LUANA DE CÁSSIA BICUDO

**Caracterização das subpopulações e atributos espermáticos como
método preditivo de desempenho na produção *in vitro* de embriões
em bovinos**

São Paulo
2018

LUANA DE CÁSSIA BICUDO

Caracterização das subpopulações e atributos espermáticos como método preditivo de desempenho na produção *in vitro* de embriões em 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

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

De acordo: _____

Orientador

São Paulo
2018

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

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. 3669
FMVZ

Bicudo, Luana de Cássia
Caracterização das subpopulações e atributos espermáticos como método preditivo de desempenho na produção *in vitro* de embriões em bovinos / Luana de Cássia Bicudo.
– 2018.
128 f. : il.

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Reprodução Animal, São Paulo, 2018.

Programa de Pós-Graduação: Reprodução Animal.

Área de concentração: Reprodução Animal.

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

1. Fertilidade. 2. Touro. 3. Sêmen. 4. CASA. 5. PIVE. I. Título.

CERTIFIED

We certify that the Research "Characterization of subpopulations and spermatoc features as a predictive method of performance in the in vitro production of embryos in cattle", protocol number CEUAX 5509220814, under the responsibility Luana De Cássia Bicudo/ Mayra Elena Ortiz D'avila Assumpção, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Ethic Committee in the Use of Animals of School of Veterinary Medicine and Animal Science (University of São Paulo), and was approved in the meeting of day November 17, 2015.

Certificamos que o protocolo do Projeto de Pesquisa intitulado "Caracterização das subpopulações e atributos espermáticos como método preditivo de desempenho na produção in vitro de embriões em bovinos", protocolado sob o CEUAX nº 5509220814, sob a responsabilidade de Luana De Cássia Bicudo/ Mayra Elena Ortiz D'avila 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 na reunião de 17 de novembro de 2015.

Profa. Dra. Anneliese de Souza Traldi
Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo

Roseli da Costa Gomes
Secretária
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: BICUDO, Luana de Cássia

Título: Caracterização das subpopulações e atributos espermáticos como método preditivo de desempenho na produção *in vitro* de embriões em 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: _____

*Dedico aos meus anjinhos vó
Severina Marques Jacinto e vó
Lourdes Denadai Bicudo*

AGRADECIMENTOS

A Deus, sou grata por a cada etapa me iluminar, guiar, dar forças e abençoar e a cada dia, me dar um motivo para sorrir.

Minha eterna gratidão aos meus maiores amores, meus pais Sara Débora Jacinto Bicudo e Sony Dimas Bicudo, obrigada por SEMPRE me apoiarem, por toda dedicação e por serem minha fonte inesgotável de energia, esperança e amor.

À minha orientadora, professora Mayra Elena Ortiz D'Avila Assumpção, por quem eu tenho grande admiração como professora e como mulher. Obrigada por manter a porta sempre aberta para diálogo e novas ideias, pela orientação, ensinamentos, carinho, compreensão, presentinhos, abraços apertados, por me estimular a querer sempre mais e a aproveitar cada oportunidade.

Ao meu maior companheiro nestes 4 anos, Daniel de Souza Ramos Angrimani. Agradeço por ter sido meu ponto de equilíbrio, por me confortar nos momentos difíceis e por me acompanhar nas maiores alegrias, por deixar tudo mais fácil, intenso, colorido e inesquecível.

À minha família e amigos, que sempre torcem por mim e fazem das minhas conquistas as deles.

À Jussara Angrimani e Danilo Angrimani, obrigada por me receberem como membro da família, pela torcida, conversas, apoio, almoços e jantares.

Aos membros e agregados do Laboratório de Biologia do Espermatozoide (BioSptz) Camilla Mota Mendes, Thais Rose dos Santos Hamilton, Adriano Felipe Perez Siqueira, Letícia Signori de Castro, Vivian Cardoso Castiglioni, Tamie Guibu de Almeida, Ignacio Jofré Fernández e Marcelo Demarchi Goissis, por contribuírem no desenvolvimento deste trabalho como uma verdadeira equipe e, principalmente, pela ótima convivência nestes anos, cheias de conversas, risadas e guloseimas.

Aos pós-graduandos do VRA, que se tornaram verdadeiros amigos, especialmente à Andressa Dalmazzo, João Diego de Agostini Losano, Bruno Rogério Rui, Marcel Henrique Blank, Giulia Kiyomi Vechiato Kawai, Nívea de Mattos Góes Vieira, Carolina Camargo Rocha e Roberta Ferreira Leite por deixarem estes anos mais leves e divertidos.

Ao professor Marcílio Nichi por disponibilizar o Laboratório de Andrologia e seus membros para execução deste trabalho, e, sobretudo, por ser esta pessoa tão agradável de se conviver, sempre disposto a ajudar e conversar.

Ao professor Leandro Rodello, pela análise de subpopulações, minha menina dos olhos da tese, pela sua disponibilidade em me ajudar, pelos ensinamentos e estímulo.

Ao Rodolfo Daniel Mingoti, pelas análises estatísticas multivariadas e pela sua paciência em me ajudar, mesmo estando na correria de final de tese.

A todos que me acolheram tão bem na Ghent University, professora Ann Van Soom, Bart Leemans, Núria Llamas, Katarzyna Szymanska, Krishna Pavani, Eline Wydooghe, Petra Van Damme, Gretania Residiwati, Maaïke Catteeuw e Xiaoyuan Lin. Obrigada por fazerem desta experiência um período de grande crescimento e alegria, do qual irei sempre lembrar com saudades.

Aos professores do VRA José Antonio Visintin, Valquiria Hyppolito Barnabe, Anneliese de Souza Traldi, Ed Hoffmann Madureira, Rubens Paes de Arruda, Pietro Sampaio Baruselli, Claudia Barbosa Fernandes, Claudio Alvarenga de Oliveira, Marcelo Alcindo de Barros Vaz Guimarães (*in memoriam*), Eneiva Carla Carvalho Celeghini, Mario Binelli, Ricardo José Garcia Pereira, Camila Infantsi Vannucchi, André Furugen Cesar de Andrade e Clair Motos de Oliveira, pelos ensinamentos em aulas e fora delas, conversas e momentos de descontração, que fazem deste departamento um ambiente agradável para se trabalhar.

A toda a equipe de funcionários do VRA, especialmente à Harumi Doi Shiraishi, Loide Her Cardoso Santos Sanson e Roberta Viana Ribeiro, pela seriedade, eficiência e compromisso no trabalho, tão necessário a nós, pós-graduandos.

À Universidade de São Paulo, a Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia e ao Departamento de Reprodução Animal (VRA), que possibilitaram o desenvolvimento do meu doutorado.

À In Vitro Brasil® e Andrea Basso pela parceria e fornecimento do banco de dados dos touros utilizados na PIVE.

À CAPES pela concessão da bolsa de doutorado e ao banco Santander pelo auxílio financeiro para o estágio na Ghent University - Bélgica.

RESUMO

BICUDO, L.C. **Caracterização das subpopulações e atributos espermáticos como método preditivo de desempenho na produção *in vitro* de embriões em bovinos.** [Characterization of subpopulations and spermatc features as a predictive method of performance in the in vitro production of embryos in cattle], 2018. 128f. Tese (Doutorado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2018.

A predição do desempenho de touros na produção *in vitro* de embriões (PIVE), pela avaliação seminal, não está plenamente estabelecida. Com este estudo, objetivou-se caracterizar as diferenças nos atributos espermáticos de touros com baixo e alto desempenho, baseado nas taxas de clivagem e de blastocisto, visando estabelecer métodos preditivos de maior eficiência na PIVE. A partir do histórico de três anos da empresa In Vitro Brasil®, foram selecionados touros que haviam resultado nas menores e maiores taxas de clivagem e de blastocisto, estabelecendo-se 4 grupos experimentais: baixa taxa de clivagem (BC, n=5), alta taxa de clivagem (AC, n=5), baixa taxa de blastocisto (BB, n=5) e alta taxa de blastocisto (AB, n=5). Foram adquiridas palhetas de sêmen congelado dos touros de cada grupo, nas quais foram avaliados, antes (Pré-Percoll®) e após centrifugação em gradiente de Percoll® (Pós-Percoll®), os atributos espermáticos: cinética, em sistema CASA; integridade de membranas plasmática e acrossomal (FITC-PSA/PI), potencial de membrana mitocondrial (JC-1), *status* oxidativo (DHE, CellROX™ green/PI, MitoSox red), apoptose (FITC-FMK-VAD/PI) e DNA (SCSA), por citometria de fluxo; morfologia; atividade mitocondrial (DAB); capacitação (CTC); teste funcional e TBARS induzido. Diferenças entre grupos (BC vs. AC e BB vs. AB) foram estimadas pelo teste t. Para todas as análises estatísticas foi considerado nível de significância de 5%. Na ausência de interações significativas, o efeito dos grupos foi analisado ao fundir os momentos Pré e Pós-Percoll®. Os grupos AC e AB apresentaram valores superiores de VAP, VCL, ALH e DNC e valores inferiores de BCF, STR, LIN e WOB, cinética indicativa de hiperativação. Adicionalmente, estes grupos apresentaram indícios de menor ocorrência de estresse oxidativo, evidenciados pelo percentual de espermatozoides com membrana lesada e estresse oxidativo (CellROX™ green/PI) no grupo AC e nível de DHE no grupo AB. Para os demais atributos estudados, não se obteve diferença entre os grupos. Por meio de análise de regressão logística multivariada, constatou-se que a taxa de clivagem sofre efeito de: VCL, BCF e

percentual de espermatozoides com integridade de membrana e sem estresse oxidativo; já a taxa de blastocisto, sofre efeito de: defeitos menores, VSL, DABIII e DHE, os quais foram incluídos nos respectivos modelos preditivos. As taxas obtidas com o modelo preditivo foram comparadas às taxas reais por análise de correlação de Pearson, que resultaram em intensidade moderada tanto para clivagem ($r=0,56$) quanto para blastocisto ($r=0,44$). Subpopulações espermáticas com diferentes perfis de cinética em CASA, foram determinadas em três etapas estatísticas segundo Núñez-Martínez et al. (2006). Foram detectadas 4 subpopulações: 1-Rápidos e progressivos; 2- Hiperativados; 3- Lentos e sinuosos; 4- Lentos e progressivos. Touro com alto desempenho (AC e AB) apresentaram maior percentual de subpopulação 2, Pré-Percoli[®], e das subpopulações 1 e 2, Pós-Percoli[®]. Com isto, demonstra-se ser possível diferenciar touros de baixo e alto desempenho na PIVE, pela avaliação dos atributos espermáticos, com o estabelecimento de modelos preditivos para as taxas de clivagem e de blastocisto. Ademais, o estudo das subpopulações espermáticas constitui-se no método mais efetivo para a predição do desempenho *in vitro*.

Palavras-chave: Fertilidade. Touro. Sêmen. CASA. PIVE.

ABSTRACT

BICUDO, L.C. **Characterization of subpopulations and spermatoc features as a predictive method of performance in the *in vitro* production of embryos in cattle.** [Caracterização das subpopulações e atributos espermáticos como método preditivo de desempenho na produção *in vitro* de embriões em bovinos], 2018. 128f. Tese (Doutorado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2018.

The prediction of bull performance on the *in vitro* production (IVP) of bovine embryos, by the seminal evaluation, is not fully established. Thus, the aim of this study was to characterize the differences in the sperm features of bulls with low and high performance, based on cleavage and blastocyst rates, in order to establish predictive methods for a greater efficiency in the IVP. Based on the results obtained in three years from the company In Vitro Brasil®, bulls were selected by the lowest and highest cleavage and blastocyst rates, establishing 4 experimental groups: low cleavage rate (BC, n=5), high cleavage rate (AC, n=5), low blastocyst rate (BB, n=5) and high blastocyst rate (AB, n=5). Frozen semen were obtained from the bulls of each group, in which were evaluated, before (Pre-Percoll®) and after Percoll® gradient centrifugation (Post-Percoll®), the sperm features: kinetics, in CASA; integrity of plasma and acrosomal membranes (FITC-PSA/PI), mitochondrial membrane potential (JC-1), oxidative status (DHE, CellROX™ green/PI, MitoSox red), apoptosis (FITC-FMK-VAD/PI) and DNA (SCSA), by flow cytometry; morphology; mitochondrial activity (DAB); capacitation (CTC); functional test and induced TBARS. Differences between groups (BC vs. AC and BB vs. AB) were estimated by t test. A significance level of 5% was considered for all statistical analysis. In the absence of significant interactions, the effect of the groups was analyzed by merging the moments Pre and Post-Percoll®. The AC and AB groups presented higher values of VAP, VCL, ALH and DNC and lower values of BCF, STR, LIN and WOB, kinetics indicative of hyperactivation. In addition, these groups showed less evidence of oxidative stress, observed by the percentage of spermatozoa with damaged membrane and oxidative stress (CellROX™ green/PI) in the AC group and level of DHE in the AB group. For the others sperm features, there was no difference between groups. By multivariate logistic regression analysis, it was verified that the cleavage rate is affected by: VSL, BCF and percentage of spermatozoa with membrane integrity and without oxidative stress; and the blastocyst rate, is

affected by: minor defects, VSL, DABIII and DHE, which were included in the respective predictive models. The rates obtained with the predictive model were compared to the real rates by Pearson correlation analysis, which resulted in moderate intensity for both cleavage ($r=0.56$) and blastocyst ($r=0.44$). Spermatic subpopulations with different kinetic profiles at CASA were determined in three statistical steps according to Núñez-Martínez et al. (2006). Four subpopulations were detected: 1-Fast and progressive; 2- Hyperactivated; 3- Slow and sinuous; 4- Slow and progressive. Bulls with high performance (AC and AB) presented higher percentage of subpopulation 2, Pre-Percoll®, and subpopulations 1 and 2, Post-Percoll®. In summary, it is possible to differentiate low and high-performance bulls at IVP by evaluating the sperm features, with the establishment of predictive models for the cleavage and blastocyst rates. Furthermore, the study of sperm subpopulations is the most effective method for predicting in vitro performance.

Keywords: Fertility. Bull. Semen. CASA. IVP.

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	14
2.	REVISÃO DE LITERATURA	16
2.1	Avaliação da qualidade seminal	16
2.2	Cinética e Subpopulações espermáticas	17
2.3	Morfologia espermática.....	20
2.4	Sondas fluorescentes e citometria de fluxo.....	23
2.5	Membrana plasmática.....	23
2.6	Capacitação espermática e reação acrossomal	24
2.7	Função mitocondrial e estresse oxidativo	27
2.8	Apoptose	29
2.9	Integridade de DNA	31
2.10	Teste funcional	33
2.11	Benefícios da avaliação associada de diferentes atributos espermáticos	34
2.12	Avaliação após seleção espermática	36
3.	HIPÓTESE	37
4.	OBJETIVOS	37
4.1	Objetivo Geral	38
4.2	Objetivos específicos	38
5.	MATERIAL E MÉTODOS	39
5.1	Delineamento experimental	39
5.1.1	Seleção dos Touroos	39
5.1.2	Preparação do sêmen	40
5.2	Metodologia para avaliação espermática	42
5.2.1	Cinética e subpopulações espermáticas	43
5.2.2.	Concentração espermática	45
5.2.3	Morfologia espermática	45
5.2.4	Atividade mitocondrial	45
5.2.5	Citometria de fluxo	46
5.2.5.1	Preparação do sêmen	46
5.2.5.2	Integridade de membranas plasmática e acrossomal	47
5.2.5.3	Potencial de membrana mitocondrial	47

5.2.5.4	Apoptose espermática	48
5.2.5.5	Estresse oxidativo	49
5.2.5.5.1	Dihidroetídio (DHE)	49
5.2.5.5.2	MitoSOX™ Red	49
5.2.5.5.3	CellROX™ green	50
5.2.5.6	Cromatina espermática	50
5.2.6	Capacitação espermática	51
5.2.7	Teste funcional de ligação em membrana perivitelínica	52
5.2.8	Resposta espermática à indução do estresse oxidativo	52
5.2.9	Análise estatística	53
6.	RESULTADOS	55
6.1	Comparação dos grupos para taxa de clivagem	55
6.2	Comparação dos grupos para taxa de blastocisto	61
6.3	Modelo preditivo para as taxas de clivagem e de blastocisto	67
6.4	Subpopulações espermáticas	70
7.	DISCUSSÃO	79
7.1	Cinética espermática	81
7.2	Capacitação	84
7.3	Membranas plasmática e acrossomal	86
7.4	Morfologia espermática	88
7.5	Estresse oxidativo	89
7.6	Apoptose e função mitocondrial	92
7.7	Cromatina espermática	93
7.8	Teste funcional	95
7.9	Modelo preditivo para as taxas de clivagem e de blastocisto	97
7.10	Subpopulações espermáticas	98
8.	CONCLUSÕES	101
9.	REFERÊNCIAS	103
	ANEXO A	124
	APÊNDICE A	125
	APÊNDICE B	127

1. INTRODUÇÃO

O desenvolvimento das biotecnologias da reprodução, como inseminação artificial, transferência e produção *in vitro* de embriões permitiu um grande avanço na multiplicação de animais e nos programas de melhoramento genético (ARRUDA et al., 2010; SARTORI et al., 2016).

Atualmente, o Brasil é o maior produtor de embriões bovinos obtidos por fecundação *in vitro*, atingindo produção superior a 300.000 embriões/ano desde 2010 (VIANA; FIGUEIREDO; SIQUEIRA, 2017). Apesar da produção encontrar-se em expansão, ainda existe um grande potencial de crescimento para esta biotécnica aumentar a produção e a produtividade dos rebanhos (SARTORI et al., 2016).

Com a adoção desta e de outras biotécnicas, a fertilidade do macho passou a ter um impacto ainda maior no desempenho reprodutivo dos rebanhos, devido à intensa utilização de um único reprodutor no acasalamento de diversas fêmeas (ARRUDA et al., 2010; KATHIRAVAN et al., 2011).

Uma vez que a influência do touro na produção *in vitro* de embriões (PIVE) já foi constatada (PALMA; SINOWATZ, 2004; ALOMAR et al., 2008; SH, 2014; UTT, 2016), a seleção prévia de reprodutores que resultam em altos índices é bastante vantajosa por se evitar dispêndios e aumentar a eficiência no processo produtivo (HOLT; O'BRIEN; ABAIGAR, 2007).

Apesar da avaliação da qualidade seminal poder ser utilizada como critério de identificação e seleção de reprodutores com desempenho superior, este objetivo ainda constitui um grande desafio por sofrer influência de diferentes fatores (GILLAN et al., 2008; UTT, 2016).

Primeiramente, pelo fato do espermatozoide ser uma célula altamente especializada e dotada de diferentes atributos para ser capaz de realizar a função de fecundar o oócito (GRAHAM; MOCÉ, 2005). Este tipo celular apresenta uma complexa morfologia, a exemplo dos diferentes tipos de membranas que o compõe, possui habilidade de se deslocar de forma ativa e de passar por diversos fenômenos biológicos de forma sequencial, ao final dos quais, propicia que o material genético nele contido, seja adequadamente pareado e fundido ao material genético do oócito, de forma a recompor o número diploide da espécie (GADELLA et al., 2001; GRAHAM; MOCÉ, 2005; MOCÉ; GRAHAM, 2008).

Adicionalmente, as pesquisas desenvolvidas ao longo de décadas, não investigam os mesmos atributos espermáticos, desta forma, não há consenso sobre quais destes, são de fato determinantes para se obter maior desempenho frente ao uso das biotécnicas da reprodução (JANUSKAUSKAS; JOHANNISSON; RODRIGUEZ-MARTINEZ, 2001; 2003; PHILLIPS et al., 2004; SELVARAJU et al., 2008; SHOJAEI et al., 2012).

Além disto, é possível que os atributos espermáticos necessários à fecundação *in vitro* sejam diferentes dos necessários para o evento *in vivo* (SCHNEIDER; ELLINGTON; WRIGHT, 1999). A despeito de ter sido relatado que o desempenho reprodutivo *in vitro* e *in vivo* são equivalentes (ZHANG et al., 1997; 1998; SUDANO et al., 2011), na atualidade, é bem estabelecido que bons resultados obtidos *in vitro* não asseguram resultados positivos a campo e vice-versa (VANDAELE et al., 2006; UTT, 2016; CASTRO et al., 2018). Esta discrepância pode ser justificada pelo fato de que mesmo que o sistema de produção *in vitro* tente mimetizar as condições de fecundação *in vivo*, esta técnica ainda não se aproxima das complexas interações que ocorrem entre os espermatozoides e o trato genital feminino (LARSSON; RODRIGUEZ-MARTINEZ, 2000).

Durante muitos anos, a avaliação da qualidade seminal foi constituída basicamente da determinação da motilidade, concentração e morfologia espermáticas com o uso de microscopia óptica (EVENSON, 1986). Embora estas avaliações ainda sejam de grande valia para a análise clínica de rotina, existem muitos outros fatores capazes de afetar a fertilidade e que são passíveis de serem avaliados por métodos mais sensíveis e eficientes (GRAHAM, 2001; HAMILTON et al., 2016).

Atualmente, faz-se o uso de técnicas mais avançadas para a avaliação espermática, como sondas fluorescentes associadas à citometria de fluxo e análise da cinética espermática em sistema computadorizado para o estudo de subpopulações (FERRAZ et al., 2014; BERGSTEIN-GALAN et al., 2017; VIEIRA et al., 2018), o que têm produzido resultados diferenciados por constituir uma inovadora metodologia de análise (OLIVEIRA et al., 2012; SELLEM et al., 2015).

Deste modo, o estudo de diversos atributos espermáticos, que abrangem diferentes funções celulares, associado à determinação do comportamento cinético das subpopulações espermáticas pode auxiliar no estabelecimento de parâmetros favoráveis para o sucesso da PIVE e, assim, possibilitar a instituição de um método preditivo do desempenho de touros para uso nesta biotécnica.

2. REVISÃO DE LITERATURA

A presente revisão de literatura visa discorrer sobre os principais atributos espermáticos necessários à fecundação, métodos pelos quais podem ser avaliados e respectiva influência no desempenho reprodutivo *in vivo* e *in vitro*.

2.1 Avaliação da qualidade seminal

A análise da qualidade do sêmen, além de ser utilizada como ferramenta para seleção de reprodutores e identificação de problemas reprodutivos, tem como um dos objetivos primordiais o estabelecimento da predição do potencial de fertilidade do reprodutor (GRAHAM; MOCÉ, 2005; DE ANDRADE et al., 2007; DEL OLMO et al., 2013). Tal análise é fundamental frente a utilização da amostra seminal em biotécnicas da reprodução, que visam o aproveitamento intensivo de animais com características desejáveis, maximizando o número de seus descendentes (AMANN; HAMMERSTEDT, 1993).

Apesar de décadas de estudo e de grandes avanços no conhecimento da biologia reprodutiva do macho, a adoção de métodos preditivos de fertilidade não é ainda plenamente satisfatória, provavelmente devido à grande complexidade da célula espermática, que requer diferentes atributos para ser capaz de fecundar o oócito (GRAHAM, 2001; GRAHAM; MOCÉ, 2005) e da possibilidade de existirem atributos necessários para a fecundação que ainda não são conhecidos (GRAHAM; MOCÉ, 2005; SELLEM et al., 2015).

Embora a avaliação *in vitro* da qualidade seminal seja empregada há mais de um século, sendo incorporados, progressivamente, métodos cada vez mais complexos, nenhum deles isoladamente fornece resultados consistentes relacionados à fertilidade (GRAHAM; MOCÉ, 2005; MOCÉ; GRAHAM, 2008; FREITAS-DELL'AQUA et al., 2009; PUGLISI et al., 2012).

A avaliação de apenas um atributo espermático pode indicar se uma amostra seminal apresentará baixa habilidade fecundante, porém, não é capaz de determinar se esta amostra resultará em índices satisfatórios de fertilidade (GRAHAM, 2001;

GRAHAM; MOCÉ, 2005). Porém, a associação de métodos que avaliam diferentes atributos espermáticos, pode estimar o potencial fecundante de uma amostra seminal com maior acuidade (GARNER et al., 1986; GRAHAM; KUNZE; HAMMERSTEDT, 1990; CELEGHINI et al., 2007; MOCÉ; GRAHAM, 2008).

2.2. Cinética e Subpopulações espermáticas

A motilidade é considerada como um dos atributos espermáticos mais importantes para a qualidade seminal, pois reflete a viabilidade e integridade estrutural da célula espermática (KATHIRAVAN et al., 2011).

Apesar de amplamente utilizada, a motilidade espermática avaliada microscopicamente de forma visual não é suficiente para prever o potencial de fecundidade, pois apresenta efetividade contraditória a campo (CORREA; PACE; ZAVOS, 1997). Além de ser considerada uma análise subjetiva e não possibilitar a definição de diferentes padrões de cinética, esta avaliação representa apenas um dos muitos atributos necessários à função espermática (GRAHAM, 2001; KATHIRAVAN et al., 2011).

A avaliação da motilidade pelo sistema computadorizado de análise de sêmen (CASA) traz benefícios, se comparada à microscopia óptica, por permitir a constatação objetiva de diversos parâmetros relacionados à cinética espermática de forma mais acurada e precisa (VERSTEGEN; IGUER-OUADA; ONCLIN, 2002; AMANN; KATZ, 2004).

Os parâmetros de cinética espermática detectados pelo CASA são obtidos matematicamente com o objetivo de descrever o movimento de cada espermatozoide que atravessa o campo microscópico, dentre eles se destacam: as motilidades total e progressiva, velocidade de trajeto (VAP), velocidade progressiva (VSL), velocidade curvilínea (VCL), amplitude de deslocamento lateral de cabeça (ALH), frequência de batimentos do flagelo (BCF), retilinearidade (STR), linearidade (LIN) e as categorias de espermatozoides rápidos, médios, lentos e estáticos (MORTIMER, 1997; VERSTEGEN; IGUER-OUADA; ONCLIN, 2002; KATHIRAVAN et al., 2011).

Por meio deste sistema de avaliação pode-se identificar, por exemplo, espermatozoides com cinética característica de hiperativação (YÁNIZ et al., 2018),

que em touros é caracterizada pela alta velocidade e percurso errático, detectados pelo aumento nos parâmetros de VCL e do ALH, e diminuição da LIN (VERSTEGEN; IGUER-OUADA; ONCLIN, 2002; SHOJAEI et al., 2012). A mensuração objetiva de espermatozoides que apresentam este padrão de cinética pode ser utilizada como marcador biológico para se avaliar a capacidade funcional destas células, uma vez que espermatozoides que apresentam, precocemente, movimento característico de hiperativação, perdem viabilidade antes do momento da fecundação (KATHIRAVAN et al., 2011).

Ainda com a utilização do CASA, torna-se possível a avaliação das características de cinética espermática de maneira individual, o que permite a identificação de subpopulações espermáticas que possuem características similares (AMANN; KATZ, 2004; NÚÑEZ-MARTÍNEZ; MORAN; PEÑA, 2006; KATHIRAVAN et al., 2011; MAROTO-MORALES et al., 2012; AMANN; WABERSKI, 2014; BERGSTEIN-GALAN et al., 2017).

A existência de subpopulações pode ser atribuída às diferenças na origem e na produção individual de espermatozoides, assim como pela diferença no *status* de maturação e idade dos espermatozoides quando se misturam no epidídimo e, subsequentemente, no ejaculado, refletindo em diferentes padrões de movimento (KATHIRAVAN et al., 2011).

Assim, ao se levar em consideração as subpopulações que coexistem numa amostra seminal, ganham-se informações relevantes a respeito da diversidade funcional dos grupos de espermatozoides (NÚÑEZ-MARTÍNEZ; MORAN; PEÑA, 2006; O'MEARA et al., 2008; YÁNIZ et al., 2018), proporcionando uma avaliação mais fidedigna do que a análise que utiliza valores de média (AMANN; WABERSKI, 2014).

Por meio de diferentes estudos demonstra-se a influência das subpopulações espermáticas no desempenho reprodutivo. Del Olmo et al. (2013) relataram que, na espécie ovina, a determinação das subpopulações espermática pelo CASA pode ser útil para identificar amostras de sêmen congelado que, quando utilizados em inseminação artificial, resultam em maiores taxas de nascimento de cordeiros. Já na espécie equina, Quintero-Moreno et al. (2003) observaram que nos ejaculados que resultaram em maior taxa de prenhez, a maioria dos espermatozoides móveis pertenciam à subpopulação com maior motilidade progressiva e baixa linearidade.

A determinação das subpopulações espermáticas também permite constatar sua influência sobre os resultados da PIVE, pois Ferraz et al. (2014) observaram que

o percentual de espermatozoides pertencentes à subpopulação com motilidade rápida e progressiva correlacionou positivamente com a penetração em zona pelúcida e formação de pró-núcleo, *in vitro*. Porém, ainda carecem informações do quanto as subpopulações espermáticas interferem nas taxas de clivagem e de blastocisto.

Além da detecção da diferença no padrão de movimento, tem-se observado que as subpopulações espermáticas não respondem de maneira similar aos processos de criopreservação e à exposição aos agentes capacitantes (PÉREZ et al., 1997; BUFFONE et al., 2004; NÚÑEZ-MARTÍNEZ; MORAN; PEÑA, 2006).

Muiño et al. (2008) observaram que a criopreservação não alterou a proporção de espermatozoides pertencentes à subpopulação com motilidade rápida e progressiva, assim, aqueles animais que possuíam maior percentual de espermatozoides nesta subpopulação antes da congelação, apresentaram maior criotolerância e maior longevidade do sêmen após a descongelação, justificando a existência de animais com alto e baixo potencial de congelabilidade espermática.

Pérez et al. (1997) consideraram que as subpopulações espermáticas se comportam de maneira distinta frente ao processo de capacitação. A hipótese destes autores é a de que alguns espermatozoides capacitam precocemente por possuírem menores quantidades de fatores decapitantes ou por perdê-los com maior facilidade, apesar de não ter sido estudado este efeito na fertilidade.

Assim, este tipo de análise possui um amplo leque de aplicação, permitindo a realização de diversos estudos relacionados ao comportamento de amostras seminais frente a diferentes tratamentos ou procedimentos, nos quais muito dos efeitos ainda são desconhecidos (MUIÑO et al., 2008; KATHIRAVAN et al., 2011; AMANN; WABERSKI, 2014). Possibilita também, ajustar a dose inseminante para touros altamente requisitados, estabelecendo-se um mínimo necessário de espermatozoides requerido para inseminação artificial, visando máximo aproveitamento (MUIÑO et al., 2008) e ainda evidenciar diferenças entre grupos experimentais, entre diferentes tratamentos ou mesmo utilizar na previsão do desempenho reprodutivo (VERSTEGEN; IGUER-OUADA; ONCLIN, 2002; KATHIRAVAN et al., 2011).

2.3 Morfologia espermática

A importância da avaliação da morfologia espermática é consagrada desde os primórdios da análise da qualidade seminal (LAGERLÖF, 1934; WILLIAMS; SAVAGE, 1964) e valorizada até a atualidade devido à grande influência nos índices reprodutivos (SÖDERQUIST et al., 1991; SCHNEIDER; ELLINGTON; WRIGHT, 1999; AMANN; SEIDEL; MORTIMER, 2000).

Em diversos estudos é apontada a existência de correlação positiva entre o percentual de espermatozoides normais e a fertilidade, avaliada pela taxa de não-retorno ao cio (AL-MAKHZOOMI et al., 2008) e taxa de ocorrência de parto (ATTIA; KATILA; ANDERSSON, 2016) nos processos de reprodução *in vivo* e pela formação de pró-núcleo (TANGHE et al., 2002) e desenvolvimento embrionário *in vitro* (WALTERS et al., 2005a). Além disto, Odhiambo et al. (2014) observaram que a remoção de espermatozoides defeituosos utilizando técnicas de nano-partículas revestidas com anticorpos contra ubiquitina, aumentou a viabilidade da amostra seminal e a taxa de fecundação *in vitro*.

Deste modo, a morfologia espermática pode ser utilizada como critério de seleção de reprodutores, nos quais touros que possuam grande número de espermatozoides defeituosos, devido à grande possibilidade de apresentarem baixos resultados ou falhas na reprodução, devam ser excluídos (JANUŠKAUSKAS; ŽILINSKAS; SÖDERQUIST et al., 1991; WALTERS et al., 2005a). Porém, deve-se ressaltar que em uma população de touros que apresentem baixos valores de anormalidades espermáticas, a diferenciação entre reprodutores de alto e baixo desempenho reprodutivo pode não ser possível (JANUŠKAUSKAS; ŽILINSKAS, 2002).

Os defeitos espermáticos podem ser decorrentes de diversas causas como anormalidades na espermatogênese, intrínseca do reprodutor ou da inadequação ambiental (WALTERS et al., 2005a), de caráter genético (CRAN; DOTT, 1976; CHENOWETH, 2005), relacionadas à idade avançada do reprodutor (AL-MAKHZOOMI et al., 2008), ou ainda iatrogênico, na inadequada manipulação do sêmen (LAGERLOF, 1936).

Ao longo do tempo, surgiram diferentes sistemas de classificação que agrupam as alterações morfológicas e permitem interpretações prognóstica da eficiência

reprodutiva dos machos. Blom (1950) propôs classificação agrupando as alterações em defeitos primários, originadas durante a espermatogênese, defeitos secundários, formados durante a maturação espermática nas vias extra-testiculares e defeitos terciários, com origem após a ejaculação.

Entretanto, após estudo de Rao (1971) sobre as alterações espermáticas que ocorrem durante a passagem pelo trato reprodutivo, Blom (1972) reformulou estes conceitos e propôs nova classificação, na qual as alterações são agrupadas em defeitos maiores, com reconhecido prejuízo à fertilidade e defeitos menores, cujos efeitos deletérios à fertilidade são percebidos quando estão com prevalência muito mais elevada em relação aos anteriores.

A exemplo da gota protoplasmática distal que mesmo em altas proporções não resulta em queda no desempenho reprodutivo, enquanto a presença de espermatozoides com gota proximal leva à diminuição na taxa de não retorno ao cio (AL-MAKHZOOMI et al., 2008) e também à diminuição da taxa de clivagem na PIVE (AMANN; SEIDEL; MORTIMER, 2000), devido a relação entre este defeito e a imaturidade espermática (AL-MAKHZOOMI et al., 2008).

Já os defeitos de cabeça, principalmente formato piriforme, possuem impacto negativo nas taxas de clivagem e de blastocisto na PIVE (WALTERS et al., 2005a) e na taxa de não-retorno ao cio (SÖDERQUIST et al., 1991; AL-MAKHZOOMI et al., 2008) por estarem relacionados a danos na cromatina espermática (WALTERS et al., 2005a; WALTERS et al., 2006).

No Brasil, esta classificação das alterações espermáticas de BLOM (1972) tem sido amplamente adotada na avaliação andrológica de touros e como referencial em diversos trabalhos científicos (CASAGRANDE et al., 1979; VALE FILHO et al., 1997; CBRA, 1998; NICHI et al., 2006; ARRUDA et al., 2011; CBRA, 2013).

Saacke et al. (1998) demonstraram que espermatozoides com severas anormalidades no formato de cabeça não participam do conjunto de espermatozoides acessórios. Destes achados se formulou um novo conceito morfofuncional, no qual tanto a viabilidade quanto a morfologia espermática são importantes para a fecundação, uma vez que alterações em qualquer uma delas resultam na exclusão total ou parcial dessas células nas diversas barreiras do trato genital feminino.

Assim, Saacke (2008) propõe que na reprodução *in vivo* as características seminais podem ser consideradas compensáveis ou não compensáveis. Aquelas que são importantes para o transporte e função dos espermatozoides no trato reprodutivo

feminino até, e inclusive, o início do processo de fecundação e do bloqueio da polispermia são as características compensáveis. Na inseminação artificial, o aumento da concentração espermática na dose inseminante, compensa os efeitos negativos das anormalidades compensáveis, justificando a sua denominação (DEN DAAS et al., 1998).

Saacke (2008), define ainda que as características seminais não compensáveis, estão relacionadas às alterações da cromatina que podem estar presentes em espermatozoides com aparência morfológica normal. Entretanto, devido a sua acessibilidade ao oócito, são capazes de fecundar, resultando em embrião com qualidade alterada e atrasos na formação do pró-núcleo masculino, com consequente atraso na clivagem e no desenvolvimento embrionário.

Na rotina laboratorial, a morfologia espermática é determinada pela avaliação individualizada das células por meio de confecção de esfregaço da amostra seminal em lâmina histológica, submetido à colorações como Wright, Rosa Bengala e Karras e avaliado em microscopia óptica (ARRUDA et al., 2011). Podem ainda ser empregados métodos de preparação úmida na qual a amostra de sêmen é fixada em sistemas tampão formolizados ou contendo glutaraldeído, colocado entre lâmina e lamínula histológicas e realizada a leitura em microscopia de contraste de fase ou de contraste de interferência diferencial (DE ARRUDA et al.; WALTERS et al., 2005b).

