

VIVIAN CARDOSO CASTIGLIONI

**EFEITO DO POTENCIAL MITOCONDRIAL DOS ESPERMATOZOIDES
BOVINOS NA PRODUÇÃO *in vitro* DE EMBRIÕES**

São Paulo

2021

VIVIAN CARDOSO CASTIGLIONI

**EFEITO DO POTENCIAL MITOCONDRIAL DOS ESPERMATOZOIDES
BOVINOS NA PRODUÇÃO *in vitro* DE EMBRIÕES**

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'Avila

Assumpção

São Paulo

2021

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

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO

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

T. 4069
FMVZ

Castiglioni, Vivian Cardoso

Efeito do potencial mitocondrial dos espermatozoides bovinos na produção *in vitro* de embriões / Vivian Cardoso Castiglioni. – 2021.

104 f. : il.

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Reprodução Animal, São Paulo, 2021.

Programa de Pós-Graduação: Reprodução Animal.

Área de concentração: Reprodução Animal.

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

1. ΔΨm. 2. Atributos espermáticos. 3. Touros. 4. Óxido nítrico. I. Título.



CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Efeito do potencial mitocondrial dos espermatozoides bovinos na produção in vitro de embriões", protocolada sob o CEUA nº 7246170117 (ID 003342), sob a responsabilidade de **Mayra Elena Ortiz D'Ávila Assumpção e equipe; Vivian da Silva Cardoso Pinto** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (CEUA/FMVZ) na reunião de 15/03/2017.

We certify that the proposal "Effect of the mitochondrial potential of bovine spermatozoa on the in vitro production of embryos", utilizing 80 Bovines (80 females), protocol number CEUA 7246170117 (ID 003342), under the responsibility of **Mayra Elena Ortiz D'Ávila Assumpção and team; Vivian da Silva Cardoso Pinto** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the School of Veterinary Medicine and Animal Science (University of São Paulo) (CEUA/FMVZ) in the meeting of 03/15/2017.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa**

Vigência da Proposta: de **10/2016** a **06/2020**

Área: **Reprodução Animal**

Origem: **Não aplicável biotério**

Espécie: **Bovinos**

sexo: **Fêmeas**

idade: **24 a 48 meses**

N: **80**

Linhagem: **Bos taurus**

Peso: **450 a 550 kg**

Local do experimento: Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo

Comentário da CEUA: *Projeto aprovado, com apresentação dos documentos solicitados.*

São Paulo, 26 de março de 2021

Prof. Dr. Marcelo Bahia Labruna

Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo

Camilla Mota Mendes

Vice-Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo

Título da proposta: "Efeito do potencial mitocondrial dos espermatozoides bovinos na produção in vitro de embriões".

Parecer Consubstanciado da Comissão de Ética no Uso de Animais FMVZ (ID 007607)

A Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, no cumprimento das suas atribuições, analisou e **APROVOU** a Alteração do cadastro (versão de 10/fevereiro/2021) da proposta acima referenciada.

Resumo apresentado pelo pesquisador: "Solicito alteração do nome da aluna de doutorado responsável por esse projeto, para que o certificado da CEUA esteja de acordo com o nome que a aluna passou a usar. O nome que consta na CEUA "Vivian da Silva Cardoso Pinto" agora passa a ser "Vivian Cardoso Castiglioni". Obrigada!".

Comentário da CEUA: "aprovada a alteração no nome da aluna".

Prof. Dr. Marcelo Bahia Labruna

Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo

Camilla Mota Mendes

Vice-Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autora: CASTIGLIONI, VIVIAN CARDOSO

Título: Efeito do Potencial Mitocondrial dos Espermatozoides Bovinos na Produção *in vitro* de Embriões

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 este trabalho aos
meus pais e Filipe, por estarem
sempre ao meu lado me
incentivando a fazer meu melhor.*

AGRADECIMENTOS

Enfim, cheguei até aqui, momento que por algumas vezes parecia tão distante. Estou feliz por concluir esse trabalho e essa fase da minha vida que contribuiu tanto para meu crescimento profissional e pessoal. E feliz por ter tantas pessoas ao meu lado que eu possa agradecer...

Agradeço primeiramente aos meus pais, **Silvio** e **Cida**, pela vida, educação que puderam me proporcionar, e por grande parte do que sou hoje. Obrigada por todo suporte, por estarem sempre presentes em tudo que acontece na minha vida, alegrias, angústias, desafios! Vocês sempre serão um exemplo de dignidade, caráter e de profissionais! Minha eterna gratidão por ter vocês como meus pais.

Ao meu marido, **Filipe**, que desde o começo de toda minha carreira/graduação (sim!) esteve ao meu lado, apoiando, incentivando, torcendo e vibrando a cada conquista! O mais orgulhoso sempre (não faz questão de esconder isso de ninguém). Sempre me incentivando a crescer mais e mais, e não nunca deixa que eu duvide do meu potencial. Você é um exemplo para mim, meu amor e melhor amigo desde sempre. Fico muito feliz em poder dividir com você todas as conquistas, alegrias, até mesmo os meus medos, angústias, e...minha vida! Obrigada por todos os momentos que já vivemos! Aproveito também para agradecer meus sogros, **Fabio** e **Teresa**, por me tratarem como filha, sempre presentes, torcendo e se preocupando comigo! E que também ficam felizes a cada conquista minha! Agradeço muito por ter vocês em minha vida!

Ao meu irmão, **Rafael**, apesar da nossa área ser completamente diferente, sei que fica feliz por mim, por encerrar esse ciclo. Não tenho como não agradecer a minha companheira fiel de 4 patas, minha **Lila**, sempre ao meu lado (literalmente), ainda mais na escrita desse trabalho. Sempre trazendo paz, amor e alegria quando precisamos.

Agradeço à toda minha **família**, por estarem sempre presentes na minha vida (aos que já se foram também), por todo amor e torcida por mim, não vou citar nomes, mas essa parte vai para vocês: avós, tias/tios, primas/primos, madrinha/padrinho e afilhado! Levo um pouco de vocês sempre comigo.

Agradeço aos amigos que independente de saber ou não exatamente com o que eu trabalhava me apoiavam e incentivavam. Amigas da época do mestrado no LVB: **Maira**, que ainda foi

parceira de doutorado na FMVZ, **Michele, Thais, Larissa e Adeline** obrigada por todo carinho e mesmo que longe as vezes, estão sempre presentes, saudades sempre! Às Girls (**Cássia, Dani, Denise e Lilian**), por tantos bons momentos compartilhados, viagens, almoços/jantares e por todo incentivo!!

À minha querida orientadora, **Profa. Mayra**, que me recebeu no seu grupo e laboratório de braços abertos (literalmente). Profa. obrigada pela confiança e por essa oportunidade, por me deixar fazer parte desse grupo que é quase uma família! Tenho grande respeito e admiração por você, que conheci ainda no final da minha graduação. Espero que eu possa ter contribuído com você e seu grupo o tanto que vocês contribuíram para meu crescimento! Obrigada pelo carinho, preocupação, e por estar sempre disposta a ajudar ou procurar soluções junto com a gente, e por fim, por sempre disposta a ouvir.

Ao **professor Visintin**, agradeço por toda sua contribuição ao laboratório, departamento e a Universidade de São Paulo como um todo.

Aos meus amigos de laboratório e equipe Biosptz!! Obrigada pela ajuda em cada experimento, aspirações (momento em que todos se reúnem para ajudar), pela convivência diária, por dividirem comigo alegrias, angústias, experimentos e resultados (ou não). Aos mais “antigos”: **Luana Bicudo, Tamie Guibu, Letícia Castro e Marcelo Goissis**, obrigada por toda ajuda, sugestões e parceria!! **Camilla Mota**, base de apoio do lab., obrigada por cada sugestão, pedidos de reagentes, meios e sptz preparados, e claro, pelas comidas boas! **Thais Hamilton**, por toda ajuda nos experimentos com sptz, PCR dos embriões, por sugestões, correções e realização das análises estatísticas!! **Adriano Siqueira**, parceiro de TODOS os experimentos, de trotes, minha dupla de fluxo, não sei o que seria de mim sem esse meu braço direito no laboratório. Aos mais “novos”: **Felipe Luedke, Júlia Simões, Carol Pereira, Eric Fusada, Carlos Paco**, obrigada por alegrarem meus dias e sempre estarem dispostos a ajudar, Eric então, esteve presente em todas as FIVs praticamente. Já sinto falta de todos vocês, da nossa convivência diária, das conversas, risadas, dos cafés e bandejões compartilhados.

Agradeço ao **Departamento de Reprodução Animal** da FMVZ-USP por todo o suporte necessário. A todos funcionários, colabores do departamento, secretárias (Harumi e Loide). Aos **Professores**: Claudia Fernandes, Marcílio Nichi, Mario Binelli, Ricardo Pereira, Marcelo Goissis, Guilherme Pugliesi, Ed Hoffmann, Eneiva Carla, Camila Vannucchi, Pietro Baruselli, André Furugen, Rubens Paes de Arruda), agradeço pelas aulas, convivência e por

tudo que fazem pela educação e pesquisa. Um agradecimento especial aos professores queridos deste departamento que tive o privilégio e prazer de conviver mais de perto durante as disciplinas PAE e as idas à Pirassununga (que sempre vou lembrar com muita alegria e carinho), assim como os colegas pós-graduandos parceiros de disciplinas PAE.

A todos os colegas pós-graduandos de outros laboratórios do departamento, pela boa convivência em todos esses anos, conversas e trocas de experiências. Principalmente, **João Diego** pelas análises no CASA e a **Roberta (Bobbie)** que contribuiu muito para esse trabalho, obrigada pelos desenhos lindos, análises de DAB, conversas e sugestões de análises que foram essenciais!

À Profa. **Marcella Milazzotto**, UFABC, por toda ajuda, sugestões e auxílio para realização de algumas partes deste trabalho. Muito obrigada pela atenção e disposição em ajudar! E à **Joana Pieretti**, UFABC, pela realização das análises de óxido nítrico.

Aos **membros da banca**, meus sinceros agradecimentos por toda contribuição e pelo tempo dedicado à correção deste trabalho.

À **Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ)** e a **USP** por toda infraestrutura e suporte. Lugar em que me sinto honrada em poder dizer que fiz parte durante os últimos anos. Agradeço a todos funcionários, técnicos e administrativos que fazem parte dessa grande faculdade.

To the University of Calgary (Canada), Dr. Jacob Thundathil and Dr. John Kastelic for the opportunity of having me in your lab. I'm also thankful for my lab friends Veena, Jacob and Anjana. It was a great and special time in my life, and I'll never forget those times.

À CAPES pelo apoio financeiro concedido no processo CAPES-Print USP 88887.368017/2019-00, que permitiu que pudesse ir para a University of Calgary durante seis meses.

Ao CNPq, processo 152574/2016-6, pelo apoio financeiro durante todo o período do doutorado.

“All we have to decide
is what to do with the time
that is given us.”

J.R.R. Tolkien

RESUMO

CASTIGLIONI, V. C. **Efeito Do Potencial Mitocondrial Dos Espermatozoides Bovinos Na Produção *in vitro* De Embriões**. 2021. 104 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2021.

O uso de biotécnicas da reprodução vem sendo utilizado como ferramenta para melhorar tanto a eficiência reprodutiva quanto maximizar o uso de animais geneticamente superiores. O Brasil é responsável por 29% da produção *in vitro* de embriões bovinos (PIVE) no mundo. Apesar da extensa utilização desta biotécnica, existem pontos críticos que limitam a sua eficiência. Fatores relacionados à qualidade de oócitos, o ambiente *in vitro* (mais exposto ao O₂ atmosférico) e efeito touro (atributos espermáticos). Os atributos espermáticos vêm sendo relacionados com a fertilidade. Estudos têm relacionado o potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) com o estresse oxidativo, sendo essa associação ora positiva ora negativa para a fecundação. Acredita-se que essa seja influenciada por outras características espermáticas associadas. Com isso, formulou-se a hipótese de que o $\Delta\Psi_m$ é um atributo dependente dos demais atributos relacionados à qualidade espermática, sendo que o **Alto Perfil** espermático quando associado com o **Maior $\Delta\Psi_m$** , condiciona um ambiente mais ativo e oxidativo durante a fecundação *in vitro* (FIV). Esse ambiente mais exacerbado é deletério, diminuindo a taxa de blastocistos. No entanto, espermatozoides de **Baixo Perfil** associados a um **Maior $\Delta\Psi_m$** , proporcionam um ambiente menos ativo e menos exacerbado, portanto maiores taxa de blastocistos. O objetivo deste trabalho foi avaliar como o $\Delta\Psi_m$ e os atributos relacionados ao perfil espermático interferem nas taxas de PIVE e na resposta antioxidante destes embriões. Portanto, foram realizadas manipulações de PIVE, análises dos parâmetros espermáticos por citometria de fluxo, cinética espermática (CASA), atividade mitocondrial (DAB), estresse oxidativo e detecção de óxido nítrico (NO \cdot), análise de expressão de genes antioxidantes nos embriões. Além disso, foram realizadas análises de compostos associados a mitocôndria (ADT, ATP, NADH, FADH₂) e peroxidação lipídica (4-HNE) por cromatografia líquida em amostras de espermatozoides e meio de FIV, respectivamente. Os resultados demonstram que apesar de ter sido observado relação de dependência do $\Delta\Psi_m$ com os demais atributos espermáticos, a relação encontrada entre o $\Delta\Psi_m$ e o **Perfil espermático** foi contrária a esperada na hipótese proposta. Ou seja, o **Alto Perfil** associado ao **Maior $\Delta\Psi_m$** apresentou maiores taxas na PIVE. Assim como o **Baixo Perfil** com **Maior $\Delta\Psi_m$** apresentou as piores taxas na PIVE. O **Perfil** espermático influenciou mais na PIVE do que a diferença

de $\Delta\Psi_m$. Quanto ao status oxidativo nos espermatozoides, não foram observadas diferenças entre os grupos estudados. As diferenças relacionadas ao metabolismo mitocondrial foram associadas à análise de DAB, e uma via compensatória foi observada no grupo de **Menor $\Delta\Psi_m$** . Os baixos níveis de $\text{NO}\cdot$ detectados no meio de FIV foram associados com maiores índices de fertilidade *in vitro*. Para análise de expressão gênica, GPx4 foi mais expressa no grupo de Baixo Perfil espermático, demonstrando um desequilíbrio da resposta antioxidante no grupo de menor qualidade espermática. Não foi possível a detecção dos compostos relacionados ao metabolismo mitocondrial e peroxidação lipídica por cromatografia líquida. Portanto mais estudos, com metodologias mais sensíveis para essa detecção, devem ser realizados para que esses compostos sejam detectados e associados com o $\Delta\Psi_m$, para melhor entendimento da função mitocondrial na PIVE.

Palavras-chave: Atributos espermáticos, touros, expressão gênica embrionária, óxido nítrico.

ABSTRACT

CASTIGLIONI, V. C. **Effect of Mitochondrial Potential of Bovine Sperm on *in vitro* Embryo Production**. 2021. 104 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2021.

Reproductive biotechnologies have been used as a tool to improve both reproductive efficiency and maximize the use of genetically superior animals. Brazil is responsible for 29% of the *in vitro* production of bovine embryos (IVP) in the world. Despite the extensive use of this biotechnology, there are critical points that limit its efficiency. These factors relate to oocyte quality, *in vitro* environment (exposure to atmospheric O₂) and the bull effect (sperm attributes). Sperm attributes have been associated with fertility. Studies have related the mitochondrial membrane potential ($\Delta\Psi_m$) with oxidative stress, with this association being either positive or negative for fertilization. This is believed to be influenced by other associated sperm characteristics. Thus, it is hypothesized that $\Delta\Psi_m$ is an attribute dependent on the other attributes related to sperm quality, and the high sperm profile, when associated with the higher $\Delta\Psi_m$, leads to a more active and oxidative environment during *in vitro* fertilization (IVF). This exacerbated environment is harmful, decreasing the rate of blastocyst formation. However, low profile sperm associated with a higher $\Delta\Psi_m$ provides a less active and less exacerbated environment, therefore resulting in higher rates of blastocyst formation. The objective of this work was to evaluate how $\Delta\Psi_m$ and attributes related to the sperm profile interfere in the PIVE rates and in the antioxidant response of these embryos. Therefore, IVP manipulations, analysis of sperm parameters by flow cytometry, sperm kinetics (CASA), mitochondrial activity (DAB), oxidative stress and detection of nitric oxide (NO \cdot), and analysis of expression of antioxidant genes in embryos were performed. In addition, analyses of compounds associated with mitochondria (ADT, ATP, NADH, FADH₂) and lipid peroxidation (4-HNE) were performed by liquid chromatography on samples of sperm and IVF medium, respectively. The results demonstrate that although a relationship of dependence of $\Delta\Psi_m$ with the other sperm attributes was observed, the relationship found between $\Delta\Psi_m$ and the sperm profile was contrary to what was expected in the proposed hypothesis. In other words, the high profile sperm associated with higher $\Delta\Psi_m$ resulted in higher rates of IVP. The low profile with the Higher $\Delta\Psi_m$ presented the worst rates of IVP. The sperm profile influenced IVP more than the $\Delta\Psi_m$ differences. Regarding the oxidative status in sperm, no differences were observed between the groups studied. Differences related

to mitochondrial metabolism were associated with the analysis of DAB, and a compensatory pathway was observed in the group of lower $\Delta\Psi_m$. Lower levels of NO detected in the IVF medium were associated with higher *in vitro* fertility rates. For gene expression analysis, Gpx4 had higher expression in the low sperm profile group, demonstrating an imbalance of the antioxidant response in the group with lower sperm quality. It was not possible to detect compounds related to mitochondrial metabolism and lipid peroxidation by liquid chromatography. Therefore, more studies, with more sensitive methodologies for this detection, should be carried out and associated with $\Delta\Psi_m$, for a better understanding of mitochondrial function in IVP.

Keywords: Sperm attributes, bulls, embryonic gene expression, nitric oxide.

LISTA DE QUADROS

Quadro 1: Parâmetros avaliados pelo sistema CASA nos espermatozoides.	50
Quadro 2: Classificação dos espermatozoides conforme atividade mitocondrial, utilizando o teste DAB.	51
Quadro 3: Genes alvo utilizados para avaliação embrionária, com respectivas funções e códigos de identificação do ensaio Taqman® (Applied Biosystem, EUA).	53
Quadro 4: Limites de detecção do método analítico LC-MS/MS para os compostos avaliados em espermatozoides (ATP, ADP, NADH e FADH ₂) e em meio FIV (4-HNE).	68

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Correlação entre atributos espermáticos, coeficiente de correlação (Rho) e valor de p.....	56
Tabela 2: Ranqueamento das partidas espermáticas de acordo com os valores (%) de integridade de membrana plasmática para formação dos grupos Alto e Baixo Perfil espermático.	57
Tabela 3: Ranqueamento das partidas espermáticas de acordo com os valores (%) de $\Delta\Psi_m$ (JC-1) para formação dos subgrupos Alto Perfil espermático: Maior $\Delta\Psi_m$ e Menor $\Delta\Psi_m$, Baixo Perfil espermático: Maior $\Delta\Psi_m$ e Menor $\Delta\Psi_m$	57
Tabela 4: Alto Perfil espermático e efeito isolado para JC-1. Valores de medianas (quartil inferior e quartil superior) e valores de p para atributos espermáticos avaliados.	57
Tabela 5: Baixo Perfil espermático e efeito isolado do $\Delta\Psi_m$. Valores de medianas (quartil inferior e quartil superior) e valores de p para atributos espermáticos avaliados.	58
Tabela 6: Valores de p para os diferentes efeitos analisados para expressão de PRDX1, NFE2L2, GPx4, XBP1, HMOX1 e DDIT3 em embriões 8 células.	69

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Desenho esquemático da localização das mitocôndrias nos espermatozoides e da formação do potencial de membrana mitocondrial no espaço intermembranas durante a produção de ATP por meio da cadeia respiratória (Fosforilação Oxidativa), elétrons provenientes do Ciclo do Ácido Cítrico (Ciclo de Krebs).	32
Figura 2: Reação de redução do O ₂ a H ₂ O e a formação de EROs.	33
Figura 3: Formação de EROs e ERNs, enzimas antioxidantes associadas e o envolvimento dessas espécies nos danos celulares.	34
Figura 4: Modelo hipotético gráfico da relação entre o Perfil espermático e $\Delta\Psi_m$ na PIVE.	40
Figura 5: Delineamento experimental para a formação dos grupos utilizados na PIVE.	43
Figura 6: Classificação para taxa de fecundação, por contagem de pronúcleos.....	46
Figura 7: Taxa de clivagem (%) entre os grupos de Alto e Baixo Perfil espermático.	59
Figura 8: Efeito de interação entre os grupos Alto e Baixo Perfil espermático com Maior e Menor $\Delta\Psi_m$ para a taxa de blastócitos em porcentagem.	59
Figura 9: Efeito de interação entre os grupos Alto e Baixo Perfil espermático com Maior e Menor $\Delta\Psi_m$ para a taxa de desenvolvimento embrionário em porcentagem.....	60
Figura 10: Valor das medianas de cada grupo para taxa de fecundação normal (2 Pronúcleos), fecundação negativa (1 Pronúcleo) e poliespermia (+2 Pronúcleos) entre os grupos Alto e Baixo Perfil espermático com Maior e Menor $\Delta\Psi_m$	60
Figura 11: Porcentagem de espermatozoides com maior potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) no momento da FIV entre os grupos de Alto e Baixo Perfil espermático.....	61
Figura 12: Porcentagem de espermatozoides com acrossomo íntegro (AI) no momento da FIV entre os grupos de Alto e Baixo Perfil espermático.....	62
Figura 13: Porcentagem de espermatozoides com membrana plasmática íntegra (MPI) no momento da FIV entre os grupos de Alto e Baixo Perfil espermático.....	62
Figura 14: Porcentagem de espermatozoides com maior de potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) no momento da FIV entre os grupos de Maior e Menor $\Delta\Psi_m$,	63
Figura 15: Porcentagem de espermatozoides com membrana plasmática íntegra (MPI) no momento da FIV entre os grupos de Maior e Menor $\Delta\Psi_m$	63
Figura 16: Velocidade curvilínea ($\mu\text{m/s}$) no momento da FIV entre os grupos de Alto e Baixo Perfil espermático.	65
Figura 17: Amplitude de deslocamento lateral de cabeça (μm) no momento da FIV entre os grupos de Alto e Baixo Perfil espermático.	65
Figura 18: Box plot, dos valores da mediana, quartil superior, inferior, máximo e mínimo, com percentual de espermatozoides classificados como DAB IV (sem atividade mitocondrial) entre os grupos de Alto e Baixo Perfil espermático.....	66
Figura 19: Percentual de espermatozoides classificados como DAB I (alta atividade mitocondrial) entre os grupos de Maior e Menor $\Delta\Psi_m$	67
Figura 20: Efeito de interação entre os grupos para a detecção de óxido nítrico ($\mu\text{mol/L}$) em amostras de meio FIV.....	68
Figura 21: Quantificação relativa dos genes PRDX1, NFE2L2, GPx4, XBP1, HMOX1 e DDIT3. No gráfico a : Comparação entre grupo Alto (A) e Baixo Perfil Espermático (B). No gráfico b : Comparação entre Maior (M) e Menor (m) $\Delta\Psi_m$. Valores expressos em \log_2 (FC).	70

LISTA DE ABREVIATURAS

PIV/PIVE	Produção <i>in vitro</i> de Embriões
IETS	<i>International Embryo Transfer Society</i>
EROs	Espécies Reativas De Oxigênio
$\Delta\Psi_m$	Potencial De Membrana Mitocondrial
MOET	<i>Multiple Ovulation and Embryo Transfer</i>
IA	Inseminação Artificial
OPU	<i>Ovum Pick Up</i>
SFB	Soro Fetal Bovino
FSH	Hormônio Folículo Estimulante
LH	Hormônio Luteinizante
CASA	<i>Computer-Assisted Semen Analysis</i>
VSL	Velocidade Progressiva
VCL	Velocidade Curvilínea
BCF	Frequência Do Batimento Do Flagelo
STR	Retilinearidade
LIN	Linearidade
FITC-PI	<i>Pisum sativum agglutinin</i> associado a <i>Propidium iodide</i>
JC-1	<i>5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'tetraethylbenzimidazolyl-carbocyanine iodide</i>
FO	Fosforilação Oxidativa
NADH	Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo
FADH ₂	Flavina Adenina Dinucleotídeo
ATP	Adenosina Trifosfato
ADP	Adenosina Difosfato
ERNs	Espécies Reativas De Nitrogênio
NOS	<i>Nitric Oxide Synthase</i>
NO [·]	Óxido Nítrico
O ₂ ^{·-}	Ânion Superóxido
ONOO [·]	Peroxinitrito
H ₂ O ₂	Peróxido De Hidrogênio
·OH	Radical Hidroxila
SOD	Superóxido Dismutase
CAT	Catalase

GPx	Glutathione Peroxidase
PUFA	<i>Polyunsaturated Fatty Acids</i>
DAB	3,3-diaminobenzina
LC-MS/MS	<i>Liquid Chromatography/Mass Spectrometry</i>
DHE	<i>Dihydroethidium</i>
MDA	Malondialdeído
TBARS	Teste De Substâncias Reativas Ao Ácido Tiobarbitúrico
4-HNE	4-Hidroxinonenal
SCSA	<i>Sperm Chromatin Structure Assay</i>
MIV, FIV, CIV	Maturação, Fecundação e Cultivo <i>in vitro</i>
COCs	Complexo <i>Cumulus Oophorus</i>
HH	meio HECM-HEPES
MPI	Membrana Plasmática Íntegra
AI	Acrossomo Íntegro
CI	Cromatina Íntegra
CR+	CellRox+, células estressadas
DHE+	sptz que apresentaram de ânion superóxido
Mito+	sptz que apresentaram ânion superóxido mitocondrial
Sptz	Espermatozoide

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	22
2	REVISÃO DE LITERATURA	25
2.1	PRODUÇÃO <i>in vitro</i> DE EMBRIÕES (PIVE) BOVINOS	25
2.2	ATRIBUTOS ESPERMÁTICOS E EFEITO TOURO NA PIVE	27
2.3	PRODUÇÃO DE ENERGIA NOS ESPERMATOZOIDES	30
2.3.1	Fosforilação oxidativa (FO)	30
2.3.2	Glicólise	31
2.4	METABOLISMO MITOCONDRIAL ESPERMÁTICO E ESTRESSE	33
2.4.1	Avaliação da atividade mitocondrial	35
2.4.2	Detecção de EROs e ERNs	36
2.5	QUALIDADE DE EMBRIÕES PIV	37
3	HIPÓTESE	40
4	OBJETIVOS	41
5	MATERIAL E MÉTODO	42
5.1	FORMAÇÃO DOS GRUPOS EXPERIMENTAIS	42
5.2	PIVE	43
5.2.1	MIV	44
5.2.2	Preparo do sêmen e FIV	44
5.2.3	CIV	45
5.3	AVALIAÇÕES ESPERMÁTICAS E DO MEIO FIV	47
5.3.1	Citometria de Fluxo	47
5.3.2	CASA (<i>Computer-assisted sperm analysis</i>)	49
5.3.3	DAB	50
5.3.4	Cromatografia Líquida	51
5.3.5	Óxido nítrico (NO [·])	52
5.4	ANÁLISE DE EXPRESSÃO GÊNICA EMBRIONÁRIA	52
5.5	ANÁLISE ESTATÍSTICA	54
6	RESULTADOS	56
6.1	FORMAÇÃO DOS GRUPOS EXPERIMENTAIS	56
6.2	PIVE	58
6.3	AVALIAÇÕES ESPERMÁTICAS E MEIO FIV	61
6.4	EXPRESSÃO GÊNICA EMBRIONÁRIA	69
7	DISCUSSÃO	71
8	CONCLUSÃO	81

9	CONSIDERAÇÕES FINAIS	82
	REFERÊNCIAS	83
	ANEXOS	97
	APÊNDICES	99

1 INTRODUÇÃO

No final do ano de 2019, o mundo estava prestes a enfrentar o que viria a se tornar uma pandemia de coronavírus (COVID-19). Durante o ano de 2020, todos os países passaram a enfrentar dificuldades sociais, econômicas e sanitárias como consequências da pandemia. Foi um ano muito difícil para a economia mundial e para o do Brasil, o PIB encerrou o ano de 2020 em queda de 4,1%, comparado ao ano de 2019, sendo assim a maior queda da série histórica (IBGE, 2020). No entanto, houve alta somente no setor agropecuário brasileiro, encerrando 2020 com crescimento de 2%, e a produção de carne bovina ficou na segunda posição do ranking de maiores faturamentos, com R\$ 139,7 bilhões (CNA, 2021). Esses dados fazem com que o setor da pecuária seja uma das principais chaves para recuperação da economia brasileira neste momento tão delicado em que vivemos.

A bovinocultura brasileira é um dos setores mais importantes do agronegócio e, consequentemente, da economia nacional. Em 2020, o rebanho bovino no Brasil possuía aproximadamente 215 milhões de animais, constituindo o maior rebanho comercial do mundo. O Brasil é o líder na exportação de carne bovina, segundo maior produtor de carne (atrás apenas dos Estados Unidos da América) e sexto maior produtor mundial de leite (ABIEC, 2020; USDA, 2020). As projeções para o final da próxima década são de aumento no consumo, na produção e na exportação tanto de carne quanto leite bovino (MAPA, 2020; USDA, 2021).

De acordo com relatório anual da Associação Brasileira das Indústrias Exportadoras de Carnes divulgado em 2020, referente ao ano de 2019, o Brasil possui 851,57 milhões de hectares em seu território, sendo 19% (161 milhões de hectares) composto por pastagens. Com a utilização de tecnologias aplicadas à produção bovina, aproximadamente 270 milhões de hectares deixaram de ser desmatados nos últimos 28 anos (ABIEC, 2020). As biotécnicas da reprodução vêm sendo utilizadas como ferramenta para melhorar tanto a eficiência reprodutiva quanto maximizar o uso de animais geneticamente superiores e assim, aumentar a produção e o ganho genético do rebanho bovino.

Uma das principais biotécnicas utilizadas em bovinos, e que está em constante crescimento, é a produção *in vitro* de embriões (PIVE) (BLONDIN, 2017). O último levantamento feito pela *International Embryo Transfer Society* (IETS) em 2020, demonstrou que a PIVE no mundo continua crescendo em relação ao desenvolvimento embrionário *in vivo*, sendo importante destacar que o Brasil foi responsável por 29% dos embriões produzidos *in vitro* no mundo em 2019, atrás apenas dos EUA (VIANA, 2020).

Apesar de já ser uma biotécnica reconhecida, vantajosa e amplamente disseminada no mundo, alguns pontos são considerados críticos e podem limitar a eficiência da técnica, como: qualidade dos oócitos utilizados, diferenças encontradas nos índices de fertilidade *in vitro* entre touros e modificações no ambiente *in vitro* causadas após a fecundação, interferindo nas taxas e na qualidade da PIVE (LONERGAN; FAIR, 2008; BLONDIN, 2017).

O próprio ambiente *in vitro* é o principal fator relacionado com a qualidade embrionária e com menores taxas de embriões bovinos PIV comparado ao sistema *in vivo* (RIZOS et al., 2002a). Considerando que a concentração de oxigênio é maior no ambiente *in vitro* do que em condições *in vivo*, a produção de EROs (espécies reativas de oxigênio) também é favorecida (GUÉRIN; EL MOUATASSIM; MÉNÉZO, 2001; LEESE et al., 2008; TAKAHASHI, 2012).

A produção de EROs nos espermatozoides, é importante para que os processos fisiológicos ocorram durante a fecundação, porém em condições de desequilíbrio entre geração e degradação por mecanismos antioxidantes, o aumento de EROs leva ao estresse oxidativo (AGARWAL, A. VIRK, G. ONG, C. DU PLESSIS, 2014). As mitocôndrias presentes na peça intermediária dos espermatozoides contribuem para a motilidade espermática e para o metabolismo energético, porém, também são consideradas principais fontes de produção de EROs (MARCHETTI et al., 2004).

