LETÍCIA SIGNORI DE CASTRO

Efeito do estresse oxidativo no espermatozoide e relação com o desenvolvimento embrionário

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

Departamento:

Reprodução Animal

Área de concentração:

Reprodução Animal

Orientadora:

Profa. Dra. Mayra Elena Ortiz D'Ávila Assumpção

De acordo:

Orientadora

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

São Paulo

2014

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da
Universidade de São Paulo)

T.3039
FMVZ

Castro, Letícia Signori de
Efeito do estresse oxidativo no espermatozoide e relação com o desenvolvimento
embrionário / Letícia Signori de Castro. -- 2014.
65 f. : il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e
Zootecnia. Departamento de Reprodução Animal, São Paulo, 2014.

Programa de Pós-Graduação: Reprodução Animal.

Área de concentração: Reprodução Animal.

Orientador: Prof^a. Dr^a. Mayra Elena Ortiz D'Ávila Assumpção.

1. EROs. 2. Motilidade. 3. Produção *in vitro* de embriões. 4. Bovino. I. Título.

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Efeito do estresse oxidativo no espermatozóide e relação com o desenvolvimento embrionário", protocolado sob o nº 2710/2012, utilizando nº indeterminado de vacas e touros, sob a responsabilidade da Profa. Dra. Mayra Elena Ortiz D'Ávila Assumpção, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da "Comissão de Ética no uso de animais" da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado em reunião de 15/8/2012.

We certify that the Research "Effects of oxidative stress on spermatozoa and their relationship with embryonic development", protocol number 2710/2012, utilizing indeterminate number of cows and bulls, under the responsibility Profa. Dra. Mayra Elena Ortiz D'Ávila Assumpção, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by "Ethic Committee in the use of animals" of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of University of São Paulo and was approved in the meeting of day 8/15/2012.

São Paulo, 8 de maio de 2014.

Denise Tabacchi Fantoni
Presidente

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: CASTRO, Letícia Signori de

Título: Efeito do estresse oxidativo no espermatozoide e relação com o desenvolvimento embrionário

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

Data: ____ / ____ / ____

Banca examinadora

Prof.Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof.Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

*Dedico com carinho aos meus pais.
Meus exemplos de vida que refletem
em cada linha desta dissertação, mas
além disto, na pessoa que me tornei
para estar aqui escrevendo-a.*

AGRADECIMENTOS

Primeiro, agradeço aos meus pais, **Lúcia e Orlando**. Não existem palavras que descrevam o quanto sou grata pelo apoio incondicional de vocês. Meus principais incentivadores, sempre sentados na primeira fila das minhas realizações. Vocês são minha inspiração e “quando eu crescer quero ser igual a vocês”.

Aos peludos da minha vida, **Tico e Bella**. Titico, que nos piores dias deste mestrado foi a minha fonte de alegria. Companheiro fiel, sempre deitadinho ao meu lado em cada linha desta dissertação. Você não poderia ter vindo em melhor hora.

À minha família, **Vó Lourdes, Tia Sô, Gabi**, agradeço por entenderem minha ausência (especialmente nos dias sem jantar, né Gabi!), me apoiarem e terem orgulho do que sou. Agradeço também quem está lá de cima olhando por mim: **Vó Zilda**, quem me ensinou a ser teimosa, ter força para nunca desistir e fazer tudo com muito amor.

Às minhas irmãs por escolha, **Kaka e Tuka**, obrigada pelas várias noites das meninas, de vinhos, de japas, pelas conversas e incentivos, momentos que eu pude respirar! Aos meus **Vet amigos** (eterno grupo D), obrigada pelas piadas, brejas e risadas, mesmo de longe, sempre juntos.

Aos meus membros acessórios, o 110 e a 220v, **Adriano Siqueira e Patrícia Assis**, o que dizer a vocês? Um parágrafo é pouco para agradecer! **Pati**, minha “ROS partner”, sempre quebrando a cabeça comigo com esse tal de estresse oxidativo, minha grande companheira destas tantas FIVs. Obrigada pelas várias horas de citômetro e de fluxo, sempre pronta para fazer acontecer! **Dríiii**, atrasos à parte, se você me ensinou alguma coisa foi que calma e paciência são virtudes que eu preciso praticar mais. Obrigada pelas tardes gastas no SAS e pela paciência em transformar todos os dados (“Vai virar paramétrico na marra!”). Foi um grande prazer trabalhar com vocês!

À **Cris Lucio e Ju Baldrighi**, Pós-Docs do meu coração. Obrigada pelas palavras de carinho e incentivo diários (respectivamente, claro!). Ju, mesmo de longe, sempre na torcida (Vaaai Fitness!!!!).

À **Thais Hamilton e Camilla**, que me acompanham desde a época de pequena cientista, obrigada pelo apoio sempre. Ao **Febem (Marcelo)**, obrigada pelos *brain storms*, por tentar solucionar problemas quase insolucionáveis e estimular tanto nosso senso crítico. Aos meus colegas de laboratório sempre

dispostos para aspirar 135 ovários: **Robinson, Juliana (Kit), Mari Giasseti, ICs “trio calafrio” Karina, Carla e Catarina...**sem vocês não se faz FIV! Agradeço também ao **João Diego** por todas as análises do CASA, sempre disposto e prestativo.

À minha orientadora **Mayra**, sempre Profa. Mayra! Obrigada por comprar minhas ideias, segurar na minha mão nos tombos deste mestrado (“Professoraaaa meus sptz estão morrendo!!!”) sempre me empurrando para frente (#vaiLelê), ser mais que apenas uma orientadora.

Ao meu praticamente "Co-orientador", **Prof. Marcílio...Má**, muuuuito obrigada por estar sempre disposto a ajudar, discutir dados, estatísticas, gráficos, trocar receitas etc. Ninguém mandou ser tão prestativo e especialista em ROS.

Ao **Prof. Visintin...JAV**, às vezes distante, mas sempre de olho em nós. Obrigada por ser tantas vezes a voz da experiência e nosso grande conselheiro.

Ao **Programa de Pós-Graduação em Reprodução Animal** pela oportunidade de fazer parte desta equipe.

A todos **os professores da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia** (minha eterna casa) e **Universidade de São Paulo** que contribuíram para minha formação como pós-graduanda.

Aos **funcionários** do Departamento de Reprodução Animal (VRA) e FMVZ pelo apoio e ajuda nas situações burocráticas.

Aos nossos STAFFs de fora, **Seu João** (Frigorífico Angelelli) e **Gilberto**, sempre dispostos para coletar e transportar nossos ovários de todo dia.

À **Dra. Renata Helena Branco Arnandes**, Diretora-Geral do Instituto de Zootecnia pela doação do sêmen utilizado neste experimento.

À **FAPESP** pela bolsa e ao **CNPq** pelo auxílio financeiro.

“It always seems impossible until it’s done”

(Nelson Mandela)

RESUMO

CASTRO, L. S. de. **Efeito do estresse oxidativo no espermatozoide e relação com o desenvolvimento embrionário**. [Effects of oxidative stress on spermatozoa and relationship with embryo development]. 2014. 65 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

O *status* oxidativo do espermatozoide atua sobre ele de diferentes formas, desde a capacitação até a fecundação do oócito. No entanto, as espécies reativas de oxigênio (EROs) podem ser benéficas ou prejudiciais dependendo do contexto celular. Tendo em vista a baixa proteção antioxidante do sêmen criopreservado, associado às sucessivas manipulações que antecedem a fecundação *in vitro*, entender como esta célula se comporta em um ambiente oxidante e os impactos deste sobre o embrião é de suma importância. Com isto, o objetivo deste trabalho foi propor um modelo dose-dependente para o estudo do estresse oxidativo sobre o espermatozoide e possível impacto no desenvolvimento embrionário. Para isto, no experimento 1, palhetas de sêmen criopreservado de touros (n=5) da raça Nelore foram submetidas à incubação por 1 hora a 38,5 °C e 5% CO₂, com doses crescentes de peróxido de hidrogênio (0; 12,5; 25; e 50 µM). Ao final da incubação, os parâmetros de motilidade foram avaliados pelo sistema Computer Assisted System Analysis (CASA). No experimento 2, foram escolhidas duas doses de peróxido de hidrogênio com base nos resultados do experimento 1: alta (50 µM), baixa (12,5 µM) e também um controle (0 µM). Os espermatozoides foram incubados com as respectivas doses de peróxido de hidrogênio por 1 hora, e ao final da incubação foram utilizados para a fecundação *in vitro* (D=0). Neste experimento, além das análises do CASA, foram feitas avaliações do *status* oxidativo (CellROX® green e 2'-7'-diacetato de diclorofluoresceína - DCFH), do potencial mitocondrial (JC-1), da cromatina (LA) e da capacitação espermática (clortetraciclina). Os embriões foram avaliados com relação à taxa de clivagem rápida (30 horas pós-inseminação), taxa de clivagem (D=3), taxa de desenvolvimento (D=5) e taxa de blastocisto (D=8). Para análise estatística foi utilizado o modelo de regressão polinomial, considerando $p \leq 0,05$. Tanto no experimento 1 quanto no experimento 2 houve detrimento dose-dependente do peróxido de hidrogênio sobre o padrão de movimento e de porcentagem de células móveis. Houve aumento dose-dependente da porcentagem

de células positivas para CellROX®, células capacitadas e positivas para o LA. Com relação às taxas de clivagem e de blastocisto, houve diminuição da porcentagem de embriões clivados e de blastocistos, conforme a dose de peróxido de hidrogênio foi aumentada. Referente à taxa de desenvolvimento embrionário, houve bloqueio das estruturas em 2-4 células. Nestas condições, o espermatozoide quando exposto a um ambiente oxidante, apresenta alterações no padrão de motilidade, no *status* oxidativo e na capacitação, sendo que estas interferem de forma negativa no desenvolvimento embrionário, desde o início da clivagem até a formação do blastocisto.

Palavras-chave: EROs. Motilidade. Produção *in vitro* de embriões. Bovino.

ABSTRACT

CASTRO, L. S. de. **Effects of oxidative stress on spermatozoa and relationship with embryo development.** [Efeito do estresse oxidativo no espermatozoide e relação com o desenvolvimento embrionário]. 2014. 65 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

Oxidative status may influence spermatozoa by distinct mechanisms, from capacitation to oocyte fertilization. However, reactive oxygen species (ROS) could be beneficial or harmful depending on cellular context. Due to the low levels of antioxidant enzymes of cryopreserved semen, associated to successive manipulations prior to *in vitro* fertilization (IVF), it is momentous to understand the mechanism involved on sperm status in such conditions and the further impact on embryo development. The present study aimed to assess the possible impact of a dose-dependent model for sperm oxidative stress on embryo development. In experiment 1, straws from five Nelore bulls were subjected to a 1 hour incubation at 38,5 °C and 5% CO₂, with increase doses of hydrogen peroxide (0; 12,5; 25; e 50 µM). At the end of incubation period, motility parameters were evaluated by Computed Assisted System Analysis (CASA). Based on the results of the experiment 1, experiment 2 was designed to study a high (50 µM) and a low (12,5 µM) dose of hydrogen peroxide and also a control (0 µM). Sperm samples were incubated with each dose for 1 hour and subsequently used for *in vitro* fertilization (D=0). Samples were analyzed by CASA, oxidative status (CellROX® green and 2'-7' diclorofluorescein diacetate - DCFH), mitochondrial potential (JC-1), chromatin (LA) and sperm capacitation status (chlortetracilin). Embryos were evaluated based on fast cleavage rate (30 hours pos-insemination), cleavage rate (D=3), development rate (D=5) and blastocyst rate (D=8). Statistical analysis was performed by polynomial regression model, considering significant a $p \leq 0,05$. A dose-dependent deleterious effect of hydrogen peroxide was observed on most motility variables evaluated by CASA, including the percentage of motile cells. Similarly, a dose-dependent increase was observed on the percentages of positive cells for CellROX®, capacitated sperm and also for LA. A decrease on the percentage of cleaved embryos and blastocyst was observed as hydrogen peroxide increased. Interestingly, a blockage was detected during the 2-4 cell stage. In these conditions when exposed

to oxidative environment, sperm may present disabled motility characteristics, oxidative status and premature capacitation and such abnormalities result on impaired embryo development, from the first cleavage to blastocyst.

Keywords: ROS. Motility. In vitro embryo production. Bovine.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	17
2.1	O OXIGÊNIO COMO FONTE ENERGÉTICA.....	17
2.2	AS ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO COMO RADICAIS LIVRES	18
2.3	PRODUÇÃO DE EROS X MECANISMOS ANTIOXIDANTES.....	19
2.4	EROS E O PAPEL NA CAPACITAÇÃO ESPERMÁTICA	20
2.5	EROS E AS VÁRIAS MITOCÔNDRIAS ESPERMÁTICAS.....	21
2.6	EROS E O EFEITO SOBRE A MEMBRANA PLASMÁTICA DO ESPERMATOZOIDE	22
2.7	EROS E A MOLÉCULA DE DNA	23
2.8	O PAPEL DO ESPERMATOZOIDE NO DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO....	24
3	HIPÓTESE	27
4	OBJETIVOS.....	28
5	O DANO OXIDATIVO SOBRE O ESPERMATOZOIDE BOVINO TEM IMPACTO NO DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO: UM MODELO DE ESTUDO DOSE-DEPENDENTE	29
5.1	INTRODUÇÃO.....	29
5.2	MATERIAL E MÉTODO	31
5.2.1	Reagentes e soluções.....	31
5.2.2	Experimento 1: Efeito do estresse oxidativo induzido sobre o padrão de motilidade espermática.....	31
5.2.2.1	Processamento das amostras.....	32
5.2.2.2	Indução do estresse oxidativo com peróxido de hidrogênio.....	32
5.2.2.3	Análise de motilidade espermática computadorizada	32
5.2.3	Experimento 2: Efeito do estresse oxidativo sofrido pelo espermatozoide sobre o desenvolvimento embrionário	33
5.2.3.1	Produção <i>in vitro</i> de embriões.....	33
5.2.3.2	Avaliações espermáticas.....	34
5.2.3.2.1	<i>Ensaio de potencial de membrana mitocondrial pela sonda fluorescente JC-1</i>	<i>35</i>
5.2.3.2.2	<i>Ensaio de status oxidativo pela diacetato de diclorfluoresceína (DCFH)</i>	<i>35</i>
5.2.3.2.3	<i>Ensaio de status oxidativo pela CellROX® green</i>	<i>36</i>
5.2.3.2.4	<i>Avaliação da cromatina</i>	<i>36</i>
5.2.3.2.5	<i>Ensaio de capacitação espermática pela clortetraciclina (CTC)</i>	<i>37</i>

5.2.3.3	Avaliações do desenvolvimento embrionário.....	38
5.3	ANÁLISE ESTATÍSTICA	38
5.4	RESULTADOS	39
5.4.1	Experimento 1: O peróxido de hidrogênio promove um decréscimo dose-dependente sobre os parâmetros de motilidade espermática	39
5.4.2	Experimento 2: O espermatozoide quando exposto ao peróxido de hidrogênio promove uma queda dose-dependente do desenvolvimento embrionário	42
5.4.2.1	Validação da sonda fluorescente CellROX® green.....	42
5.4.2.2	Avaliações espermáticas.....	43
5.4.2.3	Desenvolvimento embrionário	45
5.4.2.4	Correlações entre parâmetros espermáticos e desenvolvimento embrionário	47
5.5	DISCUSSÃO.....	49
5.5.1	O estresse oxidativo em detrimento da motilidade, porém sem afetar o potencial mitocondrial	50
5.5.2	O estresse oxidativo e a capacitação espermática	51
5.5.3	O uso da CellROX® como avaliação do status oxidativo do espermatozoide	52
5.5.4	O espermatozoide oxidado e seu impacto no desenvolvimento do embrião	53
6	CONCLUSÃO	56
	REFERÊNCIAS.....	57

1 INTRODUÇÃO

Estima-se que o rebanho de bovinos no Brasil, segundo o IBGE de 2013 esteja ao redor de 211 milhões de animais, sendo o segundo maior do mundo, ficando atrás apenas da Índia. A bovinocultura de corte representa a maior fatia do agronegócio brasileiro, movimentando 167,5 bilhões de dólares em 2010, segundo a Associação Brasileira das Indústrias Exportadoras de Carne (ABIEC). Em crescimento contínuo, o rebanho brasileiro busca alternativas para melhorar a produtividade, por meio do ganho genético em cada geração.

