

RAPHAELA GABRIELLE BRITO SOUSA

**AVALIAÇÃO DA SUSCEPTIBILIDADE ESPERMÁTICA À
DIFERENTES DESAFIOS OXIDATIVOS EM AMOSTRAS SEMINAIS
CRIOPRESERVADAS DE TOUROS ANGUS DE BAIXA E ALTA
FERTILIDADE**

São Paulo

2021

RAPHAELA GABRIELLE BRITO SOUSA

**AVALIAÇÃO DA SUSCEPTIBILIDADE ESPERMÁTICA À
DIFERENTES DESAFIOS OXIDATIVOS EM AMOSTRAS SEMINAIS
CRIOPRESERVADAS DE TOUROS ANGUS DE BAIXA E ALTA
FERTILIDADE**

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

Departamento:

Reprodução Animal

Área de concentração:

Reprodução animal

Orientador:

Prof. Dr. Marcilio Nichi

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

T. 4102
FMVZ

Sousa, Raphaela Gabrielle Brito
Avaliação da susceptibilidade espermática à diferentes desafios oxidativos em amostras seminais criopreservadas de touros Angus de baixa e alta fertilidade / Raphaela Gabrielle Brito Sousa. – 2021.
65 f. : il.

Dissertação (Mestrado) – 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.

Orientador: Prof. Dr. Marcilio Nichi.

1. Status oxidativo. 2. Criopreservação. 3. Sêmen. 4. Reprodução. 5. Espécies reativas de oxigênio. I. Título.



CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Avaliação espermática de danos oxidativos de touros de baixa e alta fertilidade", protocolada sob o CEUA nº 9508130418 (ID 006872), sob a responsabilidade de **Marcílio Nichi** e equipe; *Raphaela Gabrielle Brito Sousa* - 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 14/08/2019.

We certify that the proposal "Sperm evaluation of oxidative damage of bulls with low and high fertility", utilizing 20 Bovines (20 males), protocol number CEUA 9508130418 (ID 006872), under the responsibility of **Marcílio Nichi and team**; *Raphaela Gabrielle Brito Sousa* - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the School of Veterinary Medicine and Animal Science (University of São Paulo) (CEUA/FMVZ) in the meeting of 08/14/2019.

Finalidade da Proposta: [Pesquisa](#)

Vigência da Proposta: de 05/2018 a 05/2020 Área: Reprodução Animal

Origem: [Animais provenientes de estabelecimentos comerciais](#)

Espécie: [Bovinos](#) sexo: [Machos](#) idade: [2 a 10 anos](#) N: [20](#)

Linhagem: [Variados, taurinos e zebrinos](#) Peso: [600 a 800 kg](#)

Local do experimento: As amostras de sêmen congelado serão avaliadas no Laboratório de Andrologia (LA) no Departamento de Reprodução Animal FMVZ/USP

São Paulo, 30 de abril de 2020

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-Coordenador

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: SOUSA, Raphaela Gabrielle Brito

Título: AVALIAÇÃO DA SUSCEPTIBILIDADE ESPERMÁTICA À DIFERENTES DESAFIOS OXIDATIVOS EM AMOSTRAS SEMINAIS CRIOPRESERVADAS DE TOUROS ANGUS DE BAIXA E ALTA FERTILIDADE

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

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

DEDICATÓRIA

Dedico,

à minha mamãe Dirce Efigênia Brito Lopes e Oliveira, que é meu maior exemplo familiar e profissional, que me ensinou que é depois da chuva que aparece o arco-íris, que me diz que mesmo que pareça distante continue a dar passo a passo... E esse é o primeiro de muitos passos que serão dados em minha vida! Foi a senhora, mamãe, que mesmo a distância se fez presente em todos os momentos, este trabalho é pra senhora, minha guerreira!

(Bejinho de olho)

AGRADECIMENTOS

Quanta alegria!!!! Finalizar este trabalho com um sorriso no rosto após tanto tempo de incertezas, seja pela pandemia, seja pelo medo de não dar conta... E quando falo em não dar conta, foram às pessoas citadas abaixo que me deram força e apoio em momentos desta longa trajetória.

Agradeço,

À Deus, por todas as bênçãos proporcionadas a mim.

Ao meu orientador Marcilio Nichi, que mais que um pai e amigo, abriu as portas do laboratório e me aceitou como sua aluna. Sinto-me honrada por fazer parte da sua equipe! Obrigada por seu cuidado, carinho, por nossas noites do poker e comidas (yakissoba, hambúrguer), por me ensinar a melhor maionese verde do planeta, entre tantas outras coisas. Obrigada principalmente por me ensinar a ser um ser humano da paz, que ajuda as pessoas e tem companheirismo. Não tinha melhor escolha para ser meu orientador.

À Gabriel Warmilon, meu irmãozão, meu brother! Que mesmo longe esteve presente aguentou meu choro e meu sorriso. Foram tantas conversas e decisões em conjunto. Aquele que é tão parecido comigo que brincamos que eu sou ele de cabelo. Eu te amo muito e você sempre será um exemplo para mim. Reserva um lugar que logo eu chego por aí!

À mamãe Dirce, preocupada sempre comigo, companheira. Obrigada por todo auxílio psicológico e pelo financiamento do meu curso com a “mãePESP”. Eu te amo muito.

Ao meu pai Leca e à minha irmã Anna Clara, pela preocupação e pelo cuidado.

Ao meu namorado Andrei dos Santos, que apareceu na minha vida como meu amor em meio ao caos, mas me ensina cada dia mais sobre a serenidade e paciência.

Aos meus tios e tias, que me auxiliam, preocupam e cuidam de mim, mesmo à distância. Em especial à Tia Daisy, que sempre ora por nós e, assim como minhas outras tias, é uma guerreira. À Tia Deny e Tia Lene por todo apoio.

Aos meus primos, por momentos de descontração. Em especial à minha enfermeira Kamille, pois é para ela que eu mando mensagem de madrugada falando “Mimiiii, me ajuda”. Ela é meu maior exemplo de empatia.

Aos meus amigos, Gabriel Novaes (ele aparecerá mais abaixo, em especial); à Jamile Garcia, pelas farras e conversas; ao Derek, por me irritar (brincadeira) e pelos bate-papos; à Monica Degraf Cavallin, por TUDO, pelas conversas, presença e preocupação; à Julia Simões, por toda paciência e por nossas baladinhas na Vila Mada; ao João, aquele que surtou comigo na reta final; ao Hiroshi, que apareceu e me mostrou como é bom o pisco peruano; à Raysa, amiga do Pará, que come açaí com carne (chique demais) e ainda ira me ensinar a comer.

Ao irmão que a vida me deu, Gabriel. Ensinei esse menino chato até a cozinhar... meu companheiro de vida em SP, dos roles gastronômicos sempre! Por isso eu engordei, por ser amiga do Gabriel! Valeu, Gah!

À Jamile Garcia, por todas as loucuras, desde a faculdade, desde antes da faculdade ainda.... Minha companheira, nossas conversas, metas, rolês, estudos, nossos estresses hehehehe. Minha amiga para sempre!

À Mônica, que desde a primeira disciplina, quando ela não era nem mesmo aluna e mesmo assim foi minha companheira de bandeco. Ainda foi minha confidente, amiga, mãe. Exemplo de mulher!

À Samantha, ou Samanthinha, como eu a chamo normalmente. Minha amiga cacheada que está um pouco longe, mas é quem me liga, pergunta, se disponibiliza a ajudar sempre. Nossas conversas na madrugada foram essenciais!

Aos colegas de laboratório, em especial à Bobbie por seus cuidados e ao João Diego, que mais que um colega foi um amigo que auxiliou durante toda a confecção deste trabalho, desde a escolha do orientador até a entrega final.

Aos colegas de departamento Bianca, Marcel, Daniel, Brunão, Giulia, Ken, Henrique, Álvaro, Nívea, entre tantos outros, por todas as discussões e brincadeiras. Em especial à professora Thais, que foi uma grande desafiadora e me auxiliou neste trabalho.

Aos professores do Departamento, em especial à professora Mayra, que me deu oportunidade de iniciar minha carreira acadêmica.

Ao BIOSPZ, em especial à professora Thais, por todo auxílio na presente pesquisa.

Aos colegas de república, primeiramente, desculpa! Sei que sou chata, mas tivemos momentos muito especiais em casa, no nosso lar!

À Harumi, pela paciência e por todo cuidado para conosco, alunos da pós-graduação. Sem você seria tudo mais difícil.

Aos funcionários do VRA. Por manter toda infraestrutura para que esta pesquisa fosse realizada.

À CRV, pela oportunidade de trabalhar com as amostras e poder honrá-las da melhor forma possível.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) – Código de financiamento 88882.376386/2019-01

Muito obrigada! Sem vocês nada disso teria acontecido!

***“He told me, son, sometimes it may seem dark
But the absence of the light is a necessary part
Just know, you're never alone
You can always come back home***

You can always come back

***Every road is a slippery slope
There is always a hand that you can hold on to
Looking deeper through the telescope
You can see that your home's inside of you***

***Just know, that wherever you go
No, you're never alone
You will always get back home”***

93 Million Miles- Jason Mraz

RESUMO

SOUSA, R G B. Avaliação da susceptibilidade espermática à diferentes desafios oxidativos em amostras seminais criopreservadas de touros angus de baixa e alta fertilidade, 2021. 65 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2021.

O efeito reprodutivo individual do touro é conhecido por ser de extrema importância, uma vez que o touro pode fertilizar grande número de fêmeas. Tal efeito pode ser mais acentuado com o uso de sêmen criopreservado que permite que o material genético de touros superiores seja conservado e transmitido ao rebanho. No entanto, lotes subfêrteis podem levar a perdas significativas. Isto pode ocorrer, pois alguns touros apresentam características espermáticas dentro dos valores preconizados para a análise rotineira, mas com baixo índice de fertilidade. O que pode prejudicar a fertilidade é o estresse oxidativo. Visando evitar esse efeito, a terapia antioxidante pode ser alternativa. No entanto, escolher o antioxidante certo é a chave para o sucesso da terapia. Portanto, o objetivo deste estudo foi avaliar a susceptibilidade de espermatozoides de touros com diferentes taxas de fertilidade a diferentes desafios oxidativos com o objetivo de detectar os mais deletérios. Para tanto, 20 palhetas de sêmen de touros altamente férteis ($n = 10$) e pouco férteis ($n = 10$) foram descongelados e submetidos a desafios oxidativos induzidos (ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), radical hidroxila (OH^{\bullet}) e o subproduto tóxico da peroxidação lipídica (malondialdeído (MDA)). A fertilidade foi determinada usando índice baseado em 170.000 inseminações artificiais realizadas em 543 fazendas. As amostras foram avaliadas quanto ao subproduto da peroxidação lipídica (substâncias reativas com ácido tiobarbitúrico), cinética espermática (CASA), atividade mitocondrial (3'3 diaminobenzidina), estado oxidativo (CellROX verde e 2'-7 'diclorofluoresceína diacetato), potencial mitocondrial (JC-1), integridade do DNA (SCSA), integridade das membranas plasmática (eosina-nigrosina) e acrossomal (*Fast green/ rosa bengala*). Independentemente da fertilidade, a indução de hidroxila reduziu a atividade mitocondrial, enquanto a incubação com peróxido aumentou a atividade mitocondrial. No entanto, o grupo do peróxido foi altamente deletério para a cinética dos espermatozoides tanto em touros de alta quanto baixa fertilidade. O grupo de baixa fertilidade apresentou aumento da peroxidação nas amostras incubadas com peróxido de hidrogênio, enquanto o grupo

de alta fertilidade foi mais suscetível ao radical hidroxila. Em conclusão, H_2O_2 e $OH\cdot$ parecem ser as EROs mais deletérias para os espermatozoides bovinos, sendo que o grupo de baixa fertilidade é altamente afetado pelo peróxido de hidrogênio.