Sendo assim, a maior produção de EROs durante a fecundação *in vitro* (FIV) pode estar ligada ao metabolismo dos espermatozoides. O metabolismo espermático pode estar exacerbado em um microambiente *in vitro*, devido a maior quantidade de espermatozoides ativos e com altos atributos espermáticos (características intrínsecas ao espermatozoide), obtidos após os processos de seleção espermática. O metabolismo exacerbado pode ter impacto negativo na FIV e conseqüentemente prejudicar o desenvolvimento e a qualidade embrionária. Trabalhos recentes vêm demonstrando a importância de estudar os atributos espermáticos (motilidade, integridade de membranas e da cromatina, atividade mitocondrial) e o estresse oxidativo, assim como suas implicações na PIVE (SIMÕES, 2010; CASTRO et al., 2016a; SIQUEIRA et al., 2018). Portanto, é possível classificar em diferentes perfis espermáticos os espermatozoides que são submetidos à FIV, e as possíveis conseqüências da associação dessas características na PIVE.

Diferentes estudos vêm demonstrando efeito deletério do excesso de potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) em espermatozoides para o desenvolvimento embrionário (KATO; NAGAO, 2015; SIQUEIRA et al., 2018). Entretanto, em muitos trabalhos, o alto $\Delta\Psi_m$ vem sendo associado com a melhor qualidade espermática, e sendo considerado um dos

atributos mais usados como critério de qualidade para selecionar amostras espermáticas em humanos (KASAI et al., 2002; MARCHETTI et al., 2004; GALLON et al., 2006). As discrepâncias encontradas na literatura para o atributo $\Delta\Psi_m$ podem estar ocorrendo por conta da interação deste atributo com os níveis de outros atributos espermáticos, ou seja, altos níveis de $\Delta\Psi_m$ podem ser benéficos ou não, dependendo das condições dos demais atributos que definem a qualidade espermática.

Portanto, estudos são necessários para definir qual é a relação do $\Delta\Psi_m$ com os demais atributos associados a qualidade espermática, assim como a relação desses atributos com o metabolismo mitocondrial e estresse oxidativo nos espermatozoides quando são submetidos à FIV. E por fim, qual a influência destas características espermáticas com a qualidade e taxa de embriões produzidos *in vitro*. Com essas informações será possível identificar pontos críticos relacionados à PIVE e selecionar amostras espermáticas para maior produção de embriões, expandindo ainda mais o mercado de PIVE.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 PRODUÇÃO *in vitro* DE EMBRIÕES (PIVE) BOVINOS

Biotécnicas da reprodução em bovinos têm sido utilizadas comercialmente para promover o aumento da produção animal e melhoramento genético, por meio da multiplicação de indivíduos geneticamente superiores (SIQUEIRA et al., 2020). Com a PIVE, o ganho genético pode ser observado em um curto período, diminuindo os intervalos entre gerações e maior produção de embriões quando comparado aos métodos convencionais como a inseminação artificial (IA) e o desenvolvimento embrionário *in vivo* por meio de superovulação seguida de IA (VARAGO; MENDOÇA; LAGARES, 2008). Além disso, a PIVE possibilita a utilização de fêmeas jovens de alto valor genético pré-púberes ou ainda, fêmeas que apresentem algum distúrbio reprodutivo adquirido para serem doadoras de oócitos (CHAUBAL et al., 2007). Recentemente, a aspiração folicular seguida da PIVE de animais pré-púberes com características de interesse vem sendo cada vez mais utilizada, encurtando o intervalo entre gerações e acelerando o ganho genético destes animais (SANCHES; ZANGIROLAMO; SENEDA, 2019).

O primeiro bezerro produzido *in vitro* nasceu em 1981 nos EUA (BRACKETT et al., 1982), já em humanos, o nascimento de um bebê, utilizando esta técnica já havia sido publicado em 1978 na Inglaterra (STEPTOE; EDWARDS, 1978). Porém, somente por volta dos anos 90 que essa tecnologia chegou ao Brasil, primeiramente utilizada como pesquisas nas universidades, e ao final desta década foi que a produção começou em escala para bovinos. Os laboratórios comerciais de PIVE começaram a surgir por volta dos anos 2000, nessa época o mercado da produção *in vitro* de embriões ainda era liderado pela Europa, apesar das baixas taxas de embriões PIV, que representavam 12% de todas as transferências embrionárias (THIBIER, 1998; RUBIN, 2005). Inicialmente no Brasil, a PIVE causou um grande impacto no mercado de raças de bovinos de corte, Nelore principalmente, e em 2005 quando surgiu a possibilidade de usar sêmen sexado na PIVE, foi quando ganhou também o mercado de raças leiteira (VIANA et al., 2012).

Em 2002, a América do Sul, principalmente o Brasil, passou a liderar a produção de embriões bovinos PIV no mundo, até que em 2017 passou a ser a segunda colocada na produção *in vitro* de embriões, atrás da América do Norte (VIANA, 2020). Considerando que os EUA já lideravam a produção total de embriões no mundo, somando embriões provenientes dos sistemas *in vivo* e *in vitro*, ultrapassaram o Brasil na produção *in vitro*, pois

substituíram o sistema de desenvolvimento embrionário *in vivo* de MOET (*Multiple Ovulation and Embryo Transfer*) pela PIVE, aumentando o número de embriões produzido *in vitro* mas sem aumentar o total de embriões produzidos (VIANA; FIGUEIREDO; SIQUEIRA, 2017).

Desde 2015, o número de embriões provenientes do sistema *in vivo* no mundo vem caindo em relação à PIVE. Em 2016 ocorreu um marco para a história da PIVE, sendo que pela primeira vez o número de embriões bovinos produzidos *in vitro* superaram o sistema *in vivo*. De acordo com o último levantamento da IETS, no ano de 2019 dentre os mais de 1,4 milhão embriões produzidos e coletados, 72,7% foram produzidos *in vitro*, enquanto apenas 27,3% oriundos do sistema *in vivo* (VIANA et al., 2018; VIANA, 2020).

O processo de PIVE envolve etapas de coleta de oócitos por meio de aspiração folicular de uma doadora guiada por ultrassom (*Ovum Pick Up* - OPU) ou por meio de aspiração de ovários provenientes de abatedouros comerciais (maior importância na pesquisa), seguido de maturação (MIV), fecundação (FIV) e cultivo (CIV) no ambiente *in vitro* até o estágio de blastocisto, o processo todo tem duração de 7 a 8 dias (GONÇALVES et al., 2007).

A etapa de maturação oocitária é determinada pela maturação citoplasmática e nuclear, em que os oócitos em fase de prófase I progridem até a fase de metáfase II, na presença de meios de cultivo com soro fetal bovino (SFB), FSH, LH, estradiol, entre outros componentes que mimetizam o ambiente *in vivo*, para que a maturação ocorra. Este processo demora de 18 a 24 horas para acontecer em atmosfera com 5% gás de CO₂ e temperatura controlada a 38,5°C (GONÇALVES et al., 2007).

Após a maturação, os oócitos estarão prontos para receber os espermatozoides, que passaram por um processo de preparação prévia (descongelamento, seleção, lavagem). Para que a fecundação ocorra, os espermatozoides precisam estar capacitados (agentes capacitadores presentes no meio de FIV) e hiperativados, e então são atraídos pelo Complexo *Cumulus Oophorus* (COCs) para que ocorra a reação acrossomal, e fusão do material genético masculino e feminino (VARAGO; MENDOÇA; LAGARES, 2008; UMEZU et al., 2020).

Assim que o espermatozoide fecunda o oócito, há influxo intracelular de cálcio, o que desencadeia a ativação oocitária e este completa a segunda divisão meiótica (retoma a partir da metáfase II), ocorrendo a extrusão do segundo corpúsculo polar no espaço perivitelínico e formação do pronúcleo materno (GARDNER; EVANS, 2006). Ao penetrar no oócito, o espermatozoide sofre descondensação da cabeça, havendo a formação do pronúcleo paterno (XU; GREVE, 1988). O influxo de cálcio intracelular no oócito, também desencadeia a

despolarização da membrana e impede a penetração de outros espermatozoides, evitando a poliespermia (SANDERS; SWANN, 2016).

Após 18 a 22 horas do início da FIV é realizado o cultivo *in vitro*, em que o excesso de células do cumulus é removido e os possíveis zigotos são transferidos para um meio de cultivo, no qual diversas divisões celulares ocorrem e as estruturas permanecem por 7 dias até a formação dos blastocistos (GONÇALVES et al., 2007).

Dentre as três etapas do processo de produção *in vitro*, existem grupos de pesquisas estudando uma maneira de otimizar o processo como um todo para encontrar uma condição ideal para melhorar ainda mais os índices de produção. Apesar da PIVE ser atualmente o principal método para a produção de embriões bovinos, a taxa de prenhez após transferência, ainda está abaixo do desejável quando comparada com a monta natural, inseminação artificial e até mesmo com o desenvolvimento embrionário *in vivo* (HASLER, 2000; PONTES et al., 2009). Estudos tem reportado a ocorrência de morte embrionária, alterações metabólicas, epigenéticas e diferenças na expressão gênica de embriões PIVE, quando comparados ao desenvolvimento embrionário *in vivo* (MCHUGHES et al., 2009; CHEN et al., 2015; GARDNER; HARVEY, 2015; SARTORI et al., 2016).

Ao avaliar as taxas de eficiência nas etapas da PIVE, pode-se observar que a taxa de oócitos maturados é de 85-90%, taxa de fecundação entre 70-85%, porém a taxa de desenvolvimento embrionário permanece entre 20-40%, trazendo evidências de que distúrbios possam estar ocorrendo após a etapa de fecundação, causando alterações no desenvolvimento embrionário (FERRÉ et al., 2020). Esses distúrbios podem ocorrer em decorrência de atributos espermáticos associados ao ambiente *in vitro* artificial (RIZOS et al., 2002a; SIQUEIRA et al., 2020). O que demonstra que, apesar do grande avanço até o momento na utilização dessa biotécnica, muito ainda deve ser estudado e conhecido para continuar melhorando o sistema de PIVE e consequentemente a eficiência produtiva no rebanho bovino.

2.2 ATRIBUTOS ESPERMÁTICOS E EFEITO TOURO NA PIVE

Touros com índices similares de fecundação *in vivo* (avaliados por meio da taxa de não retorno ao cio) ao serem utilizados na FIV, apresentam diferenças na velocidade de desenvolvimento embrionário, além de apresentarem grandes variações individuais nas taxas de clivagem (36 a 93%) e de produção de blastocistos (7 a 51%) (PALMA; SINOWATZ, 2004; ALOMAR et al., 2008). Em um estudo, Kropp et al. (2017) avaliaram touros de alta e baixa fertilidade a campo na PIVE, e apesar de não encontrarem diferenças significativas nas

taxas de clivagem e de blastocistos, nem na morfologia embrionária, apresentaram diferenças significativas no perfil de transcrição gênica dos embriões provenientes dos grupos de alta e de baixa fertilidade, indicando que os touros podem influenciar na reprogramação genética dos embriões.

Dentre outros fatores que podem estar associados à fecundação *in vitro* e que contribuem para a variabilidade das taxas de desenvolvimento embrionário na PIVE, encontra-se a ocorrência de poliespermia (presença de mais que 2 prónucleos no zigoto). Estudos relatam que a poliespermia pode ocorrer entre 5-45% em bovinos e interferir no desenvolvimento embrionário normal, nas taxas de clivagem, de blastocisto e até mesmo condicionar a morte embrionária (COY; AVILÉS, 2010; DEMYDA-PEYRÁS et al., 2015). A poliespermia pode ser consequência de diversos fatores, como má qualidade oocitária, alta concentração espermática, tempo de incubação na FIV e até mesmo características individuais de cada touro (WANG et al., 2003; DEMYDA-PEYRÁS et al., 2015).

Além disso, falhas na FIV podem ocorrer devido às características intrínsecas dos espermatozoides (os chamados atributos espermáticos) e pelo próprio ambiente *in vitro* condicionados por eles, podendo ser um ambiente mais propício à formação de espécies reativas de oxigênio (EROs) (SILVA et al., 2007; ALOMAR et al., 2008; MARTÍN-ROMERO et al., 2008; SIQUEIRA et al., 2018). Vale ressaltar ainda que, apesar de existirem diferenças nas taxas de desenvolvimento embrionário encontradas entre touros, existem trabalhos que demonstram também diferenças entre ejaculados/partidas de um mesmo touro (EYESTONE; FIRST, 1989; OTOI et al., 1993; WARD et al., 2001; PALMA; SINOWATZ, 2004).

Ao avaliar os atributos espermáticos de diferentes touros é possível detectar características que irão interferir na taxa de embriões PIV (SIQUEIRA et al., 2018). Existem diversos atributos espermáticos que são estudados a fim de prever fertilidade em bovinos (MOCÉ; GRAHAM, 2008).

A motilidade espermática é o atributo espermático mais básico e rotineiramente avaliado, pois reflete a viabilidade e integridade dos espermatozoides (KATHIRAVAN et al., 2011). Avaliar a motilidade por microscopia óptica pode não ser suficiente ou preciso, por conta da subjetividade da técnica. Visto isso, a avaliação da cinética espermática pelo sistema computadorizado de análise de motilidade (*Computer-Assisted Semen Analysis - CASA*), produz resultados mais acurados e objetivos em relação a motilidade e cinética espermática quando comparada à motilidade visual no microscópio (SELLEM et al., 2015; GLIOZZI et al., 2017). Os parâmetros obtidos pelo CASA são capazes de descrever o tipo de movimento

dos espermatozoides, como velocidade progressiva (VSL), velocidade curvilínea (VCL), frequência do batimento do flagelo (BCF), retilinearidade (STR), linearidade (LIN), entre outros, e com isso identificar diferentes padrões de movimentos e hiperativação espermática (KATHIRAVAN et al., 2011; SHOJAEI et al., 2012).

A avaliação de apenas um atributo espermático não é suficiente para selecionar espermatozoides de boa qualidade no ambiente *in vitro*, por esse motivo o ideal para ter uma melhor resposta é a avaliação de diversos atributos em conjunto. Além disso, muitos dos atributos se correlacionam entre si, interferindo no desenvolvimento embrionário *in vitro* (SIQUEIRA et al., 2018). Atributos relacionados à estrutura espermática e função, como integridade de membrana plasmática e de membrana acrossomal, motilidade, morfologia, integridade de cromatina e o $\Delta\Psi_m$ são os mais rotineiramente utilizados (KASAI et al., 2002; TARTAGLIONE; RITTA, 2004; HOLT, 2009). A relação desses atributos com as taxas de embriões produzidos *in vitro*, é uma relação complexa e não deve ser avaliada individualmente, para isso é importante o estudo da associação desses atributos para definir um perfil de qualidade espermática e como essas associações interferem no ambiente da FIV.

Os espermatozoides utilizados na PIVE são criopreservados e após descongelação, estruturas espermáticas importantes no processo de fecundação e desenvolvimento embrionário podem ser afetadas, como membrana plasmática e acrossomal, mitocôndrias e o DNA (HAMMERSTEDT; GRAHAM; NOLAN, 1990; WATSON, 2000). Por esse motivo, é fundamental a avaliação dos atributos espermáticos antes dos espermatozoides serem introduzidos no ambiente de FIV.

Para a avaliação da viabilidade espermática desses atributos é comum o uso da citometria de fluxo com sondas fluorescentes (GARNER et al., 1997; GILLAN; EVANS; MAXWELL, 2005). A avaliação espermática com sondas florescentes também pode ser realizada por microscopia, porém ao utilizar citometria de fluxo, os dados passam a ser mais confiáveis e objetivos, uma vez que o número de espermatozoides avaliados é maior e em um curto período de tempo (até 20.000 células por amostra) (MARCHETTI, C. OBERT, G. DEFFOZEZ, A. FORMSTECHE, P. MARCHETTI, 2002).

Com a citometria de fluxo é possível avaliar a integridade de membrana acrossomal e membrana plasmática, simultaneamente, com a associação de FITC-PI (*Pisum sativum agglutinin* associado a *Propidium iodide*) (CELEGHINI et al., 2007). A fragmentação de DNA pode ser avaliada ao testar a susceptibilidade do DNA à desnaturação ácida *in situ* (EVENSON; LARSON; JOST, 2002). E por fim, para a avaliação mitocondrial espermática, diversas sondas fluorescentes já foram descritas, dentre elas o 5,5',6,6'-tetrachloro-

1,1',3,3'tetraethylbenzimidazolyl-carbocyanine iodide (JC-1), que é capaz de diferenciar o $\Delta\Psi_m$ dos espermatozoides entre alto e baixo, emitindo fluorescência de cor alaranjada e verde, respectivamente (GARNER et al., 1997).

O estudo do $\Delta\Psi_m$, tem fundamental importância na PIVE, uma vez que as mitocôndrias são consideradas uma das principais fontes de ATP espermático (TRAVIS et al., 1998; MARCHETTI et al., 2004; LOSANO et al., 2018b). Apesar de já ser um atributo bastante estudado na função espermática (SIKKA; RAJASEKARAN; HELLSTROM, 1995; AGARWAL, A. VIRK, G. ONG, C. DU PLESSIS, 2014), é importante avaliar a influência deste quando associado aos demais atributos espermáticos para uma avaliação mais completa. É importante também associar outras análises, assim como a avaliação da produção de EROs no ambiente *in vitro*, visto que as mitocôndrias são consideradas como a principal fonte de produção de EROs nos espermatozoides (KOPPERS et al., 2008).

2.3 PRODUÇÃO DE ENERGIA NOS ESPERMATOZOIDEOS

A maior produção de ATP ocorre nas mitocôndrias, porém existem duas vias interligadas em que a produção de energia pode ocorrer nos espermatozoides, pela glicólise ou pelo ciclo de Krebs, seguido da fosforilação oxidativa (FORD, 2006; DU PLESSIS et al., 2015). A produção de energia nos espermatozoides ocorre em compartimentos celulares diferentes, sendo que a fosforilação oxidativa ocorre nas mitocôndrias, localizadas na peça intermediária, e a glicólise acontece na região da cabeça e cauda. Células espermáticas são capazes de utilizar ambas as vias como fontes de energia, dependendo do estágio de maturação espermática, espécie animal e do ambiente em que estão inseridos (LOSANO et al., 2017a; VARUZHANYAN; CHAN, 2020).

2.3.1 Fosforilação oxidativa (FO)

A FO ocorre durante o metabolismo aeróbio, nas mitocôndrias. As mitocôndrias são compostas principalmente por membranas externa e interna, espaço intermembranas e matriz mitocondrial. Na membrana mitocondrial interna fica localizada a cadeia respiratória ou cadeia transportadora de elétrons, a qual é composta por cinco complexos proteicos (I, II, III, IV e complexo ATP sintase). O transporte de elétrons através dos complexos é responsável pela produção de ATP, via fosforilação oxidativa (FO) (NELSON; COX, 2014). A FO gera 30 moléculas de ATP por molécula de glicose degradada, sendo a produção de ATP por essa via, 15 vezes mais eficiente do que a glicólise (DU PLESSIS et al., 2015).

A fosforilação oxidativa é a etapa final do metabolismo produtor de energia, sendo responsável pela síntese da maioria do ATP produzido nas células. Elétrons provenientes do ciclo de Krebs, localizado na matriz mitocondrial, são transportados por NADH e FADH₂ até a cadeia respiratória. O fluxo de elétrons através dos complexos proteicos é acompanhado pela transferência de prótons (bombeamento de prótons) para o espaço intermembranas, produzindo um gradiente eletroquímico, ou seja, uma diferença na concentração de prótons (H⁺) e carga elétrica entre o espaço intermembranas e a matriz mitocondrial, gerando a força próton motriz ou diferença de potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$). Os prótons concentrados no espaço intermembranas, não são capazes de atravessar a membrana mitocondrial íntegra, mas por diferença no gradiente eletroquímico tendem a retornar para a matriz mitocondrial pelo complexo ATP sintase, e ao passar pelo complexo ocorre a formação de ATP (NELSON; COX, 2014) (figura 1).

Para que as mitocôndrias sejam funcionais, principalmente, a membrana mitocondrial interna deve estar intacta e impermeável para que a FO ocorra. A despolarização da membrana mitocondrial ou a queda do potencial de membrana, indica que houve dano mitocondrial, atrapalhando o funcionamento energético da célula. Por outro lado, quando ocorre uma hiperpolarização da membrana mitocondrial pode levar a uma maior formação de EROs e conseqüentemente, danos celulares (WOLKEN; ARRIAGA, 2014).

2.3.2 Glicólise

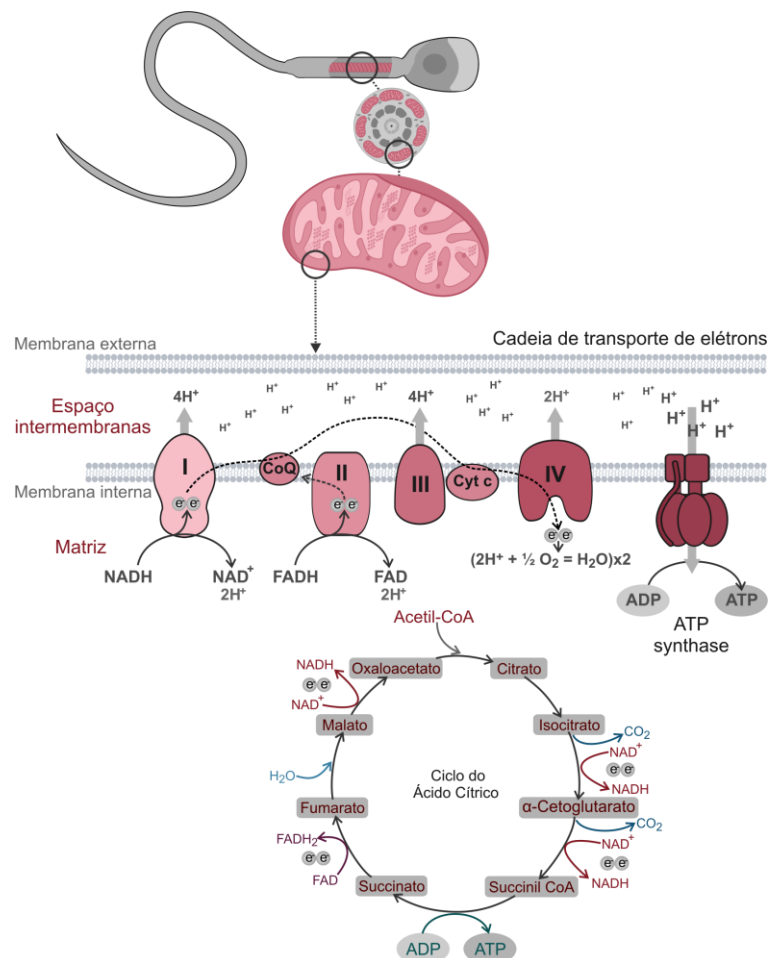
Na glicólise, uma molécula de glicose é degradada na ausência de oxigênio, envolvendo a quebra de seis carbonos monossacarídeos durante uma série de reações catalíticas, gerando no final duas moléculas de três carbonos, o piruvato. A cada molécula de glicose convertida em piruvato, dois ATP são consumidos na fase preparatória da via e quatro ATP são produzidos, resultando em um rendimento final de duas moléculas de ATP produzidas (NELSON; COX, 2014). Apesar da produção de ATP por essa via ser menor que a FO, é uma via muito importante para os espermatozoides dependendo da fase de desenvolvimento, uma vez que fases mais imaturas (espermatogônias) utilizam mais esta via (VARUZHANYAN; CHAN, 2020).

Muitos trabalhos têm relatado a importância da glicólise para o metabolismo energético dos espermatozoides, participando como a principal fonte de ATP utilizada para motilidade (MUKAI; OKUNO, 2004; NASCIMENTO et al., 2008; LOSANO et al., 2017a). Porém, existem divergências na literatura quanto a principal via de produção de energia nos

espermatozoides, dependendo da espécie estudada e das condições biológicas avaliadas (AMARAL et al., 2013; LOSANO et al., 2017b).

É importante ressaltar que as duas vias estão interligadas, sendo a glicólise uma via primária para a fosforilação oxidativa. As moléculas de piruvato, produtos finais da glicólise, são convertidos em acetil-coenzima A (acetil-CoA) e entram diretamente no ciclo de Krebs ou ciclo do ácido cítrico. Ao longo das reações que ocorrem no ciclo de Krebs, a energia liberada é conservada nos transportadores de elétrons reduzidos (NADH e FADH₂). Posteriormente, estas coenzimas reduzidas são oxidadas, doando prótons (H⁺) e elétrons, que entram na cadeia respiratória até serem transferidos ao O₂ (acceptor final de elétrons) (figura 1) (FERRAMOSCA; ZARA, 2014; NELSON; COX, 2014).

Figura 1: Desenho esquemático da localização das mitocôndrias nos espermatozoides e da formação do potencial de membrana mitocondrial no espaço intermembranas durante a produção de ATP por meio da cadeia respiratória (Fosforilação Oxidativa), elétrons provenientes do Ciclo do Ácido Cítrico (Ciclo de Krebs).



Fonte: Castiglioni, V. C. (2021). Baseado em Nelson e Cox (2014).

Legenda: Complexo I: NADH desidrogenase; Complexo II: Succinato desidrogenase; Complexo III: Ubiquinona citocromo c-oxirredutase; Complexo IV: citocromo oxidase; Cyt C: citocromo C; CoQ: Ubiquinona.

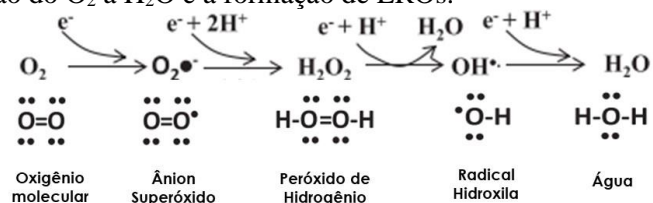
2.4 METABOLISMO MITOCONDRIAL ESPERMÁTICO E ESTRESSE

O estudo das mitocôndrias nos espermatozoides é importante para avaliar a funcionalidade espermática e também para avaliar o estresse oxidativo, uma vez que já foi observado que a alta atividade metabólica presente em espermatozoides de garanhões de alta fertilidade, possuem elevada atividade mitocondrial e conseqüentemente elevada produção de EROs (GIBB; LAMBOURNE; AITKEN, 2014).

As mitocôndrias são consideradas a principal fonte de produção de EROs nos espermatozoides (KOPPERS et al., 2008). Quando associadas ao ambiente *in vitro*, em que a concentração de oxigênio é maior do que em condições *in vivo*, como no útero e oviduto da fêmea (1,5-8% de O_2) (FISCHER; BAVISTER, 1993), tornam o ambiente ainda mais oxidativo e deletério. Já foi comprovado que espermatozoides que sofrem maior estresse oxidativo têm impacto negativo na FIV e conseqüentemente no desenvolvimento embrionário *in vitro* (SILVA et al., 2007; LANE et al., 2014; CASTRO et al., 2016b).

Durante a fosforilação oxidativa, ocorre a redução de O_2 em H_2O no complexo IV, ou seja, os elétrons são atraídos pelo oxigênio para formar uma molécula de água ao final do processo. Porém, sabe-se, que durante o transporte de elétrons pela cadeia respiratória pode ocorrer um escape dos elétrons, e quando estes entram em contato com o oxigênio molecular podem formar o ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o radical hidroxila ($\cdot OH$), conhecidos como EROs (GUÉRIN; EL MOUATASSIM; MÉNÉZO, 2001) (figura 2). O escape de elétrons pode ocorrer principalmente nos complexos I e III, sendo esses complexos considerados como a maior fonte de EROs, liberando $O_2^{\cdot-}$ na matriz mitocondrial e no espaço intermembranas (MORAES; MEYERS, 2018).

Figura 2: Reação de redução do O_2 a H_2O e a formação de EROs.



Fonte: modificado de R. J. Mailloux (2015).

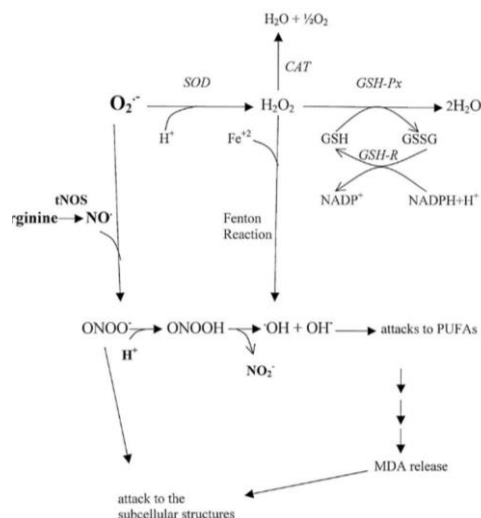
O estresse celular também pode ser causado pelo estresse nitrosativo, ou seja, produção de espécies reativas de nitrogênio (ERNs). A partir da oxidação de L-arginina em L-citrulina, pela enzima óxido nítrico sintase (*Nitric Oxide Synthase* - NOS), o óxido nítrico (NO^{\cdot}) é formado. As EROs e ERNs estão interligadas, a combinação de NO^{\cdot} e $O_2^{\cdot-}$ formam

um potente composto oxidante, o peroxinitrito (ONOO^-), demonstrado na figura 3 (AKYOL et al., 2004).

As EROs e ERNs são consideradas radicais livres (moléculas com um ou mais elétrons não pareados na órbita externa), com exceção do H_2O_2 que não é um radical livre mas pode gerar o $\cdot\text{OH}$, considerado um dos mais reativos (HALLIWELL, 1991).

Os espermatozoides possuem mecanismos de defesa contra o dano das EROs, sendo estes enzimáticos e não enzimáticos, como a superóxido dismutase (SOD), a primeira na defesa antioxidante, que transforma $\text{O}_2^{\cdot-}$ em uma molécula de H_2O_2 (ALVAREZ; STOREY; TOUCHSTONE, 1978). O H_2O_2 pode ser degradado por duas enzimas antioxidantes separadamente, a catalase (CAT) transformando H_2O_2 em H_2O e O_2 , e a glutathiona peroxidase (GPx/sistema glutathiona redutase), transformando H_2O_2 em H_2O (NORDBERG; ARNÉR, 2001). Caso a degradação de H_2O_2 falhe com essas enzimas antioxidantes, o peróxido de hidrogênio vai participar da reação de Fenton, no qual o H_2O_2 se liga com Fe^{2+} ou Cu^+ e forma o $\cdot\text{OH}$, figura 3 (SUTTON; WINTERBOURN, 1989). O radical $\cdot\text{OH}$ será apenas degradado pelos antioxidantes não enzimáticos, como o ácido ascórbico e o α -tocoferol (SIKKA; RAJASEKARAN; HELLSTROM, 1995). ERNs também possuem moléculas específicas que são capazes de neutralizá-las, tais como o ácido úrico e o ácido cítrico para degradar o peroxinitro (AITKEN et al., 2004).

Figura 3: Formação de EROs e ERNs, enzimas antioxidantes associadas e o envolvimento dessas espécies nos danos celulares.



Fonte: Modificado de Akyol et al. 2004.

Legenda: PUFA: *Polyunsaturated Fatty Acids*; $\text{O}_2^{\cdot-}$: ânion superóxido; SOD: superóxido dismutase; CAT: catalase; H_2O_2 : Peróxido de Hidrogênio; GSH-Px: glutathiona peroxidase; GSH: glutathiona reduzida; GSSG: glutathiona oxidada; GSH-R: glutathiona redutase; NADPH+H^+ : NAD reduzido; NADP^+ : NAD oxidado; OH^- : íon hidroxila; $\cdot\text{OH}$: radical hidroxila; tNOS: *Nitric Oxide Synthase* total; NO: óxido nítrico; ONOO^- : peroxinitrito; MDA: Malondialdeído (produto da peroxidação lipídica); NO_2^- : nitrito.

As EROs e ERNs fazem parte de processos fisiológicos dos espermatozoides, sendo importantes para o funcionamento normal da célula, e para a sinalização celular como a ligação ao oócito, reação acrossomal, capacitação e hiperativação espermática (O'FLAHERTY; BEORLEGUI; BECONI, 1999). Em condições de desequilíbrio entre a produção dessas moléculas e a disponibilidade de enzimas antioxidantes, elas podem ser prejudiciais para as células, figura 3. Vale ressaltar que os espermatozoides apresentam um citoplasma reduzido e, portanto, a quantidade de enzimas antioxidantes presente é limitada. Além disso, espermatozoides possuem grande quantidade de ácidos graxos poliinsaturados de cadeia insaturadas (*Polyunsaturated Fatty Acids* - PUFA) na membrana plasmática para garantir fluidez da membrana, sendo que a presença destas insaturações torna essas moléculas mais instáveis e suscetíveis ao ataque das EROs e ERNs. Esses fatores contribuem para a mecanismo oxidante nos espermatozoides (AITKEN; CLARKSON; FISHEL, 1989; LENZI et al., 2000; ALLAMANENI et al., 2005).