Para tanto, as biotecnologias da reprodução atuam buscando aumentar a produção de descendentes geneticamente superiores em um menor intervalo de tempo, otimizando o potencial reprodutivo tanto da fêmea, quanto do macho. Dentre as mais conhecidas estão a inseminação artificial convencional (IA), em tempo fixo (IATF), a superovulação seguida de colheita e transferência de embriões (SOVTE) e a produção *in vitro* de embriões (PIVE), sendo esta última considerada atualmente a “menina dos olhos” da maioria dos pecuaristas.

No Brasil, a técnica de PIVE vem gradativamente sendo incorporada nos rebanhos bovinos como forma de melhoramento genético, despontando nesta tecnologia, contribuindo com 86% da produção mundial de embriões *in vitro* (MAPLETOFT, 2013). Quando comparada às outras biotécnicas, a PIVE apresenta inúmeras vantagens, sendo a principal, a não utilização de protocolos hormonais, diminuindo a variação da resposta individual e o risco de desenvolver resistência ao tratamento hormonal. Contudo, apesar dos avanços obtidos nos últimos anos, raramente a proporção de embriões, que atinge estágio de blastocisto, é superior a 40%, gerando inconstância nos resultados. A qualidade do oócito, os meios e o sistema de cultivo utilizados e também o touro podem influenciar na consistência destes resultados.

Em humanos, a PIVE é comumente utilizada por casais que não conseguem ter filhos por meios naturais. Muitos estudos já identificaram que, alterações no espermatozoide podem provocar falhas ou atraso na fecundação, além de interferir no desenvolvimento embrionário (BARTOOV et al., 2003; LIU et al., 2004; TESARIK; GRECO; MENDOZA, 2004). A causa destas alterações pode ser decorrente da exposição do espermatozoide ao sistema *in vitro*, um ambiente desfavorável que

propicia alta produção de radicais livres como as espécies reativas de oxigênio (EROs), altamente deletérias a esta célula.

Diversos pesquisadores já relataram o efeito destas EROs sobre o padrão de motilidade (RUIZ-PESINI et al., 1998), integridade de membranas (DU PLESSIS et al., 2010) e DNA espermático (AITKEN; DE IULIIS, 2010), especialmente em humanos. Sabendo que o gameta masculino contribui tanto com componentes nucleares quanto citoplasmáticos, para a formação de um novo embrião, este estudo visa entender como o espermatozoide bovino se comporta frente a um desafio oxidativo e o reflexo deste no desenvolvimento embrionário.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 O OXIGÊNIO COMO FONTE ENERGÉTICA

“Só a dose faz o veneno” (Paracelso 1493-1541). Esta frase se aplica para um dos componentes químicos essenciais a vida, o oxigênio. Os primeiros organismos que surgiram na Terra, os seres anaeróbicos, viviam em uma atmosfera rica em nitrogênio e gás carbônico, sendo o oxigênio tóxico a eles. Com o passar do tempo, evolutivamente, começaram a surgir organismos mais complexos, com mecanismos de defesa antioxidante para protegê-los do efeito tóxico do oxigênio e capazes de utilizar esta molécula como fonte para produção de energia de forma mais eficiente: os seres aeróbicos (MOJZSIS, 2001).

O oxigênio, na célula aeróbica, participa da principal via de produção de energia, a fosforilação oxidativa. Esta via metabólica fosforila o ADP em ATP, utilizando elétrons liberados de reações de oxi-redução na mitocôndria. Os principais carreadores de elétrons são a nicotinamida adenina dinucleotídeo (NAD^+) e as flavinas [(flavina mononucleotídeo (FMN) e a flavina adenina dinucleotídeo (FAD)]. As respectivas formas reduzidas (NADPH , FMNH_2 e FADH_2) são oxidadas pelo oxigênio, produzindo ATP. A oxidação ocorre em várias etapas, e a energia é liberada gradativamente, no processo denominado cadeia transportadora de elétrons (NELSON; COX, 2008).

Apesar do papel essencial que o oxigênio possui para produção de energia dos organismos aeróbicos, pode ser também um vilão. Gerschman et al. (1954) realizaram estudo paralelo entre os efeitos do oxigênio e de radiações ionizantes e propuseram que o maior efeito deletério do oxigênio é devido à produção de espécies reativas de oxigênio (EROs).

2.2 AS ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO COMO RADICAIS LIVRES

Radicais livres são quaisquer moléculas que possuem um ou mais elétrons desemparelhados no orbital e esta característica os torna moléculas altamente reativas (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2012). Normalmente são produzidos continuamente no metabolismo celular, e estão envolvidos em vias de produção de energia, fagocitose, regulação do crescimento celular, sinalização intercelular e síntese de substâncias biológicas (BARREIROS; DAVID, 2006).

Dentre os radicais livres, os mais importantes para células aeróbicas são os derivados do oxigênio que fazem parte do grupo das EROs. Estas substâncias são produzidas em uma reação em cadeia, sendo os componentes da cadeia principal o ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), e o hidroxila ($OH^{\cdot}$). O ânion superóxido é produzido principalmente de forma enzimática *in vivo*, pela redução do oxigênio (O_2) pela NADPH oxidase ou xantina oxidase. Destas reações de auto-oxidação em cadeia podem participar também gliceraldeídos, FMNH₂, FADH₂, adrenalina, noradrenalina, L-DOPA, dopamina ou componentes tiol como a cisteína, proteínas do grupo heme presentes na hemoglobina e mioglobina e na cadeia transportadora de elétrons da mitocôndria. Da dismutase enzimática do ânion superóxido forma-se o peróxido de hidrogênio, substância que não é considerada um radical livre, mas é classificada como uma ERO por ser origem de possíveis danos e passar com grande facilidade por membranas biológicas. Já o hidroxila pode ser produzido pela reação de Fenton, na qual o peróxido de hidrogênio reage com o Fe^{2+} formando Fe^{3+} e o radical hidroxila, conhecido como o radical mais lesivo à célula. Apesar de não possuir uma capacidade de difusão através das membranas tão alta, pode reagir com qualquer molécula próxima a ele, sendo considerado o principal agressor ao DNA (revisado por HALLIWELL, 2001).

A produção de EROs mitocondrial ocorre pelo vazamento de elétrons para o oxigênio, produzindo o superóxido. Normalmente na célula, esta taxa de vazamento mantém-se baixa, uma vez que a concentração de oxigênio dentro da mitocôndria é baixa. O arranjo dos complexos carreadores de elétron e a presença de proteínas desacopladoras na mitocôndria facilitam a passagem dos elétrons para o próximo complexo, ao invés deste escapar para o oxigênio. Contudo, alterações na organização da mitocôndria, seja pelo bloqueio de determinado complexo ou na

própria integridade de membrana desta organela podem favorecer o vazamento e a formação de superóxido. Uma vez formado, este ânion torna-se altamente lesivo à célula, podendo oxidar lipídeos, proteínas e DNA. É neste momento que os mecanismos antioxidantes celulares são necessários.

2.3 PRODUÇÃO DE EROS X MECANISMOS ANTIOXIDANTES

Os antioxidantes podem ser quaisquer substâncias presentes em baixas concentrações quando comparados com o substrato oxidável que previne, atrasa ou remove danos oxidativos de uma molécula alvo. Podem ser classificados como agentes que: 1- removem de forma catalítica os radicais livres; 2- diminuem a formação de radicais livres; 3- proteínas que protegem biomoléculas contra danos oxidativo; 4- promovem extinção física dos radicais livres; 5- substituem uma molécula sensível ao dano oxidativo por uma molécula resistente; ou 6- “agentes de sacrifício” que são preferencialmente oxidados pelos radicais livres no lugar de moléculas mais importantes (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2012).

Existem diversos mecanismos antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos responsáveis pela manutenção dos níveis dos radicais livres produzidos. Para os espermatozoides, a principal fonte de antioxidantes é o plasma seminal (MANN, 1954). Este fluido compensa o reduzido citoplasma que a célula espermática possui (DONNELLY; MCCLURE; LEWIS, 1999) com a presença de antioxidantes enzimáticos, como a superóxido dismutase (SOD; ALVAREZ et al., 1987), a glutational peroxidase e redutase (GPX e GSR; CHAUDIERE; WILHELMSSEN; TAPPEL, 1984) e a catalase (CAT; JEULIN et al., 1989), e não enzimáticos como o ascorbato (FRAGA et al., 1991), o α -tocoferol (AITKEN; CLARKSON, 1988), o piruvato (LAMIRANDE; GAGNON, 1992) e a glutational (LI, 1975).

Normalmente, o reparo dos danos provocados pelos agentes oxidantes ocorre em células com síntese proteica e mecanismos de reparo de DNA ativos, no entanto este não é o caso do espermatozoide. Por ser uma célula com ausência destes mecanismos e ainda possuir membrana rica em ácidos graxos poli-insaturados, o espermatozoide é extremamente sensível ao ataque dos radicais livres. Apesar

disto, sabe-se que essas moléculas também são importantes para que a célula espermática desempenhe uma de suas principais funções: fecundar o oócito.

2.4 EROS E O PAPEL NA CAPACITAÇÃO ESPERMÁTICA

O espermatozoide, quando ejaculado, não está totalmente preparado para fecundar o oócito. Uma série de eventos devem ocorrer para que este esteja apto a atravessar todo o trato reprodutivo da fêmea, ultrapassar as células do cumulus que circundam o oócito e se ligar à zona pelúcida. Estes eventos fazem parte do processo de capacitação espermática, caracterizado pelo influxo de cálcio, aumento da fluidez de membrana, aumento de pH intracelular e AMP cíclico, fosforilação de diversas proteínas e hiperativação da motilidade (SIGNORELLI; DIAZ; MORALES, 2012). Existem diversas vias e componentes fisiológicos ou indutores pelos quais pode-se dar início ao processo de capacitação. Dentre eles estão a albumina, que promove remoção do colesterol da membrana plasmática (DAVIS, 1981), o bicarbonato de sódio que altera a arquitetura da membrana propiciando a reação acrossomal (HARRISON; GADELLA, 2005), a heparina que pode ser adicionada *in vitro* para induzir a reação acrossomal (PARRISH; SUSKO-PARRISH, 1988), além das EROs.

Estudos em humanos e em bovinos mostram que o ânion superóxido, quando gerado pelo sistema xantina/xantina oxidase, pode desencadear a hiperativação e a capacitação espermática. Em contrapartida, a adição de enzimas antioxidantes ao meio como, por exemplo, a SOD, pode bloquear este processo (DE LAMIRANDE; GAGNON, 1993; O'FLAHERTY; BEORLEGUI; BECONI, 1999). Provavelmente, a ativação e o bloqueio gerados *in vitro* refletem a modulação do processo de capacitação gerada pelas enzimas antioxidantes do plasma seminal, prevenindo a capacitação precoce do espermatozoide *in vivo*. Em bovinos, a adição de peróxido de hidrogênio em baixas doses, promove um efeito tempo e dose-dependente sobre a fosforilação da tirosina de algumas proteínas envolvidas na capacitação, sendo este efeito reduzido sob altas doses (RIVLIN et al., 2004).

O envolvimento das EROs no processo de capacitação *in vitro*, depende das condições de incubação (meios, tampões, indutores), bem como o tempo de

exposição da célula, sendo os efeitos espécie-específicos (DE LAMIRANDE et al., 1997). O espermatozoide quando exposto aos agentes capacitantes, imediatamente inicia a produção do superóxido (O'FLAHERTY; BEORLEGUI; BECONI, 2003). Provavelmente, esta produção seja gerada pelas oxidases espermáticas no meio extracelular, porém a via e as enzimas que atuam neste processo ainda não foram bem esclarecidas (O'FLAHERTY; DE LAMIRANDE; GAGNON, 2006).

2.5 EROS E AS VÁRIAS MITOCÔNDRIAS ESPERMÁTICAS

Evolutivamente, as espécies poligâmicas, com maior competição espermática, possuem maior volume da peça intermediária quando comparadas às monogâmicas (ANDERSON; DIXSON, 2002). Provavelmente, porque é nesta região que se localiza a fonte energética do espermatozoide: as mitocôndrias.

Na parte central da peça intermediária forma-se o axonema, uma estrutura composta por nove pares de microtúbulos dispostos radialmente ao redor de dois filamentos centrais. Este é envolto na periferia por numerosas mitocôndrias, dispostas em forma de hélice e que são responsáveis pela produção de energia para a motilidade espermática (HAFEZ; HAFEZ, 2003). Mas, assim como discutido anteriormente, as mitocôndrias também são responsáveis pela produção de radicais livres como o superóxido.

