

ADRIANO FELIPE PEREZ SIQUEIRA

Efeito de atributos espermáticos na produção *in vitro* de embriões bovinos

São Paulo

2016

ADRIANO FELIPE PEREZ SIQUEIRA

Efeito de atributos espermáticos na produção *in vitro* de embriões bovinos

Tese 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 Doutor em Ciências

Departamento:
Reprodução Animal

Área de Concentração:
Reprodução Animal

Orientador:
Profa. Dra. Mayra Elena Ortiz D'Ávila Assumpção

De acordo: _____

Orientador(a)

São Paulo

2016

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.3322
FMVZ

Siqueira, Adriano Felipe Perez
Efeito de atributos espermáticos na produção *in vitro* de embriões bovinos / Adriano Felipe
Perez Siqueira. -- 2016.
78 f. : il.

Tese (Doutorado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e
Zootecnia. Departamento de Reprodução Animal, São Paulo, 2016.

Programa de Pós-Graduação: Reprodução Animal.

Área de concentração: Reprodução Animal.

Orientador: Profa. Dra. Mayra Elena Ortiz D'Ávila Assumpção.

1. Qualidade seminal. 2. Citometria de fluxo. 3. Fecundação *in vitro*. 4. Fertilidade. 5. Touros. I.
Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO



FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

Comissão de Ética no Uso de Animais



CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado “Efeito dos atributos espermáticos na produção *in vitro* de embriões em bovinos”, protocolado sob o nº 2720/2012, utilizando amostras de sêmen e oócitos de de bovinos, 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 sperm attributes on *in vitro* production in bovine”, protocol number 2720/2012, utilizing samples of bovine semen and oocytes of indeterminate number of cattle, 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, 27 de abril de 2016.

Denise Tabacchi Fantoni
Presidente

Av. Prof. Dr. Orlando Marques de Paiva, nº87
Cidade Universitária “Armando de Salles Oliveira”
São Paulo/SP – Brasil
05508-270

Fone: + 55 11 3091-7676/0904
Fax: +55 11 3032-2224
e-mail: ceuavet@usp.br
<http://www.fmvz.usp.br/comissao-de-etica-www>
<http://orion.fmvz.usp.br/index.php#>

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: SIQUEIRA, Adriano Felipe Perez

Título: Efeito de atributos espermáticos na produção *in vitro* de embriões bovinos

Tese 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 Doutor em Ciências

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Agradecimentos

Feliz por sempre ter muito a agradecer, já peço desculpas caso me esqueça de alguém ou algo, mas fim de doutorado, cheguei aos 30 e algumas vezes a memória falha, dá um desconto rsss...

À minha mãe, Terezinha, pelas marmitas, lanches, bolos para manter minha hiperglicemia no laboratório, ao meu pai, Siqueira, pelas esfihas e lanches, quando chego em casa (dá onde será que veio meu espirito gordo?) e claro, pelo suporte financeiro (PAISpesp) rsss...Ao meu irmão, André e minha cunhada, Fernanda e à toda minha família pelos momentos divertidos e hilários, com as trapalhadas desta família singular, e claro o clássico karaokê dos primos!! Ao eterno e saudoso Simon, que quase resistiu até este momento da minha vida e me mostrou que mais importante que o tempo é como você vive, então não espere, não deixe passar, aproveite mesmo as coisas pequenas se forem elas que te proporcionem prazer e felicidade! Consigo facilmente lembrar-me dele olhando de longe esperançoso, abanando o rabo e provavelmente pensando: “releve que eu aprontei e estou de castigo, me deixa ir aí ficar com você!!!” (...sempre um amável pilantra...).

À Universidade de São Paulo e toda sua estrutura, da qual tenho tanto orgulho de fazer parte.

À Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – USP, só quem conhece e fez parte consegue entender, especialmente à turma 70, ao grupo A e ao G7.

Ao Programa de Pós Graduação em Reprodução Animal (PPGRA) e ao Departamento de Reprodução Animal, pela prazerosa convivência desde 2005, como passa!!! Representados pelo professor Mário Binelli, meu primeiro orientador, atual presidente da PPGRA, Harumi, secretária da PPGRA salvadora dos perdidos da burocracia, e os saudosos professores Barnabe, Marcelo e nossa querida dona Silvia. A todos os queridos pós-graduandos do programa, pelas festas, churrascos, aniversários, chá de bebe, journal club, copas do mundo...por ajudarem nas aspirações quando chegavam 200 ovários, como é bom ter um ambiente e uma convivência assim, além da parceria científica!!!

À minha orientadora, Mayra Elena Ortiz D’Ávila Assumpção, cujo nome só não é maior que o coração, por basicamente uma adoção, pela compreensão e apoio, por confiar, dar liberdade e, além disso, comprar nossas ideias e defender nossos interesses. Uma acumuladora de compromissos e responsabilidades, que não aprendeu a dizer NÃO, mas com uma dedicação sem pretensões que inspira. Sempre gentil e carinhosa com seus orientados, reconhecendo e valorizando os pontos fortes, respeitando e auxiliando nas limitações (já que você não sai do Brasil eu trago o mundo para você, ingleses, italianos, colombianos, peruanos, nada como fazer um sanduíche sem passaporte e passagens aéreas kkkk). Bom sentir que posso sempre contar, principalmente nos momentos mais turbulentos e quando as cagadas foram inevitáveis, incluindo umas barbeiragens por aí kkkk.....

Ao professor Visintin, outro acumulador de compromissos e funções, sempre buscando o melhor para seus alunos, para sua faculdade e esta universidade, por todo apoio e colaboração.

À Letícia (Lelê, Lets, Lelezinha) por toda parceria no laboratório, por me empurrar quando preciso, por ser parte dos meus tentáculos, rodar 40 percois no escuro, aspirar zilhões de ovários, selecionar milhares de oócitos, por perdoar meus atrasos e ups...meus esquecimentos! Sempre disposta a ajudar, corrigir, cortar, cortar e cortar (Dri para de encher linguiça...). A temível carrasco mais carinhosa que eu conheço, sempre se lembrando de mim em seus doces, comidas, mimos da dona Lúcia e do seu Orlando, nas caronas, nas hospedagens, nos shots, nas tetas kkkkk...Uma ótima amiga para todas as horas, trabalho e diversão.

À Patrícia (Patira, Paty-pró, Patricia Melatonina de Assis), guerreira e corajosa, é bom ver você indo longe, pena que foi longe mesmo kkk, muitas saudades, parceira de CA, (uma biritinha e a gente vai embora, ahaamm..., nem a pata de vaca nos segurava). Horas no escuro no citômetro analisando trocentas amostras...já disse que tenho saudades?? Kkkk

Julia (Julieta) e Cristina (Crisonilda Lúcio), todos juntos na galera fitness sem limites kkkkk, consultoras, animadoras, críticas, apoiadoras, realmente não há limites, nem pra nossa diversão, tão bom quando estamos todos juntos, cada um com o seu jeito, tão diferentes, tão iguais, é bom sempre poder contar com vocês...quero ter vocês para sempre!!! Amo vocês(Jú, inclua a dona Cleusa, Mariane e Cíntia).

Cristina (Kustela), sempre disposta a me salvar quando estou surtando, um temaki pra desabafar, me salvando com sua organização, comprando passagens, verificando datas e compromissos, facilitando minha vida, isso quando não me financiando kkkkkk. Uma das pessoas mais amáveis, sempre preocupada com todos, buscando o melhor pra todos, só não se esquece de você também tá? Amiga fiel, com quem sei que sempre posso contar e que sempre topa uma gordice por aí. Obrigado por esses 12 anos de companheirismo, pelo empréstimo de família (Jú, Caio, dona Ivete, tio Juvenal)!!

Keila (Keiloka) você traiu a Cris e a mim com o Marcelo (agregado mais bem-vindo e querido) e nos abandonou...kkk, brincadeira. É muito bom ver como a distância não muda em nada, sempre presente, viva o whats kkkk, e é bom porque agora temos um motivo para quebrar a rotina e passar um tempo juntos...nossos fins de semana em POA são revitalizantes. Claro que sei que também posso sempre contar com vc. Saiba que me sinto muito feliz e livre quando estou com vocês...somos quase uma família kkkk!

Fê e Tomitas, os esquilos ativar ficaram velhos kkkkkkk, acho q agora estamos mais slow-motion, mas sempre bom poder ter a companhia de vocês, a amizade, sair, comer um japa, umas baladinhas, precisamos encontrar a fonte da juventude kkkkk

Aos queridos Mayretes e JAVinetes, atuais, defendidos, pré-históricos kkkk!!!

Atuais: Luana (Luaninha, Luanits, Luana Goiabinha), por junto com a Lelê ser meus tentáculos, e rodar aqueles milhões de percois, pipetar as sondas, analisar o sêmen, aspirações também....acho que você junto com a Lê podem pedir dupla titulação. Camilla (Camis) viabilizando as coisas, compras, pedidos, estoques, ligações, matadouro, motoboy, meios, ahhhh quanta coisa kkkk, mais gostoso quando são doces, bolos de aniversário e doces, obrigado por todo trabalho e esforço com toda essa parte organizacional. Robinson (Rob),

Thaís (Thá Hamilton), chegaram os ovários kkkk, obrigado pela disposição para aspirar, dúvidas estatísticas e por sempre estarem disponíveis a colaborar com o que fosse necessário. Marcelo (Fébs, Febem, Oráculo) nosso pós-doc para todos os assuntos, um conhecimento invejável, sempre sabe a resposta, quando crescer quero ser igual a você kkkk. Nacho(Ignácio Pinto Pancho), bienvenido, mais um maluco pro grupo e dos com espirito gordo kkk aeeee...Tamie recém chegada, fui aluno PAE da sua turma e agora você já aqui (:o) seja bem-vinda rsss....Aos ICs [Carla, Catarina, Karina, Ítalo, Pedro, Bruna, Mariana (Xúm)] e a todos os estagiários (incluindo Camilo mi hijo) que passaram por esses quatro anos, dos mais diversos lugares, sempre dispostos a aprender, a ajudar, a acrescentar, conviver e interagir, foram grande parte do aprendizado e é muito bom ver a evolução e ter a companhia de vocês.

Aos defendidos e pré-históricos: Renata, Flávia, Groke, Alê Nicácio, Zeca, Éverton, Pedro, Rafa, Paulo, Juliana, Samir, Fabíola, Marcela, Weber, como o tempo passa...

A todos os CASA colaboradores (Brunão, Dani, Diego, Andressa, Maíra) que estavam sempre disponíveis para passar o CASA. Ao professor Marcílio pelas dicas, sugestões, auxílios linguísticos, estatísticos, por confiar a mim a guarda e cuidados dos bonsais.

Aos queridos Mineiro, Adriele, Leoni e a todos do Angelelli pela colaboração e dedicação com o material, sempre preocupados e solícitos para que tudo ficasse certo, uma ótima equipe.

À Izadora Rezende, era para vir aprender FIV e utilizar uns embriões e virou braço direito, esquerdo e pernas. Muito responsável e eficiente, me auxiliando na preparação de meios, placas e o que fosse preciso, como diria a Letícia, me deixou extremamente mal acostumado kkkkkkk, foi um imenso prazer ter sua companhia e carinho, foi divertido trabalhar com você, ótima parceria!

Aos amigos dos Corais Irmãos Usp (Vet, IB e IO), representados pelos regentes Leo (Leonardo Camargos) e Ângela (Ângela Zucarelli) muito divertido, sempre um momento prazeroso no meio do dia, dar uma quebrada na rotina e uma revigorada, vocês fazem meu dia mais feliz.

Ao Davi Zago, por toda dedicação e competência, pela compreensão e disposição, um profissional invejável, prestando um trabalho com carinho e excelência, ahhh e claro por toda paciência..kkk

A todos meus amigos representados pelo Déio, Carol Minucci, Di (Dilermando) Di (Diego), Paulinha (Polla), Morulão, Pelanca, Isoca, Ju, Xabs, Fuka, Beikon, Balbs, Sinão, Tatoo, Raley, Gabi, Dé, Mi.

À FAPESP (2013/07940-9) e a CAPES pelo apoio financeiro.

Não é o que você é por dentro,
mas o que você faz que te define.

(Batman Begins)

RESUMO

SIQUEIRA, A. F. P. **Efeito de atributos espermáticos na produção *in vitro* de embriões bovinos.** [Effect of sperm traits on bovine *in vitro* production]. 2016. 78 f. Tese (Doutorado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

A produção *in vitro* de embriões (PIVE) bovinos é uma ferramenta importante na reprodução animal, com aplicações acadêmicas e comerciais, e com grande relevância econômica. Apesar da sua aplicabilidade, a eficiência da PIVE ainda pode ser aumentada. Efeitos espermáticos podem ser evidenciados no desenvolvimento embrionário durante a PIVE apresentando grandes variações nas taxas de produção. Devido ao aspecto multifatorial da fertilidade, as avaliações espermáticas apresentam resultados inconstantes, mesmo com o uso de métodos mais precisos de análise como a citometria de fluxo, combinada às sondas fluorescentes, que permitem avaliar maior número de espermatozoides e de atributos simultaneamente. O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito de atributos espermáticos (motilidade antes e após gradiente de Percoll[®], integridade de membranas plasmática e acrossomal, alto potencial de membrana mitocondrial e resistência da cromatina) de maneira individual, (diferença para apenas para um atributo espermático) e de maneira combinada em perfis espermáticos (diferença para todos os atributos espermáticos simultaneamente). O efeito foi avaliado por meio das taxas de clivagem, blastocisto e eficiência de desenvolvimento embrionário (taxa de blastocisto/taxa de clivagem). Os resultados demonstraram que os atributos motilidade prévia ao Percoll[®], a integridade da membrana acrossomal e o potencial de membrana mitocondrial, individuais, apresentam efeito negativo sobre as taxas de desenvolvimento embrionário e de blastocisto. A motilidade após o gradiente de Percoll[®], a integridade da membrana plasmática e a resistência da cromatina, bem como a combinação de todos os atributos espermáticos analisados, sob mesmas condições, não apresentaram efeito sobre a PIVE. Deste modo, conclui-se que controversamente alguns atributos espermáticos podem apresentar efeitos negativos sobre as taxas da PIVE e que a função e interação de atributos espermáticos com o processo *in vitro* devem ser mais bem compreendidas, a fim de permitir o aprimoramento deste processo podendo aumentar as taxas de produção, maximizando a eficiência da PIVE.

Palavras-chave: Qualidade seminal. Citometria de fluxo. Fecundação *in vitro*. Fertilidade. Touros.

ABSTRACT

SIQUEIRA, A. F. P. **Effect of sperm traits on bovine *in vitro* production.** [Efeito de atributos espermáticos na produção *in vitro* de embriões bovinos]. 2016. 78 f. Tese (Doutorado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

In vitro production (IVP) of bovine embryos is an important technology of animal reproduction. This technology is applied on research and livestock, with economic highlights, however IVP efficiency could be higher, and can be influenced by male effects. Until now, sperm evaluations had failed to determine these male effects, even using advanced technologies such as large mix of fluorescent probes by flow cytometry analysis, which evaluates a large number of sperm cells and traits simultaneously. Then, the aim of this study was to determine the effect of sperm traits (motility before and after Percoll[®] selection, plasma membrane and acrosome integrity, high mitochondrial membrane potential, and chromatin structure) on IVP rates. Effect of each trait was enriched to evaluate the individual trait effect (differences between groups of bulls exclusively for the enriched trait, while others traits was homogenous). Combined effect of traits was also evaluated (differences between groups of bulls, and groups of batches from same bulls, for all traits simultaneously, generating a sperm profile). Enriched and combined effects were evaluated on cleavage, blastocyst and embryo development (blastocyst/cleavage) rates. Results showed that motility before Percoll[®] selection, acrosome integrity, and high mitochondrial membrane enriched effects had negative impact on blastocyst and embryo development rates. Motility after Percoll[®] selection, plasma membrane integrity, chromatin structure, and combined effects were not significant on IVP rates. We can conclude that controversially, some sperm traits could have a negative effect on IVP outcomes, thereafter sperm traits physiology and interactions with *in vitro* systems must be better understood to enhance *in vitro* fertilization conditions, increasing IVP yields.

Keywords: Sperm quality. Flow cytometry. *In vitro* fertilization. Fertility. Bulls.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

µg	Micrograma
µl	Microlitro
µM	Micromolar
AI	Acrossomo íntegro
	É o resultado da divisão da fluorescência vermelha pela Fluorescência total
AlfaTYlog	(vermelho + verde) da cromatina de cada espermatozóide.
ATP	Adenosina trifosfato
BSA	Albumina sérica bovina
CASA	<i>Computer-assisted sperm analysis</i>
CAPES	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
CCO	Complexos <i>cumulus oophorus</i>
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais em Experimentação
CIV	Cultivo <i>in vitro</i>
CO₂	Dióxido de carbono
CCPs	Centrais de Colheita e Processamento de Sêmen
D	Dia
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EDTA	<i>Ethylenediamine tetraacetic acid</i>
EROs	Espécies reativas de oxigênio
FAPESP	Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo
FITC-PSA	<i>Psium sativum</i> conjugada ao fluoróforo isotiocionato de fluoresceína
FIV	Fecundação <i>in vitro</i>
FSH	Hormônio folículo estimulante
g	Grama
°C	Graus celsius
G	Gauge
GSH	Glutationa
h	Hora
HCl	Ácido clorídrico
IA	Inseminação artificial
ICSI	Injeção intra-citoplasmática de espermatozoides

JC-1	<i>5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3' tetraethylbenzimidazolylcarbocyanine iodide</i>
K	Potássio
KSOM	Potassium supplemented simplex optimised medium
LA	Laranja de acridina
LA-	Cromatina resistente ao desafio ácido
LASER	<i>Light Amplification by Stimulated Emissions of Radiation</i>
m	Massa
M	Molar
Min	Minuto
MIV	Maturação <i>in vitro</i>
mg	Miligrama
mL	Mililitro
mm	Milimetro
mM	milimolar
MPI	Membrana plasmática íntegra
mW	Miliwatt
n	Número
N₂	Nitrogênio
Na	Sódio
NaCl	Cloreto de Sódio
nm	Nanômetro
O₂	Oxigênio
OPU	<i>Ovum</i> pick-up
P	P valor
PBS	Solução salina fosfatada
pH	Potencial hidrogeniônico
PI	Iodeto de propídio
PIV	Produção <i>in vitro</i>
PIVE	Produção <i>in vitro</i> de embriões
PÓS	Motilidade após seleção por gradiente de Percoll
PRÉ	Motilidade prévia seleção por gradiente de Percoll
Rho	Coefficiente de correlação
s	Segundo

SAS	Statistic analysis system
SCSA	Sperm chromatin struture assay
SFB	Soro fetal bovino
SOV	Superovulação
SPTZ	espermatozoides
TALP	<i>Modified tyrode's albumin lactate pyruvate</i>
TCM	<i>Tissue culture medium</i>
TNE	Tris-NaCL-EDTA
v	Volume
X	Vezes

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	16
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	18
2.1	PRODUÇÃO <i>IN VITRO</i> DE EMBRIÕES	18
2.2	O ESPERMATOZOIDE E O EFEITO TOURO.....	19
2.3	FERTILIDADE <i>IN VIVO</i> X <i>IN VITRO</i>	20
2.4	ATRIBUTOS ESPERMÁTICOS E SUA RELAÇÃO COM A FUNÇÃO ESPERMÁTICA.....	22
2.5	O IMPASSE DO VALOR PREDITIVO DE TESTES DE ANÁLISE ESPERMÁTICA.....	26
3	HIPÓTESE.....	28
4	OBJETIVOS	29
4.1	OBJETIVOS GERAIS.....	29
4.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	29
5	MATERIAL E MÉTODO	30
5.1	AMOSTRAS SEMINAIS	30
5.2	ANÁLISE DA MOTILIDADE ESPERMÁTICA	30
5.3	ANÁLISES DO ACROSSOMO, MEMBRANA PLÁSMÁTICA, POTENCIAL DE MEMBRANA MITOCONDRIAL E RESISTÊNCIA DA CROMATINA APÓS SELEÇÃO POR GRADIENTE DE PERCOLL [®]	31
5.4	PRODUÇÃO <i>IN VITRO</i> DE EMBRIÕES (PIVE).....	32
5.5	EXPERIMENTO I – ANÁLISE E SELEÇÃO DE AMOSTRAS.....	33
5.6	EXPERIMENTO II – PIVE DAS AMOSTRAS SELECIONADAS.....	35
5.7	ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	35
6	RESULTADOS	36
6.1	EXPERIMENTO I - ANÁLISE E SELEÇÃO DE AMOSTRAS	36
6.2	EXPERIMENTO II - EFEITO DO PERFIL ESPERMÁTICO NA PIVE.....	42
6.3	DISCUSSÃO	49
7	CONCLUSÃO.....	61
8	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	62
	REFERÊNCIA	63
	ANEXO	72

1 INTRODUÇÃO

A produção *in vitro* de embriões (PIVE) bovinos, principalmente devido ao desenvolvimento da maturação *in vitro* (MIV) associada à aspiração folicular *in vivo* (OPU), tem permitido o uso de uma reserva de oócitos até então desperdiçada de fêmeas de alto potencial genético (LONERGAN; FAIR, 2016). Esta biotécnica vem sendo empregada para aumentar o número de descendentes destas fêmeas em programas de melhoramento genético animal, sendo que, em países como o Brasil, sua aplicação há tempos já superou a de outras biotécnicas, como a superovulação (SOV) (VIANA et al., 2010). A PIVE é capaz de produzir mais bezerros de um mesmo cruzamento, quando comparada à SOV (PONTES et al., 2009). No Brasil, graças a este destaque comercial na produção de bovinos, os embriões PIV representaram 87% das transferências (VIANA et al., 2010). Essa importância econômica no mercado nacional tem justificado estudos que visem o aumento da eficiência desta biotécnica, pois o rendimento influencia diretamente o custo e a utilização.