Sendo assim, EROs e ERNs em concentrações excessivas podem ser nocivas, causando danos às proteínas, lipídios e DNA espermático, impactando na sua estrutura e viabilidade, causando uma peroxidação lipídica, perda de motilidade, perda do potencial de membrana mitocondrial e interrupção do transporte de elétrons, danos ao DNA, e ainda ativação de vias apoptóticas (AITKEN; CLARKSON; FISHEL, 1989; LAMIRANDE; GAGNON, 1992).

Estudos que avaliam o metabolismo mitocondrial espermático em condições de maior concentração de oxigênio, como no ambiente *in vitro*, devem contribuir para o entendimento dos danos causados pelo estresse oxidativo de origem mitocondrial. Diferentes testes são utilizados como marcadores de atividade mitocondrial, como por exemplo a utilização de sondas fluorescentes para avaliar o $\Delta\Psi_m$, além de testes disponíveis para a avaliar a presença de EROs e ERNs.

2.4.1 Avaliação da atividade mitocondrial

O $\Delta\Psi_m$ é considerado um marcador de atividade mitocondrial (EVENSON, 1982). Para sua avaliação, em geral são utilizadas sondas fluorescentes catiônicas lipofílicas que penetram nas mitocôndrias e são capazes de identificar diferenças nas concentrações de prótons entre o espaço intermembranas e a matriz mitocondrial e, com isso identificar diferentes potenciais de membrana mitocondrial (AMARAL; RAMALHO-SANTOS, 2010). Sondas fluorescentes como MitoTracker, JC-1 e Rodamina 123 são as mais utilizadas. O JC-1

é capaz de discriminar e separar populações espermáticas com alto e baixo $\Delta\Psi_m$, fluorescendo em verde para formas monoméricas no caso de baixo $\Delta\Psi_m$, e em vermelho-alaranjado quando formam agregados, no caso de alto $\Delta\Psi_m$ (SMILEY et al., 1991; AMARAL; RAMALHO-SANTOS, 2010).

Outro marcador de atividade mitocondrial que pode ser utilizado é baseado na oxidação da 3'3 diaminobenzina (DAB) pelo citocromo C. Este marcador avalia a atividade do citocromo C, uma proteína que doa elétrons para o oxigênio na cadeia respiratória. Essa proteína, quando oxidada forma um complexo amarronzado marcando as mitocôndrias com a cadeia de transporte de elétrons funcional, sendo assim possível quantificar, visualmente, no microscópio essa atividade mitocondrial (HRUDKA, 1987).

Apesar dessas avaliações serem úteis para a função mitocondrial, não podem ser utilizadas para quantificar a eficiência energética dos espermatozoides. Desta forma, é necessário avaliar o metabolismo energético mitocondrial, como o funcionamento da cadeia transportadora de elétrons, de coenzimas transportadoras de elétrons e avaliação de produtos da fosforilação oxidativa como o ATP, para que a avaliação mitocondrial seja completa. A quantificação dos níveis de ATP, ADP, NADH e FADH₂ pode ser realizada por meio de cromatografia líquida de alta eficiência (LC – *Liquid Chromatography*), assim como a utilização de kits comerciais para essa finalidade, fornecendo uma resposta direta da atividade mitocondrial por meio da avaliação do produto final da fosforilação oxidativa (ATP), dos seus intermediários e das coenzimas transportadoras de elétrons na cadeia respiratória (VIGUE; VIGUE; HUSZAR, 1992; STOCK et al., 2000; SAMIZO et al., 2001).

2.4.2 Detecção de EROs e ERNs

Com a finalidade de correlacionar o estresse oxidativo e a queda na fertilidade/função espermática, estudos vêm sendo conduzidos para a identificação de EROs e ERNs em espermatozoides e meios que o cercam. Diferentes técnicas estão disponíveis para detectar a presença dessas moléculas no ambiente *in vitro*, assim como técnicas que avaliam a peroxidação lipídica, consequência de um dano causado inicialmente pelas EROs (AITKEN; JONES; ROBERTSON, 2012; GUTHRIE; WELCH, 2012; GOSALVEZ; TVRDA; AGARWAL, 2017).

Ensaio que utilizam sondas fluorescentes para avaliação do estresse oxidativo podem avaliar a formação geral de EROs ou a formação de EROs em compartimentos celulares específicos. A geração intracelular de O₂⁻ pode ser mensurada por DHE (*Dihydroethidium*),

uma sonda sem carga, de fluorescência azul, permeável à membrana, que mede produção total de O_2^- , e quando oxidada se liga ao DNA corando-o em vermelho (BURNAUGH; SABEUR; BALL, 2007). A sonda MitoSOX Red é um cátion lipossolúvel direcionada à matriz mitocondrial, e quando oxidada pelo O_2^- apresenta fluorescência vermelha (KOPPERS et al., 2008). Já a sonda CellROX green é direcionada para citoplasma e núcleo, e ao ser oxidada por radicais livres intracelulares emite fluorescência verde, sendo considerada sensível e eficiente para detectar o estresse oxidativo em espermatozoides bovinos (CASTRO et al., 2016a).

A mensuração de NO também é importante por conta do estresse gerado quando produzido em excesso (DOSHI et al., 2012). Métodos diretos de detecção envolvem a utilização de um sensor específico de NO como o ISO-NOP (Iso-NO *probe*) capaz de identificar e medir NO , por meio de uma membrana permeável ao gás como resultado da oxidação que sofre ao passar pelo eletrodo (DONNELLY et al., 1997). Outro método direto de detecção é a citometria de fluxo para a detecção de $ONOO^-$ e NO com uma sonda permeável, a diaminofluoresceína (DAF-FM) (VIGNINI et al., 2006). A quantificação de compostos associados ao óxido nítrico pode ser considerada como uma medida indireta de estresse oxidativo (BECKMAN et al., 1994).

Para a avaliação da peroxidação lipídica, é realizado a detecção de malondialdeído (MDA), um produto primário da peroxidação lipídica, por espectrofotometria, pelo teste de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) (NICHI et al., 2017). Pode ainda ser detectado o 4-hidroxinonal (4-HNE), uma molécula ainda mais tóxica produzida pela peroxidação lipídica (AITKEN et al., 2012). Apesar do 4-HNE ser uma molécula mais sensível como marcador de peroxidação lipídica, ainda não há relatos na literatura de detecção de 4-HNE no plasma seminal para finalidade diagnóstica de estresse oxidativo (AITKEN; DREVET, 2020).

2.5 QUALIDADE DE EMBRIÕES PIV

A influência da qualidade espermática sobre o desenvolvimento e a qualidade embrionária já foi relatada previamente. Parinaud et al. (1993) demonstraram uma relação entre morfologia anormal dos espermatozoides e baixa qualidade embrionária. Sabe-se também que existe uma forte influência paterna na qualidade e no desenvolvimento embrionário precoce e tardio. Ou seja, espermatozoides com danos no DNA afetam a qualidade embrionária precoce assim como continua afetando a qualidade dos embriões após

a fase de transferência embrionária, resultando em queda nas taxas de implantação (SIMON et al., 2014).

Após o período de fecundação *in vitro*, o período de cultivo embrionário é quando ocorre o desenvolvimento embrionário e é um período considerado determinante para a qualidade dos blastocistos (RIZOS et al., 2002b). A análise subjetiva do desenvolvimento e da morfologia embrionária, realizada de maneira visual com a utilização de esteromicroscópio, é um método rotineiro de avaliação da qualidade embrionária nos laboratórios. No entanto, além das limitações de ser uma técnica subjetiva, sujeita a variação de avaliador, este tipo de análise não permite identificar quais são as possíveis causas pelas quais a qualidade embrionária foi afetada. A expressão gênica dos embriões vem sendo utilizada como uma ferramenta adicional de análise da qualidade embrionária. Visto isso, genes alvos relacionados ao desenvolvimento e qualidade embrionária vem sendo estudados, assim como genes responsáveis pela resposta ao estresse oxidativo e genes associados com vias do metabolismo embrionário. Diversos genes podem estar diferentemente expressos de acordo com o sistema em que os embriões foram desenvolvidos *in vivo* ou *in vitro* (BALASUBRAMANIAN et al., 2007; AL DARWICH et al., 2010; SUDANO et al., 2014).

2.5.1 Expressão gênica e estresse oxidativo

Os danos oxidativos sofridos pelos espermatozoides, previamente e durante o processo de fecundação e cultivo *in vitro*, podem gerar consequências tardias. Entre elas estão: a redução da taxa de desenvolvimento e implantação embrionária, redução do crescimento fetal e até mesmo alterações na prole nascida (SILVA et al., 2007; LANE et al., 2014).

Alguns genes tem se mostrado marcadores sensíveis de condições de cultivo, sendo os níveis de seus transcritos associados à qualidade embrionária (STINSHOFF et al., 2011). A expressão gênica relativa já foi mais representativa em embriões no estágio de 8 células do que em blastocistos, coincidindo com o momento em que ocorre a ativação embrionária em bovinos, 8-16 células (RODRIGUEZ-ZAS; SCHELLANDER; LEWIN, 2008; ALMEIDA, 2018).

O estresse oxidativo nos embriões vem sendo bastante estudado por ser uma das principais causas de queda de qualidade embrionária na PIVE. Apesar de muitas vezes não ser possível observar diferenças morfológicas visuais em embriões cultivados sob estresse oxidativo, a taxa de blastocistos é influenciada e diferenças no transcriptoma embrionário podem ser observadas ao avaliar genes ligados ao estresse oxidativo (CAGNONE; SIRARD,

2013). Genes relacionados a resposta antioxidante como NFE2L2, GPx1, PRDX1, SOD1 e 2, CAT estavam relativamente mais expressos em embriões cultivados em atmosfera com 20% de oxigênio comparados com embriões cultivados em 5% de oxigênio (LEITE et al., 2017).

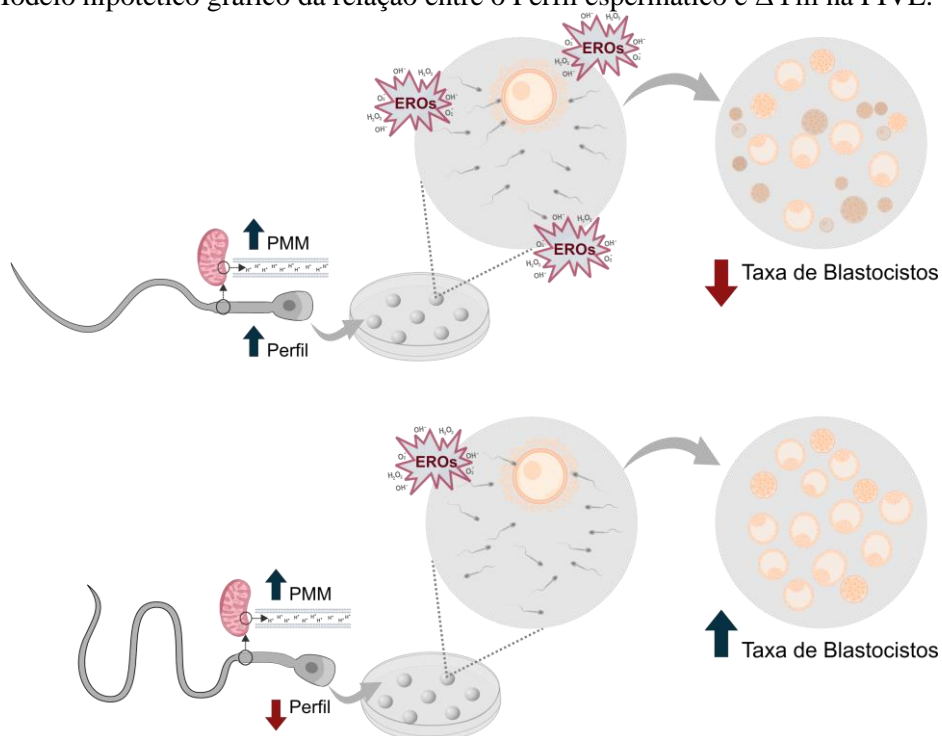
Genes relacionados à apoptose e degradação de DNA também são importantes na avaliação do transcriptoma embrionário. Uma maior quantidade do transcrito DDIT3, fator de transcrição relacionado ao DNA, foi observada em grupo de embriões cultivados em um ambiente em que a tensão de oxigênio era maior, podendo causar danos ao desenvolvimento embrionário e à ativação embrionária (LEITE et al., 2017).

Apesar dos espermatozoides serem bastante estudados quanto aos atributos de qualidade espermática e estresse oxidativo, pouco se sabe sobre a relação de um conjunto de atributos espermáticos com diferentes níveis de $\Delta\Psi_m$ no desenvolvimento e na qualidade dos embriões produzidos *in vitro*. E, principalmente, se essas associações condicionam um ambiente mais estressante, interferindo na taxa de blastocistos produzidos e na resposta antioxidante embrionária subsequente. Para isso, foram considerados dois diferentes perfis espermáticos representados por um conjunto de atributos espermáticos, associados com dois diferentes níveis de $\Delta\Psi_m$ para formular a hipótese deste trabalho.

3 HIPÓTESE

Formou-se a hipótese de que o $\Delta\Psi_m$ é um atributo dependente dos demais atributos relacionados à qualidade espermática, sendo capaz de compensar os demais atributos espermáticos durante a FIV, interferindo na taxa de blastocistos produzidos. Com isso, espermatozoides de **Alto Perfil** espermático (índices mais altos nos atributos espermáticos) quando associados com uma **Maior** porcentagem de espermatozoides com $\Delta\Psi_m$, condicionam um ambiente mais ativo e mais oxidativo durante a fecundação *in vitro* (FIV). Esse ambiente mais exacerbado é deletério para gametas e zigotos, diminuindo a taxa de produção de blastocistos. No entanto, espermatozoides de **Baixo Perfil** (índices mais baixos nos atributos espermáticos) quando associados a uma **Maior** porcentagem de espermatozoides com $\Delta\Psi_m$, apesar do ambiente oxidativo condicionado pelo alto $\Delta\Psi_m$, condicionam um ambiente menos ativo e menos exacerbado, portanto maior capacidade de fecundar no ambiente *in vitro*, conseqüentemente, maior taxa de blastocistos (figura 4).

Figura 4: Modelo hipotético gráfico da relação entre o Perfil espermático e $\Delta\Psi_m$ na PIVE.



Fonte: Castiglioni, V. C. (2021).

Legenda: PMM: Potencial de Membrana Mitocondrial (↑Alto e ↓Baixo); Perfil: Perfil Espermático (↑Alto e ↓Baixo); EROs: Espécies Reativas de Oxigênio.

4 OBJETIVOS

Geral

Avaliar como o $\Delta\Psi_m$ dos espermatozoides juntamente com os demais atributos espermáticos interferem nos índices de PIVE e na resposta antioxidante dos embriões produzidos.

Específicos

- Identificar se existe diferença nos índices de PIVE entre grupos com **Maior** ou **Menor $\Delta\Psi_m$** , dentro de dois níveis de perfil espermático (**Alto e Baixo**);
- Identificar diferenças no status oxidativo do meio de FIV entre os grupos de **Maior ou Menor $\Delta\Psi_m$** , dentro de dois níveis de perfil espermático (**Alto e Baixo**);
- Relacionar parâmetros do metabolismo mitocondrial com o status oxidativo e os índices de PIVE;
- Identificar diferenças nos níveis de expressão gênica relacionados à resposta antioxidante nos embriões, produzidos a partir de grupos de espermatozoides com **Maior ou Menor $\Delta\Psi_m$** , dentro de dois níveis de perfil espermático (**Alto e Baixo**).

5 MATERIAL E MÉTODO

O presente trabalho foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais de Experimentação (CEUA) da FMVZ-USP (protocolo nº 7246170117). Os experimentos foram realizados na Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (FMVZ-USP), parte no laboratório CEMSA/CIETEC/IPEN e parte no Centro de Ciências Naturais e Humanas da Universidade Federal do ABC (UFABC). Os meios e reagentes utilizados foram mencionados conforme a etapa em que foram utilizados.

O trabalho foi dividido em duas etapas consecutivas. Primeiramente, palhetas de sêmen doadas de Centrais de Processamento e Colheita de Sêmen foram triadas por citometria de fluxo e então foram distribuídas entre os grupos experimentais. A partir destes grupos formados, foram conduzidos os experimentos de PIVE, análises de parâmetros funcionais dos espermatozoides (citometria de fluxo, CASA, DAB, compostos associados ao metabolismo mitocondrial e detecção de NO \cdot) e de expressão gênica embrionária.

5.1 FORMAÇÃO DOS GRUPOS EXPERIMENTAIS

A partir de 48 partidas de sêmen, provenientes de 14 touros da raça Nelore foi feita a análise espermática, como forma de triagem e distribuição destas partidas entre os grupos experimentais. As palhetas foram analisadas quanto à motilidade microscópica visual pré e pós Percoll®, e por citometria de fluxo para os diferentes atributos espermáticos que são rotineiramente avaliados em espermatozoides bovinos, utilizando sondas fluorescentes FITC-PSA associada ao PI para avaliar a integridade de acrossomo e integridade de membrana plasmática simultaneamente; teste baseado no SCSA (*Sperm Chromatin Structure Assay*) para avaliar a resistência da cromatina e JC-1 para avaliar o $\Delta\Psi_m$ espermático, como descrito por Siqueira et al. (2018).

Foram realizadas cinco replicatas técnicas e para cada atributo avaliado foi utilizada a mediana dos valores das replicatas. A mediana passou a representar o valor oficial de cada partida. Com este valor foi realizado uma análise de correlação para todos os atributos espermáticos avaliados. A partir da análise de correlação, os grupos foram primeiramente ranqueados de acordo com o atributo espermático que mais se correlacionou com os demais, sendo assim esse atributo passou a representar um indicador de qualidade no perfil espermático. E o atributo que mais correlacionou com os demais foi a integridade de membrana plasmática (MPI), sendo então os grupos separados em **Alto Perfil** e **Baixo Perfil**

espermático, ou seja, acima e abaixo da mediana respectivamente. A partir desta primeira separação, os grupos foram novamente ranqueados por quartis, porém desta vez com base nos índices de JC-1, a fim de separar dentro de cada grupo de perfil espermático, os subgrupos relacionados a um **Maior** ou **Menor** nível de $\Delta\Psi_m$ espermático, valor máximo ao quartil superior e do quartil inferior ao valor mínimo, respectivamente (figura 5).

Não foi permitido a utilização de diferentes partidas de um mesmo touro dentro do mesmo subgrupo, impedindo que o efeito touro interferisse no grupo. Mas um mesmo touro, com partidas diferentes, poderia estar presente em grupos diferentes. Por fim, foram incluídos 3 touros em cada subgrupo, totalizando 12 touros nos quatro grupos experimentais de PIVE.

Figura 5: Delineamento experimental para a formação dos grupos utilizados na PIVE.



5.2 PIVE

A PIVE dos 12 touros, correspondentes aos 4 grupos experimentais, foi realizada simultaneamente em cada replicata, sendo realizadas, no total, 9 manipulações de PIVE. Após a fecundação *in vitro*, uma parte dos espermatozoides foi avaliada imediatamente para os atributos espermáticos e outra parte foi armazenada em freezer -80°C para posterior avaliação do metabolismo energético. Os embriões obtidos ao final do processo, também foram armazenados (*buffer* de extração de RNA) para posterior análise de expressão gênica.

Para a PIVE foram utilizados ovários oriundos de abatedouro comercial para obtenção de oócitos e todo o processo foi realizado de acordo com Siqueira et al. (2018), com algumas modificações.

5.2.1 MIV

O processo de PIVE iniciava assim que os ovários de abatedouro chegavam ao laboratório, oriundos do interior de São Paulo. Os ovários foram transportados em um recipiente térmico com solução salina a 0,9% com antibióticos (penicilina e estreptomicina) a 37°C. Ao chegar no laboratório, a temperatura foi mensurada e então os ovários foram lavados com a mesma solução salina recém preparada e aquecida. A partir dessa etapa, os folículos ovarianos com diâmetro entre 2 e 8 mm foram aspirados com seringa de 5 mL e agulha 21G. O Complexo *Cumulus Oophorus* (COCs) obtidos na aspiração folicular, foram então rastreados e selecionados com o uso de um estereomicroscópio, de acordo com o grau de qualidade oocitária, foram selecionadas estruturas de grau I e II segundo o manual da IETS (STRINGFELLOW; SEIDEL, 2009). Após seleção, os COCs foram lavados em meio HECM-HEPES (HH – preparada no laboratório, anexo 1) e em seguida no meio MIV [TCM199 Bicarbonado – Gibco®, suplementado com 10% de SFB - Gibco®, 22 µg/mL de piruvato, 50 µg/mL de gentamicina, 0,5 µg/mL de FSH-Folltropin-V (Vetrepharm, Inc., Belleville, ON, Canada), 50 µg/mL de gonadotrofina coriônica humana (Vetecor Laboratories, Calier, Spain) e 1 µg/mL de 17b-estradiol hidrossolúvel]. Ao fim desse processo, os COCs foram maturados *in vitro*, em placas com gotas de 90 µL de meio MIV sob óleo mineral (20 a 25 oócitos/gota), em incubadora a 38,5°C com alta umidade e 5% de CO₂ em ar durante 22 a 24 horas.

5.2.2 Preparo do sêmen e FIV

Após o período de maturação, os oócitos maturados foram lavados com meio HH e em seguida com meio FIV-gota [TL-Stock (NaCl, KCl, MgCl₂, NaH₂PO₄, NaHCO₃, CaCl₂H₂O, Ácido Lático - Sigma®) acrescidos de BSA livre de ácidos graxos Sigma®, piruvato, gentamicina e agentes capacitantes: heparina, penicilamina, epinefrina e hipotaurina]. E então, transferidos aleatoriamente para novas placas com 4 gotas de 90 µL de meio FIV-gota (20 oócitos/gota) sob óleo mineral, sendo usado uma placa de FIV para cada touro individualmente. Para cada touro, 80 oócitos maturados foram inseminados, totalizando 1040 oócitos a cada manipulação.

Para a inseminação *in vitro*, as palhetas de sêmen foram descongeladas em água a 37°C por 30 segundos. Imediatamente após a descongelação, 5 µL das amostras foram pipetados em lâmina aquecida, coberta com lamínula para avaliar a motilidade visual por microscopia óptica com contraste de fase (motilidade PRÉ). Cada palheta foi então submetida

a um gradiente de densidade Percoll® com diferentes concentrações (400 µL de 45% e 400 µL de 90%) em um microtubo Eppendorf®, e centrifugados por 6600 xg/5 minutos. Os espermatozoides móveis que atravessaram essas barreiras com diferentes concentrações de Percoll® foram então transferidos para um novo microtubo com 1 mL de meio FIV (sem agentes capacitantes) e centrifugados novamente a 1100 xg/3 minutos para que fossem lavados e retirado o excesso de Percoll®. Após a lavagem, o *pellet* contendo os espermatozoides foi novamente avaliado quanto a motilidade visual sob microscopia óptica com contraste de fase (motilidade PÓS).

A concentração espermática também foi avaliada, diluindo 5 µL do sêmen lavado em 245 µL de água (diluição 1:50), e então foi feita a contagem em câmara de Neubauer, sob microscopia óptica em aumento de 40x. A concentração foi então ajustada com meio FIV (sem agentes capacitantes) para 25×10^6 espermatozoides/mL e os oócitos foram inseminados nas gotas com 4 µL de sêmen após ajuste de concentração (100.000 espermatozoides móveis/gota). Imediatamente após a inseminação dos oócitos (D0), parte da amostra do *pellet* de sêmen de cada touro foi avaliada para os atributos espermáticos e outra parte foi congelada a -80°C para avaliação posterior do metabolismo energético e estresse oxidativo.

Nesta etapa, além dos 12 touros utilizados dentre os quatro grupos experimentais (Grupo 1: **Alto Perfil** e **Maior $\Delta\Psi_m$** , Grupo 2: **Alto Perfil** e **Menor $\Delta\Psi_m$** , Grupo 3: **Baixo Perfil** e **Maior $\Delta\Psi_m$** , Grupo 4: **Baixo Perfil** e **Menor $\Delta\Psi_m$**), conforme a figura 5, um touro controle de FIV também foi utilizado. Este touro foi utilizado como uma forma de controle para cada manipulação de FIV, pois os índices de PIVE deste já são conhecidos. Apenas as manipulações nas quais a taxa de blastocisto do touro controle foi superior a 15% foram incluídas como validadas neste trabalho.

5.2.3 CIV

Ao retirar os oócitos da placa de FIV, para realizar a etapa do CIV, o meio remanescente, nas gotas de FIV foi recolhido e armazenado individualmente/touro em freezer -80°C. Esse meio foi utilizado para avaliação do estresse oxidativo e da peroxidação lipídica, presente no meio após o período de incubação dos oócitos com os espermatozoides durante o período da FIV.

Após 20 horas da FIV, foi realizado o cultivo *in vitro* (CIV), sendo esse momento considerado o dia 1 (D1) do cultivo. Os presumíveis zigotos foram lavados e desnudados em meio HH, por meio de pipetagem manual. O excesso de células do cumulus foi removido por

pipetagens sucessivas, feitas por um mesmo técnico para todos os touros e em todas as manipulações, a fim de evitar variação técnica. Os presumíveis zigotos foram transferidos para uma nova placa contendo gotas de 60 μL de meio de cultivo KSOM (Milipore, MR 020P-5D) sob óleo mineral e cultivados por 8 dias em incubadora sob uma atmosfera de gases controlados com 5% CO_2 , 5% de O_2 e 90% de N_2 a 38,5°C e alta umidade.

Para a avaliação da taxa de fecundação (contagem pronúcleos), após a remoção das células do cumulus, foram retirados 8 presumíveis zigotos, de cada touro, sendo estes fixados em paraformol a 4% por 20 minutos. Após esse período, as estruturas foram armazenadas em meio PBS acrescido de 1% de PVP (Poli N-Vinil-2-pirrolidona). No dia da avaliação da taxa de fecundação, as estruturas foram lavadas quatro vezes com PBS (gotas de 50 μL para cada lavagem) com 1% de PVP e incubadas por 10 minutos com 10 $\mu\text{g/mL}$ de Hoechst 33342. Por fim, os prováveis zigotos foram avaliados em microscópio de epifluorescência (Olympus IX80, Olympus Corporation) e classificadas de acordo com a visualização dos pronúcleos: fecundação normal (2 pronúcleos), fecundação negativa (1 pronúcleo) ou poliespermia (mais de 2 pronúcleos), conforme demonstrado na figura 6.

Figura 6: Classificação para taxa de fecundação, por contagem de pronúcleos.



Após 48 horas do cultivo (D3), 30 μL do meio da placa de CIV foi removido e acrescentado mais 30 μL de meio KSOM acrescido de 10% de SFB, ficando assim a uma concentração final de SFB de 5% em cada gota. Nesse momento também foi feita a contagem das estruturas clivadas, **taxa de clivagem** ($\frac{n \text{ de estruturas clivadas}}{n \text{ de estruturas totais cultivadas}} \times 100$).

Ainda no D3 foram retiradas 5 estruturas de 8 células e colocadas em meio *buffer* de extração de RNA para que depois fossem submetidos à análise molecular, no entanto essas estruturas foram contadas na taxa de clivagem.

No D5, em cada gota de cultivo foi adicionado um novo meio de KSOM acrescido de 5% de SFB (30 μ L). Por fim, no oitavo dia de cultivo (D8), foram avaliadas a **taxa de blastocistos** ($\frac{n \text{ de embriões viáveis produzidos}}{n \text{ de estruturas totais cultivadas}} \times 100$) e a **taxa de desenvolvimento embrionário** ($\frac{n \text{ de embriões viáveis produzidos}}{n \text{ de clivados}-5} \times 100$), estruturas clivadas -5 pois foi o número de estruturas de 8 células retiradas no D3.

No total foram realizadas nove manipulações completas de PIVE, e 7 replicatas foram validadas (replicatas técnicas), sendo que em cada manipulação todos os 13 touros, dos quatro grupos experimentais, foram testados simultaneamente na FIV.

5.3 AVALIAÇÕES ESPERMÁTICAS E DO MEIO FIV

Para as análises dos atributos espermáticos todas as amostras foram preparadas como descritas no item 5.2.2, ou seja, todas passaram pelo gradiente de Percoll®, feito lavagem e ajuste de concentração. As análises de citometria de fluxo e de motilidade espermática computadorizada (CASA), assim como a montagem das lâminas de DAB foram realizadas no mesmo momento em que a FIV foi realizada, para que fosse possível avaliar quais foram as condições daquelas amostras no momento em que estavam sendo usadas para a inseminação *in vitro*, dentre todos os grupos experimentais. As análises referentes ao metabolismo energético e estresse oxidativo espermático, como mensuração de ATP, ADP, NADH, FADH₂, 4-HNE e óxido nítrico foram feitas posteriormente a FIV, após descongelamento do *pellet* (armazenados até o momento da análise a -80°C).

5.3.1 Citometria de Fluxo

Atributos espermáticos como integridade de membrana plasmática e acrossomal, potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$), resistência da cromatina e atributos relacionados ao estresse oxidativo espermático foram avaliados por citometria de fluxo. Utilizando o citômetro de fluxo Guava EasyCyte™ Mini System (Guava® Technologies, Hayward, CA, EUA), o qual possui um laser de excitação de 488 nm e emite luz de 20 nW de potência, com detectores para fluorescência amarela (583 nm), vermelha (680 nm) e verde (525 nm). Foram avaliados 20.000 eventos para cada amostra, debris e células aglutinadas foram excluídos e as células espermáticas foram analisadas pelo software FlowJo® v10.2, Apêndice 1. Todas as sondas fluorescentes foram adquiridas pela Molecular Probes (Eugene, OR, EUA).

As integridades da membrana plasmática e acrossomal foram avaliadas utilizando as sondas fluorescentes FITC-PSA associada com PI. A lecitina se liga à membrana interna do acrossomo e emite fluorescência verde nas células com acrossomo lesado ou reagido. Já o PI é uma sonda impermeável às membranas íntegras, porém quando existe lesão a sonda é capaz de penetrar na célula e fluoresce em vermelho. Para a análise com as sondas conjugadas foi utilizado o protocolo descrito por Siqueira et al. (2018), utilizando 7,5 μL de sêmen (187.500 células), 30 μL de meio FIV (sem agentes capacitantes) e corados com 13 μL da mistura de FITC-PSA (concentração final de 5 μg) com PI (concentração final de 6 μM), incubados por 5 minutos a 37°C, protegidos da luz. Para a leitura no citômetro de fluxo, foram adicionados 300 μL de PBS aquecido a 37°C. Na análise dos dados, as populações foram denominadas **AI** (% de sptz com acrossomo íntegro) e **MPI** (% de sptz com membrana plasmática íntegra).

As análises do $\Delta\Psi\text{m}$ foram realizadas utilizando a sonda fluorescente JC-1, sonda que apresenta dois tipos de coloração, ao se acumular no espaço intermembranas dependendo do $\Delta\Psi\text{m}$, podendo formar monômeros emitindo fluorescência verde para baixo potencial ou formar J-agregados que emitem fluorescência vermelha/alaranjada para alto potencial. Para esta análise foi utilizado protocolo descrito por Siqueira et al. (2018), com 7,5 μL de sêmen (187.500 células), 30 μL de meio FIV (sem agentes capacitantes) incubados com 0,5 μL de JC-1 (concentração final de 1 μM) por 5 minutos a 37°C, protegidos da luz. Para a leitura no citômetro, foram adicionados 300 μL de PBS aquecido a 37°C. Na análise dos dados as populações foram separadas em % de espermatozoide com maior e menor potencial de membrana mitocondrial (**Maior $\Delta\Psi\text{m}$** ou **Menor $\Delta\Psi\text{m}$** , respectivamente).