Sabe-se que nos espermatozoides, a geração de EROs pode ocorrer na cadeia transportadora de elétrons ou pela enzima NADPH oxidase (KOPPERS et al., 2008). A combinação de alta demanda energética e limitado maquinário antioxidante torna o espermatozoide uma célula extremamente suscetível ao desbalanço entre EROs produzidos e defesa antioxidante. Diversos trabalhos já demonstraram o efeito da produção de EROs em detrimento da motilidade espermática. Ruiz-Pesini et al. (1998) identificaram correlação positiva entre motilidade espermática e enzimas específicas da mitocôndria (complexo I, II e IV), sugerindo que uma disfunção mitocondrial nestes complexos pode justificar os casos de astenozoospermia idiopática em humanos. Sondas específicas para produção de EROs mitocondriais mostram que a excessiva produção destes radicais livres podem resultar na peroxidação lipídica de membranas e perda de motilidade (DU PLESSIS et al., 2010;

AITKEN et al., 2012). Ferramosca et al. (2013) demonstraram que o estresse oxidativo afeta negativamente a respiração mitocondrial por meio do desacoplamento entre o transporte de elétrons e a síntese de ATP. Neste caso, a eficiência de respiração mitocondrial diminuída pode ser uma das causas do decréscimo de motilidade frente à alta produção de EROs. A inibição da fosforilação oxidativa também pode induzir dano peroxidativo na peça intermediária, e este dano contribuir para perda de motilidade total e progressiva dos espermatozoides (KOPPERS et al., 2008). Desta forma, as muitas mitocôndrias responsáveis por sustentar a motilidade também podem ser uma arma contra a própria célula, danificando também outra organela fundamental, a membrana plasmática do espermatozoide, alvo altamente oxidável.

2.6 EROS E O EFEITO SOBRE A MEMBRANA PLASMÁTICA DO ESPERMATOZOIDE

A membrana do espermatozoide é uma estrutura altamente complexa, com diversos domínios caracterizados por proteínas essenciais para adesão e fusão da membrana espermática com a zona pelúcida. É rica em ácidos graxos poli-insaturados (PUFAs) que, devido a conformação, contribuem para maior fluidez de membrana do espermatozoide. Contudo, os PUFAs também são altamente suscetíveis ao ataque das EROs, sofrendo o processo conhecido como peroxidação lipídica (FLESCHE; GADELLA, 2000).

As EROs quando reagem com os lipídeos de membrana promovem a formação de radicais carbono com o potencial para produzir a peroxidação do ácido graxo adjacente. Esta reação em cadeia é considerada altamente deletéria, o que acarreta diminuição da fluidez de membrana e consequente redução da capacidade fecundante do espermatozoide (AITKEN; CLARKSON; FISHEL, 1989; ZABLUDOVSKY et al., 1999).

Para as espécies domésticas, a peroxidação lipídica está normalmente relacionada ao processo de resfriamento e criopreservação do espermatozoide (PARTYKA; LUKASZEWICZ; NIŻAŃSKI, 2012; GÓMEZ-FERNÁNDEZ et al., 2013). Brouwers e Gadella (2003) verificaram que amostras de sêmen fresco bovino

possuem uma porcentagem muito pequena de células sofrendo peroxidação lipídica, porém após a criopreservação esta porcentagem pode chegar a até 60%. Esta peroxidação pode promover alterações de membrana e diminuir o potencial fecundante, uma vez que touros com baixos níveis de peroxidação lipídica têm maiores chances de gerar descendentes quando comparado com os de altos níveis (KASIMANICKAM et al., 2007).

O processo de descongelação pode causar danos oxidativos decorrentes do rápido aumento da utilização de oxigênio pela célula, após um período de interrupção do metabolismo, determinando maior produção de EROs (BALL; VO, 2002). Somado a isto, após a criopreservação, o espermatozoide apresenta diminuição da atividade das enzimas antioxidantes, tornando-o ainda mais suscetível às EROs (BILODEAU et al., 2000).

Em humanos, já foi demonstrado uma correlação negativa entre a produção de derivados da peroxidação lipídica (malondialdeído e 4-hidroxi-alcenais) com motilidade e padrão do movimento espermático, viabilidade e competência de fusão com a membrana do oócito (GOMEZ; IRVINE; AITKEN, 1998). O malondialdeído é considerado altamente mutagênico e carcinogênico, pois pode reagir com o DNA formando, assim como as EROs, ligações com a deoxiguanosina e deoxiadenosina, provocando mutações pontuais (MARNETT, 1999). Sendo assim, a peroxidação lipídica pode provocar lesões tanto das membranas do espermatozoide, quanto do próprio DNA.

2.7 EROS E A MOLÉCULA DE DNA

A molécula de DNA é relativamente estável, porém pode sofrer decomposição química espontânea. A perda de bases purinas pode acontecer aproximadamente 10^4 vezes ao dia, no genoma humano (BARNES; LINDAHL, 2004). Porém, esta perda não pode ocorrer no DNA espermático, que carrega metade das informações para gerar um novo indivíduo. Para tanto, o DNA dos espermatozoides mamíferos é considerado o DNA mais compactado das células eucariotas (WARD; COFFEY, 1991). As protaminas (proteínas nucleares) substituem as histonas durante o processo de espermatogênese e são responsáveis por este alto grau de

compactação (ZINI; AGARWAL, 2011). Esta troca permite que todo conteúdo do DNA paterno fique protegido na pequena estrutura que é a cabeça do espermatozoide, seja armazenado no trato reprodutivo masculino e transportado pelo trato feminino, momento no qual ele fica mais suscetível aos danos, como, por exemplo, a oxidação causada pelos radicais livres.

O radical hidroxila desempenha um papel determinante no dano à cromatina, podendo alterar a estrutura de bases nitrogenadas em moléculas de DNA e RNA, gerando componentes oxidantes e assim, iniciando um processo de oxidação em cadeia. Por exemplo, o radical hidroxila pode se ligar à guanina no carbono 8 do anel aromático, formando o 8'-hidroxi-2'-deoxiguanina (8OHdG), molécula conhecida como "fingerprint" do dano oxidativo ao DNA (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2012). No caso de células com replicação de DNA ativo, estas alterações na estrutura do DNA podem ser reparadas, impedindo a perpetuação do dano gerado pelas EROs. Contudo, o espermatozoide maduro é uma célula com replicação inativa, não sendo capaz de reparar este tipo de dano.

No espermatozoide o ataque das EROs pode causar a ligação entre as bases, o que desestabiliza a molécula, gerando quebras na fita de DNA (AITKEN; DE IULIIS, 2010). Estudos em humanos demonstraram que a presença de 8OHdG em espermatozoides tem alta correlação com fragmentação do DNA (DE IULIIS et al., 2009). Além disto, o dano de DNA está mais relacionado à produção de EROs gerado pela criopreservação do que a apoptose celular (THOMSON et al., 2009). A célula espermática que sofre ação das EROs e ainda assim consegue fecundar o oócito podem carrear alterações não reparadas no DNA, com sérias consequências para o embrião que será gerado.

2.8 O PAPEL DO ESPERMATOZOIDE NO DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO

Diversos trabalhos já verificaram que a presença de anormalidades no espermatozoide, que provocam falha ou atraso na fecundação, também podem provocar alterações no desenvolvimento embrionário em humanos (BARTOOV et al., 2003; LIU et al., 2004; TESARIK; GRECO; MENDOZA, 2004). O impacto dos

espermatozoides no desenvolvimento embrionário pode ser classificado como efeito precoce ou tardio (BARROSO et al., 2009). Os efeitos precoces estariam relacionados a fatores do espermatozoide como alterações no centríolo e citoesqueleto, que desencadeariam falhas na ativação oocitária e atraso nas primeiras clivagens (TESARIK; GRECO; MENDOZA, 2004). Já os efeitos tardios estão principalmente relacionados às alterações do DNA espermático.

O início das primeiras clivagens embrionárias já foi correlacionado a fatores paternos, que podem interferir na velocidade do desenvolvimento inicial do embrião (WARD et al., 2001), como a duração da primeira fase de síntese, antes da primeira clivagem (COMIZZOLI et al., 2000). Além disto, sugere-se que 40% das falhas após o procedimento de ICSI (*intracytoplasmic sperm injection*) sejam decorrentes de falha na ativação oocitária (RAWE et al., 2000), ou alterações da proteína PLC ζ (zeta) espermática, responsável por iniciar a oscilação de cálcio necessária para ativação oocitária (YOON et al., 2008). Outro fator citoplasmático envolvido na falha da fecundação seria as alterações nos microtúbulos, que podem bloquear o oócito desde a fase de metáfase II, na expulsão do 2º corpúsculo polar, até momentos antes da 1ª clivagem (ASCH et al., 1995). Estudos mais recentes tem verificado a participação de componentes não-genômicos como proteínas citoplasmáticas e os RNAs presentes nos espermatozoides, no desenvolvimento embrionário (YAMAUCHI; SHAMAN; WARD, 2011; LIU et al., 2012), mas o conhecimento sobre o impacto destes componentes extra-nucleares sobre o embrião ainda são limitados.

Já os fatores nucleares, como a fragmentação do DNA espermático, são amplamente discutidos, especialmente em humanos, uma vez que este dano de DNA pode refletir além da taxa de fecundação (SUN; JURISICOVA; CASPER, 1997), mas também na qualidade embrionária (SALEH et al., 2003) e até mesmo no conceito (AITKEN, 2001).

O DNA do espermatozoide, mesmo que já compactado, pode sofrer injúrias do ambiente externo que refletem na integridade. Em bovinos, Fatehi et al. (2006) verificaram que espermatozoides expostos a radiações γ (gama) apresentam dano de DNA espermático, sendo que este dano não prejudica a capacidade fecundante nem reflete nas primeiras clivagens, mas bloqueia a formação de blastocistos. Além disto, correlações entre níveis de EROs e índices de fertilidade, bem como falhas no desenvolvimento precoce de embriões oriundos de espermatozoides expostos a

oxidação, já foram descritos em humanos e em primatas (AGARWAL et al., 2005; BURRUEL et al., 2013).

A principal meta dos estudos na área de PIVE é tornar o sistema artificial (a incubadora e os meios de cultivo) cada vez mais próximo do sistema reprodutivo feminino, uma vez que, em bovinos, todo processo desde a maturação do oócito até o 7º dia de vida do embrião são realizados nestas condições. Uma das diferenças entre o sistema *in vivo* e o *in vitro* é a concentração de oxigênio. No oviduto e útero da maioria dos mamíferos as concentrações de oxigênio ficam ao redor de 5% a 7% (BONTEKOE et al., 2012). Estas concentrações são muito baixas quando comparadas as concentrações de oxigênio no ar atmosférico (ao redor de 20%). A exposição, tanto de gametas como de embriões ao excesso de oxigênio durante as manipulações torna inevitável a maior produção de EROs, tornando o sistema *in vitro* mais delicado.

Três principais fatores podem contribuir para o acúmulo de EROs *in vitro*: 1- ausência de mecanismos de defesa endógenos; 2- exposição de gametas e embriões às sucessivas manipulações; e 3- criação de ambiente propício para a geração de estresse oxidativo, como as altas concentrações de oxigênio (DU PLESSIS et al., 2008). Para a fecundação *in vitro*, os espermatozoides são submetidos a procedimentos como gradiente de Percoll® para a remoção do diluidor, de células mortas e do crioprotetor, perdendo assim a proteção antioxidante, tanto dos diluidores, quanto do plasma seminal.

Sabendo da importância do espermatozoide no momento da fecundação, na ativação do oócito e no desenvolvimento embrionário inicial, entender como esta célula responde ao dano oxidativo, mesmo após tantas manipulações é essencial para buscar alternativas para minimizar estes danos. Além disto, esclarecer qual o impacto deste espermatozoide, exposto ao estresse oxidativo, sobre o desenvolvimento embrionário auxiliará na identificação dos pontos críticos da produção *in vitro* de embriões.

3 HIPÓTESE

O espermatozoide bovino criopreservado, quando exposto a um ambiente oxidante, sofre alterações no padrão de motilidade, no potencial mitocondrial e na cromatina que refletem na capacidade fecundante e no desenvolvimento embrionário *in vitro* subsequente.

4 OBJETIVOS

Principal

- Verificar o impacto do estresse oxidativo induzido no espermatozoide sobre os atributos espermáticos e produção *in vitro* de embriões bovinos.

Específicos

- Avaliar o efeito dose-dependente de concentrações de peróxido de hidrogênio nos parâmetros de motilidade espermática;
- Avaliar o impacto da exposição de espermatozoides a diferentes concentrações de peróxido de hidrogênio no status oxidativo, potencial mitocondrial, capacitação espermática e integridade de cromatina;
- Avaliar o efeito de espermatozoides expostos ao peróxido de hidrogênio nas taxas de clivagem, desenvolvimento embrionário e blastocisto *in vitro*.

5 O DANO OXIDATIVO SOBRE O ESPERMATOZOIDE BOVINO TEM IMPACTO NO DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO: UM MODELO DE ESTUDO DOSE-DEPENDENTE

5.1 INTRODUÇÃO

Em humanos, a produção *in vitro* de embriões (PIVE) surgiu como alternativa para casais que não conseguiam ter filhos naturalmente, após coito programado ou inseminação artificial (AITKEN; NIXON, 2013). Já na reprodução animal, principalmente em bovinos, a PIVE ganha cada vez mais força nos programas de melhoramento genético do rebanho por ser a biotecnologia que mais contribui para diminuir o intervalo entre gerações. O Brasil desponta nesta tecnologia, contribuindo com 86% da produção mundial de embriões *in vitro* (MAPLETOFT, 2013). Apesar disto, a PIVE ainda enfrenta algumas barreiras com relação à homogeneidade de resultados.

O touro pode determinar a capacidade de desenvolvimento de embriões PIVE (PALMA; SINOWATZ, 2004; XU et al., 2006), visto que influencia no momento (WARD et al., 2001), e na duração (COMIZZOLI et al., 2000) da primeira clivagem. Em humanos, diversos trabalhos já identificaram a influência do espermatozoide no desenvolvimento embrionário, seja por componentes extra-nucleares (ASCH et al., 1995; RAWE et al., 2000; YOON et al., 2008) ou nucleares (SUN; JURISICOVA; CASPER, 1997; AITKEN, 2001; SALEH et al., 2003).

Uma das diferenças entre o sistema *in vitro* e o *in vivo* é a concentração de oxigênio. Os valores de 20% de oxigênio em ar são superiores aos valores encontrados no oviduto e útero da maioria dos mamíferos (BONTEKOE et al., 2012). A exposição de gametas e embriões a este excesso de oxigênio durante as manipulações torna inevitável a maior produção de espécies reativas de oxigênio (EROs). Estudos em humanos já relataram correlações entre níveis de EROs no espermatozoide e índices de fertilidade na reprodução assistida, sugerindo a análise prévia do sêmen para EROs como forma de direcionamento do procedimento de PIVE (AGARWAL et al., 2005). Em oócitos de primatas submetidos à ICSI com espermatozoide expostos ao estresse oxidativo foram identificadas falhas no

desenvolvimento embrionário, com divisões anormais e alta taxa de fragmentação nuclear de blastômeros (BURRUEL et al., 2013). Estes dados sugerem que, o espermatozoide quando exposto a um ambiente oxidante pode ter tanto componentes citoplasmáticos quanto nucleares afetados pelos radicais livres, e isto reflete diretamente sobre o embrião oriundo desta célula danificada.