O uso das microscopias eletrônica, de transmissão ou de varredura também constituem em métodos para se compreender a real extensão das alterações morfológicas das células espermáticas, bem como determinar qual estrutura constitucional encontra-se alterada morfolologicamente (BARTH; OKO, 1989).

Apesar da facilidade em se avaliar a morfologia espermática em microscopia (SAILER; JOST; EVENSON, 1996), o uso da morfometria espermática pelo sistema computadorizado (ASMA) permite uma avaliação mais avançada (BOERSMA; RASSHOFER; STOLLA, 2001). Entretanto, ainda é necessário o estabelecimento de padrões no preparo das amostras e no método de análise para poderem ser estipulados parâmetros de normalidade e assim tornar esta avaliação mais objetiva (SAILER; JOST; EVENSON, 1996; BOERSMA; RASSHOFER; STOLLA, 2001).

2.4 Sondas fluorescentes e citometria de fluxo

O conhecimento sobre as diversas sondas fluorescentes e de componentes conjugados a estas permitiu análises mais amplas dos atributos espermáticos (GILLAN; EVANS; MAXWELL, 2005). A leitura realizada por meio de citometria de fluxo tornou a avaliação mais precisa, prática e com maior repetibilidade, uma vez que possibilita a análise de milhares de células em um curto espaço de tempo, retirando a subjetividade existente na observação sob microscopia de epifluorescência (GARNER et al., 1986; GRAHAM; KUNZE; HAMMERSTEDT, 1990; COSSARIZZA et al., 1993; GRAHAM, 2001; LO; BRINKMAN; GOTTARDO, 2008).

Apesar das vantagens, este tipo de análise tem como fator limitante a avaliação da média da população para cada atributo, sendo que a combinação de dois ou três diferentes ensaios na mesma população espermática, não permite determinar o verdadeiro número de espermatozoides aptos à fecundação em uma população da amostra de sêmen (GRAHAM; MOCÉ, 2005).

De maneira ideal, acredita-se que para se obter uma previsibilidade real da capacidade fecundante, devam ser desenvolvidos métodos de análise objetiva e que avaliem múltiplos atributos espermáticos simultaneamente e de maneira individual, apesar da citometria de fluxo auxiliar neste desenvolvimento, grandes avanços ainda são necessários (GRAHAM, 2001; SELLEM et al., 2015).

2.5 Membrana plasmática

A membrana plasmática do espermatozoide, assim como a de todas as células em mamíferos, é composta por uma bicamada fosfolipídica com proteínas integradas, glicoproteínas e glicolipídios anexados a superfície dispostas em um mosaico fluido (SINGER; NICOLSON, 1972). Os fosfolipídios diferem na composição da bicamada, por exemplo, a fosfatidilserina e a fosfatidiletanolamina estão concentradas no folheto interno e a esfingomielinina e a fosfatidilcolina são encontradas no folheto externo (GADELLA et al., 1999).

A membrana plasmática tem importante papel em diversos eventos fisiológicos da função espermática, sendo responsável pela preservação da homeostase celular (DE ANDRADE et al., 2007), participando dos processos de capacitação (HALLAP et al., 2006), da apoptose celular (DURU et al., 2001; MARTIN et al., 2004) e da fecundação, ao interagir com epitélio do trato reprodutivo feminino e com as células do complexo *cumulus oophorus* (HOSSAIN et al., 2011).

Juntamente com a motilidade, a avaliação da integridade de membrana plasmática é considerada como reflexo da viabilidade celular, por estar envolvida diretamente com a capacidade fecundante do espermatozoide (HALLAP et al., 2006; NARESH; ATREJA, 2015).

Estudos das alterações existentes na membrana têm contribuído para um avanço significativo na compreensão da função dessas células (GILLAN; EVANS; MAXWELL, 2005; CELEGHINI et al., 2007; SIMÕES et al., 2013), assim como na determinação dos efeitos negativos da criopreservação neste compartimento celular (COLLIN et al., 2000).

A avaliação da integridade de membrana plasmática pode ser realizada com o uso de sondas fluorescentes impermeáveis a membrana íntegra, mas que na presença de lesões, adentram a célula e se ligam ao DNA, permitindo a identificação de espermatozoides com alterações (PEÑA; JOHANNISSON; WALLGREN, 2003), a exemplo do iodeto de proprídeo (PI), Yo-Pro-1, homodímero de etídio-1 (EthD-1) e Hoechst 33258 (GILLAN; EVANS; MAXWELL, 2005).

2.6 Capacitação espermática e reação acrossomal

Na ejaculação, os espermatozoides dos mamíferos ainda não possuem habilidade fecundante (MORTIMER, 2000). Para serem capazes de fecundar o oócito, os espermatozoides devem passar pelo processo de capacitação, que *in vivo* ocorre fisiologicamente ao entrarem em contato com o trato reprodutor feminino (JAGAN MOHANARAO; ATREJA, 2011), principalmente no oviduto (HOLT; FAZELI, 2010) e *in vitro* é induzida pelo uso de diferentes agentes (LANDIM-ALVARENGA et al., 2001; ASSUMPÇÃO et al., 2002; KARUNAKARAN; DEVANATHAN, 2017).

Ademais, o processo de criopreservação leva, em muitos espermatozoides, a alterações moleculares semelhantes às aquelas que ocorrem na capacitação, evento conhecido como criocapacitação (PÉREZ-PÉ et al., 2002; PONS-REJRAJI; BAILEY; LECLERC, 2009). As células alteradas pelo processo de criopreservação e que apresentam capacitação prematura têm prejuízos em sua capacidade fecundante por diminuição de sua longevidade (PÉREZ-PÉ et al., 2002; POMMER; RUTLLANT; MEYERS, 2003; GADELLA, 2008).

As vias de sinalização que caracterizam a capacitação espermática ainda não são completamente elucidadas (AITKEN, 2017), porém um conjunto das complexas modificações moleculares, bioquímicas e morfológicas que ocorrem neste processo, já é conhecido (GALANTINO-HOMER; VISCONTI; KOPF, 1997; POMMER; RUTLLANT; MEYERS, 2003; MURATORI et al., 2004; BREITBART et al., 2010).

Um dos primeiros eventos é a aquisição de motilidade hiperativada, caracterizada por movimento vigoroso, não-progressivo e não-linear, que é indicativa de capacitação espermática e responsável pela promoção de um forte poder de propulsão para o espermatozoide transpassar os envoltórios do oócito, particularmente, a zona pelúcida (VERSTEGEN; IGUER-OUADA; ONCLIN, 2002; KATHIRAVAN et al., 2011).

Durante a capacitação, ocorre produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) que levam à produção de oxisterol, o qual facilita a remoção de colesterol da membrana plasmática, aumentando sua fluidez e a permeabilidade ao cálcio (KARUNAKARAN; DEVANATHAN, 2017). Com a alteração da composição, ocorre a apresentação de complexos receptores de zona na superfície espermática, inibição da tirosina fosfatase e aumento da produção de AMPc (AITKEN, 2011; AITKEN; BAKER, 2013).

Diversas técnicas têm sido utilizadas a fim de se avaliar a capacitação espermática e devido à complexidade deste fenômeno, estas técnicas avaliam diferentes estágios deste processo.

A sonda fluorescente Merocianina 540 (M540) se intercala à membrana quando há desordenamento dos lipídios, resultando em aumento da intensidade do padrão de fluorescência (GADELLA et al., 2001; HALLAP et al., 2006). Acredita-se que alterações na fluidez de membrana detectadas pela M540 preceda o influxo de cálcio, fazendo desta sonda o método mais adequado para avaliar eventos precoces da capacitação (RATHI et al., 2001; GILLAN; EVANS; MAXWELL, 2005; BERGSTEIN-

GALAN et al., 2017). Esta sonda também pode ser associada à sonda Yo-Pro1, que é impermeável à membrana plasmática íntegra e se liga ao DNA, quando a permeabilidade está alterada, permitindo avaliar em conjunto a integridade da membrana plasmática celular (HALLAP et al., 2006; O'MEARA et al., 2008).

Outro evento precoce relacionado à capacitação espermática, o efluxo de colesterol, pode ser avaliado em microscopia de fluorescência ou espectrofotometria de luminescência com o uso do antibiótico polieno macrolídeo Fillipin (FLESCH et al., 2001; MACÍAS-GARCÍA et al., 2015). Este se liga especificamente ao colesterol emitindo fluorescência azul sob incidência de luz ultravioleta (MACÍAS-GARCÍA et al., 2015).

Já a clortetraciclina (CTC) é um antibiótico de fluorescência amarela utilizado para a detecção do influxo de cálcio (KURODA; FUKUSHIMA; HARAYAMA, 2007), evento tardio da capacitação espermática (RODRIGUEZ-MARTINEZ, 2001). Esta sonda se liga aos compartimentos celulares que contêm altas concentrações de Ca^{2+} , gerando três padrões diferentes de fluorescência, que possibilitam a diferenciação de espermatozoides capacitados, não capacitados e com acrossomo reagido (KARUNAKARAN; DEVANATHAN, 2017).

A detecção da fosforilação da proteína tirosina associada a cauda espermática também é utilizada como um biomarcador relativo à capacitação (JAGAN MOHANARAO; ATREJA, 2011) e pode ser avaliada pelo método de imunofluorescência avaliada em microscopia (LEEMANS et al., 2014).

Como a capacitação não ocorre de forma simultânea em todos os espermatozoides, é necessário que ao chegar próximo ao oócito, se tenha um conjunto de espermatozoides aptos para fecundação por um período mais prolongado (HOLT; FAZELI, 2010). A importância da avaliação da capacitação, principalmente no sêmen descongelado é determinar a proporção de espermatozoides que apresente estas alterações prematuramente, que consequentemente apresentam reflexos negativos sobre a vida-útil da célula e potencialmente sobre a fecundação (HALLAP et al., 2006).

Subsequentemente à ligação do espermatozoide capacitado à zona pelúcida, ocorre a reação acrossomal, processo de exocitose de enzimas acrossomais imprescindível para a penetração do espermatozoide no oócito (BREITBART; RUBINSTEIN; ETKOVITZ, 2006; WITTE; SCHÄFER-SOMI, 2007). Neste processo, estão envolvidas a ativação de uma cascata de proteínas quinase, como a proteína

quinase A, C e tirosina quinase (PTK), além de EROs (O'FLAHERTY et al., 2005; BREITBART; RUBINSTEIN; ETKOVITZ, 2006).

Apesar da motilidade hiperativada e a reação acrossomal serem eventos independentes, ambas envolvem alterações no cálcio intracelular, que aparentemente ocorrem devido a alterações no controle do influxo de íons pela membrana plasmática (HARRISON, 1996).

A integridade de membrana acrossomal é essencial para que o espermatozoide seja capaz de sofrer as alterações relacionadas à capacitação e realize a reação acrossomal somente no momento necessário para fecundar o oócito (GRAHAM; MOCÉ, 2005; DE ANDRADE et al., 2007), permitindo os processos subsequentes de adesão e fusão de membranas (GADELLA et al., 2001; GRAHAM; MOCÉ, 2005).

Os marcadores de lecitina, como a aglutinina de *Pisum sativum* (PSA) se ligam aos glicanos expostos por remodelamento da membrana acrossomal, que ocorre na capacitação prematura, reação acrossomal ou por lesão de acrossomo (ROVEGNO et al., 2013; ODHIAMBO et al., 2014). Assim, o PSA quando conjugada ao isotiocionato fluoresceína (FITC) é utilizado com o objetivo de se verificar a integridade acrossomal, uma vez que a fluorescência verde amarelada evidencia lesão de acrossomo (CELEGHINI et al., 2007; ROVEGNO et al., 2013; ODHIAMBO et al., 2014).

2.7 Função mitocondrial e estresse oxidativo

A mitocôndria é a principal organela responsável pelo metabolismo celular, atuando na homeostase de Ca^{2+} , na regulação osmótica e na modulação do estado redutivo (ORTEGA-FERRUSOLA et al., 2008). Além disto, sua atividade gera energia através da produção de ATP, a qual é essencial à movimentação espermática por meio do batimento flagelar (GRAVANCE et al., 2000; SCHOBER et al., 2007).

A avaliação do potencial de membrana mitocondrial reflete a capacidade desta organela em bombear prótons da matriz mitocondrial para o espaço inter-membranas, gerando um gradiente eletroquímico (CHEN, 1988; SARASTE, 1999). Em espermatozoides, o potencial de membrana mitocondrial pode ser avaliado pela utilização da sonda fluorescente 5,5',6-6'-Tetrachloro-1,1',3,3'-

Tetraethylbenzimidazolcarbocyanine iodide (JC-1), com vantagens, se comparada aos fluoróforos utilizados anteriormente, como a Rodamina 123 e Mito Tracker Green FM, por permitir a distinção entre alto e baixo potencial de membrana e por não produzir ligação inespecífica na célula espermática (GARNER et al., 1997; GRAVANCE et al., 2000; CELEGHINI et al., 2007).

Já a atividade mitocondrial é a eficiência do transporte de elétrons entre os complexos enzimáticos, como ocorre nas reações de oxidação durante a fosforilação oxidativa (TERADA, 1990), que pode ser avaliada pelo ensaio citoquímico baseado na oxidação da 3'3 diaminobenzidina (DAB) pelo citocromo c (HRUDKA, 1987).

Estas avaliações são relevantes por apresentarem relação direta com a motilidade (GARNER et al., 1997) e principalmente por interferirem no desempenho reprodutivo (TROIANO et al., 1998), principalmente em amostras que passaram pelo processo de criopreservação, o qual aumenta a proporção de espermatozoides com baixo potencial de membrana mitocondrial (MARTIN et al., 2004; ALVAREZ-RODRIGUEZ; VICENTE-CARRILLO; RODRIGUEZ-MARTINEZ, 2017).

A mitocôndria também é o principal sítio de formação de EROs intracelular, devido a liberação de elétrons durante a fosforilação oxidativa (AITKEN et al., 2012; KIM; AGCA; AGCA, 2013).

Embora as EROs sejam essenciais para o desempenho de diversos processos fisiológicos, como a capacitação espermática e reação acrossomal (O'FLAHERTY; BEORLEGUI; BECONI, 1999; O'FLAHERTY et al., 2005), estes metabólitos podem rapidamente superar o limite das defesas antioxidantes presentes no espermatozoide e no plasma seminal, levando a um estado de estresse oxidativo (AITKEN et al., 2012).

Uma vez estabelecido o estresse oxidativo, não há reversão, isto se deve a limitada capacidade das células se auto-repararem e ao estabelecimento de um *feed back* positivo, no qual os produtos da peroxidação lipídica estimulam a produção de mais radicais livres mitocondriais (AITKEN et al., 2012).

Esta condição estressante traz grandes prejuízos a função espermática por levar à peroxidação de ácidos graxos dos fosfolipídios da membrana, degradação do DNA e até mesmo apoptose celular (MORTIMER, 2000; ANZAR et al., 2002; AITKEN et al., 2006; ORTEGA-FERRUSOLA et al., 2008), podendo ser causa de infertilidade (AITKEN et al., 2012; AITKEN, 2017).

Além disto, atualmente, tem-se o conhecimento de que espermatozoides morfologicamente defeituosos liberam espécies reativas de oxigênio, propiciando um

ambiente de estresse oxidativo que prejudica o desempenho dos espermatozoides morfologicamente normais (AITKEN et al., 2006; ZINI; SIGMAN, 2009; KOPPERS; GARG; AITKEN, 2010; ODHIAMBO et al., 2014).

Pelo fato do estresse oxidativo afetar negativamente a qualidade do sêmen, a avaliação deste estado metabólico em diferentes compartimentos espermáticos, torna-se relevante (AITKEN et al., 2012).

De maneira não específica, a detecção do estresse oxidativo em células vivas pode ser realizada com o uso da sonda fluorescente CellROX™ green, que se liga ao DNA e emite fluorescência verde na presença de radicais livres (SOLLINGER et al., 2013). Com a leitura em citometria de fluxo, esta sonda possui alta sensibilidade, inclusive em amostras criopreservadas de sêmen de touro (DE CASTRO et al., 2015).

Já a detecção específica de alguns EROs, como ânion superóxido, pode ser feita com o uso do dihidroetídio (DHE) (AITKEN et al., 2012). O DHE é um produto da redução de dois elétrons do etídio de baixa fluorescência, que na oxidação se liga ao DNA produzindo fluorescência vermelha de alta intensidade, quando excitada a 510nm (AITKEN et al., 2006).

Ademais, uma vez que o ânion superóxido é a principal EROs produzida pela mitocôndria (GOMES; FERNANDES; LIMA, 2005), é relevante a detecção específica de ânion superóxido mitocondrial, a qual pode ser realizada com o uso da MitoSOX™ Red (AITKEN et al., 2012). Este é um agente que penetra em células vivas e se localiza seletivamente na mitocôndria, uma vez neste local, esta sonda é oxidada por ânion superóxido, gerando uma fluorescência vermelha (KOPPERS; GARG; AITKEN, 2010).

2.8 Apoptose

Necrose e apoptose são duas formas de morte celular, enquanto a necrose é um processo patológico que afeta um grande número de células por causar ruptura de membrana e extravasamento do conteúdo celular, a apoptose é a morte celular programada fisiologicamente, que afeta individualmente cada célula sem provocar resposta inflamatória (ANZAR et al., 2002).

A apoptose é um fenômeno complexo caracterizado por um conjunto de eventos que alteram a ultraestrutura e a bioquímica celular (ANZAR et al., 2002; ORTEGA-FERRUSOLA et al., 2008). Em espermatozoides, a cascata da apoptose pode ser desencadeada por estresse oxidativo e peroxidação lipídica, o que leva à produção de maior quantidade de EROs mitocondriais em um ciclo de oxirredução que se auto-alimenta (AITKEN; BAKER, 2013).

Após a indução da apoptose, os poros mitocondriais são abertos, levando a diminuição do potencial de membrana mitocondrial com consequente perda da motilidade espermática (ORTEGA-FERRUSOLA et al., 2008; AITKEN; BAKER, 2013). Em seguida, ocorre a ativação de caspases, aumento da permeabilidade e externalização da fosfatidilserina na membrana plasmática (PEÑA; JOHANNISSON; WALLGREN, 2003; ORTEGA-FERRUSOLA et al., 2008; AITKEN; BAKER, 2013). Por fim, ocorrem danos oxidativos no DNA e consequente morte celular (MARTIN et al., 2004; AITKEN, 2011; AITKEN; BAKER, 2013).

Entretanto, a ocorrência real da apoptose em espermatozoides é particularizada por alguns autores, que nomeiam este conjunto de alteração de “eventos semelhantes à apoptose” pelo fato de não ocorrer a fragmentação do DNA por endonucleases logo após o dano oxidativo, como ocorre em células somáticas (MARTIN et al., 2004; AITKEN; BAKER, 2013; SANTIAGO-MORENO et al., 2013).

A apoptose ocorre de maneira fisiológica e com distintas finalidades: prevenir a superproliferação espermática nos testículos, uma vez que a espermatogênese é um processo contínuo (ANZAR et al., 2002); eliminar células com defeitos morfológicos de forma seletiva (ZINI; SIGMAN, 2009); interromper a função celular de espermatozoides que sofreram estresse oxidativo e carregam DNA danificado pela oxidação (AITKEN; BAKER, 2013); induzir a morte de espermatozoides capacitados que não participaram do processo de fecundação (AITKEN, 2011).

Nos testículos, os espermatozoides que sofreram apoptose são removidos de forma eficiente e silenciosamente por fagocitose pelas células de Sertoli, por meio do reconhecimento de marcadores de superfície, como a fosfatidilserina, gerada durante a cascata de apoptose (ORTEGA-FERRUSOLA et al., 2008; AITKEN; BAKER, 2013).

Porém, a presença de um elevado número de espermatozoides apoptóticos no sêmen, advindos da falha na remoção destas células nos testículos (ANZAR et al., 2002), do estresse oxidativo, da peroxidação lipídica (AITKEN; BAKER, 2013) ou ainda consequente ao processo de criopreservação (MARTIN et al., 2004;

SANTIAGO-MORENO et al., 2013), configuram a presença de células espermáticas anormais e pode ter como consequência a redução do desempenho reprodutivo (ANZAR et al., 2002; SAID et al., 2004).

A Anexina-V possui alta afinidade pela fosfatidilserina (ANZAR et al., 2002) e é capaz de detectar a translocação deste fosfolípido do folheto interno para o folheto externo da membrana plasmática (DURU et al., 2001), que é um dos eventos iniciais da apoptose (AITKEN; BAKER, 2013).

No entanto, deve-se considerar que devido ao fato do processo de criopreservação e de capacitação também induzirem a translocação de fosfatidilserina (DURU et al., 2001; ANZAR et al., 2002; MURATORI et al., 2004), o uso da Anexina-V proporciona uma avaliação menos precisa do estudo da apoptose, principalmente no sêmen congelado (ANZAR et al., 2002; MARTIN et al., 2004).

Assim como em células somáticas, nos espermatozoides a apoptose é dependente da ativação de caspases (WENG et al., 2002) sendo estas utilizadas como marcadores da apoptose em amostras seminais (MARTIN et al., 2004; SANTIAGO-MORENO et al., 2013).

A atividade de caspases pode ser detectada pelo uso do kit CaspACE FITC-VAD-FMK *In Situ Marker*, no qual a estrutura do peptídeo inibidor de caspase VAD-FMK (Val-Ala-Asp-Phe-Met-Lys), que é permeável à membrana, é conjugado ao FITC e se liga às caspases ativadas (MARTIN et al., 2004; SANTIAGO-MORENO et al., 2013). O uso deste kit adicionalmente associado ao iodeto de propídio (PI) permite a detecção de células apoptóticas e necróticas distinguindo-as de células viáveis (MARTIN et al., 2004) e tem sido utilizado na avaliação de sêmen de diversas espécies (MARTIN et al., 2007; VALLORANI et al., 2010; DE PAULA FREITAS-DELL'AQUA et al., 2013; SANTIAGO-MORENO et al., 2013).

2.9 Integridade de DNA

Durante a espermatogênese, ocorre substituição de histonas por protaminas, resultando em alta compactação e proteção do DNA espermático (MARTIN, et al., 2004). As deficiências deste processo, chamado de protaminação, torna o DNA mais

susceptível à fragmentação, podendo acarretar em infertilidade (RAHMAN et al., 2018).

A etiologia da lesão do DNA não está bem estabelecida, devido ao caráter multifatorial que pode incluir: a deficiência de protamina, estresse oxidativo, anormalidades na espermatogênese por consequência de hipertermia testicular, toxinas ambientais, inflamação ou infecção do trato reprodutivo e deficiências hormonais (ZINI; SIGMAN, 2009; AITKEN; BAKER, 2013), que levam a produção de espermatozoides defeituosos e com falhas na remodelação de cromatina (AITKEN; CURRY, 2011).

Em células somáticas, a apoptose leva à fragmentação de DNA pela ação de endonucleases mitocondriais (AITKEN et al., 2014), porém, na célula espermática, pelo fato das mitocôndrias não se localizarem no mesmo compartimento celular que o núcleo, as endonucleases não têm acesso ao núcleo espermático e por isso não ocorre a clivagem do DNA (KOPPERS et al., 2011; AITKEN; BAKER, 2013).

Em experimento realizado por Martin et al. (2004), a congelação e a descongelação do sêmen de touro, apesar de ter induzido os principais eventos relacionados à apoptose como diminuição do potencial de membrana mitocondrial, ativação de caspases e aumento da permeabilidade de membrana, não exerceu efeito sobre a fragmentação de DNA e nem sobre o nível de condensação do núcleo espermático.

Técnicas destinadas à avaliação da integridade da estrutura da cromatina espermática têm recebido destaque devido a capacidade de identificar defeitos espermáticos que não são detectáveis à avaliação convencional de sêmen (LEMMA, 2011; SIMÕES et al., 2013), além de poderem ser utilizadas como critério de seleção de reprodutores, a fim de se evitar problemas genéticos relacionados à integridade ou condensação do DNA espermático no embrião (LEMMA, 2011).

Existem diversos métodos pelos quais pode-se avaliar o DNA espermático, dentre eles, os mais comumente utilizadas são: COMETA, TUNEL, cromomicina A3 (CMA3), o ensaio da estrutura da cromatina espermática (SCSA) e o teste do laranja de acridina (EVENSON; WIXON, 2006; CASTRO et al., 2018).

O SCSA detecta a suscetibilidade do DNA frente a denaturação ácida (BALLACHEY; EVENSON; SAACKKE, 1988; EVENSON et al., 1999), para isto utiliza-se detergente ácido a fim de induzir a denaturação e laranja de acridina, que permite a leitura do ensaio por possuir propriedade metacromática e emitir fluorescência

(EVENSON et al., 1999; SIMÕES et al., 2013). Este método se destaca por ser rápido, objetivo e por avaliar grande número de células pela citometria de fluxo, com erro relativamente baixo (BALLACHEY; EVENSON; SAACKE, 1988).

Apesar de não se ter valores de referências bem definidos que relacionem a lesão do DNA espermático com a fertilidade (ZINI; SIGMAN, 2009), sabe-se que níveis elevados de dano estão associados à diminuição do desempenho reprodutivo em diferentes espécies (BALLACHEY; HOHENBOKEN; EVENSON, 1987; GILLAN; EVANS; MAXWELL, 2005; AITKEN; CURRY, 2011). A relação entre lesão do DNA e índices reprodutivos se deve pela ocorrência de mutações genéticas e epigenéticas, falhas no desenvolvimento embrionário pré-implantacional, abortamento e doenças genéticas na prole (ZINI; SIGMAN, 2009; AITKEN; BAKER, 2013; AITKEN, 2017).

Na PIVE, SIMÕES et al. (2013) observaram que a fragmentação do DNA traz prejuízos à eficiência espermática por acarretar em diminuição das taxas de clivagem e por reduzir a qualidade embrionária, evidenciada pelo aumento no número de células apoptóticas em blastocistos.

2.10 Teste funcional

Diversas são as metodologias existentes para se atestar a funcionalidade espermática, que se relacionam a habilidade fecundante dos espermatozoides e, assim, podem servir de ferramenta para a predição de fertilidade *in vivo* e *in vitro* (GRAHAM; FOOTE; HOUGH, 1987; AITKEN, 2006; LOSANO et al., 2015; KIZILAY; ALTAY, 2017). Dentre elas destacam-se os testes de: ligação espermática em zona pelúcida ou hemizona, penetração espermática em zona pelúcida e penetração espermática em oócito livre de zona pelúcida (AITKEN, 2006; KIZILAY; ALTAY, 2017).

O teste de ligação em zona pelúcida ou em hemizona avalia a capacidade de interação entre os espermatozoides e as glicoproteínas de zona pelúcida dos mamíferos (ZP), localizadas ao redor do oócito (AITKEN, 2006). Estas proteínas servem de sítio de ligação espécie-específica entre espermatozoide e oócito e induzem à reação acrossomal (BAUSEK et al., 2004). Enquanto a ZP3 media o reconhecimento e a ativação espermática na superfície, a ZP2 é considerada como

um receptor secundário, que facilita a ligação do espermatozoide após a reação acrossomal na matriz da zona pelúcida durante a penetração (AITKEN, 2006).

O teste de penetração em oócito é capaz de avaliar simultaneamente a capacidade espermática em passar pelo processo de capacitação, reação acrossomal e fusão com a membrana vitelínica do oócito (AITKEN, 2006). Este teste pode ser realizado com oócito homólogo ou heterólogo, desde que livre de zona pelúcida (GRAHAM; FOOTE; PARRISH, 1986). Apesar da zona pelúcida apresentar sítios de receptores de espermatozoides em sua superfície, a deposição de anticorpos específicos do ovário impede a ligação de espermatozoides de outras espécies (DUNBAR; SHIVERS, 1976), porém, ao se retirar a zona pelúcida do oócito, retira-se também este fator antigênico, possibilitando este procedimento (ZHAO et al., 2002). Além disto, para os espermatozoides serem capazes de penetrar oócito heterólogo, mesmo que livre de zona pelúcida, é necessário que estes passem pelo processo de capacitação e reação acrossomal previamente (LANDIM-ALVARENGA et al., 2001).

Deve-se levar em consideração que devido à diferença na composição dos lipídios de membrana dos espermatozoides de cada espécie, na utilização de oócitos heterólogos algumas espécies podem apresentar maior número de espermatozoides penetrados que em outras (LANDIM-ALVARENGA et al., 2001). O teste de penetração de espermatozoide bovino pode ser realizado utilizando-se oócito heterólogo livre de zona pelúcida de hamsters (GRAHAM; FOOTE; PARRISH, 1986) suíno (ZHAO et al., 2002) bovino e equino (LANDIM-ALVARENGA et al., 2001).

Devido à membrana perivitelínica do ovo de galinha apresentar em sua constituição uma proteína homóloga à ZP3 de mamíferos (BAUSEK et al., 2004), este tipo de membrana pode ser utilizado para o teste de ligação de espermatozoides bovinos (LOSANO et al., 2015). Além da membrana perivitelínica do ovo de galinha ser facilmente obtida, o uso desta no teste de ligação traz vantagens a este procedimento por ser simples e com baixos custos (CRISCUOLO et al., 2010).

2.11 Benefícios da avaliação associada de diferentes atributos espermáticos

Nenhum atributo espermático avaliado isoladamente é capaz de estimar o potencial de fecundação (UTT, 2016). Isto se deve à abundância de possibilidades de

interações entre diferentes atributos espermáticos, o que torna a previsão de desempenho muito complexa (O'MEARA et al., 2008). Contudo, o uso associado de diferentes técnicas que avaliam diversos atributos de uma amostra, proporciona uma previsão mais eficaz do desempenho reprodutivo (SUZUKI et al., 2003; TARTAGLIONE; RITTA, 2004; SELLEM et al., 2015).

Além de levar em consideração diferentes funções espermáticas, a avaliação associada é mais precisa pelo fato de alguns atributos correlacionarem entre si (LEMMA, 2011; SELLEM et al., 2015), como o observado entre motilidade espermática total, integridade de membrana plasmática e potencial de membrana mitocondrial (TROIANO et al., 1998; KIM; AGCA; AGCA, 2013); estabilidade e integridade de membrana plasmática, motilidade espermática e morfologia normal de cabeça (HALLAP et al., 2006); LIN, STR e VSL no CASA (UTT, 2016); estresse oxidativo e cinética espermática (DE CASTRO et al., 2015) e suscetibilidade ao estresse oxidativo e fragmentação de DNA (SIMÕES et al., 2013).

A combinação de parâmetros de cinética avaliados pelo CASA no sêmen de touros proporcionou uma correlação maior com a taxa de não-retorno ao cio de vacas inseminadas do que quando avaliados isoladamente (FARRELL et al., 1998). O mesmo foi observado levando-se em consideração a fecundação *in vitro*, na qual a motilidade progressiva, VAP, VSL e a integridade de membrana, quando avaliados em associação, foram melhores preditores da taxa de fecundação do que quando avaliados separadamente (KATHIRAVAN et al., 2008).

Em humanos, foi descrito que o espermatozoide que configura infertilidade apresenta perda do potencial de membrana mitocondrial, motilidade reduzida, aumento da produção de EROs mitocondriais, danos oxidativos no DNA, fragmentação de DNA e altos índices de morte celular (AITKEN et al., 2012).

Além disto, algumas metodologias de análise, permitem o estabelecimento de um valor preditivo para desempenho reprodutivo, como realizado por Tartaglione e Ritta (2004), no qual a avaliação concomitante da integridade de membrana plasmática e acrossomal possuiu um valor de 82% na predição do potencial de fertilidade *in vitro* e por Januskauskas, Johannisson e Rodriguez-Martinez (2003) em que a combinação das avaliações de motilidade e incidência de espermatozoides vivos aumentou para 80% o valor de predição da fertilidade, determinada pela taxa de não retorno ao cio.

Segundo Tanghe et al. (2002), a associação das avaliações de motilidade total, motilidade progressiva e morfologia normal realizadas após a descongelação e a proporção de espermatozoides vivos e mortos após o Percoll® conferem uma predição confiável da fertilidade *in vitro* de touros, considerada pela formação do pró-núcleo.

2.12 Avaliação após seleção espermática

Adicionalmente às características funcionais, deve-se levar em consideração que durante o transporte dos espermatozoides no trato genital da fêmea e posterior interação com o oócito, ocorre uma seleção de subpopulações espermáticas mais aptas à fecundação (HALLAP et al., 2004). Para serem selecionados, os espermatozoides devem ser capazes de atravessar o muco cervical, evitar a fagocitose por leucócitos nos cornos uterinos, transpor a junção útero-tubárica e se aderirem às células epiteliais do oviduto (HOLT; FAZELI, 2010).

Desta forma, para a PIVE, também é necessário que se realize a seleção espermática prévia à fecundação *in vitro* (FIV), com o objetivo de recuperar espermatozoides com qualidade superior (HENKEL; SCHILL, 2003). As técnicas de seleção mais utilizadas são: *swim-up*, lavagem por centrifugação, filtração em coluna de lã de vidro ou sefadex e gradiente de densidade de sílica coloidal, o Percoll® (DODE et al., 2002; LEE et al., 2009).

Dentre os diversos métodos, o gradiente de densidade de sílica coloidal é considerado como o mais apropriado para a seleção de espermatozoides (MORTIMER, 2000; O'MEARA et al., 2008), apesar da taxa de recuperação espermática ser baixa, em torno de 20% da concentração anterior à seleção (KIM; AGCA; AGCA, 2013).

Em diversos estudos foi demonstrado que a seleção *in vitro* de espermatozoides recupera células de qualidade superior, tendo melhoria de diferentes atributos espermáticos nas análises de integridade e estabilidade de membrana plasmática (HALLAP et al., 2004; HALLAP et al., 2006), integridade de acrossomo (O'MEARA et al., 2008), motilidade total, linearidade, potencial de membrana mitocondrial (HALLAP et al., 2004; KIM; AGCA; AGCA, 2013), morfologia espermática, condensação da cromatina (HALLAP et al., 2005; HALLAP et al., 2006)

e com sinais reduzidos de resposta à peroxidação lipídica e à apoptose (MORTIMER, 2000; LEAHY; GADELLA, 2011).

Além disto, a avaliação da qualidade seminal foi relacionada à fertilidade somente após seleção espermática *in vitro* segundo Hallap et al. (2004) e Garcia-Alvarez et al. (2010). Esta relação pode ser justificada pelo fato de que após a inseminação artificial, a subpopulação espermática que alcança o sítio de fecundação, é fisiologicamente selecionada e, portanto, diferente da população avaliada pela média de diferentes testes numa amostra total, sendo esta mais heterogêneo (GARCIA-ALVAREZ et al., 2010).

Deste modo, acredita-se que a seleção espermática prévia à avaliação da qualidade seminal, seleciona a subpopulação espermática que, de fato, é responsável pela fecundação, trazendo um cenário mais realista da habilidade fecundante de uma amostra de sêmen (HALLAP et al., 2004; HALLAP et al., 2006; GARCIA-ALVAREZ et al., 2010).

3. HIPÓTESE

A análise de diferentes atributos e das subpopulações espermáticas, determinadas pelo CASA, possibilita diferenciar amostras seminais de touros com baixos ou altos índices de produção *in vitro* de embriões, constituindo-se de um método preditivo para o desempenho nesta biotécnica reprodutiva.

4. OBJETIVOS

Constituem-se objetivos do presente trabalho, realizado em amostras de sêmen congelado/descongelado de touros:

4.1 Objetivo Geral

Caracterizar as possíveis diferenças existentes entre sêmen de touros com baixo e alto desempenho na PIVE, baseado nas taxas de clivagem e de blastocisto, a fim de se estabelecer métodos preditivos da qualidade seminal que permitam a seleção de touros para maior eficiência nesta biotécnica.

4.2 Objetivos específicos

1. Comparar qualitativamente os atributos espermáticos em amostras de sêmen congelado/descongelado de touros com baixo e alto desempenho na PIVE.
2. Determinar o melhor momento da avaliação de sêmen, antes ou após centrifugação em gradiente Percoll®, para predição do desempenho na PIVE.
3. Estabelecer modelo preditivo para a obtenção das taxas de clivagem e de blastocisto baseados nos atributos espermáticos.
4. Caracterizar as subpopulações espermáticas, determinadas em sistema CASA, no sêmen de touros utilizados na PIVE.
5. Diferenciar o perfil das subpopulações espermáticas, determinadas em CASA, no sêmen de touros com baixo e alto desempenho na PIVE.
6. Indicar o método de avaliação de sêmen mais efetivo para predição do desempenho na PIVE.