Para a detecção das EROs nos espermatozoides por citometria foram utilizadas as sondas fluorescentes CellROX green, DHE (*Dihydroethidium*) e MitoSOX Red. A sonda CellROX green penetra na célula e quando oxidada por radicais livres intracelulares liga-se ao DNA e emite fluorescência verde mais intensa, o protocolo foi realizado de acordo com Castro et al. (2016a). Foram utilizadas 187.500 células em 7,5 μL de sêmen, corados com 1,85 μL da sonda CellROX green (concentração final de 5 μM), adicionados 30 μL de meio FIV (sem agentes capacitantes) e incubados por 20 minutos a 37°C. Após esse período de incubação foi adicionado 0,6 μL de PI (concentração final de 6 μM), e incubados por mais 10 minutos. Para leitura foram adicionados 300 μL de PBS. Na análise dos dados, da mesma forma que Castro et al. (2016a), foi utilizada a população de maior interesse para identificação de espermatozoides estressados, **CR+PI-** (% de células estressadas e sem alteração de membrana).

Para detecção de $O_2^{\cdot -}$ celular total foi utilizada a sonda fluorescente DHE e para detecção de $O_2^{\cdot -}$ mitocondrial foi utilizada a sonda fluorescente MitoSOX Red, ambas corando-se em vermelho quando oxidadas. O protocolo utilizado foi de acordo com Koppers et al. (2008). Para o DHE, em 1,5 μ L da sonda (concentração final de 2,5 μ M) foram adicionadas 187.500 células em 7,5 μ L e 30 μ L de meio FIV (sem agentes capacitantes), e incubados por 20 minutos a 37°C, sendo que para leitura foram adicionados 300 μ L de PBS. Para análise dos dados a população analisada foi denominada **DHE+** (% de sptz que apresentaram de ânion superóxido celular total). Já para a sonda MitoSOX Red, 0,5 μ L foi adicionado (concentração final 2,5 μ M) a 187.500 células em 7,5 μ L de sêmen e 30 μ L de meio FIV (sem agentes capacitantes), e incubados por 20 minutos a 37°C. Da mesma forma que as demais sondas, para a leitura foram adicionados 300 μ L de PBS. Na análise dos dados a população analisada foi denominada **Mito+** (% de sptz que apresentaram ânion superóxido mitocondrial).

Por fim, a resistência da cromatina espermática foi avaliada com base no teste SCSA elaborado por Evenson; Jost, (2000), adaptado por Simões et al. (2013). Este teste se baseia na desnaturação da molécula de DNA, utilizando detergente ácido, abrindo a fita dupla do DNA. Ao abrir a fita, permite que o corante de laranja de acridina (LA) se intercale e imita fluorescência vermelha para fita simples ou fluorescência verde para fita dupla. Foi utilizado protocolo de acordo com Siqueira et al. (2018), em que 357.000 células em 15 μ L foram lavadas com 100 μ L de tampão TNE (Tris-HCL 0,1 M, NaCl 0,15 M, EDTA 1 mM em água destilada, pH 7,4), e então incubadas com 100 μ L de detergente ácido (HCL 0,08M, NaCl 0,15 M, Triton X-100 0,1% em água destilada, pH 1,2) por 30 segundos. Em seguida, foram adicionados 300 μ L da solução com o corante LA (ácido cítrico 0,1 M, Na_2HPO_4 0,2 M, EDTA 0,001 M, NaCl 0,15 M, LA stock 6 μ g/mL em água destilada, pH 6) e avaliado no citômetro de fluxo. Na análise dos dados a população denominada **CI** representa a % de sptz com a cromatina íntegra.

5.3.2 CASA (*Computer-assisted sperm analysis*)

A motilidade espermática foi avaliada pelo sistema computadorizado de análise de sêmen (CASA), Hamilton Thorne IVOS, v.12.2, do Laboratório de Andrologia do Departamento de Reprodução Animal da FMVZ/USP. Os parâmetros utilizados para análise estão descritos no quadro 1. Foram utilizados 5 μ L de sêmen, após preparo conforme item 5.2.2, já com a concentração ajustada para 25×10^6 espermatozoides/mL, depositados na

lâmina e lamínula pré-aquecida a 37°C, sendo quatro campos considerados para avaliação dos parâmetros. Para cada um dos parâmetros avaliados foram utilizados os valores da média dos quatro campos analisados.

Quadro 1: Parâmetros avaliados pelo sistema CASA nos espermatozoides.

VAP	Velocidade de trajeto ($\mu\text{m/s}$): velocidade curvilínea sobre um trajeto uniforme, desprezando o deslocamento lateral da célula espermática. Velocidade média da trajetória do sptz
VSL	Velocidade progressiva ($\mu\text{m/s}$): distância percorrida considerando uma linha reta, dividida pelo tempo decorrido
VCL	Velocidade curvilínea ($\mu\text{m/s}$): distância entre cada posição do centro da célula durante a captura da imagem
ALH	Amplitude de deslocamento lateral de cabeça (μm): largura média da oscilação da cabeça do sptz durante seu deslocamento
BCF	Frequência de batimentos do flagelo (Hz): frequência com que a linha da cabeça espermática atravessa a trajetória celular em qualquer direção
STR	Retilinearidade (%): Afastamento médio da trajetória da célula espermática, considerando uma linha reta. Calculado por $\text{VSL/VAP} \times 100$
LIN	Linearidade (%): medida do afastamento da célula espermática considerando-se uma linha reta. Calculado por $\text{VSL/VCL} \times 100$
MT	Motilidade total (%)
MP	Motilidade progressiva (%)
RAPID	Porcentagem de sptz com velocidade rápida
MEDIUM	Porcentagem de sptz com velocidade média
SLOW	Porcentagem de sptz com velocidade lenta
STATIC	Porcentagem de sptz parados

5.3.3 DAB

O teste de oxidação da 3,3'diaminobenzina (DAB) foi realizado de acordo com Losano (2017b). Trata-se de uma técnica citoquímica, na qual DAB é oxidado pela enzima citocromo C, em mitocôndrias ativas, formando um complexo de cor amarronzada depositado na peça intermediária do espermatozoide. Para essa análise foram utilizados 10 μL do sêmen na concentração ajustada para 25×10^6 sptz/mL, e incubados com 10 μL da solução de DAB (1 mg/mL) por uma hora a 37°C, protegidos da luz. Após esse período foram feitos esfregaços dessas amostras em lâminas de vidro, e então fixadas por 15 minutos em formol 10%. As lâminas foram analisadas em microscópio com contraste de fase em aumento de 1.000X sob óleo de imersão. Foram contadas 100 células por amostra espermáticas, sendo classificadas conforme descrito no quadro 2:

Quadro 2: Classificação dos espermatozoides conforme atividade mitocondrial, utilizando o teste DAB.

DAB I	% de sptz com peça intermediária do completamente corada, indicando alta atividade mitocondrial
DAB II	% de sptz com >50% da peça intermediária corada, média atividade mitocondrial
DAB III	% de sptz com <50% da peça intermediária corada, baixa atividade mitocondrial
DAB IV	% de sptz com peça intermediária completamente sem cor, indicando ausência de atividade mitocondrial

5.3.4 Cromatografia Líquida

As análises do metabolismo energético dos espermatozoides e da peroxidação lipídica do meio FIV foram realizadas no laboratório CEMSA/CIETEC/IPEN da USP, por meio da técnica de Cromatografia Líquida de Alta Performance acoplada a Espectrometria de Massas Triplo Quadrupolo (*High Performance Liquid Chromatography/Mass Spectrometry*: LC-MS/MS). O sistema de LC-MS/MS utilizado foi um Agilent Serie 1260 (Agilent Technologies, EUA) e espectrômetro de massas 3200 QTRAP® (Sciex, CN). As soluções padrões para detecção de ATP, ADP, NADH e FADH₂ foram obtidas pela Sigma-Aldrich (San Luis, MO, EUA) e 4-HNE foi adquirido da Cayman Chemical (Ann Arbor, Michigan, EUA).

Primeiramente foram realizadas preparações das soluções estoque de cada composto avaliado nos espermatozoides (ATP, ADP, NADH e FADH₂), os quais foram pesados 1 mg e diluídos em solução com 50% acetoneitrila/50% água MiliQ (v/v) para atingir à concentração final de 1 mg/mL. Para os compostos NADH e FADH₂ uma solução intermediária foi preparada, 100 ug/mL em solução 50% acetoneitrila/50% água (v/v), a partir da solução estoque. Para as análises foram preparadas duas amostras controles positivo: uma amostra em água MilliQ e outra amostra espermática, adicionadas com o composto padrão, ambas foram preparadas diluindo as soluções estoque de ADP e ATP e a solução intermediária de NADH/FADH₂ para atingir as concentrações de 100 ug/mL e 20 ug/mL, respectivamente. Estas amostras de controle foram preparadas e analisadas juntamente com as amostras experimentais.

As amostras espermáticas que foram armazenadas a -80°C após a FIV, foram descongeladas e então foi feito um *pool* destas amostras, juntando os *pellets* das 7 replicatas validadas dos 12 touros. As amostras foram preparadas da seguinte forma: em 50 µL de amostra foram adicionados 200 µL de Metanol para precipitação das proteínas, seguida de agitação em vórtex por 30 segundos, centrifugação a 8 xg por 4 minutos/4°C. Após centrifugados, 100 µL do sobrenadante foram diluídos em 100 µL de água MiliQ, sendo

injetadas no sistema de LC-MS/MS previamente otimizado para análise qualitativa e quantitativa dos compostos ATP, ADP, FADH₂ e NADH.

Para a avaliação de 4-HNE no meio de FIV, as amostras foram obtidas a partir da placa de FIV contendo meio e restos celulares remanescente, como descrito anteriormente no item 5.2.3. As amostras também foram congeladas a -80°C até o momento em que foi realizado o *pool* das amostras. A solução estoque foi diluída com Metanol a 100 µg/mL. As amostras foram preparadas da seguinte forma: 100 µL de amostra para 200 µL de Acetonitrila para precipitação de proteínas, seguida de agitação no vórtex por 30 segundos, centrifugação a 8G por 3 minutos/4°C. O volume de 150 µL do sobrenadante foi recuperado e injetado diretamente no equipamento para análise.

5.3.5 Óxido nítrico (NO[•])

As análises de NO[•] foram realizadas no Centro de Ciências Naturais e Humanas da Universidade Federal do ABC (UFABC) e até o momento da análise, as amostras ficaram armazenadas a -80°C. Foram avaliados *pools* das 7 replicatas validadas, sendo *pools* feitos a partir dos *pellets* de sêmen dos 12 touros e *pools* do meio da placa de FIV dos 12 touros.

A concentração dos S-nitrosotióis nas amostras foi determinada utilizando-se o Analisador amperométrico de radicais livres (WPI TBR4100/1025 World Precision Instruments Inc., Sarasota FL, USA) acoplado a um sensor específico de óxido nítrico (ISO-NOP, 2 mm). Alíquotas de 80 µL de cada amostra foram adicionadas ao compartimento de análise, contendo 15 mL de uma solução aquosa de cloreto de cobre (0,1 M), responsável por catalisar a clivagem da ligação S-NO. Essa condição permitiu a detecção de NO[•] livre liberado do conteúdo de S-nitrosotiol presente nas amostras. A concentração foi analisada com base em uma curva de calibração utilizando GSNO como padrão.

5.4 ANÁLISE DE EXPRESSÃO GÊNICA EMBRIONÁRIA

Para a análise de expressão gênica, foram utilizados 5 embriões de 8 células/touro, de 3 replicatas técnicas validadas. No momento da coleta no D3 do CIV, item 5.2.3, foram adicionados 40 µL de RNA Extraction Buffer® e foram incubados a 42°C por 30 minutos, sendo em seguida imersos em nitrogênio líquido e depois armazenados a -80°C até o momento da extração de RNA, que foi realizada de acordo com o manual do fabricante do kit PicoPure® (Applied Biosystem, EUA) (anexo 2). A partir do RNA extraído, 1 µL foi utilizado para a quantificação no NanoDrop® (ThermoFisher, Massachusetts, EUA), seguida

da síntese de DNA complementar (cDNA) por meio da enzima transcriptase reversa do kit SuperScript® Vilo® cDNA synthesis (Life Technologies, Califórnia, EUA) (anexo 2). O cDNA foi armazenado a -20°C até o momento da análise.

A amplificação do cDNA foi realizada utilizando ensaios Taqman® (Applied Biosystem, EUA), sendo escolhidos os genes relacionados à resposta antioxidante (quadro 3). Também foi utilizado um controle endógeno para normalizar as reações de quantificação de RT-PCR relativo. A reação do mix do ensaio Taqman foi realizada da seguinte forma: 10 µL do de TaqMan®Fast Advanced MasterMix, 1 µL do ensaio Taqman (primer e sonda associados para cada gene de interesse avaliado), 8 µL de água ultrapura e 1 µL de cDNA sintetizado. As reações foram amplificadas em duplicatas no termociclador qPCR Mastercycler realplex Thermal Cycler (Eppendorff, Hambur, Alemanha). As reações foram ativadas a 50°C por 10 minutos, seguidas de desnaturação e anelamento a 95°C por 10 minutos, e amplificação a 95°C por 30 segundos e 60°C por um minuto durante 50 ciclos. A expressão gênica dos genes alvos foi quantificada em forma de comparação relativa com a expressão do gene endógeno.

Quadro 3: Genes alvo utilizados para avaliação embrionária, com respectivas funções e códigos de identificação do ensaio Taqman® (Applied Biosystem, EUA).

Gene	Nome	Função	Código Identificação
XBP1	<i>X-Box Binding Protein 1</i>	Resposta ao estresse celular	Bt03227621_g1
HMOX1	<i>Heme Oxygenase 1</i>	Resposta antioxidante, metabolismo celular	Bt03218624_m1
PRDX1	<i>Peroxiredoxin-1</i>	Resposta antioxidante	Bt03223684_m1
NFE2L2	<i>Erythroid-Derived 2-Like 2</i>	Resposta antioxidante	Bt03251880_m1
DDIT3	<i>DNA-Damage-Inducible Transcript 3</i>	Resposta antioxidante, metilação DNA	Bt03251320_g1
GPX4	<i>Glutathione Peroxidase</i>	Resposta antioxidante	Bt03259611_m1
Actb	<i>Beta Actin</i>	Gene endógeno	Bt03279174_g1

5.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram analisados pelo programa SAS System 9.3 para Windows. As variáveis resposta avaliadas foram testadas quanto à normalidade dos resíduos e homogeneidade das variâncias em função dos grupos. Sendo obedecidas as premissas da análise estatística, as análises foram realizadas. Casos em que as premissas não foram cumpridas, os dados foram transformados. O nível de significância considerado foi de 0,05 para rejeitar a hipótese de nulidade. Dados paramétricos foram apresentados como média \pm desvio padrão, e os dados não paramétricos como medianas (quartil inferior e superior).

5.5.1 Formação dos Grupos Experimentais

Foi utilizado o PROC CORR SPEARMAN RANK para verificar qual variável dependente teria mais correlações significativas. Neste experimento a variável dependente com mais correlações significativas foi a integridade de membrana plasmática (PI). Para essa variável dependente foi realizado um ranqueamento e calculado os valores de mediana, quartil superior, quartil inferior, valor máximo e valor mínimo considerando-se 48 partidas de sêmen, em cinco replicatas técnicas, para então serem constituídos os grupos experimentais de **Alto** e **Baixo Perfil** espermático (Grupo **Alto Perfil**: valor máximo até o valor da mediana; grupo **Baixo Perfil**: da mediana até o valor mínimo). Dentro dos grupos **Alto** e **Baixo Perfil** espermático, realizou-se um ranqueamento com base nos índices de $\Delta\Psi_m$ (JC-1) e calculado os valores de mediana, quartil superior, quartil inferior, valor máximo e valor mínimo dentro de cada grupo experimental, alto e baixo perfil espermático, para então serem constituídos os grupos experimentais de **Maior** (valor máximo ao quartil superior) e **Menor $\Delta\Psi_m$** (quartil inferior ao valor mínimo) dentro de cada perfil espermático. Posteriormente, o teste não paramétrico NPAR1WAY WILCOXON foi realizado dentro dos grupos de Alto e Baixo Perfil espermático. Os grupos foram estatisticamente diferentes para os índices de $\Delta\Psi_m$; ao mesmo tempo semelhantes para os outros atributos espermáticos, considerando $p < 0,05$ para confirmar a diferença no $\Delta\Psi_m$ e um $p > 0,10$ para descartar diferença nos demais atributos.

5.5.2 PIVE, Avaliação Espermática e meio FIV

Para avaliação das taxas da PIVE (taxa de clivagem, blastocistos produzidos e desenvolvimento embrionário), taxa de fecundação (pronúcleo) e das diferentes variáveis avaliadas pelo citômetro, CASA, DAB, NO₂, e as análises da função e metabolismo espermático foi feita uma análise de variância ANOVA, utilizando PROC GLM, fatorial 2x2, (Perfil espermático: Alto e Baixo; $\Delta\Psi_m$: Maior e Menor) entre os quatro grupos experimentais (**Alto Perfil Maior $\Delta\Psi_m$** , **Alto Perfil Menor $\Delta\Psi_m$** , **Baixo Perfil Maior $\Delta\Psi_m$** e **Baixo Perfil Menor $\Delta\Psi_m$**), com posterior comparação de médias pelo método LSD.

5.5.3 Expressão Gênica

As análises de expressão gênica embrionária do qRT-PCR foram analisadas pelo procedimento MIXED do SAS System 9.3, que considerou a construção de contraste para avaliar os efeitos dos grupos experimentais e de interação, como descrito por Steibel et al. (2009).

6 RESULTADOS

6.1 FORMAÇÃO DOS GRUPOS EXPERIMENTAIS

Para a formação dos grupos a serem testados na FIV, os atributos espermáticos foram avaliados por meio de análise de correlação, o atributo espermático que mais se correlacionou com os demais e apresentou maiores valores de Rho (coeficiente de correlação) foi **MPI** (% de sptz com membrana plasmática íntegra), conforme descrito na tabela 1, sendo assim, foi possível realizar a primeira separação dos grupos de acordo com esse atributo. Por estar mais correlacionado com os demais atributos, ao ranquear as partidas de sêmen em ordem decrescente de acordo com os valores de MPI, as que apresentaram valores superiores à mediana (Q1 e Q2) formaram o grupo de **Alto Perfil** espermático e as partidas com valores inferiores à mediana (Q3 e Q4) formaram o grupo de **Baixo Perfil** espermático (tabela 2, figura 5). Após esse primeiro agrupamento, as partidas foram novamente ranqueadas dentro de cada grupo, porém desta vez, com base nos índices do $\Delta\Psi_m$. As partidas que apresentaram valores superiores à mediana (Q1) constituíram o subgrupo **Maior** nível de $\Delta\Psi_m$ e as que apresentaram valores inferiores à mediana (Q4) o subgrupo **Menor** nível $\Delta\Psi_m$ (tabela 3, figura 5).

Tabela 1: Correlação entre atributos espermáticos, coeficiente de correlação (Rho) e valor de p.

	PRÉ	PÓS	AI	MPI	Maior $\Delta\Psi_m$	CI
PRÉ	1	Rho 0,03366 p 0,8204	Rho -0,017 p 0,9087	Rho -0,08599 p 0,5612	Rho -0,1718 p 0,2430	Rho 0,01399 p 0,9248
PÓS		1	Rho 0,20894 p 0,1541	Rho 0,19587 p 0,1821	Rho 0,24582 p 0,0922	Rho -0,11004 p 0,4565
AI			1	Rho 0,74237 p <,0001	Rho 0,42673 p 0,0025	Rho 0,16866 p 0,2518
MPI				1	Rho 0,57253 p <,0001	Rho 0,33822 p 0,0187
Maior $\Delta\Psi_m$					1	Rho 0,29806 p 0,0396
CI						1

Legenda: motilidade antes do gradiente de Percoll® (PRÉ), depois do gradiente de Percoll® (PÓS), Integridade de acrossomo (AI), Integridade de membrana (MPI), maior $\Delta\Psi_m$ (maior JC-1) e Resistência da cromatina (CI).

Tabela 2: Ranqueamento das partidas espermáticas de acordo com os valores (%) de integridade de membrana plasmática para formação dos grupos Alto e Baixo Perfil espermático.

Formação dos Grupos Ranqueados por Integridade de Membrana Plasmática (MPI)		
Valor Máximo (Q1)	88,7%	ALTO PERFIL ESPERMÁTICO
Quartil Superior (Q2)	82,65%	
Mediana	78,75%	
Quartil Inferior (Q3)	73,65%	BAIXO PERFIL ESPERMÁTICO
Valor Mínimo (Q4)	44,2%	

Tabela 3: Ranqueamento das partidas espermáticas de acordo com os valores (%) de $\Delta\Psi_m$ (JC-1) para formação dos subgrupos **Alto Perfil** espermático: **Maior $\Delta\Psi_m$** e **Menor $\Delta\Psi_m$** , **Baixo Perfil** espermático: **Maior $\Delta\Psi_m$** e **Menor $\Delta\Psi_m$** .

Formação dos Subgrupos Ranqueados pelo Potencial de Membrana Mitocondrial			
	ALTO PERFIL	BAIXO PERFIL	
Valor Máximo (Q1)	88,4%	85,6%	MAIOR $\Delta\Psi_m$
Quartil Superior (Q2)	84,75%	79%	
Mediana	82,9%	74,8%	
Quartil Inferior (Q3)	80,5%	68,85%	MENOR $\Delta\Psi_m$
Valor Mínimo (Q4)	72,35%	50,1%	

A formação dos subgrupos visou selecionar partidas de sêmen que apresentassem diferença significativa apenas para índices de $\Delta\Psi_m$ e apresentassem valores homogêneos para os demais atributos (motilidade pré e pós, AI, MPI e CI). Com isso, foi possível isolar os efeitos apenas para o $\Delta\Psi_m$, sem diferenças nos índices para os demais atributos (tabela 4 e 5).

Tabela 4: **Alto Perfil** espermático e efeito isolado para JC-1. Valores de medianas (quartil inferior e quartil superior) e valores de p para atributos espermáticos avaliados.

Alto Perfil espermático			
Atributos espermáticos	Maior $\Delta\Psi_m$	Menor Ψ_m	Valor de p
PRÉ (%)	47,5 (40,0; 65,0)	45,0 (40,0; 60,0)	0,55
PÓS (%)	65,0 (40,0; 65,0)	65,0 (50,0; 70,0)	0,75
AI (%)	92,2 (90,0; 94,3)	92,9 (90,8; 94,7)	0,82
MPI (%)	82,1 (79,3; 88,7)	86,3 (80,7; 87,8)	0,39
Maior JC-1 (%)	86,6 (85,0; 88,7)^a	80,0 (77,2; 88,2)^b	0,0466
CI (%)	99,3 (98,3; 99,9)	99,2 (98,2; 99,7)	0,95

Legenda: motilidade antes do gradiente de Percoll® (PRÉ), depois do gradiente de Percoll® (PÓS), Integridade de acrossomo (AI), Integridade de membrana (MPI), maior $\Delta\Psi_m$ (maior JC-1) e Resistência da cromatina (CI). Letras diferentes representam diferença estatística (^{a,b}).

Tabela 5: **Baixo Perfil** espermático e efeito isolado do $\Delta\Psi_m$. Valores de medianas (quartil inferior e quartil superior) e valores de p para atributos espermáticos avaliados.

Baixo Perfil espermático			
Atributos espermáticos	Maior $\Delta\Psi_m$	Menor $\Delta\Psi_m$	Valor de p
PRÉ (%)	55 (40,0; 60,0)	60,0 (45,0; 60,0)	0,75
PÓS (%)	65,0 (50,0; 70,0)	60,0 (40,0; 70,0)	0,61
AI (%)	86,3 (81,7; 89,4)	85,1 (82,6; 88,2)	0,64
MPI (%)	77,7 (71,9; 78,8)	68,5 (59,7; 78,8)	0,13
Maior JC-1 (%)	82,0 (77,7; 85,0)^a	68,9 (63,1; 78,7)^b	0,0202
CI (%)	99,2 (96,6; 99,9)	98,8 (98,1; 99,6)	0,57

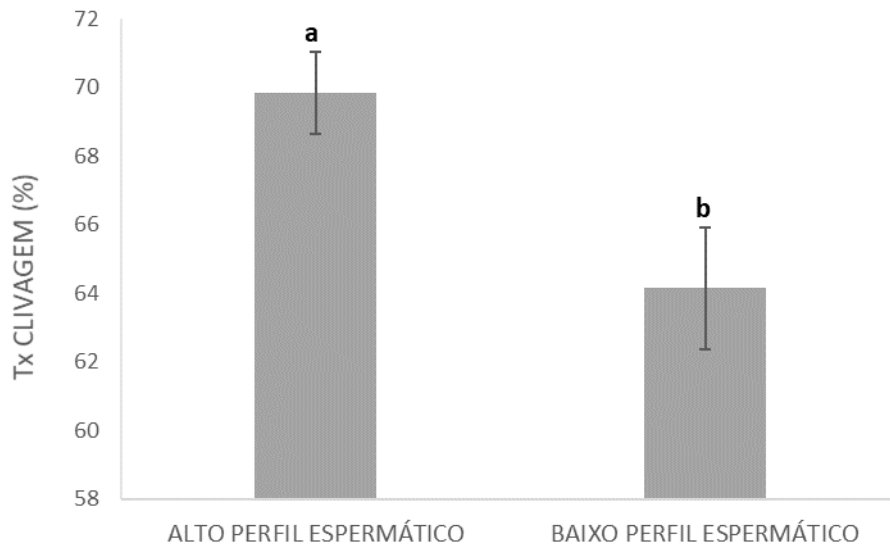
Legenda: motilidade antes do gradiente de Percoll® (PRÉ), depois do gradiente de Percoll® (PÓS), Integridade de acrossomo (AI), Integridade de membrana (MPI), maior $\Delta\Psi_m$ (maior JC-1) e Resistência da cromatina (CI). Letras diferentes representam diferença estatística (^{a,b}).

6.2 PIVE

Após a formação dos grupos experimentais, estes foram testados na FIV. Das 9 manipulações de PIVE realizadas, 7 foram validadas (taxa de blastocistos do touro controle acima de 15%) e analisadas. Ao analisar, os dados de taxa de clivagem, os mesmos foram paramétricos, portanto, foram utilizados as médias e erro padrão da média para apresentação dos resultados. Já as taxas de blastocisto e desenvolvimento embrionário não foram paramétricos, sendo utilizados valores da mediana e dos quartis superiores e inferiores.

Ao avaliar a taxa de clivagem não houve efeito de interação entre os grupos, houve efeito significativo apenas entre os grupos de **Alto** e **Baixo Perfil** espermático, sendo o grupo de **Alto Perfil** o que apresentou maior taxa de clivagem comparado ao grupo **Baixo Perfil** ($69,83 \pm 1,2$ e $64,14 \pm 1,78$, respectivamente, $p=0,0096$), conforme apresentado na figura 7.

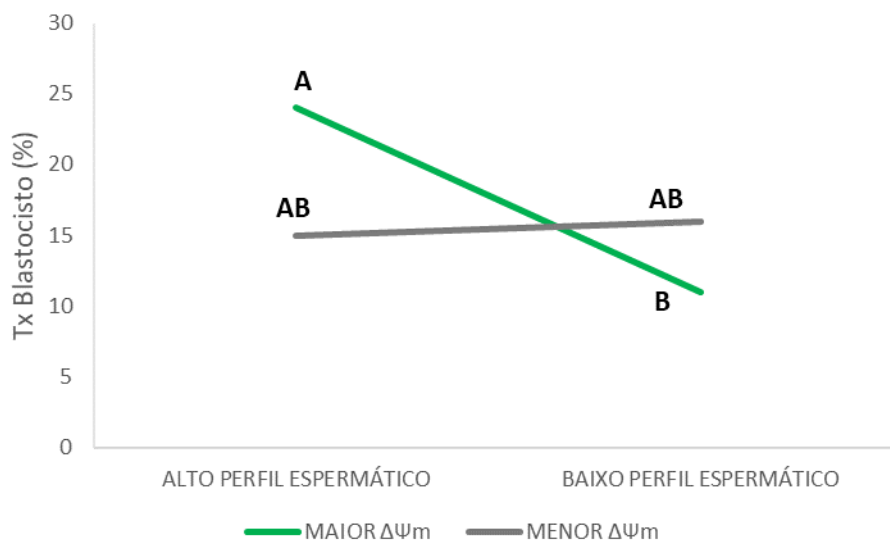
Figura 7: Taxa de clivagem (%) entre os grupos de **Alto** e **Baixo Perfil** espermático.



Letras diferentes indicam diferença estatística significativa, $p=0,0096$.

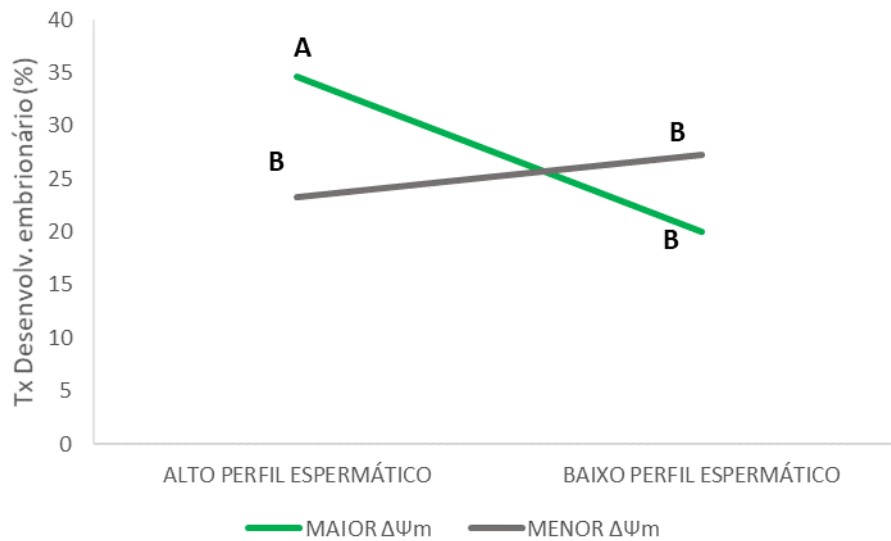
Para as outras taxas avaliadas na PIVE, houve efeito de interação entre os grupos de **Perfil** espermático e os grupos de $\Delta\Psi_m$ para as taxas de blastocisto e desenvolvimento embrionário, $p=0,0046$ e $p=0,0034$, respectivamente (figura 8 e 9). Sendo o grupo de **Alto Perfil** associado com **Maior $\Delta\Psi_m$** , o que apresentou maiores taxas de produção de blastocisto e desenvolvimento embrionário (24% e 34,62%, respectivamente). No entanto, o grupo **Baixo Perfil** associado com **Maior $\Delta\Psi_m$** foi o que apresentou as menores taxas de blastocisto e desenvolvimento embrionário (11% e 20%, respectivamente).

Figura 8: Efeito de interação entre os grupos **Alto** e **Baixo Perfil** espermático com **Maior** e **Menor $\Delta\Psi_m$** para a taxa de blastócitos em porcentagem.



Letras diferentes indicam diferença estatística significativa, $p=0,0046$.

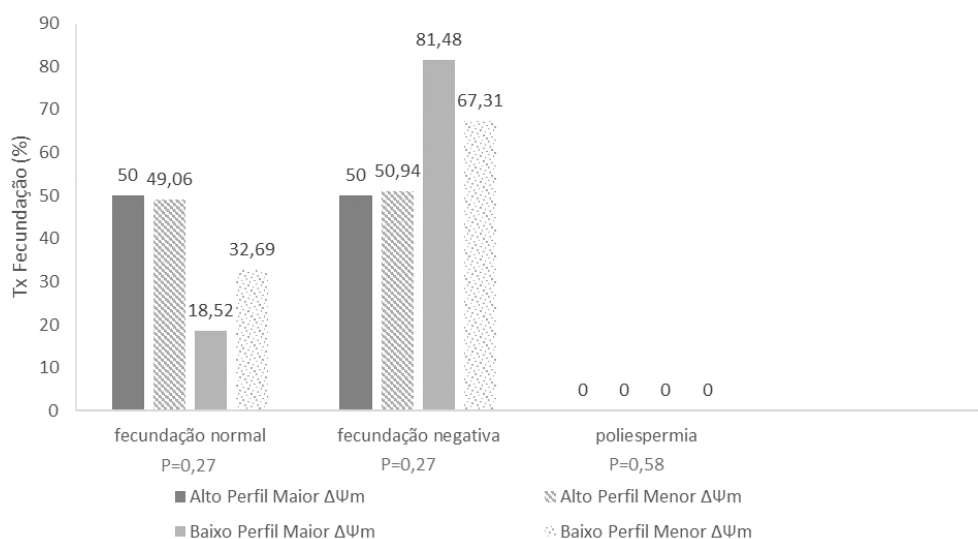
Figura 9: Efeito de interação entre os grupos **Alto** e **Baixo Perfil** espermático com **Maior** e **Menor $\Delta\Psi_m$** para a taxa de desenvolvimento embrionário em porcentagem.