A eficiência da PIVE é dependente predominantemente de dois fatores: os gametas e o sistema de produção. Com relação aos gametas, tanto o efeito da fêmea, quanto o efeito do macho são significativos (PALMA; SINOWATZ, 2004). Apesar das limitações referentes ao gameta feminino, como a eficiência da maturação citoplasmática *in vitro* e a qualidade oocitária, é interessante notar que o gameta masculino é responsável por diferenças significativas no desenvolvimento embrionário, nas taxas de PIVE e até mesmo na relação do sexo, crio-tolerância e polispermia dos embriões produzidos (WARD et al., 2003; PALMA; SINOWATZ, 2004; ALOMAR et al., 2008), caracterizando diferenças importantes na fertilidade *in vitro* entre touros.

A fertilidade *in vivo* de touros pode não apresentar efeito sobre a fertilidade *in vitro* (AL NAIB et al., 2011), ou até mesmo apresentar correlações negativas (VANDAELE et al., 2006), sugerindo uma possível falta de relação entre estas, o que limita a utilização cruzada dos resultados de cada sistema. Estabelecida esta diferença, fica evidente a necessidade de compreender a influência dos atributos espermáticos na PIVE, com o intuito de identificar os que apresentam maior impacto e maior rendimento da PIVE.

Considerando este contexto, o estudo dos atributos espermáticos que influenciam na PIVE pode fornecer subsídios para seleção de touros com diferentes índices de fertilidade *in*

vitro, além de gerar conhecimentos básicos sobre a biologia do gameta masculino e sua interação com os processos *in vitro*, possibilitando o aumento da produtividade e lucratividade desta biotécnica.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES

A PIV de embriões, no âmbito acadêmico é amplamente utilizada na rotina de laboratórios que pesquisam cultivo de células-tronco embrionárias, transgenia, clonagem e da própria biotécnica em si (KRISHER; BAVISTER, 1998; KHURAMA; NIEMANN, 2000; BADR et al., 2007). No âmbito comercial, a PIVE bovina permite a otimização do uso de animais com alto potencial genético, diminuindo o intervalo entre as gerações, acelerando com isto o ganho genético (LOHUIS, 1995; TANEJA et al., 2000), e também possibilita a utilização de animais jovens, gestantes ou lactantes ou com infertilidade uterina adquirida (TERVIT, 1996; TANEJA et al., 2000). Desta forma, se tornou uma ferramenta de grande importância na reprodução (MARINHO et al., 2015; VIEIRA et al., 2016), o que justifica a larga aplicação e o crescente interesse comercial que esta técnica apresentou nos últimos anos.

Outro fator que impulsiona o uso comercial da PIVE é o potencial de produção de embriões com a utilização da OPU-PIV, que é superior a produção da SOV (9,4 X 6,7 embriões, respectivamente). Apesar dos embriões produzidos pela SOV apresentarem maior capacidade em estabelecer uma gestação (33,5 X 41,5%), o maior número de embriões produzidos por meio da OPU-PIV resulta em maior número de bezerros nascidos (PONTES et al., 2009). Por esse motivo a transferência de embriões PIV no Brasil superou os embriões *in vivo*, sendo o maior produtor mundial, responsável por 86% dos embriões PIV transferidos em 2011 (HASLER, 2014).

Esta menor taxa de sobrevivência embrionária comparada à SOV e, ocasionalmente, prole anormal (THIBIER 2005; HANSEN et al., 2006; PONTES et al., 2009) são fatores que reduzem a eficiência da PIV, após a transferência dos embriões. Antes das transferências, também são observadas perdas ao longo de todas as etapas de produção dos embriões. Durante a MIV, aproximadamente 90% dos oócitos imaturos progridem da prófase I até a metáfase II completando a maturação nuclear. Após a fecundação *in vitro* (FIV), aproximadamente 80% dos oócitos são fecundados e concluem a primeira clivagem. No entanto, menos de 40% chega ao estágio de blastocisto. Essa maior perda durante a última

etapa da PIV, o cultivo *in vitro* (CIV), pode intuitivamente sugerir que esta fase seja o ponto crítico da PIV (LONERGAN; FAIR, 2016). No entanto, contrariamente a esta sugestão, a MIV e a FIV têm demonstrado serem as principais responsáveis pela diminuição nas taxas de blastocistos, enquanto a CIV tem demonstrado apenas influenciar na qualidade dos embriões cultivados *in vitro* (RIZOS et al., 2002). Deste modo, é importante observar que as consequências negativas dessas duas etapas *in vitro* são tardias, resultando em perdas embrionárias após a clivagem.

Durante a FIV, os gametas femininos são expostos aos gametas masculinos e os fenômenos biológicos envolvidos nesta interação podem estar entre as causas do efeito negativo da FIV sobre o desenvolvimento embrionário subsequente. Para tentar elucidar essas perdas embrionárias é necessário compreender o efeito do touro e o papel do seu carreador, o espermatozoide.

2.2 O ESPERMATOZOIDE E O EFEITO TOURO

O efeito paterno carreado pelo espermatozoide pode ser observado tanto tardiamente em embriões sem alterações morfológicas, associado à fragmentação do material genético espermático, quanto precocemente em zigotos alterando o padrão pró-nuclear e a morfologia embrionária mesmo quando não há fragmentação do material genético espermático (TESARIK et al., 2004). Na produção *in vitro*, o efeito espermático tem sido abordado tanto com relação aos fatores extrínsecos da amostra seminal, como por exemplo, as metodologias de processamento do sêmen para a aplicação na PIVE, quanto com relação aos fatores intrínsecos, ou seja, características morfo-funcionais do espermatozoide denominadas, neste presente estudo como **atributos espermáticos**.

Estudos em relação aos fatores extrínsecos, como os métodos de seleção (DODE et al., 2002; KOCHHAR et al., 2003; SUZUKI et al., 2003; SAMARDZIJA et al., 2006; MACHADO et al., 2009), bem como os fatores intrínsecos aos espermatozoides, como os atributos espermático, na PIVE, geralmente não chegam a um consenso e apresentam resultados muito variáveis. Alguns estudos não encontraram diferença nas taxas de penetração, fecundação e clivagem entre os métodos de seleção mais utilizados, como

Percoll[®], *swim-up* ou somente lavagem por centrifugação (DODE et al., 2002), ou nas taxas de clivagem e blastocisto para distintos volumes, tempos e força de centrifugação de Percoll[®] (MACHADO et al., 2009). No entanto, outros estudos encontraram diferenças dependentes dos touros para a seleção (SUZUKI et al., 2003) e diferenças nas taxas de blastocisto e no número de blastômeros, entre métodos de seleção (SAMARDZIJA et al., 2006).

Já os estudos em relação aos fatores intrínsecos têm demonstrado um efeito de touros extremamente significativo na PIVE (PALMA; SINOWATZ, 2004). Este efeito se reflete tanto na cinética da fecundação e desenvolvimento embrionário, quanto na taxa de polispermia, clivagem, estágio de bloqueio de desenvolvimento, relação do sexo, qualidade ou crio-tolerância dos embriões produzidos e no rendimento da PIVE (WARD et al., 2003; PALMA; SINOWATZ, 2004; TESARIK, 2005; ALOMAR et al., 2008).

Uma questão importante na tentativa de elucidar e controlar o efeito touro a fim de maximizar a eficiência da PIV é determinar quais estruturas celulares estão relacionadas e como a função espermática resulta na fertilidade *in vitro* de amostras seminais e/ou de cada touro. Uma provável dificuldade em atingir este objetivo está na transposição de conhecimentos e metodologias aplicadas no estudo da fertilidade *in vivo* para a *in vitro*, sem considerar as distinções entre elas.

2.3 FERTILIDADE *IN VIVO* X *IN VITRO*

O processo *in vitro*, desde sua idealização e desenvolvimento, busca mimetizar o processo *in vivo*. No entanto, é importante ressaltar que há diferenças fundamentais entre esses processos. *In vivo*, os gametas masculinos são depositados no fundo da vagina na monta natural ou no corpo uterino, próximo à região cervical durante uma inseminação artificial. Desta forma, estes devem possuir viabilidade e metabolismo suficiente para sustentar a motilidade durante o deslocamento por todo trato reprodutivo feminino, passando pela barreira do muco cervical. Neste trajeto, devem manter as funções e estruturas celulares até atingir a junção ampola-istmo, onde ocorrerá a interação com o gameta feminino e a fecundação. O espermatozoide quando no local da fecundação, deve ainda sofrer o processo de capacitação espermática para enfim estar apto a penetrar no oócito (GARRETT et al.,

2008). No entanto, no sistema *in vitro*, os espermatozoides são depositados diretamente sobre os oócitos maturados, o que já sugere que alguns aspectos relacionados ao metabolismo e à viabilidade não sejam tão requeridos para o sucesso, neste processo.

Outra diferença crucial está na proporção espermatozoide/oócito, na fecundação *in vivo* são propostos vários níveis de controle ovariano para a manutenção da proporção espermatozoide/oócito ≈ 1 , durante os estágios iniciais da fecundação *in vivo*, evitando assim a polispermia (HUNTER, 1996). Na produção *in vitro*, os oócitos são incubados na presença de concentrações espermáticas que resultam numa proporção final de milhares de espermatozoides/oócito. Essas diferenças entre os dois sistemas são apenas algumas das prováveis possibilidades para a dificuldade de se estabelecer uma relação entre a fertilidade *in vivo* e *in vitro* de touros.

Diversos estudos demonstraram esta diferença de fertilidade *in vitro* X *in vivo*. Touros com alta fertilidade *in vivo*, apresentando taxa de não retorno ao cio aos 60-90 dias entre 65-75% na inseminação artificial (IA) foram testados na PIVE e, apesar da alta e homogênea fertilidade na IA, apresentaram desempenho heterogêneo *in vitro*, com taxas de clivagem e de blastocisto que variaram de 36.3 a 93.4% e 6.9 a 51.2%, respectivamente (PALMA; SINOWATZ, 2004). Touros com taxa de não retorno ao estro aos 56 dias entre 70,4 e 75,9% na IA, também apresentaram diferenças na cinética de fecundação, taxas de polispermia, clivagem, cinética e taxas de desenvolvimento embrionário, bem como para taxa de blastocisto e relação de sexo dos embriões produzidos (ALOMAR et al., 2008). O inverso também foi observado, no qual touros com diferente fertilidade *in vivo* apresentaram desempenho semelhante para a PIVE (RODRÍGUEZ-LOZANO et al., 2014).

Já foram determinadas baixas correlações negativas (Spearman $<0,3$) entre a fertilidade *in vivo* e as taxas de clivagem e blastocisto (VANDAELE et al., 2006). No entanto, existe um contrassenso nas correlações entre a fertilidade *in vivo*, avaliada por meio da taxa de não retorno ao estro aos 56 dias, e a fertilidade *in vitro*, avaliada por meio das taxas de clivagem e blastocisto, ora apresentando relação positiva (ZHANG et al., 1997), ora ausentes, inclusive entre trabalhos de um mesmo grupo (ZHANG et al., 1999; ALOMAR et al., 2006).

Apesar dessa relação entre fertilidade *in vivo* e *in vitro* ainda não estar estabelecida e da clara necessidade de considerar a diferença entre as duas ao avaliá-las, as diferenças no desempenho entre touros e amostras são observadas em ambos os sistemas. Na PIVE, a diferença de desempenho entre touros, incluindo diferenças entre amostras de um mesmo

touro têm sido relatadas e estudadas por diversos grupos (OTOI et al., 1993; ZHANG et al., 1997; ZHANG et al., 1999; THUNDATHIL et al., 2000; THUNDATHIL et al., 2001; TANGHE et al., 2002; SUZUKI et al., 2003; WARD et al., 2003; PALMA; SINOWATZ, 2004; TARTAGLIONDE; RITTA, 2004; ALOMAR et al., 2006; ALOMAR et al., 2008; MACHADO et al., 2009; FERRAZ et al., 2014). Essas diferenças entre amostras são vistas sob mesmos sistemas de PIVE, portanto pode-se supor que são decorrentes dos fatores intrínsecos de cada amostra e como estes interagem com o ambiente *in vitro*. Deste modo, a identificação dos fatores intrínsecos, como atributos da população espermática de cada amostra e a relação com os índices da PIVE, apresenta interesse comercial, uma vez que podem explicar diferenças de produção diretamente relacionadas à lucratividade, assim como auxiliar na seleção de amostras seminais com melhores resultados *in vitro*.

2.4 ATRIBUTOS ESPERMÁTICOS E SUA RELAÇÃO COM A FUNÇÃO ESPERMÁTICA

Muitos atributos espermáticos como motilidade, *status* das membranas plasmática e acrossomal, metabolismo energético, atividade mitocondrial, produção de ATP e alterações da cromatina espermática e a relação destes atributos com a função espermática e índices de fertilidade *in vivo* e *in vitro* têm sido alvo de diversos estudos (BALLACHEY; HONENBOKEN; EVENSON, 1987; BALLACHEY; EVENSON; SAACKE, 1988; KJAESTAD et al., 1993; THUNDATHIL et al., 2000; THUNDATHIL et al., 2001; TANGHE et al., 2002; SUZUKI et al., 2003; TARTAGLIONDE; RITTA, 2004; TESARIK; GRECO; MENDOZA, 2004; ALOMAR et al., 2006; FATEHI et al., 2006; GARRETT et al., 2008; ZHANG et al., 2012; FERRAZ et al., 2014).

Devido às diferenças entre o sistema *in vivo* e *in vitro*, pode-se supor que alguns dos parâmetros de motilidade possuam baixa influência na FIV, uma vez que neste processo os gametas são incubados juntos. Esta possibilidade é sustentada pela ausência de diferença entre a motilidade total e progressiva (THUNDATHIL et al., 2001; SUZUKI et al., 2003) e entre todos os parâmetros avaliados pelo sistema computadorizado CASA (KJAESTAD et al., 1993; ALOMAR et al., 2006) para touros com distinta fertilidade *in vitro*, e por estudos nos quais parâmetros de motilidade não contribuem para modelos de predição de fertilidade *in*

vitro (TARTAGLIONDE; RITTA, 2004) ou apresentem correlações não significativas (TANGHE et al., 2002). Por outro lado, o estudo das subpopulações de motilidade espermática demonstrou que a porcentagem de células da subpopulação espermática com motilidade mais rápida e progressiva, antes da congelação, apresentou, após descongelação e seleção por gradiente de densidade Percoll[®], correlações positivas com ligação e penetração da zona pelúcida, assim como a formação de pró-núcleo masculino (FERRAZ et al., 2014).

Alterações de acrossomo conhecidas como “knobbed”, caracterizadas pela presença de espermatozoides com acrossomos achatados ou recortados, demonstraram que, apesar desta estrutura estar íntegra e sua atividade proteolítica (sistema acrosina/proacrosina) preservada, estas células apresentam reduzida capacidade de ligação e penetração na zona pelúcida, o que acarreta em baixa taxa de oócitos fecundados (THUNDATHIL et al., 2001). Além disto, apesar de serem aptos a ligar e penetrar oócitos, os espermatozoides sem esta alteração, presentes em amostras com alta porcentagem de espermatozoides com acrossomo “knobbed”, apresentam baixo potencial de formação de pró-núcleo masculino e os zigotos gerados, menor competência de desenvolvimento em mórula e blastocisto (THUNDATHIL et al., 2000). Estes dados sugerem que estas alterações de acrossomo podem provocar alteração da função molecular desta estrutura, que refletirá não apenas na redução da capacidade de fecundação, mas também no desenvolvimento subsequente dos embriões, demonstrando um efeito tardio deste compartimento. (THUNDATHIL et al., 2000). Além das avaliações de morfologia do acrossomo rotineiramente feitas no exame andrológico, esta estrutura também pode ser analisada por citometria de fluxo, com o uso de lectinas conjugadas a fluorocromos que se ligam à membrana interna ou externa ou matriz acrossômica, dependendo do tipo de lectina, indicando a reação acrossomal ou uma lesão da membrana (GRAHAM; KUNZE; HAMMERSTEDT, 1990; PETRUNKINA; HARRISON; 2011).

A membrana plasmática também pode ser avaliada pela citometria de fluxo. Corantes, como o iodeto de propídio (PI), podem ser utilizados para análise da integridade da membrana plasmática por citometria, apresentando alta correlação com outras análises, como a coloração com eosina/nigrosina avaliada por microscopia (GRAHAM; KUNZE; HAMMERSTEDT, 1990). O uso da citometria de fluxo permitiu o desenvolvimento de novas técnicas para análise da integridade da membrana do espermatozoide que apresentam capacidade superior de prever a fertilidade, uma vez que a membrana plasmática é um acurado sensor biológico do *status* de todas as funções celulares (PEÑA, 2007). Sua importância na fertilidade *in vitro* já foi demonstrada pela associação de análise de integridade de membrana e as taxas da PIVE

(TANGHE et al., 2002; TARTAGLIONDE; RITTA, 2004). Esse título de sensor biológico é amplamente difundido, sendo a análise da membrana plasmática utilizada como sinônimo da viabilidade celular. No entanto, esta nomenclatura é contestável considerando-se que a atividade metabólica é suportada por várias horas após a perda da integridade da membrana plasmática em espermatozoides bovinos (REYES et al., 2002). Apesar dessa falta de consenso, a importância deste atributo é demonstrada em trabalhos que obtiveram em sêmen fresco e pós-descongelção, a estimacão mais precisa da fertilidade *in vivo* de touros. Os resultados da citometria de fluxo apresentaram correlacões com outros atributos como a motilidade pós-descongelção e alteracões da cromatina (CHRISTENSEN et al., 2011).

A análise da funcão mitocondrial e subsequente modulacão, com o uso de bloqueadores específicos, também já foi demonstrada por citometria (GRAHAM; KUNZE; HAMMERSTEDT, 1990). A atividade mitocondrial fornece ATP (adenosina trifosfato) através da fosforilacão oxidativa, um processo aeróbico que ocorre nas mitocôndrias contribuindo para a motilidade espermática em humanos. No entanto, a fosforilacão oxidativa não é suficiente para sustentar uma alta motilidade, sendo, nesta espécie, a fonte primária de energia para a motilidade, a glicólise, um processo anaeróbico que ocorre no flagelo (NASCIMENTO et al., 2008).

Já em bovinos, a produçao de ATP no espermatozoide pode ser obtida através dos dois processos: a respiracão oxidativa e a glicólise (KRZYZOSIAK et al., 1999). Nos espermatozoides, sob condições aeróbicas, a respiracão oxidativa representa aproximadamente 80% da produçao total de ATP, enquanto a via glicolítica representa cerca de 20% (GARRETT et al., 2008). De todo ATP produzido, 75% é consumido para manutencão da motilidade (BOHNENSACK; HALANGK, 1986). Nesta espécie, não há diferencas de motilidade em condições aeróbicas e anaeróbicas, desde que haja um substrato para a glicólise. Quando a glicólise é inibida, a motilidade só é afetada em condições anaeróbicas, sugerindo que nesta espécie as duas fontes de energia contribuam para a motilidade (KRZYZOSIAK; MOLAN; VISHWANATH, 1999).

Tanto a produçao de ATP quanto o consumo de oxigênio já demonstraram correlacionar positivamente com a fertilidade *in vivo* (GARRETT et al., 2008). Após a criopreservacão, o sêmen apresenta maior consumo de oxigênio que o sêmen fresco, sendo que touros com maior fertilidade apresentam menor diferença de consumo de oxigênio após a criopreservacão, sendo que os danos à membrana mitocondrial são sugeridos como

responsáveis pelo aumento do consumo de oxigênio (GARRETT et al., 2008). Apesar do potencial de membrana mitocondrial e da integridade das membranas plasmáticas e acrossomal estarem diretamente relacionadas ao processo de fecundação, vários autores não tiveram êxito em correlacionar estes atributos espermáticos com a fertilidade *in vitro* e *in vivo* de touros (HOLT; O'BRIEN; ABAIGAR, 2007; AL NAIB et al., 2011).

Outra característica espermática, que pode não prejudicar diretamente a fecundação, mas tem demonstrado alta relação com problemas de fertilidade especialmente em humanos, uma vez que afeta o desenvolvimento embrionário, é o DNA espermático (EVENSON; DIXON, 2006). Nesta espécie, esta estrutura é fundamental para a fertilidade *in vivo* e *in vitro* (SAKKAS; ALVARES, 2010) e os efeitos das alterações do DNA espermático são refletidos apenas no desenvolvimento embrionário tardio (após ativação do genoma embrionário), bloqueando o desenvolvimento embrionário *in vitro* e comprometendo o sucesso da gestação (TESARIK; GRECO; MENDOZA, 2004; ZHANG et al., 2012).

De maneira semelhante, em bovinos, os danos no DNA e na cromatina espermática não bloqueiam a fecundação *in vitro*, muitas vezes não alterando a taxa de clivagem; no entanto, após as primeiras clivagens, induzem a apoptose, reduzindo as taxas de blastocisto (FATEHI et al., 2006). Nesta espécie, a estrutura da cromatina tem demonstrado ser bem resistente, sendo detectadas apenas pequenas porcentagens de espermatozoides com alterações de cromatina, mesmo em amostras de baixa qualidade com alterações morfológicas, após incubação, sexagem ou criopreservação (JANUSKAUSKAS; JOHANNISSON; RODRIGUEZ-MARTINEZ, 2003; BOE-HANSEN et al., 2005; GADEA et al., 2007; CARREIRA et al., 2012; SIMÕES et al., 2013). Apesar dessa pouca diferença, a análise da cromatina tem apresentado correlações com fertilidade *in vivo* (BALLACHEY; HONENBOKEN; EVENSON, 1987; BALLACHEY; EVENSON; SAACKE, 1988). Na fecundação *in vitro*, o aumento da resistência da cromatina espermática, com a suplementação de antioxidante, resultou em maior produção de embriões, sugerindo que a estrutura da cromatina pode estar relacionada aos índices da PIV (GADEA et al., 2007). O *Sperm Chromatin Structure Assay* (SCSA) é uma técnica que permite a análise da estrutura da cromatina espermática, inclusive em sêmen bovino criopreservado, podendo ser realizada por meio da citometria de fluxo apresentando resultados compatíveis aos de técnicas de análise de fragmentação de DNA, como o ensaio cometa neutro (BOE-HANSEN et al., 2005).