5. MATERIAL E MÉTODOS

O presente estudo foi realizado com a aprovação do Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ) da Universidade de São Paulo (USP) (protocolo nº 5509220814).

5.1 Delineamento experimental

A seleção dos animais experimentais e a preparação do sêmen utilizado, são descritos a seguir.

5.1.1 Seleção dos Touros

A determinação dos animais experimentais foi realizada com base em um banco de dados do laboratório comercial da In Vitro Brasil®. A partir do histórico de 3 anos (2012 a 2015), foram pré-selecionados, independentemente da raça, touros dos quais o sêmen congelado convencional, havia sido utilizado em pelo menos 5 manipulações de PIVE, com mais de 10 oócitos em cada uma delas. Por este critério de seleção, foram inclusos 100 touros.

De cada um destes reprodutores obteve-se as médias das taxas de clivagem e de blastocisto. Considerando-se o dia da fecundação *in vitro* como D0, a taxa de clivagem foi obtida em D3 e a taxa de blastocisto em D7, ambas calculadas a partir do número total de oócitos. Foram contabilizados apenas os blastocistos classificados qualitativamente como grau 1 e 2, conforme estabelecido pela Sociedade Internacional de Transferência de Embriões (IETS) (WRIGHT, 1998).

As taxas foram ranqueadas de forma crescente e selecionados 5 touros dentre os 10 que apresentavam as menores médias e 5 touros dentre os 10 que apresentavam as maiores médias para cada uma das taxas. Tal escolha foi realizada por não estarem disponíveis para venda o sêmen de todos os cinco touros localizados

nas extremidades do ranqueamento, por diversos motivos como: morte do reprodutor, suspensão da comercialização do sêmen do reprodutor escolhido e insuficiência do número de palhetas de mesma partida. Deste modo, optou-se por abranger a seleção envolvendo os 10% extremos da população.

Desta forma, foram estabelecidos 4 grupos experimentais: baixa taxa de clivagem (BC), alta taxa de clivagem (AC), baixa taxa de blastocisto (BB) e alta taxa de blastocisto (AB).

A média das taxas de clivagem dos grupos BC ($45 \pm 2\%$) e AC ($82 \pm 1\%$) e as médias das taxas de blastocisto dos grupos BB ($15 \pm 3\%$) e AB ($50 \pm 1\%$) foram comparadas pelo teste de ANOVA, constatando-se diferença significativa ($p \leq 0,05$) entre os grupos analisados.

Na distribuição dos touros nos quatro grupos, cinco reprodutores foram alocados simultaneamente em dois grupos, de forma a coincidir três touros entre os grupos AB e AC e dois touros entre os grupos BB e BC, conforme a Quadro 1. Tal alocação foi possível devido a comparação estrita entre os grupos BC e AC e entre BB e AB, não sendo feita análises de comparação entre os grupos de clivagem e de blastocisto.

Assim, foram adquiridas de três centrais brasileiras, palhetas de sêmen congelado de uma única partida, dos touros pertencentes a cada grupo.

5.1.2 Preparação do sêmen

Duas palhetas (0,25mL ou 0,5mL) da mesma partida de cada touro foram descongeladas simultaneamente a 37°C por 30 segundos, homogeneizadas em microtubo aquecido e avaliado em dois momentos: logo após a descongelação (Pré-Percoll®) e após a seleção espermática por diferentes densidades do gradiente de Percoll® (Pós-Percoll®) (Figura 1).

A fim de se determinar diferenças funcionais espermáticas entre os grupos de baixo e alto desempenho, foram avaliados em triplicata os seguintes atributos: cinética, morfologia, integridade de membranas plasmática e acrossomal, atividade e potencial de membrana mitocondrial, *status* oxidativo, teste funcional de ligação em

membrana perivitelínica de ovo de galinha, capacitação, apoptose, suscetibilidade ao estresse oxidativo e à fragmentação de DNA.

Para seleção por meio de gradiente de Percoll®, utilizou-se a mesma metodologia realizada na In Vitro Brasil®, de onde se obteve o banco de dados. Em microtubo aquecido depositou-se 200µL de Percoll® a 90% adicionado de 200µL de meio Fert-TALP modificado (PARRISH et al., 1988) (0,1M NaCl, 3,1mM KCl, 25mM NaHCO₃, 0,3mM NaH₂PO₄, 21,6mM Lactato, 2 mM CaCl₂, 0,4mM MgCl₂, 10mM Hepes, 0,006% de BSA-V (m/v), 22µg/mL de piruvato), sem agentes capacitadores (penicilamina, epinefrina e hipotaurina) e gentamicina, constituindo o Percoll® 45%.

Quadro 1- Distribuição dos touros (n=15) nos grupos experimentais segundo taxa de desempenho: alta taxa de clivagem (AC), baixa taxa de clivagem (BC), alta taxa de blastocisto (AB) e baixa taxa de blastocisto (BB).

Touro	Raça	Número de manipulações de PIVE	Grupo			
			AB	BB	AC	BC
1	Nelore	10	54%	-	83%	-
2	Nelore	5	50%	-	-	-
3	Nelore	7	48%	-	-	-
4	Nelore	13	48%	-	79%	-
5	Nelore	7	47%	-	79%	-
6	Nelore	7	-	7%	-	41%
7	Senepol	5	-	11%	-	-
8	Gir leiteiro	9	-	14%	-	44%
9	Angus	6	-	20%	-	-
10	Nelore	5	-	22%	-	-
11	Nelore	6	-	-	86%	-
12	Gir leiteiro	5	-	-	80%	-
13	Nelore	25	-	-	-	43%
14	Holandês	6	-	-	-	49%
15	Senepol	8	-	-	-	50%

No fundo do mesmo microtubo depositou-se, cuidadosamente, 400µL de Percoll® 90%, imediatamente antes de ser utilizado. Montado o gradiente de Percoll® (45% e 90%) foram depositados 250µL de sêmen, cuidadosamente, sob a superfície

do gradiente de 45% e submetido à primeira centrifugação, a 6600xg por 5 minutos. Recuperou-se o sedimento pela aspiração de volume fixo de 100µL, o qual foi diluído em 1000µL de meio Fert-TALP e submetido à segunda centrifugação a 1100xg por 3 minutos, a fim de se retirar resquícios do meio diluidor e do Percoll®. O pellet foi obtido pela aspiração de volume fixo de 100µL e ressuspendido para concentração de 25×10^6 espermatozoides/mL. Os espermatozoides recuperados foram avaliados conforme mencionado anteriormente.

Figura 1- Representação esquemática do delineamento experimental

5.2 Metodologia para avaliação espermática

As metodologias descritas a seguir foram empregadas nas amostras analisadas após a descongelação e após a centrifugação por gradiente de Percoll®, sendo apontadas particularidades quando necessário. Todos os reagentes químicos utilizados pertenciam a Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, E.U.A.), caso contrário, o fabricante foi indicado.

5.2.1 Cinética e subpopulações espermáticas

As avaliações de cinética espermática foram realizadas por meio de sistema computadorizado de análise de sêmen (CASA) da Hamilton Thorne IVOS, v.12.2, do Laboratório de Andrologia do Departamento de Reprodução Animal da FMVZ/USP. Para a análise, foram utilizados os parâmetros estabelecidos segundo o manual, apresentados no Anexo A. As velocidades foram agrupadas em: Rapid ($VAP > 50 \mu\text{m/s}$), Medium ($30 \mu\text{m/s} < VAP < 50 \mu\text{m/s}$), Slow ($VAP < 30 \mu\text{m/s}$ ou $VSL < 15 \mu\text{m/s}$) e Static (para estáticos).

Para avaliação após a descongelação (Pré-Percoll®) não se realizou qualquer diluição do sêmen ou ajuste de concentração. Para a avaliação após a centrifugação em gradiente de Percoll® (Pós-Percoll®), as amostras foram ressuspensas em meio Fert-TALP para a concentração final de 25×10^6 espermatozoides/mL.

Amostras de 5 μL de sêmen diluído, em ambos os momentos, foram depositadas entre lâmina e lamínula pré-aquecida a 37°C e considerando-se quatro campos, foram determinados os seguintes parâmetros:

MT - Motilidade total (%).

MP - Motilidade progressiva (%).

VAP - Velocidade de trajeto ($\mu\text{m/s}$): velocidade curvilínea sobre um trajeto uniforme, desprezando-se o deslocamento lateral da célula espermática. É a velocidade média da trajetória do espermatozoide.

VSL - Velocidade progressiva ($\mu\text{m/s}$): é a distância, considerando-se uma linha reta entre o ponto inicial e o final da trajetória, dividida pelo tempo decorrido.

VCL - Velocidade curvilínea ($\mu\text{m/s}$): é a distância total entre cada posição do centro da célula durante a captura da imagem. É a velocidade da trajetória real do espermatozoide.

ALH - Amplitude de deslocamento lateral de cabeça (μm): corresponde à largura média da oscilação da cabeça do espermatozoide durante seu deslocamento.

BCF - Frequência de batimentos do flagelo (Hz): determinada pela medida da frequência com que a linha da cabeça espermática atravessa a trajetória celular em qualquer direção.

STR - Retilinearidade (%): é a medida do afastamento médio da trajetória da célula espermática, considerando-se uma linha reta. Calculado pela relação entre $(VSL/VAP) \times 100$. Estima a proximidade do percurso da célula a uma linha reta.

LIN - linearidade (%): é a medida do afastamento da célula espermática considerando-se a trajetória em uma linha reta. É a razão entre $(VSL/VCL) \times 100$.

WOB – Coeficiente de Wobble (%): é a taxa de oscilação obtido pela razão entre $(VAP/VCL) \times 100$.

DNC - DANCE (μm^2) obtido pela razão $VCL \times ALH$.

Rapid - porcentagem de espermatozoides com velocidade rápida (%).

Medium - porcentagem de espermatozoides com velocidade média (%).

Slow – porcentagem de espermatozoides com velocidade lenta (%).

Static – porcentagem de espermatozoides estáticos (%).

Para cada um destes parâmetros foram obtidos os valores da média dos campos analisados e os valores individuais da trajetória dos espermatozoides para a realização das análises de cinética espermática convencional e das subpopulações espermáticas, respectivamente.

Para determinação das subpopulações, após a coleta de todos os dados, foi aplicada análise estatística em três etapas propostas por Núñez-Martínez, Moran e Peña (2006).

Na primeira etapa realizou-se a análise de componentes principais (PCA). Por meio de combinações lineares, esta análise determinou os principais parâmetros de cinética que sumarizavam as informações originais, reduzindo o número de variáveis.

Na segunda etapa foi utilizada a análise não-hierárquica usando o modelo K-médias que usa a Distância Multivariada Euclidiana para calcular os agrupamentos centrais.

Na terceira etapa foi utilizado um método discriminante obtendo números reduzidos de agrupamentos para facilitar a interpretação dos dados obtidos da análise K-médias. O número específico de agrupamentos foi baseado numa análise de Dendrogramas Hierárquico, constituindo uma “amostra individual”. Por fim, para a comparação de subpopulações em cada grupo foi utilizado o teste Qui-Quadrado, com nível de significância de 5%.

5.2.2. Concentração espermática

Para determinação da concentração espermática foram diluídos 5µL de sêmen em 245µL de água destilada, obtendo-se uma diluição de 1:50 e realizada contagem em câmara de Neubauer, sob microscopia óptica em aumento de 40x.

5.2.3 Morfologia espermática

A morfologia espermática foi realizada por preparação úmida, diluindo-se 10µL de sêmen em 20µL de solução de formol-salina previamente aquecida à 37°C. Alíquota de 6µL do sêmen fixado foi depositada entre lâmina e lamínula e realizada contagem diferencial de 200 células em microscopia de contraste de fase em aumento de mil vezes, sob imersão, seguindo a classificação de Blom (1972).

5.2.4 Atividade mitocondrial

Para a avaliação da atividade mitocondrial, foi utilizada a técnica citoquímica da 3,3'-diaminobenzidina (DAB). Alíquotas de 20µL de sêmen foram incubadas a 37°C por 1 hora com 20µL DAB (1mg/mL). Após este período, foram feitos esfregaços das amostras em lâminas de vidro com posterior fixação em formol 10% por 15 minutos.

Foi realizada contagem diferencial de 200 espermatozoides em microscopia de contraste de fase, utilizando-se aumento de mil vezes, sob imersão, obtendo-se o percentual de células pertencentes a cada uma das quatro classes espermáticas: alta (DAB I), intermediária (DAB II), baixa (DAB III) e ausência de atividade mitocondrial (DAB IV), segundo a classificação de Hrudka (1987).

5.2.5 Citometria de fluxo

O estudo dos atributos espermáticos pela utilização de sondas fluorescentes e leitura em citometria de fluxo, foi realizado no equipamento Guava EasyCyte™ Mini System (Guava Technologies), do Laboratório de Biologia do Espermatozoide do Departamento de Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP-São Paulo. Este citômetro possui laser de excitação azul de 488nm e emite radiação laser visível a 20mW, sendo detectadas as fluorescências amarela (PM1 photodetector- 583nm), vermelha (PM2 photodetector- 680nm) e verde (PM3 photodetector- 525nm).

As células espermáticas foram diferenciadas de debris com base na diferença de tamanho (FSC). Os dados foram analisados a partir de gráfico dot plot, quando mais de um parâmetro foi investigado, ou de histograma, na avaliação da intensidade de fluorescência, utilizando-se o *software* FlowJo v8.7 (Flow Cytometry Analysis Software- Tree Star INC., Asland, USA).

5.2.5.1 Preparação do sêmen

O citômetro utilizado não possui a disponibilidade de selecionar eventos de acordo com complexidade e não possui laser ultravioleta, que permitiria a identificação de material genético com o uso da sonda fluorescente Hoechst 33342. A fim de se retirar partículas pertencentes ao meio diluidor, as amostras de sêmen destinadas a avaliação logo após a descongelação (Pré-Percoll®), foram lavadas em meio Fert-TALP por meio de centrifugação em rotação de 200xg que não possui efeito negativo nos atributos espermáticos, segundo Kim, Agca e Agca (2013).

Cerca de 250µL de sêmen descongelado foram diluídos em 3.000µL de meio Fert-TALP e realizada centrifugação a 200xg por 3 minutos. O sedimento foi aspirado em volume fixo de 100µL e ressuspenso em 1.000µL de meio Fert-TALP e submetido novamente a centrifugação a 200xg por 3 minutos, obtendo-se *pellet* final de 100µL. Neste, foi realizada concentração espermática e ajustada para 5×10^6 espermatozoides/mL.

Os espermatozoides obtidos por seleção em gradiente de Percoll® foram ressuspensos em meio Fert-TALP para a mesma concentração final, de 5×10^6 espermatozoides/mL. Para todas as reações utilizando-se sondas fluorescentes e leitura em citometria de fluxo, foi realizada uma adaptação dos protocolos originais para volume e número de células reduzidos (para 90.000 espermatozoides), a fim de se otimizar o uso de cada amostra para serem feitas todas avaliações simultaneamente.

5.2.5.2 Integridade de membranas plasmática e acrossomal

Para avaliação de integridade de membranas plasmática e acrossomal foram utilizadas as sondas compostas por aglutinina do *Pisum sativum* conjugada ao isotiocionato de fluoresceína (FITC-PSA) em associação ao iodeto de propídio (PI), adaptando-se a metodologia de Hamilton et al. (2016), avaliando-se 20.000 eventos.

Uma alíquota de 18µL de sêmen foi adicionado a 7,5µL da solução de FITC-PSA (concentração final de 24,3µg/mL) associada ao PI (concentração final de 6µM), incubado a 37°C por 5 minutos, adicionado 100µL de PBS e realizada leitura em citometria de fluxo.

Foram obtidas 4 categorias espermáticas: 1: FITC-PSA-/PI- (membrana plasmática e acrossomo íntegros); 2: FITC-PSA+/PI+ (membrana plasmática lesada e acrossomo reagido); 3: FITC-PSA+/PI- (membrana plasmática íntegra e acrossomo reagido); 4: FITC-PSA-/PI+ (membrana plasmática lesada e acrossomo íntegro).

5.2.5.3 Potencial de membrana mitocondrial

Para a avaliação do potencial de membrana mitocondrial foi utilizada a sonda fluorescente iodeto de 5,5',6,6'-tetracloro,1,3,3' tetraetilbenzimidazolilcarbocianina (JC-1) (Invitrogen, Eugene, OR, USA), adaptando-se a metodologia de Hamilton et al. (2016). Para tal 18µL de sêmen foram incubados com 1µL de JC-1 (concentração final

de 1 μ M) a 37°C por 5 minutos e realizada leitura em citometria de fluxo em 20.000 eventos.

Foram obtidas três categorias espermáticas de acordo com o potencial de membrana mitocondrial: espermatozoides com mitocôndrias com baixo potencial, nas quais o JC-1 se apresenta na forma de monômeros e emite fluorescência verde, espermatozoides com mitocôndrias com alto potencial, nas quais ocorre a formação de J-agregados, que são fluorescências de coloração laranja a vermelha e espermatozoides com potencial mitocondrial intermediário, que apresentam ambas as cores de fluorescência (GARNER et al., 1997; CELEGHINI et al., 2007; ROVEGNO et al., 2013).

5.2.5.4 Apoptose espermática

A avaliação da atividade de caspases foi realizada utilizando-se o kit FITC-VAD-FMK reagent (G7462, Promega), adaptando-se a metodologia de Martin et al. (2004).

Uma alíquota de 18 μ L de sêmen foi adicionado a 82 μ L de PBS e 1 μ L de FITC-VAD-FMK (concentração final de 5mM), sendo esta homogeneizada e incubada por 20 minutos em temperatura ambiente. Após a incubação, a solução foi lavada duas vezes por meio de centrifugação (200 $\times$ g/3min), um volume fixo do sobrenadante (82 μ L) foi retirado e ressuspensionado com 82 μ L de PBS. Em seguida, 5 μ L de PI (concentração final de 6 μ M) foi adicionado e incubado por 5 minutos a 37°C.

A solução foi ressuspensionada com 100 μ L de PBS e realizada leitura em citometria de fluxo em 10.000 eventos, obtendo-se três padrões de espermatozoides que foram classificados em: viável (FITC-FMK-VAD-/PI-); apoptótico (FITC-FMK-VAD+/PI-) e necrótico (FITC-FMK-VAD+/PI+ e FITC-FMK-VAD-/PI+) segundo Martin et al., 2007.

5.2.5.5 Estresse oxidativo

Foram utilizadas três sondas fluorescentes diferentes para a detecção do estresse oxidativo em citometria de fluxo.

5.2.5.5.1 Dihidroetídio (DHE)

A detecção de ânion superóxido espermático foi realizada utilizando-se a sonda fluorescente dihidroetídio (DHE) (Molecular Probes, Inc.). O DHE se liga ao ânion superóxido gerando fluorescência vermelha no núcleo espermático (AITKEN, 2017). Para isto, alíquota de 18µL de sêmen foi incubada a 0,5µL de DHE numa concentração final de 2µM, por 15 minutos a 37°C, segundo Koppers et al. (2008), porém, sem a associação com a sonda SYTOX Green. A solução foi ressuspensa em 100µL de PBS e a leitura realizada em citometria de fluxo com a avaliação de 5.000 eventos, obtendo-se a intensidade de fluorescência vermelha do DHE.

5.2.5.5.2 MitoSOX™ Red

Para a detecção específica de superóxido de origem mitocondrial, utilizou-se a sonda fluorescente MitoSOX™ Red (Molecular Probes, Inc.; Eugene OR), seguindo a metodologia proposta por Marques et al. (2014), adaptada para citometria de fluxo. Alíquota de 18µL de sêmen foi incubada com MitoSOX™ Red numa concentração final de 3µM a 37°C por 15 minutos. Para leitura em citometria de fluxo esta solução foi ressuspensa em 100µL de PBS com avaliação de 5.000 eventos, obtendo-se a intensidade de fluorescência vermelha da MitoSOX™ Red.

5.2.5.5.3 CellROX™ green

A avaliação do estresse oxidativo intracelular foi realizado com o uso da sonda fluorescente CellROX™ green (Molecular Probes, Eugene, OR, USA), adaptando-se a metodologia proposta por De Castro et al. (2015). Uma alíquota de 4,5µL de sêmen foi incubado com 0,9µL de CellROX™ green (concentração final de 5µM) por 20 minutos a 37°C, em seguida adicionou-se 0,5µL de PI (concentração final de 6µM) que foi incubado por mais 5 minutos a 37°C. A solução foi ressuspensa em 100µL de PBS e realizada leitura por citometria de fluxo, com a avaliação de 20.000 eventos.

Foram obtidas quatro categorias espermáticas de acordo com a integridade de membrana e estresse oxidativo: membrana íntegra sem estresse (CellROX-/PI-), membrana íntegra com estresse (CellROX+/PI-), membrana lesada sem estresse (CellROX-/PI+) e membrana lesada com estresse (CellROX+/PI+).

5.2.5.6 Cromatina espermática

A avaliação da cromatina espermática foi realizada baseado no Ensaio da estrutura da cromatina espermática (SCSA) de Evenson et al. (1999), que avalia a suscetibilidade da cromatina à desnaturação ácida, seguindo a metodologia modificada por Simões et al. (2013).

Para isto, uma alíquota de 18µL sêmen foi diluída em 50µL de tampão TNE (Tris-HCl 0,01M, NaCl 0,15M, EDTA 1mM em água destilada, pH 7,4). Realizou-se centrifugação por 1 minuto, retirado o sobrenadante, ressuspensa com 25µL de TNE e adicionado 50µL de solução detergente ácida (HCl 0,08M, NaCl 0,15M, Triton X-100 0,1% em água destilada, pH 1,2) por 30 segundos para permitir o acesso da sonda laranja de acridina ao DNA espermático. Após este período, foi adicionado 150µL de solução de laranja de acridina (LA) (ácido cítrico 0,1M, Na_2HPO_4 0,2M, EDTA 0,001M, NaCl 0,15M, LA stock 6µg/mL em água destilada, pH 6), incubada por 5 minutos e realizada leitura por citometria de fluxo em 20.000 eventos, obtendo-se duas categorias: espermatozoides com DNA íntegro, que emitem fluorescência verde e espermatozoides com fragmentação de DNA, que emitem fluorescência alaranjada.

Utilizando-se o *software* FlowJo v8.7 (Flow Cytometry Analysis Software- Tree Star INC. Asland, USA), foi obtido o percentual de células com alteração na cromatina pela seleção do α TY log do histograma, no qual abrange células com fluorescência amarela/total de células (células com fluorescência amarela + células com fluorescência verde).

5.2.6 Capacitação espermática

A capacitação espermática foi avaliada utilizando-se o ensaio da sonda fluorescente clortetraciclina (CTC), segundo a metodologia utilizada por De Castro et al. (2015). Previamente à reação com a CTC, as amostras de sêmen, logo após a descongelação (Pré-Percoll®), foram lavadas duas vezes por meio de centrifugação (200xg/ 3minutos) em meio Fert-TALP, a fim de se evitar reação inespecífica com restos celulares ou partículas do meio diluidor e assim, facilitar a leitura. Alíquotas de 15 μ L de sêmen (Pré e Pós-Percoll®), numa concentração de 25×10^6 espermatozoides/mL, foram adicionadas a 20 μ L de solução de CTC (CTC 38 μ M; solução de estoque: TRIS 20 mM, NaCl 130mM, and L-cisteína 4mM) e 5 μ L de paraformaldeído a 3,7% a 37°C. Estas amostras foram mantidas em geladeira à 5°C e protegidas de luz por cerca de 12 horas. Após este período, 4 μ L de amostra foram depositados em lâmina para microscopia e homogeneizados à 2 μ L de solução DABCO (1,4-diazabicyclo [2.2.2]octano e glicerol (1:9)), cobertos por lamínula e avaliadas em microscopia de fluorescência (Olympus IX80) sob iluminação azul-violeta, utilizando-se filtros de excitação 355nm e de emissão 465nm.

Foram contadas 200 células em aumento de mil vezes sob imersão, obtendo-se o percentual de espermatozoides diferenciados em três classes de acordo com o padrão de fluorescência da CTC segundo Kato e Nagao (2015): não-capacitado (fluorescência uniforme em toda a cabeça), capacitado (fluorescência apenas na região acrossomal) e acrossomo reagido (banda fluorescente intensa apenas na região equatorial). Espermatozoides que apresentavam fluorescência não-específica ou padrão diferentes daqueles pré-estabelecidos não foram contabilizados na análise.

5.2.7 Teste funcional de ligação em membrana perivitelínica

Foi realizado teste funcional utilizando-se o método de ligação dos espermatozoides em membrana perivitelínica da gema de ovo de galinha, seguindo a metodologia de Losano et al. (2015). Para isto, a membrana perivitelínica da gema de ovo foi isolada e lavada com PBS até se tornar completamente translúcida. Após isto, foram cortadas em fragmentos de 0,5cm². Em placas, foram incubados com membrana 25.000 espermatozoides diluídos em 250µL de Fert-TALP modificado em estufa à 37°C e 5% de CO₂ por uma hora. Após a incubação, a membrana foi lavada, em tubo Falcon de 50mL contendo 10mL de PBS, sob agitação para remoção dos espermatozoides que não se ligaram à membrana. Após este procedimento, a membrana foi depositada e esticada em lâmina para microscopia, coberta por lamínula e avaliada em microscopia de contraste de fase num aumento de 400x. Realizou-se a contagem do número de espermatozoides em 5 campos e obteve-se o número de espermatozoides/mm² de membrana por meio da fórmula matemática:

$$\text{Número de espermatozoides/mm}^2 = \frac{\text{Número médio de espermatozoides por campo}}{\text{Área da objetiva (0,2163 mm}^2\text{)}}$$

5.2.8 Resposta espermática à indução do estresse oxidativo

A suscetibilidade dos espermatozoides ao estresse oxidativo foi avaliada segundo Nichi et al. (2007) pela técnica de TBARS (Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico) induzido.

Alíquotas de 200µL de sêmen, numa concentração de 25x10⁶ espermatozoides/mL, foram diluídas em sulfato de ferro (50µL a 4mM) e ácido ascórbico (50µL a 20mM) e incubados a 37°C por 90 minutos. Em seguida, foi acrescentado ácido tricloroacético (TCA) a 10% e centrifugado a 20.817xg por 15 minutos a 5°C. O volume de 1mL do sobrenadante foi recuperado e congelado para posterior análise.

Para leitura, adicionou-se 900µL de ácido tiobarbitúrico (TBA) a 1% que foi incubado a 100°C por 15 minutos em banho-maria. A fim de cessar a reação, as amostras foram colocadas em gelo. Ao ocorrer a peroxidação lipídica, ocorre formação de malondialdeído, substância reativa ao ácido tiobarbitúrico, a qual em contato ao TBA adquire coloração rósea. Esta coloração nas amostras foi quantificada em espectrofotômetro (Ultrospec 3300 pro® Amershan Biosciences, EUA) com comprimento de onda de 532nm. Os resultados foram comparados com a curva-padrão que foi previamente estabelecida e expresso em nanogramas de TBARS/10⁶ espermatozoides.

5.2.9 Análise estatística

Os dados foram analisados utilizando o Sistema SAS para Windows (SAS Institute Inc., Cary, NC, EUA). Os efeitos de grupo (BC vs. AC e BB vs. AB), efeitos do Percoll® (Pré vs. Pós-Percoll®) e as interações entre estes fatores foram estimados pelas medidas repetidas ANOVA (procedimento MIXED do SAS). Diferenças entre os diferentes grupos experimentais foram analisados por meio de testes paramétricos e não paramétricos, de acordo com a normalidade residual (distribuição de Gauss) e homogeneidade das variâncias. Sempre que um desses pressupostos não foi respeitado, os dados foram transformados. Quando as transformações não foram bem-sucedidas, foram utilizados os testes não paramétricos.

Na avaliação da taxa da clivagem, os percentuais de: intermediário potencial de membrana mitocondrial, fragmentação de DNA, membrana lesada com estresse oxidativo e velocidade lenta foram log transformados. Ainda, número de espermatozoides/mm² de membrana, porcentagem de células com membrana plasmática lesada e acrossomo reagido, alto potencial de membrana mitocondrial, média atividade mitocondrial e porcentagem de espermatozoides com membrana plasmática íntegra e acrossomo reagido foram elevados a raiz quadrada. Ademais, a porcentagem de células apresentando alta atividade mitocondrial foi elevada ao quadrado, por outro lado, porcentagem de espermatozoides com membrana plasmática e acrossomo íntegros foram elevadas a 1,5.

Já na avaliação da taxa de blastocisto, os percentuais de: médio potencial mitocondrial, fragmentação de DNA, membrana plasmática íntegra e acrossomo reagido, membrana íntegra sem estresse oxidativo, membrana plasmática lesada e acrossomo íntegro, membrana lesada com estresse oxidativo, acrossomo reagido, VAP, VSL e número de espermatozoides/mm² de membrana foram log transformados. As porcentagens de células com alto potencial de membrana mitocondrial e de membranas plasmática lesada e acrossomo reagido foram elevadas à raiz quadrada. Por fim, o percentual de espermatozoides com alta atividade mitocondrial foi elevado ao quadrado.

Quando não ocorreram interações significativas, o efeito dos grupos foi analisado ao fundir todos os momentos de avaliação, tendo em conta a correção de Bonferroni (PROC GLIMMIX); caso contrário, as comparações foram realizadas tendo em conta os efeitos principais combinados. As diferenças entre os grupos foram analisadas utilizando o teste t de Student (variáveis paramétricas) e o teste de Wilcoxon (variáveis não paramétricas). Os resultados foram descritos como a média e erro padrão.

Adicionalmente, os dados foram analisados por regressão logística multivariada usando o procedimento GLIMMIX do SAS (Statistical Analysis Software v9.4, SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) a fim de se estimar equações de regressão para predição das taxas de clivagem e de blastocisto baseadas nos atributos espermáticos avaliados. As variáveis aleatórias foram removidas sequencialmente do modelo pelo método *stepwise elimination*, considerando-se o critério de Wald para $P > 0,20$. O critério de informação de Akaike corrigido (AICC) foi utilizado para a seleção do melhor modelo. Os resultados foram descritos como média e erro padrão. A fim de testar o modelo preditivo, as taxas esperadas, na aplicação do modelo, e as taxas reais foram submetidas à análise de correlação de Pearson. Para todas as análises estatísticas foi utilizado nível de significância de 5%.

6. RESULTADOS

Não ocorreram interações significativas ($P>0,05$) entre os grupos experimentais relacionados a taxa de clivagem (BC vs. AC) e os momentos de avaliação (Pré-Percoll® vs. Pós-Percoll®) (Apêndice A). Ademais, não ocorreram interações significativas ($P>0,05$) entre os grupos experimentais relacionados a taxa de blastocisto (BB vs. AB) e os momentos de avaliação (Pré-Percoll® vs. Pós-Percoll®) (Apêndice B). Desta forma, os resultados obtidos serão apresentados sequencialmente na comparação dos grupos de baixa e alta taxa de clivagem (BC vs. AC) e posteriormente na comparação dos grupos de baixa e alta taxa de blastocisto (BB vs. AB). Optou-se por não apresentar os resultados Pré-Percoll® vs. Pós-Percoll®, já que o intuito deste trabalho foi avaliar a influência dos atributos espermáticos nas taxas de clivagem e de blastocisto.

6.1 Comparação dos grupos para taxa de clivagem

A comparação dos resultados dos parâmetros de cinética espermática avaliados por CASA entre os grupos BC e AC estão apresentados na Tabela 1.

Os grupos BC e AC não apresentaram diferenças quanto à avaliação da morfologia espermática e quanto à susceptibilidade ao estresse oxidativo, avaliado pelo teste de TBARS induzido (Tabela 2).

A avaliação da integridade de membrana plasmática e status acrossomal detectados pela associação das sondas fluorescentes FITC-PSA e PI não foi capaz de distinguir touros de baixo e alto desempenho, classificados pela taxa de clivagem, conforme a Tabela 3.

Tabela 1- Média $\pm$ erro padrão dos parâmetros de cinética espermática avaliados em sistema computadorizado (CASA), no sêmen congelado/descongelado de touros agrupados pela taxa de clivagem (baixa e alta). São Paulo, 2016.

Parâmetro	Sêmen bovino		
	Baixa Clivagem	Alta Clivagem	P
MT (%)	50,5 $\pm$ 3,5	54,4 $\pm$ 3,2	0,4066
MP (%)	35,8 $\pm$ 2,9	36,0 $\pm$ 2,8	0,9604
VAP ($\mu\text{m/s}$)	86,9 $\pm$ 2,8	97,2 $\pm$ 2,6	0,0108
VSL ($\mu\text{m/s}$)	72,2 $\pm$ 2,8	75,5 $\pm$ 2,7	0,4052
VCL ($\mu\text{m/s}$)	159,3 $\pm$ 6,3	190,0 $\pm$ 6,6	0,0015
ALH (μm)	6,8 $\pm$ 0,3	8,4 $\pm$ 0,3	0,0003
BCF (Hz)	32,8 $\pm$ 1,0	29,6 $\pm$ 1,1	0,0443
STR (%)	82,0 $\pm$ 1,4	77,6 $\pm$ 1,3	0,0243
LIN (%)	47,4 $\pm$ 1,6	42,0 $\pm$ 1,5	0,0185
WOB (%)	55,2 $\pm$ 1,3	51,8 $\pm$ 1,2	0,0575
DNC (μm^2)	1.123,4 $\pm$ 88,0	1.637,2 $\pm$ 103,9	0,0004
Rapid (%)	43,8 $\pm$ 3,1	49,1 $\pm$ 3,2	0,2431
Medium (%)	6,5 $\pm$ 0,9	5,2 $\pm$ 0,9	0,3128
Slow (%)	19,4 $\pm$ 2,8	15,2 $\pm$ 2,0	0,2572
Static (%)	30,3 $\pm$ 4,2	30,3 $\pm$ 3,7	1,0000

MT- Motilidade Total; MP- Motilidade Progressiva; VAP- Velocidade de trajeto; VSL- Velocidade progressiva; VCL- Velocidade curvilínea; ALH- Amplitude lateral da cabeça; BCF- Frequência de batimento; STR- Retilinearidade; LIN- Linearidade; WOB- Wobble= (VAP/VCL) x 100; DNC- Dance= VCL x ALH; Rapid- Espermatozoides com velocidade rápida, Medium- Espermatozoides com velocidade média; Slow- Espermatozoides com velocidade lenta; Static- Espermatozoides estáticos.

Tabela 2- Média $\pm$ erro padrão na avaliação seminal da morfologia espermática e susceptibilidade dos espermatozoides ao estresse oxidativo pela técnica de TBARS induzido, no sêmen congelado/descongelado de touros agrupados pela taxa de clivagem (baixa e alta). São Paulo, 2016.

Parâmetro	Sêmen bovino		
	Baixa Clivagem	Alta Clivagem	P
Defeitos Menores (%)	9,0 $\pm$ 0,0	8,7 $\pm$ 0,2	0,2838
Defeitos Maiores (%)	7,1 $\pm$ 0,6	7,1 $\pm$ 0,8	0,9461
Defeitos totais (%)	14,9 $\pm$ 0,9	15,7 $\pm$ 0,7	0,4527
TBARS (ng/10⁶sptz)	1023,7 $\pm$ 110,3	1001,5 $\pm$ 106,1	0,8855

TBARS- Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico

Tabela 3- Média $\pm$ erro-padrão do percentual de espermatozoides classificados de acordo com a integridade de membrana plasmática e status acrossomal, detectados simultaneamente com o uso das sondas fluorescentes FITC-PSA e PI e leitura em citometria de fluxo, no sêmen congelado/descongelado de touros agrupados pela taxa de clivagem (baixa e alta). São Paulo, 2016.

Parâmetro	Sêmen bovino		
	Baixa Clivagem	Alta Clivagem	P
MP e acrossomo íntegros (%)	59,4 $\pm$ 3,1	58,5 $\pm$ 3,7	0,9200
MP íntegra e acrossomo reagido (%)	6,7 $\pm$ 2,3	7,6 $\pm$ 1,8	0,5705
MP lesada e acrossomo íntegro (%)	16,2 $\pm$ 1,0	15,2 $\pm$ 1,0	0,4810
MP lesada e acrossomo reagido (%)	17,6 $\pm$ 1,7	18,7 $\pm$ 2,6	0,8299

MP- Membrana plasmática

Na avaliação da atividade mitocondrial pelo método de DAB, a proporção de espermatozoides com alta, intermediária, baixa e ausência de atividade foi semelhante nos grupos de BC e AC, segundo a Tabela 4.