Palavras-chave: *Status* Oxidativo. Criopreservação. Sêmen. Reprodução. Espécies reativas de oxigênio.

ABSTRACT

SOUSA, R G B. Evaluation of sperm susceptibility to different oxidative challenges in cryopreserved seminal samples of low and high fertility angus bulls. 2021. 65 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2021.

Fertility is the most important trait to consider in cattle reproductive management. In this regard, individual effect of bull is known to be of utmost importance as a bull can fertilize large numbers of females. Such effect can be even more pronounced when using cryopreserved semen, which allows the genetic material of superior bulls to be conserved and transmitted to the herd; However, sub fertile batches may lead to significant losses. This may occur due to bulls with seminal characteristics within the recommended values in the routine analysis but with lower fertility values. An important factor that may lead to impaired fertility is oxidative stress. Aiming to avoid this effect, an antioxidant therapy may be an alternative. However, choosing the right antioxidant is key to a successful therapy. Therefore, the aim of this study was to evaluate the susceptibility of bull spermatozoa with different fertility rates to different oxidative challenges aiming to detect the most deleterious. Toward this aim, 20 semen batches of highly fertile (n=10) and low fertile bulls (n=10) were thawed and submitted to induced oxidative challenges (superoxide anion [$O_2^{\bullet-}$], hydrogen peroxide [H_2O_2], hydroxyl radical [OH^{\bullet}] and the toxic by-product of lipid peroxidation (malondialdehyde [MDA])). Fertility was determined using an index based on 170,000 timed artificial inseminations in 543 farms. Samples were assessed for the quantification of the by-product of lipid peroxidation (thiobarbituric acid reactive substances), sperm kinetics (CASA), mitochondrial activity (3'3 diaminobenzidine), oxidative status (CellROX green and 2'-7' dichlorofluorescein diacetate), mitochondrial potential (JC-1), DNA integrity (SCSA), and plasma membrane (eosin-nigrosin) and acrosome integrity (fast green/rose bengal). Regardless of fertility, hydroxyl induction reduced mitochondrial activity, whereas peroxide incubation increased mitochondrial activity. However, the peroxide group was highly deleterious to sperm kinetics. The low fertility group presented increased peroxidation in samples incubated with hydrogen peroxide whereas the high fertility group was more susceptible to hydroxyl. In conclusion, H_2O_2 e OH^{\bullet} appears to be the most

deleterious ROS to bovine sperm with the oxidative status of the low fertility group highly affected by the hydrogen peroxide.

Keywords: Oxidative Status. Cryopreservation. Semen. Reproduction. Oxygen-reactive species

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Formação das espécies reativas de oxigênio	27
Figura 2. Índices de fertilidade alta e baixa e desafio oxidativo no qual as amostras foram submetidas (Controle, ânion superóxido, peróxido de hidrogênio, radical hidroxila e malondialdeído).....	33

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Efeito das incubações com sistemas geradores de diferentes espécies reativas de oxigênio e do subproduto da peroxidação lipídica ($O_2^{\bullet-}$, H_2O_2 , OH^{\bullet} , MDA) sobre as variáveis avaliadas pela análise espermática computadorizada (CASA), em touros de alta fertilidade da raça Angus. São Paulo, SP – 2021.....	40
Tabela 2. Efeito das incubações com sistemas geradores de diferentes espécies reativas de oxigênio e do subproduto da peroxidação lipídica ($O_2^{\bullet-}$, H_2O_2 , OH^{\bullet} , MDA) sobre os parâmetros em lâmina de membrana, acrossomo e de integridade da membrana e da atividade mitocondrial (JC-1) , em touros de alta fertilidade da raça Angus. São Paulo, SP – 2021.....	42
Tabela 3. Efeito das incubações com sistemas geradores de diferentes espécies reativas de oxigênio e do subproduto da peroxidação lipídica ($O_2^{\bullet-}$, H_2O_2 , OH^{\bullet} , MDA) sobre as variáveis de atividade mitocondrial (DAB I, II, III, IV e V; INDICE DAB) e potencial de membrana mitocondrial (PMM), em touros de alta fertilidade da raça Angus. São Paulo, SP – 2021.....	44
Tabela 4. Efeito das incubações com sistemas geradores de diferentes espécies reativas de oxigênio e do subproduto da peroxidação lipídica ($O_2^{\bullet-}$, H_2O_2 , OH^{\bullet} , MDA) sobre as variáveis relacionadas á estresse oxidativo (CELL-ROX, TBARS e LA), em touros de alta fertilidade da raça Angus. São Paulo, SP – 2021.....	46
Tabela 5. Efeito das incubações com sistemas geradores de diferentes espécies reativas de oxigênio e do subproduto da peroxidação lipídica ($O_2^{\bullet-}$, H_2O_2 , OH^{\bullet} , MDA) sobre as variáveis avaliadas pela análise espermática computadorizada (CASA), em touros de baixa fertilidade da raça Angus. São Paulo, SP – 2021.....	48
Tabela 6. Efeito das incubações com sistemas geradores de diferentes espécies reativas de oxigênio e do subproduto da peroxidação lipídica ($O_2^{\bullet-}$, H_2O_2 , OH^{\bullet} , MDA) sobre os parâmetros em lâmina de membrana, acrossomo e de integridade da membrana e da atividade mitocondrial (JC-1) , em touros de baixa fertilidade da raça Angus. São Paulo, SP – 2021.....	50

Tabela 7. Efeito das incubações com sistemas geradores de diferentes espécies reativas de oxigênio e do subproduto da peroxidação lipídica ($O_2^{\bullet-}$, H_2O_2 , OH^{\bullet} , MDA) sobre as variáveis de atividade mitocondrial (DAB I, II, III, IV e V; INDICE DAB) e potencial de membrana mitocondrial (PMM), em touros de baixa fertilidade da raça Angus. São Paulo, SP – 2021.....52

Tabela 8. Efeito das incubações com sistemas geradores de diferentes espécies reativas de oxigênio e do subproduto da peroxidação lipídica ($O_2^{\bullet-}$, H_2O_2 , OH^{\bullet} , MDA) sobre as variáveis relacionadas á estresse oxidativo (CELL-ROX, TBARS e LA), em touros de alta fertilidade da raça Angus. São Paulo, SP – 2021.....54

LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 1.** Efeito na motilidade total em relação do sistemas geradores de diferentes espécies reativas de oxigênio e do subproduto da peroxidação lipídica ($O_2^{\bullet-}$, H_2O_2 , OH^{\bullet} , MDA) em touros de **alta** fertilidade.....39
- Gráfico 2.** Efeito no INDAB em relação do sistemas geradores de diferentes espécies reativas de oxigênio e do subproduto da peroxidação lipídica ($O_2^{\bullet-}$, H_2O_2 , OH^{\bullet} , MDA) em touros de **alta** fertilidade.....43
- Gráfico 3.** Efeito na avaliação TBARS em relação do sistemas geradores de diferentes espécies reativas de oxigênio e do subproduto da peroxidação lipídica ($O_2^{\bullet-}$, H_2O_2 , OH^{\bullet} , MDA) em touros de **alta** fertilidade.....45
- Gráfico 4.** Efeito na motilidade total em relação do sistemas geradores de diferentes espécies reativas de oxigênio e do subproduto da peroxidação lipídica ($O_2^{\bullet-}$, H_2O_2 , OH^{\bullet} , MDA) em touros de **baixa** fertilidade.....47
- Gráfico 5.** Efeito no INDAB em relação do sistemas geradores de diferentes espécies reativas de oxigênio e do subproduto da peroxidação lipídica ($O_2^{\bullet-}$, H_2O_2 , OH^{\bullet} , MDA) em touros de **baixa** fertilidade.....51
- Gráfico 6.** Efeito na avaliação TBARS em relação do sistemas geradores de diferentes espécies reativas de oxigênio e do subproduto da peroxidação lipídica ($O_2^{\bullet-}$, H_2O_2 , OH^{\bullet} , MDA) em touros de **baixa** fertilidade.....53

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLA

%	Porcentagem
®	Marca registrada
<	Menor que
CASA	Computer Assited Sperm Analysis
Cu ⁺⁺	Cobre
DAB	3,3 diaminobenzidina
DHA	Ácido decosahexanoico
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DPBS	Dulbecco's phophate-buffered saline
EDTA	Etilenodiaminotetracético
ENMI	Estresse oxidativo Negativo e Membrana plasmática Íntegra
ENML	Estresse oxidativo Negativo e Membrana plasmática Lesada
EMI	Estresse oxidativo Positivo e Membrana plasmática Íntegra
EML	Estresse oxidativo Positivo e Membrana plasmática Lesada
EROs	Espécies Reativas de Oxigênio
Fe ⁺⁺	Ferro
FITC	Fluorescein isothiocyanate
FITC-PSA	Fluorescein isothiocyanate – Pisum sativum agglutinin
g	Força gravitacional
GPx	Glutathiona peroxidase
GSH	Glutathiona
H ₂ O	Molécula de água
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
JC-1	5,5',6,6'-tetracloro-1,1',3,3'201cloreto de tetraetil-benzimidazolilcarbocianina
Kg	Quilograma
LA	Laranja de acridina
M	Molar
MDA	Malondialdeído
mL	Mililitro
mM	Milimolar

N	Número de amostragem
NaCl	Cloreto de sódio
NADH	Nicotinamide adenine dinucleotide
NADPH	Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate
NAOH	Hidróxido de sódio
ng	Nanogramas
O ₂ ⁻	Ânion superóxido
°C	Graus Celsius
OH•	Radical hidroxila
p	Nível de significância
PBS	Solução tampão de fosfato
pH	Potencial hidrogênio iônico
PI	Iodeto propidium
PUFA	Polynsaturated fatty acid
qsp	Quantidade suficiente para
SOD	Superóxido dismutase
Sptz	Espermatozoides
TBA	Ácido tiobarbitúrico
TBARS	Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúricos
µL	Microlitro
µM	Micromolar

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	22
2 REVISÃO DE LITERATURA	25
2.1 A IMPORTÂNCIA DA FERTILIDADE	25
2.2 A CRIOPRESERVAÇÃO ESPERMÁTICA	25
2.3 ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO (EROS)	26
2.3.1 Radical superóxido ($O_2\cdot^-$)	27
2.3.2 Peróxido de hidrogênio (H_2O_2)	28
2.3.3 Radical hidroxila ($OH\cdot$)	28
2.3.4 Malondialdeído (MDA).....	28
2.4 ANTIOXIDANTES	29
3 HIPÓTESE.....	30
4 OBJETIVOS.....	31
5 MATERIAIS E MÉTODOS	32
5.1 AMOSTRAS SEMINAIS	32
5.2 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	32
5.3 PROCESSAMENTO DO SÊMEN	33
5.4 SISTEMA DE GERAÇÃO DE EROS E SUBPRODUTO DA PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA.....	33
5.5 ANÁLISES ESPERMÁTICAS.....	34
5.5.1 Análise computadorizada da cinética espermática	34
5.5.2 Análises funcionais do sêmen	34
5.5.2.1 Testes funcionais	35
5.5.2.2 Ensaio citotóxico 3,3' diaminobenzidina.....	36
5.5.2.3 Integridade acrossomal	37
5.5.2.4 Integridade da membrana plasmática	37
5.5.2.5 Resistência espermática ao estresse oxidativo.....	37
5.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA	38
6 RESULTADOS.....	39

6.1 Grupo de Alta fertilidade.....	39
6.2 Grupo de Baixa fertilidade.....	47
7 DISCUSSÃO.....	55
8 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	58
REFERÊNCIAS.....	59
ANEXOS.....	65

1 INTRODUÇÃO

O Brasil é o segundo maior produtor de carne bovina do mundo e possui o maior rebanho comercial mundial, dados relatam que o país apresenta cerca de 213,68 milhões de bovinos (ABIEC, 2020). É importante ressaltar que o ano de 2020 foi marcado pela pandemia do novo coronavírus, impactando diretamente nos setores do agronegócio (USDA, 2020).