Sabe-se que nos espermatozoides, a geração de EROs pode ocorrer na cadeia transportadora de elétrons ou pela enzima NADPH oxidase (KOPPERS et al., 2008). Sendo uma célula com alta demanda energética e, portanto com mitocôndrias extremamente ativas, a produção excessiva de EROs pela via mitocondrial pode sobrepor os já limitados mecanismos antioxidantes de forma muito rápida. As EROs são conhecidas por participarem do processo de capacitação (O'FLAHERTY; BEORLEGUI; BECONI, 1999; RIVLIN et al., 2004), porém no espermatozoide são normalmente vistas como ameaça à integridade celular. Sondas específicas para produção de EROs mitocondriais mostram que a excessiva produção destes radicais livres podem resultar na peroxidação lipídica de membranas e perda de motilidade (DU PLESSIS et al., 2010; AITKEN et al., 2012). Além disto, apesar do DNA espermático ser altamente compactado pelas protaminas (ZINI; AGARWAL, 2011), o ataque das EROs pode provocar a formação de adutos entre as bases que desestabiliza a molécula, gerando quebras na fita de DNA (AITKEN; DE IULIIS, 2010). Sugere-se então que esta célula que sofreu ação das EROs e ainda assim conseguiu fecundar o oócito, pode carrear alterações não reparadas no DNA com sérias consequências para o embrião que está se desenvolvendo.

Frente a isto, a hipótese deste trabalho é a de que o espermatozoide bovino criopreservado, quando exposto a um ambiente oxidativo, sofre alterações no padrão de motilidade, mitocôndria e, em menor grau, de cromatina espermática que podem interferir no desenvolvimento embrionário. Além disto, propõe-se um novo método, mais sensível de análise do *status* oxidativo em espermatozoide bovino, pela citometria de fluxo.

5.2 MATERIAL E MÉTODO

O presente estudo foi realizado nos Laboratórios de Biologia do Espermatozoide e no Laboratório de Andrologia, ambos nas dependências do Departamento de Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo. Todos os procedimentos foram realizados de acordo com o Comitê de Bioética desta instituição (protocolo nº 2710/2012).

5.2.1 Reagentes e soluções

Todos os reagentes químicos e soluções utilizados nestes experimentos são da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, E.U.A.), caso contrário o fabricante está indicado na sequência.

5.2.2 Experimento 1: Efeito do estresse oxidativo induzido sobre o padrão de motilidade espermática

Para este experimento, foram utilizadas palhetas de sêmen congelado de touros da raça Nelore doadas por Centrais de Processamento e Coleta de Sêmen. Avaliações prévias de motilidade total (pós-descongelação e pós-gradiente de Percoll®) e concentração foram realizadas de diversos animais de modo que o grupo de touros selecionados fosse homogêneo com relação a estas variáveis. Palhetas de cinco touros (n=5) da mesma partida, com motilidade pós-Percoll® ao redor de 70 a 80% foram selecionadas. Este experimento foi realizado em quatro replicatas no período de duas semanas.

5.2.2.1 Processamento das amostras

Visando manter as mesmas condições de processamento do sêmen que antecede a fecundação *in vitro* (FIV), o experimento 1 foi realizado da seguinte forma: Cada palheta de sêmen (0,25 mL) foi descongelada em água a 37 °C por 30 segundos e submetida ao gradiente de Percoll® (45% e 90%) a 9000 G/5 minutos. O sedimento de células com motilidade foi recuperado e lavado em 1 ml de Sp-TALP (PARRISH; SUSKO-PARRISH, 1988) a 9000 G/3 minutos. Este segundo sedimento foi ressuspensionado para uma concentração final de 25×10^6 espermatozoides/mL de meio Fert-TALP (PARRISH; SUSKO-PARRISH, 1988), sem os agentes capacitores (heparina, penicilamina, epinefrina e hipotaurina). A mesma amostra de sêmen foi dividida entre os grupos experimentais e incubada durante 1 hora a 38,5 °C com alta umidade e 5% de CO₂.

5.2.2.2 Indução do estresse oxidativo com peróxido de hidrogênio

Para indução do estresse oxidativo, foi utilizado peróxido de hidrogênio 30% (Perhydrol® MERCK Millipore) diluído em meio Fert-TALP, para uma solução uso de 625 µM. O peróxido de hidrogênio está dentro do grupo das EROs, mas não é considerado um radical livre. Este é considerado um agente oxidante fraco, porém tem alta capacidade de penetrar em membranas e pode reagir com íons de ferro ou cobre, formando radicais mais potentes, como o hidroxila. Os grupos deste experimento foram: 0 (controle); 12,5; 25 e 50 µM de peróxido de hidrogênio.

5.2.2.3 Análise de motilidade espermática computadorizada

A análise computadorizada foi realizada utilizando-se o sistema Computer Assisted Sperm Analysis (CASA; IVOS, v 12.2, Hamilton Thorn Research, Beverly, MA). As lâminas aquecidas à 37 °C foram preenchidas com 5 µL da amostra e 6 campos foram selecionados para análise. Os parâmetros considerados foram: VAP

(velocidade média de percurso), VCL (velocidade curvo-linear), VSL (velocidade linear), BCF (frequência de batida cruzada), ALH (amplitude de deslocamento lateral de cabeça), motilidade total e progressiva, porcentagem de células com movimento rápido, médio, lento e estático. Dentre os parâmetros de motilidade avaliados pelo CASA, foram escolhidos os parâmetros motilidade e motilidade progressiva como mais relevantes para escolha das doses de peróxido de hidrogênio utilizadas no experimento 2.

5.2.3 Experimento 2: Efeito do estresse oxidativo sofrido pelo espermatozoide sobre o desenvolvimento embrionário

Neste experimento, foram utilizados na fecundação *in vitro*, espermatozoides submetidos à indução de estresse oxidativo, utilizando duas concentrações de peróxido de hidrogênio escolhidas a partir dos resultados do experimento 1. Esta indução visa comparar o impacto deste estresse oxidativo sofrido pelo espermatozoide sobre a clivagem, o desenvolvimento embrionário e a taxa de blastocisto. Este experimento foi realizado em 10 replicatas, no período de dois meses, sendo que foram utilizados de 200 a 220 oócitos por replicata.

5.2.3.1 Produção *in vitro* de embriões

Foram utilizados ovários de vacas destinadas ao abatedouro comercial, sendo estes transportados em recipiente térmico, com solução salina 0,9% a 30 °C. No laboratório, os ovários foram lavados em solução salina também a 30 °C, e folículos com diâmetro entre 2 e 8 mm foram aspirados utilizando agulha 21G e seringa de 5 mL. Apenas complexo cumulus oophorus (CCOs) com camadas de células do cumulus compactas e íntegras, e citoplasma homogêneo foram selecionados para maturação *in vitro* (MIV). Os CCOs selecionados foram lavados 3x em meio pré-MIV (TCM199 Hepes suplementado com 10% de SFB, 22 µg/mL de piruvato e 50 µg/mL de gentamicina) e meio MIV [TCM199 Bicarbonato suplementado com 10% de SFB

(Gibco®), 22 µg/ml de piruvato, 50 µg/mL de gentamicina, 0,5 µg/mL de FSH–Folltropin-V (Vetrepharm, Inc., Belleville, ON, Canada), 50 µg/mL de gonadotrofina coriônica humana (Vetecor Laboratories, Calier, Spain) e 1 µg/mL de 17b-estradiol]. Em seguida os CCOs foram colocados para maturação (20-30 oócitos/gota) em incubadora a 38,5 °C com alta umidade e 5% de CO₂ em ar por 22 a 24 horas.

Para a FIV, o mesmo processamento do sêmen e indução descritos no experimento 1 foram utilizados. Porém, após o ajuste da concentração, foi realizado um *pool* de três touros, de modo a eliminar o efeito touro. Os grupos foram: 50 µM (alta dose); 12,5 µM (baixa dose); e 0 µM de peróxido de hidrogênio (controle).

Os oócitos maturados foram lavados em meio pré-FIV [TCM199 Hepes suplementado com 0,003% de BSA-V (m/v), 22 µg/mL de piruvato e 50 µg/mL de gentamicina], em seguida em meio Fert-TALP e colocados de 20-30 oócitos/gota, sob óleo mineral.

Ao final do período de incubação do sêmen, em cada amostra foram adicionados 550 µL de meio Fert-TALP e estas lavadas a 9000 G/90 segundos. O sedimento contendo as células foi recuperado para inseminação dos oócitos (± 100.000 espermatozoides/gota) e o restante da amostra utilizada para análises subsequentes. O dia da FIV foi considerado como D=0 do cultivo.

Após o período de fecundação (18 horas; D=1), os presumíveis zigotos foram lavados, sendo o excesso de células do cumulus removido mecanicamente em meio pré-FIV. Os presumíveis zigotos foram colocados então no meio de cultivo KSOM (Millipore, MR 020P-5D) e cultivados por 8 dias em incubadora a 38,5 °C, 5% de CO₂, 5% de O₂ e 90% de N₂, sob alta umidade. No 3º dia de cultivo (D=3), foi adicionado soro fetal bovino de modo que os embriões fossem cultivados a partir deste momento com 5% de soro.

5.2.3.2 Avaliações espermáticas

Com o restante da amostra foi realizada a análise da motilidade espermática computadorizada pelo CASA, como descrito no experimento 1, além das análises por microscopia de epifluorescência (Olympus IX80, Olympus Corporation) e no

citômetro de fluxo Guava EasyCyte™ Mini System (Guava® Technologies, Hayward, CA, E.U.A.). Este equipamento possui um laser de excitação de 488 nm e emite uma radiação laser visível a 20 mW. O total de 20.000 eventos por amostra foi avaliado e os dados referentes à fluorescência amarela (PM1 photodetector – 583 nm), vermelha (PM2 photodetector – 680 nm) e verde (PM3 photodetector – 525 nm) foram recuperados após amplificação logarítmica. Células duplas e debris foram excluídos utilizando FL3-A versus FL3-W *gate* e todos os dados foram analisados pelo software FlowJo® v10.2.

5.2.3.2.1 *Ensaio de potencial de membrana mitocondrial pela sonda fluorescente JC-1*

O potencial de membrana mitocondrial foi detectado pela sonda fluorescente JC-1 (5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethyl-benzimidazolylcarbocyaninechloride). Este monômero emite fluorescência verde no caso de mitocôndrias com alto potencial de membrana e vermelha no caso de médio e baixo potencial. Para análise, 187.500 células em meio FIV foram coradas com JC-1 (concentração final de 1 µM), incubadas por 10 minutos a 37 °C, protegido da luz. Para leitura no citômetro de fluxo foi completado o volume da suspensão com 300 µL de PBS à 37 °C. Como controle positivo para análise dos dados, foi utilizado o protocolo descrito por Celeghini et al., 2007, com algumas modificações. Uma amostra de sêmen foi submetida 10x à congelamento e descongelamento em nitrogênio líquido, para rompimento das membranas celulares, e como controle negativo uma amostra apenas processada como descrito no experimento 1.

5.2.3.2.2 *Ensaio de status oxidativo pela diacetato de diclorofluoresceína (DCFH)*

O 2'7' diacetato de diclorofluoresceína (DCFH) é convertido da forma não fluorescente em uma molécula fluorescente por esterases celulares e consequente oxidação da célula, classificando a população celular como positiva (fluorescência

verde) ou negativa (sem fluorescência). Para o ensaio, 187.500 células foram coradas com uma solução contendo DCFH e iodeto de propídeo (PI), na concentração final de 9,3 μM e 6 μM , respectivamente, por 5 minutos no escuro a 37 °C. Para leitura no citômetro de fluxo foi completado o volume da suspensão com 300 μL de PBS à 37°C. Para análise dos dados, foi selecionado a população de células PI-DCFH+ (sem alteração de membrana e estressadas).

5.2.3.2.3 Ensaio de status oxidativo pela CellROX® green

A sonda CellROX® green (Molecular Probes, Eugene, OR, E.U.A.) penetra na célula e quando oxidada pelos radicais livres intracelulares liga-se ao DNA, emitindo fluorescência verde mais intensa. Para o ensaio, 187.500 células foram coradas com CellROX® (concentração final de 5 μM) por 30 minutos a 37 °C, sendo que nos últimos 10 minutos foi adicionado PI (concentração final de 6 μM). Para leitura no citômetro de fluxo foi completado o volume da suspensão com 300 μL de PBS à 37 °C. Para análise dos dados, a população de células foi dividida em 4 quadrantes, sendo a população PI-VD+ (sem alteração de membrana e estressadas) considerada como a mais relevante para análise. Como não existem ainda dados na literatura da utilização desta sonda em espermatozoide bovino, foi realizada a validação desta técnica para citometria de fluxo com doses crescentes de peróxido de hidrogênio (0, 12,5, 50 e 200 μM , 1 hora de incubação a 38,5 °C, 5% de CO_2). As mesmas amostras também foram submetidas à coloração com a sonda DCFH, visando comparar as duas técnicas.

5.2.3.2.4 Avaliação da cromatina

A estabilidade da cromatina espermática foi avaliada pelo ensaio baseado no teste *sperm chromatin structure assay* (SCSA; EVENSON; JOST, 2000), como descrito por Simões et al. (2013). Este ensaio é baseado na denaturação provocada

pelo detergente ácido que quebra as ligações de hidrogênio da molécula de DNA, separando a dupla fita. Isto permite que a molécula de laranja de acridina (LA) intercale-se a ele, emitindo fluorescência vermelha (fita simples) ou verde (fita dupla; LA+). Para o ensaio, 375.000 células foram incubadas com tampão TNE (Tris-HCl 0,01 M, NaCl 0,15 M, EDTA 1 mM em água destilada, pH 7,4) e detergente ácido (HCl 0,08 M, NaCl 0,15 M, Triton X-100 0,1% em água destilada, pH 1,2). Após 30 segundos, foi adicionado à solução de LA (ácido cítrico 0,1 M, Na₂HPO₄ 0,2 M, EDTA 0,001 M, NaCl 0,15 M, LA stock 6 µg/mL em água destilada, pH 6), e cada amostra foi avaliada por citometria de fluxo, após 10 minutos de incubação a 37 °C. Como controle positivo para análise dos dados, uma amostra foi incubada por 5 minutos com ácido clorídrico (1,2 M em detergente ácido, pH 0,1) e como controle negativo foi utilizado uma amostra apenas processada, como descrito no experimento 1.