2.5 O IMPASSE DO VALOR PREDITIVO DE TESTES DE ANÁLISE ESPERMÁTICA

A relação entre atributos espermáticos e a fertilidade tanto *in vivo* como *in vitro* demonstram ter grande variabilidade entre os estudos realizados. O valor preditivo de testes que avaliem atributos e funções espermáticas tem sido estudado em diversas espécies, como a bovina (KJAESTAD et al., 1993; BIRCK et al., 2010; GAVIRAGHI et al., 2010; CHRISTENSEN et al., 2011), suína (GADEA; MATÁS, 2000; SELLÉS et al., 2003), ovina (FUKUI et al., 1988), canina (HAY et al., 1997) e humana (FRANKEN et al., 1993; ZHANG et al., 2012), na tentativa de categorizar graus de fertilidade. Porém, esta relação entre a qualidade seminal e a fertilidade tem apresentado resultados inconstantes (KJAESTAD et al., 1993; BIRCK et al., 2010; GAVIRAGHI et al., 2010; CHRISTENSEN et al., 2011; AL NAIB et al., 2011; ZHANG et al., 2012). Essa limitação de estimar de maneira robusta a fertilidade de uma amostra é justificável se for considerada a complexidade de cada estrutura da célula espermática e os processos pelos quais ela deve passar para obter o sucesso na fecundação.

Na fertilidade *in vitro*, a avaliação da integridade da membrana plasmática e acrossomal pela técnica de azul de Trypan-Giemsa e o teste hipo-osmótico (resistência osmótica da membrana) conseguiram explicar mais de 82% da variação da habilidade de formação de pró-núcleo de amostras seminais (TARTAGLIONDE; RITTA, 2004). No entanto, em outro estudo analisando a concentração espermática, motilidade, motilidade progressiva, integridade da membrana plasmática (eosina-nigrosina e SYBR-iodeto de propídio), morfologia, potencial de membrana mitocondrial e status acrossomal avaliados após descongelamento, após gradiente de Percoll[®] e depois da FIV de touros com alta (>60%) e baixa (20-35%) formação de pró-núcleo, apenas a integridade da membrana analisada com eosina-nigrosina após a FIV apresentou associação significativa com a formação de pró-núcleo (TANGHE et al., 2002).

Apesar desse esforço em estabelecer a significância destes atributos e destas análises na fertilidade *in vitro*, é possível identificar, nestes estudos, algumas limitações que justifiquem a falta de convergência entre os resultados, como por exemplo, a classificação e/ou seleção dos animais baseados em dados de fertilidade *in vivo* (RODRÍGUEZ-LOZANO et al., 2014), número reduzido de amostras e/ou animais (THUNDATHIL et al., 2000, 2001; TANGHE et al., 2002; SUZUKI et al., 2003; ALOMAR et al., 2006) e a adoção de um único animal como representativo de uma categoria espermática (THUNDATHIL et al., 2000;

THUNDATHIL et al., 2001; TANGHE et al., 2002; ALOMAR et al., 2006). Neste caso, o desempenho *in vitro* deste único animal é assumido como efeito do atributo espermático estudado e a influência de outros atributos espermáticos não avaliados acaba sendo ignorada. Já em outros estudos quando estas limitações não estão presentes, o efeito dos atributos é abordado com o intuito de determinar o valor preditivo *in vitro*. Nestes estudos os resultados obtidos em cada análise são utilizados isoladamente ou agrupados em modelos de regressão ou correlação com índices de fertilidade *in vitro* como taxa de fecundação, formação de pró-núcleo, clivagem e blastocisto (TARTAGLIONE; RITTA et al., 2004; FERRAZ et al., 2014).

Estas limitações encontradas nos trabalhos disponíveis na literatura científica dificultam o esclarecimento dos eventos biológicos e do papel de cada compartimento da célula espermática. Além disto, a variação dos índices ou parâmetros assumidos como indicadores de fertilidade *in vitro* que, como demonstrado até aqui, variam de taxa de ligação à zona pelúcida, penetração, formação de pró-núcleo, clivagem, blastocisto/clivados e blastocisto/oócitos totais, dificultam a comparação e a discussão entre resultados. Neste contexto, objetivos mal definidos tornam a análise seminal complexa, e a tentativa de prever a fertilidade através desta ferramenta um objetivo inatingível (HOLT; O'BRIEN; ABAIGAR, 2007; PETRUNKINA; HARRISON, 2011).

Deste modo um estudo prospectivo utilizando um conjunto de animais como representativos de uma categoria espermática, permitindo avaliar o efeito individual de um determinado atributo espermático, com simultânea homogeneização/diluição do efeito de outros atributos espermáticos na fertilidade *in vitro*, bem como o efeito dos atributos combinados gerando um perfil espermático, sejam em amostras de touros distintos (efeito inter-touro), ou em amostras dos mesmos touros, mas de partidas diferentes (efeito inter-partidas) poderá auxiliar na compreensão da relação direta destes atributos sobre o desempenho na PIVE.

3 HIPÓTESE

Existe efeito dos atributos espermáticos (motilidade PRÉ e PÓS seleção por gradiente de Percoll[®], integridade da membrana plasmática e acrossomal, potencial de membrana mitocondrial, resistência da estrutura da cromatina) quando isolados (efeito individual) ou combinados (efeito combinado em perfis espermáticos) sobre as taxas de clivagem, blastocisto e desenvolvimento embrionário na produção *in vitro* de embriões bovinos.

4 OBJETIVOS

4.1 OBJETIVOS GERAIS

Avaliar o efeito de atributos espermáticos sobre as taxas de produção *in vitro* de embriões em bovinos.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Este estudo tem como objetivo verificar a maneira pela qual os atributos espermáticos de amostras de sêmen criopreservadas provenientes de Centrais de Colheita e Processamento de Sêmen (CCPS) se comportam:

- 1) Testar o efeito de cada atributo espermático nas taxas de produção *in vitro* de embriões de maneira independente (diferença na porcentagem de células em um único atributo);
- 2) Testar o efeito combinado de atributos espermáticos, denominados perfis espermáticos nas taxas de produção *in vitro* de embriões De maneira dependente (diferença na porcentagem de células em mais de um atributo simultaneamente);
- 3) No caso de dependentes, verificar se a diferença ocorre entre touros distintos (efeito inter-touros) ou entre partidas de um mesmo touro (efeito inter-partidas).

5 MATERIAL E MÉTODO

O presente estudo foi realizado no Laboratório de Biologia do Espermatozoide, localizado no Departamento de Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo. Todos os procedimentos foram realizados de acordo com a Comissão de Ética no Uso de Animais em Experimentação (CEUA) desta instituição (protocolo n° 2720/2012). Este estudo recebeu auxílio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP – processo 2013/07940-9) e da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

5.1 AMOSTRAS SEMINAIS

Foram utilizadas palhetas de sêmen, convencional, criopreservado de touros, compradas ou doadas de Centrais de Processamento e Coleta de Sêmen. As palhetas de sêmen foram descongeladas em água a 37°C, por trinta segundos. O conteúdo de cada palheta foi gentilmente depositado sobre gradiente descontínuo de Percoll[®] (45% e 90%) e centrifugado por seis minutos a 9000 G, em centrífuga para microtubos (Eppendorf[®]). Depois da centrifugação o sedimento contendo as células móveis foi recuperado e suspenso em 1 mL de meio Fert-TALP (PARRISH; SUSKO-PARRISH, 1988) [0,1M NaCl, 3,1 mM KCl, 25 mM NaHCO₃, 0,3 mM NaH₂PO₄, 21,6 mM Lactato, 2 mM CaCl₂, 0,4 mM MgCl₂, 10 mM HEPES, 0,006% de BSA-V (m/v), 22 µg/mL de piruvato e 50 µg/mL de gentamicina] sem os agentes capacitores (heparina, penicilamina, epinefrina e hipotaurina) e novamente centrifugado por três minutos a 9.000G, para lavagem.

5.2 ANÁLISE DA MOTILIDADE ESPERMÁTICA

A motilidade espermática foi analisada visualmente por microscopia óptica com contraste de fase, a porcentagem de células móveis foi estimada antes (PRÉ) e imediatamente

após a seleção (PÓS) por gradiente de Percoll[®]. Todo o material utilizado foi previamente aquecido e mantido a 37°C. Todas as análises foram realizadas pelo mesmo avaliador.

5.3 ANÁLISES DO ACROSSOMO, MEMBRANA PLÁSMÁTICA, POTENCIAL DE MEMBRANA MITOCONDRIAL E RESISTÊNCIA DA CROMATINA APÓS SELEÇÃO POR GRADIENTE DE PERCOLL[®]

As análises descritas foram realizadas em 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 luz laser de 20 mW de potência. Um 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.

A integridade do acrossomo, da membrana plasmática e o potencial de membrana mitocondrial foram detectados pelas sondas fluorescentes FITC-PSA (lectina da *Pisum sativum* conjugada com FITC), PI (iodeto de propídio - 3,8-Diamino-5-[3-(diethylmethylammonio)propyl]-6-phenylphenanthridinium diiodide) e JC-1(5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethyl-benzimidazolylcarbocyanine iodide), respectivamente. Para análise, 187.500 células em 37,5 µL de meio Fert-TALP sem agentes capacitores foram incubadas com FITC-PSA (quantidade final de 5 µg), PI (concentração final de 6 µM) e JC-1 (concentração final de 1 µM) por 5 minutos a 37 °C, protegidas da luz. Para leitura no citômetro de fluxo foram adicionados 300 µL de PBS a 37 °C. Como controle positivo para análise dos dados destas três colorações, foi utilizado o protocolo descrito por Celeghini et al., 2007, com algumas modificações. Resumidamente, uma amostra de sêmen foi submetida cinco vezes à congelamento em nitrogênio líquido e descongelamento em água a 50° C, para rompimento da membrana plasmática, do acrossomo e perda do potencial de membrana mitocondrial. Como controle negativo foi utilizada uma amostra apenas processada como descrito no item 5.1.

A resistência 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). Para o ensaio, 375.000 células foram lavadas e suspensas em tampão TNE (Tris-HCl 0,01 M, NaCl 0,15 M, EDTA 1 mM em água destilada, pH 7,4) e posteriormente, incubadas com detergente ácido (HCl 0,08 M, NaCl 0,15 M, Triton X-100 0,1% em água destilada, pH 1,2). Após exatos 30 segundos, foi adicionada a solução de LA (ácido cítrico 0,1 M, Na₂HPO₄ 0,2 M, EDTA 0,001 M, NaCl 0,15 M, LA 6 µg/mL em água destilada, pH 6) e cada amostra foi avaliada por citometria de fluxo. Como controle positivo para análise dos dados desta técnica, uma amostra foi incubada por 5 minutos com ácido clorídrico (1,2 M em detergente ácido, pH = 0,1). Como controle negativo foi utilizada uma amostra apenas processada como descrito no item 5.1.

A seleção dos eventos de interesse (espermatozoides únicos) e a determinação de espermatozoides positivos e negativos para cada coloração foram baseadas na análise dos controles positivo e negativo e na mistura destes em três proporções (1:3; 1:1; 3:1). Esta seleção de eventos e o corte entre a população positiva e negativa para as colorações adotados foram os que resultavam em maior coeficiente de determinação e foram mantidos para todas as amostras analisadas. Todas as análises obtiveram coeficientes de determinação superiores a 0,96 (ANEXO A).

5.4 PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES (PIVE)

A PIVE foi realizada como descrita por De Castro et al. (2016), com algumas modificações. Foram utilizados ovários de vacas destinadas ao abatedouro comercial, sendo estes transportados em recipiente térmico, com solução salina 0,9% a 37 °C. No laboratório, os ovários foram lavados em solução salina também a 37 °C, e folículos com diâmetro entre 2 e 8 mm foram aspirados utilizando agulha 21G e seringa de 5 mL. Complexo *cumulus oophorus* (CCOs) foram selecionados para a maturação *in vitro* (MIV) quanto à integridade e compactação das camadas de células do *cumulus* e homogeneidade do citoplasma. Os CCOs selecionados foram lavados 3 vezes em meio pré-MIV (TCM199 Hepes - Gibco®, suplementado com 10% de SFB - Gibco®, 22 µg/mL de piruvato e 50 µg/mL de gentamicina) e 3 vezes em meio MIV [TCM199 Bicarbonato - Gibco®, 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 17β-estradiol hidrossolúvel]. Em seguida os CCOs foram colocados para maturação (20 oócitos/gota) em incubadora a 38,5 °C com alta umidade e 5% de CO₂ em ar, por 22 a 24 horas.

Os oócitos maturados foram lavados em meio pré-FIV [TCM199 Hepes- Gibco®, 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 (PARRISH; SUSKO-PARRISH, 1988) e colocados de 20-30 oócitos/gota, sob óleo mineral. Para a FIV, o mesmo processamento do sêmen descrito anteriormente (item 5.1) foi utilizado. Cinco microlitros da amostra de sêmen na concentração ajustada para 25 X 10⁶ espermatozoides/mL (125.000 espermatozoides móveis/gota) foram utilizados para inseminação de cada gota e mantidos em incubadora a 38,5 °C com alta umidade e 5% de CO₂ em ar, por 20 horas. O dia da FIV foi considerado como D=0 do cultivo.

Após o período de fecundação (D=1), os presumíveis zigotos foram lavados, sendo o excesso de células do *cumulus* removido mecanicamente, por pipetagem sucessiva, 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.

5.5 EXPERIMENTO I – ANÁLISE E SELEÇÃO DE AMOSTRAS

Para analisar os atributos espermáticos em amostras de sêmen comerciais criopreservadas, 63 partidas provenientes de 35 touros de diversas raças foram analisadas, sendo que, de cada partida, quatro palhetas foram avaliadas (n=252).

Após a análise, os valores de motilidade antes e após o gradiente de Percoll® (PRÉ e PÓS, respectivamente), a porcentagem de células com membrana acrossomal íntegra (AI), com membrana plasmática íntegra (MPI), com alto potencial de membrana mitocondrial (Alta) e com cromatina resistente ao desafio ácido (LA-) após Percoll® das quatro replicatas

de cada amostra foram utilizadas para avaliar se os atributos espermáticos eram dependentes ou independentes.

Para verificar a homogeneidade da população de espermatozoides selecionada por o gradiente de Percoll[®], entre palhetas distintas de uma mesma partida, submetidas ao gradiente de Percoll[®] em momentos diferentes, o coeficiente de variação entre as quatro palhetas de cada partida foi calculado.

Posteriormente, foi gerado um *ranking* das partidas para cada atributo. Para o ranqueamento das partidas foi utilizada a mediana dos valores das quatro palhetas analisadas de cada partida e, a partir deste foram selecionadas as amostras utilizadas no segundo experimento. Devido ao comportamento diferencial entre raças, para remover este efeito, optou-se por selecionar para o experimento II apenas amostras de touros Nelore, por representarem a maioria das amostras analisadas (48 partidas de 21 touros).

Para análise do efeito de perfil espermático (atributos espermáticos combinados) inter-touros, as quatro partidas com maiores porcentagens de espermatozoides com os atributos analisados (PRÉ, PÓS, AI, MPI, Alta e LA-) e as quatro partidas com menores porcentagens de células, de touros distintos foram selecionadas e agrupadas no grupo **ALTA** e **BAIXA**, respectivamente.

Para análise do efeito de perfil espermático inter-partidas, a partida com maior porcentagem de espermatozoides com os atributos analisados (PRÉ, PÓS, AI, MPI, Alta e LA-) e a partida com menor porcentagem de espermatozoides, de quatro touros foram selecionadas e agrupadas no grupo **ALTA** e **BAIXA**, respectivamente.

A fim de estudar o efeito individual de cada atributo (PRÉ, PÓS, AI, MPI, Alta e LA-) e mediante ao comportamento dependente entre os atributos, dentro do ranking de cada atributo, amostras que apresentavam porcentagem superior e inferior à mediana geral do atributo selecionado e, no entanto, possuíam as porcentagens intermediárias para os outros atributos espermáticos foram selecionadas e agrupadas no grupo **ALTA** e **BAIXA**, respectivamente para cada atributo. Para esta análise do efeito individual de cada atributo, apenas uma partida de cada touro poderia ser selecionada por grupo, no entanto era priorizada a utilização de partidas dos mesmos touros.

5.6 EXPERIMENTO II – PIVE DAS AMOSTRAS SELECIONADAS

Neste experimento, as amostras dos grupos **ALTA** e **BAIXA** formados no experimento I para todos os atributos, que apresentaram diferenças significativas, foram processadas como descrito no item 5.1 e utilizadas na PIVE (n=365). A taxa de clivagem no D=3, a taxa de blastocisto no D=8 sobre o total de oócitos e a taxa de desenvolvimento (taxa de blastocisto/clivados), também no D8, foram determinadas. As manipulações, com maior e menor taxa de blastocisto para cada amostra, foram descartadas das análises, utilizando-se apenas as replicadas mais homogêneas. Para cada amostra foram utilizados 60 a 90 oócitos por manipulação, realizando de 5 a 7 manipulações/amostra. Em todas as manipulações de PIVE, um touro controle do laboratório com desempenho *in vitro* conhecido foi utilizado e apenas dados das manipulações nas quais o touro controle obteve taxa de blastocisto superior a 20% foram consideradas na análise para controle da qualidade dos oócitos e meios utilizados.

5.7 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Todas as análises foram realizadas no programa SAS 9.3 (*Statistical Analysis System*). No experimento I, os valores de motilidade antes e após o gradiente de Percoll[®] (PRÉ e PÓS, respectivamente), porcentagem de células com membrana acrossomal íntegra (AI), com membrana plasmática íntegra (MPI), com alto potencial de membrana mitocondrial (Alta) e com cromatina resistente ao desafio ácido (LA-) das quatro replicatas de cada amostra foram submetidos a análise de Correlação de Spearman, para dados não-paramétricos adotando o valor de significância de $p < 0,05$. No experimento I também, os valores das quatro replicatas (palhetas) de cada amostra selecionada para os grupos **ALTA** foram testados com os valores das amostras dos respectivos grupos **BAIXA** por meio do teste de Mann-Whitney-Wilcoxon, para dados não-pareados e não-paramétricos, considerando um $p < 0,05$ para considerar o efeito significativo e um $p > 0,10$ para excluir um efeito significativo dos demais atributos.

No experimento II, as taxas de clivagem, blastocisto e desenvolvimento embrionário foram testadas entre os grupos **ALTA** e **BAIXA** de cada atributo individual e dos efeitos combinados inter-touros e inter-partidas, por meio do teste de Mann-Whitney-Wilcoxon para dados não-pareados e não-paramétricos, considerando um $p < 0,05$ para considerar o efeito significativo.

6 RESULTADOS

6.1 EXPERIMENTO I - ANÁLISE E SELEÇÃO DE AMOSTRAS

A análise de correlação mostrou que na população geral de touros analisada, há correlações significativas entre todos os atributos analisados (Quadro 1), indicando que nas 63 partidas analisadas, estes atributos apresentam comportamento dependente entre si. Apesar de significativas, as correlações entre as motilidades e as análises das membranas e cromatina apresentaram fraca associação ($Rho < 0,3$), sendo que apenas as correlações entre as análises das membranas e cromatina apresentaram associação moderada ($0,4 < Rho < 0,6$). Não foram detectadas correlações com forte associação ($Rho > 0,7$) entre os atributos espermáticos.

Quadro 1 - Correlações dos atributos espermáticos analisados (PRÉ, PÓS, MPI, AI, Alta e LA) e seus respectivos coeficientes de correlação (Rho) e valores de probabilidade (p)

	Pós	MPI	AI	Alta	LA-
Pré	0,28138 <,0001	0,22833 0,0004	0,19400 0,0026	0,19024 0,0033	0,22436 0,0005
Pós		0,26138 <,0001	0,31109 <,0001	0,26047 <,0001	0,26630 <,0001
MPI			0,77817 <.0001	0,75837 <,0001	0,53284 <,0001
AI				0,65305 <,0001	0,50243 <,0001
Alta					0,45479 <,0001

Fonte: (SIQUEIRA, A. F. P., 2016)

Legenda: PRÉ: % motilidade antes da seleção; PÓS: % motilidade após seleção; MPI: % de células com membrana plasmática íntegra; AI: % de células com acrossomo íntegro; Alta: % de células com alto potencial de membrana mitocondrial; LA-: % de células com cromatina resistente ao desafio ácido.

A população de espermatozoides selecionada por gradiente de Percoll[®] apresentou-se constante entre as seleções, realizadas em momentos diferentes, das quatro palhetas de cada

partida, obtendo-se baixos índices de variação entre análises. A média dos coeficientes de variação das 63 partidas analisadas está apresentada a seguir (Quadro 2).

Quadro 2 – Média do coeficiente de variação (4 palhetas) das partidas para os atributos PRÉ, PÓS, MPI, AI, Alta e LA

Pré	Pós	MPI	AI	Alta	LA-
23,01%	15,43%	7,35%	4,22%	8,26%	1,74%

Fonte: (SIQUEIRA, A. F. P., 2016)

Legenda: PRÉ: % motilidade antes da seleção; PÓS: % motilidade após seleção; MPI: % de células com membrana plasmática íntegra; AI: % de células com acrossomo íntegro; Alta: % de células com alto potencial de membrana mitocondrial; LA-: % de células com cromatina resistente ao desafio ácido.

As análises dos atributos espermáticos entre os agrupamentos realizados estão demonstradas a seguir, divididas por efeito.

Efeito do perfil espermático inter-touros: ao selecionar as quatro partidas com maiores e menores porcentagens de células nos atributos analisados de touros distintos para a formação do grupo **ALTA** e **BAIXA**, respectivamente, há diferenças significativas para todos os atributos analisados (Tabela 1). O grupo **ALTA** apresenta um perfil espermático exibindo porcentagem de células superior ao grupo **BAIXA**, para todos os atributos espermáticos analisados.