Tabela 4- Média $\pm$ erro-padrão do percentual de espermatozoides classificados de acordo com as classes de atividade mitocondrial (I a IV) detectadas pelo método da 3,3'-diaminobenzidina (DAB) no sêmen congelado/descongelado de touros agrupados pela taxa de clivagem (baixa e alta). São Paulo, 2016.

Parâmetro	Sêmen bovino		
	Baixa Clivagem	Alta Clivagem	P
DAB I (%)	79,2 $\pm$ 2,4	77,0 $\pm$ 3,2	0,7172
DAB II (%)	12,2 $\pm$ 1,5	13,5 $\pm$ 1,9	0,7239
DAB III (%)	3,3 $\pm$ 0,6	3,6 $\pm$ 0,7	0,7687
DAB IV (%)	5,3 $\pm$ 1,2	6,0 $\pm$ 1,0	0,6758

DAB I- alta, DAB II- intermediária, DAB III- baixa, DAB IV-ausente

Não se obteve diferença na proporção de espermatozoides com alto, intermediário ou baixo potencial de membrana mitocondrial, detectado pela sonda fluorescente JC-1, entre os grupos de baixo e alto desempenho na PIVE, determinados pela taxa de clivagem (Tabela 5).

Tabela 5- Média $\pm$ erro-padrão do percentual de espermatozoides classificados de acordo com o potencial de membrana mitocondrial, detectado pela sonda fluorescente JC-1 e leitura em citometria de fluxo no sêmen congelado/descongelado de touros agrupados pela taxa de clivagem (baixa e alta). São Paulo, 2016.

Potencial de membrana mitocondrial	Sêmen bovino		
	Baixa clivagem	Alta clivagem	P
Alto (%)	29,7 $\pm$ 3,5	26,0 $\pm$ 3,4	0,5438
Intermediário (%)	29,3 $\pm$ 3,8	28,3 $\pm$ 3,6	0,9398
Baixo (%)	40,8 $\pm$ 3,4	45,5 $\pm$ 3,1	0,3215

A comparação das proporções de espermatozoides com integridade de membrana com e sem estresse oxidativo e com lesão de membrana com e sem estresse oxidativo, detectadas pelas sondas CellROX™ green e PI, assim como a

média e erro padrão da intensidade de fluorescência das sondas MitoSOX™ Red e DHE em citometria de fluxo nos grupos BC e AC estão apresentadas na Tabela 6.

Tabela 6- Média $\pm$ erro-padrão do percentual de espermatozoides classificados de acordo com a viabilidade e presença de estresse oxidativo, avaliados simultaneamente com o uso das sondas fluorescentes CellROX™ green e PI e da intensidade de fluorescência detectada com o uso das sondas MitoSOX™ Red, para a avaliação de EROs de origem mitocondrial e Dihidroetídio (DHE) para avaliação de ânion superóxido e leitura em citometria de fluxo, no sêmen congelado/descongelado de touros agrupados pela taxa de clivagem (baixa e alta). São Paulo, 2016.

Parâmetro	Sêmen bovino		
	Baixa Clivagem	Alta Clivagem	P
Membrana íntegra sem estresse oxidativo (%)	21,9 $\pm$ 1,7	23,5 $\pm$ 2,5	0,5823
Membrana íntegra com estresse oxidativo (%)	23,2 $\pm$ 1,6	21,8 $\pm$ 2,5	0,6211
Membrana lesada sem estresse oxidativo (%)	51,3 $\pm$ 2,2	52,3 $\pm$ 2,5	0,7742
Membrana lesada com estresse oxidativo (%)	3,5 $\pm$ 0,4	2,4 $\pm$ 0,5	0,0267
MitoSOX™ Red*	16.482,6 $\pm$ 1566,4	13.476,3 $\pm$ 1417,5	0,1713
DHE*	40.266,7 $\pm$ 1979,8	35.329,3 $\pm$ 1765,2	0,0693

Membrana íntegra sem estresse oxidativo (CellROX-/PI-); Membrana íntegra com estresse oxidativo (CellROX+/PI-); Membrana lesada sem estresse oxidativo (CellROX-/PI+); Membrana lesada com estresse oxidativo (CellROX+/PI+).

*intensidade de fluorescência.

A proporção de espermatozoides viáveis (com integridade de membrana plasmática e sem ativação de caspase), apoptóticos (com integridade de membrana e com ativação de caspase) e necróticos (com lesão de membrana com e sem ativação de caspase) detectadas com o uso do kit FITC-VAD-FMK associado a sonda PI, obtidas nos grupos BC e AC estão representadas na Tabela 7.

Na avaliação da cromatina espermática, foram obtidos baixos valores de fragmentação de DNA e na comparação entre grupos BC e AC, não houve diferença significativa, como observado na Tabela 7.

Tabela 7- Média $\pm$ erro-padrão do percentual de espermatozoides classificados de acordo com a viabilidade e ativação de caspase, avaliados simultaneamente com o uso do kit FITC-VAD-FMK e a sonda fluorescente PI e o percentual de espermatozoides com fragmentação de DNA pelo ensaio de susceptibilidade da cromatina à denaturação ácida (SCSA), ambos com leitura em citometria de fluxo, no sêmen congelado/descongelado de touros agrupados pela taxa de clivagem (baixa e alta). São Paulo, 2016.

Parâmetro	Sêmen bovino		
	Baixa Clivagem	Alta Clivagem	P
Viável (%)	41,2 $\pm$ 2,9	43,7 $\pm$ 2,3	0,5013
Apoptótico (%)	18,3 $\pm$ 1,9	16,8 $\pm$ 1,6	0,5440
Necrótico (%)	40,3 $\pm$ 3,3	39,4 $\pm$ 2,3	0,8303
Fragmentação de DNA (%)	0,2 $\pm$ 0,0	0,2 $\pm$ 0,0	0,3616

Viável (FITC-FMK-VAD-/PI-); apoptótico (FITC-FMK-VAD+/PI-); necrótico (FITC-FMK-VAD+/PI+ e FITC-FMK-VAD-/PI+).

Na Tabela 8 estão apresentadas as médias e erro-padrão das proporções de espermatozoides não capacitados, capacitados e com reação acrossomal (reagidos) detectados com o uso da sonda fluorescente CTC e da proporção de espermatozoides ligados por mm² de membrana perivitelínica de ovo de galinha, na comparação entre amostras seminais de touros que apresentam baixa (BC) e alta taxa de clivagem (AC).

Tabela 8- Média $\pm$ erro-padrão do percentual de espermatozoides classificados de acordo com a ocorrência de capacitação espermática e reação acrossomal, avaliados com o ensaio da Clortetraciclina em microscopia de fluorescência e do número de espermatozoides/mm² de membrana, pelo teste de ligação de espermatozoides em membrana perivitelínica de ovo de galinha, avaliado em microscopia de contraste de fase, no sêmen congelado/descongelado de touros agrupados pela taxa de clivagem (baixa e alta). São Paulo, 2016.

Parâmetro	Sêmen bovino		
	Baixa Clivagem	Alta Clivagem	P
Não capacitado (%)	50,1 $\pm$ 3,9	49,9 $\pm$ 3,1	0,9764
Capcitado (%)	44,5 $\pm$ 3,6	44,4 $\pm$ 3,1	0,9748
Acrossomo reagido (%)	5,3 $\pm$ 0,6	5,6 $\pm$ 0,6	0,7388
Espermatozoides/mm²	89,0 $\pm$ 12,3	73,0 $\pm$ 11,2	0,3253

6.2 Comparação dos grupos para taxa de blastocisto

A comparação dos resultados dos parâmetros de cinética espermática avaliados por CASA entre os grupos BB e AB, estão apresentados, respectivamente, na Tabela 9.

Na avaliação da morfologia espermática os grupos de BB e AB não apresentaram diferenças em nenhuma das classificações, assim como na avaliação a susceptibilidade dos espermatozoides ao estresse oxidativo, avaliado pelo teste de TBARS induzido (Tabela 10).

A proporção de espermatozoides classificados quanto a integridade de membrana plasmática e o status acrossomal, avaliados com o uso da sonda FITC-PSA associada ao PI foi semelhante nos grupos BB e AB (Tabela 11).

Tabela 9- Média $\pm$ erro padrão dos parâmetros de cinética espermática avaliados em sistema computadorizado (CASA), no sêmen congelado/descongelado de touros agrupados pela taxa de blastocisto (baixa e alta). São Paulo, 2016.

Parâmetro	Sêmen bovino		
	Baixo Blastocisto	Alto Blastocisto	P
MT (%)	52,8 $\pm$ 3,7	50,4 $\pm$ 3,5	0,6393
MP (%)	39,2 $\pm$ 3,0	33,5 $\pm$ 2,5	0,1533
VAP ($\mu\text{m/s}$)	87,1 $\pm$ 3,4	95,4 $\pm$ 3,0	0,0547
VSL ($\mu\text{m/s}$)	73,9 $\pm$ 2,9	74,9 $\pm$ 2,9	0,7844
VCL ($\mu\text{m/s}$)	155,7 $\pm$ 7,3	185,4 $\pm$ 7,2	0,0059
ALH (μm)	6,6 $\pm$ 0,3	8,3 $\pm$ 0,3	0,0004
BCF (Hz)	34,0 $\pm$ 1,0	28,6 $\pm$ 0,9	0,0003
STR (%)	84,2 $\pm$ 1,1	78,3 $\pm$ 1,3	0,0012
LIN (%)	50,2 $\pm$ 1,5	42,2 $\pm$ 1,3	0,0002
WOB (%)	56,8 $\pm$ 1,3	52,0 $\pm$ 1,0	0,0052
DNC (μm^2)	1.081,7 $\pm$ 99,6	1.585,8 $\pm$ 116,2	0,0009
Rapid (%)	46,0 $\pm$ 3,5	45,5 $\pm$ 3,2	0,9211
Medium (%)	6,8 $\pm$ 0,8	5,0 $\pm$ 0,7	0,1007
Slow (%)	16,8 $\pm$ 2,1	17,6 $\pm$ 2,6	0,9192
Static (%)	30,4 $\pm$ 4,0	32,0 $\pm$ 4.0	0,7799

MT- Motilidade Total; MP- Motilidade Progressiva; VAP- Velocidade de trajeto; VSL- Velocidade progressiva; VCL- Velocidade curvilinear; ALH- Amplitude lateral da cabeça; BCF- Frequência de batimento; STR- Retilinearidade; LIN- Linearidade; WOB- Wobble= (VAP/VCL) $\times$ 100; DNC- Dance= VCL $\times$ ALH; Rapid- Espermatozoides com velocidade rápida, Medium- Espermatozoides com velocidade média; Slow- Espermatozoides com velocidade lenta; Static- Espermatozoides estáticos.

Tabela 10- Média $\pm$ erro padrão na avaliação seminal de concentração espermática, morfologia espermática e susceptibilidade dos espermatozoides ao estresse oxidativo pela técnica de TBARS induzido, no sêmen congelado/descongelado de touros agrupados pela taxa de blastocisto (baixa e alta). São Paulo, 2016.

Parâmetro	Sêmen bovino		
	Baixo Blastocisto	Alto Blastocisto	P
Defeitos Menores (%)	6,9 $\pm$ 0,5	8,3 $\pm$ 0,6	0,0876
Defeitos Maiores (%)	8,2 $\pm$ 1,2	7,1 $\pm$ 0,7	0,4335
Defeitos totais (%)	15,4 $\pm$ 1,2	15,4 $\pm$ 0,8	0,9649
TBARS (ng/mL)	996,1 $\pm$ 100,6	953,6 $\pm$ 94,8	0,7599

TBARS- Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico

Tabela 11- Média $\pm$ erro-padrão do percentual de espermatozoides classificados de acordo com a integridade de membrana plasmática e status acrossomal, detectados simultaneamente com o uso das sondas fluorescentes FITC-PSA e PI e leitura em citometria de fluxo, no sêmen congelado/descongelado de touros agrupados pela taxa de blastocisto (baixa e alta). São Paulo, 2016.

Parâmetro	Sêmen bovino		
	Baixo Blastocisto	Alto Blastocisto	P
MP e acrossomo íntegros (%)	61,43 $\pm$ 2,8	60,9 $\pm$ 4,0	0,9095
MP íntegra e acrossomo reagido (%)	7,1 $\pm$ 2,4	6,6 $\pm$ 1,9	0,6262
MP lesada e acrossomo íntegro (%)	16,6 $\pm$ 0,9	14,5 $\pm$ 1,2	0,0743
MP lesada e acrossomo reagido (%)	16,2 $\pm$ 1,5	17,2 $\pm$ 3,0	0,6810

MP- Membrana plasmática

Na avaliação da atividade mitocondrial pelo método de DAB, a proporção de espermatozoides com alta, intermediária, baixa e ausência de atividade não se diferenciaram nos grupos de BB e AB (Tabela 12)

Tabela 12- Média $\pm$ erro-padrão do percentual de espermatozoides classificados de acordo com as classes de atividade mitocondrial (I a IV) detectadas pelo método da 3,3'-diaminobenzidina (DAB) no sêmen congelado/descongelado de touros agrupados pela taxa de blastocisto (baixa e alta). São Paulo, 2016.

Parâmetro	Sêmen bovino		
	Baixo Blastocisto	Alto Blastocisto	P
DAB I (%)	82,0 $\pm$ 2,2	74,9 $\pm$ 3,7	0,1403
DAB II (%)	9,3 $\pm$ 1,1	11,2 $\pm$ 1,4	0,3021
DAB III (%)	3,2 $\pm$ 0,6	4,1 $\pm$ 0,8	0,3895
DAB IV (%)	5,4 $\pm$ 1,2	9,7 $\pm$ 3,2	0,2143

DAB I- alta, DAB II- intermediária, DAB III- baixa, DAB IV-ausente

Não houve diferença entre os grupos BB e AB na proporção de espermatozoides com alto, intermediário e baixo potencial de membrana mitocondrial, avaliado com a sonda fluorescente JC-1 (Tabela 13).

Tabela 13- Média $\pm$ erro-padrão do percentual de espermatozoides classificados de acordo com o potencial de membrana mitocondrial, detectado pela sonda fluorescente JC-1 e leitura em citometria de fluxo no sêmen congelado/descongelado de touros agrupados pela taxa de blastocisto (baixa e alta). São Paulo, 2016.

Potencial de membrana mitocondrial	Sêmen bovino		
	Baixo Blastocisto	Alto Blastocisto	P
Alto (%)	28,8 $\pm$ 3,6	29,9 $\pm$ 4,0	0,7780
Intermediário (%)	31,0 $\pm$ 3,9	28,4 $\pm$ 3,9	0,8176
Baixo (%)	40,1 $\pm$ 2,8	41,5 $\pm$ 3,5	0,7451

A avaliação da viabilidade espermática e presença de estresse oxidativo avaliados com a associação das sondas fluorescentes CellROX™ green e PI e detecção de ânion superóxido mitocondrial pela intensidade da sonda MitoSOX™ Red não foram capazes de distinguir touros de alto e baixo desempenho, classificados pela taxa de blastocisto (Tabela 14).

O grupo de BB apresentou quantidade superior de ânion superóxido, observado pela maior intensidade de fluorescência da sonda DHE em citometria de fluxo, conforme demonstrado na Tabela 14.

Tabela 14- Média $\pm$ erro-padrão do percentual de espermatozoides classificados de acordo com a viabilidade e presença de estresse oxidativo, avaliados simultaneamente com o uso das sondas fluorescentes CellROX™ green e PI e da intensidade de fluorescência detectada com o uso das sondas MitoSOX™ Red, para a avaliação de EROs de origem mitocondrial e Dihidroetídio (DHE) para avaliação de ânion superóxido e leitura em citometria de fluxo, no sêmen congelado/descongelado de touros agrupados pela taxa de blastocisto (baixa e alta). São Paulo, 2016.

Parâmetro	Sêmen bovino		
	Baixo Blastocisto	Alto Blastocisto	P
Membrana íntegra sem estresse oxidativo (%)	23,3 $\pm$ 1,8	23,8 $\pm$ 2,7	0,9874
Membrana íntegra com estresse oxidativo (%)	21,7 $\pm$ 1,9	23,6 $\pm$ 2,4	0,5413
Membrana lesada sem estresse oxidativo (%)	52,1 $\pm$ 2,3	49,8 $\pm$ 3,4	0,5587
Membrana lesada com estresse oxidativo (%)	2,8 $\pm$ 0,3	2,8 $\pm$ 0,6	0,4000
MitoSOX™ Red*	9.969,6 $\pm$ 1.504,8	11.540,4 $\pm$ 1.506,0	0,5265
DHE*	42.579,31 $\pm$ 2.181,7	34.105,0 $\pm$ 1.854,3	0,0057

Membrana íntegra sem estresse oxidativo (CellROX-/PI-); Membrana íntegra com estresse oxidativo (CellROX+/PI-); Membrana lesada sem estresse oxidativo (CellROX-/PI+); Membrana lesada com estresse oxidativo (CellROX+/PI+).

*Intensidade de fluorescência.

As proporções de espermatozoides viáveis, apoptóticos e necróticos detectados pelas sondas FITC-VAD-FMK/PI foram semelhantes entre os grupos BB e AB, assim como a proporção de espermatozoides com fragmentação de DNA, detectado pela avaliação da cromatina espermática (Tabela 15).

Tabela 15- Média $\pm$ erro-padrão do percentual de espermatozoides classificados de acordo com a viabilidade e ativação de caspase, avaliados simultaneamente com o uso do kit FITC-VAD-FMK e a sonda fluorescente PI e o percentual de espermatozoides com fragmentação de DNA pelo ensaio de susceptibilidade da cromatina à denaturação ácida, ambos com leitura em citometria de fluxo, no sêmen congelado/descongelado de touros agrupados pela taxa de blastocisto (baixa e alta). São Paulo, 2016.

Parâmetro	Sêmen bovino		
	Baixo Blastocisto	Alto Blastocisto	P
Viável (%)	45,0 $\pm$ 2,8	43,0 $\pm$ 2,2	0,5875
Apoptótico (%)	18,4 $\pm$ 1,2	19,4 $\pm$ 1,7	0,6254
Necrótico (%)	36,6 $\pm$ 2,7	37,5 $\pm$ 1,8	0,7765
Fragmentação de DNA (%)	0,2 $\pm$ 0,0	0,3 $\pm$ 0,0	0,5116

Viável (FITC-FMK-VAD-/PI-); apoptótico (FITC-FMK-VAD+/PI-); necrótico (FITC-FMK-VAD+/PI+ e FITC-FMK-VAD-/PI+).

Na Tabela 16 estão apresentadas as médias e erro-padrão das proporções de espermatozoides não capacitados, capacitados e com reação acrossomal (reagidos) detectados com o uso da sonda fluorescente CTC e da proporção de espermatozoides ligados por mm² de membrana perivitelínica de ovo de galinha, na comparação entre amostras seminais de touros que apresentam baixa (BC) e alta taxa de clivagem (AC).

Tabela 16- Média $\pm$ erro-padrão do percentual de espermatozoides classificados de acordo com a ocorrência de capacitação espermática e reação acrossomal, avaliados com o ensaio da Clortetraciclina em microscopia de fluorescência e do número de espermatozoides/mm² de membrana, pelo teste de ligação de espermatozoides em membrana perivitelínica de ovo de galinha, avaliado em microscopia de contraste de fase, no sêmen congelado/descongelado de touros agrupados pela taxa de blastocisto (baixa e alta). São Paulo, 2016.

Parâmetro	Sêmen bovino		
	Baixo Blastocisto	Alto Blastocisto	P
Não capacitado (%)	52,6 $\pm$ 3,2	56,2 $\pm$ 3,1	0,4269
Capcitado (%)	42,1 $\pm$ 3,1	38,4 $\pm$ 3,0	0,3919
Acrossomo reagido (%)	5,2 $\pm$ 0,6	5,3 $\pm$ 0,5	0,8245
Espermatozoides/mm²	77,0 $\pm$ 12,9	61,7 $\pm$ 10,0	0,6033

6.3 Modelo preditivo para as taxas de clivagem e de blastocisto

Por meio de regressão logística multivariada, obteve-se que a taxa de clivagem sofre efeito dos parâmetros do CASA: VCL e BCF e do percentual de espermatozoides com integridade de membrana e sem estresse oxidativo (MINE), avaliados pela associação entre as sondas CellROX™ green e PI em citometria de fluxo, como apresentados na Tabela 17.

Tabela 17- Estimativa e erro-padrão dos atributos espermáticos incluídos no modelo preditivo para obtenção da taxa de clivagem na produção *in vitro* de embriões bovinos. São Paulo, 2016.

Atributo	Estimativa	Erro Padrão	P
Intercept	0,9301	0,2087	0,0005
VCL	0,0026	0,0008	0,0052
BCF	-0,0271	0,0049	<,0001
MINE	0,0044	0,0022	0,0721

VCL- Velocidade curvilinear; BCF- Frequência de batimento; MINE- Membrana íntegra sem estresse oxidativo

Deste modo, a predição da taxa de clivagem é representada pela equação:

$$\text{Taxa de clivagem} = 0.9301 + (\text{VCL} * 0.0026) + (\text{BCF} * -0.0271) + (\text{MINE} * 0.0044)$$

Com o mesmo método estatístico, foi determinado que a taxa de blastocisto sofre efeito do percentual de defeitos menores (DEFMEN) na avaliação da morfologia espermática, VSL, detectado por CASA, DABIII (baixa atividade mitocondrial) pelo método citoquímico e DHE avaliado em citometria de fluxo como apresentados na Tabela 18.

Tabela 18- Estimativa e erro-padrão dos atributos espermáticos incluídos no modelo preditivo para obtenção da taxa de blastocisto na produção *in vitro* de embriões bovinos. São Paulo, 2016.

Parâmetro	Estimativa	Erro-padrão	P
Intercept	-0,0058	0,1680	0,9728
DEFMEN	0,0377	0,0084	0,0005
VSL	0,0034	0,0013	0,0267
DABIII	0,0234	0,0060	0,0015
DHE	-0,000007	0,000002	0,0140

DEFMEN- Percentual de defeitos menores; VSL- Velocidade progressiva; DABIII- Baixa atividade mitocondrial; DHE- Dihidroetídio

Deste modo, a predição da taxa de blastocisto é representada pela equação:

$$\text{Taxa de blastocisto} = -0,0058 + (\text{DEFMEN} * 0,0377) + (\text{VSL} * 0,0034) + (\text{DABIII} * 0,0234) + (\text{DHE} * -0,000007)$$

As duas equações foram utilizadas para estimar as taxas esperadas de clivagem e de blastocisto. Para comparar as observações obtidas com as esperadas foi aplicado o teste de correlação de Pearson, obtendo-se $r=0,56$ ($P=0,009$) para as taxas de clivagem (Figura 2) e $r=0,44$ ($P=0,04$) para as taxas de blastocisto (Figura 3).

Figura 2- Diagrama de dispersão da correlação entre as taxas de clivagem real e esperada (modelo preditivo) obtidas com amostras de sêmen, em duplicata (n=20), de touros ($r=0,56$, $P=0,009$). A linha indica uma tendência nos dados.

Figura 3- Diagrama de dispersão da correlação entre as taxas de blastocisto real e esperada (modelo preditivo) obtidas com amostras de sêmen, em duplicata (n=20), de touros ($r = 0,44$, $P=0,04$). A linha indica uma tendência nos dados.

6.4 Subpopulações espermáticas

Por meio da Análise de Principal Componente (PCA) foram obtidos 3 principais componentes com Autovalores acima de um (PC1, PC2 e PC3). Na avaliação Pré-Percoll®, em todos os grupos (AC, AB, BC e BB) foram observados PC1 e PC2, assim como no grupo AB pós-Percoll®, enquanto nos grupos AC, BC e BB, na avaliação Pós-Percoll® obteve-se PC1, PC2 e PC3 (Tabela 19).

Considerando os valores da cinética espermática, o primeiro principal componente (PC1) apresenta movimentos rápidos não-lineares, o segundo principal componente (PC2) representa movimentos lentos e lineares e o terceiro principal componente (PC3) apresenta movimentos oscilatórios. Os três principais componentes entraram no agrupamento não hierárquico para a formação das subpopulações nos momentos Pré e Pós-Percoll®.

Quatro subpopulações espermáticas foram definidas pela aplicação do método estatístico Cluster baseada na distância Euclideana (k-means).

De forma individualizada, para os parâmetros da cinética espermática (VAP, VSL, VCL, ALH, BCF, STR, LIN, WOB e DANCE) em CASA, foram avaliados 5.072 espermatozoides no grupo BC Pré-Percoll®, 7.955 espermatozoides no grupo AC Pré-Percoll®, 2.173 espermatozoides no grupo BC Pós-Percoll®, 2.854 espermatozoides no grupo AC Pós-Percoll®, 5.389 espermatozoides no grupo BB Pré-Percoll®, 8.927 espermatozoides no grupo AB Pré-Percoll®, 3.093 espermatozoides no grupo BB Pós-Percoll® e 2.782 espermatozoides no grupo AB Pós-Percoll®. As descrições das características dos movimentos espermáticos e dos parâmetros da cinética espermática para determinar as subpopulações estão apresentadas na Tabela 20 e os resultados das subpopulações nos diferentes grupos e momentos de avaliação nas Tabelas de 21 a 28.

Tabela 19- Resumo dos resultados da Análise de Componentes Principais (PCA) dos dados da cinética espermática. São Paulo, 2016.

		Pré-Percoll®								Pós-Percoll®										
		AC		AB		BC		BB		AC		AB		BC		BB				
		PC1	PC2	PC1	PC2	PC1	PC2	PC1	PC2	PC1	PC2	PC3	PC1	PC2	PC1	PC2	PC3	PC1	PC2	PC3
Autovalores		4,31	2,94	4,32	2,92	4,19	2,90	4,07	3,10	4,01	2,95	1,01	4,10	2,95	3,91	3,15	1,02	4,39	2,75	1,00
Variação explicada*		47,89	32,6	47,9	32,4	46,6	32,1	45,2	34,4	44,6	32,8	11,2	45,4	32,8	43,4	35,0	11,3	48,8	30,5	11,1
Autovetores**	VAP	0,47	0,02	0,46	0,05	0,47	0,02	0,48	0,03	0,47	0,07	0,11	0,46	0,07	0,48	0,08	0,12	0,46	-0,02	0,10
	VSL	0,43	0,19	0,42	0,22	0,44	0,18	0,44	0,20	0,43	0,25	0,11	0,43	0,23	0,42	0,25	0,12	0,45	0,13	0,13
	VCL	0,46	-0,14	0,47	-0,10	0,46	-0,16	0,41	-0,17	0,46	-0,17	0,10	0,46	-0,16	0,47	-0,17	0,09	0,42	-0,26	0,08
	ALH	0,38	-0,27	0,40	-0,23	0,38	-0,28	0,36	-0,32	0,39	-0,30	-0,10	0,40	-0,28	0,38	-0,32	-0,12	0,32	-0,40	-0,06
	BCF	-0,17	-0,16	-0,18	-0,18	-0,09	-0,14	-0,10	-0,04	-0,09	0,03	0,97	-0,11	-0,07	-0,08	-0,01	0,97	-0,09	0,02	0,97
	STR	0,07	0,49	0,02	0,50	0,06	0,50	0,11	0,48	0,15	0,44	-0,05	0,13	0,45	0,13	0,45	-0,08	0,24	0,40	0,01
	LIN	0,09	0,56	0,04	0,57	0,13	0,56	0,14	0,54	0,12	0,55	-0,05	0,10	0,56	0,11	0,54	-0,02	0,25	0,50	-0,02
	WOB	0,12	0,48	0,08	0,49	0,17	0,47	0,15	0,47	0,08	0,48	-0,07	0,07	0,50	0,09	0,48	-0,04	0,21	0,46	-0,09
DNC		0,43	-0,22	0,44	-0,18	0,42	-0,24	0,41	-0,28	0,42	-0,27	-0,01	0,42	-0,24	0,42	-0,26	-0,03	0,36	-0,36	-0,02

*Variação explicada é a proporção do total da variação explicada para cada principal componente

**Os autovetores são uma medida da associação dos parâmetros originais com os resultados dos principais componentes.

AC – Grupo com alta taxa de clivagem; BC – Grupo com baixa taxa de clivagem; AB – Grupo com alta taxa de blastocisto; BB – Grupo com baixa taxa de blastocisto

PC1 – principal componente 1; PC2 – principal componente 2; PC3 – principal componente 3;

VAP – Velocidade de trajeto; VSL- Velocidade progressiva; VCL – Velocidade curvilinear; ALH – amplitude de deslocamento lateral de cabeça; BCF – frequência de batimento do flagelo; STR - Retilinearidade; LIN – Linearidade; WOB – Wobble = (VAP/VCL) x 100; DNC – Dance = VCL x ALH.

Tabela 20- Descrições das características dos movimentos espermáticos e dos parâmetros da cinética espermática para determinação das subpopulações. São Paulo, 2016.

SUBPOPULAÇÕES	Características dos movimentos espermáticos	Características dos parâmetros da cinética espermática
1- Rápidos e Progressivos	Espermatozoides rápidos, progressivos, lineares e com alta oscilação.	- VCL, VSL, VAP, LIN, STR, ALH, WOB e DANCE apresentam valores altos.
2- Hiperativados	Espermatozoides hiperativados- rápidos, sinuosos com baixa linearidade	- VCL, VSL, VAP, ALH e DANCE apresentam valores altos. - LIN com valores baixos.
3- Lentos e Sinuosos	Espermatozoides lentos com baixa progressividade e linearidade e alta oscilação	- VAP e VCL com valores mais baixos - LIN e STR com valores intermediários baixo - BCF com valores altos
4- Lentos e Progressivos	Espermatozoides lentos, porém, progressivos e lineares, com trajetória de baixa sinuosidade	- VAP, VCL, DANCE, ALH com valores baixos - STR, LIN e WOB com valores altos

VAP- Velocidade de trajeto; VSL- Velocidade progressiva; VCL- Velocidade curvilinear; ALH- amplitude de deslocamento lateral de cabeça; BCF- frequência de batimento do flagelo; STR- Retilinearidade; LIN- Linearidade; WOB- Wobble = $(VAP/VCL) \times 100$; DNC- Dance = $VCL \times ALH$.

Tabela 21- Número (n) e percentual de espermatozoides (%) distribuídos em cada subpopulação (total de 5.072 espermatozoides) e média dos parâmetros de cinética espermática, determinados por CASA, que caracterizam as subpopulações no sêmen de touros com Baixa Taxa de Clivagem (BC) logo após a descongelação (Pré-Percoll®). São Paulo, 2016.

PARÂMETRO	SUBPOPULAÇÃO			
	1	2	3	4
n	1027	315	1746	1984
%	20,2	6,2	34,4	39,1
VAP($\mu\text{m/s}$)	95,1 ^b	137,4 ^a	25,3 ^d	58,9 ^c
VSL($\mu\text{m/s}$)	69,7 ^b	93,9 ^a	16,6 ^d	53,0 ^c
VCL($\mu\text{m/s}$)	174,0 ^b	262,1 ^a	58,6 ^d	85,3 ^c
ALH(μm)	8,7 ^b	13,1 ^a	3,3 ^c	3,5 ^c
BCF(Hz)	30,8 ^b	28,2 ^b	36,2 ^a	30,8 ^b
STR(%)	70,6 ^b	66,4 ^c	67,2 ^{bc}	89,6 ^a
LIN(%)	39,2 ^b	35,5 ^b	29,5 ^c	61,9 ^a
WOBBLE(%)	54,4 ^b	52,2 ^b	43,3 ^c	68,8 ^a
DANCE(μm^2)	1492,2 ^b	3392,5 ^a	247,4 ^d	359,7 ^c

Médias seguidas de diferentes letras minúsculas na mesma linha diferem entre si ($P < 0,05$);

VAP- Velocidade de trajeto; VSL- Velocidade progressiva; VCL- velocidade curvilínea; ALH- amplitude de deslocamento lateral de cabeça; BCF- frequência de batimento do flagelo; STR- Retilinearidade; LIN- Linearidade; WOB- Wobble = $(\text{VAP}/\text{VCL}) \times 100$; DNC- Dance = $\text{VCL} \times \text{ALH}$.

Tabela 22- Número (n) e percentual de espermatozoides (%) distribuídos em cada subpopulação (total de 7.955 espermatozoides) e média dos parâmetros de cinética espermática, determinados por CASA, que caracterizam as subpopulações no sêmen de touros com Alta Taxa de Clivagem (AC) logo após a descongelação (Pré-Percoll®). São Paulo, 2016.

PARÂMETRO	SUBPOPULAÇÃO			
	1	2	3	4
n	1721	712	2733	2789
%	21,6	8,9	34,4	35,1
VAP($\mu\text{m/s}$)	106,5 ^b	138,4 ^a	30,9 ^d	59,4 ^c
VSL($\mu\text{m/s}$)	79,3 ^b	91,4 ^a	19,2 ^d	52,4 ^c
VCL($\mu\text{m/s}$)	191,4 ^b	273,3 ^a	70,9 ^d	87,8 ^c
ALH(μm)	9,2 ^b	13,0 ^a	4,2 ^d	3,8 ^c
BCF(Hz)	25,8 ^c	24,6 ^c	34,6 ^a	27,6 ^b
STR(%)	72,6 ^b	65,1 ^c	62,5 ^c	87,7 ^a
LIN(%)	40,7 ^b	33,3 ^c	27,5 ^c	59,8 ^a
WOBBLE(%)	55,3 ^b	50,4 ^c	43,3 ^d	67,8 ^a
DANCE(μm^2)	1754,5 ^b	3544,6 ^a	361,8 ^c	395,8 ^c

Médias seguidas de diferentes letras minúsculas na mesma linha diferem entre si ($P < 0,05$);

VAP- Velocidade de trajeto; VSL- Velocidade progressiva; VCL- velocidade curvilínea; ALH- amplitude de deslocamento lateral de cabeça; BCF- frequência de batimento do flagelo; STR- Retilinearidade; LIN- Linearidade; WOB- Wobble = $(\text{VAP}/\text{VCL}) \times 100$; DNC- Dance = $\text{VCL} \times \text{ALH}$.

Tabela 23- Número (n) e percentual de espermatozoides (%) distribuídos em cada subpopulação (total de 5.389 espermatozoides) e média dos parâmetros de cinética espermática, determinados por CASA, que caracterizam as subpopulações no sêmen de touros com Baixa Taxa de Blastocisto (BB) logo após a descongelação (Pré-Percoll®). São Paulo, 2016.

PARÂMETROS	SUBPOPULAÇÕES			
	1	2	3	4
n	1186	270	1366	2567
%	22,0	5,0	25,3	47,6
VAP(µm/s)	84,1 ^b	118,1 ^a	25,9 ^d	59,5 ^c
VSL(µm/s)	66,7 ^b	81,9 ^a	16,7 ^d	54,9 ^c
VCL(µm/s)	147,3 ^b	229,5 ^a	58,9 ^d	83,9 ^c
ALH(µm)	7,2 ^b	11,3 ^a	3,3 ^c	3,2 ^c
BCF(Hz)	31,9 ^{bc}	29,2 ^c	37,9 ^a	34,5 ^{ab}
STR(%)	77,3 ^b	68,5 ^c	65,5 ^c	91,9 ^a
LIN(%)	44,6 ^b	35,6 ^c	29,2 ^d	65,4 ^a
WOBBLE(%)	57,0 ^b	51,4 ^c	43,8 ^d	70,9 ^a
DANCE(µm ²)	1061,6 ^b	2597,3 ^a	229,7 ^c	295,0 ^c

Médias seguidas de diferentes letras minúsculas na mesma linha diferem entre si (P < 0,05);

VAP- Velocidade de trajeto; VSL- Velocidade progressiva; VCL- velocidade curvilínea; ALH- amplitude de deslocamento lateral de cabeça; BCF- frequência de batimento do flagelo; STR- Retilinearidade; LIN- Linearidade; WOB- Wobble = (VAP/VCL) x 100; DNC- Dance = VCL x ALH.

Tabela 24- Número (n) e percentual de espermatozoides (%) distribuídos em cada subpopulação (total de 8.927 espermatozoides) e média dos parâmetros de cinética espermática, determinados por CASA, que caracterizam as subpopulações no sêmen de touros com Alta Taxa de Blastocisto (AB) logo após a descongelação (Pré-Percoll®). São Paulo, 2016.