5.2.3.2.5 Ensaio de capacitação espermática pela clortetraciclina (CTC)

O estado de capacitação espermática foi acessado pela clortetraciclina (CTC), como descrito por Ward e Storey (1984) com algumas modificações. A CTC penetra pela membrana celular ligando-se ao cálcio livre, fluorescendo mais intensamente nestas regiões. Uma alíquota contendo 375.000 células foi adicionada à solução de 20 µL de clortetraciclina, feita no mesmo dia do uso (CTC 38 µM; solução STOCK: TRIS 20 mM, NaCl 130 mM e L-cisteína 4 mM) e fixadas com 5 µL de paraformaldeído 4%. Uma alíquota desta suspensão foi colocada sobre lâmina, misturando sobre a mesma solução de DABCO (1,4-diazabicyclo [2.2.2]octano) e glicerol (1:9). A mistura foi coberta com lamínula e mantida a -20 °C protegido da luz até posterior leitura. A contagem das 200 células foi realizada com óleo de imersão em aumento de 1000x em microscópio com iluminação epifluorescente (Olympus IX80, Olympus Corporation), utilizando o filtro de 355 nm de excitação e 465 nm de emissão. Três categorias celulares foram identificadas: não capacitadas (toda cabeça corada em amarelo), capacitadas (apenas a região do acrossomo corada em amarelo) e reativas (apenas a região pós-acrossomal levemente corada em amarelo).

5.2.3.3 Avaliações do desenvolvimento embrionário

A taxa de clivagem rápida foi avaliada 30 horas pós-inseminação (30 h.p.i), realizando a contagem de estruturas que já apresentavam a primeira clivagem até este momento e a taxa de clivagem foi realizada no 3º dia de cultivo (D=3). A taxa de desenvolvimento embrionário foi avaliada no 5º dia de cultivo (D=5), sendo que os embriões foram classificados de acordo com seu estágio: não clivados (NC), 2-4 células e 8-16 células. Por fim, a taxa de blastocisto foi realizada no 8º dia de cultivo (D=8). Todas estas avaliações foram feitas em estereomicroscópio na magnificação de 63x.

5.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram testados quanto à normalidade dos resíduos e homogeneidade das variâncias, caso estas premissas não fossem obedecidas, os dados foram transformados. Para análise estatística foi utilizado o programa SAS 9.3 (*Statistical Analysis System*) pelo procedimento PROC GLM para o modelo de regressão polinomial. No experimento 1 e 2 foi considerado efeito principal de tratamento. No experimento 2 também foi realizada análise de correlação de Spearman (não-paramétrica) pelo procedimento PROC CORR para verificar possíveis correlações entre as variáveis estudadas. Neste caso, foram analisados os grupos que receberam ou não peróxido de hidrogênio, sendo os tratamentos 12,5 e 50 μ M agrupados. Foi considerado p significativo < 0,05.

5.4 RESULTADOS

5.4.1 Experimento 1: O peróxido de hidrogênio promove um decréscimo dose-dependente sobre os parâmetros de motilidade espermática

Neste experimento foi possível identificar o efeito dose-dependente do peróxido de hidrogênio sobre o padrão de motilidade do espermatozoide bovino. Foi observado efeito negativo da concentração crescente de peróxido de hidrogênio, que ocorreu de forma semelhante sobre os parâmetros VAP, VSL e VCL. Este decréscimo ocorreu de forma menos acentuada para o BCF (Figura 1A). Com relação à motilidade total e progressiva, a queda destes parâmetros ocorreu também de forma semelhante, sendo mais intensa entre as doses de 25 e 50 μ M (Figura 1B). Houve também efeito de tratamento para porcentagem de células com movimento rápido, médio, lento e estático. A porcentagem de células com movimento rápido apresentou decréscimo semelhante à motilidade progressiva, e a porcentagem de células com movimento médio, lento e estático apresentou aumento conforme se aumentou a dose de peróxido de hidrogênio (Figura 1C). A Tabela 1 apresenta, juntamente com as médias por tratamento, os parâmetros que apresentaram efeito de tratamento ($p < 0,05$) e respectivos valores de r^2 e equações da reta.

Figura 1 – Parâmetros de motilidade espermática com efeito de tratamento para o peróxido de hidrogênio

Legenda: (A) Unidades de VAP, VSL e VCL = $\mu m/s$ e BCF = hertz; (B) Total = motilidade total, Prog. = motilidade progressiva.

Com base na equação da reta gerada para os parâmetros motilidade total e motilidade progressiva (Tabela 1), as doses de 12,5 e 50 μM foram escolhidas como baixa e alta dose de peróxido de hidrogênio, para serem utilizadas no experimento 2. Essas doses foram escolhidas de modo a manter um nível aceitável de motilidade para fecundação *in vitro* (53% e 26% para motilidade e 41,7% e 8% para motilidade progressiva, como baixa e alta dose, respectivamente).

Tabela 1 – Parâmetros de motilidade espermática. Média e erro padrão, valores de p, r^2 e equação da reta para cada variável avaliada no experimento 1

	0 μM	12.5 μM	25 μM	50 μM	p	r^2	Equação
VAP ($\mu\text{m/s}$)	96.3 (± 5.2)	73.6 (± 4.6)	57.6 (± 4.2)	42.7 (± 4.5)	<0.01	0.89	$y = 96.2 - 2.03x + 0.01x^2$
VSL ($\mu\text{m/s}$)	88.4 (± 4.9)	67.3 (± 4.6)	50.2 (± 4.3)	37.3 (± 4.3)	<0.01	0.89	$y = 88.6 - 2x + 0.01x^2$
VCL ($\mu\text{m/s}$)	151.7 (± 6.9)	118.6 (± 6.4)	96.6 (± 6.4)	73.9 (± 6.3)	<0.01	0.89	$y = 4.9 - 0.02x + 0.0001x^2$
BCF (Hertz)	43.8 (± 0.8)	36.5 (± 1.4)	30.4 (± 2)	29.6 (± 2.4)	<0.01	0.82	$y = 1942.9 - 55.2x + 0.72x^2$
Motilidade (%)	62.1 (± 3.4)	51.8 (± 3.9)	44.7 (± 5.1)	25.8 (± 4.3)	<0.01	0.85	$y = 61.7 - 0.71x$
Progressiva (%)	54.1 (± 3.8)	41.2 (± 4.4)	28.9 (± 4.3)	9.2 (± 2.6)	<0.01	0.88	$y = 52.8 - 0.89x$
Rápido (%)	57.0 (± 3.9)	43.3 (± 4.5)	31.2 (± 4.6)	9.7 (± 2.7)	<0.01	0.88	$y = 55.8 - 0.93x$
Médio (%)	5.2 (± 1.2)	6.8 (± 1.5)	13.4 (± 2)	16 (± 2.5)	<0.01	0.80	$y = 5.4 + 0.22x$
Lento (%)	9 (± 1.2)	9.9 (± 1.3)	14.2 (± 1.9)	21.7 (± 3.5)	<0.01	0.83	$y = 1.91 + 0.02x$
Estático (%)	28.8 (± 3)	38.3 (± 3.6)	41.1 (± 4.3)	47.4 (± 6.2)	0.04	0.56	$y = 31.3 + 0.34x$

Legenda: y = variável e x = concentração de H_2O_2

5.4.2 Experimento 2: O espermatozoide quando exposto ao peróxido de hidrogênio promove uma queda dose-dependente do desenvolvimento embrionário

5.4.2.1 Validação da sonda fluorescente CellROX® green

Antes de proceder com o experimento 2, foi realizada a validação das duas sondas de *status* oxidativo utilizadas, a CellROX® green e a DCFH. Nesta validação foi verificado uma maior sensibilidade da sonda CellROX® green em detectar alterações na concentração crescente de peróxido de hidrogênio (Figura 2A), a partir da concentração de 12,5 μM , sendo esta com intensidade de fluorescência igual ao controle (0 μM). O mesmo não ocorreu para sonda fluorescente DCFH (Figura 2B), visto que todas as concentrações apresentam a mesma intensidade de fluorescência detectada.

Figura 2 – Histograma de intensidade de fluorescência verde para sondas fluorescentes CellROX® green e DCFH e microscopia de epifluorescência de espermatozoides corados com CellROX® green

Legenda: Histograma de intensidade de fluorescência para CellROX® (A) e DCFH (B), sendo que as linhas verdes correspondem ao controle (sem H_2O_2); as vermelhas a 12,5 μM de H_2O_2 ; as azuis a 50 μM de H_2O_2 e as laranjas a 200 μM de H_2O_2 . Espermatozoides corados com CellROX® green (C), célula positiva (verde intenso) e células negativas (verde fraco), aumento de 1000x sob óleo de imersão.

5.4.2.2 Avaliações espermáticas

Assim como no experimento 1, o efeito dose-dependente sobre o padrão de motilidade do espermatozoide se repete, e desta vez, com as análises espermáticas adicionais, também foi observado este efeito sobre parâmetros relacionados ao *status* oxidativo, avaliado pela sonda CellROX® green e capacitação espermática pelo ensaio da clortetraciclina. Não houve efeito dose-dependente para o potencial de membrana mitocondrial ($p=0,13$) e para o *status* oxidativo avaliado pela sonda DCFH ($p=0,09$). A tabela 2 apresenta, juntamente com as médias por tratamento, os parâmetros espermáticos que apresentaram efeito de tratamento ($p<0,05$) e respectivos valores de r^2 e equações da reta.

Nas figuras 3A e 3B, o aumento da dose de peróxido de hidrogênio novamente apresentou efeito negativo sobre os parâmetros relacionados à motilidade, VAP, VSL, VCL e BCF (Figura 3A), bem como sobre a motilidade total, progressiva e células com movimento rápido (Figura 3B). Com relação ao *status* oxidativo, a Figura 2C mostra o efeito positivo do aumento da concentração de peróxido de hidrogênio para porcentagem de células sem alteração de membrana e estressadas (PI-VD+).

Sobre a capacitação espermática, a figura 3D mostra o efeito positivo da concentração de peróxido de hidrogênio sobre a porcentagem de células capacitadas. Não houve efeito de tratamento para as outras categorias avaliadas por esta técnica (não capacitadas e reativas). Para avaliação da cromatina, a figura 3E mostra o aumento da porcentagem de células positivas, ou seja, com alterações de cromatina, conforme se aumenta a dose de peróxido de hidrogênio.

Portanto, os resultados deste segundo experimento indicam que a concentração crescente de peróxido de hidrogênio utilizada sobre o espermatozoide tem efeito dose-dependente tanto para o padrão de motilidade, bem como sobre o *status* oxidativo da célula, porcentagem de células capacitadas e alterações de cromatina.

Figura 3 – Avaliações espermáticas com efeito de tratamento para o peróxido de hidrogênio

Legenda: Unidades de VAP, VSL e VCL = $\mu m/s$ e BCF = hertz (A); Total = motilidade total, Prog. = motilidade progressiva (B); Status oxidativo avaliado pela CellROX® Green representado pela porcentagem de células sem alteração de membrana e estressadas (PI-VD+) (C); Capacitação espermática avaliada pela clortetraciclina (D) e células positivas para o LA (E).

Tabela 2 – Avaliações espermáticas. Média e erro padrão, valores de p, r^2 e equação da reta para cada variável avaliada no experimento 2

	0 μ M	12.5 μ M	50 μ M	p	r^2	Equação
VAP (μ m/s)	100.3 ($\pm$ 4.8)	78.7 ($\pm$ 6.9)	55.4 ($\pm$ 8.2)	< 0.01	0.73	$y = 95.5 - 0.83x$
VSL (μ m/s)	89.3 ($\pm$ 21.1)	68 ($\pm$ 7.1)	48 ($\pm$ 8)	<0.01	0.72	$y = 84.2 - 0.75x$
VCL (μ m/s)	165.4 ($\pm$ 4.9)	140.9 ($\pm$ 9.4)	111.2 ($\pm$ 10.1)	<0.01	0.75	$y = 160.3 - 1.02x$
BCF (Hertz)	40.5 (0.8)	37.6 ($\pm$ 1.8)	32.6 ($\pm$ 2.2)	<0.01	0.56	$y = 66507.3 - 518.4x$
Motilidade (%)	45.2 ($\pm$ 3.1)	34.7 ($\pm$ 4.1)	25.2 ($\pm$ 5.4)	<0.01	0.65	$y = 42.7 - 0.36x$
Progressiva (%)	35.2 ($\pm$ 2.8)	24.1 ($\pm$ 4.5)	12.2 ($\pm$ 3.9)	<0.01	0.65	$y = 32.7 - 0.42x$
Rápido (%)	39.4 ($\pm$ 3)	26.6 ($\pm$ 4.7)	16.9 ($\pm$ 5)	<0.01	0.65	$y = 36.1 - 0.40x$
Capacitado (%)	21 ($\pm$ 2.8)	25.8 ($\pm$ 1.8)	32 ($\pm$ 4.1)	0.018	0.78	$y = 21.97 + 0.21x$
PI-VD+ (%)	30.7 ($\pm$ 4.5)	35.8 ($\pm$ 4.2)	53.3 ($\pm$ 3)	<0.01	0.91	$y = 1135.7 + 35.8x$
LA+ (%)	0.2 ($\pm$ 0.06)	1.6 ($\pm$ 0.3)	2.3 ($\pm$ 0.6)	<0.01	0.89	$y = 1.19 - 0.04x$

Legenda: y = variável e x = concentração de H₂O₂

5.4.2.3 Desenvolvimento embrionário

Na produção *in vitro* de embriões, todos os parâmetros de desenvolvimento embrionário apresentaram efeito de tratamento, exceto a clivagem rápida ($p=0,15$). A tabela 3 apresenta, juntamente com as médias por tratamento, os parâmetros embrionários que apresentaram efeito de tratamento ($p<0,05$) e respectivos valores de r^2 e equações da reta.