Em 2020 o PIB brasileiro apresentou queda de 4,1% em relação ao ano anterior, mas o PIB relacionado à pecuária durante o mesmo período aumentou sua representatividade em relação ao PIB total, passando de 8,4% para 10%, fortalecendo o setor na economia brasileira (ABIEC, 2021).

Neste cenário, a Associação Brasileira de Angus encerrou o ano de 2020 batendo a marca histórica de carne Angus certificada, enviada ao mercado externo. A China foi o destino principal do produto no mercado internacional, elevando de 22,1% para 40,3% das exportações sua participação (IBGE, 2020).

No entanto, a eficiência da produção de carne bovina no Brasil ainda pode ser otimizada utilizando as biotécnicas reprodutivas. Como exemplo, podemos destacar que apenas 15,9% do rebanho bovino é inseminado artificialmente (BARUSELLI, 2019). Neste sentido, o aumento da utilização de biotécnicas reprodutivas pode aumentar de maneira significativa a produtividade do rebanho (SILVA, 2018).

Biotécnica fundamental para logística da implementação de outras tecnologias aplicadas a reprodução (ex: inseminação artificial, transferência de embriões) é a criopreservação das células espermáticas. Além disto, esta tecnologia permite a utilização do sêmen por períodos indeterminados (congelamento), diminui riscos e custos de transporte de animais e maximiza a rápida difusão de material genético de machos de alto valor zootécnico (CASTELO *et al.*, 2008). Porém, a criopreservação de sêmen é uma técnica que promove grande estresse celular e predispõe os espermatozoides a condições extremamente desfavoráveis (PURDY, 2008), induzindo danos às membranas, redução da motilidade e fragmentação de DNA (LUCIO *et al.*, 2016). De fato, estudos indicam que 40 a 50% das células espermáticas submetidas ao processo de criopreservação não sobrevivem ao procedimento (THOMAS *et al.*, 1998). Dentre os fatores responsáveis pelas crioinjúrias, destacam-se a formação de cristais de gelo intracelulares (HOLT W,

NORTH R, 1994) e o aumento da osmolaridade (MEDEIROS, 2002) do meio. Tais fatores podem levar á lesões das organelas intracelulares, destacando-se alterações mitocondriais, principal fonte de energia para o metabolismo de células aeróbias (HOLT W, NORTH R, 1994).

Durante o processo de produção de energia em forma de ATP pela mitocôndria, formam-se metabólitos de oxigênio denominadas espécies reativas de oxigênio (EROs). Estas desempenham papel fundamental nos processos fisiológicos. No entanto, para que isso ocorra, é necessário que haja um balanço entre as EROs e seus mecanismos de controle, os antioxidantes (KOPPERS *et al.*, 2008). No caso de desbalanço, caracteriza-se o estresse oxidativo, potencialmente lesivo para todas as biomoléculas (lipídeos, carboidratos, proteínas, DNA e RNA) (WATSON, 1981). Para o espermatozoide, célula aeróbia, as EROs também participam de seu funcionamento fisiológico (ex: a capacitação espermática, hiperativação da motilidade e reação acrossomal) (O'FLAHERTY C, BEORLEGUI N, BECONI MT, 2003). No entanto, o desbalanço no sistema oxidante-antioxidante é extremamente deletério para o espermatozoide, pois esta célula possui reduzida capacidade antioxidante devido ao seu reduzido citoplasma. Além disto, o espermatozoide é rico em ácidos graxos poli-insaturados, mais facilmente oxidados (DOWLING, 2009), sendo que condições pró- oxidativas podem ser letais para a célula espermática (ANGRIMANI *et al.*, 2015).

As EROs são formadas em reação em cadeia, na qual o ânion superóxido (O_2^-), leva à formação do peróxido de hidrogênio (H_2O_2), que por sua vez forma o radical hidroxila ($OH\bullet$). A formação excessiva de EROs causará danos oxidativos, levando à peroxidação lipídica, (DROGE,2002) associada à diminuição da fertilidade o estresse oxidativo (BILODEAU, 2000). No entanto, cada espécie reativa é preferencialmente controlada por mecanismos antioxidantes distintos. Neste caso, o ânion superóxido é eliminado pela enzima superóxido dismutase (SOD), o peróxido de hidrogênio eliminado pelas enzimas catalase (CAT) e glutathiona peroxidase (GPx) e o radical hidroxila eliminado por mecanismos não enzimáticos (vitaminas C, E). Além disto, sabe-se que subprodutos do estresse oxidativo como o malondialdeído (MDA) podem ser tão ou mais deletérios que as próprias EROs (KAWAI *et al.*,2017).

Durante a criopreservação dos espermatozoides, lesões mitocondriais podem levar a liberação de fatores pró-oxidativos. De fato, uma série de estudos indicam o

estresse oxidativo como principal fonte de crioinjúrias. Frente a isso, estudos vem sendo realizados para manter a integridade do espermatozoide durante a criopreservação, ficando evidenciada nas pesquisas a importância dos antioxidantes na proteção celular (RUI *et al.*,2017). A avaliação de quais EROs são mais prejudiciais é de fundamental importância, pois cada espécie reativa possui um mecanismo antioxidante ideal (NICHI, 2003).

Sendo assim, trabalhos que avaliem a ação deletéria das EROs ainda devem ser realizados, principalmente no tocante a espermatozoides criopreservados de touros classificados em alta e baixa fertilidade.

2 REVISÃO DE LITERATURA

A pecuária brasileira possui destaque no cenário mundial e está presente em todos os estados, sendo de suma importância para a economia no Brasil. Dentro deste seguimento, a bovinocultura, incluindo a cadeia produtiva de leite e carnes, busca o uso de tecnologias para melhorar a eficiência produtiva a fim de otimizar os resultados de produção, implementando biotecnologias (EMERICK *et al.*, 2011).

As biotecnologias como a IA (Inseminação Artificial) e PIVE (Produção *in vitro* de embriões) atuam permitindo o aumento na produção (SARTORI *et al.*, 2016). As vantagens da utilização destas técnicas estão ligadas ao aproveitamento de animais geneticamente superiores e melhora nos programas de cruzamento e seleção (CASTELO *et al.*, 2008). Para aplicação destas biotecnologias é utilizado sêmen criopreservado. Portanto, sêmen de má qualidade influenciará nos resultados de produção quando utilizadas biotecnologias reprodutivas (DROGE, 2002).

2.1 A IMPORTÂNCIA DA FERTILIDADE

A fertilização requer atributos espermáticos que possuem processos complexos, havendo grande variação entre touros e partidas. Utilizar partidas de touros com potencial de fertilidade reduzido ocasiona grande impacto no rebanho (ABUD *et al.*, 2014). Isto pode ocorrer, pois touros que possuem características aceitáveis de motilidade progressiva, vigor, defeitos morfológicos e concentração (CELEGHINI *et al.*, 2017), podem apresentar alterações estruturais ou de funções espermáticas que não foram contempladas com estas avaliações (NICHI, 2003), levando à subfertilidade. Várias técnicas vêm sendo desenvolvidas, buscando a identificação destas alterações espermáticas que refletem na fertilidade destes touros, principalmente após processo de criopreservação (CELEGHINI *et al.*, 2017).

2.2 A CRIOPRESERVAÇÃO ESPERMÁTICA

A técnica de criopreservação de sêmen visa estocar as amostras espermáticas em nitrogênio líquido a -196°C (Hammerstedt RH, Graham JK, Nolan JP, 1990), mantendo a sua capacidade fecundante após o processo de descongelação. Tal tecnologia possibilita a conservação e utilização destas células espermáticas por tempo indeterminado (CARNEIRO *et al.*, 2007).

Os principais problemas durante o congelamento de células são a formação de cristais de gelo intracelulares e o aumento nas concentrações de soluto, levando a um aumento da osmolaridade. Também, durante o processo de descongelação, estas células entram em contato com os meios hipotônicos, podendo ocorrer uma entrada de água excessiva na célula pela diferença de osmolaridade entre os meios (HOLT, 2000), causando estresse osmótico (KOPPERS AJ, DE IULIIS GN, FINNIE JM, MCLAUGHLIN E A, AITKEN RJ, 2008). Assim, é necessária a utilização de meio diluente e substâncias crioprotetoras (HOLT, W. V., AND R. D. NORTH, 1994).

Este processo de resfriamento, congelação e descongelação do sêmen altera a homeostase, causando um desequilíbrio fisiológico e bioquímico a célula (HOLT, 2000), como perda de motilidade, danos ao acrossoma e membrana plasmática, redução do metabolismo e perda dos componentes intracelulares (MEDEIROS, 2002), reduzindo a viabilidade e habilidade fecundante dessas células (WATSON, 1981). Os danos causados na criopreservação podem ser classificados como estresse osmótico, choque térmico (WATSON, 2000) e estresse oxidativo (AITKEN, R.J.; KRAUSZ, C, 2001), sendo o último associado ao aumento da taxa de danos celulares que são induzidos pelas EROs (BAUMBER *et al.*, 2000).

2.3 ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO (EROS)

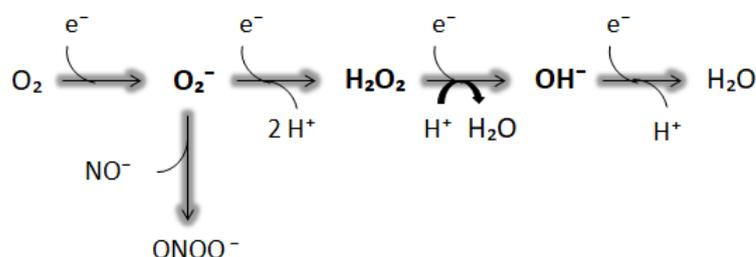
As EROs incluem todos os radicais livres, átomos ou moléculas que possuem um ou mais elétrons despareados (HALLIWELL B, GUTTERIDGE JMC, 1990) e não radicais derivados do oxigênio, os quais são quimicamente instáveis, apresentando elétron despareado. São substâncias altamente reativas, apresentando capacidade de reagir com compostos que estejam próximos, exercendo a função de agentes oxidantes (BAUMBER *et al.*, 2000).