PARÂMETROS	SUBPOPULAÇÕES			
	1	2	3	4
n	2082	852	2948	3045
%	23,3	9,5	33,0	34,1
VAP(µm/s)	102,1 ^b	138,2 ^a	31,8 ^d	57,5 ^c
VSL(µm/s)	73,5 ^b	90,0 ^a	19,8 ^d	49,8 ^c
VCL(µm/s)	189,1 ^b	271,2 ^a	73,1 ^d	86,9 ^c
ALH(µm)	9,2 ^b	12,9 ^a	4,3 ^c	3,8 ^d
BCF(Hz)	25,9 ^b	25,2 ^b	34,7 ^a	27,7 ^b
STR(%)	70,6 ^b	64,3 ^c	62,4 ^c	86,6 ^a
LIN(%)	38,3 ^b	33,0 ^c	27,3 ^c	57,8 ^a
WOBBLE(%)	53,6 ^b	50,8 ^b	43,1 ^c	66,5 ^a
DANCE(µm ²)	1731,4 ^b	3501,3 ^a	372,9 ^c	398,0 ^c

Médias seguidas de diferentes letras minúsculas na mesma linha diferem entre si (P < 0,05);

VAP- Velocidade de trajeto; VSL- Velocidade progressiva; VCL- velocidade curvilínea; ALH- amplitude de deslocamento lateral de cabeça; BCF- frequência de batimento do flagelo; STR- Retilinearidade; LIN- Linearidade; WOB- Wobble = (VAP/VCL) x 100; DNC- Dance = VCL x ALH.

Tabela 25- Número (n) e percentual de espermatozoides (%) distribuídos em cada subpopulação (total de 2.173 espermatozoides) e média dos parâmetros de cinética espermática, determinados por CASA, que caracterizam as subpopulações no sêmen de touros com Baixa Taxa de Clivagem (BC) após centrifugação em gradiente de Percoll® (Pós-Percoll®). São Paulo, 2016.

PARÂMETROS	SUBPOPULAÇÕES			
	1	2	3	4
n	749	182	613	629
%	34,5	8,4	28,2	28,9
VAP(µm/s)	103,5 ^b	141,7 ^a	42,4 ^d	90,4 ^c
VSL(µm/s)	78,1 ^b	93,9 ^a	27,6 ^c	81,9 ^b
VCL(µm/s)	217,5 ^b	314,9 ^a	103,0 ^d	133,4 ^c
ALH(µm)	9,8 ^b	14,3 ^a	5,1 ^c	4,7 ^c
BCF(Hz)	31,2 ^b	29,4 ^b	36,6 ^a	33,0 ^{ab}
STR(%)	73,5 ^b	64,5 ^c	63,2 ^c	89,6 ^a
LIN(%)	35,3 ^b	29,5 ^{bc}	26,8 ^c	61,6 ^a
WOBBLE(%)	47,2 ^b	44,9 ^{bc}	41,4 ^c	68,4 ^a
DANCE(µm ²)	2131,4 ^b	4529,8 ^a	617,2 ^c	743,0 ^c

Médias seguidas de diferentes letras minúsculas na mesma linha diferem entre si (P < 0,05);

VAP- Velocidade de trajeto; VSL- Velocidade progressiva; VCL- velocidade curvilínea; ALH- amplitude de deslocamento lateral de cabeça; BCF- frequência de batimento do flagelo; STR- Retilinearidade; LIN- Linearidade; WOB- Wobble = (VAP/VCL) x 100; DNC- Dance = VCL x ALH.

Tabela 26- Número (n) e percentual de espermatozoides (%) distribuídos em cada subpopulação (total de 2.854 espermatozoides) e média dos parâmetros de cinética espermática, determinados por CASA, que caracterizam as subpopulações no sêmen de touros com Alta Taxa de Clivagem (AC) após centrifugação em gradiente de Percoll® (Pós-Percoll®). São Paulo, 2016.

PARÂMETROS	SUBPOPULAÇÕES			
	1	2	3	4
n	1173	325	723	633
%	41,1	11,4	25,3	22,2
VAP(µm/s)	106,1 ^b	134,8 ^a	43,5 ^d	94,0 ^c
VSL(µm/s)	80,5 ^b	92,9 ^a	28,9 ^c	81,4 ^b
VCL(µm/s)	230,4 ^b	319,0 ^a	106,8 ^d	145,6 ^c
ALH(µm)	10,5 ^b	14,7 ^a	5,2 ^c	5,3 ^c
BCF(Hz)	31,4 ^b	30,4 ^b	37,4 ^a	33,6 ^b
STR(%)	74,6 ^b	67,7 ^c	63,9 ^c	86,1 ^a
LIN(%)	34,5 ^b	29,0 ^c	26,3 ^c	56,6 ^a
WOBBLE(%)	45,8 ^b	42,2 ^b	40,5 ^b	65,4 ^a
DANCE(µm ²)	2415,6 ^b	4697,8 ^a	677,5 ^d	895,5 ^c

Médias seguidas de diferentes letras minúsculas na mesma linha diferem entre si (P < 0,05);

VAP- Velocidade de trajeto; VSL- Velocidade progressiva; VCL- velocidade curvilínea; ALH- amplitude de deslocamento lateral de cabeça; BCF- frequência de batimento do flagelo; STR- Retilinearidade; LIN- Linearidade; WOB- Wobble = (VAP/VCL) x 100; DNC- Dance = VCL x ALH.

Tabela 27- Número (n) e percentual de espermatozoides (%) distribuídos em cada subpopulação (total de 3.093 espermatozoides) e média dos parâmetros de cinética espermática, determinados por CASA, que caracterizam as subpopulações no sêmen de touros com Baixa Taxa de Blastocisto (BB) após centrifugação em gradiente de Percoll® (Pós-Percoll®). São Paulo, 2016.

PARÂMETROS	SUBPOPULAÇÕES			
	1	2	3	4
n	1085	281	949	778
%	35,1	9,1	30,7	25,1
VAP(µm/s)	114,0 ^b	139,1 ^a	35,0 ^d	93,7 ^c
VSL(µm/s)	93,6 ^{ab}	100,7 ^a	23,3 ^c	87,2 ^b
VCL(µm/s)	218,9 ^b	303,3 ^a	84,9 ^d	134,8 ^c
ALH(µm)	9,5 ^b	13,6 ^a	4,2 ^c	4,6 ^c
BCF(Hz)	32,7 ^{bc}	29,9 ^c	40,5 ^a	35,1 ^{ab}
STR(%)	79,9 ^b	71,0 ^{bc}	64,0 ^c	91,4 ^a
LIN(%)	41,9 ^b	33,2 ^c	26,9 ^c	64,3 ^a
WOBBLE(%)	51,6 ^b	45,7 ^c	41,4 ^c	70,0 ^a
DANCE(µm ²)	2077,0 ^b	4151,9 ^a	442,9 ^d	740,3 ^c

Médias seguidas de diferentes letras minúsculas na mesma linha diferem entre si (P < 0,05);

VAP- Velocidade de trajeto; VSL- Velocidade progressiva; VCL- velocidade curvilínea; ALH- amplitude de deslocamento lateral de cabeça; BCF- frequência de batimento do flagelo; STR- Retilinearidade; LIN- Linearidade; WOB- Wobble = (VAP/VCL) x 100; DNC- Dance = VCL x ALH.

Tabela 28- Número (n) e percentual de espermatozoides (%) distribuídos em cada subpopulação (total de 2.782 espermatozoides) e média dos parâmetros de cinética espermática, determinados por CASA, que caracterizam as subpopulações no sêmen de touros com Alta Taxa de Blastocisto (AB) após centrifugação em gradiente de Percoll® (Pós-Percoll®). São Paulo, 2016.

PARÂMETROS	SUBPOPULAÇÕES			
	1	2	3	4
n	1116	402	605	659
%	40,1	14,4	21,7	23,7
VAP(µm/s)	98,6 ^b	133,9 ^a	34,7 ^d	86,9 ^c
VSL(µm/s)	75,5 ^b	96,0 ^a	22,4 ^c	76,7 ^b
VCL(µm/s)	211,1 ^b	306,8 ^a	87,3 ^d	133,0 ^c
ALH(µm)	9,7 ^b	13,9 ^a	4,4 ^c	5,0 ^c
BCF(Hz)	30,8 ^b	30,6 ^b	39,0 ^a	31,4 ^b
STR(%)	75,6 ^b	70,4 ^b	63,0 ^c	87,5 ^a
LIN(%)	35,5 ^b	31,3 ^{bc}	25,7 ^c	58,0 ^a
WOBBLE(%)	46,4 ^b	43,7 ^{bc}	39,9 ^c	65,9 ^a
DANCE(µm ²)	2060,6 ^b	4288,2 ^a	484,3 ^d	812,6 ^c

Médias seguidas de diferentes letras minúsculas na mesma linha diferem entre si (P < 0,05);

VAP- Velocidade de trajeto; VSL- Velocidade progressiva; VCL- velocidade curvilínea; ALH- amplitude de deslocamento lateral de cabeça; BCF- frequência de batimento do flagelo; STR- Retilinearidade; LIN- Linearidade; WOB- Wobble = (VAP/VCL) x 100; DNC- Dance = VCL x ALH.

Na comparação do percentual de espermatozoides em cada uma das subpopulações entre os grupos relacionados à taxa de clivagem (BC e AC) logo após a descongelação do sêmen (Pré-Percoll®), o grupo AC apresentou maior proporção de espermatozoides da subpopulação 2, hiperativados, enquanto o grupo BC apresentou maior proporção de espermatozoides da subpopulação 4, lentos e progressivos (Tabela 29).

Na avaliação após a centrifugação em gradiente de Percoll® (Pós-Percoll®) o grupo AC, continuou apresentando maior proporção de espermatozoides da subpopulação 2, hiperativados, e maior percentual de espermatozoides da subpopulação 1, rápidos e progressivos em comparação ao grupo BC. Enquanto este, além de maior percentual de subpopulação 4, também teve maior percentual de espermatozoides da subpopulação 3, lentos e sinuosos (Tabela 30).

Tabela 29- Percentual de espermatozoides em cada subpopulação no sêmen de touros de baixa (BC) ou alta taxa de clivagem (AC) logo após a descongelação (Pré-Percoll®). São Paulo, 2016.

Grupo Pré- Percoll®	Subpopulação			
	1	2	3	4
BC (%)	20,2	6,2	34,4	39,1**
AC (%)	21,6	8,9*	34,4	35,1

* (P<0,05); ** (P<0,001) diferença significativa entre os grupos nas distintas subpopulações.
BC= 5.072 espermatozoides; AC= 7.955 espermatozoides.

Tabela 30- Percentual de espermatozoides em cada subpopulação no sêmen de touros de baixa (BC) ou alta taxa de clivagem (AC) após a centrifugação em gradiente de Percoll® (Pós-Percoll®). São Paulo, 2016.

Grupo Pós- Percoll®	Subpopulação			
	1	2	3	4
BC (%)	34,5	8,4	28,2*	28,9*
AC (%)	41,1**	11,4**	25,3	22,2

* (P<0,05); ** (P<0,001) diferença significativa entre os grupos nas distintas subpopulações.
BC=2173 espermatozoides; AC= 2854 espermatozoides.

Na comparação da proporção de espermatozoides em cada uma das subpopulações entre os grupos relacionados à taxa de blastocisto (BB e AB), logo após a descongelação do sêmen (Pré-Percoll®), o grupo AB apresentou maior percentual de espermatozoides da subpopulação 2, hiperativados, e de subpopulação 3, lentos e sinuosos e o grupo BB apresentou maior proporção de espermatozoides da subpopulação 4, lentos e progressivos (Tabela 31).

Na avaliação após a centrifugação em gradiente de Percoll® (Pós-Percoll®) o grupo AB apresentou maior percentual de espermatozoides da subpopulação 2, hiperativados, e de espermatozoides da subpopulação 1, rápidos e progressivos em comparação ao grupo BB. Enquanto este grupo exibiu percentual superior de subpopulação 3, lentos e sinuosos (Tabela 32).

Tabela 31- Percentual de espermatozoides em cada subpopulação no sêmen de touros de baixa (BB) ou alta taxa de blastocisto (AB) logo após a descongelação (Pré-Percoll®). São Paulo, 2016.

Grupo	Subpopulação			
	1	2	3	4
Pré-Percoll®				
BB (%)	22	5	25,3	47,6*
AB (%)	23,3	9,5*	33*	34,1

* (P<0,05); ** (P<0,001) diferença significativa entre os grupos nas distintas subpopulações.
BB= 5389 espermatozoides; AB= 8927 espermatozoides.

Tabela 32- Percentual de espermatozoides em cada subpopulação no sêmen de touros de baixa (BB) ou alta taxa de blastocisto (AB) após a centrifugação em gradiente de Percoll® (Pós-Percoll®). São Paulo, 2016.

Grupo	Subpopulação			
	1	2	3	4
Pós- Percoll®				
BB (%)	35,1	9,1	30,7*	25,1
AB (%)	40,1**	14,4*	21,7	23,7

* (P<0,05); ** (P<0,001) diferença significativa entre os grupos nas distintas subpopulações.
BB= 3.093 espermatozoides; AB= 2.782 espermatozoides.

7. DISCUSSÃO

No presente estudo, optou-se por utilizar o termo desempenho ao invés de fertilidade, por atribuir ao primeiro uma melhor precisão na compreensão dos fenômenos estudados.

O termo fertilidade é utilizado para expressar sucesso na reprodução, contudo diferentes conceitos e parâmetros são utilizados para defini-la, de acordo com o modelo experimental empregado (HAMMERSTEDT, 1996).

Fertilidade na condição de reprodução *in vivo* é expressa, principalmente, pela taxa de não retorno ao cio (JANUSKAUSKAS; JOHANNISSON; RODRIGUEZ-MARTINEZ, 2003; HALLAP et al., 2005), já na produção *in vitro* de embriões pode ser relacionada às taxas de clivagem e de blastocisto (SCHNEIDER; ELLINGTON; WRIGHT, 1999), taxa de ligação e penetração na zona pelúcida e formação de pró-núcleo (FERRAZ et al., 2014).

Esta, provavelmente, é a causa de surgirem incongruências entre os resultados de desempenho reprodutivo obtidos *in vivo* e *in vitro* (SCHNEIDER; ELLINGTON; WRIGHT, 1999). Enquanto a taxa de não retorno ao cio envolve fatores como falha na fecundação, perda embrionária e abortamento, a taxa de clivagem representa o potencial do oócito fecundado passar para o estágio de 2 a 8 células, já a taxa de blastocisto, reflete a habilidade do zigoto em se desenvolver 5 a 7 dias após a fecundação *in vitro*, ultrapassando algumas barreiras biológicas como a reativação da expressão gênica, entre outras (LONERGAN, 1994).

Adicionalmente, diversos são os fatores que interferem no sucesso da produção *in vitro* de embriões bovinos (PALMA; SINOWATZ, 2004; SEIDEL, 2015) como: o oócito (PAVLOK et al., 1988), sua qualidade, maturação e competência oocitária (LEIBFRIED-RUTLEDGE et al., 1989), os meios utilizados (GHYS et al., 2016), o tipo de cultivo (SIRARD; LAMBERT, 1985), o microambiente da PIVE, representados pela temperatura, osmolaridade, exposição a agentes citotóxicos e luz (PALMA; SINOWATZ, 2004), o sêmen (SIRARD; LAMBERT, 1985; FUKUI et al., 1988; SH, 2014) e o método empregado na seleção espermática (SAMARDZIJA et al., 2006).

Apesar da clara influência intrínseca do macho e respectiva qualidade seminal no desempenho da PIVE, evidenciada pela obtenção de distintos resultados, sob a

mesma condição laboratorial, no uso de sêmen de diferentes reprodutores (PALMA; SINOWATZ, 2004; TESARIK; GRECO; MENDOZA, 2004; ALOMAR et al., 2008), ainda não está completamente elucidado até qual dos estágios de desenvolvimento embrionário o espermatozoide exerce sua influência.

Enquanto alguns autores observaram que o touro interfere apenas na taxa de clivagem, dependente da penetração, fecundação e ativação do oócito (SHAMSUDDIN; LARSSON, 1993; ZHANG et al., 1997; ZHANG et al., 1999; WARD et al., 2003; SUDANO et al., 2011), outros afirmam que esta influência está na taxa de blastocisto, referente ao desenvolvimento embrionário inicial (LONERGAN, 1994; PALMA; SINOWATZ, 2004) ou ainda em ambas as taxas (SH, 2014).

Por esta razão, no presente estudo, optou-se por empregar como critério de desempenho na PIVE tanto a taxa de clivagem quanto a de blastocisto. Sendo selecionados em um total de 100 touros utilizados durante 3 anos em um laboratório comercial de PIVE, 5 reprodutores dentre os 10 que apresentavam as menores médias de taxa de clivagem (BC), 5 reprodutores dentre os 10 que apresentavam as maiores médias de taxa de clivagem (AC), 5 touros dentre os 10 que apresentavam menores médias de taxa de blastocisto (BB) e 5 touros dentre os 10 que apresentavam as maiores médias de taxa de blastocisto (AB), sendo os grupos de alta e baixa taxas significativamente diferentes ($P \geq 0,05$).

As diferenças encontradas em alguns atributos espermáticos entre os grupos de alto e baixo desempenho na PIVE tanto nos grupos selecionados pela taxa de clivagem quanto pela taxa de blastocisto, podem indicar que os espermatozoides desempenham importante papel nestas duas etapas da produção de embriões *in vitro*.

Embora se tenham relatos de que a previsibilidade de desempenho *in vitro* por meio da avaliação da qualidade seminal seja mais fidedigna após algum método de seleção espermática (JANUSKAUSKAS et al., 2000; TANGHE et al., 2002) no presente estudo, não houve interação entre os grupos e o momento avaliado (Pré e Pós-Percol[®]), indicando que este tipo de avaliação independe da seleção espermática.

A fim de se determinar diferenças nos atributos espermáticos entre os grupos de baixo e alto desempenho, foram avaliados: cinética, capacitação, integridade de membranas plasmática e acrossomal, morfologia, estresse oxidativo, apoptose, função mitocondrial, cromatina, teste de ligação em membrana perivitelínica em ovo de galinha, além do estabelecimento de modelos preditivos para as taxas de clivagem

e de blastocisto e estudo das subpopulações espermáticas que serão discutidos a seguir.

7.1 Cinética espermática

Pela avaliação da cinética espermática em CASA, foram obtidas diferenças entre os grupos BC e AC e entre BB e AB nos mesmos parâmetros: VAP, VCL, ALH, BCF, STR, LIN, WOB e DNC (Tabelas 1 e 9).

Segundo Suzuki et al. (2003), apesar do Percoll® selecionar espermatozoides com parâmetros de motilidade e características de viabilidade superiores, este método não é capaz de aumentar a fertilidade *in vitro*, avaliada pela taxa de penetração em oócito, o que poderia justificar a ausência de interação entre os grupos (BC x AC e BB x AB) e entre os momentos da avaliação (Pré e Pós-Percoll®), concluindo-se que mesmo após a seleção por gradiente de Percoll® a diferença entre os grupos foi mantida.

Por meio dos resultados do presente estudo, ressalta-se a importância da avaliação da cinética espermática por meio do CASA, posto que os padrões de movimento obtidos não seriam diferenciados pela avaliação visual em microscopia óptica (VERSTEGEN; IGUER-OUADA; ONCLIN, 2002).

As diferenças observadas nos parâmetros de cinética espermática entre os grupos de alto e baixo desempenho relacionados a taxa de clivagem e de blastocisto, corroboram com estudos prévios, nos quais relata-se a relevante influência da cinética espermática nos índices reprodutivos (KATHIRAVAN et al., 2008; KATHIRAVAN et al., 2011; SUNDARARAMAN; KALATHARAN; JAWAHAR, 2012; DEL OLMO et al., 2013).

Diferenças nos parâmetros da cinética espermática na comparação entre touros de alta e baixa fertilidade, considerada pela taxa de não retorno ao cio é descrita por Shojaei et al. (2012). Neste estudo, o sêmen descongelado de touros com alta fertilidade possuía valores superiores de ALH, motilidade total e progressiva. Ainda neste trabalho, após seleção por *swim-up* também foram encontrados valores superiores para ALH e valores inferiores para LIN, STR e VSL no grupo de alta

fertilidade e LIN e STR se correlacionaram negativamente com a taxa de não retorno ao cio.

Hirano et al. (2001) avaliaram a relação entre a cinética espermática e a fertilidade *in vitro* no sêmen humano antes e após seleção espermática por *swim-up*. Neste estudo foram encontradas diferenças em diversos parâmetros do CASA entre os grupos de alto e baixo desempenho, dentre eles destacou-se o VCL ($P < 0,01$). Assim, como no presente estudo, estes autores observaram que o grupo de alto desempenho também apresentou valores superiores para VCL tanto antes quanto após seleção espermática, relatando que este parâmetro reflete a habilidade fecundante do espermatozoide e assim, pode ser utilizado na tomada decisão antes de se fazer uso da PIVE entre casais.

Em estudo realizado na utilização da avaliação de sêmen congelado de touros para a predição da fertilidade a campo, os parâmetros de motilidade total, BCF, VCL e ALH foram incluídos no modelo preditivo, explicando quase metade ($R^2 = 0,47$, $P < 0,05$) da variação na taxa de concepção (GLIOZZI et al., 2017).

Ainda, segundo Suzuki et al. (2003) VAP e VCL são os únicos parâmetros de cinética espermática que possuem um discreto potencial para se predizer a fertilidade *in vitro*. Esta relação, também foi encontrada no presente estudo, uma vez os grupos de alto desempenho (AC e AB) apresentaram valores superiores em ambos os parâmetros quando comparados aos grupos de baixo desempenho (BC e BB). Enquanto o VCL é indicativo dos movimentos para a frente e lado a lado, produzido pela geração de curvas flagelares (HO; GRANISH; SUAREZ, 2002), a VAP é indicativo da duração da trajetória geral do espermatozoide (MORTIMER, 1997), sendo relatada correlação positiva deste parâmetro com a fertilidade *in vitro* (KATHIRAVAN et al., 2008).

ALH é relacionado à capacidade de penetração do espermatozoide na zona pelúcida do oócito (VERSTEGEN; IGUER-OUADA; ONCLIN, 2002), assim, altos valores para este parâmetro, parecem favorecer a fecundação, uma vez que os grupos de alto desempenho *in vitro* (AC e BC) apresentaram valores superiores em comparação com os grupos de baixo desempenho (BC e BB).

Por meio do CASA, também pode-se detectar a cinética de hiperativação, a qual é caracterizada por movimento vigoroso, não-linear com alta amplitude e assimetria de ondas no batimento flagelar, que permite a penetração do espermatozoide na zona pelúcida (HO; GRANISH; SUAREZ, 2002; KATHIRAVAN et

al., 2011). Assim, ao CASA, a hiperativação é identificada por altos valores de VCL e ALH juntamente com baixo valor de LIN (MUIÑO et al., 2008; SHOJAEI et al., 2012). Este padrão foi encontrado nos grupos AC e AB, sugerindo que touros pertencentes a estes grupos possuem espermatozoides em cinética característica de hiperativação.

Ademais, o valor de Dance (DNC) é utilizado por alguns autores para determinar a motilidade hiperativada em espermatozoides em comparação com outros dentro de uma população (HOLT; O'BRIEN; ABAIGAR, 2007). Os valores mais altos de DNC observados nos grupos de alto desempenho (AC e AB), é compatível com os valores mais altos de VCL e ALH e mais baixos de LIN, que caracterizam a hiperativação espermática.

Wobble (WOB), taxa de oscilação, é um parâmetro adicional (SCHMIDT; KAMP, 2004) que pode ser considerado como indicador da eficiência do movimento espermático para frente, no qual menores valores de WOB representam maior oscilação (INGERMANN et al., 2011; NEUMANN et al., 2017). Neste trabalho, ambos os grupos de alto desempenho (AC e AB) apresentaram percentual de Wobble inferior aos de baixo desempenho (BC e BB). Assim, os grupos AC e AB exibiram movimentos mais oscilatórios, condizentes com a motilidade hiperativada (CHAN et al., 1992).

Estes resultados são sugestivos de cinética de hiperativação, pois não há consenso sobre os valores destes parâmetros que caracterizam este tipo de cinética espermática na espécie bovina, sendo encontrados valores divergentes na literatura (SHOJAEI et al., 2012; VAN DER HORST, 2014; KANNO et al., 2017; MONDAL et al., 2017). A dificuldade no estabelecimento destes valores de referência e ainda, a comparação de resultados em diferentes estudos, é de grande complexidade devido a diversos fatores que influenciam na acurácia e precisão desta avaliação, como: metodologia, uso de diferentes tipos de aparelhos e configurações do software, manipulação de amostras como meio diluir e seleção espermática (SHOJAEI et al., 2012; AMANN; WABERSKI, 2014; ISHIJIMA, 2015; DEL GALLEGGO et al., 2017; KANNO et al., 2017). Esta dificuldade se evidencia em revisão realizada por Mortimer (1997) na qual podem ser observados 11 diferentes padrões de cinética que caracterizam a hiperativação no sêmen de homens num período de 8 anos.

Apesar da dificuldade em se estabelecer estes parâmetros característicos de hiperativação, de acordo com o presente estudo, é possível que esta avaliação possa ser utilizada para diferenciar touros de alto e baixo desempenho *in vitro*, corroborando com outros estudos que relatam que a cinética de hiperativação está associada a

superioridade no desempenho reprodutivo (MURASE et al., 2010; VAN DER HORST, 2014).

Como relatada por Shojaei et al. (2012), que encontraram maior proporção de espermatozoides hiperativados no sêmen de touros considerados de alta fertilidade e esta característica se correlacionou positivamente com a taxa de não retorno ao cio.

Uma vez que a motilidade hiperativada é considerada como indicativa de capacitação (KATHIRAVAN et al., 2011), pode-se constituir uma nova hipótese, de que os espermatozoides de touros que apresentam superioridade no desempenho da PIVE, considerado pelas taxas de clivagem e de blastocisto, apresentam motilidade hiperativada após a descongelação e centrifugação em gradiente de Percoll®, passam pelo processo de capacitação mais rapidamente e isto traz benefícios à fecundação e posterior desenvolvimento embrionário.

7.2 Capacitação

Apesar de se ter um indicativo da capacitação pelo comportamento de motilidade hiperativada, não foram encontradas diferenças na avaliação do status de capacitação espermática pelo ensaio da clortetraciclina (CTC) entre os grupos de alta e baixa taxas de clivagem e de blastocisto (Tabelas 8 e 16).

Ainda que a capacitação espermática possa ser avaliada por diferentes métodos, a obtenção de resultados fidedignos nem sempre é possível, devido à extrema complexidade deste processo, o qual envolve uma sequência de fenômenos (AITKEN, 2017).

O ensaio da CTC é de fácil execução e constitui numa ferramenta útil na triagem de amostras quanto à capacitação, sendo possível diferenciar grupos quando há uma grande diferença entre eles (THUNDATHIL et al., 1999; RODRIGUEZ-MARTINEZ, 2001). No entanto, este teste apresenta baixa especificidade e sua leitura é relativamente subjetiva (ELKHAWAGAH et al., 2014). Deste modo, acredita-se que a CTC não foi capaz de detectar diferenças sutis entre os grupos, porém, que exercem grande influência no resultado final da fecundação. Assim como em trabalho realizado por (KATO; NAGAO, 2015) no qual observaram que a hiperativação e a capacitação, avaliada pela CTC, não interferiu na taxa de blastocisto obtida por ICSI.

Ademais, pode ser que este teste apresente uma baixa acurácia no sêmen criopreservado pelo fato da criopreservação induzir uma série de alterações na ultraestrutura lipídica da membrana (PONS-REJRAJI; BAILEY; LECLERC, 2009). É provável que ocorra maior permeabilidade à entrada de cálcio, fazendo com que CTC detecte este evento, que não está, necessariamente, relacionada à capacitação (BREININGER; CETICA; BECONI, 2010).

A capacitação é o fenômeno fundamental para que os espermatozoides sejam capazes de fecundar o oócito (JAGAN MOHANARAO; ATREJA, 2011). Enquanto no genital feminino, a capacitação ocorre principalmente no oviduto, onde as células epiteliais secretam substâncias decapacitantes (SCHNEIDER; ELLINGTON; WRIGHT, 1999), na PIVE, é necessário que se realize a indução da capacitação e da reação acrossomal para que a fecundação ocorra (LENZ et al., 1983; AOYAGI et al., 1988; PARRISH, 2014).

O tratamento mais comumente utilizado para induzir a capacitação espermática é com o uso da heparina (ZHANG et al., 1997; ASSUMPÇÃO et al., 2002; KARUNAKARAN; DEVANATHAN, 2017) que possui função semelhante à das moléculas decapacitantes secretadas pelas células epiteliais do oviduto (SCHNEIDER; ELLINGTON; WRIGHT, 1999; GHERSEVICH; MASSA; ZUMOFFEN, 2015). A heparina remove proteínas associadas à membrana e estimula o aumento intracelular de cálcio, pH e AMPc (BREININGER; CETICA; BECONI, 2010; FERRÉ et al., 2017; KARUNAKARAN; DEVANATHAN, 2017).

Apesar da indução, os espermatozoides individualmente não respondem sincronicamente à capacitação, por isto é necessário um período longo para que a maioria deles esteja capacitado (HARRISON, 1996; RODRIGUEZ-MARTINEZ, 2001).

Para a fecundação *in vivo*, a capacitação espermática prematura é prejudicial, pois acarreta em reação acrossomal e perda da viabilidade rapidamente (PÉREZ-PÉ et al., 2002; KURODA; FUKUSHIMA; HARAYAMA, 2007; AITKEN, 2017). Adicionalmente a isto, os espermatozoides devem percorrer grandes distâncias até o sítio de fecundação, sendo que a ovulação não ocorre de maneira sincrônica a deposição do sêmen no genital feminino (HARRISON, 1996; BERGSTEIN-GALAN et al., 2017).

Entretanto, para a fecundação *in vitro*, a capacitação precoce pode ser desejável (BLOTTNER; NEHRING; TORNER, 1990; BUFFONE et al., 2004; SEIDEL, 2015). Primeiramente porque, pelo fato dos espermatozoides serem depositados

muito próximos aos oócitos, não é necessária a viabilidade espermática por longo períodos (HARRISON, 1996). Segundo, porque quando a fecundação ocorre rapidamente, acelera a cinética de desenvolvimento embrionário e consequentemente, resulta em superioridade nos índices de PIVE e na qualidade embrionária (WARD et al., 2002; KIRKEGAARD et al., 2013; MILAZZOTTO et al., 2016).

Além disto, a rápida resposta à capacitação pode ser favorável para PIVE pelo fato do tempo de viabilidade do sêmen após a descongelação ser limitado e poder não ser suficiente para sofrer capacitação *in vitro* durante o período de incubação com o oócito (PARRISH et al., 1986; PARRISH, 2014; RAHMAN et al., 2018).

Em diferentes estudos demonstrou-se que touros apresentam diferenças na capacidade e na velocidade em adquirir o status de capacitação e reação acrossomal frente a indução *in vitro* (LEIBFRIED-RUTLEDGE et al., 1989; THUNDATHIL et al., 1999) e que a resposta mais rápida à capacitação favorece a PIVE (BLOTTNER; NEHRING; TORNER, 1990). Deste modo, esta característica pode justificar a diferença no desempenho *in vitro* entre touros (AOYAGI et al., 1988; ZHANG; LU; SEIDEL, 2003; SEIDEL, 2015).

A avaliação da resposta espermática quanto a cinética de hiperativação, capacitação e reação acrossomal frente ao uso de indutores da capacitação poderia trazer informações relevantes na distinção entre as características seminais dos quatro grupos estudados. Uma vez que nesta condição, a taxa de reação acrossomal é correlacionada à fertilidade *in vitro* (BLOTTNER; NEHRING; TORNER, 1990) e a campo (WHITFIELD; PARKINSON, 1995; RODRIGUEZ-MARTINEZ, 2001), podendo ser utilizada para selecionar touros com maior desempenho reprodutivo (BLOTTNER; NEHRING; TORNER, 1990; KARUNAKARAN; DEVANATHAN, 2017). Porém, no presente estudo, não foi adicionado qualquer tipo de agente capacitante para se realizar as análises dos atributos espermáticos, não se avaliando a aptidão destas células em tornarem-se capacitadas e/ou reagidas.

7.3 Membranas plasmática e acrossomal

A integridade das membranas plasmática e acrossomal é relacionada a viabilidade da célula espermática por exercer importante papel em diversos processos

que são necessários à fecundação, como capacitação, colonização do oviduto, ligação do espermatozoide ao oócito e reação acrossomal, exercendo, assim, grande influência sobre a produção *in vitro* de embriões (VERSTEGEN; IGUER-OUADA; ONCLIN, 2002; SELVARAJU et al., 2008; LEEMANS et al., 2014). Por consequência, a avaliação destes atributos é aplicada como parâmetro na diferenciação entre o alto e baixo potencial de desempenho do sêmen a ser utilizado nesta biotecnologia.

Os percentuais de membrana plasmática íntegra e acrosso não reagido, não apresentaram diferença ($P > 0,05$) entre os grupos de touros de baixo e alto desempenho, tanto referente à taxa de clivagem quanto à taxa de blastocisto (Tabelas 3 e 11), corroborando com estudos prévios nos quais a avaliação isolada destes atributos não foi suficiente para a predição do desempenho reprodutivo (PUGLISI et al., 2012).

Entretanto, estes resultados diferem dos dados apresentados por Singh et al. (2016) na comparação entre búfalos com diferenças no desempenho reprodutivo a campo, na qual a avaliação da integridade de membrana plasmática e acrossomal, avaliada pela associação das sondas fluorescentes *Peanut agglutinin* conjugada ao isotiocianato de fluoresceína (FITC-PNA) e PI, colaboraram para a previsibilidade da fertilidade.

Assim como diferem dos relatados por Tanghe et al. (2002) que na comparação entre touros de alta e baixa fertilidade *in vitro*, considerada pela formação do pró-núcleo, a avaliação da integridade de membrana pela técnica de eosina/nigrosina, realizada após a centrifugação em gradiente de Percoll®, representou uma base confiável para previsão do desempenho *in vitro*.

Porém, Oliveira et al. (2017) observaram que a avaliação da integridade de membrana só foi capaz de diferenciar partidas de sêmen, que resultaram em maior taxa de prenhez, após submeter as amostras seminais às condições de desafio térmico, centrifugação em gradiente de Percoll® ou ambos os procedimentos. Apesar de no presente estudo não ter sido realizado o desafio térmico, a realização da avaliação deste atributo espermático após a centrifugação em gradiente de Percoll® também não foi capaz de diferenciar grupos de baixo e alto índices de desempenho *in vitro*.

Além destes autores não terem analisado a integridade da membrana acrossomal simultaneamente à integridade de membrana plasmática, as avaliações

foram realizadas em microscopia ao invés da citometria de fluxo, a qual constitui em uma ferramenta de maior acurácia e precisão (LO; BRINKMAN; GOTTARDO, 2008).

Apesar disto, a similaridade obtida entre os grupos não refuta o conceito de que a integridade das membranas plasmática e acrossomal são relevantes para os resultados na PIVE (RODRIGUEZ-MARTINEZ, 2001; SELVARAJU et al., 2008), porém, devido à alta proporção de espermatozoides com integridade de membranas plasmática e acrossomal nos quatro grupos (BC, AC, BB e AB) este atributo, no presente estudo, não foi capaz de justificar a diferença no desempenho *in vitro* dos touros.

Os altos valores observados para a proporção de espermatozoides com integridade de membrana plasmática e de acrossomo detectados simultaneamente com uso das sondas fluorescentes FITC-PSA/PI, e altos valores obtidos para espermatozoides não capacitados com o uso da sonda fluorescente CTC, nos quatro grupos estudados, evidenciam que estes espermatozoides embora apresentem características cinéticas de capacitação ainda não sofreram o processo de reação acrossomal e, portanto, mantêm potencial de fecundação, conforme descrito por Singh et al. (2016).

7.4 Morfologia espermática

No presente estudo, a avaliação da morfologia espermática não foi capaz de diferenciar touros de alto desempenho *in vitro* relacionados às taxas de clivagem e de blastocisto (Tabelas 2 e 10). Porém, deve-se destacar que em todos os grupos avaliados (BC, AC, BB e AB) o valor percentual médio de defeitos menores, maiores e totais foram baixos e dentro dos limites preconizados pelo Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA, 2013).

Este resultado é esperado visto que todas as amostras seminais utilizadas provêm de touros alocados em centrais de reprodução, onde se têm nutrição e instalações favoráveis à reprodução evitando-se, por exemplo, estresse térmico e hídrico, adicionados à intensa seleção de animais com características reprodutivas desejáveis (RAHMAN et al., 2018).

A morfologia espermática é classicamente incluída na rotina de avaliação da qualidade seminal (EVENSON, 1986). Apesar do surgimento de diversas tecnologias de avaliação espermática, a morfologia ainda é considerada de grande relevância, pelo seu irrefutável impacto no desempenho reprodutivo (BLOM, 1972; SCHNEIDER; ELLINGTON; WRIGHT, 1999; AMANN; SEIDEL; MORTIMER, 2000; ATTIA; KATILA; ANDERSSON, 2016).