Tabela 3 – Avaliações do desenvolvimento embrionário dos embriões oriundos de espermatozoides expostos a diferentes doses de peróxido de hidrogênio nas diferentes fases do cultivo *in vitro*. Média e erro padrão, valores de p, r^2 e equação da reta para cada variável avaliada

	0 μ M	12.5 μ M	50 μ M	p	r^2	Equação
Taxa de clivagem (%)	72.1 ($\pm$ 2.4)	67.9 ($\pm$ 3.4)	61.5 ($\pm$ 4.4)	0.02	0.71	$y = 71.4 - 0.2x$
Não clivado (%)	27.4 ($\pm$ 1.6)	25 ($\pm$ 1.7)	32.2 ($\pm$ 2.8)	0.04	0.63	$y = 25.7 + 0.11x$
2-4 células (%)	32.6 ($\pm$ 2.1)	36.7 ($\pm$ 2.4)	41.7 ($\pm$ 2.6)	<0.01	0.75	$y = 33.4 + 0.17x$
8-16 células (%)	40 ($\pm$ 2.6)	38.1 ($\pm$ 1.6)	25.9 ($\pm$ 2.2)	<0.01	0.76	$y = 40.7 - 0.29x$
Taxa de blastocisto (%)	14.2 ($\pm$ 3.3)	8.33 ($\pm$ 1.7)	2.1 ($\pm$ 0.8)	0.01	0.57	$y = 2.4 - 0.02x$

Legenda: y = variável e x = concentração de H_2O_2 . Taxa de clivagem (D=3); Não clivados, 2-4 células e 8-16 células (D=5) e taxa de blastocisto (D=8).

As figuras 4A e 4C representam, respectivamente, o efeito negativo do aumento da concentração de peróxido de hidrogênio tanto sobre a taxa de clivagem no 3º dia de cultivo, quanto sobre a taxa de blastocisto, ao final dos 8 dias de cultivo. A figura 4B, representa a taxa de desenvolvimento embrionário avaliada no 5º dia de cultivo. Houve efeito positivo, aumentando a porcentagem de estruturas não clivadas (NC) e com 2-4 células, e efeito negativo sobre a porcentagem de estruturas com 8-16 células, conforme se aumenta a dose de peróxido de hidrogênio. Com isto, pode ser verificado que o estresse oxidativo sofrido pelo espermatozoide antes da fecundação *in vitro*, também tem efeito dose-dependente sobre o desenvolvimento embrionário, seja ele inicial (taxa de clivagem) ou tardio (taxa de desenvolvimento e blastocisto).

Figura 4 – Avaliações do desenvolvimento embrionário dos embriões oriundos de espermatozoides expostos a diferentes doses de peróxido de hidrogênio nas diferentes fases do cultivo *in vitro*

Legenda: Taxa de clivagem avaliada no 3º dia de cultivo (A); taxa de desenvolvimento avaliada no 5º dia de cultivo, sendo NC = não clivados (B); e taxa de blastocisto avaliada no 8º dia de cultivo (C).

5.4.2.4 Correlações entre parâmetros espermáticos e desenvolvimento embrionário

A tabela 4 mostra os valores de correlação (r) e significância (p) para os parâmetros espermáticos e desenvolvimento embrionário considerados mais relevantes ao estudo, separados em 2 grupos: sem (controle) e com (tratados) adição de peróxido de hidrogênio. No geral, foi identificado um maior número de correlações entre as variáveis estudadas no grupo tratado quando comparado ao grupo controle. Dentro das variáveis relacionadas à motilidade, as mesmas

correlações observadas no grupo controle também foram observadas no grupo tratado e, além destas, outras 13 correlações foram identificadas no grupo com peróxido de hidrogênio. No grupo tratado, houve correlação positiva entre a porcentagem de células com alto potencial de mitocôndria e PI-VD+ e correlação negativa com o padrão de movimento (VAP, VSL, VCL e BCF).

Com relação ao *status* oxidativo, novamente no grupo tratado, houve correlação negativa entre a porcentagem de células sem alteração de membrana e estressadas (PI-VD+ e PI-DCFH+) com o padrão de movimento, sendo que a porcentagem de células PI-DCFH+ também apresentou correlação negativa com motilidade total e progressiva.

Por fim, no grupo tratado com peróxido de hidrogênio, a taxa de clivagem teve correlação positiva com a motilidade total e progressiva, e a taxa de blastocisto teve correlação negativa com a porcentagem de células PI-VD+ e positiva com o padrão de motilidade.

Tabela 4 – Correlações entre avaliações espermáticas e desenvolvimento embrionário realizadas no experimento 2 para grupo controle (sem H₂O₂) e tratados (com H₂O₂)

	Cap	PI-VD+	PI-DCFH+	APM	VAP	VSL	VCL	ALH	BCF	Motil	Prog	LA+	Cliv	Blast
Cap		ns	ns	ns	ns	ns	ns	-0.58 ^a	ns	ns	ns	ns	ns	ns
PI-VD+	-0.83 ^a		ns	0.64 ^b	-0.49 ^a	-0.43 ^a	-0.55 ^b	ns	0.42 ^a	ns	ns	ns	ns	-0.49 ^a
PI-DCFH+	ns	ns		ns	-0.42 ^a	-0.47 ^b	ns	ns	-0.43 ^a	-0.62 ^b	-0.6 ^b	ns	ns	ns
APM	ns	ns	ns		-0.53 ^b	-0.49 ^b	-0.50 ^b	ns	-0.39 ^a	ns	ns	ns	ns	ns
VAP	ns	ns	ns	ns		0.99 ^b	0.90 ^b	ns	0.77 ^b	0.67 ^b	0.83 ^b	ns	ns	0.52 ^a
VSL	ns	ns	ns	ns	0.98 ^b		0.86 ^b	ns	0.78 ^b	0.68 ^b	0.84 ^b	ns	ns	0.53 ^a
VCL	ns	ns	ns	ns	ns	ns		0.42 ^a	0.76 ^b	0.65 ^b	0.74 ^b	ns	ns	0.56 ^a
ALH	ns	ns	ns	ns	ns	ns	0.61 ^a		ns	0.39 ^a	ns	ns	ns	ns
BCF	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns		0.57 ^a	0.61 ^b	ns	ns	0.51 ^a
Motil	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns		0.93 ^b	ns	0.55 ^b	ns
Prog	ns	ns	ns	ns	ns	0.55 ^a	ns	ns	ns	0.95 ^b		ns	0.44 ^a	ns
LA+	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns		ns	ns
Cliv	ns	ns	-0.73 ^b	ns	-0.77 ^b	-0.78 ^b	ns	ns	ns	ns	ns	0.7 ^a		ns
Blast	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	

Legenda: ^ap<0.05 ^bp<0.01. Células cinza = controle (sem H₂O₂) e células brancas = tratados (com H₂O₂). Cap = % capacitadas; APM = % alto potencial de mitocôndria; VAP, VSL e VCL = µm/s; BCF = hertz; ALH = µm; Motil = % motilidade total; Prog = % motilidade progressiva; Cliv = taxa de clivagem (%); Blast = taxa de blastocisto (%).

5.5 DISCUSSÃO

Neste estudo foi verificado o impacto, dose-dependente dos espermatozoides expostos a um ambiente oxidativo sobre o desenvolvimento embrionário. Este impacto ocorreu desde a clivagem, até o desenvolvimento a blastocisto. Além disto, pode ser verificado efeito sobre a motilidade, o processo de capacitação e também alterações da cromatina espermática. Pela primeira vez, há registro do uso de uma nova sonda fluorescente por citometria de fluxo para avaliar *status* oxidativo em espermatozoides bovinos de forma eficiente e sensível.

5.5.1 O estresse oxidativo em detrimento da motilidade, porém sem afetar o potencial mitocondrial

No experimento 1 foi proposto um modelo de avaliação do efeito do estresse oxidativo induzido sobre a motilidade do espermatozoide bovino. Mesmo utilizando baixas concentrações de peróxido de hidrogênio em um curto período de incubação, quando comparados aos utilizados na literatura (AITKEN et al., 1998; SILVA et al., 2007; RAHMAN et al., 2012), os dados sugerem que a motilidade do espermatozoide bovino é altamente sensível ao estresse oxidativo. Dentro dos parâmetros avaliados pelo CASA, as correlações que aparecem no grupo controle também aparecem no grupo tratado. Porém, neste segundo grupo, sob efeito do peróxido de hidrogênio, mais correlações tornam-se significativas. Somado a isto, no grupo tratado, as correlações negativas entre o *status* oxidativo (porcentagem de células PI-VD+ e PI-DCFH+), padrão de movimento espermático (VAP, VSL, VCL e BCF) e porcentagem de motilidade total e progressiva reforçam o efeito prejudicial do ambiente oxidativo gerado pelo peróxido de hidrogênio sobre a motilidade.

No experimento 2, o detrimento da motilidade se mantém, porém foi verificado que o potencial de mitocôndria não se alterou da mesma forma que a motilidade. Em suínos já foi observado este efeito provocado pelo peróxido de hidrogênio, com redução da motilidade sem alteração do potencial de mitocôndria ou concentração de ATP (GUTHRIE; WELCH; LONG, 2008). Estes autores sugerem que não há atuação do peróxido de hidrogênio sobre a função mitocondrial, mas sim interferindo nos mecanismos de contratilidade da cauda do espermatozoide. Outra possibilidade é de que o potencial mitocondrial possa sofrer, mais tardiamente, os efeitos do estresse oxidativo, como foi verificado em outros estudos (KOPPERS et al., 2008; AITKEN et al., 2012; AMARAL et al., 2013). Neste estágio, a célula já se encontraria em um estado de morte celular com perda da integridade de membranas e assim sofrendo diminuição do potencial mitocondrial, como ocorre, por exemplo, na criopreservação (SCHOBER et al., 2007; CASTRO et al.¹).

A correlação positiva entre o alto potencial de mitocôndria com a porcentagem de células sem alteração de membrana e estressadas (PI-VD+) no grupo que recebe

¹ Dados não publicados.

o peróxido de hidrogênio (tratado), observadas neste trabalho, sugere que o alto potencial de membrana mitocondrial pode estar relacionado, em condições de estresse, com o escape de radicais livres nas células íntegras e metabolicamente ativas, ou seja, com maior potencial de liberação de EROs. Esta relação entre potencial mitocondrial e produção de EROs já foi demonstrado para outros tipos celulares (HANSFORD; HOGUE; MILDAZIENE, 1997; LEE; BENDER; KADENBACH, 2002). Nesta situação, o alto potencial de mitocôndria age prejudicando a motilidade, uma vez que existe correlação negativa entre alto potencial de mitocôndria e o padrão de movimento espermático (VAP, VSL, VCL e BCF).

5.5.2 O estresse oxidativo e a capacitação espermática

Uma das funções biológicas das EROs é sua participação no processo de capacitação (DE LAMIRANDE et al., 1997). Existem controvérsias sobre qual via estas moléculas atuam, mas em bovinos já foi demonstrado que a adição de peróxido de hidrogênio em baixas doses (até 50 μ M) promove um efeito tempo e dose-dependente sobre a fosforilação da tirosina de algumas proteínas envolvidas na capacitação, sendo este efeito reduzido sob altas doses (5 mM) (RIVLIN et al., 2004). O estresse oxidativo induzido neste estudo apresentou efeito crescente e dose-dependente sobre a porcentagem de células capacitadas.

Contudo, este efeito crescente na porcentagem de células capacitadas não refletiu na capacidade de fecundação do espermatozoide, avaliada indiretamente pela taxa de clivagem, provavelmente porque estas células sofreram uma capacitação prematura e morreram. A criopreservação do sêmen, assim como sucessivas lavagens podem antecipar a capacitação pela alteração de permeabilidade de membrana e remoção dos fatores decapacitantes (CORMIER; SIRARD; BAILEY, 1997; LEAHY; GADELLA, 2011). No presente estudo, o estresse oxidativo nas doses mais altas provavelmente agravou a capacitação prematura, já iniciada após a descongelação, diminuindo o tempo de vida desta célula e impossibilitando a fecundação do oócito, e assim refletindo em piores taxas de clivagem nas doses mais altas de peróxido de hidrogênio.

5.5.3 O uso da CellROX® como avaliação do status oxidativo do espermatozoide

Neste estudo, o status oxidativo do espermatozoide foi avaliado por 2 sondas fluorescentes: a 2'7' diacetato de diclorofluoresceína (DCFH) e a CellROX®, sendo que esta última não há relatos na literatura sobre o uso em espermatozoides. Houve diferença na detecção do *status* oxidativo entre estas duas sondas fluorescentes. Para a DCFH não houve efeito dose-dependente do peróxido de hidrogênio, já com a CellROX® foi possível identificar o efeito do tratamento conforme a dose foi aumentada. Estes dados indicam uma diferença entre a sensibilidade destas duas sondas na detecção do *status* oxidativo celular.

Tanto a DCFH quanto a CellROX® são consideradas sondas inespecíficas com relação ao tipo de radical livre detectado, apesar de muitos trabalhos ainda utilizarem a DCFH como sonda específica para peróxido de hidrogênio (GOMES; FERNANDES; LIMA, 2005). Além disto, elas apresentam algumas diferenças com relação ao local de atuação. O sinal gerado pela DCFH é mais efetivo quando o agente oxidante é gerado no citoplasma ou próximo da membrana plasmática (AITKEN et al., 2013). Já a CellROX® green é considerada uma sonda primariamente nuclear. Possui uma fluorescência fraca e quando oxidada, se liga à molécula de DNA apresentando um verde mais intenso, o que pode caracterizar também uma maior estabilidade da fluorescência.

A diferença de sensibilidade entre estas duas sondas foi observada na validação das sondas para a citometria de fluxo (Figura 2). Utilizando a CellROX® foi possível identificar diferenças na intensidade de fluorescência verde conforme a concentração de peróxido de hidrogênio da amostra foi aumentada. Isto não ocorreu para a DCFH, uma vez que independente da concentração, a intensidade de fluorescência foi a mesma. Neste caso, deve ser considerado também o tipo de amostra que foi utilizado no presente estudo: sêmen descongelado e submetido a diversas centrifugações (gradiente de Percoll® e lavagens), sabidamente uma célula mais suscetível à produção de radicais livres (AGARWAL; IKEMOTO; LOUGHLIN, 1994). Talvez este estresse oxidativo inerente da amostra foi suficiente para gerar o sinal positivo para maioria das células avaliadas pela DCFH. Além disto, alguns estudos relatam a dificuldades de trabalhar com a sonda DCFH por ela ser muito

instável e facilmente foto-oxidada (WANG; JOSEPH, 1999). Nestas condições experimentais, a CellROX® green demonstrou ser mais sensível e eficiente na detecção do *status* oxidativo do espermatozoide.

5.5.4 O espermatozoide oxidado e seu impacto no desenvolvimento do embrião

Neste experimento foi verificado que o espermatozoide, quando exposto a um ambiente oxidante tem um impacto, dose-dependente, no desenvolvimento embrionário, desde as primeiras clivagens até a fase de blastocisto. Os resultados mostram que o espermatozoide oxidado promove uma queda na taxa de clivagem, e este fato provavelmente é decorrente de uma menor taxa de fecundação, uma vez que existe menor porcentagem de células móveis conforme a dose de agente indutor foi sendo aumentada. Esta ideia é reforçada frente às correlações encontradas entre motilidade e taxa de clivagem. A ausência de correlação e correlações positivas entre a taxa de clivagem e motilidade total e progressiva no grupo controle e tratado, respectivamente, indicam que apenas sob condições de estresse oxidativo (presença de peróxido de hidrogênio), a motilidade espermática teve influência negativa sobre a taxa de clivagem.