O mecanismo de ação das EROs na fisiologia do espermatozoide ainda não foi completamente elucidado, porém os estudos o caracterizam conforme suas funções na célula espermática, tais como, os processos de hiperativação, capacitação, ligação com a zona pelúcida e reação acrossomal (NICHI *et al.*, 2007). Portanto, as EROs têm papel importante na função espermática fisiológica e, desequilíbrio entre produção de EROs e produção de antioxidantes, pode ter sérios efeitos adversos sobre o espermatozoide, durante os processos de refrigeração e

congelamento, que expõem a célula a ambientes não fisiológicos, principalmente pela alteração da relação espermatozoide e plasma (BALL, 2008).

No espermatozoide, a mitocôndria é o principal local de produção de EROs devido a grande quantidade de elétrons disponíveis e alta concentração de moléculas de oxigênio resultantes da respiração celular (AGARWAL, ASHOK, AND TAMER M. SAID, 2005). As principais EROs são o radical hidroxila ($\text{OH}\cdot$), o ânion superóxido ($\text{O}_2\cdot^-$), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o óxido nítrico (NO_2) (NICHI,2003). Primeiramente, são formados o ânion superóxido e o peróxido de hidrogênio, sendo o H_2O_2 produzido através da dismutase enzimática ou não enzimática do ânion superóxido (HALLIWELL B, GUTTERIDGE JMC., 1990). O radical hidroxila pode ser formado através do H_2O_2 e do ânion superóxido, e através da reação do ânion superóxido com o óxido nítrico produzindo o peroxinitrito (ONOO^-), que então irá se decompor para NO_2 e $\text{OH}\cdot$ (HALLIWELL, 1991). Conforme Figura 1.

Figura 1. Formação das espécies reativas de oxigênio



Fonte: Adaptado por NICHI,2003.

2.3.1 Radical superóxido ($\text{O}_2\cdot^-$)

É radical livre formado a partir do oxigênio molecular pela adição de um elétron. Ocorre espontaneamente nas células aeróbicas, principalmente na membrana mitocondrial, através da cadeia respiratória. Este radical age apenas no compartimento onde é produzido, pois não tem habilidade de penetrar membranas lipídicas, sendo caracterizado como pouco reativo (NORDBERG J, ARNER ES, 2001).

2.3.2 Peróxido de hidrogênio (H₂O₂)

Este não é radical livre, porém é metabólito do oxigênio que possui características extremamente deletérias por participar como intermediário na reação que produz o OH• (NORDBERG J, ARNER ES, 2001). Tem vida longa e possui capacidade de atravessar membranas biológicas (NICHI, 2003).

2.3.3 Radical hidroxila (OH•)

Considerado o radical livre mais reativo em sistemas biológicos, a hidroxila é capaz de causar mais danos que qualquer outra EROs. Formado a partir do peróxido de hidrogênio em reação catalisada por íons metais de ferro (Fe⁺⁺) ou cobre (Cu⁺), denominada reação de Fenton. Outra característica importante, é que este radical pode iniciar a oxidação dos ácidos graxos poli-insaturados das membranas celulares (lipoperoxidação) (MAIA, 2006).

2.3.4 Malondialdeído (MDA)

Presente em grandes quantidades na membrana espermática, os ácidos graxos poli-insaturados (PUFA) permitem a fluidez necessária para os eventos associados à fecundação (AGARWAL, ASHOK, SAJAL GUPTA, AND SURESH SIKKA, 2006), porém torna os espermatozoides vulneráveis a peroxidação lipídica, culminando em potencial diminuído da capacidade de fecundação dos espermatozoides (BALL, 2008).

Os subprodutos e produtos finais da peroxidação lipídica, tais como, malondialdeído (MDA), também exercem efeitos tóxicos e podem diminuir a motilidade do espermatozoide, estes produtos servem como indicadores bioquímicos da peroxidação lipídica (KANKOFER, 2005). Destes subprodutos os chamados aldeídos, a partir da peroxidação lipídica forma-se MDA, que tem sido amplamente estudado como marcador para estresse oxidativo (DRAPER, H. HADLEY M, 1990). O MDA apresenta alta reatividade e longevidade, além da capacidade em atuar dentro e fora das células, interagindo com biomoléculas, tais como ácidos nucleicos e proteínas causando danos irreversíveis nos mecanismos celulares (DEL RIO, DANIELE, AMANDA J. STEWART, AND NICOLETTA PELLEGRINI., 2005).

Cada espécie reativa possui um antioxidante, e este possui um papel para determinada ação nesta cadeia de produção das EROs (NICHI,2003), para minimizar esses danos nas moléculas espermáticas faz-se necessária a ação dos mecanismos antioxidantes (GURGEL, 2012).

2.4 ANTIOXIDANTES

Os antioxidantes são definidos como uma substância que retarda ou previne a oxidação de substratos oxidáveis (HALLIWELL, BARRY, AND JOHN MC GUTTERIDGE., 2006). O plasma seminal possui mecanismos e substâncias de proteção contra o estresse oxidativo, compensando a deficiência da célula espermática em relação às enzimas citoplasmáticas (DONNELLY, EILISH T., NEIL MCCLURE, AND SHEENA EM LEWIS.,1999). As enzimas antioxidantes presentes no plasma seminal são superóxido dismutase (SOD) (ALVAREZ, JUAN G., 1987), sistema glutaciona peroxidase / glutaciona redutase (GPX) (CHAUDIERE, J., E. C. WILHELMSSEN, AND ALL TAPPEL., 1984) e catalase (CAT) (JEULIN *et al.*, 1989), descritos como antioxidantes enzimáticos. Existem também os antioxidantes não enzimáticos, tais como, ascorbato (FRAGA, CESAR G., 1991), α -tocoferol (Vitamina E) (AITKEN, R. JOHN, AND JANE S. CLARKSON., 1988), piruvato (DE LAMIRANDE, E. V. E., AND CLAUDE GAGNON., 1992), glutaciona (LENZI *et al.*, 1994).

Sabe-se que a formação e destruição das EROs é em cadeia em que cada antioxidante, em sequência, elimina as EROs formadas. A escolha do antioxidante também varia de acordo com seu potencial de ação, em seu local alvo, portanto para tratamento antioxidante eficiente é necessário este sistema biológico seja estudado e submetido a determinados antioxidantes específicos, pois já se sabe que os tratamentos antioxidantes podem levar a efeitos deletérios (NICHI, 2003).

Em condições fisiológicas, as espécies reativas de oxigênio (EROs) e os antioxidantes encontram-se em situação de equilíbrio. Quando ocorre o desequilíbrio e quantidade excessiva de EROs é liberada, ocorre o estresse oxidativo (ANDRADE *et al.*, 2012).

3 HIPÓTESE

Os touros da raça Angus, com diferentes taxas de fertilidade, possuem susceptibilidade à diferentes EROs.

.

4 OBJETIVOS

Com base na literatura e hipótese exposta, este experimento possui os seguintes objetivos:

- ❖ Avaliar a susceptibilidade dos espermatozoides criopreservados (touro de alta e baixa fertilidade) frente aos desafios oxidativos;
- ❖ Avaliar qual EROs é mais deletéria em espermatozoides bovinos criopreservados:
 - Cinética espermática;
 - Integridade de membrana plasmática;
 - Integridade de membrana acrossomal;
 - Atividade mitocondrial;
 - Potencial de membrana mitocondrial;
 - Integridade do DNA;
 - Resistência espermática ao estresse oxidativo.

5 MATERIAIS E MÉTODOS

As atividades experimentais foram realizadas no Laboratório de Andrologia e Laboratório de Biologia do Espermatozoide (BIOSTZ), ambos situado nas dependências do Departamento de Reprodução Animal (VRA) da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (FMVZ USP). Este trabalho foi conduzido de acordo com as normas éticas para o uso de animais e aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da FMVZ USP (protocolo nº 9508130418).

5.1 AMOSTRAS SEMINAIS

As amostras seminais foram oriundas da empresa CRV LAGOA, sendo no total de 20 partidas de sêmen de *Bos taurus* (raça Angus), com histórico de fertilidade já conhecida através do índice iFert™ do ano de 2018 e que dispõe igualmente os mesmos protocolos de criopreservação a todas as amostras portanto, seguem o padrão da empresa no seu processo de criopreservação.

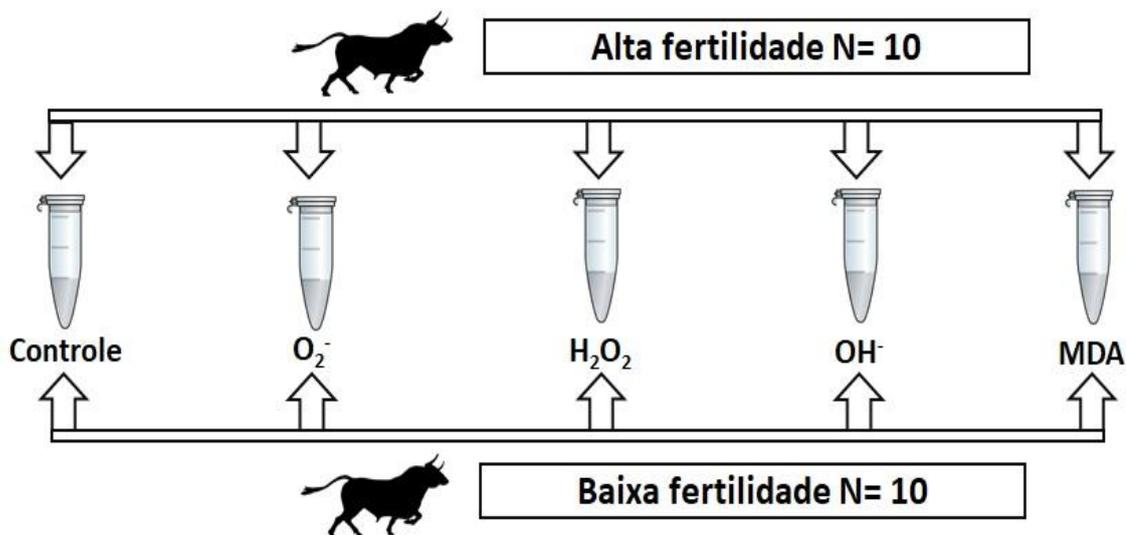
O selo iFert™ caracterizado anteriormente como Superior/Elite, é um selo utilizado pela empresa através de análise estatística dos dados de prenhez à IATF, sendo este selo dado á touros com resultados acima da média, este selo é capaz de prever a fertilidade. Os dados dos touros são analisados anualmente, utilizando os dados a campo com base em media de 500.000 informações válidas e quase 1.000 touros são avaliados, estes touros são classificados como animais de alta fertilidade os animais com índice maior ou igual a 2; e classificados como baixa fertilidade animais que possuem índice abaixo de 2. Utiliza-se um filtro no qual é excluído o fator fêmea e fator ambiental ficando apenas a avaliação do fator touro.

5.2 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Utilizou-se 10 partidas de sêmen de touros de alta fertilidade e 10 partidas de baixa fertilidade. Foi realizado *pool* de amostras com partidas diferentes de 4 palhetas de cada touro no qual posteriormente foi dividida em 5 alíquotas, submetidas à 4 diferentes desafios e grupo controle.