Além dos defeitos morfológicos acarretarem em prejuízos na fecundação, espermatozoides morfolologicamente anormais liberam maiores quantidades de EROs e aceleram o processo de estresse oxidativo, com consequente agravamento na depreciação da qualidade seminal (ODHIAMBO et al., 2014).

Porém, a previsibilidade do desempenho reprodutivo utilizando-se essa avaliação da qualidade seminal, parece ser significativo apenas quando se têm altas taxas de defeitos morfológicos (TANGHE et al., 2002).

7.5 Estresse oxidativo

Na avaliação do status oxidativo, encontrou-se que os grupos de baixo desempenho podem apresentar índices mais elevados de estresse oxidativo, observados pela maior proporção de espermatozoides que apresentam simultaneamente lesão de membrana e estresse oxidativo pelo CellROX™ green no grupo de baixa clivagem (BC) (Tabela 6) e maior intensidade de fluorescência do DHE, referente à maior concentração de ânion superóxido, no grupo de baixo blastocisto (BB) (Tabela 14).

Os espermatozoides são suscetíveis ao estresse oxidativo pelo fato da membrana plasmática ser rica em ácidos graxos poli-insaturados, especialmente ácido docosahexaenóico (DHA), o qual confere fluidez à membrana, necessária para os processos relacionados à fecundação (AITKEN, 2017).

Adicionalmente, elevados níveis de produção de EROs podem levar a prejuízos na qualidade seminal, com consequente queda no desempenho reprodutivo, por acometer diferentes atributos espermáticos como cinética, potencial de membrana mitocondrial, morfologia, integridade da membrana acrossomal, além de ser o principal fator que leva a danos no DNA (HAMILTON et al., 2016; AITKEN, 2017).

Apesar disto, estes danos não foram observados na avaliação dos diferentes atributos espermáticos nos grupos de baixo desempenho e, assim, não justificaria a diferença nos índices de produção *in vitro* entre os grupos.

Entretanto, o estresse oxidativo nos espermatozoides podem prejudicar o desenvolvimento embrionário nos processos *in vitro* por gerar alterações no processo de mitose, levar a aberrações cromossomais em embriões de 2 a 4 células e acometer o desenvolvimento até o estágio de blastocisto (KATO; NAGAO, 2015), que não são detectáveis pela avaliação da qualidade seminal.

A proporção de espermatozoides que apresentavam integridade de membrana e estresse oxidativo, detectados com o uso das sondas CellROX™ green e PI nos quatro grupos experimentais (BC, AC, BB e AB) foram muito semelhantes ao encontrado por De Castro et al. (2015) em sêmen descongelado de touros submetido ao Percoll®. Neste mesmo estudo, foi padronizado o uso desta sonda para o sêmen descongelado de bovinos, demonstrando que a adição de peróxido de hidrogênio em diferentes concentrações gerou níveis muito superiores de células positivas para o CellROX™ green.

A sonda CellROX™ green detecta a presença de EROs, de maneira não-específica, por aumentar a intensidade de fluorescência e se ligar ao DNA ao ser oxidada (DE ASSIS et al., 2015). A avaliação simultânea da integridade de membrana plasmática e estresse oxidativo, realizada ao se associar esta sonda com o PI, traz informações relevantes à avaliação do sêmen pelo fato de que um dos prejuízos em se ter altos níveis de EROs em uma amostra seminal se deve ao ataque oxidativo nos lipídios da membrana plasmática, dando início à peroxidação lipídica (KARUNAKARAN; DEVANATHAN, 2017). A maior proporção de espermatozoides que apresentam lesão de membrana e estresse oxidativo no grupo BC em relação ao grupo AC, pode indicar que o grupo de baixo desempenho sofreu maiores consequências negativas do estresse oxidativo e isto pode justificar as menores taxas de clivagem.

O efeito negativo da presença de EROs na taxa de clivagem é relatada em estudo realizado por Breininger, Cetica e Beconi (2010) no qual a adição de ânion superóxido ao sêmen, apesar de ter sido utilizado a fim de se induzir a capacitação espermática, levou a diminuição da taxa de clivagem.

Na comparação do status oxidativo entre os grupos referentes à taxa de blastocisto, a maior intensidade de fluorescência de DHE detectada no grupo de baixo

blastocisto (BB), é indicativo de maior quantidade de ânion superóxido (O_2^-) (AITKEN et al., 2012; MERATI et al., 2018). Este ânion é a principal EROs envolvida nos mecanismos que levam à capacitação espermática na espécie bovina, relacionada sobretudo à aquisição da motilidade hiperativada e afinidade pela zona pelúcida do oócito (O'FLAHERTY et al., 2005; MAIA; BICUDO, 2009; BREININGER; CETICA; BECONI, 2010).

Contudo, a contínua produção deste agente, principalmente na membrana plasmática, pode superar as defesas antioxidantes e assim, estabelecer o estado de estresse oxidativo, que leva a danos no DNA e morte celular (AITKEN et al., 2006; AITKEN, 2017). Além disto, o ânion superóxido passa ser altamente danoso à célula espermática ao ser convertido em oxidantes mais potentes, como radical hidroxiperoxil (HO_2^-), por meio de protonação, e peróxido de hidrogênio (H_2O_2), por dismutação (AITKEN, 2017). Ademais, a alta concentração do ânion superóxido numa amostra seminal pode levar a maiores concentrações desta EROs no sistema de produção *in vitro*, levando a prejuízos no desenvolvimento embrionário inicial e, conseqüentemente, na taxa de blastocisto (GOTO et al., 1993; JOO et al., 2001).

A mitocôndria é o principal sítio de produção de EROs, conseqüente à atuação desta organela em diversos eventos fisiológicos da célula espermática como a respiração celular, por meio da fosforilação oxidativa (AITKEN et al., 2012; KIM; AGCA; AGCA, 2013) e alta produção de ATP durante a aquisição da cinética de hiperativação (KATO; NAGAO, 2015). Entretanto, altas concentrações de EROs de origem mitocondrial estão relacionadas a processos patológicos e apoptose celular, resultando em queda da motilidade e dano no DNA espermático (AITKEN; CURRY, 2011; AITKEN et al., 2012), o que poderia justificar a diferença no desempenho *in vitro*. Contudo, não foi observada diferença significativa entre os grupos de alto e baixo desempenho para as taxas de clivagem e de blastocisto na intensidade de fluorescência da MitoSOX™ Red (Tabelas 6 e 14).

Ao teste de TBARS induzido, esperava-se que a indução da peroxidação lipídica com o uso de ferro e vitamina C, resultasse em maiores concentrações de malondialdeído nos grupos de baixo desempenho, por este subproduto ser altamente danoso à célula espermática (KAWAI et al., 2017). No entanto, este teste não foi capaz de diferenciar os grupos e, assim, não auxiliou na previsibilidade dos índices de produção *in vitro*.

7.6 Apoptose e função mitocondrial

A presença de espermatozoides apoptóticos e necróticos no sêmen acarreta em diminuição da qualidade seminal (MANGOLI et al., 2018; MERATI et al., 2018) com consequente prejuízo no desempenho reprodutivo a campo (SINGH et al., 2016) ou nas taxas de clivagem e de blastocisto na PIVE (ZHAO et al., 2014). Apesar disto, as proporções de espermatozoides viáveis, apoptóticos e necróticas detectadas pela sonda FITC-VAD-FMK associada ao PI, no presente estudo, foram semelhantes entre os grupos BC e AC e entre BB e AB (Tabelas 7 e 15) e os valores foram próximos aos encontrados por Martin et al. (2004) e Martin et al. (2007) no sêmen descongelado de touros.

Apesar de haver divergência sobre a real ocorrência de apoptose na célula espermática, por não resultar em lise do núcleo (AITKEN; BAKER, 2013; SANTIAGO-MORENO et al., 2013), é comprovada a presença da maquinaria necessária para o desencadeamento deste evento, especialmente pela via mitocondrial, a exemplo do fator pró-apoptótico Bax, caspases, citocromo c e a flavoproteína fator indutor de apoptose (AIF) (MARTIN et al., 2007; MERATI et al., 2018).

Os eventos que caracterizam a ocorrência da apoptose em espermatozoides são: diminuição do potencial de membrana mitocondrial, ativação de caspase e alterações na permeabilidade da membrana plasmática, levando a morte celular (PAASCH et al., 2004; MARTIN et al., 2007; ZHAO et al., 2014).

Como a ativação de caspase é um dos principais marcadores da apoptose celular (BRUM; SABEUR; BALL, 2008) e sua detecção em espermatozoides com o uso da sonda fluorescente FITC-VAD-FMK é comprovada no sêmen bovino (MARTIN et al., 2004; MARTIN et al., 2007), pode-se afirmar que a diferença no desempenho que é encontrada entre diferentes touros, não é justificada pela ocorrência de apoptose e necrose celular.

Apesar disto, considerando-se que a perda da integridade da membrana plasmática associada a perda do potencial de membrana mitocondrial são eventos relacionados a necrose celular (MARTIN et al., 2007; KARUNAKARAN; DEVANATHAN, 2017), pode-se afirmar que os valores encontrados na avaliação de células necróticas estão de acordo com os baixos valores encontrados para lesão de membrana plasmática e para baixo potencial de membrana mitocondrial, isto porque

diferentemente da apoptose, a necrose celular envolve ruptura da membrana plasmática (MARTIN et al., 2004).

A mitocôndria tem grande participação na cascata da apoptose nas células de mamíferos, inclusive em espermatozoides (MARTIN et al., 2007; WANG; YOULE, 2009). Moléculas pró-apotóticas promovem a formação de poros na membrana mitocondrial, levando à diminuição do seu potencial de membrana e permitindo a liberação de proteínas responsáveis pela morte celular e pela ativação de caspases (RAVAGNAN; ROUMIER; KROEMER, 2002; ORTEGA-FERRUSOLA et al., 2008). Além disto, a produção de EROs mitocondriais é um dos fatores desencadeadores da apoptose (ANZAR et al., 2002; MORAN et al., 2008; AITKEN; BAKER, 2013; AITKEN et al., 2014).

Não foram encontradas diferenças nas classes de atividade mitocondrial e nem nos níveis de potencial de membrana mitocondrial entre os grupos BC e AC e entre os grupos BB e AB (Tabelas 4, 5, 12 e 13). Uma vez que a função mitocondrial é relacionada ao desempenho reprodutivo (SOUSA et al., 2011), este resultado pode ser explicado pelo fato de que em todos os grupos estes atributos apresentaram bons resultados, ressaltando-se que se tratavam de amostras de sêmen congelado, que tendem a apresentar diminuição da função mitocondrial (MARTIN et al., 2004; ALVAREZ-RODRIGUEZ; VICENTE-CARRILLO; RODRIGUEZ-MARTINEZ, 2017).

A alta atividade mitocondrial pode ser fonte de altos níveis de EROs podendo ser prejudicial à qualidade seminal (AITKEN et al., 2012). Apesar de não se ter parâmetros estabelecidos, a partir do qual valor este efeito pode ser observado, os resultados encontrados nas avaliações da função mitocondrial (atividade e potencial de membrana) associadas a detecção das EROs mitocondriais pela MitoSOX™ Red, indicam que a alta função mitocondrial detectada em todos os grupos não afetou negativamente a qualidade espermática e não é a causa de diferentes desempenhos na PIVE.

7.7 Cromatina espermática

Na avaliação da cromatina espermática, foram obtidos baixos índices de fragmentação de DNA (até 0,3%), não havendo diferença na comparação entre os

grupos de alto e baixo desempenho *in vitro*, tanto para os grupos relacionados à taxa de clivagem quanto à taxa de blastocisto (Tabelas 7 e 15). Desta forma, não foi possível estabelecer relação de predição do desempenho pela avaliação deste atributo.

Em recente pesquisa realizada por Castro et al. (2018) na comparação entre touros de alto e baixo desempenho *in vitro*, considerada pela taxa de desenvolvimento embrionário, também não foi encontrada diferença entre os grupos na avaliação da cromatina espermática, utilizando-se o mesmo método de SCSA e nem pelo ensaio de COMETA alcalino. Porém, diferente do esperado, o grupo de alto desempenho apresentou maior deficiência de protaminação, avaliada por CMA3, que segundo estes autores, não justifica a diferença no desempenho *in vitro*, pelo percentual de deficiência de protamina ser muito baixa em ambos os grupos.

Apesar disto, a avaliação da cromatina espermática é de grande valia pelo fato da fragmentação de DNA nem sempre ser acompanhada por alterações em outros atributos (BOCHENEK; SMORAG; PILCH, 2001). Apesar do oócito ser capaz de reparar danos no DNA espermático (LIN et al., 2008), altos níveis de anormalidades podem levar ao insucesso reprodutivo, mesmo no uso de biotecnologias reprodutivas (BALLACHEY; EVENSON; SAACKE, 1988).

Em homens, a alteração na cromatina espermática é comumente observada e atribuída à deficiência na compactação do DNA, que propicia lesões mais facilmente (EVENSON, 1986; BARROSO; MORSHEDI; OEHNINGER, 2000; SAKKAS et al., 2002). O índice de fragmentação de DNA acima de 27% é considerado como valor de referência por afetar negativamente a fertilidade na cópula natural, na inseminação intra-uterina e até mesmo na PIVE (EVENSON; WIXON, 2006).

Em touros, esta avaliação pode ser utilizada para se distinguir reprodutores de alto e baixo desempenho reprodutivo apenas quando a amostra seminal apresente níveis elevados de fragmentação (GRAHAM, 2001; JANUSKAUSKAS; JOHANNISSON; RODRIGUEZ-MARTINEZ, 2001; PUGLISI et al., 2012), como encontrados na presença de doenças em geral ou com o uso de fármacos específicos (BALLACHEY; EVENSON; SAACKE, 1988).

Isto porque os níveis de fragmentação de DNA detectados nesta espécie são muito inferiores aos encontrados em humanos (D'OCCHIO et al., 2013), devido à alta compactação e resistência da cromatina espermática (CASTRO et al., 2018). De fato, os baixos valores de fragmentação de DNA encontrados no presente estudo,

assemelham-se aos de De Castro et al. (2015) e de Hallap et al. (2005) na avaliação do sêmen congelado/descongelado de touros com e sem a utilização de métodos de seleção espermática.

Bochenek, Smorag e Pilch (2001) observaram que valores de índice de fragmentação de DNA em torno de 23% afetaram negativamente a taxa de não retorno ao cio, sugerindo que este valor possa ser utilizado como referência. Porém, ainda não se tem um valor bem estabelecido que sabidamente leve a prejuízos no desempenho *in vitro*, apesar de já ser comprovado que danos no DNA levam a diminuição nas taxas de clivagem e de blastocisto (ERICKSON; KROETSCH; ANZAR, 2016).

Apesar do estresse oxidativo ser um dos fatores responsáveis pela perda da integridade do DNA espermático (AITKEN et al., 2014) não foi observada relação entre a suscetibilidade ao estresse oxidativo, avaliado pelo TBARS, e a suscetibilidade à fragmentação de DNA, como encontrado por Simões et al. (2013).

Assim como é conceituado por Aitken e Baker (2013), não foi encontrada qualquer relação entre células apoptóticas e fragmentação de DNA. Isto porque a compartimentação das mitocôndrias na peça intermediária, característica da célula espermática, faz com que fatores indutores da apoptose e endonucleases fiquem confinados nesta região e não atinjam o núcleo espermático (AITKEN et al., 2014).

7.8 Teste funcional

Os testes funcionais, como o teste de ligação em zona pelúcida homóloga e heteróloga ou em hemizona e teste de penetração são considerados como indicativos do potencial de fertilidade tanto *in vivo* (ZHANG et al., 1998; ZHANG et al., 1999) quanto *in vitro* (LIU; GARRETT; BAKER, 2003; KATHIRAVAN et al., 2008; PUGLISI et al., 2012; KIZILAY; ALTAY, 2017). Porém, não foram encontradas diferenças entre os grupos BC e AC e entre BB e AB, no número de espermatozoides ligados pelo teste de ligação em membrana perivitelínica de ovo de galinha (Tabelas 8 e 16).

Outros estudos, assim como o presente, não encontraram equivalência entre as taxas de ligação e o desempenho reprodutivo (ZHANG et al., 1998; PUGLISI et al.,

2012). Com esta divergência, pode-se sugerir que os testes funcionais, não necessariamente, se equivalem às taxas de clivagem e de blastocisto obtivas na PIVE.

Isto porque, apesar destes testes avaliarem a capacidade espermática em se ligar ou penetrar a zona pelúcida do oócito (LIU et al., 1989; LIU; GARRETT; BAKER, 2003), existem diversos outros fatores necessários para que o espermatozoide exerça a sua função e que influenciam na obtenção de um embrião até o estágio de blastocisto pelo procedimento *in vitro* (LUCIO et al., 2016) e ainda diversos outros para o estabelecimento de uma gestação (LONERGAN, 1994). Dentre eles, o processo de fecundação em si, a cromatina espermática, o desenvolvimento embrionário, a regulação gênica e epigenética (WRENZYCKI; NIEMANN, 2003; SADEGHI et al., 2009; VENTURA-JUNCÁ et al., 2015).

Além disto, a previsão do desempenho reprodutivo por meio dos testes funcionais pode variar de acordo com o tipo de teste, como na utilização de zona pelúcida homóloga, heteróloga ou hemizona (ZHANG et al., 1998; LANDIM-ALVARENGA et al., 2001; KIZILAY; ALTAY, 2017). Apesar do teste de ligação em membrana perivitelínica de ovo de galinha ter sido atestado para a ligação de espermatozoides bovinos, pela similaridade na ZP3 (BARBATO; CRAMER; HAMMERSTEDT, 1998; LOSANO et al., 2015), este método nunca foi utilizado com o objetivo de diferenciar amostras seminais com diferentes índices reprodutivos. Assim, os resultados obtidos com o presente estudo possibilitam a concepção de que este teste não apresenta sensibilidade suficiente para identificar amostras seminais que resultem em alto ou baixo desempenho na PIVE.

Atualmente, em homens, os testes funcionais são mais utilizados a fim de se escolher o método de reprodução assistida, sendo que amostra seminais que falham no teste funcional são direcionados a utilizarem ICSI para a produção de descendentes (OEHNINGER; FRANKEN; OMBELET, 2014).

Desta forma, os testes funcionais possuem maior potencial para identificar amostras seminais de baixa qualidade e que apresentam grande chance de falha na fecundação, do que, propriamente, prever bons resultados (LIU et al., 1989; BARBATO; CRAMER; HAMMERSTEDT, 1998; LIU; GARRETT; BAKER, 2003). Isto se deve pela alta influência dos atributos espermáticos como motilidade, defeitos morfológicos e integridade das membranas plasmática e acrossomal no resultado destes testes (LIU et al., 1989; SELVARAJU et al., 2008; CRISCUOLO et al., 2010).

7.9 Modelo preditivo para as taxas de clivagem e de blastocisto

Foi possível estabelecer modelos preditivos para o desempenho *in vitro*, por meio de análise de regressão logística multivariada, a qual determinou quais atributos espermáticos exercem efeito sob a taxa de clivagem (VCL, BCF e percentual de espermatozoides com integridade de membrana e sem estresse oxidativo) e sob a taxa de blastocisto (percentual de defeitos menores, VSL, DABIII e DHE).

Este tipo de análise constitui-se em uma ferramenta mais poderosa do que a comparação de cada parâmetro espermático separadamente (JANUSKAUSKAS; JOHANNISSON; RODRIGUEZ-MARTINEZ, 2003; SINGH et al., 2016) e possui valor de predição mais acurado do que a correlação simples entre os atributos e o desempenho reprodutivo, uma vez que a fecundação é dependente de diversas funções espermáticas (SELLEM et al., 2015).

Por isto, esta metodologia tem sido empregada em diversos estudos para se obter uma previsão do desempenho reprodutivo em touros (TARTAGLIONE; RITTA, 2004; KATHIRAVAN et al., 2008; SELLEM et al., 2015; MORRELL et al., 2017).

Com o uso da regressão logística multivariada, distintas combinações de atributos espermáticos são observadas em diferentes modelos preditivos para fertilidade a campo, como: integridade de membrana, VAP e o índice competitivo de ligação em zona pelúcida (PUGLISI et al., 2012); integridade de membranas plasmática e acrossomal e o status de peroxidação lipídica (SINGH et al., 2016); status oxidativo, integridade de acrossomo, compactação de DNA, atividade mitocondrial, viabilidade, velocidade e defeitos morfológicos (SELLEM et al., 2015). Apesar de algumas similaridades como o *status* oxidativo, parâmetros de cinética, atividade mitocondrial e morfologia, nenhum destes autores obtiveram a mesma combinação que o presente estudo, dificultando o estabelecimento de um consenso.

Adicionalmente, a simples obtenção do modelo preditivo não valida completamente sua aplicabilidade, são necessários testes comprovativos para que o valor de predição, de fato, seja utilizado na rotina prática (ZHANG et al., 1998). A fim de atender este pré-requisito, foi realizado teste de correlação entre as taxas de clivagem e de blastocisto esperadas, aplicando-se o modelo preditivo, e as taxas reais, obtidas do banco de dados na seleção dos touros.

Avaliando-se a aplicação dos modelos preditivos para clivagem e blastocisto, no presente estudo, as taxas, esperada e real, correlacionaram-se de maneira

significativa ($P \leq 0,05$), porém com intensidade moderada ($r=0,56$ para taxa de clivagem e $r=0,44$ para taxa de blastocisto). Deste modo, os modelos preditivos obtidos contribuíram de forma pouco precisa para a previsão das taxas de clivagem e de blastocisto.

Estes resultados foram pouco satisfatórios, mas podem ter sido influenciados pelo tamanho amostral ($n=20$). Portanto, a baixa acurácia destes modelos poderá ser ratificada com ampliação do número de touros avaliados.

Similarmente, Sellem et al. (2015) obtiveram baixos valores de correlação entre o modelo preditivo, utilizando avaliação de sêmen em citometria de fluxo e CASA, e a fertilidade a campo em touros. Estes autores, apontam que uma possível causa para baixa acurácia é a ausência de grande variedade nas taxas de fertilidade, o que também pode ter contribuído para a moderada correlação, no presente estudo. Desta forma é possível que a inclusão de amostras seminais com taxas intermediárias de desempenho *in vitro* também aumente a acurácia deste modelo.

7.10 Subpopulações espermáticas

Foram detectadas 4 subpopulações espermáticas possuindo características de cinética distintas na avaliação dos grupos (BC, AC, BB e AB) antes e após a centrifugação em gradiente de Percoll®. A comparação entre os grupos de alto e baixo desempenho, tanto de clivagem quanto de blastocisto, resultaram em diferentes padrões de distribuição dos espermatozoides nas quatro subpopulações nos dois momentos avaliados (Pré e Pós-Percoll®) (Tabelas 29 a 32).

O estudo das subpopulações baseado nos parâmetros de cinética espermática em CASA não é recente (MORTIMER, 1997; ABAIGAR et al., 1999; ABAIGAR et al., 2001; VERSTEGEN; IGUER-OUADA; ONCLIN, 2002), porém, na atualidade, esta análise tem merecido destaque em diversos estudos devido à grande abrangência de aplicação (SANTOLARIA et al., 2015; BERGSTEIN-GALAN et al., 2017; KANNO et al., 2017; LUNA et al., 2017).

A determinação das subpopulações pode ser realizada por meio da morfometria espermática (SANTOLARIA et al., 2016; VALVERDE et al., 2016), entretanto, avaliação individualizada pelas características de cinética espermática em

CASA constitui o método mais fidedigno no estudo das subpopulações (LUNA et al., 2017).

A utilização do CASA proporcionou um grande avanço no estudo da cinética espermática por permitir a avaliação simultânea de diversos parâmetros (VERSTEGEN; IGUER-OUADA; ONCLIN, 2002). No entanto, a expressão de valores médios destes parâmetros, tende a ocultar o significado da diversidade da cinética dos diferentes espermatozoides dentro de uma amostra seminal (HOLT; O'BRIEN; ABAIGAR, 2007; AMANN; WABERSKI, 2014). Com a avaliação individualizada dos espermatozoides e determinação das subpopulações, pode-se obter um número amostral muito maior, constituindo-se assim em um método mais acurado, o que pode ser evidenciado pelo número de espermatozoides avaliados em cada grupo nos dois momentos: 5.072 no grupo BC Pré-Percoll®, 7.955 no grupo AC Pré-Percoll®, 2.173 no grupo BC Pós-Percoll®, 2.854 no grupo AC pós-Percoll®, 5.389 no grupo BB Pré-Percoll®, 8.927 no grupo AB Pré-Percoll®, 3.093 no grupo BB Pós-Percoll® e 2.782 no grupo AB Pós-Percoll®.

A existência de diferentes subpopulações espermáticas já é descrita no sêmen de diversas espécies como bovinos (FERRAZ et al., 2014), equinos (GARCÍA et al., 2009), ovinos (BERGSTEIN-GALAN et al., 2017), caninos (NÚÑEZ-MARTÍNEZ; MORAN; PEÑA, 2006), suínos (QUINTERO-MORENO; RIGAU; RODRÍGUEZ-GIL, 2004), animais silvestres (MARTINEZ-PASTOR et al., 2005; GALLEGU et al., 2015) e humanos (CHANTLER; ABRAHAM-PESKIR; ROBERTS, 2004). Porém, este é o primeiro estudo que avalia a relação entre as subpopulações espermáticas e as taxas obtidas na PIVE em bovinos.

Neste, a subpopulação 3, que apresentam espermatozoides lentos e sinuosos foi mais frequente nos grupos de baixo desempenho (BC e BB) após a centrifugação em gradiente de Percoll®, enquanto a subpopulação 4, de espermatozoides com cinética lenta e progressiva foi mais frequente em ambos os grupos de baixo desempenho Pré-Percoll® e no grupo BC Pós-Percoll®, o que pode justificar o baixo desempenho destas amostras. Isto porque, segundo Liu, Garrett e Baker (2003) a baixa fertilidade parece estar mais associada a uma menor proporção de espermatozoides que possuem capacidade de fecundar o oócito do que uma diminuição desta capacidade em todos os espermatozoides.

Os grupos de melhor desempenho *in vitro* (AC e AB) apresentaram maior percentual de espermatozoides da subpopulação 2, hiperativados, em ambos os

momentos avaliados (Pré e Pós-Percoll®) quando comparados aos grupos de baixo desempenho (BC e BB). Este achado corrobora a hipótese de que a taxa mais elevada de espermatozoides hiperativados na amostra é favorável à PIVE e pode ser empregada como um fator preditivo.

A centrifugação em gradiente de Percoll® seleciona espermatozoides que apresentam qualidade superior, por serem estes capazes de migrar através das colunas de sílica coloidal (MORTIMER, 2000; BERGSTEIN et al., 2016), o que, no presente estudo, implicou na modificação do perfil das subpopulações. Os grupos de alto desempenho (AC e AB) apresentaram maior percentual de espermatozoides da subpopulação 1, rápidos e progressivos, em relação aos grupos de baixo desempenho (BC e BB) após este procedimento. Por hipótese, o gradiente de Percoll® selecionou a subpopulação que de fato é responsável pela fecundação.

Estes resultados estão de acordo com outros estudos (QUINTERO-MORENO et al., 2003; MUIÑO et al., 2008; RAMÓN et al., 2013; FERRAZ et al., 2014; YÁNIZ et al., 2015) nos quais o grupo de melhor desempenho reprodutivo apresentou maior proporção de espermatozoides na subpopulação com características de cinética semelhante à do presente estudo.

Em estudo realizado na comparação de subpopulações em sêmen de carneiros, o perfil de distribuição entre três subpopulações foi diferente entre os reprodutores de alta e baixa fertilidade a campo. Sendo que carneiros de alta fertilidade apresentaram maior percentual de espermatozoides da subpopulação com cinética rápida e linear (YÁNIZ et al., 2015).

Na comparação de espermatozoides epididimários criopreservados de veado-vermelho de alta e baixa fertilidade, considerada pela taxa de prenhez após inseminação artificial, animais de alta fertilidade apresentaram maior proporção de espermatozoides na subpopulação de rápidos e lineares (RAMÓN et al., 2013).

Similarmente, em garanhões, a fertilidade a campo foi associada a subpopulação espermática com cinética mais progressiva (QUINTERO-MORENO et al., 2003).

Em touros, Muiño et al. (2008) constataram que amostras seminais com maior percentual da subpopulação rápida e progressiva foram mais resistentes ao processo de criopreservação e apresentaram maior longevidade após a descongelação, levantando a hipótese de que a proporção desta subpopulação poderia determinar diferenças na fertilidade *in vivo*, apesar desta não ter sido avaliada.

No sêmen congelado/descongelado de touros, Ferraz et al. (2014) observaram que amostras com maior percentual da subpopulação de rápidos e progressivos, dentre as 4 detectadas, resultaram em maior número de espermatozoides ligados à zona pelúcida.

O presente estudo apresenta resultados consistentes de que valores mais altos das subpopulações de espermatozoides hiperativados (Subpopulação 2) Pré e Pós-Percoll® e de rápidos e progressivos (Subpopulação 1) Pós-Percoll® são indicativos de melhor desempenho na PIVE. Deste modo, o estudo das subpopulações espermáticas pode ser considerado como o método de predição mais eficaz, com a vantagem de utilizar apenas duas ferramentas: CASA e o procedimento estatístico.

8. CONCLUSÕES

A análise dos resultados corrobora a hipótese de que a avaliação dos atributos e das subpopulações espermáticas possibilita diferenciar touros com baixo e alto desempenho na PIVE e permite concluir que:

- 1- Amostras seminais de touros de alto desempenho na PIVE, apresentam cinética espermática com valores superiores de VAP, VCL, ALH e DNC e inferiores de BCF, STR, LIN e WOB, cinética indicativa de hiperativação, e indícios de menor ocorrência de estresse oxidativo.
- 2- A centrifugação em gradiente de Percoll® não exerce influência na comparação dos atributos espermáticos entre touros de baixo e alto desempenho, exceto para as subpopulações espermáticas.
- 3- O modelo preditivo para taxa de clivagem inclui os efeitos de: VCL, BCF e integridade de membrana e ausência de estresse oxidativo (MINE) e resulta na equação:

$$\text{Taxa de clivagem} = 0.9301 + (\text{VCL} * 0.0026) + (\text{BCF} * -0.0271) + (\text{MINE} * 0.0044)$$

- 4- O modelo preditivo para taxa de blastocisto inclui os efeitos de: defeitos menores (DEFMEN), VSL, DABIII (baixa atividade mitocondrial) e DHE e resulta na equação:

$$\text{Taxa de blastocisto} = -0,0058 + (\text{DEFMEN} * 0,0377) + (\text{VSL} * 0,0034) + (\text{DABIII} * 0,0234) + (\text{DHE} * -0,000007)$$

- 5- No sêmen congelado/descongelado de touros antes e após centrifugação em gradiente de Percoll®, por meio de sistema CASA, são detectadas 4 subpopulações espermáticas: 1-Rápidos e progressivos; 2- Hiperativados. 3- Lentos e sinuosos; 4- Lentos e progressivos.
- 6- Touros de alto desempenho na PIVE apresentam maior proporção de subpopulação 2 (hiperativados) Pré e Pós-Percoll® e de subpopulação 1 (rápidos e progressivos) Pós-Percoll®.
- 7- O estudo das subpopulações espermáticas constitui-se no método mais efetivo para predizer o desempenho de touros na PIVE, por discriminar grupos de espermatozoides com cinética semelhante, utilizando apenas CASA e procedimento estatístico específico.

9. REFERÊNCIAS

- ABAIGAR, T.; HOLT, W. V.; HARRISON, R. A.; DEL BARRIO, G. Sperm subpopulations in boar (*Sus scrofa*) and gazelle (*Gazella dama mhorri*) semen as revealed by pattern analysis of computer-assisted motility assessments. **Biol Reprod**, v. 60, n. 1, p. 32-41, 1999.
- ABAIGAR, T.; CANO, M.; PICKARD, A.; HOLT, W. Use of computer-assisted sperm motility assessment and multivariate pattern analysis to characterize ejaculate quality in Mohor gazelles (*Gazella dama mhorri*): effects of body weight, electroejaculation technique and short-term semen storage. **Reproduction**, v. 122, n. 2, p. 265-273, 2001.
- AITKEN, R. Sperm function tests and fertility. **International journal of andrology**, v. 29, n. 1, p. 69-75, 2006.
- AITKEN, R. J.; WINGATE, J. K.; DE IULIIS, G. N.; KOPPERS, A. J.; MCLAUGHLIN, E. A. Cis-unsaturated fatty acids stimulate reactive oxygen species generation and lipid peroxidation in human spermatozoa. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 91, n. 10, p. 4154-4163, 2006.
- AITKEN, R. J.; CURRY, B. J. Redox regulation of human sperm function: from the physiological control of sperm capacitation to the etiology of infertility and DNA damage in the germ line. **Antioxidants & redox signaling**, v. 14, n. 3, p. 367-381, 2011.
- AITKEN, R. J. The capacitation-apoptosis highway: oxysterols and mammalian sperm function. **Biology of Reproduction**, v. 85, n. 1, p. 9-12, 2011.
- AITKEN, R. J.; WHITING, S.; DE IULIIS, G. N.; MCCLYMONT, S.; MITCHELL, L. A.; BAKER, M. A. Electrophilic aldehydes generated by sperm metabolism activate mitochondrial reactive oxygen species generation and apoptosis by targeting succinate dehydrogenase. **Journal of Biological Chemistry**, v. 287, n. 39, p. 33048-33060, 2012.
- AITKEN, R. J.; BAKER, M. A. Causes and consequences of apoptosis in spermatozoa; contributions to infertility and impacts on development. **International Journal of Developmental Biology**, v. 57, n. 2-3-4, p. 265-272, 2013.
- AITKEN, R. J.; SMITH, T. B.; JOBLING, M. S.; BAKER, M. A.; DE IULIIS, G. N. Oxidative stress and male reproductive health. **Asian journal of andrology**, v. 16, n. 1, p. 31, 2014.
- AITKEN, R. J. Reactive oxygen species as mediators of sperm capacitation and pathological damage. **Molecular reproduction and development**, v. 84, n. 10, p. 1039-1052, 2017.
- AL-MAKHZOOMI, A.; LUNDEHEIM, N.; HÅÅRD, M.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Sperm morphology and fertility of progeny-tested AI dairy bulls in Sweden. **Theriogenology**, v. 70, n. 4, p. 682-691, 2008.
- 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, n. 1, p. 48-61, 2008.
- ALVAREZ-RODRIGUEZ, M.; VICENTE-CARRILLO, A.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Exogenous Individual Lecithin-Phospholipids (Phosphatidylcholine and Phosphatidylglycerol) Cannot Prevent the Oxidative Stress Imposed by Cryopreservation of Boar Sperm. **Veterinary Medicine Surgery**, v. 1, n. 1, p., 2017.

AMANN, R.; HAMMERSTEDT, R. In vitro evaluation of sperm quality: an opinion. **Journal of andrology**, v. 14, n. 6, p. 397-406, 1993.

AMANN, R.; SEIDEL, G.; MORTIMER, R. Fertilizing potential in vitro of semen from young beef bulls containing a high or low percentage of sperm with a proximal droplet. **Theriogenology**, v. 54, n. 9, p. 1499-1515, 2000.

AMANN, R. P.; KATZ, D. F. Andrology Lab Corner*: Reflections on CASA After 25 Years. **Journal of andrology**, v. 25, n. 3, p. 317-325, 2004.

AMANN, R. P.; WABERSKI, D. Computer-assisted sperm analysis (CASA): capabilities and potential developments. **Theriogenology**, v. 81, n. 1, p. 5-17. e13, 2014.

ANZAR, M.; HE, L.; BUHR, M. M.; KROETSCH, T. G.; PAULS, K. P. Sperm apoptosis in fresh and cryopreserved bull semen detected by flow cytometry and its relationship with fertility. **Biol Reprod**, v. 66, n. 2, p. 354-360, 2002.

AOYAGI, Y.; FUJII, K.; IWAZUMI, Y.; FURUDATE, M.; FUKUI, Y.; ONO, H. Effects of two treatments on semen from different bulls on in vitro fertilization results of bovine oocytes. **Theriogenology**, v. 30, n. 5, p. 973-985, 1988.

ARRUDA, R.; ORRO, I.; PASSOS, T.; COSTA E SILVA, E.; ZÚCCARI, C. Técnicas para avaliação laboratorial da integridade estrutural e funcional do sêmen congelado de touros. **Rev. Bras. Reprod. Anim**, v. 34, n., p. 168-184, 2010.