A avaliação do desenvolvimento realizada no quinto dia de cultivo indica um bloqueio dos embriões no estágio de 2-4 células, já que nesta fase os embriões já deveriam estar no estágio de 8-16 células. Este bloqueio reflete até o desenvolvimento a blastocisto. Duas possíveis causas podem ser apontadas: 1- o espermatozoide oxidado, após a fecundação, provoca danos intracelulares no oócito como peroxidação lipídica e depleção de mecanismos antioxidantes que prejudicam o desenvolvimento além de 2-4 células; 2- alterações do DNA espermático causadas pelo estresse oxidativo bloqueiam o desenvolvimento antes mesmo da ativação do genoma embrionário por causar falhas na divisão nuclear. A primeira hipótese é muito difícil de ser comprovada, uma vez que avaliações realizadas no zigoto para avaliar possíveis danos intracelulares tornariam inviável o cultivo até blastocisto. Contudo, os dados de alteração de cromatina do presente trabalho e de outros

estudos indicam que o DNA do espermatozoide tem maior chance de ser um dos possíveis causadores do bloqueio do desenvolvimento embrionário.

No presente estudo, foi verificado efeito negativo do estresse oxidativo sobre a porcentagem de células com alteração de cromatina (LA+). Alterações de cromatina espermática em bovinos são consideradas muito baixas quando comparadas a de outras espécies (WATERHOUSE et al., 2010; MALAMA et al., 2012; SIMÕES et al., 2013). Apesar da porcentagem de células positivas para o LA ser pequena (2,3% na concentração de 50 μ M), o peróxido de hidrogênio foi capaz de provocar efeito dose-dependente, aumentando a porcentagem de células positivas. Como o mecanismo de oxidação é dinâmico, estas lesões podem se perpetuar dentro da célula, mesmo após a fecundação, especialmente nas regiões com presença de histonas. Estudos indicam que estas regiões não são ao acaso. Apesar de poucas, a localização estratégica destas histonas são consideradas possíveis marcações epigenéticas do DNA paterno que sinalizariam genes relacionados ao desenvolvimento embrionário inicial e que precisam ser rapidamente ativados (CARRELL, 2012; MILLER; BRINKWORTH; ILES, 2010). Contudo, este DNA ainda ligado às histonas pode ser mais sensível ao ataque das EROs, expondo as marcações epigenéticas a possíveis alterações que refletiriam na falha do desenvolvimento embrionário.

As falhas no desenvolvimento embrionário causadas por espermatozoides expostos ao estresse oxidativo já foram observadas em primatas (BURRUEL et al., 2013). Neste estudo, os autores atribuíram a falha no desenvolvimento antes mesmo da ativação do genoma embrionário a alterações nas divisões e altas taxas de fragmentação nuclear dos blastômeros. Em camundongo, outro estudo verificou que espermatozoides expostos ao peróxido de hidrogênio tem atraso no desenvolvimento embrionário e redução na taxa de implantação (LANE et al., 2014). Provavelmente este impacto no desenvolvimento embrionário, incluindo os resultados do presente estudo, poderia estar relacionado a alterações do DNA espermático, especialmente nas regiões histônicas, que são as mais sensíveis. Mais estudos desta fase do desenvolvimento inicial (intervalo entre a primeira clivagem até o estágio de 8-16 células, quando o genoma embrionário bovino é ativado) e os mecanismos epigenéticos envolvidos poderiam elucidar a dinâmica do bloqueio embrionário que parece ser causada pelo espermatozoide submetido ao dano oxidativo.

Com os avanços dos estudos na área de transcriptoma, diversos trabalhos já identificaram a presença de RNAs no espermatozoide (LALANCETTE et al., 2008; DADOUNE, 2009; FEUGANG et al., 2010). Alguns desses RNAs já foram relatados como funcionais, sendo necessários, por exemplo, para a primeira clivagem do zigoto (LIU et al., 2012). A molécula de RNA é mais instável do que a de DNA e também sujeita ao ataque das EROs (KONG; LIN, 2010). Quando oxidada pode levar a formação de proteínas não-funcionais, truncadas ou com dobramento incorreto (POULSEN et al., 2012). Com isto podemos supor que, alguns destes RNAs espermáticos também possam ser alvos da oxidação das EROs e uma vez que são necessários para o desenvolvimento embrionário, este seria prejudicado, antes mesmo da ativação do próprio genoma.

6 CONCLUSÃO

Foi concluído que o espermatozoide bovino, quando exposto a um ambiente oxidante, tem grande impacto sobre padrão de motilidade, *status* oxidativo, capacitação e integridade da cromatina. Estas alterações refletem de forma negativa no desenvolvimento embrionário, desde a clivagem até blastocisto. Mais estudos referentes ao intervalo entre a primeira clivagem e a ativação do genoma embrionário devem ser realizados para compreender melhor o efeito deletério deste espermatozoide oxidado nesta fase.

REFERÊNCIAS

AGARWAL, A.; ALLAMANENI, S.; NALLELLA, K.; GEORGE, A.; MASCHA, E. Correlation of reactive oxygen species levels with the fertilization rate after in vitro fertilization: a qualified meta-analysis. **Fertility and Sterility**, v. 84, n. 1, p. 228–231, 2005.

AGARWAL, A.; IKEMOTO, I.; LOUGHLIN, K. Effect of sperm washing on levels of reactive oxygen species in semen. **Archives of Andrology**, v. 33, p. 157–162, 1994.

AITKEN, R.; CLARKSON, J. Significance of reactive oxygen species and antioxidants in defining the efficacy of sperm preparation techniques. **Journal of Andrology**, v. 9, n. 6, p. 367–376, 1988.

AITKEN, R. J. Oxidative stress, DNA damage and the Y chromosome. **Reproduction**, v. 122, n. 4, p. 497–506, 2001.

AITKEN, R. J.; CLARKSON, J. S.; FISHEL, S. Generation of reactive oxygen species, lipid peroxidation, and human sperm function. **Biology of Reproduction**, v. 40, p. 183–197, 1989.

AITKEN, R. J.; DE IULIIS, G. N. On the possible origins of DNA damage in human spermatozoa. **Molecular Human Reproduction**, v. 16, n. 1, p. 3–13, 2010.

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, 2012.

AITKEN, R. J.; GORDON, E.; HARKISS, D.; TWIGG, J. P.; MILNE, P.; JENNINGS, Z.; IRVINE, D. S. Relative impact of oxidative stress on the functional competence and genomic integrity of human spermatozoa. **Biology of Reproduction**, v. 59, n. 5, p. 1037–1046, 1998.

AITKEN, R. J.; NIXON, B. Sperm capacitation: a distant landscape glimpsed but unexplored. **Molecular Human Reproduction**, v. 19, n. 12, p. 785–793, 2013.

AITKEN, R.; SMITH, T.; LORD, T.; KUCZERA, L.; KOPPERS, A.; NAUMOVSKI, N.; CONNAUGHTON, H.; BAKER, M.; DE IULIIS, G. On methods for the detection of reactive oxygen species generation by human spermatozoa: analysis of the cellular responses to catechol oestrogen, lipid aldehyde, menadione and arachidonic acid. **Andrology**, v. 1, n. 2, p. 192–205, 2013.

ALVAREZ, J.; TOUCHSTONE, J.; BLASCO, L.; STOREY, B. Spontaneous lipid peroxidation and production of hydrogen peroxide and superoxide in human spermatozoa. **Journal of Andrology**, v. 8, n. 5, p. 338–348, 1987.

AMARAL, S.; REDMANN, K.; SANCHEZ, V.; MALLIDIS, C.; RAMALHO-SANTOS, J.; SCHLATT, S. UVB irradiation as a tool to assess ROS-induced damage in human spermatozoa. **Andrology**, v. 1, n. 5, p. 707–714, 2013.

ANDERSON, M. J.; DIXSON, A. F. Motility and the midpiece in primates. **Nature**, v. 416, p. 496, 2002.

ASCH, R.; SIMERLY, C.; ORD, T.; ORD, V.; SCHATTEN, G. The stages at which human fertilization arrests: microtubule and chromosome configurations in inseminated oocytes which failed to complete fertilization and development in humans. **Human Reproduction**, v. 10, n. 7, p. 1897–1906, 1995.

BALL, B. A.; VO, A. Detection of lipid peroxidation in equine spermatozoa based upon the lipophilic fluorescent dye C11-BODIPY581/591. **Journal of Andrology**, v. 23, n. 2, p. 259–269, 2002.

BARNES, D. E.; LINDAHL, T. Repair and genetic consequences of endogenous DNA base damage in mammalian cells. **Annual Review of Genetics**, v. 38, p. 445–476, 2004.

BARREIROS, A. L. B. S.; DAVID, J. P. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo - Divulgação. **Química Nova**, v. 29, n. 1, p. 113–123, 2006.

BARROSO, G.; VALDESPIN, C.; VEGA, E.; KERSHENOVICH, R.; AVILA, R.; AVENDAÑO, C.; OEHNINGER, S. Developmental sperm contributions: fertilization and beyond. **Fertility and Sterility**, v. 92, n. 3, p. 835–848, 2009.

BARTOEV, B.; BERKOVITZ, A.; ELTES, F.; KOGOSOVSKY, A.; YAGODA, A.; LEDERMAN, H.; ARTZI, S.; GROSS, M.; BARAK, Y. Pregnancy rates are higher with intracytoplasmic morphologically selected sperm injection than with conventional intracytoplasmic injection. **Fertility and Sterility**, v. 80, n. 6, p. 1413–1419, 2003.

BILODEAU, J. F.; CHATTERJEE, S.; SIRARD, M. A.; GAGNON, C. Levels of antioxidant defenses are decreased in bovine spermatozoa after a cycle of freezing and thawing. **Molecular Reproduction and Development**, v. 55, n. 3, p. 282–288, 2000.

BONTEKOE, S.; MANTIKOU, E.; WELY, M.; SESHADRI, S.; REPPING, S.; MASTENBROEK, S. Low oxygen concentrations for embryo culture in assisted reproductive technologies. **Cochrane Database of Systematic Reviews**, n. 7, 2012.

BROUWERS, J. F. H. .; GADELLA, B. M. In situ detection and localization of lipid peroxidation in individual bovine sperm cells. **Free Radical Biology and 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**, v. 63, n. 2, p. 458–469, 2005.

BURRUEL, V.; KLOOSTER, K.; CHITWOOD, J.; ROSS, P.; MEYERS, S. Oxidative damage to Rhesus Macaque spermatozoa results in mitotic arrest and transcript abundance changes in early embryos. **Biology of Reproduction**, v. 89, p. 1–11, 2013.

CARRELL, D. T. Epigenetics of the male gamete. **Fertility and Sterility**, v. 97, n. 2, p. 267–274, 2012.

CELEGHINI, E. C. C.; DE 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, p. 479–488, 2007.

CHAUDIERE, J.; WILHELMSSEN, E.; TAPPEL, A. Mechanism of selenium-glutathione peroxidase and its inhibition by mercaptocarboxylic acids and other mercaptans. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 259, p. 1043–1050, 1984.

COMIZZOLI, P.; MARQUANT-LE GUIENNE, B.; HEYMAN, Y.; RENARD, J. P. Onset of the first S-phase is determined by a paternal effect during the G1-phase in bovine zygotes. **Biology of Reproduction**, v. 62, n. 6, p. 1677–1684, 2000.

CORMIER, N.; SIRARD, M.; BAILEY, J. Premature capacitation of bovine spermatozoa is initiated by cryopreservation. **Journal of Andrology**, v. 18, n. 4, p. 461–468, 1997.

DADOUNE, J.-P. Spermatozoal RNAs: what about their functions? **Microscopy Research and Technique**, v. 72, n. 8, p. 536–551, 2009.

DAVIS, B. K. Timing of fertilization in mammals: sperm cholesterol/phospholipid ratio as a determinant of the capacitation interval. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 78, n. 12, p. 7560–7564, 1981.

DE IULIIS, G. N.; THOMSON, L. K.; MITCHELL, L. A; FINNIE, J. M.; KOPPERS, A. J.; HEDGES, A.; NIXON, B.; AITKEN, R. J. DNA damage in human spermatozoa is highly correlated with the efficiency of chromatin remodeling and the formation of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine, a marker of oxidative stress. **Biology of Reproduction**, v. 81, n. 3, p. 517–524, 2009.

DE LAMIRANDE, E.; GAGNON, C. A positive role for the superoxide anion in triggering hyperactivation and capacitation of human spermatozoa. **International Journal of Andrology**, v. 16, p. 21–25, 1993.

DE LAMIRANDE, E.; JIANG, H.; ZINI, A.; KODAMA, H.; GAGNON, C. Reactive oxygen species and sperm physiology. **Reviews of Reproduction**, v. 2, n. 1, p. 48–54, 1997.

DONNELLY, E. T.; MCCLURE, N.; LEWIS, S. E. The effect of ascorbate and alpha-tocopherol supplementation in vitro on DNA integrity and hydrogen peroxide-induced DNA damage in human spermatozoa. **Mutagenesis**, v. 14, n. 5, p. 505–512, 1999.

DU PLESSIS, S. S.; MAKKER, K.; DESAI, N. R.; AGARWAL, A. Impact of oxidative stress on IVF. **Expert Review of Obstetrics & Gynecology**, v. 3, n. 4, p. 539–554, 2008.

DU PLESSIS, S. S.; MCALLISTER, D. A.; LUU, A.; SAVIA, J.; AGARWAL, A.; LAMPIAO, F. Effects of H₂O₂ exposure on human sperm motility parameters, reactive oxygen species levels and nitric oxide levels. **Andrologia**, v. 42, n. 3, p. 206–210, 2010.

EVENSON, D.; JOST, L. Sperm chromatin structure assay is useful for fertility assessment. **Methods In Cell Science : An Official Journal Of The Society For In Vitro Biology**, v. 22, n. 2-3, p. 169–189, 2000.

FATEHI, A. N.; BEVERS, M. M.; SCHOEVERS, E.; ROELEN, B. A. J.; COLENBRANDER, B.; GADELLA, B. M. DNA damage in bovine sperm does not block fertilization and early embryonic development but induces apoptosis after the first cleavages. **Journal of Andrology**, v. 27, p. 176–188, 2006.

FERRAMOSCA, A.; PINTO PROVENZANO, S.; MONTAGNA, D. D.; COPPOLA, L.; ZARA, V. Oxidative stress negatively affects human sperm mitochondrial respiration. **Urology**, v. 82, n. 1, p. 78–83, 2013.