Tabela 1 - Medianas (3º quartil; 1ºquartil) e valores de p, para todos os atributos espermáticos analisados, na comparação dos quatro touros de cada grupo (**ALTA** e **BAIXA**)

Variável\Grupo	ALTA (n=16)	BAIXA (n=16)	Valor de p
Pré (%)	60,0 (50,0; 65,0)	32,5 (30,0; 55,0)	0,0059
Pós (%)	75,0 (70,0; 82,5)	62,5 (52,5; 70,0)	0,0064
MPI (%)	86,5 (84,6; 88,2)	60,1 (53,9; 65,5)	<0,0001
AI (%)	95,7 (94,2; 96,5)	76,0 (71,1; 82,1)	<0,0001
Alta (%)	88,9 (87,9; 91,0)	68,7 (64,2; 77,5)	<0,0001
LA- (%)	99,3 (99,1; 99,7)	95,3 (86,6; 98,1)	0,0002

Fonte: (SIQUEIRA, A. F. P., 2016)

Legenda: PRÉ: motilidade prévia seleção; PÓS: motilidade após seleção; MPI: membrana plasmática íntegra; AI: acrossomo íntegro; Alta: alto potencial de membrana mitocondrial; LA-: cromatina resistente ao desafio ácido.

Efeito do perfil espermático inter-partidas: ao selecionar a partida de quatro touros com maior e menor porcentagem de células nos atributos analisados para a formação do grupo **ALTA** e **BAIXA**, respectivamente. O grupo **ALTA** apresenta um perfil espermático exibindo porcentagem de células superior ao grupo **BAIXA**, para todos os atributos espermáticos analisados (Tabela 2). Importante ressaltar que, nesta análise, foram utilizados os mesmos quatro touros no grupo **ALTA** e grupo **BAIXA**, removendo o efeito animal e avaliando apenas o efeito entre partidas.

Tabela 2 - Medianas (3º quartil; 1ºquartil) e valores de p, para todos os atributos espermáticos analisados, na comparação das quatro partidas de cada grupo (**ALTA** e **BAIXA**)

Variável\Grupo	ALTA (n=16)	BAIXA (n=16)	Valor de p
Pré (%)	60,0 (42,5; 62,5)	40,0 (30,0; 50,0)	0,0081
Pós (%)	70,0 (67,5; 75,0)	60,0 (50,0; 70,0)	0,0294
MPI (%)	79,8 (75,2; 84,1)	67,5 (53,9; 74,5)	0,0006
AI (%)	91,0 (87,2; 94,3)	80,3 (71,4 88,3)	0,0006
Alta (%)	86,8 (84,8; 88,7)	74,6 (66,4; 82,7)	<0,0001
LA- (%)	98,7 (96,5; 99,1)	97,7 (89,0; 98,5)	0,0345

Fonte: (SIQUEIRA, A. F. P., 2016)

Legenda: PRÉ: motilidade prévia seleção; PÓS: motilidade após seleção; MPI: membrana plasmática íntegra; AI: acrossomo íntegro; Alta: alto potencial de membrana mitocondrial; LA-: cromatina resistente ao desafio ácido.

Efeitos individuais: ao selecionar as amostras com medianas superiores e inferiores para o atributo do ranking e, no entanto, homogêneas para os demais atributos, foi possível individualizar o efeito de cada atributo. O termo “efeito individual” foi selecionado, pois esta estratégia permitiu a formação de grupos nos quais apenas um atributo diferisse significativamente ($p < 0,05$). Deste modo foi possível formar grupos com diferenças para todos os atributos individualmente como demonstrados a seguir:

Efeito individual PRÉ: os resultados do efeito individual PRÉ se encontram sumarizados na Tabela 3.

Tabela 3 - Medianas (3º quartil; 1ºquartil) e valores de p, para todos os atributos espermáticos analisados, na comparação das cinco amostras de cada grupo (ALTA e BAIXA)

Variável\Grupo	ALTA (n=20)	BAIXA (n=20)	Valor de p
Pré (%)	60,0 (60,0; 67,5)	40,0 (32,5; 50,0)	<0,0001
Pós (%)	75,0 (70,0; 80,0)	72,5 (67,5; 75,0)	0,2187
MPI (%)	80,8 (75,4; 84,2)	79,7 (76,1; 83,3)	0,4326
AI (%)	90,8 (88,3; 92,8)	92,2 (90,9; 94,6)	0,1134
Alta (%)	87,8 (83,6; 89,2)	86,6 (80,5; 89,1)	0,5272
LA- (%)	98,9 (98,1; 99,4)	98,4 (96,5; 99,5)	0,4013

Fonte: (SIQUEIRA, A. F. P., 2016)

Legenda: PRÉ: motilidade prévia seleção; PÓS: motilidade após seleção; MPI: membrana plasmática íntegra; AI: acrossomo íntegro; Alta: alto potencial de membrana mitocondrial; LA-: cromatina resistente ao desafio ácido.

Efeito individual PÓS: os resultados do efeito individual PÓS se encontram sumarizados na Tabela 4.

Tabela 4 - Medianas (3º quartil; 1ºquartil) e valores de p, para todos os atributos espermáticos analisados, na comparação das cinco amostras de cada grupo (ALTA e BAIXA)

Variável\Grupo	ALTA (n=20)	BAIXA (n=20)	Valor de p
Pré (%)	60,0 (45,0; 60,0)	55,0 (47,5; 67,5)	0,7415
Pós (%)	80,0 (72,5; 82,5)	70,0 (60,0; 70,0)	0,0006
MPI (%)	78,5 (73,1; 82,3)	78,2 (75,3; 84,2)	0,6167
AI (%)	90,8 (88,5; 94,3)	88,7 (87,8; 92,7)	0,2791
Alta (%)	85,6 (83,0; 88,2)	83,2 (79,9; 88,1)	0,4488
LA- (%)	98,4 (97,9; 99,2)	98,6 (97,1; 99,1)	0,5423

Fonte: (SIQUEIRA, A. F. P., 2016)

Legenda: PRÉ: motilidade prévia seleção; PÓS: motilidade após seleção; MPI: membrana plasmática íntegra; AI: acrossomo íntegro; Alta: alto potencial de membrana mitocondrial; LA-: cromatina resistente ao desafio ácido.

Efeito individual MPI: os resultados do efeito individual MPI se encontram sumarizados na Tabela 5.

Tabela 5 - Medianas (3º quartil; 1ºquartil) e valores de p, para todos os atributos espermáticos analisados, na comparação dos grupos **ALTA** e **BAIXA**

Variável\Grupo	ALTA (n=20)	BAIXA (n=20)	Valor de p
Pré	60,0 (45,0; 60,0)	60,0 (45,0; 60,0)	0,9680
Pós	72,5 (70,0; 80,0)	70,0 (70,0; 80,0)	0,9776
MPI	81,0 (78,2; 83,4)	75,6 (72,2; 78,6)	0,0012
AI	89,1 (87,6; 91,7)	88,7 (87,8; 91,7)	0,9568
Alta	86,3 (83,5; 88,6)	85,1 (81,2; 87,5)	0,2856
LA-	98,7 (97,4; 99,3)	98,7 (97,7; 99,1)	0,8284

Fonte: (SIQUEIRA, A. F. P., 2016)

Legenda: PRÉ: motilidade prévia seleção; PÓS: motilidade após seleção; MPI: membrana plasmática íntegra; AI: acossomo íntegro; Alta: alto potencial de membrana mitocondrial; LA-: cromatina resistente ao desafio ácido.

Efeito individual AI: os resultados do efeito individual AI se encontram sumarizados na Tabela 6.

Tabela 6 - Medianas (3º quartil; 1ºquartil) e valores de p, para todos os atributos espermáticos analisados, na comparação dos grupos **ALTA** e **BAIXA**

Variável\Grupo	ALTA (n=20)	BAIXA (n=20)	Valor de p
Pré	42,5 (30,0; 60,0)	52,5 (40,0; 62,5)	0,2677
Pós	70,0 (65,0; 80,0)	75,0 (70,0; 80,0)	0,4083
MPI	77,8 (72,6; 81,9)	78,6 (73,1; 80,7)	0,8923
AI	91,95 (89,9; 93,9)	88,7 (87,9; 89,9)	0,0033
Alta	86,6 (83,9; 87,7)	84,9 (80,8; 88,0)	0,4327
LA-	98,3 (96,8; 99,4)	98,0 (97,0; 98,4)	0,2553

Fonte: (SIQUEIRA, A. F. P., 2016)

Legenda: PRÉ: motilidade prévia seleção; PÓS: motilidade após seleção; MPI: membrana plasmática íntegra; AI: acossomo íntegro; Alta: alto potencial de membrana mitocondrial; LA-: cromatina resistente ao desafio ácido.

Efeito individual Alta: os resultados do efeito individual Alta se encontram sumarizados na Tabela 7.

Tabela 7 - Medianas (3º quartil; 1ºquartil) e valores de p, para todos os atributos espermáticos analisados, na comparação dos grupos **ALTA** e **BAIXA**

Variável\Grupo	ALTA (n=16)	BAIXA (n=16)	Valor de p
Pré	47,5 (32,5; 60,0)	50, (40,0; 60,0)	0,5942
Pós	70,0 (70,0; 72,5)	70,0 (70,0; 80,0)	0,2470
MPI	77,3 (69,9; 79,1)	73,7 (68,5; 78,3)	0,3270
AI	89,3 (86,8; 91,9)	87,9 (85,5; 90,8)	0,3270
Alta	86,6 (84,4; 88,8)	75,9 (72,8; 81,8)	0,0029
LA-	98,2 (96,6; 99,3)	98,3 (96,1; 98,8)	0,4284

Fonte: (SIQUEIRA, A. F. P., 2016)

Legenda: PRÉ: motilidade prévia seleção; PÓS: motilidade após seleção; MPI: membrana plasmática íntegra; AI: acrossomo íntegro; Alta: alto potencial de membrana mitocondrial; LA-: cromatina resistente ao desafio ácido.

Efeito individual LA-: os resultados do efeito individual LA se encontram sumarizados na Tabela 8.

Tabela 8 - Medianas (3º quartil; 1ºquartil) e valores de p, para todos os atributos espermáticos analisados, na comparação dos grupos **ALTA** e **BAIXA**

Variável\Grupo	ALTA (n=20)	BAIXA (n=20)	Valor de p
Pré	45,0 (40,0; 55,0)	45,0 (30,0; 60,0)	0,7435
Pós	70,0 (67,5; 75,0)	70,0 (65,0; 72,5)	0,4541
MPI	79,9 (75,9; 84,3)	78,3 (73,4; 80,5)	0,1555
AI	91,5 (88,1; 93,7)	90,7 (87,9; 92,2)	0,4568
Alta	86,7 (83,6; 90,3)	86,3 (83,1; 88,7)	0,3039
LA-	99,0 (98,7; 99,4)	96,9 (96,4; 98,6)	0,0004

Fonte: (SIQUEIRA, A. F. P., 2016)

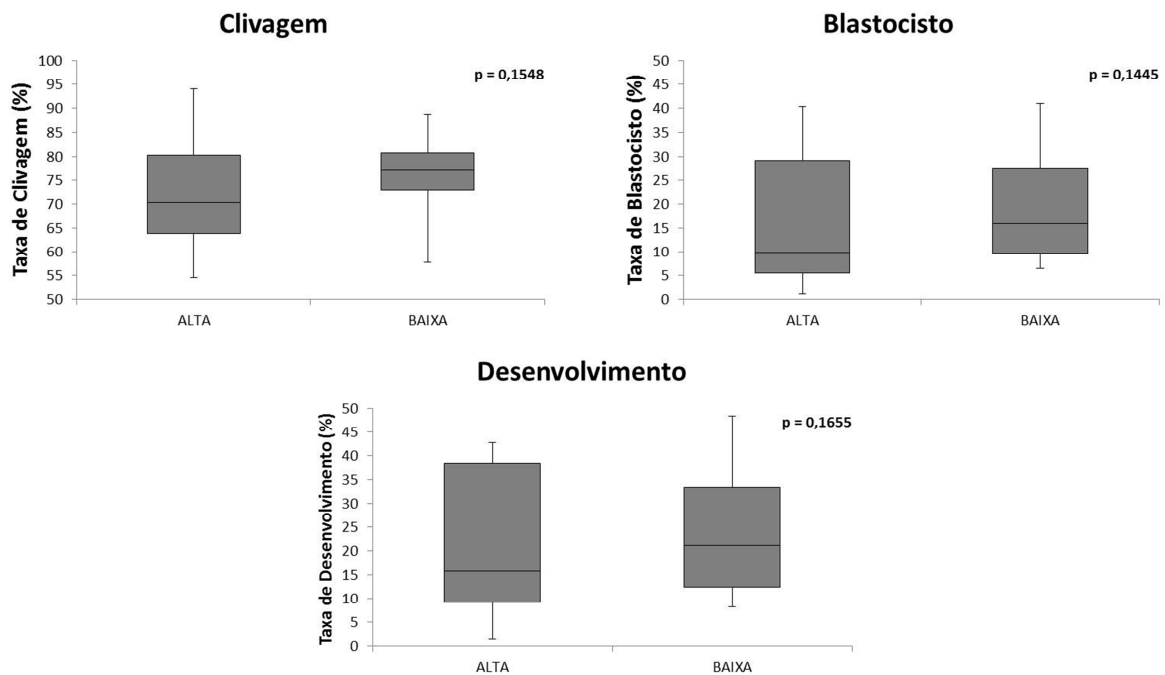
Legenda: PRÉ: motilidade prévia seleção; PÓS: motilidade após seleção; MPI: membrana plasmática íntegra; AI: acrossomo íntegro; Alta: alto potencial de membrana mitocondrial; LA-: cromatina resistente ao desafio ácido.

6.2 EXPERIMENTO II - EFEITO DO PERFIL ESPERMÁTICO NA PIVE

Os resultados encontrados para a análise das taxas de clivagem, blastocisto e desenvolvimento embrionário, entre os grupos experimentais, estão apresentados a seguir.

Efeito do perfil espermático inter-touros: não foram encontradas diferenças para as taxas de clivagem (70,4 e 77,1%; $p=0,1548$), blastocisto (9,8 e 16%; $p=0,1445$) ou desenvolvimento embrionário (15,9 e 21,2%; $p=0,1655$) entre os grupos **ALTA** ($n=17$) e **BAIXA** ($n=16$).

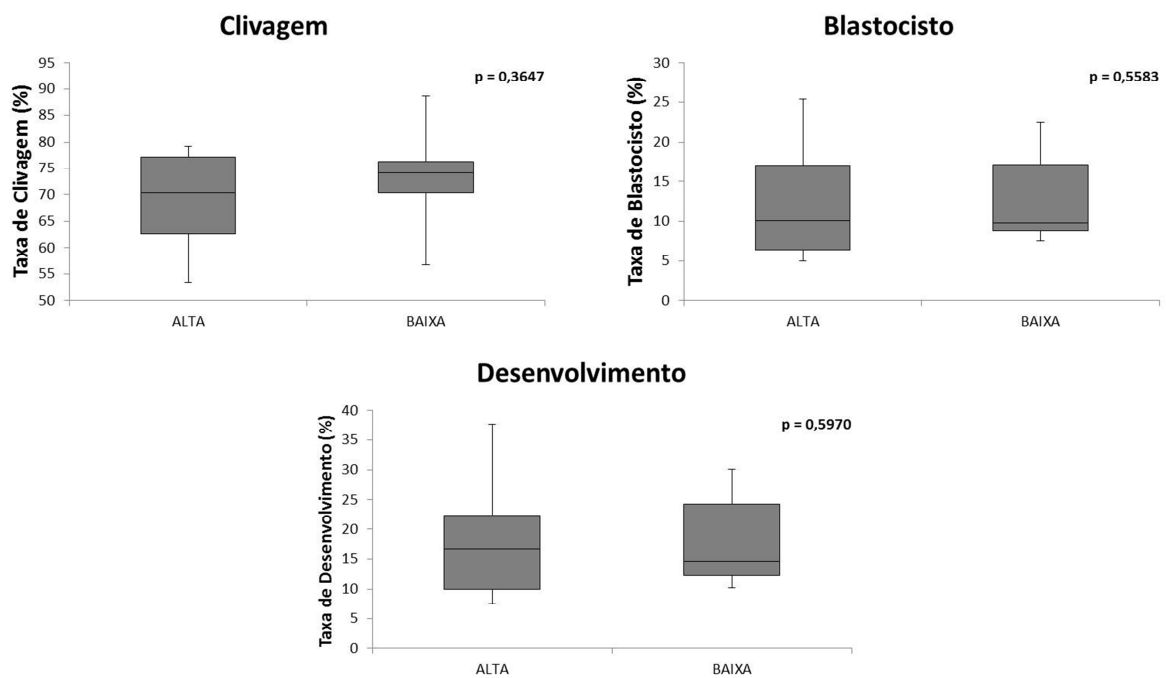
Figura 1- Box plot da comparação das taxas de clivagem, de blastocisto e de desenvolvimento embrionário entre os grupos **ALTA** e **BAIXA** do perfil espermático inter-touros, no estudo do efeito combinado de todos os atributos espermáticos utilizando-se touros distintos na formação dos dois grupos



Fonte: (SIQUEIRA, A. F. P., 2016)

Efeito do perfil espermático inter-partidas: assim como no efeito inter-touros, para o efeito inter-partidas (Figura 2) também não foram encontradas diferenças entre os grupos **ALTA** (n=17) e **BAIXA** (n=15) para as taxas de clivagem (70,4 e 77,2%; $p=0,3647$), blastocisto (10,1 e 9,8%; $p=0,5583$) ou desenvolvimento embrionário (16,6 e 14,6%; $p=0,5970$) entre estes grupos.

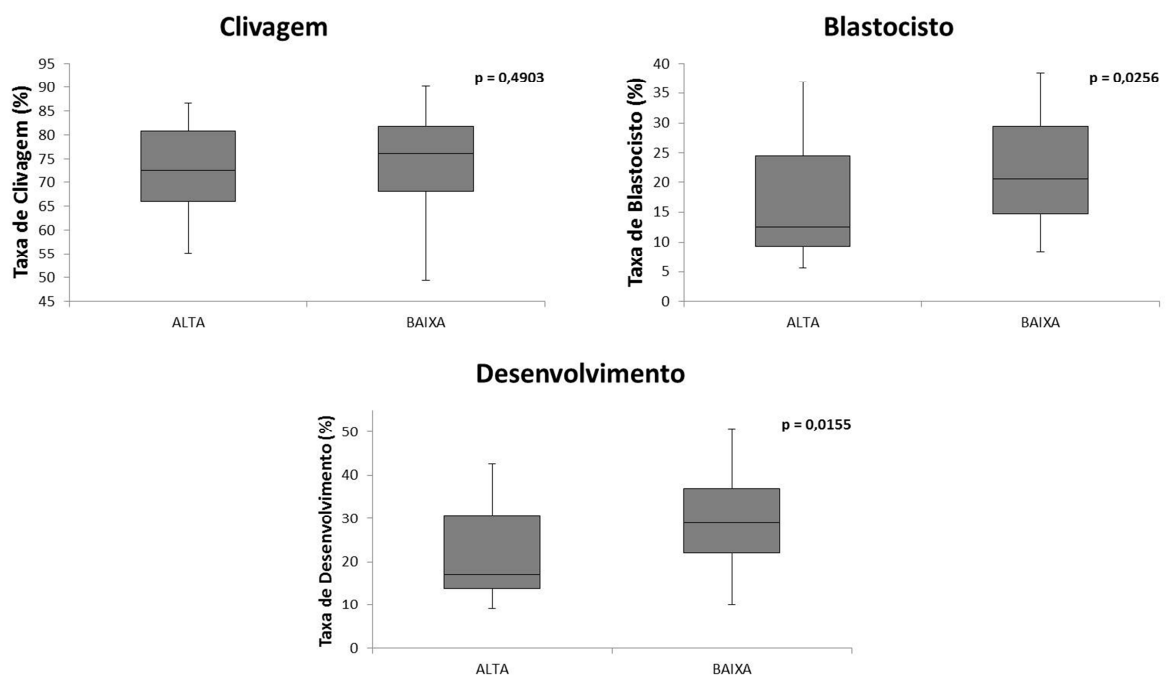
Figura 2 – Box plot da comparação das taxas de clivagem, blastocisto e desenvolvimento embrionário entre os grupos **ALTA** e **BAIXA** do perfil espermático inter-partidas, no estudo do efeito combinado de todos os atributos espermáticos, utilizando-se os mesmos touros na formação dos dois grupos



Fonte: (SIQUEIRA, A. F. P., 2016)

Efeito enriquecido PRÉ: não foi encontrada diferença significativa para a taxa de clivagem (72,4 e 76,1%; $p=0,4903$), no entanto houve diferença deste atributo para as taxas de blastocisto (12,5 e 20,5%; $p=0,0256$) e de desenvolvimento embrionário (17,1 e 28,9%; $p=0,0155$) entre os grupos **ALTA** ($n=20$) e **BAIXA** ($n=20$), sendo que o grupo **BAIXA** apresentou valores superiores para ambas variáveis (Figura 3).