Apresentando dois índices, (alta e baixa), tais amostras foram submetidas individualmente com o sistema de indução com as EROs e o produto da peroxidação lipídica (Controle, $O_2^{\bullet-}$, H_2O_2 , OH^{\bullet} e MDA), manteve-se um grupo controle com utilização de PBS (livre de cálcio e magnésio), conforme Figura 1.

Figura 2. Índices de fertilidade alta e baixa e desafio oxidativo no qual as amostras foram submetidas (Controle, ânion superóxido, peróxido de hidrogênio, radical hidroxila e malondialdeído).



5.3 PROCESSAMENTO DO SÊMEN

As amostras foram descongeladas por 30 segundos a $37^{\circ}C$ e posteriormente alocadas em tubo de 2ml com os tratamentos, mantido em banho seco a $37^{\circ}C$.

5.4 SISTEMA DE GERAÇÃO DE EROS E SUBPRODUTO DA PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA

As frações foram subdivididas em cinco alíquotas para incubação durante 30 minutos a $37^{\circ}C$ com sistemas de geração EROs (NICHII,2003) e adicionados 200 μL de meio PBS (livre de cálcio e magnésio).

Para estes tratamentos foram utilizados os seguintes protocolos: incubação utilizando o sistema xantina-xantina oxidase (xantina 0,5 mM, Xantina Oxidase 0,05 UI / mL, para a produção de ânions superóxido ($O_2^{\bullet-}$). Para produção de radicais hidroxila (OH^{\bullet}) as amostras foram incubadas com sulfato ferroso (Fe_2SO_4 , 4 mM) e sódio ascorbato (20 mM). O peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o malondialdeído (MDA) foram adicionados diretamente às alíquotas a uma concentração de 4 mM.

As amostras ficaram incubadas durante um período de trinta minutos a 37 ° C em banho maria e imediatamente após a incubação, os espermatozoides foram analisadas.

5.5 ANÁLISES ESPERMÁTICAS

Após o período de incubação, as amostras foram avaliadas em relação à susceptibilidade às EROs quanto as características de cinética e funcionalidade espermática (Cinética espermática; Integridade de membrana plasmática; Integridade de membrana acrossomal; Atividade mitocondrial; Potencial de membrana mitocondrial; Integridade do DNA; Resistência espermática ao estresse oxidativo).

5.5.1 Análise computadorizada da cinética espermática

Os padrões de cinética de espermatozoide foram avaliados utilizando a *Computer Assisted Sperm Analysis* (CASA, Hamilton-Thorne®, Ivos 12.3, EUA). Foram consideradas as seguintes variáveis: motilidade (%), motilidade progressiva (%), VAP (velocidade média de percurso, $\mu\text{m/s}$), VSL (velocidade retilínea, $\mu\text{m/s}$), VCL (velocidade curvilínea, $\mu\text{m/s}$), ALH (amplitude do movimento lateral da cabeça, μm), BCF (frequência de batimento cruzado, Hz), STR (retilinearidade, %) e LIN (linearidade, %). Além desses parâmetros, a velocidade do espermatozoide foi também dividida em quatro grupos: rápido (%), médio (%), lento (%) e estático (%) (VERSTEGEN, J., M. IGUER-OUADA, AND K., 2002), conforme Apêndice 1.

5.5.2 Análises funcionais do sêmen

Os testes funcionais de espermatozoide foram avaliados utilizando citometria de fluxo (Guava EasyCyte™ Mini System, Guava® Technologies, 190 Hayward, CA, EUA) (CASTRO *et al.*, 2016), onde todas as amostras foram ajustadas para a concentração de 25 milhões de espermatozoides/mL (PARRISH *et al.*, 1988), e o ensaio citoquímico 3'3 diaminobenzidina (técnica DAB) (NICHI, 2003).

5.5.2.1 Testes funcionais

O equipamento de citometria de fluxo utiliza um laser azul que emite uma radiação laser visível, analisando os dados correspondentes às cores amarelo e vermelho e sinais fluorescentes através dos resultados em amplificação logarítmica. Estes serão analisados pelo software FlowJo[®] v10.2.

Para avaliação através dessa técnica, foram utilizadas as sondas de *iodeto propidium* (PI) e FITC conjugado com *Pisum sativum agglutinin* (FITC-PSA), para avaliação de membranas plasmática e acrossomal, respectivamente. A população espermática foi dividida em quatro grupos, sendo estes a membrana intacta e acrossomo intacto (MAI), membrana intacta e acrossomo danificado (MIAD), membrana danificada e acrossomo intacto (MDAI) e membrana danificada e acrossomo danificado (MDAD).

As amostras foram marcadas com 0.5mg/mL de PI e 100mg/mL de FITC-PSA e analisadas em citômetro de fluxo após 10 minutos de incubação sob excitação de 488nm e emissão de 630-650nm para a sonda IP e 515-530nm para a sonda FITC.

Para avaliação de potencial de membrana mitocondrial (PMM), foi utilizada a sonda JC-1 (5,5',6,6'-tetracloro-1,1',3,3'-201-cloreto de tetraetilbenzimidazolilcarbocianina; Invitrogen, Eugene, OR, USA). Foram classificadas as amostras em porcentagens de potencial de membrana mitocondrial de espermatozoide, como alto (JC-1 alto), intermediário (JC-1 intermediário) e baixo (JC-1 baixo) (SILVIA *et al.*, 2014). Onde foram adicionados 0,5µL de JC-1 (76.5mM) às amostras com incubação a 37°C por 5 minutos antes da análise no citômetro.

A susceptibilidade do DNA através do teste de estabilidade da cromatina foi baseado no ensaio da estrutura da cromatina dos espermatozoides (SCSA) (HOLT, 2000). Utilizando a sonda laranja de acridina (LA). As amostras foram incubadas com 50 µL de buffer TNE e 100 µL detergente ácido por 30 segundos e em seguida foi adicionado 100 µL de sonda LA, sendo a amostra analisada por citometria de fluxo após incubação a 37°C por 5 minutos, sob excitação de 488nm e emissão de 630-650nm (vermelho) e 515-530nm (verde). Foi considerada a intensidade de cor em vermelho e verde, as suas variações classificando-as conforme sua degeneração de cromatina (DE CASTRO *et al.*, 2016).

A avaliação do estresse oxidativo intracelular foi realizado com o uso da sonda fluorescente CellROX green (Molecular Probes, Eugene, OR, USA), que

penetra na célula quando oxidada por EROs. Sendo utilizado 7,5 µl de sêmen (187.500 células) foram incubados com 1,85 µl da sonda CellROXTM green (concentração final 5 µM) em 30µl de meio TL SEMEN a 37°C por 20 minutos. As amostras foram também incubadas com 0,6 µl de PI (concentração final de 0,6 µM) por mais 10 minutos. No momento da leitura em citômetro de fluxo foram adicionados 300 µl de PBS nas amostras. (DE CASTRO *et al.*, 2016)

Tais amostras foram avaliadas por meio da técnica de citometria de fluxo com excitação a 488nm e detectadas a 515-530 para a sonda CellRox® green e 630-650nm para a sonda IP. As células foram classificados em quatro categorias espermáticas de acordo com a integridade de membrana plasmática e estresse oxidativo: membrana íntegra sem estresse (NEML), membrana íntegra com estresse (EMI), membrana lesada sem estresse (NEMI) e membrana lesada com estresse (EML).

5.5.2.2 Ensaio citoquímico 3,3' diaminobenzidina

A avaliação de atividade mitocondrial foi realizada através da técnica citoquímica usando o reagente 3'3' diaminobenzidina (teste de DAB) de acordo com a metodologia usada por Nichi (2003), onde a enzima Citocromo C-Oxidase produzida por mitocôndrias ativas é oxidada produzindo uma coloração marrom (HRUDKA, 1987). Foram então feitas alíquotas de 10µL de amostras que foram incubadas com 10µL de 3'3' Diaminobenzidina em tubo cônico âmbar durante 1 hora a 37°C. Após esse período, foram feitos esfregaços em lâminas de microscopia em local protegido da luz. Posteriormente, as lâminas foram fixadas em formaldeído 10% durante 15 minutos, sendo a leitura das lâminas realizada em microscopia com contraste de fase em magnificação de 1000 x sob óleo de imersão. Realizada a contagem de 200 células.

As células foram classificadas em 4 classes de acordo com a porcentagem de peça intermediária corada:

- Classe I: completamente corada (100%), indicando alta atividade mitocondrial (DAB I);
- Classe II: maioria de peça intermediária corada (<100%,>50%), indicando atividade média (DAB II);

- Classe III: maioria de peça intermediária não corada (<50%,>0%), indicando baixa atividade (DAB III);
- Classe IV: peça intermediária não corada completamente (0%), indicando ausência de atividade mitocondrial (DAB IV).

Também foi calculado o Índice de Atividade Mitocondrial (IAM) conforme Hrudka (1987) que expressa o resultado conforme equação:

$$IAM = \{(\% \text{ Classe I} * 1) + (\% \text{ Classe II} * 0.5) + (\% \text{ Classe III} * 0.25) + (\% \text{ Classe IV} * 0)\}$$

5.5.2.3 Integridade acrossomal

Utilizou-se a Coloração Simples Fast- Green/Rosa-Bengala para avaliação da integridade acrossomal. (POPE; ZHANG; DRESSER, 1991). Para isso, alíquota de cada amostra (5 µl) foi adicionada ao corante (5 µl), homogenizada e incubada por 60 segundos em mesa aquecedora à 37°C. Após o período de incubação, foram realizados esfregaços em lâminas de microscopia. Analisado através de microscopia convencional, contando 200 células que foram classificadas como:

- Acrossomo Íntegro: possui coloração roxa em sua região acrossomal, levemente mais escura que a região pós-acrossomal;
- Acrossomo Lesionado: coloração rosa claro em sua região acrossomal, levemente mais clara que a região pós-acrossomal.

5.5.2.4 Integridade da membrana plasmática

Utilizando a coloração de Eosina-Nigrosina (E/N), descrita por Barth e Oko (1989) foi avaliada a integridade da membrana plasmática. Para tal avaliação foram aliquotados 5 µl de sêmen junto ao corante, na proporção de 1:1, sendo realizados esfregaços sobre lâminas de microscopia. As lâminas foram avaliadas em microscopia convencional e contadas 200 células, que foram classificadas em:

- Membrana íntegra: células aparecem na coloração branca (não coradas);
- Membrana lesionada: células aparecem com coloração rosa (coradas).

5.5.2.5 Resistência espermática ao estresse oxidativo

Para avaliar a susceptibilidade à peroxidação lipídica, foi utilizado o teste TBARS (Substâncias Reativas de Ácido Tiobarbitúrico), conforme descrito e adaptado por Nichi (2017). Este teste é baseado na dosagem do malondialdeído (MDA; produto primário da peroxidação lipídica) e sua reação com TBA, que ocorre a altas temperaturas e produz um complexo de coloração rosa, sendo esta coloração quantificada no espectrofotômetro (Ultrospec 3300 Pro[®] Amersham Biosciences, USA), onde as amostras foram induzidas com os desafios propostos e posteriormente analisadas.