ARRUDA, R.; CELEGHINI, E. D. C.; ALONSO, M.; CARVALHO, H.; OLIVEIRA, L.; NASCIMENTO, J.; SILVA, D.; AFFONSO, F.; LEMES, K.; JAIME, J. Métodos de avaliação da morfologia e função espermática: momento atual e desafios futuros. **Rev. Bras. Reprod. Anim**, v. 35, n., p. 145-151, 2011.

ASSUMPTÃO, M.; HAIPECK, K.; LIMA, K.; MELLO, M. R. B. D.; OLIVEIRA, L. J. D.; OLIVEIRA, V. P. D.; TAVARES, L. M. T.; VISINTIN, J. A. Capacitação espermática in vitro com heparina e cálcio ionóforo e sua correlação com a fertilidade em touros. **Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci**, v. 39, n. 3, p. 149-156, 2002.

ATTIA, S.; KATILA, T.; ANDERSSON, M. The Effect of Sperm Morphology and Sire Fertility on Calving Rate of Finnish Ayrshire AI Bulls. **Reprod Domest Anim**, v. 51, n. 1, p. 54-58, 2016.

BALLACHEY, B.; HOHENBOKEN, W.; EVENSON, D. Heterogeneity of sperm nuclear chromatin structure and its relationship to bull fertility. **Biology of Reproduction**, v. 36, n. 4, 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. **J Androl**, v. 9, n. 2, p. 109-115, 1988.

BARBATO, G.; CRAMER, P.; HAMMERSTEDT, R. A practical in vitro sperm-egg binding assay that detects subfertile males. **Biology of Reproduction**, v. 58, n. 3, p. 686-699, 1998.

BARROSO, G.; MORSHEDI, M.; OEHNINGER, S. Analysis of DNA fragmentation, plasma membrane translocation of phosphatidylserine and oxidative stress in human spermatozoa. **Hum Reprod**, v. 15, n. 6, p. 1338-1344, 2000.

BARTH, A. D.; OKO, R. Abnormal morphology of bovine spermatozoa. v., n., p., 1989.

BAUSEK, N.; RUCKENBAUER, H. H.; PFEIFER, S.; SCHNEIDER, W. J.; WOHLRAB, F. Interaction of sperm with purified native chicken ZP1 and ZPC proteins. **Biology of Reproduction**, v. 71, n. 2, p. 684-690, 2004.

BERGSTEIN-GALAN, T. G.; WEISS, R. R.; KOZICKI, L. E.; BICUDO, S. D. Sperm subpopulations in ejaculated sperm and spermatozoa recovered from ovine epididymides up to 48 h after death. **Animal Reproduction Science**, v. 187, n., p. 20-27, 2017.

BERGSTEIN-GALAN, T.; BICUDO, L.; RODELLO, L.; WEISS, R.; BICUDO, S. Sperm membrane integrity and stability after selection of cryopreserved ovine semen on colloidal solutions. **Andrologia**, v., n., p., 2017.

BERGSTEIN, T.; BICUDO, L.; RODELLO, L.; WEISS, R.; BICUDO, S. Kinematic and spermatoc recovery after selection by centrifugation in colloid solutions of ovine cryopreserved semen. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 68, n. 6, p. 1539-1547, 2016.

BLOM, E. Interpretation of spermatoc cytology in bulls. **Fertility and sterility**, v. 1, n. 3, p. 223-238, 1950.

BLOM, E. [The ultrastructure of some characteristic sperm defects and a proposal for a new classification of the bull spermiogram (author's transl)]. **Nordisk Veterinaermedicin**, v. 25, n. 7, p. 383-391, 1972.

BLOTTNER, S.; NEHRING, H.; TORNER, H. Individual differences in capacitation of bull spermatozoa by heparin in vitro: relationship to fertility. **Theriogenology**, v. 34, n. 3, p. 619-628, 1990.

BOCHENEK, M.; SMORAG, Z.; PILCH, J. Sperm chromatin structure assay of bulls qualified for artificial insemination. **Theriogenology**, v. 56, n. 4, p. 557-567, 2001.

BOERSMA, A.; RASSHOFER, R.; STOLLA, R. Influence of sample preparation, staining procedure and analysis conditions on bull sperm head morphometry using the morphology analyser integrated visual optical system. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 36, n. 5, p. 222-229, 2001.

BREININGER, E.; CETICA, P. D.; BECONI, M. Capacitation inducers act through diverse intracellular mechanisms in cryopreserved bovine sperm. **Theriogenology**, v. 74, n. 6, p. 1036-1049, 2010.

BREITBART, H.; RUBINSTEIN, S.; ETKOVITZ, N. Sperm capacitation is regulated by the crosstalk between protein kinase A and C. **Molecular and cellular endocrinology**, v. 252, n. 1, p. 247-249, 2006.

BREITBART, H.; ROTMAN, T.; RUBINSTEIN, S.; ETKOVITZ, N. Role and regulation of PI3K in sperm capacitation and the acrosome reaction. **Molecular and cellular endocrinology**, v. 314, n. 2, p. 234-238, 2010.

BRUM, A. M.; SABEUR, K.; BALL, B. A. Apoptotic-like changes in equine spermatozoa separated by density-gradient centrifugation or after cryopreservation. **Theriogenology**, v. 69, n. 9, p. 1041-1055, 2008.

BUFFONE, M.; DONCEL, G.; BRIGGILER, C. M.; VAZQUEZ-LEVIN, M.; CALAMERA, J. Human sperm subpopulations: relationship between functional quality and protein tyrosine phosphorylation. **Human reproduction**, v. 19, n. 1, p. 139-146, 2004.

CASAGRANDE, J.; PINHEIRO, L.; ALMEIDA, C.; FERRAZ, J. Patologia espermática agrupada segundo BLOM (1972) na avaliação de sêmen para conelação. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 3, n. 2, p. 19-23, 1979.

CASTRO, L.; SIQUEIRA, A.; HAMILTON, T.; MENDES, C.; VISINTIN, J.; ASSUMPÇÃO, M. Effect of bovine sperm chromatin integrity evaluated using three different methods on in vitro fertility. **Theriogenology**, v. 107, n., p. 142-148, 2018.

CBRA. **Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal**. 2.ed. Belo Horizonte, CBRA, 1998. 49 p.

CBRA. **Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal**. 3. ed. Belo Horizonte, CBRA, 2013. 104 p.

CELEGHINI, E.; DE ARRUDA, R.; DE ANDRADE, A.; NASCIMENTO, J.; RAPHAEL, C. Practical techniques for bovine sperm simultaneous fluorimetric assessment of plasma, acrosomal and mitochondrial membranes. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 42, n. 5, p. 479-488, 2007.

CHAN, P.; PROUGH, S.; HENIG, I.; TREDWAY, D. Predictive value of sperm hyperactivation measurements based on the dilution effect method in clinical in vitro fertilization. **INTERNATIONAL JOURNAL OF FERTILITY**, v. 37, n. 6, p. 373-377, 1992.

CHANTLER, E.; ABRAHAM-PESKIR, J.; ROBERTS, C. Consistent presence of two normally distributed sperm subpopulations within normozoospermic human semen: a kinematic study. **International journal of andrology**, v. 27, n. 6, p. 350-359, 2004.

CHEN, L. B. Mitochondrial membrane potential in living cells. **Annual review of cell biology**, v. 4, n. 1, p. 155-181, 1988.

CHENOWETH, P. J. Genetic sperm defects. **Theriogenology**, v. 64, n. 3, p. 457-468, 2005.

COLLIN, S.; SIRARD, M. A.; DUFOUR, M.; BAILEY, J. L. Sperm calcium levels and chlortetracycline fluorescence patterns are related to the in vivo fertility of cryopreserved bovine semen. **J Androl**, v. 21, n. 6, p. 938-943, 2000.

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

COSSARIZZA, A.; BACCARANICONTRI, M.; KALASHNIKOVA, G.; FRANCESCHI, C. A new method for the cytofluorometric analysis of mitochondrial membrane potential using the J-aggregate forming lipophilic cation 5, 5', 6, 6'-tetrachloro-1, 1', 3, 3'-tetraethylbenzimidazolcarbocyanine iodide (JC-1). **Biochemical and biophysical research communications**, v. 197, n. 1, p. 40-45, 1993.

CRAN, D.; DOTT, H. The ultrastructure of knobbed bull spermatozoa. **Journal of reproduction and Fertility**, v. 47, n. 2, p. 407-NP, 1976.

CRISCUOLO, T.; ROCHA, A.; SEMACO, T.; SERZEDELO, T.; ALEGRETTI, J.; SERAFINI, P.; MOTTA, E. Motile sperm binding to the egg yolk membrane is an easy and feasible function test for acrosome integrity. **J Brasileiro Reprod Assist**, v. 14, n. 4, p., 2010.

D'OCCHIO, M. J.; HENGSTBERGER, K. J.; TUTT, D.; HOLROYD, R. G.; FORDYCE, G.; BOE-HANSEN, G. B.; JOHNSTON, S. D. Sperm chromatin in beef bulls in tropical environments. **Theriogenology**, v. 79, n. 6, p. 946-952, 2013.

DE ANDRADE, A.; DE ARRUDA, R.; CELEGHINI, E.; NASCIMENTO, J.; MARTINS, S.; RAPHAEL, C.; MORETTI, A. Fluorescent stain method for the simultaneous determination of mitochondrial potential and integrity of plasma and acrosomal membranes in boar sperm. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 42, n. 2, p. 190-194, 2007.

DE ARRUDA, R. P.; CELEGHINI, E. C. C.; GARCIA, A. R.; DOS SANTOS, G. D. C.; LEITE, T. G.; OLIVEIRA, L. Z.; LANÇONI, R.; DE PAULA RODRIGUES, M. Morfologia espermática de touros: interpretação e impacto na fertilidade. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 39, n. 1, p. 47-60.

DE ASSIS, P. M.; CASTRO, L. S.; SIQUEIRA, A. F. P.; DE CARVALHO DELGADO, J.; DOS SANTOS HAMILTON, T. R.; GOISSIS, M. D.; MENDES, C. M.; NICHI, M.; VISINTIN, J. A.; ASSUMPÇÃO, M. E. O. D. Á. System for evaluation of oxidative stress on in-vitro-produced bovine embryos. **Reproductive biomedicine online**, v. 31, n. 4, p. 577-580, 2015.

DE CASTRO, L. S.; DE ASSIS, P. M.; SIQUEIRA, A. F.; HAMILTON, T. R.; MENDES, C. M.; LOSANO, J. D.; NICHI, M.; VISINTIN, J. A.; ASSUMPÇÃO, M. E. 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, n., p., 2015.

DE PAULA FREITAS-DELL'AQUA, C.; MONTEIRO, G. A.; DELL'AQUA, J. A.; PAPA, F. O. The effects of refrigeration temperature and storage time on apoptotic markers in equine semen. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 33, n. 1, p. 27-30, 2013.

DEL GALLEGGO, R.; SADEGHI, S.; BLASCO, E.; SOLER, C.; YÁNIZ, J.; SILVESTRE, M. Effect of chamber characteristics, loading and analysis time on motility and kinetic variables analysed with the CASA-mot system in goat sperm. **Animal Reproduction Science**, v. 177, n., p. 97-104, 2017.

DEL OLMO, E.; BISBAL, A.; MAROTO-MORALES, A.; GARCÍA-ALVAREZ, O.; RAMON, M.; JIMENEZ-RABADAN, P.; MARTÍNEZ-PASTOR, F.; SOLER, A.; GARDE, J.; FERNANDEZ-SANTOS, M. Fertility of cryopreserved ovine semen is determined by sperm velocity. **Animal Reproduction Science**, v. 138, n. 1, p. 102-109, 2013.

DEN DAAS, J.; DE JONG, G.; LANSBERGEN, L.; VAN WAGTENDONK-DE LEEUW, A. The relationship between the number of spermatozoa inseminated and the reproductive efficiency of individual dairy bulls. **J Dairy Sci**, v. 81, n. 6, p. 1714-1723, 1998.

DODE, M. A.; 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, n. 1-2, p. 15-23, 2002.

DUNBAR, B. S.; SHIVERS, C. A. Immunological aspects of sperm receptors on the zona pellucida of mammalian eggs. **Immunological communications**, v. 5, n. 5, p. 375-385, 1976.

DURU, N. K.; MORSHEDI, M.; SCHUFFNER, A.; OEHNINGER, S. Cryopreservation-thawing of fractionated human spermatozoa and plasma membrane translocation of phosphatidylserine. **Fertility and sterility**, v. 75, n. 2, p. 263-268, 2001.

ELKHAWAGAH, A.; LONGOBARDI, V.; GASPARRINI, B.; SOSA, G.; BIFULCO, G.; ABOUELROOS, M.; ABD EL-GHAFAR, A.; CAMAPNILE, G. Evaluation of in vitro capacitation of buffalo frozen/thawed sperm by different techniques. **Journal of Buffalo Science**, v. 3, n. 1, p. 3-11, 2014.

ERICKSON, L.; KROETSCH, T.; ANZAR, M. Relationship between sperm apoptosis and bull fertility: in vivo and in vitro studies. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 28, n. 9, p. 1369-1375, 2016.

EVENSON, D. Male Germ Cell Analysis by Flow Cytometry: Effects of Cancer, Chemotherapy, and Other Factors on Testicular Function and Sperm Chromatin Structure. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 468, n. 1, p. 350-367, 1986.

EVENSON, D.; JOST, L.; MARSHALL, D.; ZINAMAN, M.; CLEGG, E.; PURVIS, K.; DE ANGELIS, P.; CLAUSSEN, O. Utility of the sperm chromatin structure assay as a diagnostic and prognostic tool in the human fertility clinic. **Human reproduction**, v. 14, n. 4, p. 1039-1049, 1999.

EVENSON, D. P.; WIXON, R. Clinical aspects of sperm DNA fragmentation detection and male infertility. **Theriogenology**, v. 65, n. 5, p. 979-991, 2006.

FARRELL, P.; PRESICCE, G.; BROCKETT, C.; FOOTE, R. Quantification of bull sperm characteristics measured by computer-assisted sperm analysis (CASA) and the relationship to fertility. **Theriogenology**, v. 49, n. 4, p. 871-879, 1998.

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

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

FERRÉ, L. B.; BOGLIOTTI, Y.; CHITWOOD, J. L.; FRESNO, C.; ORTEGA, H. H.; KJELLAND, M. E.; ROSS, P. J. Effect of spermatozoa motility hyperactivation factors and gamete coincubation duration on in vitro bovine embryo development using flow cytometrically sorted spermatozoa. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 29, n. 4, p. 805-814, 2017.

FLESCH, F. M.; BROUWERS, J. F.; NIEVELSTEIN, P. F.; VERKLEIJ, A. J.; VAN GOLDE, L. M.; COLENBRANDER, B.; GADELLA, B. M. Bicarbonate stimulated phospholipid scrambling induces cholesterol redistribution and enables cholesterol depletion in the sperm plasma membrane. **Journal of cell science**, v. 114, n. 19, p. 3543-3555, 2001.

FREITAS-DELL'AQUA, C.; CRESPILO, A.; PAPA, F.; DELL'AQUA JR, J. Metodologia de avaliação laboratorial do sêmen congelado bovino. **Rev Bras Reprod Anim**, v. 33, n., p. 213-222, 2009.

FUKUI, Y.; GLEW, A.; GANDOLFI, F.; MOOR, R. Ram-specific effects on in-vitro fertilization and cleavage of sheep oocytes matured in vitro. **Journal of reproduction and Fertility**, v. 82, n. 1, p. 337-340, 1988.

GADELLA, B.; MILLER, N.; COLENBRANDER, B.; VAN GOLDE, L.; HARRISON, R. Flow cytometric detection of transbilayer movement of fluorescent phospholipid analogues across the boar sperm plasma membrane: elimination of labeling artifacts. **Molecular reproduction and development**, v. 53, n. 1, p. 108-125, 1999.

GADELLA, B.; RATHI, R.; BROUWERS, J.; STOUT, T.; COLENBRANDER, B. Capacitation and the acrosome reaction in equine sperm. **Animal Reproduction Science**, v. 68, n. 3, p. 249-265, 2001.

GADELLA, B. Sperm membrane physiology and relevance for fertilization. **Animal Reproduction Science**, v. 107, n. 3, p. 229-236, 2008.

GALANTINO-HOMER, H. L.; VISCONTI, P. E.; KOPF, G. S. Regulation of protein tyrosine phosphorylation during bovine sperm capacitation by a cyclic adenosine 3'5'-monophosphate-dependent pathway. **Biology of Reproduction**, v. 56, n. 3, p. 707-719, 1997.

GALLEGO, V.; VÍLCHEZ, M.; PEÑARANDA, D.; PÉREZ, L.; HERRÁEZ, M.; ASTURIANO, J.; MARTÍNEZ-PASTOR, F. Subpopulation pattern of eel spermatozoa is affected by post-activation time, hormonal treatment and the thermal regimen. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 27, n. 3, p. 529-543, 2015.

GARCIA-ALVAREZ, O.; MAROTO-MORALES, A.; RAMON, M.; DEL OLMO, E.; MONTORO, V.; DOMINGUEZ-REBOLLEDO, A. E.; BISBAL, A.; JIMENEZ-RABADAN, P.; PEREZ-GUZMAN, M. D.; SOLER, A. J. Analysis of selected sperm by density gradient centrifugation might aid in the estimation of in vivo fertility of thawed ram spermatozoa. **Theriogenology**, v. 74, n. 6, p. 979-988, 2010.

GARCÍA, B. M.; FERNÁNDEZ, L. G.; MORRELL, J.; FERRUSOLA, C. O.; TAPIA, J.; MARTÍNEZ, H. R.; PEÑA, F. Single-Layer Centrifugation Through Colloid Positively Modifies the Sperm Subpopulation Structure of Frozen–Thawed Stallion Spermatozoa. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 44, n. 3, p. 523-526, 2009.

GARNER, D.; PINKEL, D.; JOHNSON, L.; PACE, M. Assessment of spermatozoal function using dual fluorescent staining and flow cytometric analyses. **Biology of Reproduction**, v. 34, n. 1, p. 127-138, 1986.

GARNER, D. L.; THOMAS, C. A.; JOERG, H. W.; DEJARNETTE, J. M.; MARSHALL, C. E. Fluorometric assessments of mitochondrial function and viability in cryopreserved bovine spermatozoa. **Biol Reprod**, v. 57, n. 6, p. 1401-1406, 1997.

GHERSEVICH, S.; MASSA, E.; ZUMOFFEN, C. Oviductal secretion and gamete interaction. **Reproduction**, v. 149, n. 1, p. R1-R14, 2015.

GHYS, E.; DALLEMAGNE, M.; DE TROY, D.; SAUVEGARDE, C.; ERRACHID, A.; DONNAY, I. Female bovine blastocysts are more prone to apoptosis than male ones. **Theriogenology**, v. 85, n. 4, p. 591-600, 2016.

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

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

GLIOZZI, T.; TURRI, F.; MANES, S.; CASSINELLI, C.; PIZZI, F. The combination of kinetic and flow cytometric semen parameters as a tool to predict fertility in cryopreserved bull semen. **animal**, v. 11, n. 11, p. 1975-1982, 2017.

GOMES, A.; FERNANDES, E.; LIMA, J. L. Fluorescence probes used for detection of reactive oxygen species. **Journal of biochemical and biophysical methods**, v. 65, n. 2-3, p. 45-80, 2005.

GOTO, Y.; NODA, Y.; MORI, T.; NAKANO, M. Increased generation of reactive oxygen species in embryos cultured in vitro. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 15, n. 1, p. 69-75, 1993.

GRAHAM, J.; FOOTE, R.; PARRISH, J. Effect of dilauroylphosphatidylcholine on the acrosome reaction and subsequent penetration of bull spermatozoa into zona-free hamster eggs. **Biology of Reproduction**, v. 35, n. 2, p. 413-424, 1986.

GRAHAM, J.; FOOTE, R.; HOUGH, S. Penetration of zona-free hamster eggs by liposome-treated sperm from the bull, ram, stallion, and boar. **Biology of Reproduction**, v. 37, n. 1, p. 181-188, 1987.

GRAHAM, J.; KUNZE, E.; HAMMERSTEDT, R. Analysis of sperm cell viability, acrosomal integrity, and mitochondrial function using flow cytometry. **Biology of Reproduction**, v. 43, n. 1, p. 55-64, 1990.

GRAHAM, J.; MOCÉ, E. Fertility evaluation of frozen/thawed semen. **Theriogenology**, v. 64, n. 3, p. 492-504, 2005.

GRAHAM, J. K. Assessment of sperm quality: a flow cytometric approach. **Animal Reproduction Science**, v. 68, n. 3, p. 239-247, 2001.

GRAVANCE, C.; GARNER, D.; BAUMBER, J.; BALL, B. Assessment of equine sperm mitochondrial function using JC-1. **Theriogenology**, v. 53, n. 9, p. 1691-1703, 2000.

HALLAP, T.; HÅÅRD, M.; JAAKMA, Ü.; LARSSON, B.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Does cleansing of frozen-thawed bull semen before assessment provide samples that relate better to potential fertility? **Theriogenology**, v. 62, n. 3, p. 702-713, 2004.

HALLAP, T.; NAGY, S.; HÅÅRD, M.; JAAKMA, Ü.; JOHANNISSON, A.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Sperm chromatin stability in frozen-thawed semen is maintained over age in AI bulls. **Theriogenology**, v. 63, n. 6, p. 1752-1763, 2005.

HALLAP, T.; NAGY, S.; JAAKMA, U.; JOHANNISSON, A.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Usefulness of a triple fluorochrome combination Merocyanine 540/Yo-Pro 1/Hoechst 33342 in assessing membrane stability of viable frozen-thawed spermatozoa from Estonian Holstein AI bulls. **Theriogenology**, v. 65, n. 6, p. 1122-1136, 2006.

HAMILTON, T. R. D. S.; MENDES, C. M.; CASTRO, L. S. D.; ASSIS, P. M. D.; SIQUEIRA, A. F. P.; DELGADO, J. D. C.; GOISSIS, M. D.; MUÑO-BLANCO, T.; CEBRIÁN-PÉREZ, J. Á.; NICHI, M. Evaluation of lasting effects of heat stress on sperm profile and oxidative status of ram semen and epididymal sperm. **Oxidative medicine and cellular longevity**, v. 2016, n., p., 2016.

HAMMERSTEDT, R. H. Evaluation of sperm quality: identification of the subfertile male and courses of action. **Animal Reproduction Science**, v. 42, n. 1, p. 77-87, 1996.

HARRISON, R. Capacitation mechanisms, and the role of capacitation as seen in eutherian mammals. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 8, n. 4, p. 581-594, 1996.

HENKEL, R. R.; SCHILL, W.-B. Sperm preparation for ART. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 1, n. 1, p. 1, 2003.

HIRANO, Y.; SHIBAHARA, H.; OBARA, H.; SUZUKI, T.; TAKAMIZAWA, S.; YAMAGUCHI, C.; TSUNODA, H.; SATO, I. Andrology: Relationships between sperm motility characteristics assessed by the computer-aided sperm analysis (CASA) and fertilization rates in vitro. **Journal of assisted reproduction and genetics**, v. 18, n. 4, p. 215-220, 2001.

HO, H.-C.; GRANISH, K. A.; SUAREZ, S. S. Hyperactivated motility of bull sperm is triggered at the axoneme by Ca^{2+} and not cAMP. **Developmental biology**, v. 250, n. 1, p. 208-217, 2002.

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, n. 6, p. 709-718, 2007.

HOLT, W. V.; FAZELI, A. The oviduct as a complex mediator of mammalian sperm function and selection. **Molecular reproduction and development**, v. 77, n. 11, p. 934-943, 2010.

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

HRUDKA, F. Cytochemical and ultracytochemical demonstration of cytochrome c oxidase in spermatozoa and dynamics of its changes accompanying ageing or induced by stress. **Int J Androl**, v. 10, n. 6, p. 809-828, 1987.

INGERMANN, R.; SCHULTZ, C.; KANUGA, M.; WILSON-LEEDY, J. Metabolism of motile zebrafish sperm. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology**, v. 158, n. 4, p. 461-467, 2011.

ISHIJIMA, S. Ca^{2+} and cAMP regulations of microtubule sliding in hyperactivated motility of bull spermatozoa. **Proceedings of the Japan Academy, Series B**, v. 91, n. 3, p. 99-108, 2015.

JAGAN MOHANARAO, G.; ATREJA, S. K. Identification of capacitation associated tyrosine phosphoproteins in buffalo (*Bubalus bubalis*) and cattle spermatozoa. **Animal Reproduction Science**, v. 123, n. 1-2, p. 40-47, 2011.

JANUSKAUSKAS, A.; JOHANNISSON, A.; SÖDERQUIST, L.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Assessment of sperm characteristics post-thaw and response to calcium ionophore in relation to fertility in Swedish dairy AI bulls. **Theriogenology**, v. 53, n. 4, p. 859-875, 2000.

JANUSKAUSKAS, A.; JOHANNISSON, A.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Assessment of sperm quality through fluorometry and sperm chromatin structure assay in relation to field fertility of frozen-thawed semen from Swedish AI bulls. **Theriogenology**, v. 55, n. 4, p. 947-961, 2001.

JANUSKAUSKAS, A.; JOHANNISSON, A.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Subtle membrane changes in cryopreserved bull semen in relation with sperm viability, chromatin structure, and field fertility. **Theriogenology**, v. 60, n. 4, p. 743-758, 2003.

JANUŠKAUSKAS, A.; ŽILINSKAS, H. Bull semen evaluation post-thaw and relation of semen characteristics to bull's fertility. v., n., p.

JOO, B. S.; KIM, M. K.; NA, Y. J.; MOON, H. S.; LEE, K. S.; DO KIM, H. The mechanism of action of coculture on embryo development in the mouse model: direct embryo-to-cell contact and the removal of deleterious components. **Fertility and sterility**, v. 75, n. 1, p. 193-199, 2001.

KANNO, C.; SAKAMOTO, K. Q.; YANAGAWA, Y.; TAKAHASHI, Y.; KATAGIRI, S.; NAGANO, M. Comparison of sperm subpopulation structures in first and second ejaculated semen from Japanese black bulls by a cluster analysis of sperm motility evaluated by a CASA system. **Journal of Veterinary Medical Science**, v. 79, n. 8, p. 1359-1365, 2017.

KARUNAKARAN, M.; DEVANATHAN, T. Evaluation of bull semen for fertility-associated protein, in vitro characters and fertility. **Journal of Applied Animal Research**, v. 45, n. 1, p. 136-144, 2017.

KATHIRAVAN, P.; KALATHARAN, J.; EDWIN, M. J.; VEERAPANDIAN, C. Computer automated motion analysis of crossbred bull spermatozoa and its relationship with in vitro fertility in zona-free hamster oocytes. **Animal Reproduction Science**, v. 104, n. 1, p. 9-17, 2008.

KATHIRAVAN, P.; KALATHARAN, J.; KARTHIKEYA, G.; RENGARAJAN, K.; KADIRVEL, G. Objective Sperm Motion Analysis to Assess Dairy Bull Fertility Using Computer-Aided System—A Review. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 46, n. 1, p. 165-172, 2011.

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. e0129285, 2015.

KAWAI, G. K. V.; GURGEL, J. R. C.; DE AGOSTINI LOSANO, J. D.; DALMAZZO, A.; ROCHA, C. C.; TSUNODA, R. H.; DE ARAÚJO GÓES, P. A.; RUI, B. R.; ANGRIMANI, D. D. S. R.; MENDES, C. M. Susceptibility of Stallion Spermatozoa to Different Oxidative Challenges: Role of Seminal Plasma. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 55, n., p. 76-83, 2017.

KIM, S.; AGCA, C.; AGCA, Y. Effects of various physical stress factors on mitochondrial function and reactive oxygen species in rat spermatozoa. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 25, n. 7, p. 1051-1064, 2013.

KIRKEGAARD, K.; KESMODEL, U. S.; HINDKJÆR, J. J.; INGERSLEV, H. J. Time-lapse parameters as predictors of blastocyst development and pregnancy outcome in embryos from good prognosis patients: a prospective cohort study. **Human reproduction**, v. 28, n. 10, p. 2643-2651, 2013.

KİZILAY, F.; ALTAY, B. Sperm function tests in clinical practice. **Turkish journal of urology**, v. 43, n. 4, p. 393, 2017.

KOPPERS, A. J.; DE IULIIS, G. N.; FINNIE, J. M.; MCLAUGHLIN, E. A.; AITKEN, R. J. Significance of mitochondrial reactive oxygen species in the generation of oxidative stress in spermatozoa. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 93, n. 8, p. 3199-3207, 2008.

KOPPERS, A. J.; GARG, M. L.; AITKEN, R. J. Stimulation of mitochondrial reactive oxygen species production by unesterified, unsaturated fatty acids in defective human spermatozoa. **Free Radic Biol Med**, v. 48, n. 1, p. 112-119, 2010.

KOPPERS, A. J.; MITCHELL, L. A.; WANG, P.; LIN, M.; AITKEN, R. J. Phosphoinositide 3-kinase signalling pathway involvement in a truncated apoptotic cascade associated with motility loss and oxidative DNA damage in human spermatozoa. **Biochem J**, v. 436, n. 3, p. 687-698, 2011.

KURODA, K.; FUKUSHIMA, M.; HARAYAMA, H. Premature capacitation of frozen-thawed spermatozoa from subfertile Japanese black cattle. **Journal of Reproduction and Development**, v. 53, n. 5, p. 1079-1086, 2007.

LAGERLOF, N. Sterility in bulls. **Vet. Rec.**, v. 48, n., p. 1159-1170, 1936.

LAGERLÖF, N. Morphological studies on the change in sperm structure and in the testes of bulls with decreased or abolished fertility. **Acta Pathol Microbiol Scand**, v. 19, n., p. 254-266, 1934.

LANDIM-ALVARENGA, F.; ALVARENGA, M. A.; SEIDEL, G.; SQUIRES, E.; GRAHAM, J. Penetration of zona-free hamster, bovine and equine oocytes by stallion and bull spermatozoa pretreated with equine follicular fluid, dilauroylphosphatidylcholine or calcium ionophore A23187. **Theriogenology**, v. 56, n. 5, p. 937-953, 2001.

LARSSON, B.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Can we use in vitro fertilization tests to predict semen fertility? **Animal Reproduction Science**, v. 60, n., p. 327-336, 2000.

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

LEE, H. L.; KIM, S. H.; JI, D. B.; KIM, Y. J. A comparative study of Sephadex, glass wool and Percoll separation techniques on sperm quality and IVF results for cryopreserved bovine semen. **J Vet Sci**, v. 10, n. 3, p. 249-255, 2009.

LEEMANS, B.; GADELLA, B. M.; SOSTARIC, E.; NELIS, H.; STOUT, T. A.; HOOGEWIJS, M.; VAN SOOM, A. Oviduct Binding and Elevated Environmental pH Induce Protein Tyrosine Phosphorylation in Stallion Spermatozoa¹. v., n., p., 2014.

LEIBFRIED-RUTLEDGE, M.; CRITSER, E.; PARRISH, J.; FIRST, N. In vitro maturation and fertilization of bovine oocytes. **Theriogenology**, v. 31, n. 1, p. 61-74, 1989.

LEMMA, A. **Effect of cryopreservation on sperm quality and fertility**: INTECH Open Access Publisher, 2011

LENZ, R. W.; BALL, G. D.; LOHSE, J. K.; FIRST, N. L.; AX, R. L. Chondroitin sulfate facilitates an acrosome reaction in bovine spermatozoa as evidenced by light microscopy, electron microscopy and in vitro fertilization. **Biol Reprod**, v. 28, n. 3, p. 683-690, 1983.

LIN, M.-H.; LEE, R. K.-K.; LI, S.-H.; LU, C.-H.; SUN, F.-J.; HWU, Y.-M. Sperm chromatin structure assay parameters are not related to fertilization rates, embryo quality, and pregnancy rates in in vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection, but might be related to spontaneous abortion rates. **Fertility and sterility**, v. 90, n. 2, p. 352-359, 2008.

LIU, D.; LOPATA, A.; JOHNSTON, W.; BAKER, H. Human sperm—zona pellucida binding, sperm characteristics and in-vitro fertilization. **Human reproduction**, v. 4, n. 6, p. 696-701, 1989.

- LIU, D.; GARRETT, C.; BAKER, H. Low proportions of sperm can bind to the zona pellucida of human oocytes. **Human reproduction**, v. 18, n. 11, p. 2382-2389, 2003.
- LO, K.; BRINKMAN, R. R.; GOTTARDO, R. Automated gating of flow cytometry data via robust model-based clustering. **Cytometry Part A**, v. 73, n. 4, p. 321-332, 2008.
- LONERGAN, P. The application of in vitro fertilization techniques to the prediction of bull fertility. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 29, n. 1, p. 12-21, 1994.
- LOSANO, J. D.; ANGRIMANI, D. S.; PEREIRA, R. J.; ROCHA, A. M.; CRISCUOLO, T. S.; BARNABE, V. H.; BARNABE, R. C.; MENDES, C. M.; ASSUMPCAO, M. E.; NICHII, M. Utilisation of sperm-binding assay combined with computer-assisted sperm analysis to evaluate frozen-thawed bull semen. **Andrologia**, v. 47, n. 1, p. 77-84, 2015.
- LUCIO, A. C.; ALVES, B. G.; ALVES, K. A.; MARTINS, M. C.; BRAGA, L. S.; MIGLIO, L.; ALVES, B. G.; SILVA, T. H.; JACOMINI, J. O.; BELETTI, M. E. Selected sperm traits are simultaneously altered after scrotal heat stress and play specific roles in in vitro fertilization and embryonic development. **Theriogenology**, v. 86, n. 4, p. 924-933, 2016.
- LUNA, C.; YESTE, M.; DEL ALAMO, M. M. R.; DOMINGO, J.; CASAO, A.; RODRIGUEZ-GIL, J. E.; PÉREZ-PÉ, R.; CEBRIÁN-PÉREZ, J. A.; MUIÑO-BLANCO, T. Effect of seminal plasma proteins on the motile sperm subpopulations in ram ejaculates. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 29, n. 2, p. 394-405, 2017.
- MACÍAS-GARCÍA, B.; GONZÁLEZ-FERNÁNDEZ, L.; LOUX, S. C.; ROCHA, A.; GUIMARÃES, T.; PEÑA, F.; VARNER, D. D.; HINRICHS, K. Effect of calcium, bicarbonate, and albumin on capacitation-related events in equine sperm. **Reproduction**, v. 149, n. 1, p. 87-99, 2015.
- MAIA, M.; BICUDO, S. Radicais livres, antioxidantes e função espermática em mamíferos: uma revisão. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 33, n. 4, p. 183-193, 2009.
- MANGOLI, E.; TALEBI, A. R.; ANVARI, M.; TAHERI, F.; VATANPARAST, M.; RAHIMINIA, T.; HOSSEINI, A. Vitamin C attenuates negative effects of vitrification on sperm parameters, chromatin quality, apoptosis and acrosome reaction in neat and prepared normozoospermic samples. **Taiwanese Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 57, n. 2, p. 200-204, 2018.
- MAROTO-MORALES, A.; RAMON, M.; GARCIA-ALVAREZ, O.; SOLER, A. J.; FERNÁNDEZ-SANTOS, M. R.; ROLDAN, E. R.; GOMENDIO, M.; PEREZ-GUZMAN, M.; GARDE, J. J. Morphometrically-distinct sperm subpopulations defined by a multistep statistical procedure in ram ejaculates: intra-and interindividual variation. **Theriogenology**, v. 77, n. 8, p. 1529-1539, 2012.
- MARQUES, M.; SOUSA, A. P.; PAIVA, A.; ALMEIDA-SANTOS, T.; RAMALHO-SANTOS, J. Low amounts of mitochondrial reactive oxygen species define human sperm quality. **Reproduction**, v. 147, n. 6, p. 817-824, 2014.
- MARTIN, G.; SABIDO, O.; DURAND, P.; LEVY, R. Cryopreservation induces an apoptosis-like mechanism in bull sperm. **Biol Reprod**, v. 71, n. 1, p. 28-37, 2004.
- MARTIN, G.; CAGNON, N.; SABIDO, O.; SION, B.; GRIZARD, G.; DURAND, P.; LEVY, R. Kinetics of occurrence of some features of apoptosis during the cryopreservation process of bovine spermatozoa. **Human reproduction**, v. 22, n. 2, p. 380-388, 2007.
- MARTINEZ-PASTOR, F.; GARCIA-MACIAS, V.; ALVAREZ, M.; HERRAEZ, P.; ANEL, L.; DE PAZ, P. Sperm subpopulations in Iberian red deer epididymal sperm and their changes

through the cryopreservation process. **Biology of Reproduction**, v. 72, n. 2, p. 316-327, 2005.