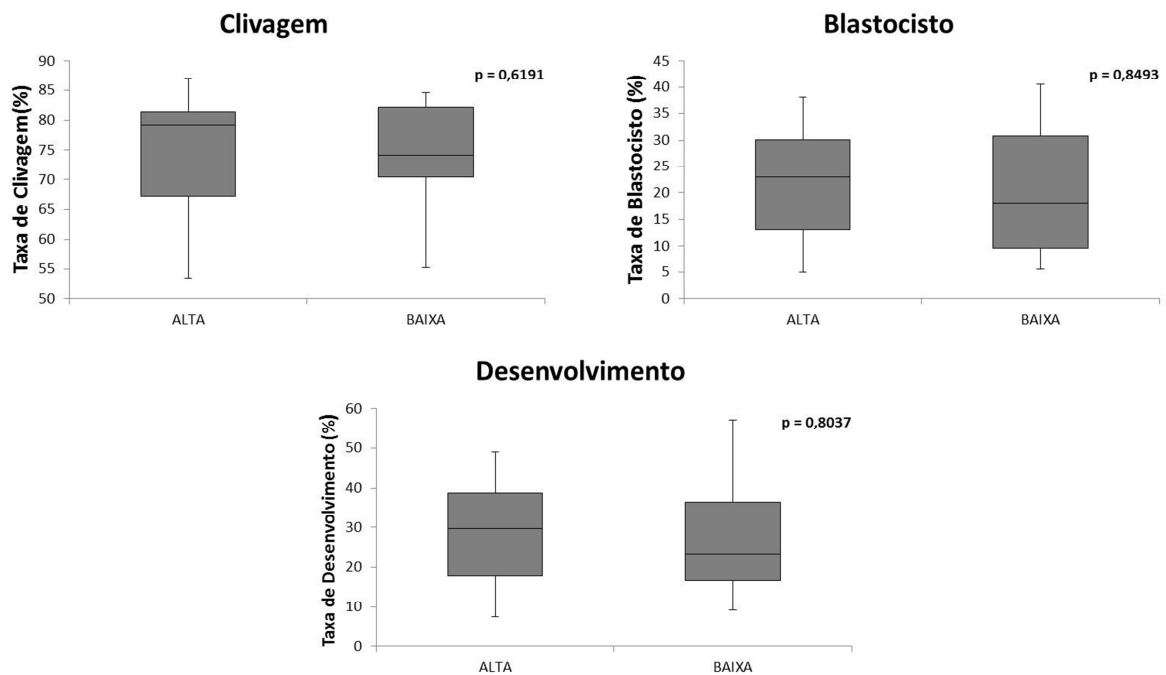
Figura 3 - Box plot da comparação das taxa de clivagem, blastocisto e desenvolvimento embrionário entre os grupo **ALTA** e **BAIXA** motilidade PRÉ seleção por gradiente de Percoll®



Fonte: (SIQUEIRA, A. F. P. 2016)

Efeito individual PÓS: não foi possível encontrar diferenças significativas (Figura 4) para as taxas de clivagem (79,2 e 74,1%; $p=0,6191$), blastocisto (22,9 e 17,9%; $p=0,8493$) e desenvolvimento embrionário (29,6 e 23,3%; $p=0,8037$) entre os grupos **ALTA** ($n=20$) e **BAIXA** ($n=18$).

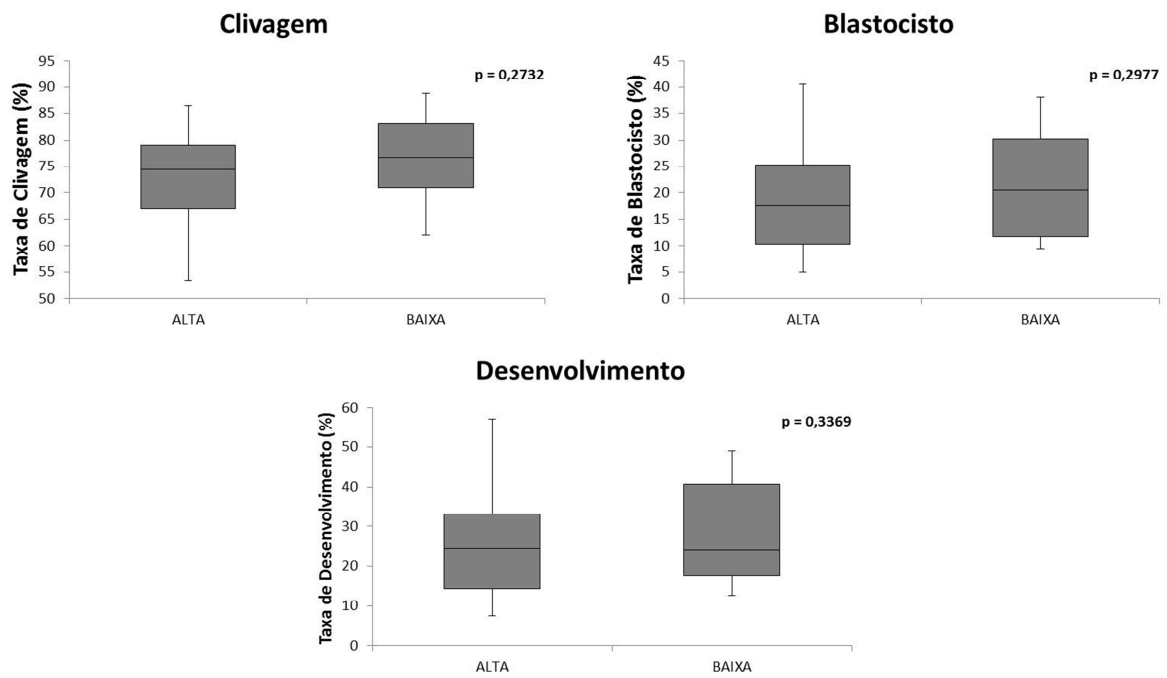
Figura 4 - Box plot da comparação das taxa de clivagem, blastocisto e desenvolvimento embrionário entre os grupo **ALTA** e **BAIXA** motilidade PÓS seleção por gradiente de Percoll®



Fonte: (SIQUEIRA, A. F. P. 2016)

Efeito individual MPI: não foram encontradas diferenças significativas (Figura 5) para as taxas de clivagem (74,4 e 76,7%; $p=0,2732$), blastocisto (17,6 e 20,5%; $p=0,2977$) e desenvolvimento embrionário (24,5 e 24,1%; $p=0,3369$) entre os grupos **ALTA** ($n=20$) e **BAIXA** ($n=20$).

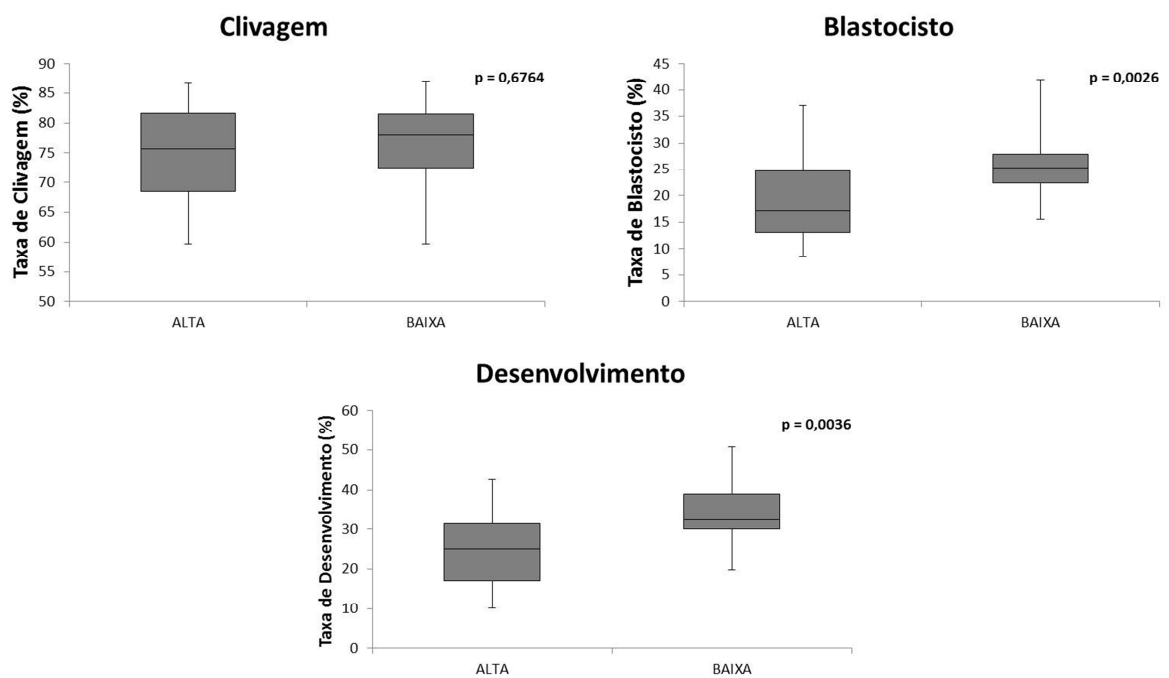
Figura 5 - Box plot da comparação das taxa de clivagem, blastocisto e desenvolvimento embrionário entre os grupo **ALTA** e **BAIXA** integridade de membrana plasmática.®



Fonte: (SIQUEIRA, A. F. P. 2016)

Efeito individual AI: não foi encontrada diferença significativa para a taxa de clivagem (75,7 e 78,0%; $p=0,6764$), no entanto, houve diferença deste atributo para as taxas de blastocisto (17,1 e 25,3%; $p=0,0026$) e desenvolvimento embrionário (24,9 e 32,2%; $p=0,0036$) entre os grupos **ALTA** ($n=21$) e **BAIXA** ($n=20$). Nestes casos, o grupo **BAIXA** apresentou valores superiores quando comparado ao grupo **ALTA** (Figura 6).

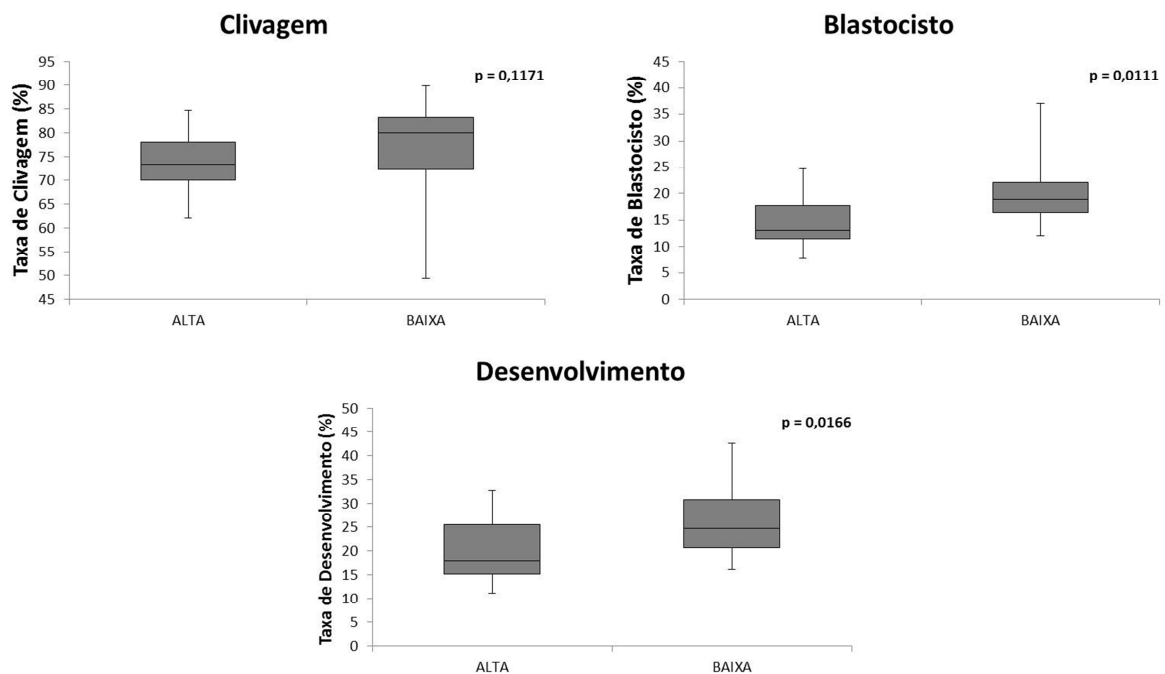
Figura 6 - Box plot da comparação das taxa de clivagem, blastocisto e desenvolvimento embrionário entre os grupo **ALTA** e **BAIXA** integridade de acrossomo



Fonte: (SIQUEIRA, A. F. P. 2016)

Efeito individual Alta: não foi encontrada diferença significativa para a taxa de clivagem (73,4 e 80,0%; $p=0,1171$), no entanto, houve um efeito significativo deste atributo nas taxas de blastocisto (13,1 e 18,9%; $p=0,0111$) e desenvolvimento embrionário (18,0 e 34,7%; $p=0,0166$) entre os grupos **ALTA** ($n=17$) e **BAIXA** ($n=16$), sendo que, para estas variáveis, o grupo **BAIXA** apresentou valores superiores quando comparado ao grupo **ALTA** (Figura 7).

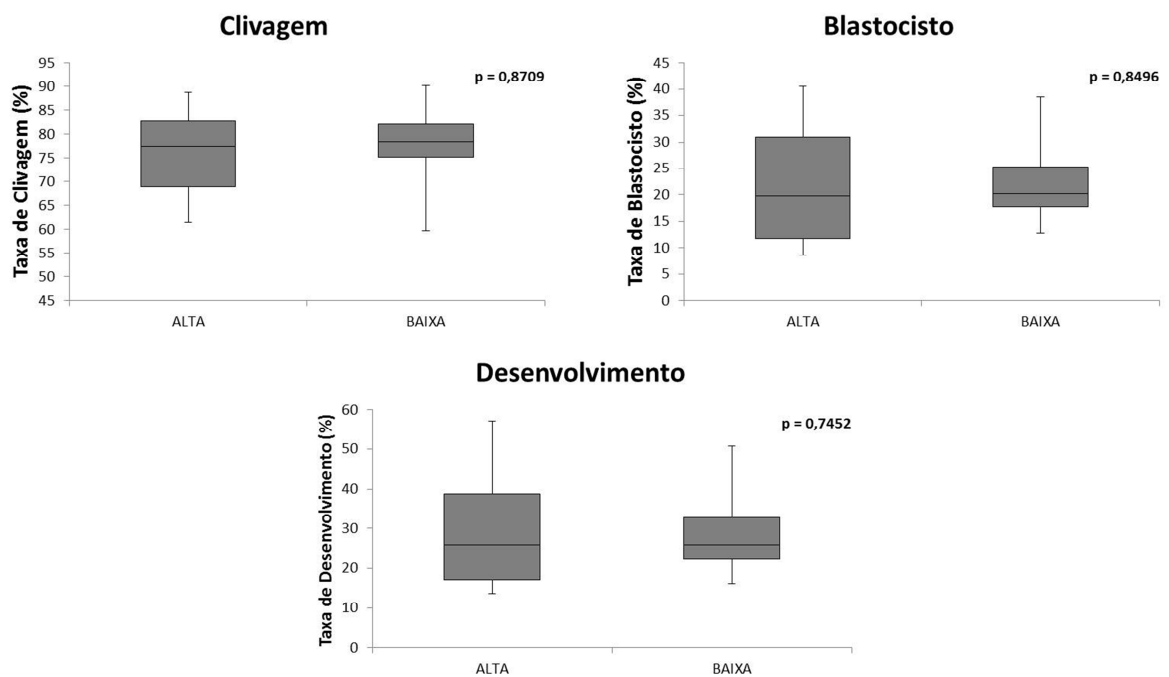
Figura 7 - Box plot da comparação das taxa de clivagem, blastocisto e desenvolvimento embrionário entre os grupo **ALTA** e **BAIXA** percentagem de espermatozoides com alto potencial de membrana mitocondrial



Fonte: (SIQUEIRA, A. F. P. 2016)

Efeito individual LA-: não foram encontradas diferenças significativas (Figura 8) para as taxas de clivagem (77,4 e 78,4%; $p=0,8709$), blastocisto (19,7 e 20,2%; $p=0,8496$) e desenvolvimento embrionário (25,8 e 25,8%; $p=0,7452$) entre os grupos **ALTA** ($n=19$) e **BAIXA** ($n=21$).

Figura 8 - Box plot da comparação das taxa de clivagem, blastocisto e desenvolvimento embrionário entre o grupo **ALTA** e **BAIXA** resistência da estrutura da cromatina espermática ao desafio ácido



Fonte: (SIQUEIRA, A. F. P. 2016)

6.3 DISCUSSÃO

Neste estudo foi verificado o efeito individual de cada atributo espermático e dos perfis espermáticos na PIVE. Dentre os atributos espermáticos avaliados, apenas os efeitos individuais da motilidade antes da seleção por Percoll[®] (PRÉ), da porcentagem de células com acrossomo íntegro (AI) e do alto potencial de membrana mitocondrial (Alta) apresentaram diferenças entre os grupos **ALTA** e **BAIXA**. É interessante notar que para todos esses atributos, o grupo **BAIXA** apresentou taxas superiores de blastocisto e de desenvolvimento embrionário, quando comparado ao grupo **ALTA**. No entanto, nos atributos combinados, formando o perfil espermático **ALTA** ou **BAIXA**, essa diferença não foi

encontrada entre touros (efeito inter-touros) e entre partidas dos mesmos touros (efeito inter-partidas).

Todos os atributos espermáticos analisados apresentaram correlações positivas entre si. Isto indica que estes atributos espermáticos estão relacionados de maneira semelhante à função espermática, portanto, de uma forma geral, todos estes atributos podem ser utilizados como indicadores para avaliar o *status* de uma amostra seminal. Estes resultados são justificados, por exemplo, quando se utiliza métodos como o Percoll[®], ou outros métodos para seleção de células móveis como, por exemplo, Bovipure ou *swim up*. Nestes métodos, além de se obter uma população espermática com maior motilidade é possível obter também, uma população mais homogênea, com maior integridade de membranas, maior potencial de membrana mitocondrial e melhor qualidade de cromatina (TANGHE et al., 2002; SUZUKI et al., 2003; SAMARDZIJA et al., 2006; MACHADO et al., 2009). Da mesma maneira, porém com efeito inverso, o processo de congelamento ou sexagem espermática (CARVALHO et al., 2010) demonstram afetar negativamente vários atributos espermáticos simultaneamente. Estas duas situações, tanto de um efeito positivo, quanto de um efeito negativo, reforçam esta associação entre os atributos espermáticos analisados.

Além das correlações encontradas, as baixas médias dos coeficientes de variação indicam que a população espermática de uma amostra seminal, selecionada pela centrifugação em gradiente de Percoll[®], se mantém constante, mesmo quando a seleção é realizada em momentos diferentes e a partir de palhetas distintas de uma mesma partida. No entanto, cada partida resulta em populações espermáticas distintas após seleção, mesmo ao se utilizar partidas de um mesmo touro. Estas diferenças entre partidas são estatisticamente confirmadas pela análise dos atributos entre os agrupamentos realizados. O encontro de diferenças significativas apesar de pequenas, provavelmente só foi possível devido à repetibilidade da população selecionada pelo gradiente de Percoll[®] e a acurácia da metodologia de análise utilizada. As motilidades foram os atributos que apresentaram maior coeficiente de variação (PRÉ = 23,01% e PÓS= 15,43%), esta maior variação era esperada uma vez que, enquanto as análises realizadas por meio da citometria de fluxo permitem a determinação precisa da porcentagem de células com cada atributo analisado, a estimativa da motilidade realizada pelo método visual, permite apenas ao avaliador estimar a porcentagem de células móveis na amostra, atribuindo um valor geralmente em escala de dezenas, como por exemplo, 20%, 30% ou 40%. Mesmo com esta limitação do método de análise, as médias dos coeficientes de variação podem ser consideradas baixas, provavelmente devido à realização de todas as análises por um mesmo avaliador.

Na avaliação do efeito individual do atributo PRÉ, ou seja, a motilidade antes da seleção pelo Percoll[®], apesar de não ser observada diferença nas taxas de clivagem, amostras com menor motilidade pré-Percoll[®] (grupo **BAIXA**) apresentaram maiores taxas de blastocisto e de desenvolvimento embrionário quando comparadas às amostras com maior motilidade PRÉ (grupo **ALTA**). A diferença entre estes dois grupos não era esperada, uma vez que os grupos não diferiram para os outros atributos, no momento da inseminação dos oócitos. Embora não esperados, estes resultados já foram reportados anteriormente (ALOMAR et al., 2006). Nele, dois touros com menor motilidade previamente à seleção pelo Percoll[®] foram os que apresentaram as maiores taxas de blastocisto, no entanto os autores não estabeleceram uma relação clara entre parâmetros de motilidade e de fertilidade *in vitro*, não discutindo a relevância biológica destes resultados.

A energia produzida para a motilidade espermática, em bovinos, vem na maior parte da fosforilação oxidativa, que consome oxigênio para a produção e a manutenção do gradiente de prótons da membrana mitocondrial (BOHNENSACK; HALANGK; 1986; GARRETT et al., 2008). Esse consumo de oxigênio dá indícios de que estas células móveis podem ser fonte, por exemplo, de espécies reativas de oxigênio (EROs). Deste modo, amostras com maior motilidade prévia podem ser amostras que apresentam maior produção de EROs. Já foi relatado que a presença de EROs pode causar uma pré-sensibilização dos espermatozoides, resultando em aumento da produção de EROs após a indução da capacitação (AITKEN; CLARKSON; FISHEL; 1989). Desta forma, no presente estudo, os espermatozoides oriundos de amostras com maior motilidade PRÉ poderiam estar em um ambiente mais oxidante, sendo pré-sensibilizados a produzir mais EROs, durante a FIV, momento no qual a capacitação é induzida por agentes capacitantes, criando um ambiente deletério aos gametas em incubação. Esse ambiente inóspito, criado por espermatozoides com alta motilidade PRÉ, pode ser também a explicação para as diferenças encontradas para o efeito individual de outros atributos.