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.

FISCHER, B.; BAVISTER, B. Oxygen tension in the oviduct and uterus of rhesus monkeys, hamsters and rabbits. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 99, p. 673–679, 1993.

FLESCH, F. M.; GADELLA, B. M. Dynamics of the mammalian sperm plasma membrane in the process of fertilization. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1469, n. 3, p. 197–235, 2000.

FRAGA, C.; MOTCHNIK, P.; SHIGENAGA, M.; HELBOCK, H.; JACOB, R.; AMES, B. Ascorbic acid protects against endogenous oxidative DNA damage in human sperm. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 88, n. 24, p. 11003–11006, 1991.

GERSCHMAN, R.; GILBERT, D.; NYE, S.; DWYER, P.; FENN, W. Oxygen poisoning and x-irradiation: a mechanism in common. **Science**, v. 119, p. 623–626, 1954.

GOMES, A.; FERNANDES, E.; LIMA, J. L. F. C. Fluorescence probes used for detection of reactive oxygen species. **Journal of Biochemical and Biophysical Methods**, v. 65, n. 2-3, p. 45–80, 2005.

GOMEZ, E.; IRVINE, D. S.; AITKEN, R. J. Evaluation of a spectrophotometric assay for the measurement of malondialdehyde and 4-hydroxyalkenals in human

spermatozoa: relationships with semen quality and sperm function. **International Journal of Andrology**, v. 21, n. 2, p. 81–94, 1998.

GÓMEZ-FERNÁNDEZ, J.; GÓMEZ-IZQUIERDO, E.; TOMÁS, C.; MOCÉ, E.; DE MERCADO, E. Is sperm freezability related to the post-thaw lipid peroxidation and the formation of reactive oxygen species in boars? **Reproduction in Domestic Animals**, v. 48, n. 2, p. 177–182, 2013.

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.

HAFEZ, E.; HAFEZ, B. **Reprodução animal**. 7. ed. Manole, 2003. 513 p.

HALLIWELL, B. Free radicals and other reactive species in disease. **Encyclopedia of Life Science**, p. 1–7, 2001.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. **Free radicals in biology and medicine**. 4. ed. Oxford: 2012. 851 p.

HANSFORD, R. G.; HOGUE, B. A; MILDAZIENE, V. Dependence of H₂O₂ formation by rat heart mitochondria on substrate availability and donor age. **Journal of Bioenergetics and Biomembranes**, v. 29, n. 1, p. 89–95, 1997.

HARRISON, R. A P.; GADELLA, B. M. Bicarbonate-induced membrane processing in sperm capacitation. **Theriogenology**, v. 63, n. 2, p. 342–351, 2005.

JEULIN, C.; SOUFIR, J.; WEBER, P.; LAVAL-MARTIN, D.; CALVAYRAC, R. Catalase activity in human spermatozoa and seminal plasma. **Gamete Research**, v. 24, n. 2, p. 185–196, 1989.

KASIMANICKAM, R.; KASIMANICKAM, V.; THATCHER, C. D.; NEBEL, R. L.; CASSELL, B. G. Relationships among lipid peroxidation, glutathione peroxidase, superoxide dismutase, sperm parameters, and competitive index in dairy bulls. **Theriogenology**, v. 67, n. 5, p. 1004–1012, 2007.

KONG, Q.; LIN, C. Oxidative damage to RNA: mechanisms, consequences, and diseases. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 67, n. 11, p. 1817–1829, 2010.

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.

LALANCETTE, C.; MILLER, D.; LI, Y.; KRAWETZ, S. A. Paternal contributions: new functional insights for spermatozoal RNA. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 104, n. 5, p. 1570–1579, 2008.

LAMIRANDE, E. DE; GAGNON, C. Reactive oxygen species and human spermatozoa. II. Depletion of adenosine triphosphate plays an important role in the inhibition of sperm motility. **Journal of Andrology**, v. 13, n. 5, p. 379–386, 1992.

LANE, M.; MCPHERSON, N. O.; FULLSTON, T.; SPILLANE, M.; SANDEMAN, L.; KANG, W. X.; ZANDER-FOX, D. L. Oxidative stress in mouse sperm impairs embryo development, fetal growth and alters adiposity and glucose regulation in female offspring. **Plos One**, v. 9, n. 7, p. e100832, 2014.

LEAHY, T.; GADELLA, B. M. Sperm surface changes and physiological consequences induced by sperm handling and storage. **Reproduction**, v. 142, n. 6, p. 759–778, 2011.

LEE, I.; BENDER, E.; KADENBACH, B. Control of mitochondrial membrane potential and ROS formation by reversible phosphorylation of cytochrome c oxidase. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 234-235, n. 1-2, p. 63–70, 2002.

LI, T. The glutathione and thiol content of mammalian spermatozoa and seminal plasma. **Biology of Reproduction**, v. 12, p. 641–646, 1975.

LIU, C.-H.; TSAO, H.-M.; CHENG, T.-C.; WU, H.-M.; HUANG, C.-C.; CHEN, C.-I.; LIN, D. P.; LEE, M.-S. DNA fragmentation, mitochondrial dysfunction and chromosomal aneuploidy in the spermatozoa of oligoasthenoteratozoospermic males. **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**, v. 21, n. 4, p. 119–126, 2004.

LIU, W.; PANG, R.; CHIU, P.; WONG, B.; LAO, K.; LEE, K.; YEUNG, W. Sperm-borne microRNA-34c is required for the first cleavage division in mouse. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 109, n. 2, p. 490–494, 2012.

MALAMA, E.; KIOSSIS, E.; THEODOSIOU, T.; BOSCO, C.; BOLLWEIN, H. Lag effect of microclimatic conditions on DNA integrity of frozen-thawed bovine sperm. **Animal Reproduction Science**, v. 136, p. 33–41, 2012.

MANN, T. **The biochemistry of semen**. London, Methuen: 1954. 284 p.

MAPLETOFT, R. History and perspectives on bovine embryo transfer. **Animal Reproduction**, v. 10, p. 168–173, 2013.

MARNETT, L. J. Lipid peroxidation-DNA damage by malondialdehyde. **Mutation Research**, v. 424, n. 1-2, p. 83–95, 1999.

MILLER, D.; BRINKWORTH, M.; ILES, D. Paternal DNA packaging in spermatozoa: more than the sum of its parts? DNA, histones, protamines and epigenetics. **Reproduction (Cambridge, England)**, v. 139, n. 2, p. 287–301, 2010.

MOJZSIS, S. J. **Earth inside and out**, New Press: 2001, 237 p.

NELSON, D.; COX, M. **Lehninger principles of biochemistry**. 5. ed. Freeman: 2008, 1158 p.

O'FLAHERTY, C.; BEORLEGUI, N.; BECONI, M. Reactive oxygen species requirements for bovine sperm capacitation and acrosome reaction.

Theriogenology, v. 52, n. 99, p. 289–301, 1999.

O'FLAHERTY, C.; BEORLEGUI, N.; BECONI, M. T. Participation of superoxide anion in the capacitation of cryopreserved bovine sperm. **International Journal of Andrology**, v. 26, n. 2, p. 109–114, 2003.

O'FLAHERTY, C.; DE LAMIRANDE, E.; GAGNON, C. Positive role of reactive oxygen species in mammalian sperm capacitation: triggering and modulation of phosphorylation events. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 41, n. 4, p. 528–540, 2006.

PALMA, G. A.; SINOWATZ, F. Male and female effects on the in vitro production of bovine embryos. **Anatomia, Histologia and Embryologia**, v. 33, n. 5, p. 257–262, 2004.

PARRISH, J.; SUSKO-PARRISH, J. Capacitation of bovine sperm by heparin. **Biology of Reproduction**, p. 1171–1180, 1988.

PARTYKA, A.; LUKASZEWICZ, E.; NIŻAŃSKI, W. Effect of cryopreservation on sperm parameters, lipid peroxidation and antioxidant enzymes activity in fowl semen. **Theriogenology**, v. 77, n. 8, p. 1497–1504, 2012.

POULSEN, H. E.; SPECHT, E.; BROEDBAEK, K.; HENRIKSEN, T.; ELLERVIK, C.; MANDRUP-POULSEN, T.; TONNESEN, M.; NIELSEN, P. E.; ANDERSEN, H. U.; WEIMANN, A. RNA modifications by oxidation: a novel disease mechanism? **Free Radical Biology & Medicine**, v. 52, n. 8, p. 1353–1361, 2012.

RAHMAN, M. B.; VANDAELE, L.; RIJSSELAERE, T.; ZHANDI, M.; MAES, D.; SHAMSUDDIN, M.; VAN SOOM, A. Oocyte quality determines bovine embryo development after fertilisation with hydrogen peroxide-stressed spermatozoa. **Reproduction, Fertility, and Development**, v. 24, n. 4, p. 608–618, 2012.

RAWE, V. Y.; OLMEDO, S. B.; NODAR, F. N.; DONCEL, G. D.; ACOSTA, A A; VITULLO, A D. Cytoskeletal organization defects and abortive activation in human oocytes after IVF and ICSI failure. **Molecular human reproduction**, v. 6, n. 6, p. 510–516, 2000.

RIVLIN, J.; MENDEL, J.; RUBINSTEIN, S.; ETKOVITZ, N.; BREITBART, H. Role of hydrogen peroxide in sperm capacitation and acrosome reaction. **Biology of Reproduction**, v. 70, n. 2, p. 518–522, 2004.

RUIZ-PESINI, E.; DIEZ, C.; LAPEÑA, A C.; PÉREZ-MARTOS, A.; MONTOYA, J.; ALVAREZ, E.; ARENAS, J.; LÓPEZ-PÉREZ, M. J. Correlation of sperm motility with mitochondrial enzymatic activities. **Clinical Chemistry**, v. 44, n. 8 p. 1616–1620, 1998.

SALEH, R.; AGARWAL, A.; NADA, E.; EL-TONSY, M.; SHARMA, R.; MEYER, A.; NELSON, D.; THOMAS, A. Negative effects of increased sperm DNA damage in relation to seminal oxidative stress in men with idiopathic and male factor infertility. **Fertility and Sterility**, v. 79, n. June, p. 1597–1605, 2003.

SCHOBBER, D.; AURICH, C.; NOHL, H.; GILLE, L. Influence of cryopreservation on mitochondrial functions in equine spermatozoa. **Theriogenology**, v. 68, p. 745–754, 2007.

SIGNORELLI, J.; DIAZ, E. S.; MORALES, P. Kinases, phosphatases and proteases during sperm capacitation. **Cell and Tissue Research**, 2012.

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, 2007.

SIMÕES, R.; FEITOSA, W. B.; SIQUEIRA, A. F. P.; NICHI, M.; PAULA-LOPES, F. F.; MARQUES, M. G.; PERES, M. A.; BARNABE, V. H.; VISINTIN, J. A.; ASSUMPÇÃO, M. E. O. A. Influence of bovine sperm DNA fragmentation and oxidative stress on early embryo in vitro development outcome. **Reproduction**, v. 146, n. 5, p. 433–441, 2013.

SUN, J.; JURISICOVA, A.; CASPER, R. Detection of deoxyribonucleic acid fragmentation in human sperm: correlation with fertilization in vitro. **Biology of Reproduction**, v. 56, n. 3, p. 602–607, 1997.

TESARIK, J.; GRECO, E.; MENDOZA, C. Late, but not early, paternal effect on human embryo development is related to sperm DNA fragmentation. **Human Reproduction**, v. 19, n. 3, p. 611–615, 2004.

THOMSON, L. K.; FLEMING, S. D.; AITKEN, R. J.; DE IULIIS, G. N.; ZIESCHANG, J. A.; CLARK, A. M. Cryopreservation-induced human sperm DNA damage is predominantly mediated by oxidative stress rather than apoptosis. **Human Reproduction**, v. 24, n. 9, p. 2061–2070, 2009.

WANG, H.; JOSEPH, J. Quantifying cellular oxidative stress by dichlorofluorescein assay using microplate reader. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 27, n. 99, p. 612–616, 1999.

WARD, C. R.; STOREY, B. T. Determination of the time course of capacitation in mouse spermatozoa using a chlortetracycline fluorescence assay. **Developmental Biology**, v. 104, n. 2, p. 287–296, 1984.

WARD, F.; RIZOS, D.; CORRIDAN, D.; QUINN, K.; BOLAND, M.; LONERGAN, P. Paternal influence on the time of first embryonic cleavage post insemination and the implications for subsequent bovine embryo development in vitro and fertility in vivo. **Molecular Reproduction and Development**, v. 60, n. 1, p. 47–55, 2001.

WARD, W.; COFFEY, D. DNA packaging and organization in mammalian spermatozoa: comparison with somatic cells. **Biology of Reproduction**, p. 569–574, 1991.

WATERHOUSE, K. E.; GJELDNE, A.; TVERDAL, A.; DE ANGELIS, P. M.; FARSTAD, W.; HÅRD, M.; KOMMISRU, E. Alterations of sperm DNA integrity during cryopreservation procedure and in vitro incubation of bull semen. **Animal Reproduction Science**, v. 117, n. 1-2, p. 34–42, 2010.

XU, J.; GUO, Z.; SU, L.; NEDAMBALE, T.; ZHANG, J.; SCHENK, J.; MORENO, J.; DINNYÉS, A.; JI, W.; TIAN, X.; YANG, X.; DU, F. Developmental potential of vitrified holstein cattle embryos fertilized in vitro with sex-sorted sperm. **Journal of Dairy Science**, v. 89, n. 7, p. 2510–2518, 2006.

YAMAUCHI, Y.; SHAMAN, J. A.; WARD, W. S. Non-genetic contributions of the sperm nucleus to embryonic development. **Asian Journal of Andrology**, v. 13, n. 1, p. 31–35, 2011.

YOON, S.; JELLERETTE, T.; SALICIONI, A.; LEE, H.; YOO, M.; COWARD, K.; PARRINGTON, J.; GROW, D.; CIBELLI, J.; VISCONTI, P.; MAGER, J.; FISSORE, R. Human sperm devoid of PLC, zeta 1 fail to induce Ca²⁺ release and are unable to initiate the first step of embryo development. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 118, n. 11, p. 3671–3681, 2008.

ZABLUDOVSKY, N.; ELTES, F.; GEVA, E.; BERKOVITZ, E.; AMIT, A.; BARAK, Y.; HAR-EVEN, D.; BARTOOV, B. Relationship between human sperm lipid peroxidation, comprehensive quality parameters and IVF outcome. **Andrologia**, v. 31, n. 2, p. 91–98, 1999.

ZINI, A.; AGARWAL, A. **Sperm chromatin**. New York, NY: Springer New York, 2011. 535 p.