MERATI, Z.; FARSHAD, A.; FARZINPOUR, A.; ROSTAMZADEH, J.; SHARAFI, M. Anti-apoptotic effects of minocycline on ram epididymal spermatozoa exposed to oxidative stress. **Theriogenology**, v., n., p., 2018.

MILAZZOTTO, M. P.; GOISSIS, M. D.; CHITWOOD, J. L.; ANNES, K.; SOARES, C. A.; ISPADA, J.; ASSUMPÇÃO, M. E. O. Á.; ROSS, P. J. Early cleavages influence the molecular and the metabolic pattern of individually cultured bovine blastocysts. **Molecular reproduction and development**, v. 83, n. 4, p. 324-336, 2016.

MOCÉ, E.; GRAHAM, J. In vitro evaluation of sperm quality. **Animal Reproduction Science**, v. 105, n. 1, p. 104-118, 2008.

MONDAL, M.; TAKAGI, Y.; BABA, S. A.; HAMANO, K. I. Possible ability of bovine follicular fluid to attract migrating bull spermatozoa. **Reproductive medicine and biology**, v. 16, n. 2, p. 133-138, 2017.

MORAN, J. M.; MADEJON, L.; ORTEGA FERRUSOLA, C.; PENA, F. J. Nitric oxide induces caspase activity in boar spermatozoa. **Theriogenology**, v. 70, n. 1, p. 91-96, 2008.

MORRELL, J. M.; NONGBUA, T.; VALEANU, S.; VERDE, I. L.; LUNDSTEDT-ENKEL, K.; EDMAN, A.; JOHANNISSON, A. Sperm quality variables as indicators of bull fertility may be breed dependent. **Animal Reproduction Science**, v. 185, n., p. 42-52, 2017.

MORTIMER, D. Sperm preparation methods. **Journal of andrology**, v. 21, n. 3, p. 357-366, 2000.

MORTIMER, S. T. A critical review of the physiological importance and analysis of sperm movement in mammals. **Human reproduction update**, v. 3, n. 5, p. 403-439, 1997.

MUIÑO, R.; TAMARGO, C.; HIDALGO, C.; PEÑA, A. Identification of sperm subpopulations with defined motility characteristics in ejaculates from Holstein bulls: effects of cryopreservation and between-bull variation. **Animal Reproduction Science**, v. 109, n. 1, p. 27-39, 2008.

MURASE, T.; EL-KON, I.; HARAYAMA, H.; MUKOUJIMA, K.; TAKASU, M.; SAKAI, K. Hyperactivated motility of frozen-thawed spermatozoa from fertile and subfertile Japanese Black bulls induced by cyclic adenosine 3', 5'-monophosphate analogue, cBiMPS. **Journal of Reproduction and Development**, v. 56, n. 1, p. 36-40, 2010.

MURATORI, M.; PORAZZI, I.; LUCONI, M.; MARCHIANI, S.; FORTI, G.; BALDI, E. Annexin V binding and merocyanine staining fail to detect human sperm capacitation. **Journal of andrology**, v. 25, n. 5, p. 797-810, 2004.

NARESH, S.; ATREJA, S. Detection, Localization and Tyrosine Phosphorylation Status of Ser/Thr Protein Phosphatase1 γ in Freshly Ejaculated, In Vitro Capacitated and Cryopreserved Buffalo Spermatozoa. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 50, n. 6, p. 901-909, 2015.

NEUMANN, G.; BERNARDES JÚNIOR, J. J.; SANCHES, P. V.; PIANA, P. A.; BOMBARDELLI, R. A. Contribution of the CASA system, based on open source software, to the assessment of sperm characteristics: informetric and usage-based approaches. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 46, n. 7, p. 560-568, 2017.

NICHI, M.; BOLS, P.; ZÜGE, R.; BARNABE, V.; GOOVAERTS, I.; BARNABE, R.; CORTADA, C. Seasonal variation in semen quality in *Bos indicus* and *Bos taurus* bulls raised under tropical conditions. **Theriogenology**, v. 66, n. 4, p. 822-828, 2006.

NICHI, M.; GOOVAERTS, I.; CORTADA, C.; BARNABE, V.; DE CLERCQ, J.; BOLS, P. Roles of lipid peroxidation and cytoplasmic droplets on in vitro fertilization capacity of sperm collected from bovine epididymides stored at 4 and 34 C. **Theriogenology**, v. 67, n. 2, p. 334-340, 2007.

NÚÑEZ-MARTÍNEZ, I.; MORAN, J.; PEÑA, F. A Three-Step Statistical Procedure to Identify Sperm Kinematic Subpopulations in Canine Ejaculates: Changes after Cryopreservation. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 41, n. 5, p. 408-415, 2006.

O'FLAHERTY, C.; BEORLEGUI, N.; BECONI, M. Reactive oxygen species requirements for bovine sperm capacitation and acrosome reaction. **Theriogenology**, v. 52, n. 2, p. 289-301, 1999.

O'FLAHERTY, C.; BREININGER, E.; BEORLEGUI, N.; BECONI, M. Acrosome reaction in bovine spermatozoa: role of reactive oxygen species and lactate dehydrogenase C4. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects**, v. 1726, n. 1, p. 96-101, 2005.

O'MEARA, C.; HANRAHAN, J.; PRATHALINGAM, N.; OWEN, J.; DONOVAN, A.; FAIR, S.; WARD, F.; WADE, M.; EVANS, A.; LONERGAN, P. Relationship between in vitro sperm functional tests and in vivo fertility of rams following cervical artificial insemination of ewes with frozen-thawed semen. **Theriogenology**, v. 69, n. 4, p. 513-522, 2008.

ODHIAMBO, J. F.; DEJARNETTE, J.; GEARY, T. W.; KENNEDY, C. E.; SUAREZ, S. S.; SUTOVSKY, M.; SUTOVSKY, P. Increased conception rates in beef cattle inseminated with nanopurified bull semen. **Biology of Reproduction**, v. 91, n. 4, p. 97, 2014.

OEHNINGER, S.; FRANKEN, D. R.; OMBELET, W. Sperm functional tests. **Fertility and sterility**, v. 102, n. 6, p. 1528-1533, 2014.

OLIVEIRA, L.; ARRUDA, R.; CELEGHINI, E. C. C.; DE ANDRADE, A.; PERINI, A.; RESENDE, M.; MIGUEL, M.; LUCIO, A.; HOSSEPIAN DE LIMA, V. Effects of discontinuous Percoll gradient centrifugation on the quality of bovine spermatozoa evaluated with computer-assisted semen analysis and fluorescent probes association. **Andrologia**, v. 44, n. 1, p. 9-15, 2012.

OLIVEIRA, L. Z.; RIBEIRO, L. B.; SILVA, L. G. T. D.; OLIVEIRA, C. S.; DIAS, E. A. R.; CAMPANHOLI, S. P.; CAMPOS, C. C.; OLIVEIRA, M. V. D.; MONTEIRO, F. M. Assessment of different in vitro sperm challenges and in vivo fertility of bovine semen batches. **Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.(Online)**, v. 54, n. 3, p. 264-276, 2017.

ORTEGA-FERRUSOLA, C.; SOTILLO-GALÁN, Y.; VARELA-FERNÁNDEZ, E.; GALLARDO-BOLAÑOS, J.; MURIEL, A.; GONZÁLEZ-FERNÁNDEZ, L.; TAPIA, J.; PENA, F. Detection of "Apoptosis-Like" Changes During the Cryopreservation Process in Equine Sperm. **Journal of andrology**, v. 29, n. 2, p. 213-221, 2008.

PAASCH, U.; SHARMA, R. K.; GUPTA, A. K.; GRUNEWALD, S.; MASCHA, E. J.; THOMAS JR, A. J.; GLANDER, H.-J.; AGARWAL, A. Cryopreservation and thawing is associated with varying extent of activation of apoptotic machinery in subsets of ejaculated human spermatozoa. **Biology of Reproduction**, v. 71, n. 6, p. 1828-1837, 2004.

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

PARRISH, J.; SUSKO-PARRISH, J.; LEIBFRIED-RUTLEDGE, M.; CRITSER, E.; EYESTONE, W.; FIRST, N. Bovine in vitro fertilization with frozen-thawed semen. **Theriogenology**, v. 25, n. 4, p. 591-600, 1986.

PARRISH, J.; SUSKO-PARRISH, J.; WINER, M.; FIRST, N. Capacitation of bovine sperm by heparin. **Biology of Reproduction**, v. 38, n. 5, p. 1171-1180, 1988.

PARRISH, J. J. Bovine in vitro fertilization: in vitro oocyte maturation and sperm capacitation with heparin. **Theriogenology**, v. 81, n. 1, p. 67-73, 2014.

PAVLOK, A.; TORNER, H.; MOTLIK, J.; FULKA, J.; KAUFFOLD, P.; DUSCHINSKI, U. Fertilization of bovine oocytes in vitro: effect of different sources of gametes on fertilization rate and frequency of fertilization anomalies. **Animal Reproduction Science**, v. 16, n. 3, p. 207-213, 1988.

PEÑA, F. J.; JOHANNISSON, A.; WALLGREN, M. Assessment of fresh and frozen-thawed boar semen using an Annexin-V assay: a new method of evaluating sperm membrane integrity. **Theriogenology**, v. 60, n. 4, p. 677-689, 2003.

PÉREZ-PÉ, R.; GRASA, P.; FERNÁNDEZ-JUAN, M.; PELEATO, M. L.; CEBRIÁN-PÉREZ, J. Á.; MUIÑO-BLANCO, T. Seminal plasma proteins reduce protein tyrosine phosphorylation in the plasma membrane of cold-shocked ram spermatozoa. **Molecular reproduction and development**, v. 61, n. 2, p. 226-233, 2002.

PÉREZ, L.; VALCÁRCEL, A.; DE LAS HERAS, M.; MOSES, D.; BALDASSARRE, H. The storage of pure ram semen at room temperature results in capacitation of a subpopulation of spermatozoa. **Theriogenology**, v. 47, n. 2, p. 549-558, 1997.

PHILLIPS, N.; MCGOWAN, M.; JOHNSTON, S.; MAYER, D. Relationship between thirty post-thaw spermatozoal characteristics and the field fertility of 11 high-use Australian dairy AI sires. **Animal Reproduction Science**, v. 81, n. 1, p. 47-61, 2004.

POMMER, A. C.; RUTLLANT, J.; MEYERS, S. A. Phosphorylation of protein tyrosine residues in fresh and cryopreserved stallion spermatozoa under capacitating conditions. **Biology of Reproduction**, v. 68, n. 4, p. 1208-1214, 2003.

PONS-REJRAJI, H.; BAILEY, J. L.; LECLERC, P. Cryopreservation affects bovine sperm intracellular parameters associated with capacitation and acrosome exocytosis. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 21, n. 4, p. 525-537, 2009.

PUGLISI, R.; POZZI, A.; FOGGIO, L.; SPANÒ, M.; ELEUTERI, P.; GROLLINO, M. G.; BONGIONI, G.; GALLI, A. The usefulness of combining traditional sperm assessments with in vitro heterospermic insemination to identify bulls of low fertility as estimated in vivo. **Animal Reproduction Science**, v. 132, n. 1-2, p. 17-28, 2012.

QUINTERO-MORENO, A.; MIRO, J.; TERESA RIGAU, A.; RODRIGUEZ-GIL, J. E. Identification of sperm subpopulations with specific motility characteristics in stallion ejaculates. **Theriogenology**, v. 59, n. 9, p. 1973-1990, 2003.

QUINTERO-MORENO, A.; RIGAU, T.; RODRIGUEZ-GIL, J. E. Regression analyses and motile sperm subpopulation structure study as improving tools in boar semen quality analysis. **Theriogenology**, v. 61, n. 4, p. 673-690, 2004.

RAHMAN, M. B.; SCHELLANDER, K.; LUCEÑO, N. L.; VAN SOOM, A. Heat stress responses in spermatozoa: Mechanisms and consequences for cattle fertility. **Theriogenology**, v., n., p., 2018.

RAMÓN, M.; SOLER, A. J.; ORTIZ, J. A.; GARCÍA-ALVAREZ, O.; MAROTO-MORALES, A.; ROLDAN, E. R.; GARDE, J. J. Sperm population structure and male fertility: an intraspecific study of sperm design and velocity in red deer. **Biology of Reproduction**, v. 89, n. 5, p. 110, 111-117, 2013.

RAO, A. R. Changes in the morphology of sperm during their passage through the genital tract in bulls with normal and impaired spermatogenesis. v., n., p., 1971.

RATHI, R.; COLENBRANDER, B.; BEVERS, M. M.; GADELLA, B. M. Evaluation of in vitro capacitation of stallion spermatozoa. **Biol Reprod**, v. 65, n. 2, p. 462-470, 2001.

RAVAGNAN, L.; ROUMIER, T.; KROEMER, G. Mitochondria, the killer organelles and their weapons. **Journal of cellular physiology**, v. 192, n. 2, p. 131-137, 2002.

RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Sperm function in cattle and pigs: morphological and functional aspects. **ARCHIV FUR TIERZUCHT**, v. 44, n., p. 102-113, 2001.

ROVEGNO, M.; FEITOSA, W. B.; ROCHA, A. M.; MENDES, C. M.; VISINTIN, J. A.; D'AVILA ASSUMPCAO, M. E. Assessment of post-thawed ram sperm viability after incubation with seminal plasma. **Cell Tissue Bank**, v. 14, n. 2, p. 333-339, 2013.

SAACKE, R. G. Sperm morphology: Its relevance to compensable and uncompensable traits in semen. **Theriogenology**, v. 70, n. 3, p. 473-478, 2008.

SADEGHI, M. R.; HODJAT, M.; LAKPOUR, N.; AREFI, S.; AMIRJANNATI, N.; MODARRESI, T.; JADDA, H. H.; AKHONDI, M. M. Effects of sperm chromatin integrity on fertilization rate and embryo quality following intracytoplasmic sperm injection. **Avicenna journal of medical biotechnology**, v. 1, n. 3, p. 173, 2009.

SAID, T. M.; PAASCH, U.; GLANDER, H. J.; AGARWAL, A. Role of caspases in male infertility. **Hum Reprod Update**, v. 10, n. 1, p. 39-51, 2004.

SAILER, B. L.; JOST, L. K.; EVENSON, D. P. Bull sperm head morphometry related to abnormal chromatin structure and fertility. **Cytometry**, v. 24, n. 2, p. 167-173, 1996.

SAKKAS, D.; MOFFATT, O.; MANICARDI, G. C.; MARIETHOZ, E.; TAROZZI, N.; BIZZARO, D. Nature of DNA damage in ejaculated human spermatozoa and the possible involvement of apoptosis. **Biol Reprod**, v. 66, n. 4, p. 1061-1067, 2002.

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. 4, n. 1, p. 1, 2006.

SANTIAGO-MORENO, J.; CASTAÑO, C.; TOLEDANO-DÍAZ, A.; ESTESO, M.; LÓPEZ-SEBASTIÁN, A.; GUERRA, R.; RUIZ, M.; MENDOZA, N.; LUNA, C.; CEBRIÁN-PÉREZ, J. Cryopreservation of aoudad (*Ammotragus lervia sahariensis*) sperm obtained by transrectal ultrasound-guided massage of the accessory sex glands and electroejaculation. **Theriogenology**, v. 79, n. 2, p. 383-391, 2013.

SANTOLARIA, P.; VICENTE-FIEL, S.; PALACÍN, I.; FANTOVA, E.; BLASCO, M.; SILVESTRE, M.; YÁNIZ, J. Predictive capacity of sperm quality parameters and sperm

subpopulations on field fertility after artificial insemination in sheep. **Animal Reproduction Science**, v. 163, n., p. 82-88, 2015.

SANTOLARIA, P.; SOLER, C.; RECREO, P.; CARRETERO, T.; BONO, A.; BERNÉ, J. M.; YÁÑIZ, J. L. Morphometric and kinematic sperm subpopulations in split ejaculates of normozoospermic men. **Asian journal of andrology**, v. 18, n. 6, p. 831, 2016.

SARASTE, M. Oxidative phosphorylation at the fin de siècle. **Science**, v. 283, n. 5407, p. 1488-1493, 1999.

SARTORI, R.; PRATA, A.; FIGUEIREDO, A.; SANCHES, B.; PONTES, G.; VIANA, J.; PONTES, J.; VASCONCELOS, J.; PEREIRA, M.; DODE, M. Update and overview on assisted reproductive technologies (ARTs) in Brazil. **Animal Reproduction**, v. 13, n. 3, p. 300-312, 2016.

SCHMIDT, H.; KAMP, G. Induced hyperactivity in boar spermatozoa and its evaluation by computer-assisted sperm analysis. **Reproduction**, v. 128, n. 2, p. 171-179, 2004.

SCHNEIDER, C.; ELLINGTON, J.; WRIGHT, R. Relationship between bull field fertility and in vitro embryo production using sperm preparation methods with and without somatic cell co-culture. **Theriogenology**, v. 51, n. 6, p. 1085-1098, 1999.

SCHOBBER, D.; AURICH, C.; NOHL, H.; GILLE, L. Influence of cryopreservation on mitochondrial functions in equine spermatozoa. **Theriogenology**, v. 68, n. 5, p. 745-754, 2007.

SEIDEL JR, G. E. Lessons from reproductive technology research. **Annu. Rev. Anim. Biosci.**, v. 3, n. 1, p. 467-487, 2015.

SELLEM, E.; BROEKHUIJSE, M.; CHEVRIER, L.; CAMUGLI, S.; SCHMITT, E.; SCHIBLER, L.; KOENEN, E. Use of combinations of in vitro quality assessments to predict fertility of bovine semen. **Theriogenology**, v. 84, n. 9, p. 1447-1454. e1445, 2015.

SELVARAJU, S.; RAVINDRA, J.; GHOSH, J.; GUPTA, P.; SURESH, K. Evaluation of sperm functional attributes in relation to in vitro sperm-zona pellucida binding ability and cleavage rate in assessing frozen thawed buffalo (*Bubalus bubalis*) semen quality. **Animal Reproduction Science**, v. 106, n. 3, p. 311-321, 2008.

SH, S. K. Investigation of bull effect on in vitro embryo production. **Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi**, v. 20, n. 4, p., 2014.

SHAMSUDDIN, M.; LARSSON, B. In vitro development of bovine embryos after fertilization using semen from different donors. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 28, n. 2, p. 77-84, 1993.

SHOJAEI, H.; KROETSCH, T.; WILDE, R.; BLONDIN, P.; KASTELIC, J.; THUNDATHIL, J. Moribund sperm in frozen-thawed semen, and sperm motion end points post-thaw and post-swim-up, are related to fertility in Holstein AI bulls. **Theriogenology**, v. 77, n. 5, p. 940-951, 2012.

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

SINGER, S.; NICOLSON, G. L. The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. **Membranes and Viruses in Immunopathology**; Day, SB, Good, RA, Eds, v., n., p. 7-47, 1972.

SINGH, R. K.; KUMARESAN, A.; CHHILLAR, S.; RAJAK, S. K.; TRIPATHI, U. K.; NAYAK, S.; DATTA, T.; MOHANTY, T.; MALHOTRA, R. Identification of suitable combinations of in vitro sperm-function test for the prediction of fertility in buffalo bull. **Theriogenology**, v. 86, n. 9, p. 2263-2271. e2261, 2016.

SIRARD, M.; LAMBERT, R. In vitro fertilization of bovine follicular oocytes obtained by laparoscopy. **Biology of Reproduction**, v. 33, n. 2, p. 487-494, 1985.

SÖDERQUIST, L.; JANSON, L.; LARSSON, K.; EINARSSON, S. Sperm morphology and fertility in AI bulls. **Journal of Veterinary Medicine Series A**, v. 38, n. 1-10, p. 534-543, 1991.

SOLLINGER, D.; EIBLER, R.; LORENZ, S.; STRAND, S.; CHMIELEWSKI, S.; AOQUI, C.; SCHMADERER, C.; BLUYSSSEN, H.; ZICHA, J.; WITZKE, O. Damage associated molecular pattern activated Toll-like receptor 4 signaling modulates blood pressure in L-NAME induced hypertension. **Cardiovascular research**, v., n., p. cvt265, 2013.

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

SUDANO, M. J.; CRESPILO, A. M.; FERNANDES, C. B.; JUNIOR, A. M.; PAPA, F. O.; RODRIGUES, J.; MACHADO, R.; LANDIM-ALVARENGA, F. D. C. Use of Bayesian inference to correlate in vitro embryo production and in vivo fertility in Zebu bulls. **Veterinary medicine international**, v. 2011, n., p., 2011.

SUNDARARAMAN, M.; KALATHARAN, J.; JAWAHAR, K. T. P. Computer assisted semen analysis for quantification of motion characteristics of bull sperm during cryopreservation cycle. **Veterinary World**, v. 5, n. 12, p. 723-726, 2012.

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, n. 3-4, p. 157-172, 2003.

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 in Domestic Animals**, v. 37, n. 3, p. 127-132, 2002.

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

TERADA, H. Uncouplers of oxidative phosphorylation. **Environmental Health Perspectives**, v. 87, n., p. 213, 1990.

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

THUNDATHIL, J.; GIL, J.; JANUSKAUSKAS, A.; LARSSON, B.; SODERQUIST, L.; MAPLETOFT, R.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Relationship between the proportion of capacitated spermatozoa present in frozen-thawed bull semen and fertility with artificial insemination. **International journal of andrology**, v. 22, n. 6, p. 366-373, 1999.

TROIANO, L.; GRANATA, A. R.; COSSARIZZA, A.; KALASHNIKOVA, G.; BIANCHI, R.; PINI, G.; TROPEA, F.; CARANI, C.; FRANCESCHI, C. Mitochondrial membrane potential and DNA stainability in human sperm cells: a flow cytometry analysis with implications for male infertility. **Exp Cell Res**, v. 241, n. 2, p. 384-393, 1998.

UTT, M. D. Prediction of bull fertility. **Animal Reproduction Science**, v. 169, n., p. 37-44, 2016.

VALE FILHO, V.; BERGMANN, J.; ANDRADE, V.; QUIRINO, C.; REIS, S.; MENDONÇA, R. Caracterização andrológica de touros Nelore, selecionados para primeira estação de monta. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 21, n. 2, p. 42-45, 1997.

VALLORANI, C.; SPINACI, M.; BUCCI, D.; TAMANINI, C.; GALEATI, G. Effects of antioxidants on boar spermatozoa during sorting and storage. **Animal Reproduction Science**, v. 122, n. 1-2, p. 58-65, 2010.

VALVERDE, A.; ARENÁN, H.; SANCHO, M.; CONTELL, J.; YÁNIZ, J.; FERNÁNDEZ, A.; SOLER, C. Morphometry and subpopulation structure of Holstein bull spermatozoa: variations in ejaculates and cryopreservation straws. **Asian journal of andrology**, v. 18, n. 6, p. 851, 2016.

VAN DER HORST, G. SPERM MOTILITY SUBPOPULATIONS AND FERTILITY. In: Proceedings of the 25th Technical Conference on Artificial Insemination & Reproduction, 2014, p. 74.

VANDAELE, L.; MATEUSEN, B.; MAES, D.; DE KRUIF, A.; VAN SOOM, A. Is apoptosis in bovine in vitro produced embryos related to early developmental kinetics and in vivo bull fertility? **Theriogenology**, v. 65, n. 9, p. 1691-1703, 2006.

VENTURA-JUNCÁ, P.; IRARRÁZAVAL, I.; ROLLE, A. J.; GUTIÉRREZ, J. I.; MORENO, R. D.; SANTOS, M. J. In vitro fertilization (IVF) in mammals: epigenetic and developmental alterations. Scientific and bioethical implications for IVF in humans. **Biological research**, v. 48, n. 1, p. 68, 2015.

VERSTEGEN, J.; IGUER-OUADA, M.; ONCLIN, K. Computer assisted semen analyzers in andrology research and veterinary practice. **Theriogenology**, v. 57, n. 1, p. 149-179, 2002.

VIANA, J. H. M.; FIGUEIREDO, A. C. S.; SIQUEIRA, L. G. B. Brazilian embryo industry in context: pitfalls, lessons, and expectations for the future. In: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia-Artigo em anais de congresso (ALICE), 2017Animal Reproduction, v. 14, p. 476-481, 2017.

VIEIRA, N. D. M. G.; DE AGOSTINI LOSANO, J. D.; ANGRIMANI, D. D. S. R.; KAWAI, G. K. V.; DE CÁSSIA BICUDO, L.; RUI, B. R.; DA SILVA, B. D. C. S.; ASSUMPÇÃO, M. E. O. D. A.; NICHI, M. Induced sperm oxidative stress in dogs: Susceptibility against different reactive oxygen species and protective role of seminal plasma. **Theriogenology**, v. 108, n., p. 39-45, 2018.

WALTERS, A.; EYESTONE, W.; SAACKE, R.; PEARSON, R.; GWAZDAUSKAS, F. Bovine embryo development after IVF with spermatozoa having abnormal morphology. **Theriogenology**, v. 63, n. 7, p. 1925-1937, 2005a.

WALTERS, A.; SAACKE, R.; PEARSON, R.; GWAZDAUSKAS, F. The incidence of apoptosis after IVF with morphologically abnormal bovine spermatozoa. **Theriogenology**, v. 64, n. 6, p. 1404-1421, 2005b.

WALTERS, A.; SAACKE, R.; PEARSON, R.; GWAZDAUSKAS, F. Assessment of pronuclear formation following in vitro fertilization with bovine spermatozoa obtained after thermal insulation of the testis. **Theriogenology**, v. 65, n. 6, p. 1016-1028, 2006.

WANG, C.; YOULE, R. J. The role of mitochondria in apoptosis. **Annual review of genetics**, v. 43, n., p. 95, 2009.

WARD, F.; ENRIGHT, B.; RIZOS, D.; BOLAND, M.; LONERGAN, P. Optimization of in vitro bovine embryo production: effect of duration of maturation, length of gamete co-incubation, sperm concentration and sire. **Theriogenology**, v. 57, n. 8, p. 2105-2117, 2002.

WARD, F.; RIZOS, D.; BOLAND, M.; 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, n. 7, p. 1575-1584, 2003.

WENG, S.-L.; TAYLOR, S. L.; MORSHEDI, M.; SCHUFFNER, A.; DURAN, E. H.; BEEBE, S.; OEHNINGER, S. Caspase activity and apoptotic markers in ejaculated human sperm. **Molecular human reproduction**, v. 8, n. 11, p. 984-991, 2002.

WHITFIELD, C.; PARKINSON, T. Assessment of the fertilizing potential of frozen bovine spermatozoa by in vitro induction of acrosome reactions with calcium ionophore (A23187). **Theriogenology**, v. 44, n. 3, p. 413-422, 1995.

WILLIAMS, W.; SAVAGE, A. Observations on seminal micropathology of bulls. **INTERNATIONAL JOURNAL OF FERTILITY**, v. 9, n. 2, p. 271-&, 1964.

WITTE, T. S.; SCHÄFER-SOMI, S. Involvement of cholesterol, calcium and progesterone in the induction of capacitation and acrosome reaction of mammalian spermatozoa. **Animal Reproduction Science**, v. 102, n. 3, p. 181-193, 2007.

WRENZYCKI, C.; NIEMANN, H. Epigenetic reprogramming in early embryonic development: effects of in-vitro production and somatic nuclear transfer. **Reproductive biomedicine online**, v. 7, n. 6, p. 649-656, 2003.

WRIGHT, J. Photographic illustrations of embryo developmental stage and quality codes. **Manual of the International Embryo Transfer Society**, n.3, p.167-170, 1998.

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

YÁÑIZ, J.; SILVESTRE, M.; SANTOLARIA, P.; SOLER, C. CASA-Mot in mammals: an update. **Reproduction, Fertility and Development**, v., n., p., 2018.

ZHANG, B.; 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, n. 2, p. 221-231, 1997.

ZHANG, B.; LARSSON, B.; LUNDEHEIM, N.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Sperm characteristics and zona pellucida binding in relation to field fertility of frozen-thawed semen from dairy AI bulls. **International journal of andrology**, v. 21, n. 4, p. 207-216, 1998.

ZHANG, B.; LARSSON, B.; LUNDEHEIM, N.; HAARD, M.; 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, n. 4, p. 253-260, 1999.

ZHANG, M.; LU, K.; SEIDEL, G. Development of bovine embryos after in vitro fertilization of oocytes with flow cytometrically sorted, stained and unsorted sperm from different bulls. **Theriogenology**, v. 60, n. 9, p. 1657-1663, 2003.

ZHAO, X.-M.; SONG, X.-X.; KAWAI, Y.; NIWA, K. Penetration in vitro of zona-free pig oocytes by homologous and heterologous spermatozoa. **Theriogenology**, v. 58, n. 5, p. 995-1006, 2002.

ZHAO, X. M.; REN, J. J.; ZHAO, S. J.; CUI, L. S.; HAO, H. S.; WANG, H. Y.; DU, W. H.; QIN, T.; LIU, Y.; WANG, D. Apoptosis-Like Events and In Vitro Fertilization Capacity of Sex-Sorted Bovine Sperm. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 49, n. 4, p. 543-549, 2014
ZINI, A.; SIGMAN, M. Are tests of sperm DNA damage clinically useful? Pros and cons. **Journal of andrology**, v. 30, n. 3, p. 219-229, 2009.

ANEXO A - Configuração utilizada para a avaliação de cinética espermática do sêmen bovino em CASA (HAMILTON THORNE- IVOS-12.2).

IMAGE CAPTURE			
Frames Per Sec.	60 Hz		
No. of Frames	30		
CELL DETECTION			
Minimum Contrast	60		
Minimum Cell Size	5pix		
DEFAULTS (if < 5 Motile Cells)			
Cell Size	5pix		
Cell Intensity	70		
PROGRESSIVE CELLS			
Path Velocity (VAP)	50 μ/s		
Straightness (STR)	70%		
SLOW CELLS			
Slow Cells	Static		
VAP Cutoff	30 μ/s		
VSL Cutoff	15 μ/s		
STATIC GATES (on QC Plots)			
MINIMUM		MAXIMUM	
0,30	Static intensity gates	1,70	
0,10	Static size gates	3,40	
8	Static elongation gates	97	
ILUMINATION			
Intensity	2.230		
Photometer	74		
MAGNIFICATION	1,73		
VIDEO SOURCE			
Frequency	60Hz		
Field	Dark		
ANALYSIS CHAMBER			
Chamber type	Leja4		
Chamber depth	20μm		
Stage position A	3,9		
Stage position B	11,8		
Stage position C	18,7		
Stage position D	26,6		
FIELD SELECTION	Automatic		
SET STAGE TEMPERATURE	37°C		

APÊNDICE A- Valores de probabilidade para o efeito de Grupo (Alta Taxa de Clivagem vs. Baixa Taxa de Clivagem) e Percoll® (Pré-Percoll® vs. Pós-Percoll®) e sua interação nas variáveis referentes aos atributos espermáticos. São Paulo, 2018. (Continua)

Atributos espermáticos	Grupo	Percoll®	Grupo X Percoll®
Motilidade total	0,58	0,68	0,47
Motilidade progressiva	0,94	0,71	0,37
Rapid	0,43	0,55	0,36
Medium	0,35	0,002	0,43
Slow	0,13	0,002	0,67
Static	0,81	0,01	0,28
Velocidade de trajeto	0,06	0,01	0,89
Velocidade progressiva	0,60	0,02	0,88
Velocidade curvilinear	0,002	0,0003	0,42
Amplitude de deslocamento lateral de cabeça	0,01	0,006	0,48
Frequência de batimentos do flagelo	0,19	0,001	0,14
Retilinearidade	0,21	0,43	0,86
Linearidade	0,14	0,002	0,96
Dance	0,004	0,0009	0,20
Wobble	0,18	0,0002	0,77
TBARS	0,70	0,95	0,50
Defeitos Menores	0,34	0,29	0,29
Defeitos Maiores	0,95	0,0008	0,40
Defeitos Totais	0,59	0,02	0,65
DHE	0,19	0,0002	0,68
MitoSOX™ Red	0,35	0,14	0,99

(Conclusão)			
Atributos espermáticos	Grupo	Percoll®	Grupo X Percoll®
Espermatozoides/mm ²	0,37	0,37	0,34
Alta Atividade Mitocondrial (DAB I)	0,75	<0,0001	0,33
Média Atividade Mitocondrial (DAB II)	0,83	0,004	0,11
Baixa Atividade Mitocondrial (DAB III)	0,76	0,0006	0,63
Ausência de Atividade Mitocondrial (DAB IV)	0,70	<0,0001	0,73
Membrana plasmática íntegra e acrossomo reagido	0,70	<0,0001	0,41
Membrana plasmática lesada e acrossomo reagido	0,78	0,0001	0,45
Membrana plasmática lesada e acrossomo íntegro	0,43	0,63	0,76
Membrana plasmática e acrossomo íntegros	0,89	<0,0001	0,48
Alto Potencial de Membrana Mitocondrial	0,54	0,02	0,46
Intermediário Potencial de Membrana Mitocondrial	0,96	0,57	0,99
Baixo Potencial de Membrana Mitocondrial	0,23	0,0004	0,23
Não capacitado	0,97	0,26	0,96
Capacitado	0,96	0,23	0,97
Reagido	0,77	0,91	0,66
Fragmentação de DNA	0,48	0,002	0,20
Apoptótico	0,67	0,25	0,96
Necrótico	0,78	0,05	0,85
Viável	0,50	0,01	0,97
Membrana íntegra com estresse oxidativo	0,68	0,001	0,17
Membrana lesada com estresse oxidativo	0,003	0,96	0,91
Membrana lesada sem estresse oxidativo	0,82	0,01	0,68
Membrana íntegra sem estresse oxidativo	0,74	0,95	0,22

APÊNDICE B- Valores de probabilidade para o efeito de Grupo (Alta Taxa de Blastocisto vs. Baixa Taxa de Blastocisto) e Percoll® (Pré-Percoll® vs. Pós-Percoll®) e sua interação nas variáveis referentes aos atributos espermáticos. São Paulo, 2018. (Continua)

Atributos espermáticos	Grupo	Percoll®	Grupo X Percoll®
Motilidade total	0,70	0,45	0,66
Motilidade progressiva	0,27	0,59	0,27
Rapid	0,89	0,78	0,64
Medium	0,10	0,0008	0,82
Slow	0,89	0,006	0,87
Static	0,74	0,02	0,91
Velocidade de trajeto	0,01	0,001	0,28
Velocidade progressiva	0,67	0,001	0,66
Velocidade curvilinear	0,01	0,0002	0,60
Amplitude de deslocamento lateral de cabeça	0,008	0,001	0,49
Frequência de batimentos do flagelo	0,02	0,004	0,21
Retilinearidade	0,07	0,87	0,16
Linearidade	0,02	0,02	0,25
Dance	0,005	0,0004	0,21
Wobble	0,03	0,005	0,57
TBARS	0,48	0,89	0,87
Defeitos Menores	0,31	0,15	0,18
Defeitos Maiores	0,63	0,002	0,87
Defeitos Totais	0,97	0,009	0,51
DHE	0,08	0,004	0,87
MitoSOX™ Red	0,58	0,72	0,33

			(Conclusão)
Atributos espermáticos	Grupo	Percoll®	Grupo X Percoll®
Espermatozoides/mm ²	0,64	0,88	0,64
Alta Atividade Mitocondrial (DAB I)	0,20	0,0003	0,88
Média Atividade Mitocondrial (DAB II)	0,42	0,004	0,45
Baixa Atividade Mitocondrial (DAB III)	0,31	0,0001	0,47
Ausência de Atividade Mitocondrial (DAB IV)	0,35	0,13	0,50
Membrana plasmática íntegra e acrossomo reagido	0,75	0,0001	0,89
Membrana plasmática lesada e acrossomo reagido	0,76	0,0002	0,30
Membrana plasmática lesada e acrossomo íntegro	0,11	0,53	0,62
Membrana plasmática e acrossomo íntegros	0,92	0,0001	0,23
Alto Potencial de Membrana Mitocondrial	0,92	0,06	0,95
Intermediário Potencial de Membrana Mitocondrial	0,77	0,42	0,53
Baixo Potencial de Membrana Mitocondrial	0,61	0,0004	0,43
Capacitado	0,35	0,40	0,63
Reagido	0,87	0,98	0,42
Fragmentação de DNA	0,55	0,01	0,43
Apoptótico	0,59	0,34	0,85
Necrótico	0,79	0,37	0,59
Viável	0,61	0,12	0,88
Membrana íntegra com estresse oxidativo	0,74	0,0005	0,90
Membrana lesada com estresse oxidativo	0,23	0,50	0,44
Membrana lesada sem estresse oxidativo	0,76	0,006	0,99
Membrana íntegra sem estresse oxidativo	0,99	0,84	0,80