No presente estudo, quando foi avaliado o efeito individual do atributo integridade de acrossomo (AI), foi possível observar que o grupo ALTA, ou seja, amostras que possuíam maior porcentagem de células com acrossomo íntegro, obtiveram as menores taxas de blastocisto e de desenvolvimento embrionário. Este resultado surpreendente sugere que este maior número de células com acrossomo íntegro possui um efeito negativo sobre o desenvolvimento embrionário subsequente. Uma possível explicação para este efeito deletério sobre os embriões é que esse maior número de células com acrossomo íntegro são capacitadas

e sofrem a reação acrossomal na gota de FIV. Essa maior quantidade das enzimas líticas acrossomais no sistema *in vitro* pode apresentar efeito deletério sobre o oócito e conseqüentemente sobre os embriões produzidos neste meio. Este efeito negativo do provável excesso de reação acrossomal na presença dos oócitos, também já foi demonstrado em outros estudos (TANGHE et al., 2002; ALOMAR et al. 2006). Alomar et al. (2006) sugerem que um excesso de enzimas acrossomais poderia danificar os oócitos em co-cultivo. No entanto, considerando os resultados encontrados no presente trabalho para a motilidade PRÉ, sugere-se outra possibilidade, o condicionamento de um ambiente hostil durante a etapa da FIV pela maior produção de EROs, pois após a indução da capacitação espermática que culmina na reação acrossomal, os espermatozoides produzem até cinco vezes mais EROs que células não induzidas (AITKEN; CLARKSON; FISHEL; 1989). Deste modo, quanto maior o número de células aptas a sofrerem capacitação espermática, maior a produção de EROs no meio da FIV. A produção de EROs induzida pela capacitação e um subsequente efeito negativo tardio sobre o desenvolvimento embrionário também já foi relatado (KATO; NAGAO; 2015).

Outro resultado inesperado foi o efeito individual do atributo alto potencial de mitocôndria. Assim como para os outros atributos discutidos até aqui, o grupo **BAIXA**, ou seja, com menor porcentagem de células com alto potencial de membrana mitocondrial, apresentou taxas de blastocisto e de desenvolvimento embrionário superiores ao grupo **ALTA**. Novamente, a produção de radicais livres parece justificar esta diferença. Amostras com maior potencial de membrana mitocondrial podem apresentar maior produção de EROs, uma vez que a mitocôndria do espermatozoide é a mais importante fonte de EROs nesta célula (KOPPERS et al., 2008), de maneira que a oxidação citoplasmática em espermatozoides bovinos é dependente das EROs mitocondriais (SILVA et al., 2007). Nesta espécie, já foi demonstrado que, sob condições oxidativas, espermatozoides com alto potencial de membrana mitocondrial apresentam maior liberação de radicais livres (DE CASTRO et al., 2016). Esta relação entre as mitocôndrias dos espermatozoides e o desenvolvimento embrionário já foi demonstrado em um estudo recente por meio do efeito negativo do potencial de membrana mitocondrial dos espermatozoides sobre a integridade de cromossomos de blastocistos produzidos *in vitro* (KATO; NAGAO; 2015). Naquele estudo, foi demonstrado que a indução da capacitação espermática, leva a produção de EROs no meio resultando na fragmentação do DNA dos zigotos e a redução da integridade de cromossomos dos blastocistos produzidos por FIV e por ICSI. Além disto, essa redução da integridade de cromossomos foi completamente inibida pela redução da porcentagem de células com alto

potencial de membrana mitocondrial, pela utilização de um desacoplador mitocondrial, demonstrando a importância desta fonte de EROs.

Entretanto, a mitocôndria produz EROs por vias distintas, que podem ser independentes da manutenção do potencial de membrana mitocondrial (KOPPERS et al., 2008). A perda deste potencial, por utilização de desacopladores pode dobrar o consumo de oxigênio e aumentar a produção de EROs, em caso de impedimento do transporte de elétrons (KOPPERS et al., 2008), o que torna esta estratégia de reduzir a produção de EROs arriscada. O uso de antioxidantes como o α -tocoferol demonstrou suprimir os efeitos deletérios da produção de EROs mitocondriais sobre a motilidade (KOPPERS et al., 2008), sugerindo que talvez a utilização de antioxidantes em vez de inibidores mitocondriais possa ser uma estratégia mais segura.

No presente trabalho, os resultados encontrados para os efeitos individuais integridade de acrossomo, potencial de membrana mitocondrial e motilidade prévia à seleção evidenciam que a causa de menores taxas de blastocisto para todos os atributos possa ser decorrente do ambiente deletério criado por estas células, no momento da FIV. Um trabalho recente demonstrou que a exposição de espermatozoides bovinos às EROs antes da FIV, aumenta a porcentagem de espermatozoides capacitados e com estresse oxidativo, reduzindo as taxas de clivagem, aumentando o bloqueio do desenvolvimento embrionário nas primeiras clivagens e reduzindo a taxa final de blastocisto (DE CASTRO et al., 2016). No entanto, esses autores não estabeleceram as vias pelas quais as EROs afetam o desenvolvimento embrionário (DE CASTRO et al., 2016). Em outro estudo foi demonstrado que a exposição de espermatozoides bovinos a agentes oxidantes, previamente à FIV, causou os mesmos efeitos negativos no desenvolvimento embrionário, com redução da clivagem e do desenvolvimento subsequente, sendo que as exposições mais sutis não alteraram a viabilidade espermática nem a taxa de clivagem, sendo o impacto visto apenas após a primeira clivagem (SILVA et al., 2007).

Em camundongos foi verificado que a exposição dos espermatozoides às EROs previamente a FIV, mesmo sem alteração da motilidade ou a capacidade de fecundação, resultou em danos tardios, entre eles, o bloqueio embrionário, um baixo desenvolvimento até o estágio de blastocisto e alterações na diferenciação celular, com redução da proporção das células da massa celular interna, sem alteração no número total de células (LANE et al., 2014). Lane et al. (2014) verificaram que o efeito dessas alterações espermáticas previamente à FIV se perpetuava mesmo após a transferência dos embriões resultando em menor taxa de

implantação, menor comprimento dos fetos e alterações pós-natais, como síndromes metabólicas, intolerância à glicose e menor peso.

Apesar do presente estudo não ter realizado a avaliação da produção de radicais livres nas amostras seminais, sugere-se que a produção de EROs, no meio de fecundação, durante a co-incubação dos gametas na FIV, pode justificar as alterações observadas no desenvolvimento embrionário. A maior produção de EROs durante a capacitação, seja por espermatozoides sensibilizados por prévia exposição; por maior motilidade antes da seleção; por maior número de células com acrossomo íntegro ou pelo maior potencial de membrana mitocondrial, geraria um estresse oxidativo no meio de fecundação. Esse estresse poderia afetar não apenas a função espermática, como também agir diretamente nos gametas femininos em co-incubação e nos zigotos em desenvolvimento, o que poderia levar ao bloqueio do desenvolvimento embrionário por distintas vias.

Uma alternativa para minimizar estes efeitos deletérios seria a utilização de antioxidantes, ou a redução do tempo de FIV ou a dose inseminante. Já foi demonstrado efeito positivo na PIVE quando da incubação das amostras seminais com antioxidantes como, por exemplo, a glutatona (GSH). A redução da produção das EROs pelos espermatozoides resultou em um aumento dos espermatozoides vivos, diminuição de desordens lipídicas na membrana destas células, redução de danos no DNA espermático com consequente aumento das taxas de penetração e de taxas de embriões (GADEA et al., 2007). Neste mesmo estudo, vale ressaltar que a maioria dos efeitos observados apresentou interação com o touro, o que reforça a importância das variações individuais, sugerindo que a efetividade de um tratamento antioxidante pode ser dependente do *status* oxidativo inicial da amostra. Aitken et al. (1989), no mesmo trabalho no qual relataram a pré-sensibilização dos espermatozoides por exposições prévias ao estresse oxidativo, também observam que a adição do antioxidante α -tocoferol, suprimiu esta sensibilização e os efeitos negativos subsequentes, ocasionados por um estresse oxidativo induzido.

A redução do tempo de exposição ao gameta masculino em humanos demonstrou um aumento na qualidade embrionária e aumento das taxas de gestação (GIANAROLI et al., 1996; DIRNFELD et al., 1999). Em bovinos, esta melhor qualidade também já foi demonstrada por meio do aumento da taxa de blastocisto/oócito clivado de 15,8% e 17,3% para 31,7% e 38,2%, para dois touros distintos respectivamente (KOCHHAR et al., 2003). No entanto, este aumento estava associado a reduções na taxa de clivagem de 67,1% e 69,3%

para 37,8% e 39,1% para os mesmos dois touros distintos respectivamente (KOCHHAR et al., 2003), além de alterar a proporção entre embriões machos e fêmeas (DODE et al., 2002; KOCHHAR et al., 2003). Em bovinos, a quantidade de embriões produzidos é de grande interesse econômico, pois está mais relacionada à quantidade de produtos finais (bezerros nascidos) que à qualidade embrionária, sendo exatamente a vantagem da PIVE sobre a SOV (PONTES et al., 2009). Isto torna a redução do tempo de co-incubação dos gametas uma estratégia desvantajosa nesta espécie. No entanto, os resultados dessa redução indicam que a elucidação dos mecanismos envolvidos no efeito negativo da co-incubação de gametas permitiria, além do aumento na produção de embriões, incrementos na qualidade embrionária e nas taxas de prenhez dos embriões produzidos *in vitro*. Esta relação entre suscetibilidade ao estresse oxidativo do espermatozoide e a qualidade dos embriões PIV já foi demonstrada em bovinos (SIMÕES et al., 2013).

A redução da concentração espermática durante a co-incubação dos gametas poderia reduzir os efeitos negativos, provavelmente associados à produção de EROs na FIV, em amostras com os atributos que demonstraram um efeito negativo sobre a PIVE. As concentrações espermáticas demonstraram correlação com as taxas de fecundação e de clivagem (Ward et al., 2003). Contudo, para a taxa de blastocisto, as maiores concentrações apresentam taxas semelhantes (Ward et al., 2003). Isso pode ser um indicativo do efeito negativo indireto da maior quantidade de células espermáticas no potencial de desenvolvimento embrionário, principalmente para touros com maior fertilidade *in vitro*. No entanto, o objetivo e conseqüentemente as análises naquele estudo foram outros e a significância destes resultados não foi determinada. Ward et al. (2003) utilizavam concentrações reduzidas, a maior utilizada foi de $0,5 \times 10^6$ espermatozoides/mL, muito inferior à utilizada no presente estudo ($1,25 \times 10^6$ espermatozoides móveis/mL) e o tempo de co-incubação de 17 horas, também inferior ao adotado neste estudo (20 horas). Tais diferenças sugerem que a utilização de concentrações superiores, próximas às adotadas neste estudo, poderia exacerbar este provável efeito indireto deletério no desenvolvimento embrionário. A concentração utilizada, no presente estudo, apesar de superior à utilizada no estudo descrito por Ward et al. (2003), está em acordo com as adotadas pela maioria dos autores que variam entre 1×10^6 até 5×10^6 espermatozoides/mL (BLONDIN; COENEN; SIRARD; 1997; DODE et al; 2002; RIZOS et al., 2002; TANGHE et al., 2002; KOCHHAR et al., 2003; SUZUKI et al., 2003; PALMA; SINOWATZ, 2004; ALOMAR et al., 2006; GADEA et al., 2007; ALOMAR et al., 2008; MACHADO et al., 2009; PONTES et al., 2009;

CARVALHO et al., 2010; FERRAZ et al., 20014 KATO; NAGAO; 2015). Os três trabalhos que relatam os mesmos resultados de efeito negativo para motilidade pré-seleção, do *status* acrossomal e mitocondrial, utilizam concentrações espermáticas na FIV próximas à concentração de $1,25 \times 10^6$ espermatozoides moveis/mL e tempos de co-incubação próximos às 20 horas, adotados no presente estudo (TANGHE et al., 2002 = 1×10^6 sptz/mL por 20h; ALOMAR et al., 2006 = 2×10^6 sptz/mL por 18h; KATO; NAGAO; 2015 = 2×10^6 sptz/mL).

Cabe ressaltar que os problemas (exposição às EROs, tempo e concentração dos espermatozoides) e possíveis alternativas (antioxidantes, redução do tempo e da concentração) são pertinentes à PIVE. Na fecundação *in vitro*, a razão espermatozoide/oócito é provavelmente milhares de vezes maior que na fecundação *in vivo*. Na fecundação *in vivo* são propostos vários mecanismos de controle para a manutenção da razão espermatozoide/oócito próximas à unidade, durante os estágios iniciais da fecundação *in vivo* (HUNTER, 1996). Outra diferença substancial são as concentrações de oxigênio que são muito inferiores no trato reprodutivo feminino ($1,5-8,7 \times 20\%$ no *in vitro*) (FISHER; BAVISTER, 1993). Esta alta disponibilidade de oxigênio pode alterar o metabolismo espermático, estimulando a via aeróbica, visto que nestas condições o espermatozoide produz ATP predominantemente por esta via (GARRETT et al., 2008). Além disso, as concentrações de oxigênio apresentam relação linear com estresse oxidativo e peroxidação lipídica de espermatozoides em cultivo (ALVAREZ et al., 1987). O efeito positivo de baixas concentrações de oxigênio durante o cultivo *in vitro*, assim como o efeito positivo do co-cultivo dos embriões com tecido epitelial da tuba uterina bovino já foram demonstrados há algumas décadas (NAGAO et al., 1994) e sua utilização já está de certa forma bem estabelecida. No entanto, há apenas dois relatos da utilização de baixas concentrações de oxigênio durante a etapa da fecundação *in vitro*, um em bubalinos e outro em ovinos (LEONI et al., 2007; ELAMARAN et al., 2012).

Apesar das justificativas dos efeitos deletérios estarem envolvendo as EROs, é importante lembrar que a produção de EROs pelos espermatozoides não é apenas um efeito colateral do metabolismo espermático. As EROs desempenham um papel regulatório no controle da função espermática, sendo que o tipo de EROs, a quantidade e o momento de produção parecem ser determinantes para diferenciar entre um efeito positivo ou negativo (AITKEN et al., 1995). Em bovinos, a exposição dos espermatozoides às EROs previamente a FIV, demonstrou que apenas alguns tipos, como o peróxido de hidrogênio, foram capazes de reduzir as taxas de penetração (modelo pré-sensibilização), no entanto, a inibição da produção

desta mesma EROs durante a FIV, também reduz a taxa de penetração, mostrando seu papel fundamental nesta etapa (BLONDIN; COENEN; SIRARD, 1997).

Neste estudo, a individualização do efeito de um atributo com a homogeneização/diluição do efeito dos demais, permitiu avaliar o efeito individual de um único atributo, enquanto os demais foram mantidos homogêneos. O sucesso na identificação do efeito individual significativo de alguns atributos espermáticos nos índices da PIVE, neste estudo, demonstrou a vantagem e eficiência desta estratégia.

Os resultados para os perfis espermáticos, que combinam o efeito de todos os atributos avaliados em perfis **ALTA** ou **BAIXA**, tanto inter-touros quanto inter-partidas não mostraram diferenças entre os grupos. Ou seja, reforçam a sugestão de que o efeito de um determinado atributo espermático sobre a fertilidade *in vitro* seja dependente dos demais atributos. Neste caso, o aumento ou a diminuição de todos os atributos simultaneamente poderia resultar em um efeito “compensatório” entre eles. Quando os atributos espermáticos como menor motilidade prévia (**BAIXA PRÉ**), menor integridade de acrossomo (**BAIXA IA**) e menor atividade mitocondrial (**BAIXA Alta**) foram individualizados, estes apresentaram efeito positivo para taxa de blastocisto. Quando estes mesmos atributos foram combinados entre si, esperava-se o mesmo efeito positivo ou um efeito positivo aditivo. No entanto, quando da combinação destes atributos entre si e a associação com os demais atributos (PÓS, MPI, LA-), essa diferença entre os grupos **ALTA** e **BAIXA** deixou de existir, ou seja, parece haver um efeito compensatório. Além disso, é interessante observar que nestas condições (atributos combinados), as taxas de blastocisto, tanto para os perfis **ALTA** quanto para os perfis **BAIXA**, foram as menores observadas em todo o estudo, sugerindo que ao invés de um efeito positivo aditivo houve um efeito antagônico.

Este efeito “compensatório” pode ser confirmado por estudos que avaliaram o efeito do processo de sexagem espermática, da seleção por Percoll[®] e do impacto das alterações morfológicas. A sexagem espermática reduz simultaneamente a motilidade total e progressiva, a porcentagem de células com membrana plasmática e acrossomo intactos, porém, não reduz a fertilidade *in vitro* quando comparada às amostras convencionais do mesmo ejaculado (CARVALHO et al., 2010). A seleção por Percoll[®] aumenta simultaneamente os parâmetros da motilidade espermática e a porcentagens de células com membrana intacta, porém, não aumenta a fertilidade *in vivo* de alguns touros (SUZUKI et al., 2003). E a presença de alterações morfológicas, como gota citoplasmática proximal, que

estava associada a baixos índices de motilidade, vigor, integridade de membrana plasmática e acrossomal, potencial de membrana mitocondrial e qualidade da cromatina, porém, não foi associada a baixos índices de fertilidade *in vitro* quando comparadas às amostras seminais controle (CARREIRA et al., 2012).

Neste contexto, o efeito compensatório parece ser passível de derivação entre efeitos diretos e indiretos. Estes efeitos, por sua vez, comportam-se como um sistema de gangorra, no qual um provável efeito positivo direto na PIVE, devido ao aumento do potencial de fecundação dos espermatozoides com determinados atributos espermáticos, é suprimido pelo efeito negativo indireto do ambiente durante a fecundação *in vitro*, condicionado por estes espermatozoides com maior potencial de fecundação.

Com relação aos resultados que não apresentaram efeito significativo, era esperada essa ausência de efeito da motilidade PÓS. A dose inseminante ($1,25 \times 10^6$ espermatozoides móveis/mL), utilizada neste trabalho, foi ajustada pela motilidade, o que resulta no mesmo número final de espermatozoides móveis por gota. No entanto, o número de espermatozoides totais por gota variou, pois no grupo **ALTA**, uma menor quantidade de células foi necessária para obter a mesma dose inseminante, comparada ao grupo **BAIXA**. Estes resultados são condizentes com trabalhos que não verificaram efeito positivo da seleção de células móveis na PIVE (DODE et al., 2002) ou nos quais a motilidade não foi um preditor da fertilidade *in vitro* (TANGHE et al., 2002; SUZUKI et al., 2003; TARTAGLIONE; RITTA; 2004).

Não houve efeito da integridade da membrana plasmática, apesar de estudos anteriores (TARTAGLIONE; RITTA; 2004) mostrarem a capacidade da avaliação combinada da membrana plasmática, do acrossomo e da atividade bioquímica da membrana da cauda, responderem por 82% da variação encontrada para fertilidade *in vitro*. No entanto, a análise combinada não permite dizer qual ou quais, nem quanto, cada uma dessas características está apresentando efeito sobre a fertilidade *in vitro*. Outra limitação deste trabalho está na determinação da fertilidade *in vitro* pela taxa de formação de pró-núcleo, o que não permite avaliar o efeito destes atributos sobre o desenvolvimento embrionário. Este é um ponto importante a ser ressaltado, já que nenhum dos atributos espermáticos analisados neste estudo apresentou efeito sobre a taxa de clivagem.

Também relacionado à membrana plasmática, Tanghe et al. (2002), após avaliarem uma série de características espermáticas, em três momentos da FIV, concluíram que apenas a integridade da membrana plasmática após a co-incubação apresentou correlações

significativas com a formação de pro-núcleo. Novamente, o fato de assumir a formação de pró-núcleo como índice de fertilidade *in vitro* limita a avaliação do efeito destes atributos espermáticos no desenvolvimento embrionário e nas taxas de blastocisto. Além disso, a integridade da membrana plasmática, após a co-incubação com os gametas femininos pode ser mais um sensor das condições geradas durante a FIV do que um indicativo do efeito direto deste atributo espermático no potencial de fecundação *in vitro*.

A resistência da estrutura da cromatina espermática também não apresentou efeito individual significativo sobre as taxas da PIVE. Este efeito individual apresentou uma diferença pequena, apesar de significativas, de apenas 2,1% entre o grupo **ALTA** e **BAIXA** (99,0% e 96,9%, respectivamente), o que pode não revelar o efeito biológico deste atributo na PIVE. A pequena taxa de espermatozoides com alteração de cromatina é comum entre touros (GADEA et al., 2007; CARREIRA et al., 2012; SIMÕES et al.; 2013), mesmo após o processo de sexagem (CARVALHO et al., 2010). A cromatina espermática bovina, já se mostrou bastante resistente, inclusive aos agentes oxidantes (SILVA et al., 2007; DE CASTRO et al., 2016). A resistência deste atributo pode justificar as baixas taxas de alteração de cromatina espermática encontradas em amostras seminais de touros comerciais, o que dificultam o estudo individual deste atributo em condições naturais.

Analisando o efeito dos atributos espermáticos, pode-se sugerir que o efeito negativo tardio sobre a PIVE, nas condições utilizadas, é devido ao ambiente condicionado durante a FIV. Estes resultados apesar de inesperados e surpreendentes, em conjunto com os dados apresentados por outros autores, são justificáveis pela provável relação com as EROs. No entanto, o delineamento do presente estudo visava os atributos espermáticos que poderiam apresentar efeito direto sobre a PIVE. Seriam necessários, para confirmar essa hipótese (efeito indireto do ambiente), que fossem realizados estudos aprofundados do perfil oxidativo durante a FIV.

O efeito negativo destes atributos é suficiente para resultar em taxas de blastocistos distintas entre grupos, indicando que efeitos mais tardios, como a redução da criotolerância e a taxa de prenhez possam estar envolvidos. No entanto, critérios de qualidade embrionária e a relação com a capacidade de prever o potencial de prenhez desses embriões são extremamente discutíveis e apresentam muita variação entre estudos. Deste modo, previamente a estes resultados, era difícil estabelecer uma metodologia de análise embrionária que pudesse revelar uma possível diferença entre os grupos e que fosse aplicável para todos os

efeitos testados e embriões produzidos. Com os resultados deste presente estudo, sugere-se que as metodologias de análise devam focar em danos oxidativos e prováveis consequências ao longo do desenvolvimento embrionário.

Novos estudos que almejem elucidar a biologia do espermatozoide devem se atentar para a interação da biologia desta célula com o processo *in vitro*, mais particularmente ao ambiente que estas células podem produzir durante a fecundação para, desta maneira, confirmar os questionamentos propostos neste estudo e aumentar a eficiência da PIVE e o avanço desta biotécnica.