Letras diferentes indicam diferença estatística significativa, $p=0,0034$.

Ao avaliar a taxa de fecundação, por meio da contagem de prónucleos, não houve diferença significativa para as variáveis fecundação normal, fecundação negativa e poliespermia entre os grupos testados. Não houve efeito de interação entre os grupos, nem diferença significativa dentre os grupos de **Alto** e **Baixo Perfil** espermático e os grupos de **Maior** e **Menor $\Delta\Psi_m$** avaliados separadamente (apêndice 2, $p>0,05$), vale ressaltar que também não foi observada poliespermia em nenhum dos grupos (figura 10).

Figura 10: Valor das medianas de cada grupo para taxa de fecundação normal (2 Pronúcleos), fecundação negativa (1 Pronúcleo) e poliespermia (+2 Pronúcleos) entre os grupos **Alto** e **Baixo Perfil** espermático com **Maior** e **Menor $\Delta\Psi_m$** .



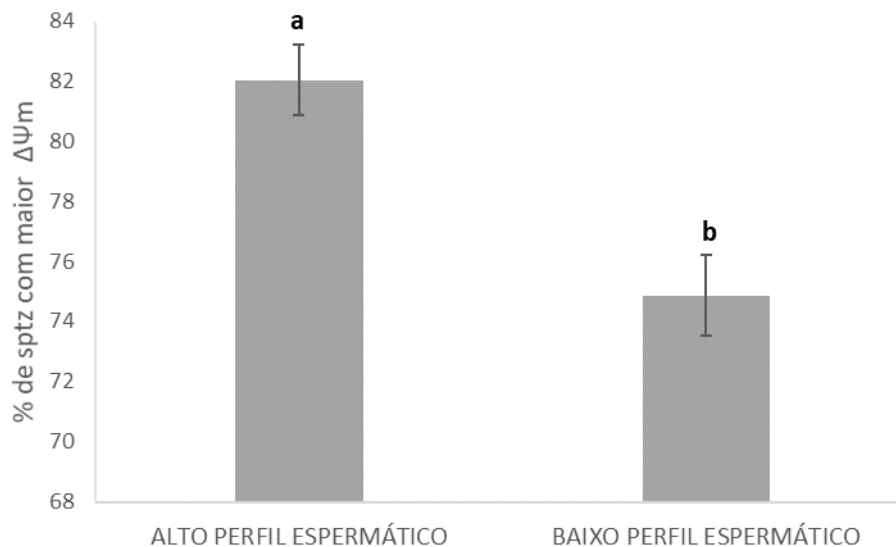
6.3 AVALIAÇÕES ESPERMÁTICAS E MEIO FIV

6.3.1 Citometria de Fluxo

Na análise de citometria de fluxo feitas no momento da FIV, todas as variáveis foram paramétricas, portanto, foram utilizadas as médias e erro padrão da média para apresentação dos resultados. Não houve efeito de interação entre os parâmetros avaliados por citometria de fluxo e os grupos testados na PIVE. Ao avaliar os parâmetros entre grupos de **Alto** e **Baixo Perfil** espermático, foi possível observar diferenças significativas para os atributos de $\Delta\Psi_m$ (figura 11), AI (% de espermatozoides com acrossomo íntegro – figura 12) e MPI (% de espermatozoides com membrana plasmática íntegra - figura 13).

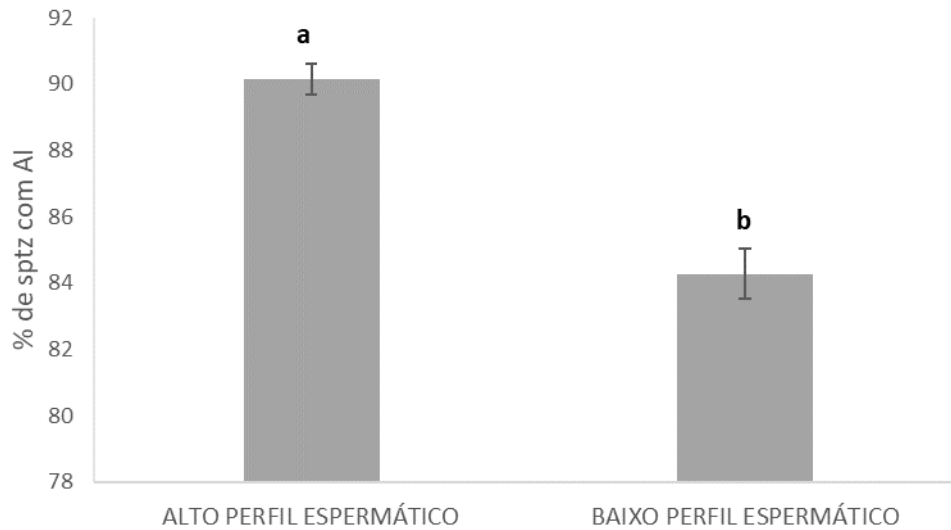
Os espermatozoides do grupo de **Alto Perfil** quando comparado ao **Baixo Perfil**, apresentaram maior porcentagem de células com maior $\Delta\Psi_m$ ($82,04 \pm 1,17\%$ e $74,86 \pm 1,34\%$, respectivamente, $p < .0001$) e AI ($90,15 \pm 0,47\%$ e $84,28 \pm 0,75\%$, respectivamente, $p < .0001$).

Figura 11: Porcentagem de espermatozoides com maior potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) no momento da FIV entre os grupos de **Alto** e **Baixo Perfil** espermático.



Letras diferentes indicam diferença estatística significativa, $p < .0001$.

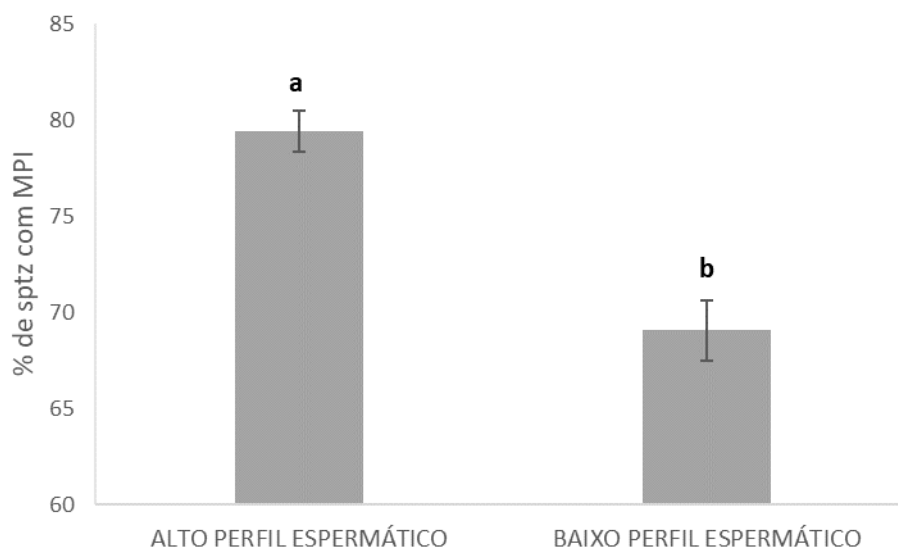
Figura 12: Porcentagem de espermatozoides com acrossomo íntegro (AI) no momento da FIV entre os grupos de **Alto** e **Baixo Perfil** espermático.



Letras diferentes indicam diferença estatística significativa, $p < .0001$.

Uma vez que os grupos de **Alto** e **Baixo Perfil** foram ranqueados previamente com base nos níveis de MPI, vale ressaltar que os grupos se mantiveram no momento da FIV, ou seja, espermatozoides presentes no grupo de **Alto Perfil** apresentaram maior taxa de MPI, comparado ao grupo de **Baixo Perfil** ($79,4 \pm 1,06\%$ e $69,05 \pm 1,58\%$, respectivamente, $p < .0001$ - figura 13).

Figura 13: Porcentagem de espermatozoides com membrana plasmática íntegra (MPI) no momento da FIV entre os grupos de **Alto** e **Baixo Perfil** espermático.

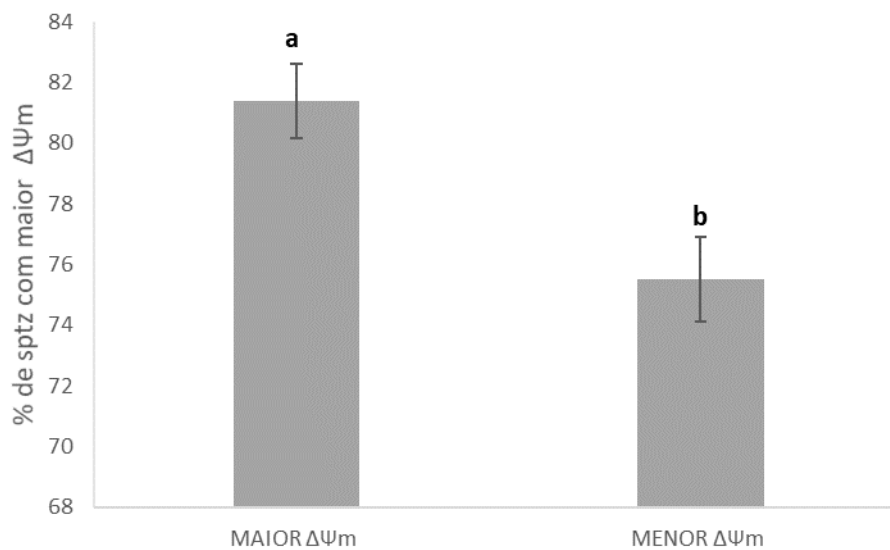


Letras diferentes indicam diferença estatística significativa, $p < .0001$.

Para os demais atributos, relacionados à integridade de cromatina (CI) e aos atributos relacionados ao estresse oxidativo espermáticos (CR+, DHE+, Mito+) não houve diferença significativa entre **Alto** e **Baixo Perfil**, nas condições avaliadas neste trabalho ($p > 0,05$), Apêndice 2.

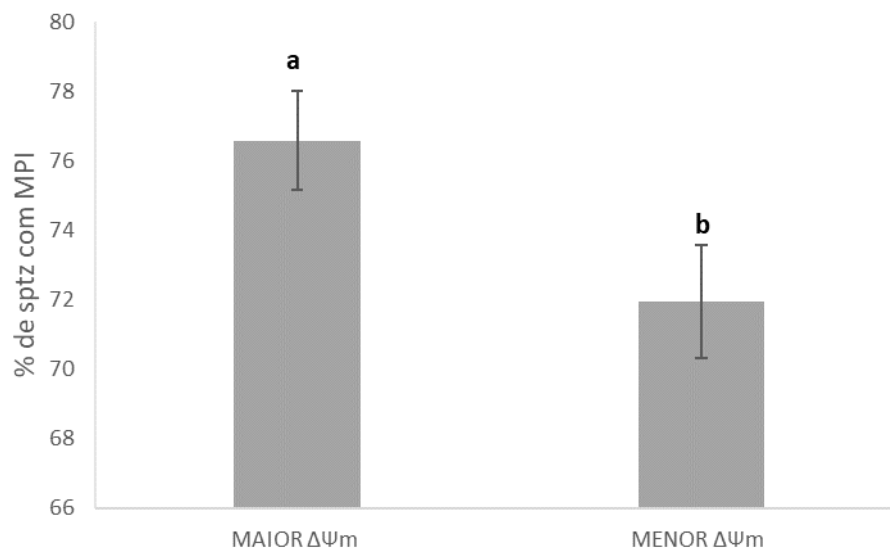
Ao avaliar os parâmetros de citometria no momento da FIV entre grupos **Maior** e **Menor $\Delta\Psi_m$** foi possível observar diferenças significativas para os atributos de maior $\Delta\Psi_m$ e MPI ($p = 0,0003$ e $p = 0,009$, respectivamente), Figura 14 e 15.

Figura 14: Porcentagem de espermatozoides com maior de potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) no momento da FIV entre os grupos de **Maior** e **Menor $\Delta\Psi_m$** ,



Letras diferentes indicam diferença estatística significativa, $p = 0,0003$.

Figura 15: Porcentagem de espermatozoides com membrana plasmática íntegra (MPI) no momento da FIV entre os grupos de **Maior** e **Menor $\Delta\Psi_m$** .



Letras diferentes indicam diferença estatística significativa, $p = 0,009$.

Novamente, foi possível observar que os grupos se mantiveram da mesma forma pela qual foram ranqueados previamente, ou seja, o grupo de **Maior $\Delta\Psi_m$** apresentou maiores taxas de $\Delta\Psi_m$ no momento da FIV, quando comparado ao grupo **Menor $\Delta\Psi_m$** ($81,38 \pm 1,21\%$ e $75,5 \pm 1,39\%$, respectivamente, $p=0,0003$). Essas análises corroboram à divisão inicial dos grupos.

Vale ressaltar que o grupo de **Maior $\Delta\Psi_m$** apresentou maior porcentagem de espermatozoides com MPI quando comparado ao grupo de **Menor $\Delta\Psi_m$** ($76,58 \pm 1,42\%$ e $71,94 \pm 1,64\%$, respectivamente, $p=0,009$).

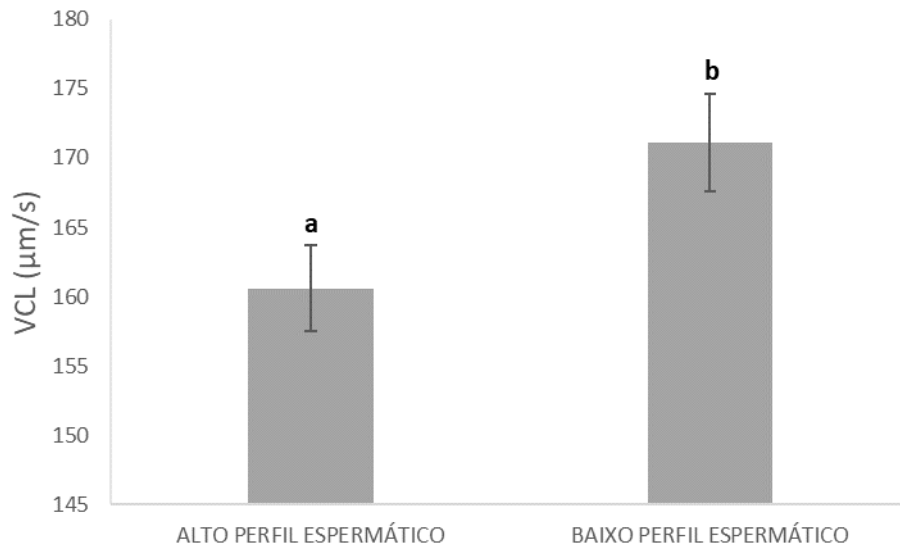
Para os demais atributos, relacionados à integridade de cromatina (CI) e atributos relacionados ao estresse oxidativo espermáticos (CR+, DHE+, Mito+) não houve diferença significativa entre os grupos avaliados para os grupos de **Maior $\Delta\Psi_m$** e **Menor $\Delta\Psi_m$** ($p>0,05$), Apêndice 2. Porém, vale enfatizar que para o atributo de espermatozoides estressados e membrana plasmática íntegra (CR+PI-), foi observada uma tendência para diferença entre os grupos de **Maior** e **Menor $\Delta\Psi_m$**). O grupo de **Maior $\Delta\Psi_m$** apresentou maior porcentagem de células estressadas comparado ao grupo de **Menor $\Delta\Psi_m$** ($21,82 \pm 2,48$ e $16,34 \pm 2,23$, $p=0,07$).

6.3.2 CASA (Computer-assisted sperm analysis)

Ao avaliar a motilidade visual em microscopia óptica Pré e Pós Percoll® não foi possível observar diferenças significativas entre os grupos avaliados na PIVE, $p>0,05$, Apêndice 2.

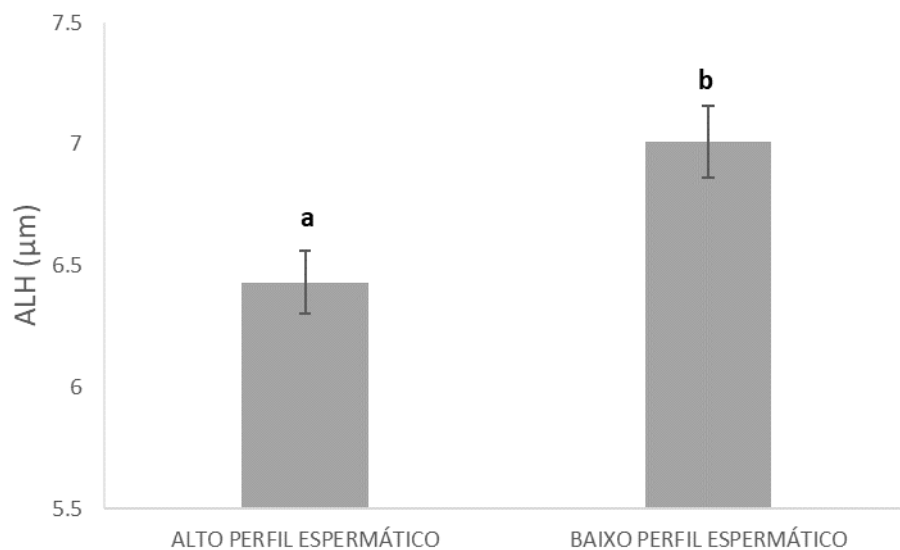
Os parâmetros de motilidade avaliados pelo sistema CASA não apresentaram efeito de interação entre os grupos testados na PIVE. Porém, ao avaliar os parâmetros do CASA entre grupos de **Alto** e **Baixo Perfil** espermático, foi possível observar diferenças significativas para VCL ($\mu\text{m/s}$) e ALH (μm). A velocidade curvilínea (VCL) foi maior no grupo de **Baixo Perfil** comparado ao grupo de **Alto Perfil** ($171,12 \pm 3,5 \mu\text{m/s}$ e $160,6 \pm 3,1 \mu\text{m/s}$, respectivamente, $p=0,02$) e o mesmo padrão foi observado para a amplitude de deslocamento lateral de cabeça (ALH), em que o grupo de **Baixo Perfil** apresentou valores maiores comparado ao grupo de **Alto Perfil** ($7,01 \pm 0,15$ e $6,43 \pm 0,13$, respectivamente, $p=0,006$), conforme demonstrado nas figuras 16 e 17.

Figura 16: Velocidade curvilínea ($\mu\text{m/s}$) no momento da FIV entre os grupos de **Alto** e **Baixo Perfil** espermático.



Letras diferentes indicam diferença estatística significativa, $p=0,02$.

Figura 17: Amplitude de deslocamento lateral de cabeça (μm) no momento da FIV entre os grupos de **Alto** e **Baixo Perfil** espermático.



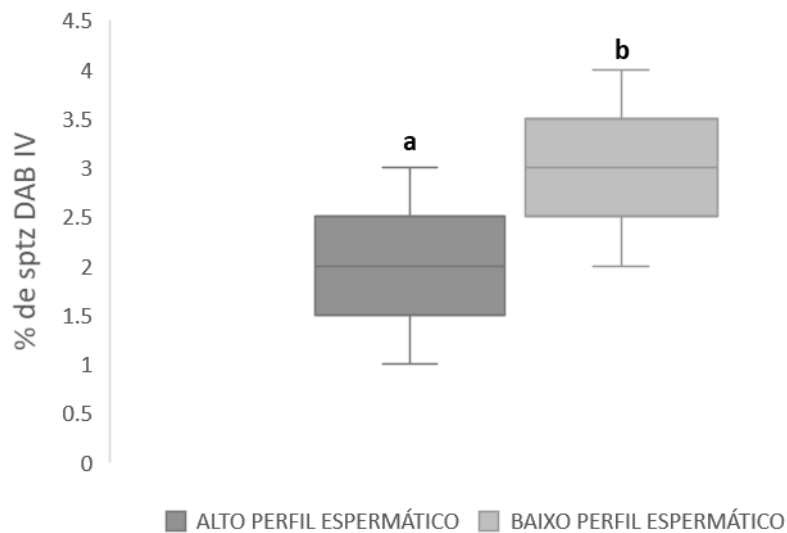
Letras diferentes indicam diferença estatística significativa, $p=0,006$.

Vale destacar que para o parâmetro de motilidade total, houve tendência para diferença entre os grupos de **Maior** e **Menor $\Delta\Psi\text{m}$** ($p= 0,05$). Sendo o grupo de **Menor $\Delta\Psi\text{m}$** o que apresentou maior motilidade total comparado ao grupo **Maior $\Delta\Psi\text{m}$** ($59,97 \pm 2,23$ e $54,19 \pm 1,88$, respectivamente).

6.3.3 DAB

Ao avaliar a atividade mitocondrial pelo ensaio citotóxico baseado na oxidação de DAB pelo citocromo C, não houve efeito de interação entre os grupos. Foi possível verificar diferença significativa entre os grupos de **Alto** e **Baixo Perfil** espermático para a classificação DAB IV, sendo assim, o grupo de **Baixo Perfil** apresentou maior porcentagem de espermatozoides sem atividade mitocondrial (3 e 2%, respectivamente, $p=0,0205$), apresentado em formato de gráfico *box plot*, por ser uma variável não paramétrica (figura 18).

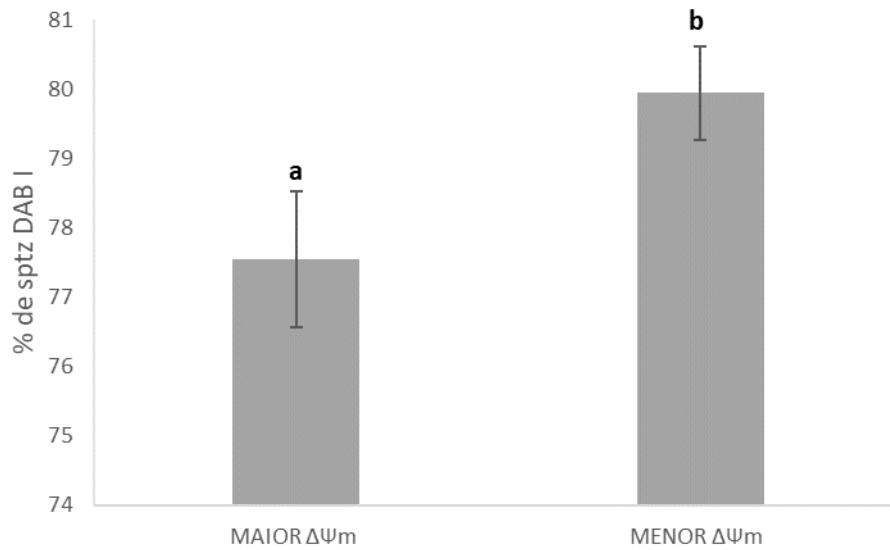
Figura 18: *Box plot*, dos valores da mediana, quartil superior, inferior, máximo e mínimo, com percentual de espermatozoides classificados como DAB IV (sem atividade mitocondrial) entre os grupos de **Alto** e **Baixo Perfil** espermático.



Letras diferentes indicam diferença estatística significativa, $p=0,0205$.

Vale ressaltar que ao avaliar os grupos de **Maior** e **Menor $\Delta\Psi_m$** , foi possível verificar uma tendência para diferença significativa entre os grupos para a classificação DAB I, sendo o grupo **Menor $\Delta\Psi_m$** o que apresentou maior porcentagem de espermatozoides com alta atividade mitocondrial comparado ao grupo de **Maior $\Delta\Psi_m$** ($79,94 \pm 0,67$ e $77,54 \pm 0,98$, respectivamente, $p=0,05$ - figura 19).

Figura 19: Percentual de espermatozoides classificados como DAB I (alta atividade mitocondrial) entre os grupos de **Maior** e **Menor $\Delta\Psi_m$** .



Letras diferentes indicam diferença estatística significativa, $p=0,05$.

6.3.4 LC-MS/MS

Ao avaliar os dados do metabolismo energético nos espermatozoides utilizados na FIV e a peroxidação lipídica no meio de FIV pela técnica de Cromatografia Líquida associada a espectrometria de massas, não foi possível detectar nenhum dos compostos avaliados. A dosagem de ATP, ADP, NADH e FADH₂ nas amostras espermáticas não pode ser realizada, pois acredita-se que já estavam degradadas ou em quantidades inferiores ao limite de detecção da técnica. O mesmo ocorreu para o composto 4-HNE nos meios de FIV.

Previamente à análise das amostras, foram feitos testes com os compostos para que fosse estabelecido um limite mínimo de detecção da técnica (quadro 4). Acredita-se que o método não foi sensível o suficiente para a detecção dos compostos, por conta da instabilidade destes compostos neste tipo de amostra. Todas as reações foram realizadas com uma amostra controle para cada composto, em que uma quantidade pré-estabelecida do composto foi adicionada a amostra antes de ser submetida a leitura no aparelho, e depois da leitura foi possível detectar os compostos nas amostras controle.

Quadro 4: Limites de detecção do método analítico LC-MS/MS para os compostos avaliados em espermatozoides (ATP, ADP, NADH e FADH₂) e em meio FIV (4-HNE).

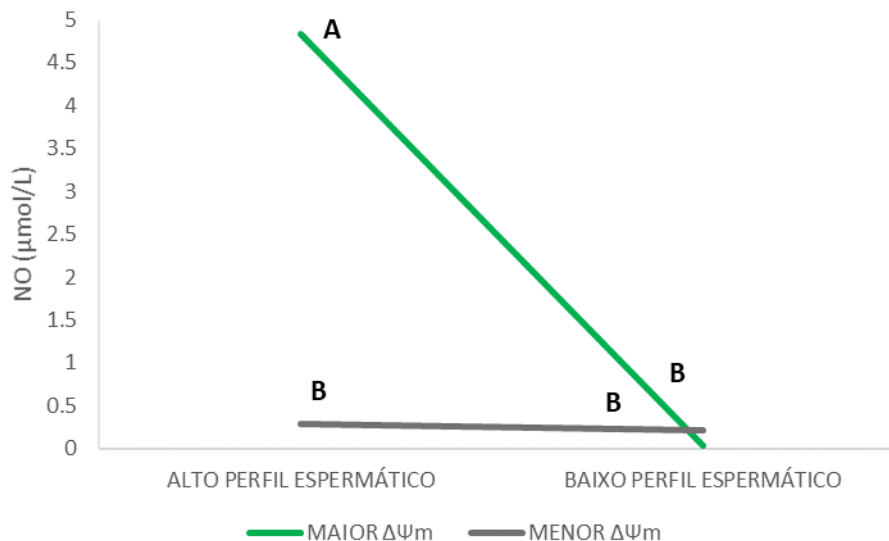
	ADP		ATP		NADH		FADH ₂		4-HNE	
	μg/mL	μM	μg/mL	μM	μg/mL	μM	μg/mL	μM	μg/mL	μM
Limite de Detecção do Método (LDM)	100	234	50	99	1,5	2,26	1	1,27	0,49	3,14
Limite de Quantificação do Método (LQM)	333	781	166	327	5	7,52	3,33	4,24	1,63	10,4

6.3.5 Óxido nítrico (NO[·])

Ao avaliar NO[·] pelo analisador amperométrico de radicais livres foi possível a detecção desta espécie reativa de nitrogênio (ERN) em amostras do meio de FIV, porém não foi detectada a presença de NO[·] nas amostras de sêmen dos touros avaliados neste trabalho.

Houve efeito de interação entre os grupos experimentais para detecção de NO[·] no meio de FIV ($p=0,03$), o grupo de **Alto Perfil** associado ao **Maior $\Delta\Psi_m$** apresentou maior concentração de NO[·] (4,84 μmol/L - figura 20).

Figura 20: Efeito de interação entre os grupos para a detecção de óxido nítrico (μmol/L) em amostras de meio FIV.



Letras diferentes indicam diferença estatística significativa, $p=0,03$.

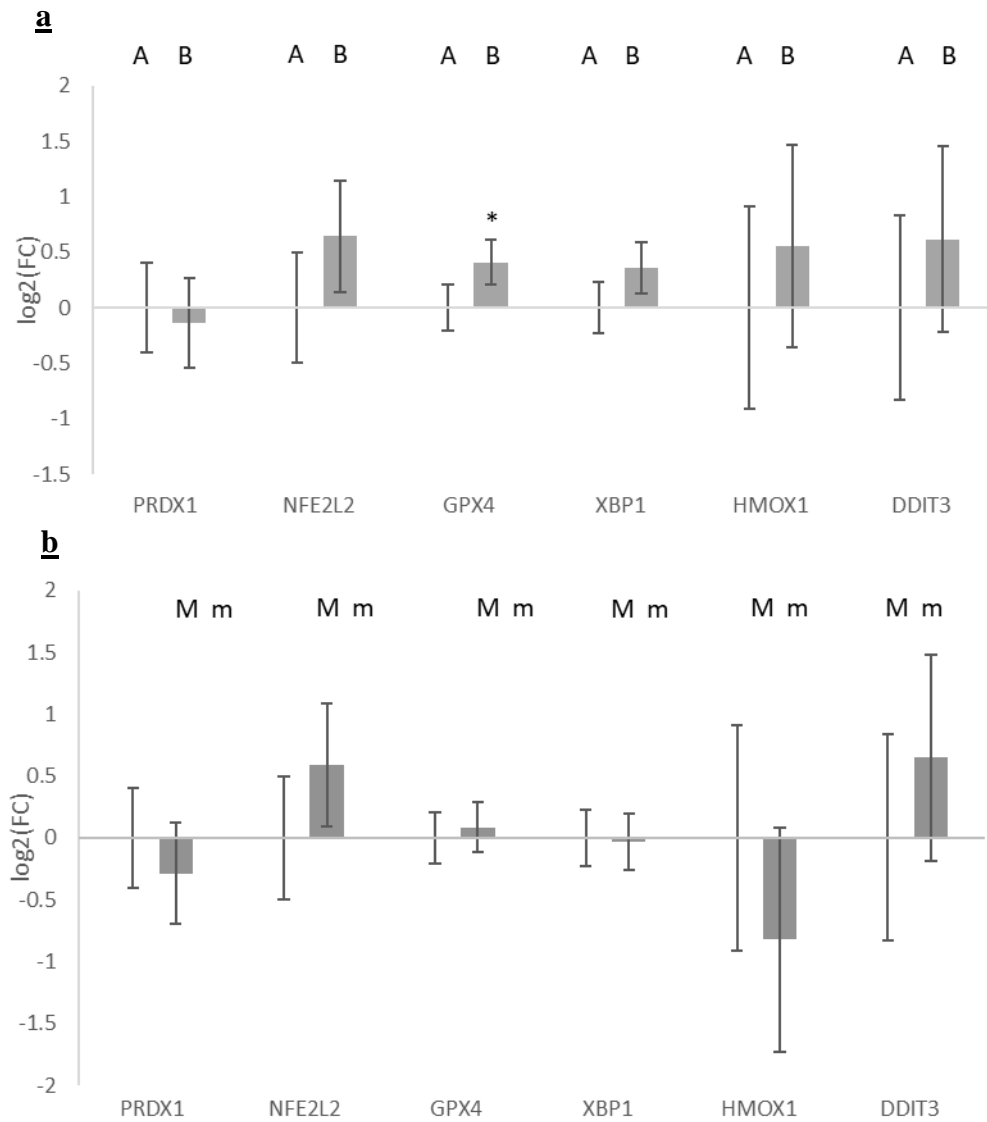
6.4 EXPRESSÃO GÊNICA EMBRIONÁRIA

Ao avaliar a expressão gênica relativa nos embriões de 8 células, por qPCR, não houve efeito de interação entre os grupos para a expressão dos genes alvo PRDX1, NFE2L2, XBP1, HMOX1 e DDIT3, conforme mostrado na tabela 6. Houve diferença na expressão gênica apenas do gene alvo GPx4 (glutathiona peroxidase 4) entre os grupos de **Alto** e **Baixo Perfil** espermático ($p=0,05$), sendo mais expresso no grupo de **Baixo Perfil** (figura 21a). Não houve diferença de expressão dos genes alvo entre os grupos de **Maior** e **Menor $\Delta\Psi_m$** (figura 21b).