5.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram avaliados pelo programa do *SAS System for Windows* (SAS Institute Inc., Cary, NC, E.U.A.). Testes paramétricos e não paramétricos foram utilizados, respectivamente, para dados que obedecem ou não às premissas estatísticas da normalidade dos resíduos e homogeneidade das variâncias. Foram utilizadas transformações para que os dados obedecem às premissas. Para avaliação do nível de significância foi rejeitado H₀ (hipóteses nulas) de 5%, para isso então, um valor significativo foi menor que 0,05 para que as diferenças estatísticas ocorreram entre os diferentes grupos seja considerada.

6 RESULTADOS

6.1 Grupo de Alta fertilidade

Na avaliação da cinética espermática, observou-se efeito deletério nas amostras incubadas com peróxido de hidrogênio. Menores motilidade total e progressiva, menor porcentagem de espermatozoides rápidos e maior porcentagem de espermatozoides estáticos. As amostras incubadas com peróxido de hidrogênio também apresentaram um padrão de velocidades menores em relação aos outros grupos (Tabela 1). Apresentando diferença entre peróxido e demais grupos conforme o gráfico 1.

Gráfico 1. Efeito na motilidade total em relação do sistemas geradores de diferentes espécies reativas de oxigênio e do subproduto da peroxidação lipídica ($O_2^{\bullet-}$, H_2O_2 , OH^{\bullet} , MDA) em touros de **alta** fertilidade

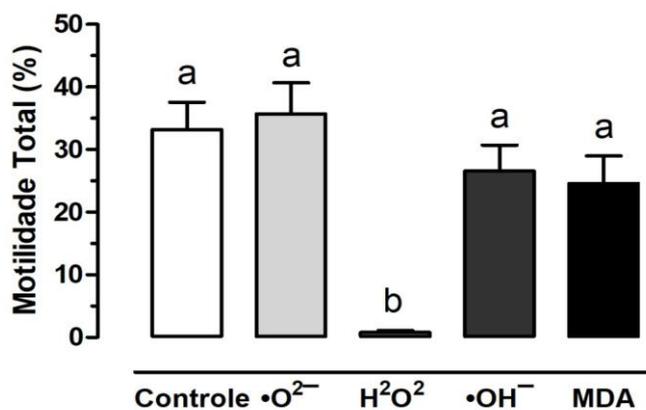


Tabela 1. Efeito das incubações com sistemas geradores de diferentes espécies reativas de oxigênio e do subproduto da peroxidação lipídica ($O_2^{\bullet-}$, H_2O_2 , OH^{\bullet} , MDA) sobre as variáveis avaliadas pela análise espermática computadorizada (CASA), em touros de alta fertilidade da raça Angus. São Paulo, SP - 2021

Variáveis	Controle	$\bullet O_2^-$	H_2O_2	$\bullet OH^-$	MDA
Motilid. Total (%)	33.20 ± 4.36 ^a	35.70 ± 4.98 ^a	0.80 ± 0.29 ^b	26.60 ± 4.10 ^a	24.60 ± 4.42 ^a
Motil. Progressiva (%)	25.80 ± 4.28 ^a	28.50 ± 4.86 ^a	0.20 ± 0.13 ^b	20.30 ± 3.81 ^a	20.30 ± 3.82 ^a
Sptz Rápidos (%)	29.60 ± 4.25 ^a	32.60 ± 5.08 ^a	0.20 ± 0.13 ^b	22.90 ± 3.99 ^a	21.50 ± 4.22 ^a
Sptz Médios (%)	3.40 ± 0.58 ^a	3.20 ± 0.36 ^a	0.50 ± 0.31 ^b	3.70 ± 0.37 ^a	3.10 ± 0.48 ^a
Sptz Lentos (%)	27.80 ± 2.41 ^{a,b}	26.10 ± 3.78 ^{a,b}	20.10 ± 4.09 ^b	30.50 ± 3.12 ^a	28.00 ± 4.26 ^{a,b}
Sptz Estáticos (%)	39.20 ± 3.99 ^b	38.30 ± 3.90 ^b	79.10 ± 4.23 ^a	43.10 ± 4.33 ^b	47.50 ± 5.30 ^b
VAP	98.19 ± 2.95 ^{a,b}	104.76 ± 3.51 ^a	39.69 ± 7.49 ^c	92.94 ± 3.30 ^{a,b}	90.02 ± 4.72 ^b
VSL	82.25 ± 3.84 ^a	89.20 ± 3.38 ^a	27.98 ± 6.82 ^b	80.73 ± 3.89 ^a	81.71 ± 4.40 ^a
VCL	180.99 ± 5.36 ^{a,b}	191.67 ± 6.45 ^a	80.20 ± 15.32 ^d	163.49 ± 2.96 ^{b,c}	146.19 ± 6.47 ^c
ALH	7.88 ± 0.32 ^a	8.28 ± 0.41 ^a	1.45 ± 0.65 ^c	7.28 ± 0.18 ^a	5.96 ± 0.25 ^b
BCF	31.11 ± 1.13 ^a	32.09 ± 1.45 ^a	9.43 ± 3.44 ^b	31.59 ± 0.80 ^a	33.77 ± 0.79 ^a
STR	82.30 ± 1.61 ^a	83.60 ± 1.33 ^a	53.80 ± 10.42 ^b	84.60 ± 1.17 ^a	89.00 ± 0.67 ^a
LIN	47.20 ± 2.02 ^a	48.10 ± 1.83 ^a	30.80 ± 6.54 ^b	50.10 ± 1.46 ^a	56.10 ± 1.55 ^a

Letras^{a,b,c,d} indicam diferença estatística entre os desafios oxidativos. ($p < 0,05$)

Em relação à membrana plasmática, os resultados apresentam algumas contradições. Na avaliação utilizando a sonda eosina/nigrosina, houve menor porcentagem de células com membrana íntegra nas amostras incubadas com ânion superóxido em relação as amostras controle. Por outro lado, houve maior porcentagem de células com membrana e acrossomo íntegros nas amostras incubadas com peróxido de hidrogênio (Tabela 2).

Tabela 2. Efeito das incubações com sistemas geradores de diferentes espécies reativas de oxigênio e do subproduto da peroxidação lipídica ($O_2^{\bullet-}$, H_2O_2 , OH^{\bullet} , MDA) sobre os parâmetros em lâmina de membrana, acrossomo e de integridade da membrana e da atividade mitocondrial (JC-1), em touros de alta fertilidade da raça Angus. São Paulo, SP – 2021

VARIÁVEIS	CONTROLE	$\bullet O_2^-$	H_2O_2	$\bullet OH^-$	MDA
MEMBRANA (%)	48.60 ± 3.84 ^A	38.60 ± 3.42 ^B	41.90 ± 2.51 ^{A,B}	39.60 ± 3.39 ^{A,B}	42.60 ± 3.75 ^{A,B}
ACROSSOMO (%)	94.40 ± 0.93	91.30 ± 1.39	92.00 ± 1.51	93.40 ± 0.91	92.80 ± 1.18
ALML	44.06 ± 2.32 ^A	41.75 ± 2.00 ^A	35.17 ± 2.86 ^B	43.65 ± 2.26 ^A	44.30 ± 2.11 ^A
ALMI	5.60 ± 0.67 ^{A,B}	6.36 ± 0.88 ^{A,B}	5.47 ± 1.15 ^B	7.57 ± 0.97 ^A	5.79 ± 0.75 ^{A,B}
AIML	24.83 ± 1.54	23.04 ± 1.83	22.53 ± 2.21	23.59 ± 1.52	24.94 ± 1.67
AIMI	25.49 ± 2.05 ^B	28.85 ± 2.20 ^B	36.86 ± 3.91 ^A	25.19 ± 2.24 ^B	24.99 ± 2.41 ^B

Letras^{a,b,c,d} indicam diferença estatística entre os desafios oxidativos. (p<0,05)

Em relação à atividade mitocondrial, verificamos efeito deletério do radical hidroxila, com uma diminuição das células com alta atividade (DABI) e aumento na porcentagem de células com nenhuma atividade (DABIV). Por outro lado, para o potencial de membrana mitocondrial, nenhuma das incubações foram estatisticamente diferentes das amostras controle, conforme tabela 3. Nota-se diferença estatística entre os grupos em relação ao grupo radical hidroxila, conforme o gráfico 2.

Gráfico 2. Efeito no INDAB em relação do sistemas geradores de diferentes espécies reativas de oxigênio e do subproduto da peroxidação lipídica ($O_2^{\bullet-}$, H_2O_2 , OH^{\bullet} , MDA) em touros de **alta** fertilidade

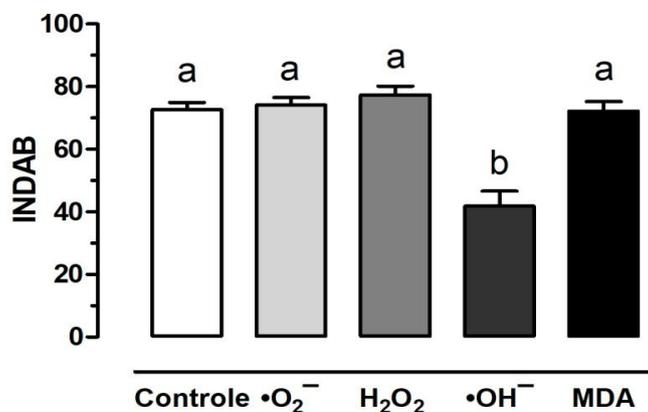


Tabela 3. Efeito das incubações com sistemas geradores de diferentes espécies reativas de oxigênio e do subproduto da peroxidação lipídica ($O_2^{\bullet-}$, H_2O_2 , OH^{\bullet} , MDA) sobre as variáveis de atividade mitocondrial (DAB I, II, III, IV e V; INDICE DAB) e potencial de membrana mitocondrial (PMM), em touros de alta fertilidade da raça Angus. São Paulo, SP - 2021

Variáveis	Controle	$\bullet O_2^-$	H_2O_2	$\bullet OH^-$	MDA
DABI	59.90 ± 3.32 ^a	60.00 ± 3.32 ^a	69.70 ± 3.68 ^a	37.40 ± 4.71 ^b	61.30 ± 4.47 ^a
DABII	22.50 ± 2.21 ^{a,b}	25.50 ± 1.85 ^a	12.60 ± 2.05 ^{c,d}	7.60 ± 1.17 ^d	18.30 ± 2.97 ^{b,c}
DABIII	6.10 ± 1.11 ^a	4.11 ± 0.65 ^{a,b}	5.40 ± 0.75 ^a	2.30 ± 1.16 ^b	6.80 ± 1.31 ^a
DABIV	11.50 ± 1.75 ^b	9.10 ± 1.35 ^b	12.30 ± 2.08 ^b	48.86 ± 1.49 ^a	13.60 ± 2.06 ^b
INDICE DAB	72.67±2.32 ^a	74.10±2.46 ^a	77.35±2.82 ^a	41.77±4.85 ^b	72.15±3.10 ^a
PMM Alto (%)	14.17 ± 1.83	17.31 ± 2.48	15.87 ± 3.29	12.45 ± 1.75	13.43 ± 2.07
PMM Intermed. (%)	16.48 ± 1.99 ^{b,c}	21.49 ± 2.02 ^b	29.76 ± 2.62 ^a	16.87 ± 1.79 ^{b,c}	15.38 ± 1.95 ^c
PMM Baixo (%)	69.34 ± 2.21 ^{a,b}	61.18 ± 3.20 ^{b,c}	54.37 ± 4.27 ^c	70.68 ± 2.50 ^a	71.18 ± 3.82 ^a

Letras^{a,b,c,d} indicam diferença estatística entre os desafios oxidativos. (p<0,05)

Já em relação ao status oxidativo, verificamos que as amostras incubadas com radical hidroxila, apresentaram maiores níveis de TBARS (nanograma de TBARS/ml) em relação aos outros grupos (Gráfico 3). Não foram observadas diferenças estatísticas entre a susceptibilidade à denaturação das cromatina espermática. (Tabela 4).