7 CONCLUSÃO

Os atributos espermáticos, motilidade PRÉ e PÓS, integridade das membranas plasmática e acrossomal, potencial de membrana mitocondrial e resistência da cromatina se comportam de maneira dependente entre si. Devido a esse comportamento, o efeito destes atributos foi avaliado de maneira combinada, sendo que tanto o efeito inter-touros, quanto o efeito inter-partidas não apresentam influência sobre os índices de PIVE.

Apesar de se comportarem de maneira dependente, a estratégia de se individualizar o efeito permitiu que os atributos fossem avaliados individualmente. Nessas condições, a motilidade prévia a seleção do Percoll[®], integridade de acrossomo e potencial de membrana mitocondrial apresentam efeito negativo tardio sobre a PIVE de bovinos.

8 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados do presente trabalho e dados encontrados na literatura permitem sugerir que, nos protocolos atuais de produção *in vitro* de embriões bovinos, os efeitos indiretos de atributos espermáticos sobre o ambiente, durante a fecundação *in vitro*, podem apresentar maior impacto no rendimento da PIVE do que os efeitos diretos destes mesmos atributos sobre o potencial de fecundação dos espermatozoides.

REFERÊNCIA

- 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.; PATERSON, M.; FISHER, H.; BUCKINGHAM, W.; VAN DUIN, M. Redox regulation of tyrosine phosphorylation in human spermatozoa and its role in the control of human sperm function. **Journal of Cell Science**, v. 108, p. 2017-2025, 1995.
- AL NAIB, A.; HANRAHAN, J. P.; LONERGAN, P.; FAIR, S. *In vitro* assessment of sperm from bulls of high and low field fertility. **Theriogenology**, v. 76, p. 161-167, 2011.
- ALOMAR, M.; TASIAUX, H.; REMACLE, S.; GEORGE, F.; PAUL, D.; DONNAY, I.; Kinetics of fertilization and development, and sex ratio of bovine embryos produced using the semen of different bulls. **Animal Reproduction Science** v. 107, p. 48-61, 2008.
- ALOMAR, M.; MAHIEU, J.; VERHAEGHE, B.; DEFOIN, L.; DONNAY, I. Assessment of sperm quality parameters of six bulls showing different abilities to promote embryo development *in vitro*. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 18, p. 395-402, 2006.
- ALVAREZ, J. G.; TOUCHSTONE, J. C.; BLASCO, L.; STOREY, B. T. Spontaneous lipid peroxidation and production of hydrogen peroxide and superoxide in human spermatozoa. **Journal of Andrology**, v. 8, p. 338-348, 1987.
- BADR, H.; BONGIONI, G.; ABDOON, A. S. S.; KANDIL, O.; PUGLISI, R. Gene expression in the *in vitro*-produced preimplantation bovine embryos. **Zygote**, v. 15, p. 355-367, 2007.
- BALLACHEY, B. E.; HOHENBOKEN, W. D.; EVENSON, D. P. Heterogeneity of sperm nuclear chromatin structure and its relationship to bull fertility. **Biology of Reproduction**, v. 36, p. 915-925, 1987.
- BALLACHEY, B. E.; EVENSON, D. P.; SAACKE, R. G. The sperm chromatin structure assay relationship with alternate tests of semen quality and heterospermic performance of bulls. **Journal of Andrology**, v. 9, p. 109-115, 1988.
- BIRCK, A.; CHRISTENSEN, P.; LABOURIAU, R.; PEDERSEN, J.; BORCHERSEN, S. *In vitro* induction of the acrosome reaction in bull sperm and the relationship to field fertility using low-dose inseminations. **Theriogenology**, v. 73, p. 1180-1191, 2010.
- BLONDIN, P.; COENEN, K.; SIRARD, M. The impact of reactive oxygen species on bovine sperm fertilizing ability and oocyte maturation. **Journal of Andrology**, v. 18, n. 4, p. 454-460, 1997.

- BOE-HANSEN, G. B.; MORRIS, I. D.; ERSBOLL, A. K.; GREVE, T.; CHRISTENSEN, P. DNA integrity in sexed bull sperm assessed by neutral comet assay and sperm chromatin structure assay. **Theriogenology**, v. 63, p. 1789-1802, 2005.
- BOHNENSACK, R.; HALANGK W. Control of respiration and of motility in ejaculated bull spermatozoa. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 850, p. 72-79, 1986.
- CARREIRA, J. T.; MINGOTI, G. Z.; RODRIGUES, L. H.; SILVA, C.; PERRI, S. H. V.; KOIVISTO, M. B. Impact of proximal cytoplasmic droplets on quality traits and *in vitro* embryo production efficiency of cryopreserved bull spermatozoa. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v. 54, p. 1-7, 2012.
- CARVALHO, J. O.; SARTORI, R.; MACHADO, G. M.; MOURÃO, G. B.; DODE, M. A. N. Quality assessment of bovine cryopreserved sperm after sexing by flow cytometry and their use in *in vitro* embryo production. **Theriogenology**, v. 74, p. 1521-1530, 2010.
- CELEGHINI, E. 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 Animal**, v. 42, p. 479-488, 2007.
- CHRISTENSEN, P.; LABORIAU, R.; BIRCK, A.; BOE-HANSEN G. B.; PEDERSEN, J.; BORCHERSEN, S. Relationship among seminal quality measures and field fertility of young dairy bulls using low-dose inseminations. **Journal of Dairy Science**, v. 94, p. 1744-1754, 2011.
- DE CASTRO, L. S.; DE ASSIS, P. M.; SIQUEIRA, A. F. P.; HAMILTON, T. R. S.; MENDES, C. M.; LOSANO, J. D. A.; NICHI, M.; VISINTIN, J. A.; ASSUMPÇÃO, M. E. O. A. Sperm oxidative stress is detrimental to embryo development: a dose-dependent study model and a new and more sensitive oxidative status evaluation. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2016, p. 1-12, 2016.
- DIRNFELD, M.; BIDER, D.; KOIFMAN, M.; CALDERON, I.; ABRAMOVICI, H. Shortened exposure of oocytes to spermatozoa improves *in vitro* fertilization outcome: a prospective, randomized, controlled study. **Human Reproduction**, v. 14, n. 10, p.2562/2564, 1999.
- DODE, M. A. N.; RODOVALHO, N. C.; UENO, V. G.; FERNANDES, C. E. The effect of sperm preparation and co-incubation time on *in vitro* fertilization of *bos indicus* oocytes. **Animal Reproduction Science**, v. 69, p. 15-23, 2002.
- ELAMARAN, G.; SINGH, K. P.; SINGH, M. K.; SINGLA, S. K.; CHAUHAN, M. S.; MANIK, R. S.; PALTA, P. Oxygen concentration and cysteamine supplementation during *in vitro* production of buffalo (*Bubalus bubalis*) embryos affect mRNA expression of *BCL-2*,

CXL-XL, MCL-1, BAX and BID. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 47, p. 1027-1036, 2012.

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.

EVENSON, D. P.; DIXON, R. Clinical aspects of sperm DNA fragmentation detection and male infertility. **Theriogenology**, v. 65, p. 979-991, 2006.

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, n. 2 p. 176-188, 2006.

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

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

FRANKEN D. R.; ACOSTA, A. A.; KRUGER, T. F.; LOMBARD, C. J.; OEHNINGER, S.; HODGEN, G. D. The hemizona assay: its role in identifying male factor infertility in assisted reproduction. **Fertility and Sterility**, v. 59 n.5 p. 1075-1080, 1993.

FUKUI, Y.; GLEW, A. M.; GANDOLFI, F.; MOOR, M. Ram-specific effects on *in vitro* fertilization and cleavage of sheep oocytes matured *in vitro*. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 82, p. 337-340, 1988.

GADEA, J.; MATÁS C. Sperm factors related to *in vitro* penetration of porcine oocytes. **Theriogenology**, v. 54, p. 1343-1357, 2000.

GADEA, J.; GUMBAO, D.; CÁNOVAS, S.; GARCÍA-VÁZQUEZ, F. A.; GRULLÓN, L. A.; GARDÓN, J. C. Supplementation of the dilution medium after thawing with reduced glutathione improves function and the *in vitro* fertilizing ability of frozen-thawed bull spermatozoa. **International Journal of Andrology**, v. 31, p. 40-49, 2007.

GARRET, L. J. A.; REVELL, S. G.; LEESE, H. J. Adenosine triphosphate production by bovine spermatozoa and its relationship to semen fertilizing ability. **Journal of Andrology**, v.29, n. 4, p. 449-458, 2008.

GAVIRAGHI, A.; DERIU, F.; SOGGIU, A.; GALLI, A.; BONACINA, C.; BONIZZI, L.; RONCADA, P. Proteomics to investigate fertility in bulls. **Veterinary Research Communications**, v. 34, p. S33-S36, 2010. Supplement,1.

GIANAROLI, L.; FIORENTINO, A.; MAGLI, M. C.; FERRARETTI, A. P.; MONTANARO, N. Prolonged sperm-oocyte exposure and high sperm concentration affect human embryo viability and pregnancy rate. **Human Reproduction**, v. 11, n. 11, p. 2507-2511, 1996.

GRAHAM, J. K.; KUNZE, E.; HAMMERSTEDT, R. H. Analysis of sperm cell viability, acrosomal integrity, and mitochondrial function using flow cytometry. **Biologoy of Reproduction**, v. 43 p. 55-64, 1990.

GIANAROLI, L.; FIORENTINO, A.; MAGLI, M. C.; FERRATTI, A. P.; MONTANARO, N. Prolonged sperm-oocyte exposure and high sperm concentration affect human embryo viability and pregnancy rate. **Human Reproduction**, v. 11, n. 11, p. 2507-2511, 1996.

HANSEN, P. J. Realizing the promise of IVF in cattle--an overview. **Theriogenology**, v. 65, p. 119-25, 2006.

HASLER, J. P. Forty years of embryo transfer in cattle: a review focusing on the journal *Theriogenology*, the growth of the industry in North America, and personal reminiscences. **Theriogenology**, v. 81, p. 152-169, 2014.

HAY, M. A.; KING, W. A.; GARTLEY C. J.; LEIBO, S. P.; GOODROWE, K. L. Effects of cooling, freezing and glycerol on penetration of oocytes by spermatozoa in dogs. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 51, p. 99-108, 1997.

HOLT, W. V.; O'BRIEN, J.; ABAIGAR, T. Applications and interpretation of computer-assisted sperm analyses and sperm sorting methods in assisted breeding and comparative research. **Reproduction, Fertility and Development**, v.19, p.709-718, 2007

HUNTER, R. H. F. Ovarian control of very low sperm/egg ratios at the commencement of mammalian fertilization to avoid polyspermy. **Molecular Reproduction and Development**, v. 44, p. 417-422, 1996.

JANUSKAUSKAS, A.; JOHANNISSON, A.; ROGRIGUEZ-MARTINEZ, H. Subtle membrane changes in cryopreserved bull semen in relation with sperm viability, chromatin structure, and field fertility. **Theriogenology**, v. 60, p. 743-758, 2003.

KATO, Y.; NAGAO, Y. Changes in sperm motility and capacitation induce chromosomal aberration of the bovine embryo following intracytoplasmic sperm injection. **Plos One**, v. 10, n. 6, p. 1-17, 2015.

- KHURANA, N. K.; NIEMANN, H. Effects of cryopreservation on glucose metabolism and survival of bovine morulae and blastocysts derived *in vitro* or *in vivo*. **Theriogenology**, v. 54, p. 313-326, 2000.
- KJAESTAD, H.; ROPSTAD E.; BERG K. A. Evaluations of spermatological parameters used to predict the fertility of frozen bull semen. **Acta Vet Scand**, v. 34, n. 3, p. 299-303, 1993.
- KOCHHAR, H. S.; KOCHHAR, K. P.; BASRUR, P. K.; KING, W. A. Influence of the duration of gamete interaction on cleavage, growth rate and sex distribution of *in vitro* produced bovine embryos. **Animal Reproduction Science**, v. 77, p. 33-49, 2003.
- KOPPERS, A. J.; DE LULIIS, 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. **Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 93, p. 3199-3207, 2008.
- KRISHER, R. L.; BAVISTER, B. D. Responses of oocytes and embryos to the culture environment. **Theriogenology**, v. 49, p. 103-114, 1998.
- KRZYZOSIAK, J.; MOLAN, P.; VISHWANATH, R. Measurements of bovine sperm velocities under true anaerobic and aerobic conditions. **Animal Reproduction Science**, v. 55, p. 163-173, 1999.
- 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. 1-9, 2014.
- LEONI, G. G.; ROSATI, I.; SUCCU, S.; BOGLIOLO, L.; BEBBERE, D.; BERLINGUER, F.; LEDDA, S.; NAITANA, S. A low oxygen atmosphere during IVF accelerates the kinetic of formation of *in vitro* produced ovine blastocysts. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 42, p. 299-304, 2007.
- LOHUIS, M. M. Potential benefits of bovine embryo-manipulation technologies to genetic improvement programs. **Theriogenology**, v. 43, p. 51-60, 1995.
- LONERGAN, P.; FAIR, T. Maturation of oocytes *in vitro*. **Annual Review of Animal Biosciences**, v. 4, p. 10.1-10.14, 2016.
- MACHADO, G. M.; CARVALHO, J. O.; SIQUEIRA FILHO, E.; CAIXETO, E. S.; FRANCO, M. M.; RUMPF, R.; DODE, M. A. N. Effect of Percoll volume, duration and force of centrifugation, on *in vitro* production and sex ratio of bovine embryos. **Theriogenology**, v. 71, p. 1289-1297, 2009.

MARINHO, L. S. R.; SANCHES, B. V.; ROSA, C. O.; TANNURA, J. H.; RIGO, A. G.; BASSO, A. C.; PONTES, J. H. F.; SENEDA, M. M. Pregnancy rates to fixed embryo transfer of vitrified IVP *Bos indicus*, *Bos taurus* or *Bos indicus* X *Bos taurus* embryos. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 50, p. 807-811, 2015.

NAGAO, Y.; SAEKI, K.; HOSHI, M.; KAINUMA, H. Effects of oxygen concentration and oviductal epithelial tissue on the development of *in vitro* matured and fertilized bovine oocytes cultured in protein free medium. **Theriogenology**, v. 41, p. 681-687, 1994.

NASCIMENTO, J. M.; SHI, L. Z.; TAM, J.; CHANDSAWANGBHUWANA, C.; DURRANT, B.; BOTVINICK, E. L.; BERNS, M. W. Comparison of glycolysis and oxidative phosphorylation as energy sources for mammalian sperm motility, using the combination of fluorescence imaging, laser tweezers, and real-time automated tracking and trapping. **Journal of Cellular Physiology**, v. 217, p. 745-751, 2008.

OTOI, T.; TACHIKAWA, S.; KONDO, S.; SUZUKI, T. Effects of different lots of semen from the same bull on *in vitro* development of bovine oocytes fertilized *in vitro*. **Theriogenology**, v. 39, p. 713-718, 1993.

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

PARRISH, J.; SUSKO-PARRISH, J.; WINER, . A.; FIRST, N. L. Capacitation of bovine sperm by heparin. **Biology of Reproduction**, v. 38, p. 1171-1180, 1988.

PEÑA, F. J. Detecting subtle changes in sperm membranes in veterinary andrology. **Asian Journal of andrology**, v. 9, n. 6, p. 731-737, 2007.

PETRUNKINA, A. M.; HARRISON, R. A. P. Cytometric solutions in veterinary andrology: developments, advantages and limitations. **Cytometry Part A**, v. 79A, p. 338-348, 2011.

PONTES J. H. F.; NONATO-JÚNIOR, I.; SANCHES, B. V.; ERENO-JÚNIOR, J. C.; UVO, S.; BARREIROS, T. R. R.; OLIVEIRA, J. A.; HASLER, J. F.; SENEDA, M. M. Comparison of embryo yield and pregnancy rate between *in vivo* and *in vitro* methods in the same nelore (*bos indicus*) donor cows. **Theriogenology**, v. 71, p. 690-697, 2009.

REYES, R.; MARTINEZ, J. C.; DELGADO, D. M.; MERCHANT-LARIOS, H. Heparin-glutathione III: study with fluorescent probes as indicators of membrane status of bull sperm. **Archives of Andrology**, v. 48, n. 3, p. 209-219, 2002.

RIZOS, D.; WARD, F.; DUFFY, P.; BOLAND, M. P.; LONERGAN, P. Consequences of bovine oocyte maturation, fertilization or early embryo development *in vitro* versus *in vivo*:

implications for blastocyst yield and blastocyst quality. **Molecular Reproduction and Development**, v. 61, p. 234-248, 2002.

RODRÍGUEZ-LOZANO, I.; ÁVALOS-RODRÍGUES, A.; CASTILLO-JUÁREZ, H.; BORDERAS-TORDESILLAS, F.; ROA-VIDAL, J. J.; ROSALES-TORRES, A. M. Percentage of ubiquitinated spermatozoa does not correlate with fertilizing capacity of thawed bovine semen. **Reproduction in Domestic Animal**, v. 49, p. 27-31, 2014.

SAKKAS, D.; ALVAREZ, J. G. Sperm DNA fragmentation: mechanisms of origin, impact on reproductive outcome and analysis. **Fertility and Sterility**, v. 93, n. 4, p. 1027-1036, 2010.

SAMARDZIJA, M.; KARADJOLE, M.; GETZ, I.; MAKEK, Z.; CERGOLJ, M.; DOBRANIC, T. Effects of bovine spermatozoa preparation on embryonic development *in vitro*. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 58, n. 4, p. 1-7, 2006.

SELLÉS, E.; GADEA, J.; ROMAR, R.; MATÁS, C.; RUIZ, S. Analysis of *in vitro* fertilizing capacity to evaluate the freezing procedures of boar semen and predict the subsequent fertility. **Reproduction of Domestic Animals**, v. 38, p.66-72, 2003.

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, 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.; VISTIN, J. A.; ASSUMPÇÃO, M. E. O. Influence of bovine sperm DNA fragmentation and oxidative stress on early embryo *in vitro* development outcome. **Reproduction**, v. 146, p. 433-441, 2013.

SUZUKI, K.; GESHI, M.; YAMAUCHI, N.; NAGAI, T. Functional changes and motility characteristics of Japanese Black bull spermatozoa separated by Percoll. **Animal Reproduction Science**, v. 77, p. 157-172, 2003.

TANEJA, M.; BOLS, P. E. J.; VELDE, A. V.; JU, J. C.; SCHREIBER, D.; TRIPP, M. W.; LEVINE, H.; ECHELARD, Y.; RIESEN, J.; YANG, X. Developmental competence of juvenile calf oocytes *in vitro* and *in vivo*: influence of donor animal variation and repeated gonadotropin stimulation. **Biology of Reproduction**, v. 62, p. 206-213, 2000.

TANGHE, S.; VAN SOOM, A.; STERCKX, V.; MAES, D.; DE KRUIF, A. Assessment of different sperm quality parameters to predict *in vitro* fertility of bulls. **Reproduction of Domestic Animals**, v. 37, p. 127-132, 2002.

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

TERVIT, H. R. Laparoscopy/laparotomy oocyte recovery and juvenile breeding. **Animal Reproduction Science**, v. 42, p. 227-238, 1996.

TESARIK, J.; GRECO, E.; MENDONZA, 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.

TESARIK, J. Paternal effects on cell division in the human preimplantation embryo. **Reproductive Biomedicine Online**, v. 10, n. 3, p. 370-375, 2005.

THIBIER, M. The zootchnical applications of biotechnology in animal reproduction: current methods and perspectives. **Reproduction Nutrition Development**, v. 45, p. 235-242, 2005.

THUNDATHIL, J.; MEYER, A. T.; PALASZ, A. T.; BARTH, A. D.; MAPLETOFT, R. J. Effect of the knobbed acrosome defect in bovine sperm on IVF and embryo production. **Theriogenology**, v. 54 p. 921-934, 2000.

THUNDATHIL, J.; PALOMINO, J.; BARTH, A.; MAPLETOFT, R.; BARROS, C. Fertilizing characteristics of bovine sperm with flattened or indented acrosomes. **Animal Reproduction Science** v. 67 p. 231-243, 2001.

VANDAELE, L.; MATEUSEN, B.; MAES, D.; KRUIF, A.; SOOM, A. V. Is apoptosis in bovine *in vitro* produced embryos related to early developmental kinetics and *in vivo* bull fertility? **Theriogenology**, v. 65, p. 1691-1703, 2006.

VIANA, J. K.; SIQUEIRA, L. G. B.; PALHÃO, M. P.; CAMARGO, L. S. A. Use of *in vitro* fertilization technique in the last decade and its effect on Brazilian embryo industry and animal production. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 38, n. 2, p. 661-674, 2010.

VIEIRA, L. M.; RODRIGUES, C. A.; CASTRO NETTO, A.; GUERREIRA, B. M.; SILVEIRA, C. R. A.; FREITAS, B. G.; BRAGANÇA, L. G. M.; MARQUES, K. N. G.; SÁ FILHO, M. F.; BÓ, G. A.; MAPLETOFT, R. J.; BARUSELLI, P. S. Efficacy of a single intramuscular injection of porcine FSH in hyaluronan prior to ovum pick-up in Holstein cattle. **Theriogenology**, v. 85, p. 877-886, 2016.

WARD, F.; RIZOS, D.; BOLAND, M. P.; LONERGAN, P. Effect of reducing sperm concentration during IVF on the ability to distinguish between bulls of high and low field fertility: work in progress. **Theriogenology**, v. 59, p. 1575-1584, 2003.

ZHANG, B. R.; LARSSON, B.; LUNDEHEIM, N.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Relationship between embryo development *in vitro* and 56-day nonreturn rates of cows inseminated with frozen-thawed semen from dairy bulls. **Theriogenology**, v. 48, p. 221-231, 1997.