Tabela 6: Valores de p para os diferentes efeitos analisados para expressão de PRDX1, NFE2L2, GPx4, XBP1, HMOX1 e DDIT3 em embriões 8 células.

Efeitos	PDX1	NFE2L2	GPX4	XBP1	HMOX1	DDIT3
Grupo Alto versus Baixo Perfil Espermático	0,71	0,2	0,05	0,12	0,54	0,46
Grupo Maior versus Menor $\Delta\Psi_m$	0,48	0,24	0,67	0,89	0,37	0,44
Maior $\Delta\Psi_m$: Alto versus Baixo Perfil Espermático	0,48	0,92	0,14	0,56	0,22	0,9
Menor $\Delta\Psi_m$: Alto versus Baixo Perfil Espermático	0,23	0,09	0,2	0,1	0,71	0,25
Alto Perfil : Maior e Menor $\Delta\Psi_m$	0,64	0,98	0,69	0,535	0,87	0,92
Baixo Perfil : Maior e Menor $\Delta\Psi_m$	0,15	0,1	0,84	0,66	0,16	0,23

Figura 21: Quantificação relativa dos genes PRDX1, NFE2L2, GPx4, XBP1, HMOX1 e DDIT3. No gráfico **a**: Comparação entre grupo **Alto (A)** e **Baixo Perfil Espermático (B)**. No gráfico **b**: Comparação entre **Maior (M)** e **Menor (m)** $\Delta\Psi_m$. Valores expressos em \log_2 (FC).



Legenda: FC = Fold change, A= Alto Perfil, B= Baixo Perfil, M= Maior $\Delta\Psi_m$, m= Menor $\Delta\Psi_m$, * $p=0,05$.

7 DISCUSSÃO

Os atributos espermáticos analisados neste estudo vêm sendo amplamente estudados e utilizados para prever o potencial fecundante de espermatozoides bovinos utilizados na FIV (TANGHE et al., 2002; TARTAGLIONE; RITTA, 2004; ALOMAR et al., 2006; CASTRO et al., 2016a; SIQUEIRA et al., 2018). Oliveira et al. (2014) afirmaram que a avaliação de múltiplos parâmetros espermáticos, em conjunto, é melhor para a avaliação de fertilidade ao invés da avaliação de um parâmetro individual. O que corrobora, uma vez que os resultados do presente estudo demonstram que os atributos espermáticos para integridade de membrana plasmática (MPI), integridade acrossomal (AI), maior potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) e integridade de cromatina (CI) estão correlacionados. Acredita-se que estes sejam os atributos espermáticos mais importantes relacionados à qualidade espermática na avaliação por citometria de fluxo, em concordância com Hossain et al., (2011).

A avaliação da qualidade espermática relacionada com a fertilidade *in vitro* consiste em uma avaliação multifatorial e não pode ser predita avaliando apenas um atributo espermático isolado (GLIOZZI et al., 2017; MORRELL et al., 2017). Os atributos espermáticos avaliados neste trabalho são os mais relacionados com a capacidade do espermatozoide de chegar ao oócito e fecundá-lo, dessa maneira ao realizar a separação dos grupos foi feita uma análise de correlação para avaliar qual atributo estaria mais relacionado aos outros e, portanto, o que daria maior segurança para separar os grupos de **Alto e Baixo Perfil** espermático. O atributo integridade de membrana plasmática foi o escolhido e a partir deste, foram separados os grupos experimentais. Com os resultados deste estudo, foi possível observar que há uma influência dos atributos espermáticos com a produção *in vitro* de embriões, similar ao observado por Siqueira et al. (2018), no qual os atributos que mais influenciaram na PIVE foram a integridade de acrossomo, $\Delta\Psi_m$ e motilidade Pré Percoll®.

De acordo com os resultados encontrados neste estudo acredita-se que espermatozoides considerados de **Alto Perfil**, ou seja, espermatozoides que apresentam maiores índices para MPI e para outros atributos correlacionados positivamente com MPI (AI, $\Delta\Psi_m$ e CI), são de melhor qualidade. Neste grupo também foram observados maiores índices de $\Delta\Psi_m$ e AI no momento da FIV e maiores chances de fecundar os oócitos (maior taxa de clivagem), semelhante ao encontrado por Marchetti et al. (2012), que correlacionou positivamente o maior potencial de membrana mitocondrial com taxa de fecundação em humanos.

Trabalhos anteriores de Januskauskas et al. (2001) e Anzar et al. (2002) observaram que espermatozoides com danos na membrana plasmática apresentavam correlação negativa com a taxa de fecundação, o mesmo foi observado com o presente resultado, no qual o grupo de **Alto Perfil** espermático apresentou maiores taxas de clivagem. Da mesma forma, no subgrupo de **Maior $\Delta\Psi_m$** também apresentaram maiores índices de MPI no momento da FIV. Demonstrando associação entre esses parâmetros de qualidade, Mocé e Graham (2008), confirmaram que diferentes variáveis espermáticas estão altamente correlacionadas umas com as outras.

Na avaliação do atributo de integridade de cromatina (CI), não foi observado nenhum efeito sobre os grupos no momento da FIV. Diferente do que vem sendo observado em espermatozoides humanos, os quais apresentam maior influência do atributo de integridade de DNA com desenvolvimento embrionário em técnicas de reprodução assistida (WDOWIAK; BAKALCZUK; BAKALCZUK, 2015), em bovinos não tem sido observada relações entre a estabilidade de cromatina e a fertilidade *in vitro* (CASTRO et al., 2018). Simões et al. (2013), observaram que em condições de maior susceptibilidade de estresse oxidativo a integridade do DNA espermático pode ser comprometida, reduzindo a qualidade embrionária mas sem comprometer as taxa de blastocistos produzidos *in vitro*. Acredita-se que esse atributo não deve ser tão importante para a fertilidade *in vitro* de touros, pois os espermatozoides desta espécie são mais resistentes ao dano de cromatina (VILLANI et al., 2010).

Com relação aos índices da PIVE, no grupo de **Alto Perfil** espermático, o **Maior $\Delta\Psi_m$** foi benéfico para a taxa de blastocisto e desenvolvimento embrionário, já o grupo de **Baixo Perfil** associado ao **Maior $\Delta\Psi_m$** , foi prejudicial para as taxas, representando as piores taxas comparado aos outros subgrupos. Com esses resultados é possível afirmar que houve uma influência do perfil espermático no efeito do atributo $\Delta\Psi_m$. Ao contrário da ideia inicial descrita na hipótese deste estudo, em que espermatozoides com **Alto Perfil** associados ao **Maior $\Delta\Psi_m$** seriam deletérios para a produção de blastocistos, por condicionarem um ambiente mais oxidativo e de maior atividade metabólica, essa combinação foi a que apresentou maiores taxa de desenvolvimento embrionário e taxa de blastocisto produzidos *in vitro*. O mesmo aconteceu com o grupo de **Baixo Perfil** associado com **Maior $\Delta\Psi_m$** , em que na hipótese deste trabalho acreditava-se ser o grupo que produziria mais blastocistos por condicionarem um ambiente menos ativo metabolicamente e menos oxidativo, no entanto foi a combinação com as piores taxas de desenvolvimento embrionário e taxa de blastocisto produzidos *in vitro*.

Com isso, pode-se afirmar que o **Perfil** espermático influencia mais na PIVE do que os níveis de $\Delta\Psi_m$. A influência deste atributo, $\Delta\Psi_m$ maior ou menor, depende dos níveis dos demais atributos espermáticos, comprovando que são relações complexas e interligadas. Diferente do que foi observado por Kasai et al. (2002), em um estudo de FIV em humanos, os níveis de $\Delta\Psi_m$ foram decisivos para o potencial fecundante, ou seja, espermatozoides com maior $\Delta\Psi_m$ apresentaram maior taxa de fecundação, porém neste estudo não foi avaliada a integridade de membrana desses espermatozoides e nem a comparação da taxa de blastocisto.

Siqueira et al. (2018), observaram, com o efeito isolado para $\Delta\Psi_m$, que os menores valores de $\Delta\Psi_m$ apresentaram melhores taxas de desenvolvimento embrionário e taxa de blastocistos produzidos. Acreditou-se que esses espermatozoides condicionavam um ambiente menos ativo metabolicamente e menos oxidativo, por isso uma melhor produção de embriões. Diferente do que foi observado no presente estudo em que não houve diferença significativa para as taxas de embriões PIV entre os grupos de **Maior** e **Menor** $\Delta\Psi_m$, como efeito isolado, o efeito observado no presente estudo foi de interação entre **Perfil** espermático e níveis de $\Delta\Psi_m$. O que pode justificar essa diferença é que no presente estudo foram utilizados touros diferentes, com níveis diferentes de atributos espermáticos e $\Delta\Psi_m$. Valores mais baixos foram encontrados nos touros do presente estudo e talvez por isso não condicionaram um ambiente oxidativo, como era suposto por Siqueira et al. (2018). Além disso, a dose inseminante usada no presente estudo foi menor, 100 mil espermatozoides móveis/gota, comparado com o trabalho de Siqueira et al. (2018), em que usaram 125 mil espermatozoides móveis/gota, essa diferença de espermatozoides a mais pode ter exacerbado ainda mais os efeitos dos altos níveis de $\Delta\Psi_m$ no trabalho anterior. Analisando essas diferenças, pode-se dizer que o Perfil espermático e o $\Delta\Psi_m$ avaliados no presente estudo, não chegaram a um nível tão elevado para que fosse deletério para as taxas na PIVE.

Com relação a contagem de pronúcleos para avaliação da taxa de fecundação *in vitro* e avaliação de poliespermia, apesar de não terem sido observadas diferenças significativas, observou-se diferenças numéricas nas taxas de fecundação normal e negativa entre os grupos de **Alto** e **Baixo Perfil** espermático. Sendo assim, os grupos de Alto Perfil parecem apresentar valores superiores para taxas de fecundação normal comparados aos grupos de Baixo Perfil (50% e 49% *versus* 19% e 33%). Almeida (2018), observou uma maior taxa de fecundação positiva normal (presença de 2 pronúcleos) entre grupos de alta fertilidade *in vitro* comparado com baixa fertilidade. Os grupos de Baixo Perfil apresentaram maiores taxas de fecundação negativa comparados aos grupos de Alto Perfil (81% e 67% *versus* 50% e 51%), sendo compatíveis com os resultados de taxa de clivagem encontrados.

Porém, diferente do que foi observado por Almeida (2018), em que o grupo de baixa fertilidade (menor taxa de blastocistos produzidos *in vitro*) apresentou maior taxa de poliespermia quando comparado ao grupo de alta fertilidade, no presente estudo não foi observado poliespermia em nenhum grupo. A ocorrência de poliespermia está correlacionada com a concentração espermática utilizada no momento da FIV (DEMYDA-PEYRÁS et al., 2015), condições *in vitro* inadequadas como o excesso de concentração de espermatozoides, de agentes capacitores no meio FIV, alteração de pH e temperatura inadequados (WANG; DAY; WU, 2003) e também pode ser estar ligada a característica individual de cada touro (ALOMAR et al., 2008). Acredita-se que não foi encontrada poliespermia nos grupos experimentais deste trabalho, pois a concentração espermática foi padronizada e ajustada ($25 \times 10^6/\text{mL}$) para todos os touros no momento da FIV, além do mais, os componentes do meio FIV estavam em concentrações equilibradas (para que a fecundação ocorresse, mas sem poliespermia) e por não ter sido uma característica presente nos touros avaliados.

Ao avaliar a correlação dos parâmetros de motilidade visual por microscopia óptica com os parâmetros de citometria na separação inicial dos grupos, não foram observadas correlações significativas, diferente do apresentado por Siqueira et al. (2018). Esses autores observaram correlação entre motilidade Pré e Pós Percoll® com os atributos avaliados por citometria, apesar de serem observações com fraca associação ($Rho < 0,3$). Além disso, também diferente de Siqueira et al. (2018), que observaram que o grupo com menor motilidade Pré Percoll® apresentou maior taxas de desenvolvimento embrionário e de blastocisto, não foram observadas diferenças para a motilidade visual por microscopia óptica entre os grupos avaliados neste estudo. Acredita-se que esse método de avaliação de motilidade seja subjetivo e não permite avaliação de diferentes padrões de cinética quando comparado a método computadorizado para a avaliação de motilidade (CASA) (KATHIRAVAN et al., 2011). Por esse motivo, a utilização de técnicas mais precisas para avaliação dos atributos espermáticos devem ser consideradas sempre que possível.

No presente estudo também foi utilizado o método CASA para avaliar os parâmetros de motilidade, e foram observadas diferenças estatísticas para os parâmetros de VCL e ALH, e tendência para a diferença na motilidade total. No trabalho de Bicudo (2018), foram observadas diferenças em diversos parâmetros de motilidade avaliados pelo sistema CASA dentre os grupos de Alta e Baixa produção de blastocistos *in vitro* e taxa de clivagem, inclusive para os parâmetros VCL e ALH. Bicudo (2018) observou valores mais altos de VCL e ALH associados com os grupos de Alta taxa de clivagem e de blastocistos.

No presente estudo não foram observadas diferenças entre os diversos parâmetros de motilidade analisados, porém, surpreendentemente, os valores mais altos para ALH e VCL foram encontrados no grupo de **Baixo Perfil** espermático. Acredita-se que possa ter ocorrido essas diferenças como uma forma de compensar os espermatozoides presentes no grupo de **Baixo Perfil**, ou seja, um aumento nesses atributos de motilidade para compensar outros atributos espermáticos considerados de menor qualidade, a fim de manter esta função.

O parâmetro VCL representa a velocidade média do tempo ao longo da trajetória do espermatozoide para frente e lado a lado, velocidade curvilínea e ALH representa amplitude de deslocamento lateral de cabeça, parâmetros que já foram relacionados com a capacidade de penetração no oócito (VERSTEGEN; IGUER-OUADA; ONCLIN, 2002). Diversos autores já relataram que os parâmetros que caracterizam a hiperativação espermática em touros são VCL e ALH aumentados, associados a diminuição da LIN (linearidade). A hiperativação também já foi correlacionada positivamente com alta fertilidade (VERSTEGEN; IGUER-OUADA; ONCLIN, 2002; SHOJAEI et al., 2012). Porém, no presente estudo não houve diferença significativa para o parâmetro de LIN nos grupos avaliados.

Para a avaliação de motilidade total foi possível observar uma tendência no grupo de **Menor $\Delta\Psi_m$** , no qual apresentou valores superiores comparado ao grupo de **Maior $\Delta\Psi_m$** ($p=0,05$). Diferente do que diversos autores já relataram (KASAI et al., 2002; MARCHETTI, C. OBERT, G. DEFFOZEZ, A. FORMSTECHE, P. MARCHETTI, 2002; GALLON et al., 2006), que observaram correlação positiva entre espermatozoides humanos com **Maior $\Delta\Psi_m$** e motilidade, o contrário foi observado no presente estudo em que espermatozoides do grupo de **Menor $\Delta\Psi_m$** apresentaram valores superiores de motilidade total comparados ao grupo de **Maior $\Delta\Psi_m$** . Essa diferença comparada com os dados da literatura pode ser explicada por divergências nos valores para os índices de baixo $\Delta\Psi_m$, sendo mais baixos na literatura quando comparados com o grupo de **Menor $\Delta\Psi_m$** no presente trabalho. Isso ocorre, pois touros que são utilizados em centrais de inseminação e utilizados na PIVE passam por um criterioso processo de seleção espermática para fazerem parte do catálogo de animais utilizados em biotecnica da reprodução, por isso os valores encontrados de $\Delta\Psi_m$ foram mais altos no momento da separação dos grupos, diferente do que ocorre em humanos por exemplo, em que as taxas são mais baixas.

Na presença de um menor $\Delta\Psi_m$, teoricamente associado com uma menor produção de ATP, a motilidade esperada seria menor se a produção de energia dependesse apenas da fosforilação oxidativa. Acredita-se que a via glicolítica possa estar mais ativa nesse grupo para compensar o menor $\Delta\Psi_m$, e assim aumentar a motilidade. Porém, no presente estudo a

via glicolítica não foi avaliada e a presença de ATP não foi detectável nos touros avaliados, por esse motivo mais estudos devem ser realizados para entender a relação do $\Delta\Psi_m$ com as vias de produção de energia para a motilidade em bovinos. Em estudos de Losano et al., (2017b, 2017a) em ovinos e bovinos, foram observados que a via glicolítica é tão importante quanto a fosforilação oxidativa para os espermatozoides dessas espécies, sendo a via glicolítica capaz de manter a motilidade apesar de um baixo $\Delta\Psi_m$, em condições de desacoplamento mitocondrial.

A via metabólica preferencial pela qual o espermatozoide vai produzir energia para a motilidade, seja por via glicolítica ou por fosforilação oxidativa na mitocôndria, pode variar conforme a espécie estudada, estágio de maturação espermática e diversos outros fatores biológicos associados (AMARAL et al., 2013). Apesar de existirem estudos que se contradizem sobre qual via é mais efetiva para produção de energia e motilidade espermática, existe um consenso de que essas vias não funcionam de forma independente, ou seja, os espermatozoides podem seguir uma via ou outra e ainda, utilizar ambas para a produção de energia, de acordo com a disponibilidade do substrato e das condições ambientais em que essa célula se encontra (RUIZ-PESINI et al., 2007; STOREY, 2008). Sendo assim, podem ter disponíveis as duas vias para exercer sua principal função, motilidade para alcançar o ócito no trato reprodutivo da fêmea. Portanto, a motilidade espermática depende dos substratos disponíveis para a produção de energia e também da via metabólica que está mais ativa (BARBAGALLO et al., 2020).

A detecção dos compostos associados a cadeia respiratória, como ATP, ADP, NADH e FADH₂, não foi possível com a técnica de cromatografia líquida associada ao espectrômetro de massas (LC-MS/MS) nas condições avaliadas neste estudo. Acredita-se que isto tenha ocorrido pois o teste não foi sensível o suficiente para detectar baixas quantidades destes compostos presentes nos espermatozoides analisados. O mesmo ocorreu para a pesquisa do composto 4-HNE, subproduto da peroxidação lipídica, nos meios de FIV pela técnica de LC-MS/MS. Não sendo possível detectar esse composto nas condições estabelecidas neste estudo, com isso, não é possível afirmar que existe uma diferença de concentração desses compostos de acordo com diferentes níveis de $\Delta\Psi_m$ espermático, e nem que o ambiente no qual a FIV foi realizada estava sob condições de estresse oxidativo, avaliado pelo produto da peroxidação lipídica 4-HNE. Em um estudo recente do nosso grupo de pesquisa, foi possível detectar peroxidação lipídica no ambiente de FIV por TBARS, em condições de maior concentrações de TBARS no diluidor espermático (CASTIGLIONI et al., 2021). O método TBARS não foi utilizado nas amostras de meio FIV, pois acreditava-se que a detecção do composto 4-HNE

seria mais preciso para detecção da peroxidação lipídica, por se tratar de um composto mais citotóxico que o malondialdeído (MOAZAMIAN et al., 2015).

A detecção de compostos como ADP, ATP em espermatozoides humano já foi descrita em estudos anteriores por meio de HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*), no qual Sousa et al. (2014) encontraram concentrações expressas em pmol/10⁶ espermatozoides, muito abaixo do limite de detecção estabelecido no presente estudo (µM). Apesar da LC-MS/MS ser uma técnica com grande poder de detecção, confiável e já ter sido relatada para a avaliação de metabolômica e proteômica em espermatozoides bovinos e humanos (BADOUARD et al., 2008; BOGLE et al., 2017; SARAF et al., 2020), até o momento não foram encontrados outros estudos que avaliassem compostos como ADP, ATP, NAHD e FADH₂ em espermatozoides bovinos por meio desta técnica. O uso da espectrometria de massa já foi reportado para a detecção de 4-HNE usando proteômica, ou seja, identificando proteínas relacionadas ao 4-HNE (NETHERTON et al., 2020) e não a detecção direta do composto em meio de fecundação *in vitro* como era a ideia principal deste trabalho.

A produção de EROs pelas mitocôndrias associada a um ambiente *in vitro* mais oxidativo torna o ambiente mais propenso a formação de altos níveis de EROs, podendo ser prejudicial para a produção de blastocistos (GOTO et al., 1993). Apesar de na literatura existirem diversos estudos que correlacionam positivamente o alto $\Delta\Psi_m$ com qualidade espermática e motilidade (KASAI et al., 2002; MARCHETTI et al., 2004; GALLON et al., 2006), o $\Delta\Psi_m$ também vem sendo relacionado com a produção de EROs. Wang et al. (2003), observaram que quanto menor o $\Delta\Psi_m$, maior é a produção de EROs, acredita-se que por conta do funcionamento inadequado da mitocôndria a produção de EROs é maior. Porém ainda há controvérsias na literatura, autores também já relataram correlação positiva entre alto $\Delta\Psi_m$ e a produção de EROs em bovinos, sugerindo que em condições de metabolismo celular mais acelerado o potencial oxidante é maior (KATO; NAGAO, 2015; CASTRO et al., 2016a).

Ao avaliar o estresse oxidativo por citometria de fluxo nos grupos estabelecidos para a PIVE (**Alto e Baixo Perfil** espermático, **Maior e Menor $\Delta\Psi_m$**), não foram observadas diferenças significativas para MitoSox+ e DHE+. No trabalho de Ashibe et al. (2019), ao avaliar a presença EROs em diferentes concentrações de oxigênio *in vitro*, também não observaram diferenças significativas entre o $\Delta\Psi_m$ em oócitos e a presença de EROs. Porém, é importante observar que o grupo de **Maior $\Delta\Psi_m$** apresentou uma tendência para a presença

de maior porcentagem de células estressadas (CR+PI-) quando comparado ao grupo de **Menor $\Delta\Psi_m$** ($21,82 \pm 2,48$ e $16,34 \pm 2,23$, $p=0,07$), o que pode indicar que esse grupo de **Maior $\Delta\Psi_m$** possa estar relacionado com maior produção de EROs. Apesar desta pequena diferença numérica para CR+PI- no grupo de **Maior $\Delta\Psi_m$** , não foram observadas diferenças para as taxas de blastocisto e desenvolvimento embrionário para os grupos com diferentes índices de $\Delta\Psi_m$ isoladamente. Diferente de trabalhos que relacionaram as menores taxas de blastocistos produzidos *in vitro* com o maior estresse oxidativo espermático, avaliado com as sondas fluorescentes DHE e CellRox green (CASTRO et al., 2016a; BICUDO, 2018). No entanto, Castro et al. (2016a) detectaram células CR+ quando os espermatozoides foram submetidos a condições estressante, incubados com H_2O_2 , diferente do que foi proposto no presente estudo. E Bicudo (2018), não encontrou diferença de $\Delta\Psi_m$ entre grupos de alto e baixo desempenho na PIVE, nem foi detectada diferenças na taxa de blastocistos para CellROX e MitoSOX entre touros de alto e baixo desempenho, houve diferença apenas para DHE, encontrado em maior quantidade no grupo de baixo blastocisto.

As EROs e ERNs como ânion superóxido, peróxido de hidrogênio e o óxido nítrico produzidos pelos espermatozoides em baixas concentrações, são importantes para funções fisiológicas, como hiperativação, reação acrossomal e a capacitação espermática (LAMIRANDE et al., 1997; RODRIGUEZ; BECONI, 2009). A presença de NO^\cdot vem sendo detectada no ambiente *in vitro* e a implicação para a presença dessa molécula nos espermatozoides vai depender da quantidade em que está presente no ambiente. Já foram reportadas que pequenas concentrações de NO^\cdot são benéficas para as funções espermáticas (SENGOKU et al., 1998; WU et al., 2004), da mesma forma que em altas concentrações são prejudiciais e tóxicas para a célula espermática (ROSSELLI et al., 1995). Visto isso, vale ressaltar o grupo de **Alto Perfil** associado ao **Maior $\Delta\Psi_m$** deste trabalho foi o que apresentou maiores quantidade de NO^\cdot no meio de FIV, e foi o grupo que apresentou melhores taxas de produção de blastocistos e de desenvolvimento embrionário. Podendo estar relacionado com a capacitação espermática que ocorreu na gota de FIV, visto que NO^\cdot já foi associado com capacitação espermática previamente (MIGUEL-JIMÉNEZ et al., 2020). Acredita-se que a quantidade de NO^\cdot liberada no meio de FIV nesse grupo ($4,84 \mu\text{mol/L}$) não foi prejudicial para a PIVE nas condições deste trabalho, da mesma forma que Herrero et al. (2001) relataram que ao expor espermatozoides humanos a concentrações entre $2,5\text{-}50 \mu\text{mol/L}$ de $ONOO^\cdot$ (produto da reação de $NO^\cdot + O_2^{\cdot-}$) não observaram efeito deletério, e sim um aumento da motilidade e da capacitação espermática.

Com relação a análise de atividade mitocondrial por DAB, os espermatozoides presentes no grupo de **Baixo Perfil**, apresentam maior número de espermatozoides com mitocôndrias inativas (DAB IV) no momento da FIV, corroborando os espermatozoides desse grupo também apresentam **Menor $\Delta\Psi_m$** no momento da FIV. Este resultado concorda com Espinoza et al. (2009), que afirmam que o $\Delta\Psi_m$ reflete na qualidade espermática. Losano et al. (2018a) observaram correlação negativa entre DAB IV e integridade de membrana, o mesmo observado neste estudo, uma vez que os grupos de **Perfil** espermático foram ranqueados com base na integridade de membrana (MPI). Acredita-se que por apresentarem menor qualidade comparado ao grupo **Alto Perfil**, espermatozoides presentes no grupo de **Baixo Perfil** apresentaram Menor $\Delta\Psi_m$ e menor atividade mitocondrial.

A atividade mitocondrial e o $\Delta\Psi_m$ funcionam de maneira dinâmica, em estudos anteriores (LOSANO et al., 2017b, 2018a), já foi observado a existência de efeito compensatório entre a atividade mitocondrial e o $\Delta\Psi_m$. O grupo de **Menor $\Delta\Psi_m$** foi o que apresentou mais mitocôndrias ativas (DAB I) comparado ao grupo de **Maior $\Delta\Psi_m$** . Com isso, a cadeia transportadora de elétrons nas mitocôndrias passa a funcionar com maior intensidade na tentativa de reestabelecer o $\Delta\Psi_m$.

O metabolismo de embriões cultivados *in vitro* está altamente relacionado com a tensão de oxigênio em que estão expostos no sistema *in vitro*, diferentes concentrações de oxigênio vão gerar diferentes padrões de transcrição gênica (DE LIMA et al., 2020). Genes relacionados ao estresse oxidativo (incluindo GPx4 e PRDX1), ao metabolismo lipídico, ao estresse e morte celular já foram encontrados como mais expressos em embriões *in vitro* quando comparados com embriões obtidos *in vivo*, tornando o ambiente *in vitro* mais estressante, interferindo na viabilidade embrionária e no processo de criopreservação desses embriões (SUDANO et al., 2014).

Com a finalidade de avaliar o estresse oxidativo dos embriões cultivados *in vitro*, formados a partir de diferentes condições espermáticas dos grupos experimentais a análise de expressão gênica realizada em embriões de 8 células foi focada na pesquisa de resposta antioxidante. Considerando que a ativação do genoma embrionário em bovinos ocorre entre 8-16 células (RODRIGUEZ-ZAS; SCHELLANDER; LEWIN, 2008), foram escolhidos embriões de 8 células para avaliação da expressão gênica. Foi identificada diferença na expressão apenas de GPx4, glutationa peroxidase 4, entre os grupos de **Alto** e **Baixo Perfil** espermático, sendo mais expresso no grupo de **Baixo Perfil**. No trabalho de Almeida (2018) foram observados genes associados ao estresse oxidativo (dentre eles XBP1, NFE2L2, DDIT3) e apoptose mais expressos nos grupos de touros com baixa fertilidade *in vitro*

comparado ao grupo de alta fertilidade. Corroborando a ideia de que espermatozoides de menor qualidade interferem na qualidade e na expressão gênica embrionária.

O estresse oxidativo ocorre quando existe um desequilíbrio entre a produção EROs e reações antioxidantes (VALKO et al., 2007). A glutathiona peroxidase, GPx, é uma enzima antioxidante, responsável por neutralizar de forma mais eficiente o H_2O_2 , catalisando a reação entre H_2O_2 e GSH (glutathiona reduzida, doadora de elétrons), formando GSSG (glutathiona oxidada) que poderá ser novamente convertida em GSH pela enzima glutathiona redutase (MASELLA et al., 2005). A presença aumentada de GPx4 no grupo de **Baixo Perfil**, indica que houve um desequilíbrio entre a produção de EROs e a enzima antioxidante GPx, nos embriões desse grupo. A enzima encontrada em maior concentração neste grupo, comparado ao grupo **Alto Perfil**, indica maior atividade antioxidante no grupo de menor qualidade espermática. Vale lembrar, que o grupo de **Baixo Perfil** também foi o grupo que apresentou maiores níveis de DAB IV (mitocôndrias inativas) e menor $\Delta\Psi_m$. Sendo assim, esse grupo foi considerado como de menor qualidade, pois os espermatozoides presentes neste grupo apresentaram maior quantidade de mitocondriais inativas, menor $\Delta\Psi_m$ e um desequilíbrio da resposta antioxidante nos embriões.

Não foram observadas diferenças para a expressão gênica relativa de PRDX1, NFE2L2, XBP1, HMOX1 e DDIT3. Acredita-se que não foram observadas diferenças para esses genes, exceto GPx4, porque os embriões foram cultivados em uma atmosfera controlada (5% CO_2 , 5% de O_2 e 90% de N_2) e mais próximo do fisiológico. Como visto por Leite et al. (2017), embriões cultivados a 20% de O_2 apresentaram maior expressão de genes relacionados a mecanismos antioxidativos comparados com o grupo a 5% de O_2 . Portanto não houve efeito da qualidade espermática e nem do $\Delta\Psi_m$ na expressão desses genes relacionados ao estresse oxidativo nos embriões cultivados *in vitro*.

8 CONCLUSÃO

Com este trabalho podemos confirmar a hipótese inicial de que o $\Delta\Psi_m$ é dependente dos demais atributos espermáticos. Porém, a relação encontrada entre o $\Delta\Psi_m$ e o **Perfil espermático** foi contrária à hipótese proposta, ou seja, espermatozoides com **Alto Perfil** associados ao **Maior $\Delta\Psi_m$** apresentaram maiores as taxas de desenvolvimento embrionário e taxa de blastocistos produzidos *in vitro*. Da mesma forma, espermatozoides de **Baixo Perfil** e **Maior $\Delta\Psi_m$** apresentaram as piores taxas, contrário ao que foi proposto na hipótese. O **Perfil espermático** influenciou mais na PIVE do que a diferença de $\Delta\Psi_m$ usada no presente estudo. Foi possível identificar diferenças nos índices de PIVE entre os grupos de **Maior** e **Menor $\Delta\Psi_m$** , dentro de diferentes níveis de perfil espermático (**Alto** e **Baixo**). Porém diferenças quanto ao status oxidativo avaliado por meio de citometria de fluxo nos espermatozoides não foram observadas nos grupos estudados. As diferenças encontradas relacionadas ao metabolismo mitocondrial foram associadas à análise de DAB, e um mecanismo compensatório foi observado no grupo de **Menor $\Delta\Psi_m$** . NO \cdot foi detectado em maior concentração no grupo **Alto Perfil** e **Maior $\Delta\Psi_m$** , grupo que apresentou maiores taxas de embriões na PIVE. Podemos considerar que os baixos níveis detectados de NO \cdot estão associados com maior fertilidade *in vitro*. Com relação à expressão gênica embrionária associada à resposta antioxidante, a qualidade espermática interferiu na resposta antioxidante embrionária apenas para a expressão de GPx4 nos grupos avaliados, sendo mais expresso no grupo de Baixo Perfil espermático, demonstrando um desequilíbrio da resposta antioxidante em grupo de menor qualidade espermática.