Gráfico 3. Efeito na avaliação TBARS em relação do sistemas geradores de diferentes espécies reativas de oxigênio e do subproduto da peroxidação lipídica ($O_2^{\bullet-}$, H_2O_2 , OH^{\bullet} , MDA) em touros de **alta** fertilidade

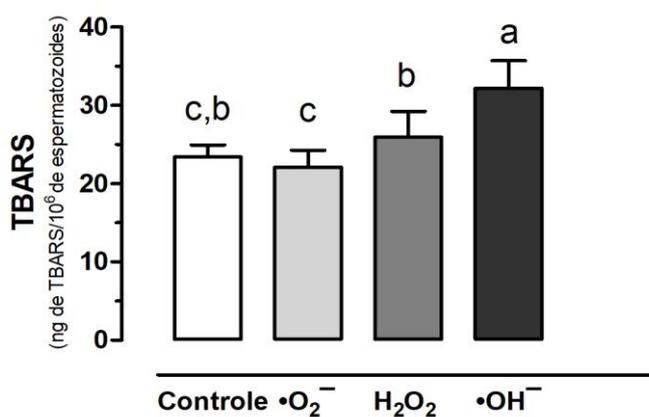


Tabela 4. Efeito das incubações com sistemas geradores de diferentes espécies reativas de oxigênio e do subproduto da peroxidação lipídica ($O_2^{\bullet-}$, H_2O_2 , OH^{\bullet} , MDA) sobre as variáveis relacionadas á estresse oxidativo (CELL-ROX, TBARS e LA), em touros de alta fertilidade da raça Angus. São Paulo, SP - 2021

Variáveis	Controle	$\bullet O_2^-$	H_2O_2	$\bullet OH^-$	MDA
EML	5.89 ± 1.47^{a,b}	12.63 ± 4.69^b	13.82 ± 6.56^b	3.02 ± 0.32^a	9.23 ± 3.33^b
EMI	3.78 ± 0.55^b	5.83 ± 1.52^{a,b}	7.52 ± 1.91^a	3.33 ± 0.56^b	4.44 ± 0.71^{a,b}
NEML	81.70 ± 1.65	73.53 ± 5.63	72.29 ± 7.51	83.84 ± 1.21	76.85 ± 3.18
NEMI	8.65 ± 1.28^{a,b}	8.02 ± 1.11^{a,b}	6.38 ± 1.27^b	9.82 ± 1.06^a	9.49 ± 1.24^a
TBARS	23.44 ± 1.51^{b,c}	22.11 ± 2.16^c	25.93 ± 3.31^b	32.22 ± 3.49^a	
LA	0.52 ± 0.17	0.43 ± 0.19	0.31 ± 0.11	0.29 ± 0.12	0.23 ± 0.07

Letras^{a,b,c,d} indicam diferença estatística entre os desafios oxidativos. ($p < 0,05$)

6.2 Grupo de Baixa fertilidade

Similar ao grupo de alta fertilidade, o peróxido de hidrogênio apresentou-se mais deletério à cinética espermática em comparação aos outros grupos, conforme visualizado no Gráfico 4. No entanto, para a motilidade total, o grupo tratado com MDA também apresentou motilidade total menor que a do grupo controle (Tabela 5).

Gráfico 4. Efeito na motilidade total em relação do sistemas geradores de diferentes espécies reativas de oxigênio e do subproduto da peroxidação lipídica ($O_2^{\bullet-}$, H_2O_2 , OH^{\bullet} , MDA) em touros de **baixa** fertilidade

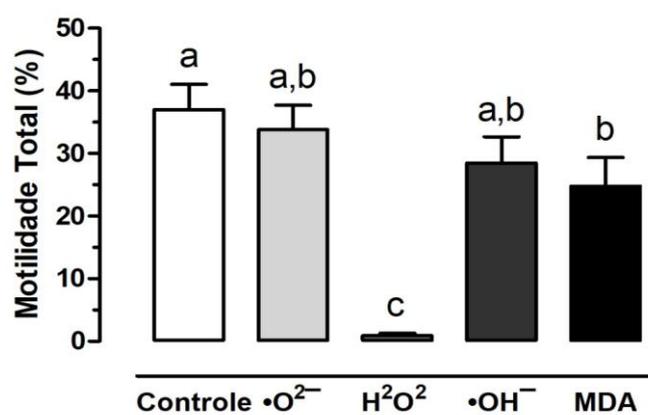


Tabela 5. Efeito das incubações com sistemas geradores de diferentes espécies reativas de oxigênio e do subproduto da peroxidação lipídica ($O_2^{\bullet-}$, H_2O_2 , OH^{\bullet} , MDA) sobre as variáveis avaliadas pela análise espermática computadorizada (CASA), em touros de baixa fertilidade da raça Angus. São Paulo, SP – 2021

Variáveis	Controle	$\bullet O_2^-$	H_2O_2	$\bullet OH^-$	MDA
Motilid. Total (%)	37.00±4.06 ^a	33.80±3.93 ^{a,b}	0.90±0.38 ^c	28.50±4.15 ^{a,b}	24.80±4.57 ^b
Motilid. Progres. (%)	28.80±3.68 ^a	25.70±3.76 ^a	0.20±0.20 ^b	21.40±3.41 ^a	19.40±4.27 ^a
Sptz Rápidos (%)	32.90±4.04 ^a	29.60±4.08 ^{a,b}	0.20±0.20 ^c	23.70±3.77 ^{a,b}	20.80±4.54 ^b
Sptz Médios (%)	4.10±0.31 ^a	4.20±0.47 ^a	0.60±0.31 ^b	5.00±0.91 ^a	4.40±0.48 ^a
Sptz Lentos (%)	29.00±2.27 ^{a,b}	22.50±5.10 ^b	23.50±3.57 ^b	30.20±4.23 ^{a,b}	35.80±4.45 ^a
Sptz Estáticos (%)	34.10±4.21 ^b	43.60±3.77 ^b	75.70±3.49 ^a	41.40±6.94 ^b	39.40±4.79 ^b
VAP	98.18±4.07 ^a	94.45±5.17 ^{a,b}	23.66±6.72 ^c	89.61±5.82 ^{a,b}	80.03±6.19 ^b
VSL	83.37±3.97 ^a	80.57±4.87 ^a	18.69±5.62 ^b	78.06±5.37 ^a	71.53±6.11 ^a
VCL	175.05±7.07 ^a	169.01±9.81 ^a	51.94±16.05 ^c	151.06±8.96 ^{a,b}	127.00±8.05 ^b
ALH	7.53±0.31 ^a	7.26±0.44 ^a	0.67±0.67 ^c	6.73±0.28 ^{a,b}	5.71±0.35 ^b
BCF	31.12±1.21 ^a	33.64±1.12 ^a	11.35±4.23 ^b	30.78±0.74 ^a	30.97±1.78 ^a
STR	83.40±1.06 ^a	83.60±1.07 ^a	47.00±13.40 ^b	84.90±0.98 ^a	87.50±1.53 ^a
LIN	48.90±1.47 ^a	49.70±1.99 ^a	24.50±7.71 ^b	51.80±1.36 ^a	56.00±2.43 ^a

Letras ^{a,b,c,d} indicam diferença estatística entre os desafios oxidativos. (p<0,05)

Não houve diferenças para a porcentagem de células com membrana íntegra entre os grupos quando da avaliação realizada por microscopia de luz. Na avaliação por citometria, verificamos maior porcentagem de células com membrana e acrossomo íntegros nas amostras tratadas com peróxido de hidrogênio (Tabela 6).

Tabela 6. Efeito das incubações com sistemas geradores de diferentes espécies reativas de oxigênio e do subproduto da peroxidação lipídica ($O_2^{\bullet-}$, H_2O_2 , OH^{\bullet} , MDA) sobre os parâmetros em lâmina de membrana, acrossomo e de integridade da membrana e da atividade mitocondrial (JC-1) , em touros de baixa fertilidade da raça Angus. São Paulo, SP – 2021

Variáveis	Controle	$\bullet O_2^-$	H_2O_2	$\bullet OH^-$	MDA
Membrana (%)	47.60±3.66	43.10±2.58	45.00±4.51	42.70±2.88	41.10±4.17
Acrossomo (%)	95.40±0.52	94.70±1.09	95.70±0.94	95.70±0.65	94.80±1.00
ALML	42.60±5.09	39.65±4.57	32.72±4.04	41.32±5.36	40.09±5.12
ALMI	5.25±1.21	4.89±0.99	3.47±0.80	5.50±1.76	3.83±0.85
AIML	23.76±2.94	24.04±2.90	25.35±2.49	24.47±2.94	25.29±3.27
AIMI	28.41±2.90 ^b	31.39±2.72 ^{a,b}	38.44±3.01 ^a	28.72±3.48 ^b	30.79±3.36 ^{a,b}

Letras^{a,b,c,d} indicam diferença estatística entre os desafios oxidativos. (p<0,05)

Em relação a atividade mitocondrial, verificamos, semelhante ao grupo de alta fertilidade, efeito deletério do radical hidroxila, refletido por menor porcentagem de células DABI e maior porcentagem de células DABIV. Por outro lado, verificamos que as amostras tratadas com peróxido de hidrogênio apresentaram menor porcentagem de células com baixo potencial de membrana mitocondrial em relação aos outros grupos. No entanto, percebe-se que essa diminuição foi causada por aumento na porcentagem de células com potencial intermediário, visto na tabela 7, o que possivelmente não representa aumento no potencial, conforme gráfico 5.