ZHANG, B. R.; LARSSON, B.; LUNDEHEIM, N.; HAARD, M. G.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Prediction of bull fertility by combined *in vitro* assessments of frozen-thawed semen from young dairy bulls entering an AI-programme. **International Journal of Andrology**, v. 22, p. 253-260, 1999.

ZHANG, L.; WANG, L.; ZHANG, X.; XU, G.; ZHANG, W.; WANG, K.; WANG, Q.; QIU, Y.; LI, J.; GAI, L.; Sperm chromatin integrity may predict future fertility for unexplained recurrent spontaneous abortion patients. **International Journal of Andrology**, v. 35, p. 752-757, 2012.

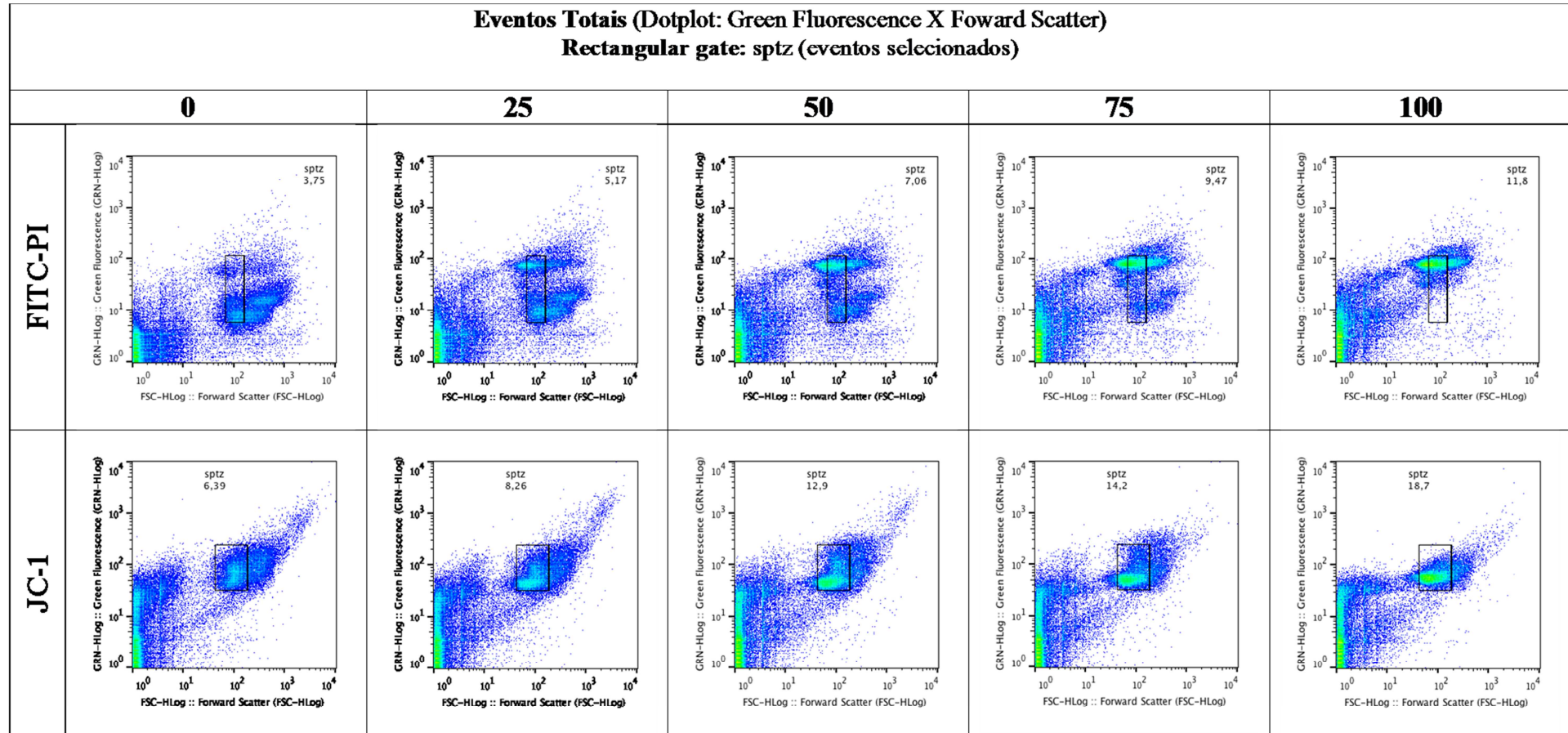
ANEXO**ANEXO A – VALIDAÇÕES DAS ANÁLISES POR CITOMETRIA DE FLUXO**

Amostras com proporções distintas: os controles negativo e positivo foram utilizados nas seguintes proporções de volume e células:

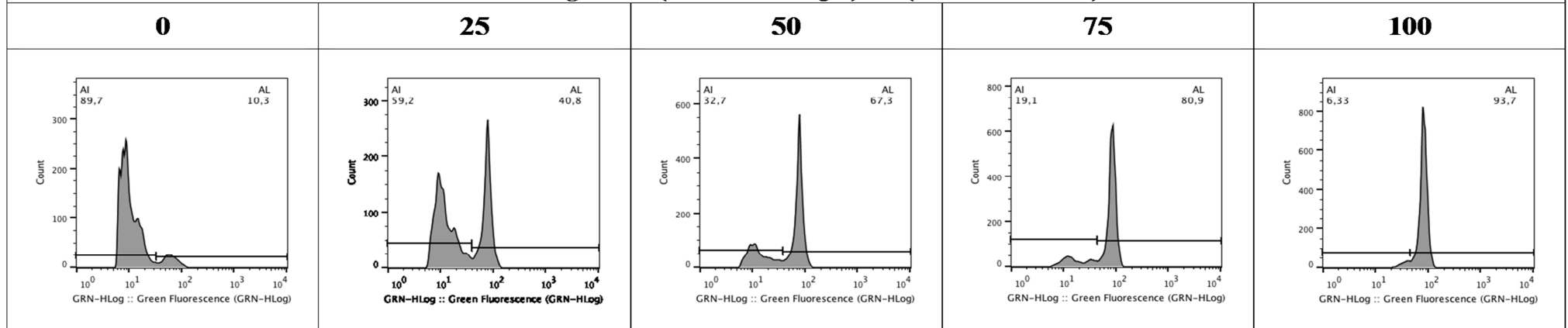
Proporção de células e volume utilizada de cada controle na preparação das amostras, para obtenção do coeficiente de regressão linear, na validação da análise de membranas plasmática, acrossomo, mitocondrial e estrutura da cromatina por citometria de fluxo capilar.

Amostra	Controle Negativo (%)	Controle Positivo (%)
0	100	0
25	75	25
50	50	50
75	25	75
100	0	100

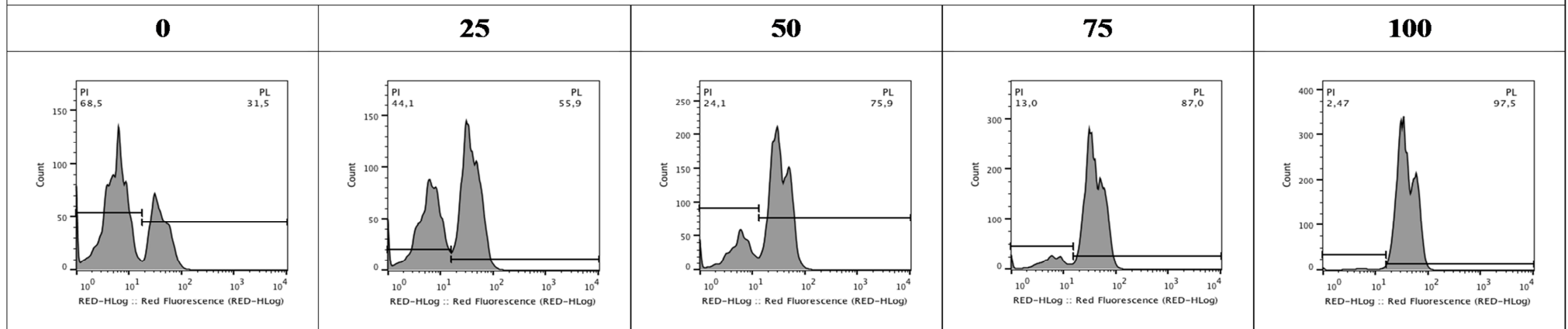
Gráficos da análise pelo software FlowJo v10.7 das amostras 0, 25, 50, 75 e 100 da validação para as sondas FITC-PI e JC-1.



Eventos Seleccionados (Histograma: Green Fluorescence)
Bisector gate: AI (acrossomo íntegro) AL (acrossomo lesado)

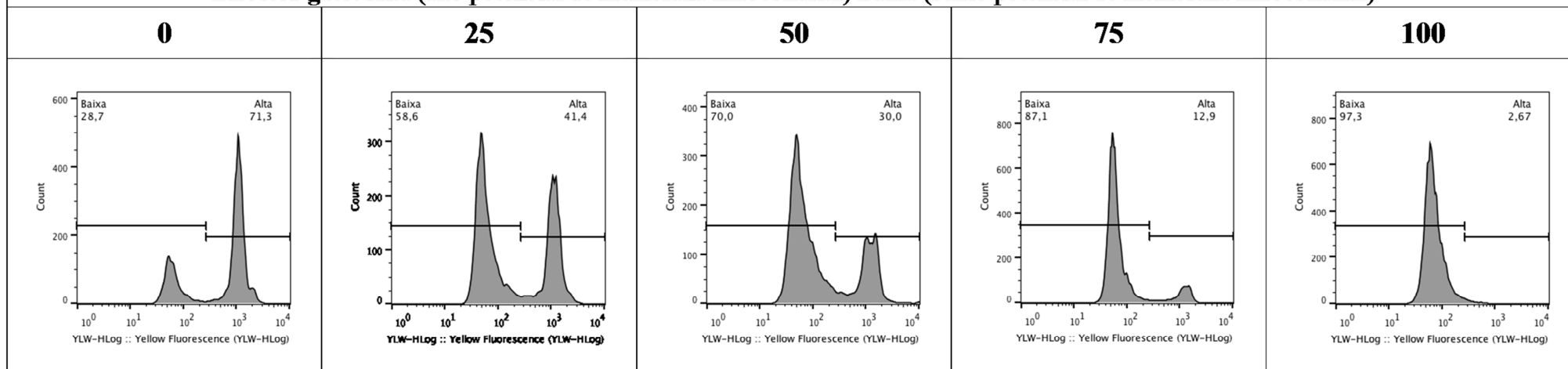


Eventos Seleccionados (Histograma: Red Fluorescence)
Bisector gate: PI (plasmática íntegra) PL (plasmática lesada)

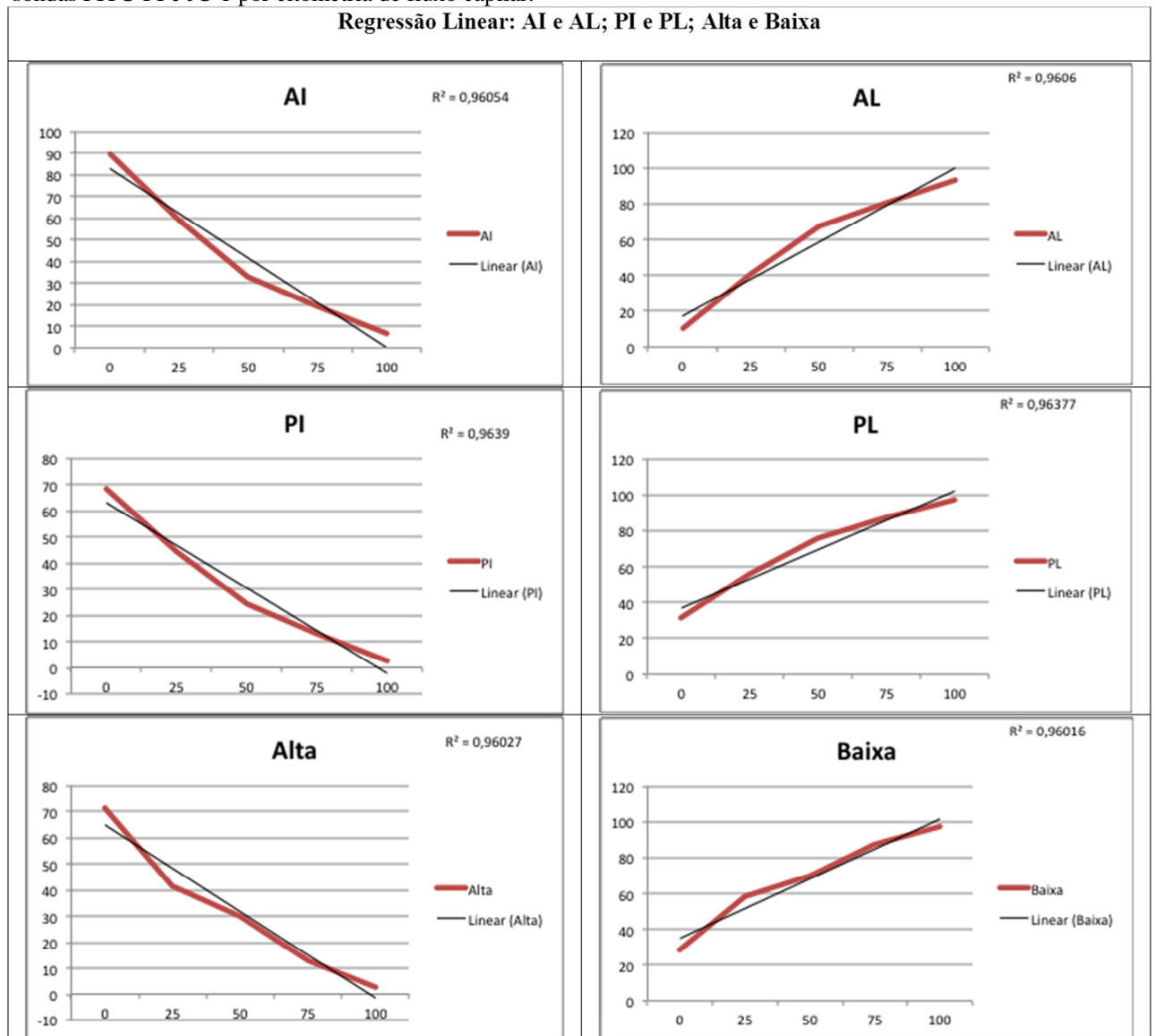


Eventos Seleccionados (Histograma: Yellow Fluorescence)

Bisector gate: Alta (alto potencial de membrana mitocondrial) Baixa (baixo potencial de membrana mitocondrial)

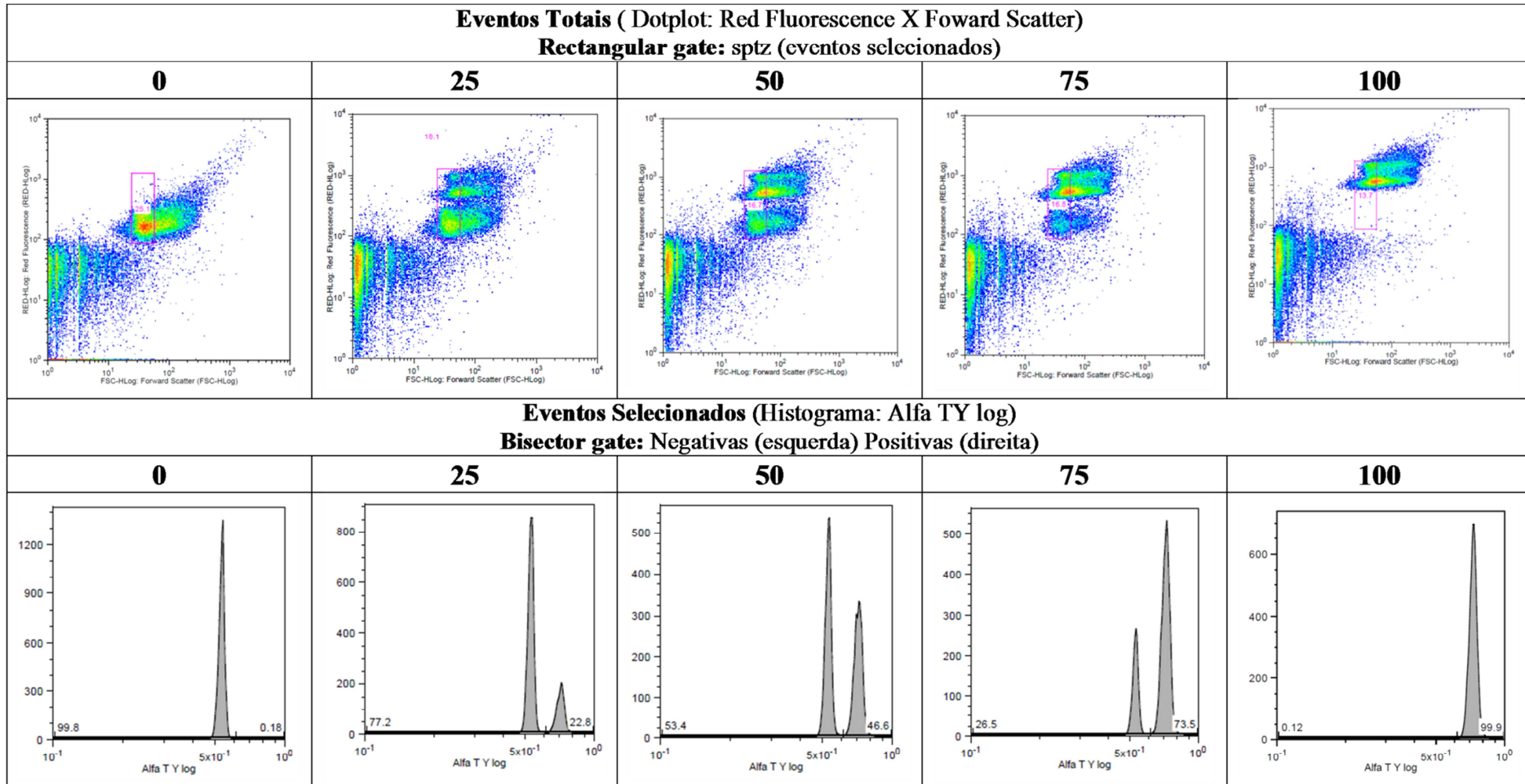


Gráficos da regressão linear da validação para avaliação da integridade da membrana acrossomal, integridade da membrana plasmática e potencial de membrana mitocondrial das amostras 0, 25, 50, 75 e 100, por uso das sondas FITC-PI e JC-1 por citometria de fluxo capilar.

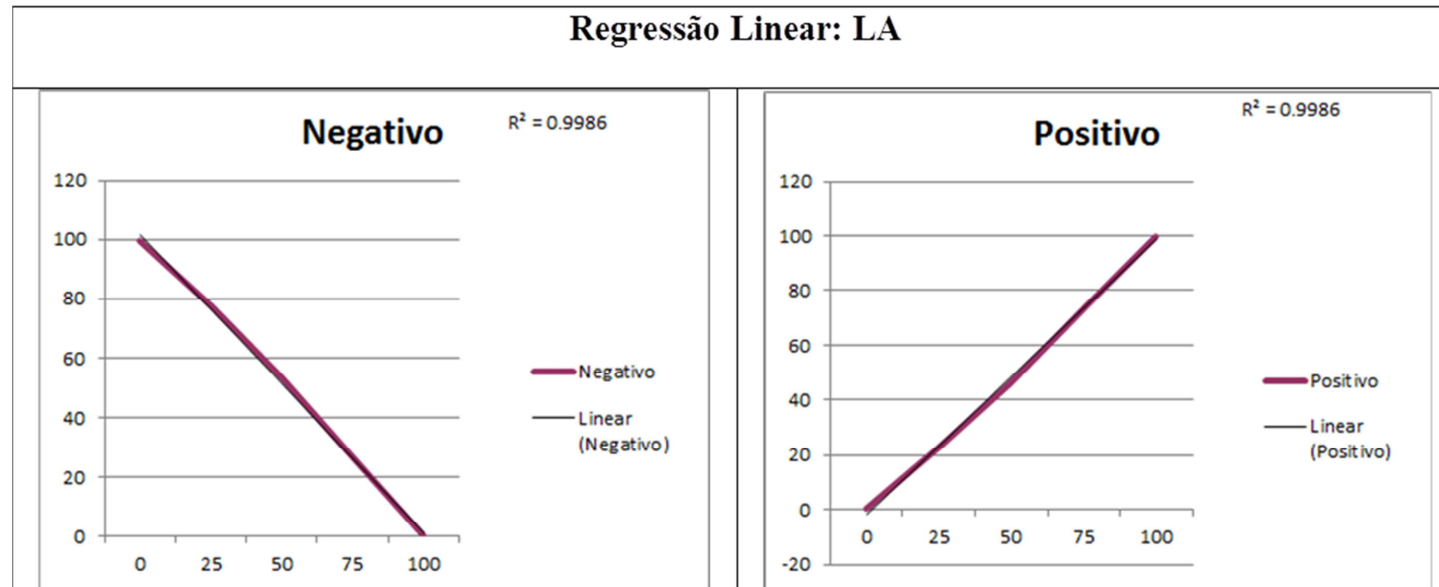


Legenda: AI: % acrossomo íntegro; AL: % acrossomo lesado; PI: % membrana plasmática íntegra; PL: % membrana plasmática lesada; Alta: % alto potencial de membrana mitocondrial; Baixa: % baixo potencial de membrana mitocondrial; R²: Coeficiente de regressão linear.

Gráficos da análise pelo software FlowJo v8.7 das amostras 0, 25, 50, 75 e 100 da validação para o ensaio SCSA modificado.



Gráficos da regressão linear da validação para avaliação da resistência da estrutura da cromatina das amostras 0, 25, 50, 75 e 100, através do ensaio SCSA modificado, corado com a sonda LA e analisado por citometria de fluxo capilar.



Legenda: Negativo: controle negativo incubado com TNE; Positivo: controle negativo incubado com HCl; R^2 : coeficiente de regressão linear