9 CONSIDERAÇÕES FINAIS

- O **Alto Perfil** espermático foi relacionado com maior qualidade espermática *in vitro*. Os atributos espermáticos apresentam relações complexas entre si, podendo alterar os resultados da PIVE dependendo do nível do perfil espermático. Sendo o $\Delta\Psi_m$, MPI e AI os atributos que mais contribuem para o perfil espermático.
- As moléculas associadas ao metabolismo energético e a peroxidação lipídica, como ATP, ADP, NADH, FADH₂ e 4-HNE, não foram detectadas neste estudo, provavelmente devido às baixas concentrações presentes nas condições avaliadas.
- O $\Delta\Psi_m$ não foi associado com o estresse oxidativo espermático nos grupos avaliados.
- A detecção de NO[•] em baixas quantidades presente no meio de FIV foi benéfica para os índices da PIVE, relacionado com maior taxa de embriões produzidos no grupo de **Alto Perfil e Maior $\Delta\Psi_m$** .
- Atividade mitocondrial avaliada por DAB foi relacionada com **Perfil Espermático**, o grupo **Baixo Perfil** apresentou maior número de espermatozoides sem atividade mitocondrial (DAB IV). Além disso, foi observado efeito compensatório na atividade mitocondrial no grupo de espermatozoides com **Menor $\Delta\Psi_m$** , sendo este grupo o que apresentou mais mitocôndrias ativas (DAB I).
- O grupo de **Baixo Perfil** espermático expressou mais GPx4 nos embriões de 8 células, apresentando maior resposta antioxidante comparado ao grupo de **Alto Perfil**.

REFERÊNCIAS

- ABIEC. **Beef Report: Perfil da pecuária no Brasil**. Disponível em: <<http://www.abiec.com.br/control/uploads/arquivos/sumario2019portugues.pdf>>. Acesso em: 3 jan. 2021.
- AGARWAL, A. VIRK, G. ONG, C. DU PLESSIS, S. Effect of Oxidative Stress on Male Reproduction. **The World Journal of Mens Health**, v. 32, n. 1, p. 1–17, 2014.
- AITKEN, R. J. et al. Redox Activity Associated with the Maturation and Capacitation of Mammalian Spermatozoa. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 36, n. 8, p. 994–1010, 2004.
- AITKEN, R. J. et al. 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.; CLARKSON, J. S.; FISHEL, S. Generation of Reactive Oxygen Species, Lipid Peroxidation, and Human Sperm Function. **Biology of Reproduction**, v. 40, n. 1, p. 183–197, 1989.
- AITKEN, R. J.; DREVET, J. R. The Importance of Oxidative Stress in Determining the Functionality of Mammalian Spermatozoa: A Two-Edged Sword. **Antioxidants**, v. 9, p. 1–19, 2020.
- AITKEN, R. J.; JONES, K. T.; ROBERTSON, S. A. Reactive Oxygen Species and Sperm Function-in Sickness and in Health. **Journal of Andrology**, v. 33, n. 6, p. 1096–1106, 2012.
- AKYOL, O. et al. Nitric Oxide as a Physiopathological Factor in Neuropsychiatric Disorders. **In Vivo**, v. 18, n. 3, p. 377–390, 2004.
- AL DARWICH, A. et al. Effect of PUFA on Embryo Cryoresistance, Gene Expression and AMPK α Phosphorylation in IVF-Derived Bovine Embryos. **Prostaglandins and Other Lipid Mediators**, v. 93, n. 1–2, p. 30–36, 2010.
- ALLAMANENI, S. S. R. et al. Characterization of Oxidative Stress Status by Evaluation of Reactive Oxygen Species Levels in Whole Semen and Isolated Spermatozoa. **Fertility and Sterility**, v. 83, n. 3, p. 800–803, 2005.
- ALMEIDA, T. G. de. **Cinética e desenvolvimento embrionário in vitro de embriões bovinos de touros de alta e baixa fertilidade**. 2018. 2018.
- ALOMAR, M. et al. Assessment of Sperm Quality Parameters of Six Bulls Showing Different Abilities to Promote Embryo Development in Vitro. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 18, n. 3, p. 395–402, 2006.
- ALOMAR, M. et al. Kinetics of Fertilization and Development, and Sex Ratio of Bovine

- Embryos Produced Using the Semen of Different Bulls. **Animal Reproduction Science**, v. 107, n. 1–2, p. 48–61, 2008.
- ALVAREZ, C.; STOREY, T.; TOUCHSTONE, C. Spontaneous Lipid Peroxidation and Production of Hydrogen Peroxide and Superoxide in Human Spermatozoa. **Journal of Andrology**, v. 8, p. 338–348, 1978.
- AMARAL, A. et al. Mitochondria Functionality and Sperm Quality. **Reproduction**, v. 146, n. 5, 2013.
- AMARAL, A.; RAMALHO-SANTOS, J. Assessment of Mitochondrial Potential: Implications for the Correct Monitoring of Human Sperm Function. **International Journal of Andrology**, v. 33, n. 1, p. 180–186, 2010.
- ANZAR, M. et al. Sperm Apoptosis in Fresh and Cryopreserved Bull Semen Detected by Flow Cytometry and Its Relationship with Fertility. **Biology of Reproduction**, v. 66, p. 354–360, 2002.
- ASHIBE, S. et al. Detrimental Effects of Oxidative Stress in Bovine Oocytes during Intracytoplasmic Sperm Injection (ICSI). **Theriogenology**, v. 133, p. 71–78, 2019.
- BADOUARD, C. et al. Determination of New Types of DNA Lesions in Human Sperm. **Zygote**, v. 16, n. 1, p. 9–13, 2008.
- BALASUBRAMANIAN, S. et al. Expression Pattern of Oxygen and Stress-Responsive Gene Transcripts at Various Developmental Stages of in Vitro and in Vivo Preimplantation Bovine Embryos. **Theriogenology**, v. 68, n. 2, p. 265–275, 2007.
- BARBAGALLO, F. et al. Evaluation of Sperm Mitochondrial Function: A Key Organelle for Sperm Motility. **Journal of Clinical Medicine**, v. 9, n. 2, p. 363, 2020.
- BECKMAN, J. S. et al. Oxidative Chemistry of Peroxynitrite. **Methods in Enzymology**, v. 233, n. C, p. 229–240, 1994.
- BICUDO, L. de C. **Caracterização das subpopulações e atributos espermáticos como método preditivo de desempenho na produção in vitro de embriões em bovinos**. 2018. 2018.
- BLONDIN, P. Logistics of Large Scale Commercial IVF Embryo Production. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 29, n. 1, p. 32–36, 2017.
- BOGLE, O. A. et al. Identification of Protein Changes in Human Spermatozoa throughout the Cryopreservation Process. **Andrology**, v. 5, n. 1, p. 10–22, 2017.
- BRACKETT, B. G. et al. Normal Development Following in Vitro Fertilization in the Cow. **Biology of reproduction**, v. 27, p. 147–158, 1982.
- BURNAUGH, L.; SABEUR, K.; BALL, B. A. Generation of Superoxide Anion by Equine

- Spermatozoa as Detected by Dihydroethidium. **Theriogenology**, v. 67, n. 3, p. 580–589, 2007.
- CAGNONE, G. L. M.; SIRARD, M. A. Transcriptomic Signature to Oxidative Stress Exposure at the Time of Embryonic Genome Activation in Bovine Blastocysts. **Molecular Reproduction and Development**, v. 80, n. 4, p. 297–314, 2013.
- CASTIGLIONI, V. C. et al. Lipid Peroxidation in Bull Semen Influences Sperm Traits and Oxidative Potential of Percoll® -Selected Sperm. **Zygote**, p. 1–8, 2021.
- CASTRO, L. S. de et al. 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, 2016a.
- CASTRO, L. S. et al. Sperm Cryodamage Occurs after Rapid Freezing Phase: Flow Cytometry Approach and Antioxidant Enzymes Activity at Different Stages of Cryopreservation. **Journal of Animal Science and Biotechnology**, v. 7, n. 1, p. 1–9, 2016b.
- CASTRO, L. S. et al. Effect of Bovine Sperm Chromatin Integrity Evaluated Using Three Different Methods on in Vitro Fertility. **Theriogenology**, v. 107, p. 142–148, 2018.
- CELEGHINI, E. C. C. et al. 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.
- CHAUBAL, S. A. et al. Hormonal Treatments for Increasing the Oocyte and Embryo Production in an OPU-IVP System. **Theriogenology**, v. 67, p. 719–728, 2007.
- CHEN, Z. et al. Characterization of Global Loss of Imprinting in Fetal Overgrowth Syndrome Induced by Assisted Reproduction. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 112, n. 15, p. 4618–4623, 2015.
- CNA. **Agronegócio avança em novembro e resultado recorde vai se consolidando**. Disponível em: <<https://www.cnabrazil.org.br/boletins/agronegocio-avanca-em-novembro-e-resultado-recorde-vai-se-consolidando>>. Acesso em: 10 feb. 2021.
- COY, P.; AVILÉS, M. What Controls Polyspermy in Mammals, the Oviduct or the Oocyte? **Biological Reviews**, v. 85, p. 593–605, 2010.
- DE LIMA, C. B. et al. The Dynamics between in Vitro Culture and Metabolism: Embryonic Adaptation to Environmental Changes. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 1–14, 2020.
- DEMYDA-PEYRÁS, S. et al. Influence of Sperm Fertilising Concentration, Sperm Selection Method and Sperm Capacitation Procedure on the Incidence of Numerical Chromosomal Abnormalities in IVF Early Bovine Embryos. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 27, n. 2, p. 351–359, 2015.

- DONNELLY, E. T. et al. Sperm Nitric Oxide and Motility: The Effects of Nitric Oxide Synthase Stimulation and Inhibition. **Molecular Human Reproduction**, v. 3, n. 9, p. 755–762, 1997.
- DOSHI, S. B. et al. Role of Reactive Nitrogen Species in Male Infertility. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 10, p. 1–11, 2012.
- DU PLESSIS, S. S. et al. Oxidative Phosphorylation versus Glycolysis: What Fuel Do Spermatozoa Use? **Asian Journal of Andrology**, v. 17, n. 2, p. 230–235, 2015.
- ESPINOZA, J. A. et al. Integrity of Mitochondrial Membrane Potential Reflects Human Sperm Quality. **Andrologia**, v. 41, n. 1, p. 51–54, 2009.
- EVENSON, D.; JOST, L. Sperm Chromatin Structure Assay Us Useful for Fertiity Assessment. **Methods in Cell Science**, v. 22, p. 169–189, 2000.
- EVENSON, D. P. Simultaneous Measurement by Flow Cytometry of Sperm Cell Viability and Mitochondrial Membrane Potential Related to Cell Motility. **The journal of Histochemistry and cytochemistry**, v. 30, n. 3, p. 279–280, 1982.
- EVENSON, D. P.; LARSON, K. L.; JOST, L. K. Sperm Chromatin Structure Assay: Its Clinical Use for Detecting Sperm DNA Fragmentation in Male Infertility and Comparisons With Other Techniques. **Journal of Andrology**, v. 23, n. 1, p. 25–43, 2002.
- EYESTONE, W. H.; FIRST, N. L. Variation in Bovine Embryo Development in Vitro Due to Bulls. **Theriogenology**, v. 31, n. 1, p. 191, 1989.
- FERRAMOSCA, A.; ZARA, V. Bioenergetics of Mammalian Sperm Capacitation. **BioMed Research International**, v. 2014, n. 1–8, 2014.
- FERRÉ, L. B. et al. Review: Recent Advances in Bovine in Vitro Embryo Production: Reproductive Biotechnology History and Methods. **Animal**, v. 14, n. 5, p. 991–1004, 2020.
- FISCHER, B.; BAVISTER, B. D. Oxygen Tension in the Oviduct and Uterus of Rhesus Monkeys, Hamsters and Rabbits. **Reproduction**, v. 99, p. 673–679, 1993.
- FORD, W. C. L. Glycolysis and Sperm Motility: Does a Spoonful of Sugar Help the Flagellum Go Round? **Human Reproduction Update**, v. 12, n. 3, p. 269–274, 2006.
- GALLON, F. et al. The Functionality of Mitochondria Differentiates Human Spermatozoa with High and Low Fertilizing Capability. **Fertility and Sterility**, v. 86, n. 5, p. 1526–1530, 2006.
- GARDNER, A. J.; EVANS, J. P. Mammalian Membrane Block to Polyspermy: New Insights into How Mammalian Eggs Prevent Fertilisation by Multiple Sperm. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 18, n. 1–2, p. 53–61, 2006.
- GARDNER, D. K.; HARVEY, A. J. Blastocyst Metabolism. **Reproduction, Fertility and**

Development, v. 27, p. 638–654, 2015.

GARNER, D. L. et al. Fluorometric Assessments of Mitochondrial Function and Viability in Cryopreserved Bovine Spermatozoa. **Biology of reproduction**, v. 57, n. 6, p. 1401–1406, 1997.

GIBB, Z.; LAMBOURNE, S. R.; AITKEN, R. J. The Paradoxical Relationship between Stallion Fertility and Oxidative Stress. **Biology of Reproduction**, v. 91, p. 1–10, 2014.

GILLAN, L.; EVANS, G.; MAXWELL, W. M. C. Flow Cytometric Evaluation of Sperm Parameters in Relation to Fertility Potential. **Theriogenology**, v. 63, n. 2 SPEC. ISS., p. 445–457, 2005.

GLIOZZI, T. M. et al. The Combination of Kinetic and Flow Cytometric Semen Parameters as a Tool to Predict Fertility in Cryopreserved Bull Semen. **Animal**, v. 11, p. 1975–1982, 2017.

GONÇALVES, P. B. D. et al. Produção in Vitro De Embriões Bovinos: Estado Da Arte. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 13, n. 2, p. 402–415, 2007.

GOSALVEZ, J.; TVRDA, E.; AGARWAL, A. Free Radical and Superoxide Reactivity Detection in Semen Quality Assessment: Past, Present, and Future. **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**, v. 34, n. 6, p. 697–707, 2017.

GOTO, Y. et al. Increased Generation Of Reactive Oxygen Species In Embryos Cultured In Vitro. **Free radical and medicinebiology**, v. 15, p. 69–75, 1993.

GUÉRIN, P.; EL MOUATASSIM, S.; MÉNÉZO, Y. Oxidative Stress and Protection against Reactive Oxygen Species in the Pre-Implantation Embryo and Its Surroundings. **Human Reproduction Update**, v. 7, n. 2, p. 175–189, 2001.

GUTHRIE, H. D.; WELCH, G. R. Effects of Reactive Oxygen Species on Sperm Function. **Theriogenology**, v. 78, n. 8, p. 1700–1708, 2012.

HALLIWELL, B. Reactive Oxygen Species in Living Systems: Source, Biochemistry, and Role in Human Disease. **American Journal of Medicine**, v. 91, n. 0002–9343, p. 14S–22S, 1991.

HAMMERSTEDT, R. H.; GRAHAM, J. K.; NOLAN, J. P. Cryopreservation What of Mammalian Sperm : We Ask Them to Survive Other Retrace. **Journal of Andrology**, v. 11, n. 1, p. 73–88, 1990.

HASLER, J. F. In-Vitro Production of Cattle Embryos: Problems with Pregnancies and Parturition. **Human Reproduction**, v. 15, n. SUPPL. 5, p. 47–58, 2000.

HERRERO, M. B.; DE LAMIRANDE, E.; GAGNON, C. Tyrosine Nitration in Human Spermatozoa: A Physiological Function of Peroxynitrite, the Reaction Product of Nitric Oxide

- and Superoxide. **Molecular Human Reproduction**, v. 7, n. 10, p. 913–921, 2001.
- HOLT, W. V. Is Semen Analysis Useful to Predict the Odds That the Sperm Will Meet the Egg? **Reproduction in Domestic Animals**, v. 44, p. 31–38, 2009.
- HOSSAIN, M. S. et al. Flow Cytometry for the Assessment of Animal Sperm Integrity and Functionality: State of the Art. **Asian Journal of Andrology**, v. 13, n. 3, p. 406–419, 2011.
- HRUDKA, F. Cytochemical and Ultracytochemical Demonstration of Cytochrome c Oxidase in Spermatozoa and Dynamics of Its Changes Accompanying Ageing or Induced by Stress. **International Journal of Andrology**, v. 10, p. 809–828, 1987.
- IBGE. **PIB cai 4,1% em 2020 e fecha ano em R\$ 7,4 trilhões**. Disponível em: <<https://agenciadenoticias.ibge.gov.br/agencia-noticias/2012-agencia-de-noticias/noticias/30166-pib-cresce-3-2-no-4-tri-mas-fecha-2020-com-queda-de-4-1-a-maior-em-25-anos>>. Acesso em: 3 mar. 2021.
- 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, p. 947–961, 2001.
- KASAI, T. et al. Relationship between Sperm Mitochondrial Membrane Potential, Sperm Motility, and Fertility Potential. **Asian Journal of Andrology**, v. 4, n. 2, p. 97–103, 2002.
- KATHIRAVAN, P. et al. Objective Sperm Motion Analysis to Assess Dairy Bull Fertility Using Computer-Aided System - A Review. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 46, 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. 1–17, 2015.
- KOPPERS, A. J. et al. Significance of Mitochondrial Reactive Oxygen Species in the Generation of Oxidative Stress in Spermatozoa. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 93, n. 8, p. 3199–3207, 2008.
- KROPP, J. et al. Male Fertility Status Is Associated with DNA Methylation Signatures in Sperm and Transcriptomic Profiles of Bovine Preimplantation Embryos. **BMC Genomics**, v. 18, p. 1–15, 2017.
- LAMIRANDE, E. de et al. Reactive Oxygen Species and Sperm Physiology. **Reviews of Reproduction**, v. 2, p. 48–54, 1997.
- LAMIRANDE, E. de; GAGNON, C. Reactive Oxygen Species and Human Spermatozoa. Depletion of Adenosine Triphosphate Plays an Important Role in the Inhibition of Sperm

- Motility. **Journal of andrology**, v. 13, n. (5), p. 379–86, 1992.
- LANE, M. et al. Oxidative Stress in Mouse Sperm Impairs Embryo Development, Fetal Growth and Alters Adiposity and Glucose Regulation in Female Offspring. **PLoS ONE**, v. 9, n. 7, p. 1–9, 2014.
- LEESE, H. J. et al. Metabolism of the Viable Mammalian Embryo: Quietness Revisited. **Molecular Human Reproduction**, v. 14, n. 12, p. 667–672, 2008.
- LEITE, R. F. et al. Oxidative Stress Alters the Profile of Transcription Factors Related to Early Development on in Vitro Produced Embryos. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2017, p. 1–14, 2017.
- LENZI, A. et al. Lipoperoxidation Damage of Spermatozoa Polyunsaturated Fatty Acids (PUFA): Scavenger Mechanisms and Possible Scavenger Therapies. **Frontiers in Bioscience**, v. 5, p. 1–15, 2000.
- LONERGAN, P.; FAIR, T. In Vitro-Produced Bovine Embryos-Dealing with the Warts. **Theriogenology**, v. 69, p. 17–22, 2008.
- LOSANO, J. D. A. et al. The Stimulated Glycolytic Pathway Is Able to Maintain ATP Levels and Kinetic Patterns of Bovine Epididymal Sperm Subjected to Mitochondrial Uncoupling. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2017, 2017a.
- LOSANO, J. D. A. et al. Effect of Mitochondrial Uncoupling and Glycolysis Inhibition on Ram Sperm Functionality. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 52, n. 2, p. 289–297, 2017b.
- LOSANO, J. D. A. et al. Effect of Vitamin E and Polyunsaturated Fatty Acids on Cryopreserved Sperm Quality in Bos Taurus Bulls Under Testicular Heat Stress. **Animal Biotechnology**, v. 29, n. 2, p. 100–109, 2018a.
- LOSANO, J. Di. D. A. et al. Spermatic Mitochondria: Role in Oxidative Homeostasis, Sperm Function and Possible Tools for Their Assessment. **Zygote**, v. 26, n. 4, p. 251–260, 2018b.
- MAILLOUX, R. J. Teaching the Fundamentals of Electron Transfer Reactions in Mitochondria and the Production and Detection of Reactive Oxygen Species. **Redox Biology**, v. 4, p. 381–398, 2015.
- MAPA. PROJEÇÕES DO AGRONEGÓCIO Brasil 2019/20 a 2029/30 Projeções de Longo Prazo. **Mapa**, p. 102, 2020.
- MARCHETTI, C. OBERT, G. DEFFOSEZ, A. FORMSTECHE, P. MARCHETTI, P. Study of Mitochondrial Membrane Potential, Reactive Oxygen Species, DNA Fragmentation and Cell Viability by Flow Cytometry in Human Sperm. **Human Rproduction**, v. 17, n. 5, p. 1257–1265, 2002.

- MARCHETTI, C. et al. Comparison of Four Fluorochromes for the Detection of the Inner Mitochondrial Membrane Potential in Human Spermatozoa and Their Correlation with Sperm Motility. **Human Reproduction**, v. 19, n. 10, p. 2267–2276, 2004.
- MARCHETTI, P. et al. Influence of Mitochondrial Membrane Potential of Spermatozoa on in Vitro Fertilisation Outcome. **Andrologia**, v. 44, n. 2, p. 136–141, 2012.
- MARTÍN-ROMERO, F. J. et al. Contribution of Culture Media to Oxidative Stress and Its Effect on Human Oocytes. **Reproductive BioMedicine Online**, v. 17, n. 5, p. 652–661, 2008.
- MASELLA, R. et al. Novel Mechanisms of Natural Antioxidant Compounds in Biological Systems: Involvement of Glutathione and Glutathione-Related Enzymes. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 16, n. 10, p. 577–586, 2005.
- MCHUGHES, C. E. et al. Identification and Quantification of Differentially Represented Transcripts in in Vitro and in Vivo Derived Preimplantation Bovine Embryos. **Molecular Reproduction and Development**, v. 76, n. 1, p. 48–60, 2009.
- MIGUEL-JIMÉNEZ, S. et al. Does Melatonin Exert Its Effect on Ram Sperm Capacitation through Nitric Oxide Synthase Regulation? **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 6, 2020.
- MOAZAMIAN, R. et al. Oxidative Stress and Human Spermatozoa: Diagnostic and Functional Significance of Aldehydes Generated as a Result of Lipid Peroxidation. **Molecular Human Reproduction**, v. 21, n. 6, p. 502–515, 2015.
- MOCÉ, E.; GRAHAM, J. K. In Vitro Evaluation of Sperm Quality. **Animal Reproduction Science**, v. 105, p. 104–118, 2008.
- MORAES, C. R.; MEYERS, S. The Sperm Mitochondrion: Organelle of Many Functions. **Animal Reproduction Science**, v. 194, n. December 2017, p. 71–80, 2018.
- MORRELL, J. M. et al. Sperm Quality Variables as Indicators of Bull Fertility May Be Breed Dependent. **Animal Reproduction Science**, v. 185, n. July, p. 42–52, 2017.
- MUKAI, C.; OKUNO, M. Glycolysis Plays a Major Role for Adenosine Triphosphate Supplementation in Mouse Sperm Flagellar Movement. **Biology of Reproduction**, v. 71, n. 2, p. 540–547, 2004.
- NASCIMENTO, J. M. et al. Comparison of Glycolysis and Oxidative Phosphorylation as Energy Sources for Mammalian Sperm Motility, Using the Combination of Fluorescence Imaging, Laser Tweezers, and Real-Time Automated Tracking and Trapping. **Journal of Cellular Physiology**, v. 217, n. 3, p. 745–751, 2008.
- NELSON, D. L.; COX, M. M. Bioenergética e metabolismo. In: ARTMED (Ed.). **Princípios de Bioquímica de Lehninger**. 6. ed. Porto Alegre: 2014, 2014. p. 501–799.

- NETHERTON, J. K. et al. Mass Spectrometry Reveals New Insights into the Production of Superoxide Anions and 4-Hydroxynonenal Adducted Proteins in Human Sperm. **Proteomics**, v. 20, n. 2, 2020.
- NICHI, M. et al. Evaluation of Epididymis Storage Temperature and Cryopreservation Conditions for Improved Mitochondrial Membrane Potential, Membrane Integrity, Sperm Motility and in Vitro Fertilization in Bovine Epididymal Sperm. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 52, n. 2, p. 257–263, 2017.
- NORDBERG, J.; ARNÉR, E. S. J. Reactive Oxygen Species, Antioxidants, and the Mammalian Thioredoxin System. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 31, n. 11, p. 1287–1312, 2001.
- O'FLAHERTY, C. M.; BEORLEGUI, N. B.; BECONI, M. T. Reactive Oxygen Species Requirements for Bovine Sperm Capacitation and Acrosome Reaction. **Theriogenology**, v. 52, p. 289–301, 1999.
- OLIVEIRA, B. M. et al. Fertility and Uterine Hemodynamic in Cows after Artificial Insemination with Semen Assessed by Fluorescent Probes. **Theriogenology**, v. 82, p. 767–772, 2014.
- OTOI, T. et al. Effects of Different Lots from the Same Bull on in Vitro Development of Bovine Oocytes Fertilized in Vitro. **Theriogenology**, v. 39, p. 713–718, 1993.
- PALMA, G. A.; SINOWATZ, F. Male and Female Effects on the In Vitro Production of Bovine Embryos. **Anatomia, Histologia, Embryologia**, v. 33, p. 257- 262., 2004.
- PARINAUD, J. et al. Influence of Sperm Parameters on Embryo Quality. **Fertility and Sterility**, v. 60, n. 5, p. 888–892, 1993.
- PONTES, J. H. F. et al. Comparison of Embryo Yield and Pregnancy Rate between in Vivo and in Vitro Methods in the Same Nelore (Bos Indicus) Donor Cows. **Theriogenology**, v. 71, n. 4, p. 690–697, 2009.
- RIZOS, D. et al. Consequences of Bovine Oocyte Maturation, Fertilization or Early Embryo Development in Vitro versus in Vivo: Implications for Blastocyst Yield and Blastocyst Quality. **Molecular Reproduction and Development**, v. 61, n. 2, p. 234–248, 2002a.
- RIZOS, D. et al. Analysis of Differential Messenger RNA Expression between Bovine Blastocysts Produced in Different Culture Systems: Implications for Blastocyst Quality. **Biology of Reproduction**, v. 66, n. 3, p. 589–595, 2002b.
- RODRIGUEZ-ZAS, S. L.; SCHELLANDER, K.; LEWIN, H. A. Biological Interpretations of Transcriptomic Profiles in Mammalian Oocytes and Embryos. **Reproduction**, v. 135, n. 2, p. 129–139, 2008.

- RODRIGUEZ, P. C.; BECONI, M. T. Peroxynitrite Participates in Mechanisms Involved in Capacitation of Cryopreserved Cattle. **Animal Reproduction Science**, v. 110, n. 1–2, p. 96–107, 2009.
- ROSSELLI, M. et al. Andrology: Effects of Nitric Oxide on Human Spermatozoa: Evidence That Nitric Oxide Decreases Sperm Motility and Induces Sperm Toxicity. **Human Reproduction**, v. 10, n. 7, p. 1786–1790, 1995.
- RUBIN, M. I. B. Twenty Years History of the Brazilian Embryo Technology Society (1985–2005). **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 33, n. 1, p. 35–54, 2005.
- RUIZ-PESINI, E. et al. The Role of the Mitochondrion in Sperm Function: Is There a Place for Oxidative Phosphorylation or Is This a Purely Glycolytic Process? **Current Topics in Developmental Biology**, v. 77, n. 06, p. 3–19, 2007.
- SAMIZO, K. et al. A Highly Sensitive Method for Measurement of Myosin ATPase Activity by Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatography. **Analytical Biochemistry**, v. 293, n. 2, p. 212–215, 2001.
- SANCHES, B. V.; ZANGIROLAMO, A. F.; SENEDA, M. M. Intensive Use of IVF by Large-Scale Dairy Programs. **Animal Reproduction**, v. 16, n. 3, p. 394–401, 2019.
- SANDERS, J. R.; SWANN, K. Molecular Triggers of Egg Activation at Fertilization in Mammals. **Reproduction**, v. 152, n. 2, p. R41–R50, 2016.
- SARAF, K. K. et al. Metabolomic Fingerprinting of Bull Spermatozoa for Identification of Fertility Signature Metabolites. **Molecular Reproduction and Development**, v. 87, n. 6, p. 692–703, 2020.
- SARTORI, R. et al. Update and Overview on Assisted Reproductive Technologies (ARTs) in Brazil. **Animal Reproduction**, v. 13, n. 3, p. 300–312, 2016.
- SELLEM, E. et al. Use of Combinations of in Vitro Quality Assessments to Predict Fertility of Bovine Semen. **Theriogenology**, v. 84, n. 9, p. 1447–1454.e5, 2015.
- SENGOKU, K. et al. Effects of Low Concentrations of Nitric Oxide on the Zona Pellucida Binding Ability of Human Spermatozoa. **Fertility and Sterility**, v. 69, n. 3, p. 522–527, 1998.
- SHOJAEI, H. et al. 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.
- SIKKA, S. C.; RAJASEKARAN, M.; HELLSTROM, W. J. Role of Oxidative Stress and Antioxidants in Male Infertility. **Journal of andrology**, v. 16, n. 6, p. 464–468, 1995.
- SILVA, P. F. N. et al. Exposure of Bovine Sperm to Pro-Oxidants Impairs the Developmental

- Competence of the Embryo after the First Cleavage. **Theriogenology**, v. 67, p. 609–619, 2007.
- SIMÕES, R. Influência Da Fragmentação de DNA Espermático Na Produção in Vitro de Embriões Bovinos. **Tese**, 2010.
- SIMÕES, R. et al. 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.
- SIMON, L. et al. Paternal Influence of Sperm DNA Integrity on Early Embryonic Development. **Human Reproduction**, v. 29, n. 11, p. 2402–2412, 2014.
- SIQUEIRA, A. F. P. et al. Sperm Traits on in Vitro Production (IVP) of Bovine Embryos: Too Much of Anything Is Good for Nothing. **PLoS ONE**, v. 13, n. 7, p. 1–16, 2018.
- SIQUEIRA, L. G. et al. Consequences of Assisted Reproductive Technologies for Offspring Function in Cattle. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 32, n. 2, p. 82–97, 2020.
- SMILEY, S. T. et al. Intracellular Heterogeneity in Mitochondrial Membrane Potentials Revealed by a J-Aggregate-Forming Lipophilic Cation JC-1. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 88, n. 9, p. 3671–3675, 1991.
- SOUSA, M. I. et al. Concentration-Dependent Sildenafil Citrate (Viagra) Effects on ROS Production, Energy Status, and Human Sperm Function. **Systems Biology in Reproductive Medicine**, v. 60, n. 2, p. 72–79, 2014.
- STEIBEL, J. P. et al. A Powerful and Flexible Linear Mixed Model Framework for the Analysis of Relative Quantification RT-PCR Data. **Genomics**, v. 94, n. 2, p. 146–152, 2009.
- STEPTOE, P. C.; EDWARDS, R. G. Birth after the Reimplantation of a Human Embryo. **The lancet - Letters to editor**, v. 366, 1978.
- STINSHOFF, H. et al. Cryopreservation Affects the Quality of in Vitro Produced Bovine Embryos at the Molecular Level. **Theriogenology**, v. 76, n. 8, p. 1433–1441, 2011.
- STOCK, D. et al. The Rotary Mechanism of ATP-Synthase. **Current Opinion in Structural Biology**, v. 10, n. 6, p. 672–679, 2000.
- STOREY, B. T. Mammalian Sperm Metabolism: Oxygen and Sugar, Friend and Foe. **International Journal of Developmental Biology**, v. 52, p. 427–437, 2008.
- STRINGFELLOW, D. A.; SEIDEL, S. M. International Embryo Transfer Manual. **IETS**, p. 145, 2009.
- SUDANO, M. J. et al. Cryotolerance and Global Gene-Expression Patterns of Bos Taurus Indicus and Bos Taurus Taurus in Vitro- and in Vivo-Produced Blastocysts. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 26, n. 8, p. 1129–1141, 2014.
- SUTTON, H. C.; WINTERBOURN, C. C. On the Participation of Higher Oxidation States of

- Iron and Copper in Fenton Reactions. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 6, p. 53–60, 1989.
- TAKAHASHI, M. Oxidative Stress and Redox Regulation on in Vitro Development of Mammalian Embryos. **The Journal of reproduction and development**, v. 58, n. 1, p. 1–9, 2012.
- TANGHE, S. et al. 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. M.; RITTA, M. N. Prognostic Value of Spermatological Parameters as Predictors of in Vitro Fertility of Frozen-Thawed Bull Semen. **Theriogenology**, v. 62, n. 7, p. 1245–1252, 2004.
- THIBIER, M. The 1997 Embryo Transfer Statistics from Around the World. **Data Retrieval Committee Report**, p. 1–11, 1998.
- TRAVIS, A. J. et al. Targeting of a Germ Cell-Specific Type 1 Hexokinase Lacking a Porin-Binding Domain to the Mitochondria as Well as to the Head and Fibrous Sheath of Murine Spermatozoa. **Molecular Biology of the Cell**, v. 9, p. 263–276, 1998.
- UMEZU, K. et al. Stromal Cell-Derived Factor 1 Regulates in Vitro Sperm Migration towards the Cumulus-Oocyte Complex in Cattle. **PLoS ONE**, v. 15, n. 4, p. 1–25, 2020.
- USDA. Dairy Production and Trade Developments. **United States Department of Agriculture and Foreign Agricultural Service**, p. 1–18, 2020.
- USDA. **Livestock and poultry: world markets and trade**. January. Disponível em: <http://apps.fas.usda.gov/psdonline/circulars/livestock_poultry.PDF>. Acesso em: 12 jan. 2021.
- VALKO, M. et al. Free Radicals and Antioxidants in Normal Physiological Functions and Human Disease. **International Journal of Biochemistry and Cell Biology**, v. 39, n. 1, p. 44–84, 2007.
- VARAGO, F. C.; MENDOÇA, L. F.; LAGARES, M. A. Produção in Vitro de Embriões Bovinos: Estado Da Arte e Perspectiva de Uma Técnica Em Constante Evolução. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 32, p. 100–109, 2008.
- VARUZHANYAN, G.; CHAN, D. C. Mitochondrial Dynamics during Spermatogenesis. **Journal of cell science**, v. 133, n. 14, 2020.
- VERSTEGEN, J.; IGUER-OUADA, M.; ONCLIN, K. Computer Assisted Semen Analyzers in Andrology Research and Veterinary Practice. **Theriogenology**, v. 57, p. 149–179, 2002.
- VIANA, J. 2019 Statistics of Embryo Collection and Transfer in Domestic Farm Animals. **Embryo Transfer Newsletter**, v. 38, n. 4, p. 14–26, 2020.

- VIANA, J. H. M. et al. Features and Perspectives of the Brazilian in Vitro Embryo Industry. **Animal Reproduction**, v. 9, n. 1, p. 12–18, 2012.
- VIANA, J. H. M. et al. A Historical Perspective of Embryo-Related Technologies in South America. **Animal Reproduction**, v. 15, n. Suppl. 1, p. 963–970, 2018.
- VIANA, J. H. M.; FIGUEIREDO, A. C. S.; SIQUEIRA, L. G. B. Brazilian Embryo Industry in Context: Pitfalls, Lessons, and Expectations for the Future. **Animal Reproduction**, v. 14, n. 3, p. 476–481, 2017.
- VIGNINI, A. et al. The Production of Peroxynitrite by Human Spermatozoa May Affect Sperm Motility through the Formation of Protein Nitrotyrosine. **Fertility and Sterility**, v. 85, n. 4, p. 947–953, 2006.
- VIGUE, C.; VIGUE, L.; HUSZAR, G. Adenosine Triphosphate (ATP) Concentrations and ATP/Adenosine Diphosphate Ratios in Human Sperm of Normospermic, Oligospermic, and Asthenospermic Specimens and in Their Swim-up Fractions: Lack of Correlation between ATP Parameters and Sperm Creatine Kinase. **Journal of andrology**, v. 13, n. 4, p. 305–311, 1992.
- VILLANI, P. et al. Sperm DNA Fragmentation Induced by DNase I and Hydrogen Peroxide: An in Vitro Comparative Study among Different Mammalian Species. **Reproduction**, v. 140, n. 3, p. 445–452, 2010.
- WANG, W. H.; DAY, B. N.; WU, G. M. How Does Polyspermy Happen in Mammalian Oocytes? **Microscopy Research and Technique**, v. 61, n. 4, p. 335–341, 2003.
- WANG, X. et al. Alterations in Mitochondria Membrane Potential and Oxidative Stress in Infertile Men: A Prospective Observational Study. **Fertility and Sterility**, v. 80, n. SUPPL. 2, p. 844–850, 2003.
- WARD, F. et al. Paternal Influence on the Time of First Embryonic Cleavage Post Insemination and the Implications for Subsequent Bovine Embryo Development in Vitro and Fertility in Vivo. **Molecular Reproduction and Development**, v. 60, n. 1, p. 47–55, 2001.
- WATSON, P. F. The Causes of Reduced Fertility with Cryopreserved Semen. **Animal Reproduction Science**, v. 60–61, p. 481–492, 2000.
- WDOWIAK, A.; BAKALCZUK, S.; BAKALCZUK, G. The Effect of Sperm DNA Fragmentation on the Dynamics of the Embryonic Development in Intracytoplasmic Sperm Injection. **Reproductive Biology**, v. 15, n. 2, p. 94–100, 2015.
- WOLKEN, G. G.; ARRIAGA, E. A. Simultaneous Measurement of Individual Mitochondrial Membrane Potential and Electrophoretic Mobility by Capillary Electrophoresis. **Analytical Chemistry**, v. 86, p. 4217–4226, 2014.

WU, T. P. et al. Effects of Nitric Oxide on Human Spermatozoa Activity, Fertilization and Mouse Embryonic Development. **Archives of Andrology**, v. 50, n. 3, p. 173–179, 2004.

XU, K. P.; GREVE, T. A Detailed Fertilization of Bovine Follicular Oocytes. **Journal of Reproduction & Fertility**, v. 82, p. 127–134, 1988.

ANEXOS

ANEXO 1 - PREPARO MEIO HECM-HEPES: MEIO HH

Reagente	Fabricante/catálogo	mM	Quantidade para 500 mL
NaCl	Sigma S-5886	114	3,331 g
KCl	Sigma P-5405	3,2	0,1195 g
NaHCO ₃	Sigma S-5761	2	0,084 g
HEPES	Sigma H-6147	10	1,19 g
Phenol Red	Sigma P-0290	.	0,0025 g
MEM aa não essenciais	Sigma M-7145	.	5 mL
Ácido Lático	Sigma L-7900	.	0,72 mL
Pirúvico	Sigma P-4862	0,1	0,0055 g
BSA	Sigma A-3311	3mg/mL	1,5 g
Pen/Strepto	Gibco 15140-122	.	2,5 mL
CaCl ₂ 2H ₂ O	Sigma C-7902	2	0,147 g
MgCl ₂ 6H ₂ O	Sigma M-2393	0,5	0,051 g
Água Miliq		.	500 mL

pH 7.3-7.4

Armazenar a 4°C

Válido por 1 mês

ANEXO 2 – EXTRAÇÃO DE RNA E SÍNTESE DE cDNA

EXTRAÇÃO COM KIT PicoPure (Applied Biosystem, EUA)

- Adicionar 40 µL de Extraction Buffer (XB) nas amostras
- Incubar a 42°C/30 minutos, e armazenar no nitrogênio líquido
- Pipetar 250 µL de Condition Buffer (CB) na membrana da coluna de purificação, incubar por 5 minutos a temperatura ambiente
- Centrifugar 16.000 xg/1 minuto
- Adicionar 40 µL de Etanol 70% nas amostras a serem extraídas
- Pipetar o conteúdo a ser extraído nas colunas já condicionadas
- Para que o RNA se ligue a membrana, centrifugar a 100 xg/2 minutos, seguidos de outra centrifugação de 16.000 xg/30 segundos
- Pipetar 100 µL de Washing Buffer 1 (W1) na coluna e centrifugar a 8.000 xg/1 minuto
- Tratamento com DNase (Qiagen, USA #79254): preparar solução de 5 µL de DNase Stock Solution em 35 µL Buffer RDD, pipetar os 40 µL em cada amostra na coluna de extração e incubar por 15 em temperatura ambiente. Adicionar 40 µL de W1 na coluna de extração, centrifugar a 8.000/15 segundos
- Pipetar 100 µL de Washing Buffer 2 (W2) na coluna e centrifugar a 8.000 xg/1 minuto
- Pipetar 100 µL de Washing Buffer 2 (W2) na coluna e centrifugar a 16.000 xg/2 minuto
- Transferir a coluna para um microtubo para coleta do RNA extraído, adicionar 11 µL de Elution Buffer (EB), incubar por um minuto em temperatura ambiente. Centrifugar a 1.000 xg/1 minuto e novamente centrifugar 16.000 xg/1 minuto.

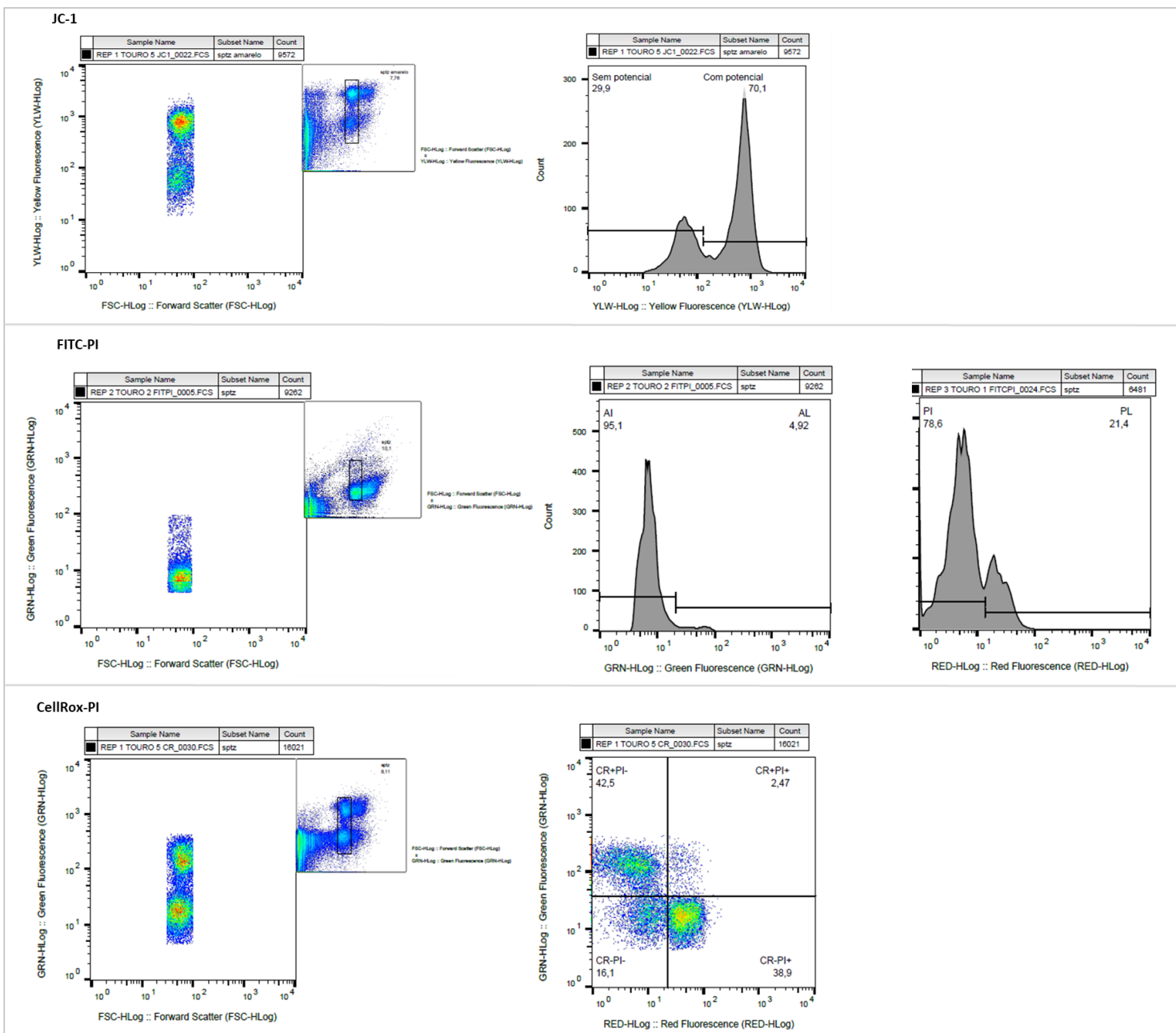
SÍNTESE DE cDNA SuperScript® Vilo® cDNA synthesis (Life Technologies, Califórnia, EUA) – volumes para uma reação

- 4 µL de 5x VILO Reaction Mix
- 2 µL de 10x SuperScript Enzyme Mix
- 10 µL do RNA extraído
- 4 µL de água nuclease free
- Incubar no termociclador a 42°C/60 minutos, seguidos de 85°C/5 minutos
- Armazenar a -20°C até a análise

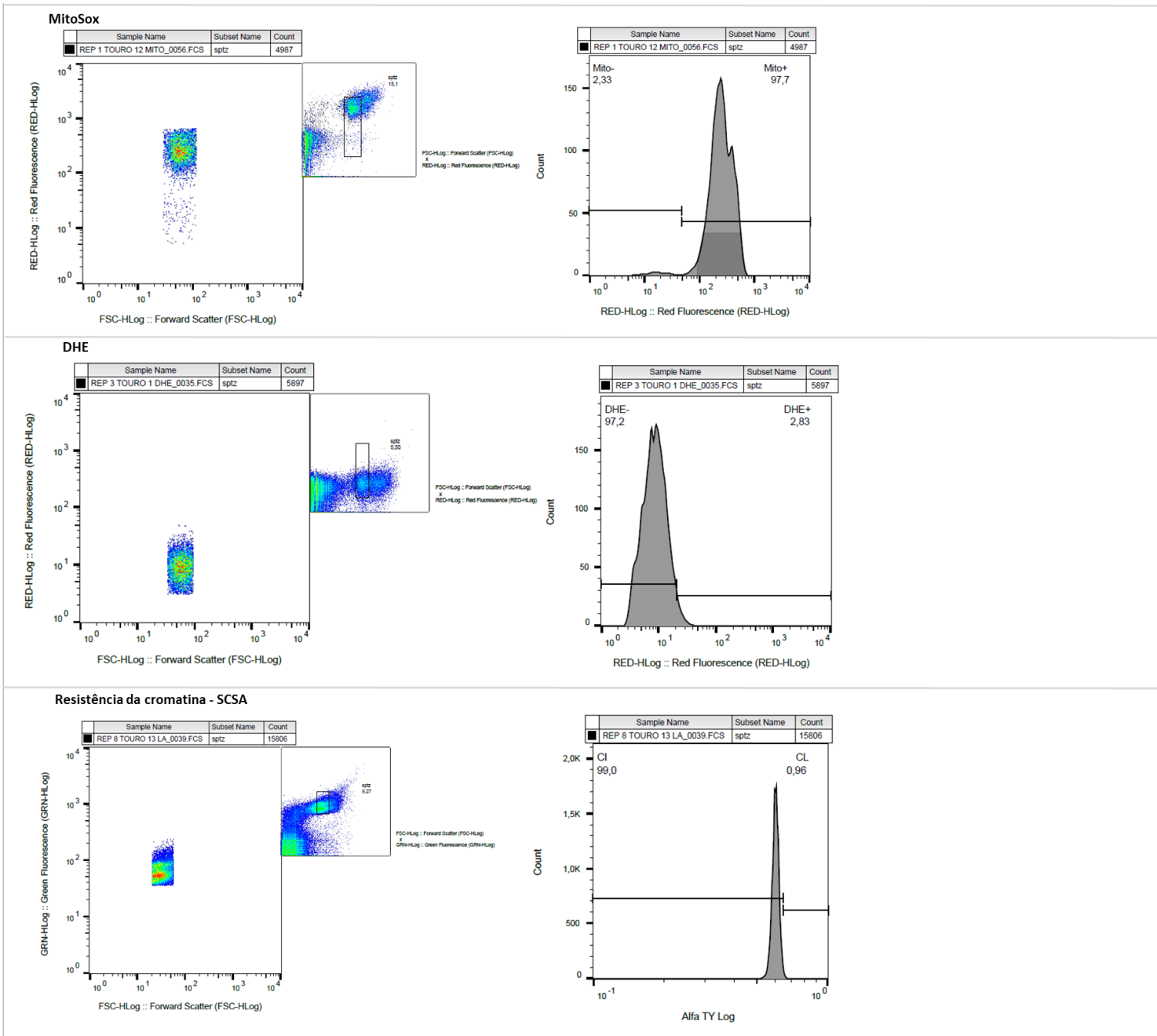
APÊNDICES

APÊNDICE 1 - ANÁLISES CITOMETRO DE FLUXO

Avaliações dos atributos espermáticos ($\Delta\Psi_m$ por JC-1, AI e PI por FITC-PI, estresse oxidativo por CR, MitoSox, DHE e integridade de cromatina por SCSA, respectivamente) pelo Software FlowJo® v10.2. Representados gráficos de intensidade de fluorescência para identificação e seleção da população espermática e histogramas utilizados para corte das populações de interesse.



Continuação Apêndice 1



Fonte: Castiglioni, V. C. (2021)

APÊNDICE 2 - EFEITO DE GRUPOS E VALORES DAS MÉDIAS E ERROS PADRÃO DA MÉDIA OU MEDIANA (QUARTIL INFERIOR; SUPERIOR) POR VARIÁVEL ANALISADA.

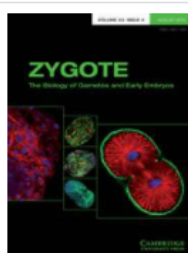
		QUALIDADE ESPERMÁTICA (PI)				
	VARIÁVEIS	ALTO PERFIL	ERRO PADRÃO DA MÉDIA/Q1-Q3	BAIXO PERFIL	ERRO PADRÃO DA MÉDIA/Q1-Q3	VALOR P
PIVE	TX BLAST	17	(13;26)	13,25	(7;18)	0,01
	TX DESENV	29,7	(20,83;39,39)	22,74	(13,1;29,5)	0,0058
	TX BLAST CORR	19,27	(14,5;29)	14,89	(7,9;19,5)	0,009
	TX CLIV	69,83	± 1,2	64,14	± 1,78	0,0096
PRONUCLEO	fecundação normal	49,53	(41,51;54,55)	32,38	(18,52;50)	0,13
	fecundação negativa	50,47	(41,82;56,60)	67,61	(50;81,48)	0,15
	poliespermia	0	(0;1,89)	0	(0;0)	0,97
CITOMETRO	JC-1	82,04	± 1,17	74,86	± 1,34	<,0001
	AI	90,15	± 0,47	84,28	± 0,75	<,0001
	MPI	79,4	± 1,06	69,05	± 1,58	<,0001
	CI	99,1	± 0,26	98,65	± 0,4	0,36
	DHE+	10,78	± 3,92	10,76	± 3,88	0,89
	CR+PI-	20,29	± 2,38	18,04	± 2,42	0,44
	Mito+	34,96	± 6,08	42,63	± 6,51	0,85
MOTIL VISUAL	MOTIL PRE	64,04	± 1,85	63,33	± 1,72	0,77
	MOTIL POS	75,35	± 0,92	73,57	± 1,05	0,21
CASA	VAP (µm/s)	102,32	± 2,27	105,98	± 2,78	0,33
	VSL (µm/s)	89,96	± 2,21	92,89	± 2,85	0,44
	VCL (µm/s)	160,6	± 3,1	171,12	± 3,5	0,02
	ALH (µm)	6,43	± 0,13	7,01	± 0,15	0,006
	BCF (Hz)	33,86	± 0,58	33,76	± 0,62	0,86
	STR (%)	85,12	± 0,64	84,8	± 0,64	0,66
	LIN (%)	55,26	± 0,83	55,18	± 1,04	0,94
	MOTILE (%)	57,12	± 2,19	56,82	± 2,01	0,88
	PROGRESSIVE (%)	43,09	± 1,93	42,53	± 1,78	0,79
	RAPID (%)	49,87	± 2,1	50,5	± 1,95	0,85
	MEDIUM (%)	7,58	± 0,48	7,05	± 0,42	0,48
	SLOW (%)	18,48	± 0,87	17,57	± 0,99	0,36
STATIC (%)	24,09	± 1,92	24,87	± 1,58	0,55	
DAB	DAB I	78,68	± 0,98	78,69	± 0,75	0,98
	DAB II	16,75	± 0,83	16,07	± 0,67	0,65
	DAB III	2	(1;3)	1	(0;3)	0,42
	DAB IV	2	(1;3)	3	(2;4)	0,0205
ÓXIDO NÍTRICO EM MEIO FIV	NO	0,75	(0,29;4,84)	0,1	(0,04;0,22)	0,037

POTENCIAL DE MEMBRANA MITOCONDRIAL (JC1)						
	VARIÁVEIS	MAIOR $\Delta\Psi_m$	ERRO PADRÃO DA MÉDIA/Q1- Q3	MENOR $\Delta\Psi_m$	ERRO PADRÃO DA MÉDIA/Q1- Q3	VALOR P
PIVE	TX BLAST	14	(9,3;25)	15,35	(8,6;21)	0,52
	TX DESENV	25,83	(17,9;39,3)	26,03	(13,1;32,4)	0,33
	TX BLAST CORR	16,17	(10,5;27,6)	17,16	(9,2;22,9)	0,48
	TX CLIV	66,85	± 1,6	67,05	± 1,59	0,96
PRONUCLEO	fecundação normal	45,75	(18,52;50)	40,87	(32,08;54,55)	0,81
	fecundação negativa	53,3	(50;81,48)	59,12	(41,82;67,92)	0,72
	poliespermia	0	(0;0)	0	(0;3,64)	0,31
CITOMETRO	JC-1	81,38	± 1,21	75,5	± 1,39	0,0003
	AI	87,46	± 0,8	87,04	± 0,77	0,54
	MPI	76,58	± 1,42	71,94	± 1,64	0,009
	CI	98,83	± 0,37	98,94	± 0,31	0,82
	DHE+	11,52	± 4,08	10,01	± 3,71	0,41
	CR+PI-	21,82	± 2,48	16,34	± 2,23	0,07
	Mito+	35,78	± 6,34	41,64	± 6,28	0,64
MOTIL VISUAL	MOTIL PRE	62,97	± 1,8	64,4	± 1,77	0,57
	MOTIL POS	75,23	± 1,09	73,69	± 0,88	0,22
CASA	VAP ($\mu\text{m/s}$)	104,26	± 2,61	103,99	± 2,47	0,94
	VSL ($\mu\text{m/s}$)	91,78	± 2,76	91	± 2,28	0,82
	VCL ($\mu\text{m/s}$)	165,37	± 3,25	166,31	± 3,57	0,81
	ALH (μm)	6,66	± 0,14	6,77	± 0,17	0,58
	BCF (Hz)	33,68	± 0,57	33,95	± 0,64	0,77
	STR (%)	84,97	± 0,7	84,94	± 0,57	0,95
	LIN (%)	54,5	± 0,93	56,18	± 0,86	0,26
	MOTILE (%)	54,19	± 1,88	59,97	± 2,23	0,05
	PROGRESSIVE (%)	40,6	± 1,69	45,15	± 1,96	0,08
	RAPID (%)	47,85	± 1,79	52,69	± 2,19	0,09
	MEDIUM (%)	6,83	± 0,39	7,84	± 0,51	0,18
	SLOW (%)	19,02	± 0,95	16,97	± 0,87	0,15
	STATIC (%)	26,33	± 1,71	22,48	± 1,77	0,1
DAB	DAB I	77,54	± 0,98	79,94	± 0,67	0,05
	DAB II	17,21	± 0,77	15,55	± 0,71	0,14
	DAB III	2	(1;4)	1	(1;2)	0,19
	DAB IV	3	(1;3)	2,5	(1;4)	0,67
ÓXIDO NÍTRICO EM MEIO FIV	NO	0,41	(0,04;4,84)	0,25	(0,16;0,63)	0,07

Continuação APÊNDICE 2 - EFEITO DE INTERAÇÃO ENTRE OS GRUPOS E VALORES DAS MÉDIAS E ERROS PADRÃO DA MÉDIA OU MEDIANA (QUARTIL INFERIOR; SUPERIOR) POR VARIÁVEL ANALISADA.

VARIÁVEIS	INTERAÇÃO (PERFIL ESPERM X $\Delta\Psi_m$)								VALOR P	
	ALTO PERFIL MAIOR $\Delta\Psi_m$	ERRO PADRÃO DA MÉDIA/Q1-Q3	ALTO PERFIL MENOR $\Delta\Psi_m$	ERRO PADRÃO DA MÉDIA/Q1-Q3	BAIXO PERFIL MAIOR $\Delta\Psi_m$	ERRO PADRÃO DA MÉDIA/Q1-Q3	BAIXO PERFIL BAIXO $\Delta\Psi_m$	ERRO PADRÃO DA MÉDIA/Q1-Q3		
PIVE	TX BLAST	24	(14;30,14)	15	(10,81;20,65)	11	(7,69;15,28)	16	(7;21)	0,0046
	TX DESENV	34,62	(29,41;46,81)	23,26	(18,6;31,67)	20	(17;25)	27,27	(13,16;32,65)	0,0034
	TX BLAST CORR	26,66	(15,71;33,34)	16,64	(12,03;22,37)	11,8	(8,63;17,54)	18,06	(7,65;22,93)	0,004
	TX CLIV	71,54	± 1,8	68,21	± 1,56	62,39	± 2,23	65,89	± 2,79	0,11
PRONUCLEO	fecundação normal	50	(41,51;67,50)	49,06	(31,48;54,55)	18,52	(17,78;50)	32,69	(32,08;57,69)	0,27
	fecundação negativa	50	(32,50;56,60)	50,94	(41,82;68,52)	81,48	(50;82,22)	67,31	(36,54;67,92)	0,27
	poliespermia	0	(0;1,89)	0	(0;3,64)	0	(0;0)	0	(0;5,77)	0,58
CITOMETRO	JC-1	84,6	± 1,73	79,87	± 1,45	78,65	± 1,47	70,66	± 1,90	0,45
	AI	90,57	± 0,65	89,73	± 0,7	84,36	± 1,09	84,21	± 1,08	0,68
	MPI	80,41	± 1,64	78,39	± 1,36	72,75	± 2,01	65,15	± 2,17	0,17
	CI	99,16	± 0,34	99,06	± 0,41	98,5	± 0,66	98,82	± 0,48	0,68
	DHE+	11,94	± 5,99	9,61	± 5,21	11,09	± 5,68	10,42	± 5,41	0,69
	CR+PI-	24,07	± 3,56	16,32	± 2,98	19,56	± 3,48	16,36	± 3,41	0,62
	Mito+	32,54	± 9,12	37,25	± 8,28	39,01	± 8,98	46,25	± 9,6	0,93
MOTIL VISUAL	MOTIL PRE	64,52	± 2,86	63,57	± 2,41	61,41	± 2,21	65,23	± 2,63	0,35
	MOTIL POS	76,66	± 1,35	74,04	± 1,22	73,8	± 1,68	73,33	± 1,3	0,45
CASA	VAP ($\mu\text{m/s}$)	101	± 3,39	103,71	± 3,06	107,52	± 3,92	104,28	± 4,02	0,41
	VSL ($\mu\text{m/s}$)	88,35	± 3,51	91,65	± 2,69	95,21	± 4,22	90,31	± 3,81	0,26
	VCL ($\mu\text{m/s}$)	161,1	± 4,65	160,2	± 4,18	169,64	± 4,45	172,75	± 5,61	0,67
	ALH (μm)	6,56	± 0,2	6,3	± 0,19	6,77	± 0,19	7,26	± 0,24	0,07
	BCF (Hz)	33,16	± 0,67	34,61	± 0,96	34,21	± 0,92	33,26	± 0,83	0,16
	STR (%)	84,28	± 0,96	86	± 0,81	85,66	± 1,01	83,84	± 0,75	0,05
	LIN (%)	53,9	± 1,23	56,7	± 1,04	55,09	± 1,41	55,33	± 1,54	0,34
	MOTILE (%)	51,76	± 2,4	62,75	± 3,34	56,61	± 2,87	57,05	± 2,89	0,07
	PROGRESSIVE (%)	38,52	± 2,45	47,9	± 2,65	44,28	± 2,63	42,26	± 2,82	0,0562
	RAPID (%)	45,09	± 2,3	54,9	± 3,26	50,61	± 2,68	50,36	± 2,92	0,07
	MEDIUM (%)	7,09	± 0,57	8,1	± 0,79	6,57	± 0,54	7,57	± 0,66	0,77
	SLOW (%)	20	± 1,32	16,9	± 1,03	18,04	± 1,37	17,05	± 1,45	0,5
STATIC (%)	27,9	± 2,39	20,1	± 2,83	24,76	± 2,45	25	± 2	0,05	
DAB	DAB I	76,61	± 1,5	80,85	± 1,07	78,47	± 1,27	78,94	± 0,73	0,12
	DAB II	18,14	± 1,23	15,3	± 1,04	16,28	± 0,94	15,83	± 0,99	0,27
	DAB III	3	(1;4)	2	(1;2)	2	(1;3)	1	(0;3)	0,45
	DAB IV	2	(1;3)	2	(1;3,5)	3	(2;4)	3,5	(2;4)	0,36
ÓXIDO NÍTRICO EM MEIO FIV	NO	4,84	(0,79;5,13)	0,29	(0;0,71)	0,04	(0;0,04)	0,22	(0,16;0,63)	0,03

APÊNDICE 3 – 1º ARTIGO RELACIONADO À TESE PUBLICADO



Zygote

Article contents





Summary

Footnotes

References

Lipid peroxidation in bull semen influences sperm traits and oxidative potential of Percoll®-selected sperm

Published online by Cambridge University Press: 05 April 2021

Vivian Cardoso Castiglioni , Adriano Felipe Perez Siqueira, Luana de Cássia Bicudo, Tamie Guibu de Almeida, Thais Rose dos Santos Hamilton , Leticia Signori de Castro, Camilla Mota Mendes, Marcílio Nichi, João Diego de Agostini Losano , José Antônio Visitin and Mayra Elena Ortiz D'Ávila Assumpção 

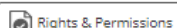
Show author details 

Article Metrics

Get access

Share 

Cite 

Rights & Permissions 

Summary

Although bovine embryo *in vitro* production (IVP) is a common assisted reproductive technology, critical points warrant further study, including sperm traits and oxidative status of sperm for *in vitro* fertilization (IVF). Our aim was to evaluate whether the lipid peroxidation index of commercial bull semen is influenced by sperm traits and oxidative status of sperm populations selected using Percoll® gradient. Semen straws from 48 batches from 14 Nelore bulls were thawed individually, analyzed for motility and subjected to Percoll selection. After Percoll, the lipid peroxidation index of the extender was evaluated, whereas selected sperm were analyzed for motility, acrosome and membrane integrity, mitochondrial membrane potential, chromatin resistance and oxidative potential under IVF conditions. Batches were divided retrospectively in four groups according to lipid peroxidation index. Sperm from Group 4 with the lowest index of lipid peroxidation had, after Percoll selection, greater plasma membrane integrity (81.3%; $P = 0.004$), higher mitochondrial potential (81.1%; $P = 0.009$) and lower oxidative potential (135.3 ng thiobarbituric acid reactive substances (TBARS)/ml; $P = 0.026$) compared with Group 1 with highest lipid peroxidation index (74.3%, 73% and 213.1 ng TBARS/ml, respectively). Furthermore, we observed negative correlations for the lipid peroxidation index with motility, membrane integrity and mitochondrial potential, and positive correlations with oxidative potential. In conclusion, oxidative stress in semen straws, as determined using lipid peroxidation in the extender, is associated with sperm traits and their oxidative potential under IVF conditions. These results provided further insights regarding the importance of preventing oxidative stress during semen handling and cryopreservation, as this could affect sperm selected for IVF. Finally, Percoll selection did not completely remove sperm with oxidative markers.

Keywords

Bull sperm

Oxidative stress

Sperm traits

TBARS