Gráfico 5. Efeito no INDAB em relação do sistemas geradores de diferentes espécies reativas de oxigênio e do subproduto da peroxidação lipídica ($O_2^{\bullet-}$, H_2O_2 , OH^{\bullet} , MDA) em touros de **baixa** fertilidade

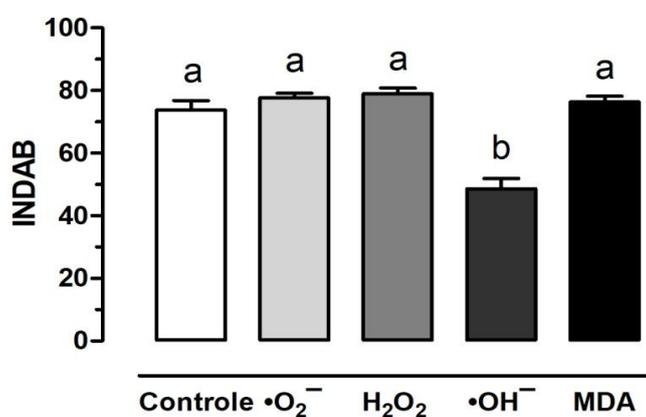


Tabela 7. Efeito das incubações com sistemas geradores de diferentes espécies reativas de oxigênio e do subproduto da peroxidação lipídica ($O_2^{\bullet-}$, H_2O_2 , OH^{\bullet} , MDA) sobre as variáveis de atividade mitocondrial (DAB I, II, III, IV e V; INDICE DAB) e potencial de membrana mitocondrial (PMM), em touros de baixa fertilidade da raça Angus. São Paulo, SP - 2021

Variáveis	Controle	$\bullet O_2^-$	H_2O_2	$\bullet OH^-$	MDA
DABI	63.50±3.47 ^a	65.78±2.45 ^a	67.60±3.29 ^a	44.50±2.78 ^b	62.40±3.96 ^a
DABII	18.00±2.79 ^a	18.90±2.71 ^a	13.20±1.94 ^{a,b}	7.30±2.27 ^b	17.90±3.54 ^a
DABIII	4.90±1.35 ^{a,b}	5.20±1.10 ^a	4.70±0.97 ^{a,b}	2.10±0.55 ^b	5.00±1.13 ^{a,b}
DABIV	10.44±1.83 ^b	7.56±1.40 ^b	9.78±1.99 ^b	43.44±3.68 ^a	9.56±1.59 ^b
INDICE DAB	73.72±3.11 a	77.66±1.47 a	78.97±1.78 a	48.67±3.23 b	76.38±1.84 a
PMM Alto (%)	17.50±2.46	22.69±2.65	20.73±2.99	16.96±2.36	19.87±2.33
PMM Intermed. (%)	18.36±1.23 ^b	18.51±1.62 ^b	31.06±3.08 ^a	19.72±1.97 ^b	16.84±0.98 ^b
PMM Baixo (%)	64.12±2.48 ^a	58.79±3.41 ^a	48.22±3.29 ^b	63.31±3.52 ^a	63.29±3.06 ^a

Letras^{a,b,c,d} indicam diferença estatística entre os desafios oxidativos. (p<0,05)

Em relação ao status oxidativo, verificamos maior susceptibilidade ao radical hidroxila em relação aos outros grupos, conforme tabela 8, nota-se diferença entre os grupos, conforme gráfico 6 entre o grupo hidroxila.

Gráfico 6. Efeito na avaliação TBARS em relação do sistemas geradores de diferentes espécies reativas de oxigênio e do subproduto da peroxidação lipídica ($O_2^{\bullet-}$, H_2O_2 , OH^{\bullet} , MDA) em touros de **baixa** fertilidade

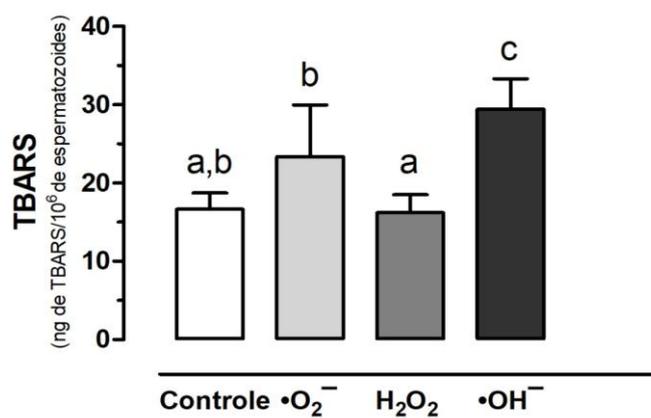


Tabela 8. Efeito das incubações com sistemas geradores de diferentes espécies reativas de oxigênio e do subproduto da peroxidação lipídica ($O_2^{\bullet-}$, H_2O_2 , OH^{\bullet} , MDA) sobre as variáveis relacionadas à estresse oxidativo (CELL-ROX, TBARS e LA), em touros de alta fertilidade da raça Angus. São Paulo, SP - 2021

Variáveis	Controle	$\bullet O_2^-$	H_2O_2	$\bullet OH^-$	MDA
EML	4.62±1.71 ^a	10.79±3.80 ^{a,b}	17.90±6.34 ^b	4.01±1.06 ^a	20.64±8.34 ^b
EMI	4.18±0.90 ^b	4.93±0.87 ^b	12.65±3.53 ^a	5.30±0.91 ^b	8.39±2.60 ^{a,b}
NEML	81.29±3.11 ^a	73.37±4.34 ^{a,b}	62.55±8.83 ^b	77.49±4.11 ^{a,b}	62.68±9.33 ^{a,b}
NEMI	9.90±1.86 ^{a,b}	10.91±2.14 ^{a,b}	6.90±0.93 ^b	13.21±2.81 ^a	8.30±1.67 ^{a,b}
TBARS	16.64 ± 2.10 ^{a,b}	23.37 ± 6.61 ^b	16.19 ± 2.30 ^a	29.42 ± 3.91 ^c	
LA	0.65±0.49	0.43±0.27	0.47±0.34	0.40±0.23	0.31±0.20

Letras^{a,b,c,d} indicam diferença estatística entre os desafios oxidativos. (p<0,05)

7 DISCUSSÃO

Sabe-se que os espermatozoides são células mais susceptíveis ao ataque de EROs devido ao seu citoplasma reduzido e, conseqüentemente, pela quantidade reduzida de antioxidante enzimático intracelular (BAUMBER, 2000). Além disso, a membrana espermática apresenta grande quantidade de ácidos graxos poli-insaturados, ricos em duplas ligações (i.e., insaturações) (PARKS; HAMMERSTEDT, 1985). A presença destes ácidos graxos é extremamente importante para que o espermatozoide apresente membrana mais fluida, fundamental para a mobilidade celular e nos processos de fertilização (LANGLAIS; ROBERTS, 1985; LADHA, 1998). No entanto, as ligações duplas tornam as ligações carbono-hidrogênio adjacentes mais instáveis e, conseqüentemente, mais susceptíveis ao ataque das EROs. Além de danificar a estrutura dos ácidos graxos, a peroxidação lipídica leva a produção de subprodutos extremamente tóxicos, que tem a capacidade de continuar a reação oxidativa em cadeia (NICHI, 2003; GURGEL, 2014; BOLLWEIN; BITTNER, 2018).

Verificamos, tanto no grupo de alta como no de baixa fertilidade, um forte efeito deletério do peróxido de hidrogênio na cinética espermática. Os resultados foram semelhantes aos encontrados por Maia *et al.* (2014) na qual, a incubação do sêmen ovino com peróxido de hidrogênio, reduziu de forma significativa os padrões de cinética espermática. Além disto, Callamera *et al.* (2001), verificou que o efeito deletério do peróxido de hidrogênio na motilidade espermática, não foi acompanhado de danos detectáveis à membrana espermática, similar o encontrado no presente estudo. Os mecanismos relacionados ao efeito deletério do peróxido de hidrogênio na motilidade espermática, ainda não é claro. Segundo Maia *et al.* (2014), podem estar relacionados a efeito do peróxido de hidrogênio na produção de ATP. Além disto, o peróxido de hidrogênio pode levar ao maior consumo de GPx e catalase, o que pode levar a produção excessiva de radical hidroxila, principal responsável pela peroxidação lipídica.

No presente estudo verificamos efeito deletério do radical hidroxila na atividade mitocondrial, seja no grupo de alta ou grupo de baixa fertilidade. O radical hidroxila é a espécie reativa de oxigênio é considerada a mais instável e que, portanto, apresenta maior reatividade (capacidade de receber e doar elétrons).

Neste contexto, o radical hidroxila é potencialmente o mais lesivo aos compostos biológicos que as demais EROs (ARUOMA *et al.*, 1989; NICHI, 2003; RODRIGUES, 2009). O ataque do radical hidroxila pode levar a danos tanto à membrana plasmática, como à membrana de organelas celulares tais como a mitocôndria. Neste caso, danos mitocondriais, podem levar à liberação de fatores pró-oxidativos. Além disto, a peroxidação dos compostos lipídicos podem levar à formação de subprodutos extremamente deletérios tais como malondialdeído. O MDA apresenta alta reatividade e longevidade, além da capacidade em atuar dentro e fora das células, interagindo com biomoléculas, tais como ácidos nucleicos e proteínas causando danos irreversíveis nos mecanismos celulares (DEL RIO; STEWART; PELLEGRINI, 2005). De fato, no presente estudo, nas amostras incubadas com radical hidroxila, além de menor atividade mitocondrial, foi observado aumento nos níveis de substância reativas ao ácido tiobarbitúrico, marcador da presença de MDA.

Surpreendentemente, para o grupo de baixa fertilidade, nenhuma das incubações levaram a efeitos deletérios às membranas plasmática e acrossomal. Também em relação à fragmentação de DNA e ao status oxidativo, nenhuma das incubações se mostrou danosa à cromatina espermática. É importante frisar, no entanto, que o processo de danos oxidativos é dinâmico, com os danos ocorrendo de forma sequencial. Possivelmente, problemas mitocondriais e o aumento na produção de subprodutos do estresse oxidativo, levariam à aumento subsequente nos danos às estruturas espermáticas como membrana e cromatina. No entanto, mais estudos com avaliações subsequentes seriam necessárias.

Os resultados do presente estudo indicam que uma terapia antioxidante isolada não seria suficiente para combater as espécies reativas mais deletérias. Uma vez que tanto o peróxido de hidrogênio como o radical hidroxila se mostraram deletérios a diferentes estruturas e atributos espermáticos, possivelmente combinação de antioxidantes seria necessária (ARUOMA *et al.*, 1989; NICHI, 2003; RODRIGUES, 2009).

Em relação ao peróxido de hidrogênio, uma terapia com catalase ou glutathione peroxidase seria alternativa. De fato, no estudo de Maia *et al.* (2010), os autores verificaram que a incubação de peróxido de hidrogênio combinada com catalase foi eficiente para evitar os efeitos deletérios à cinética espermática

encontrados com a incubação com peróxido de hidrogênio. Por outro lado, para o combate ao radical hidroxila, antioxidantes podem ser considerados. A terapia com vitamina E parece ser alternativa viável, pois quebra a reação oxidativa em cadeia. Por ser antioxidante lipossolúvel, atua na membrana espermática protegendo-a do radical hidroxila. Outra alternativa seria a vitamina C, potencialmente eficiente na proteção contra todas as espécies reativas de oxigênio. No entanto, a vitamina C, na presença de íons de ferro e cobre pode apresentar um efeito pró-oxidante ao alimentar a reação de Fenton (NICHII, 2009).

É importante ressaltar que, para que um tratamento antioxidante seja eficiente é necessário considerar uma série de fatores. É fundamental que o sistema biológico em questão esteja sob estresse oxidativo. Caso o sistema esteja em homeostase oxidativa, um tratamento antioxidante, mesmo em concentrações baixas, pode não ser eficiente ou até mesmo ser deletérias, já que as EROs possuem papel fisiológico fundamental para o espermatozoide (HALLIWELL, 2015). Além disto, o antioxidante selecionado é de extrema importância uma vez que cada espécie reativa de oxigênio possui um antioxidante preferencial. Outro ponto importante seria a concentração utilizada. Uma quantidade baixa pode ser insuficiente e uma quantidade excessiva pode ser deletéria. Assim, estudos utilizando diferentes concentrações dos antioxidantes são fundamentais.

8 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A susceptibilidade espermática de touros de alta e baixa fertilidade às diferentes espécies reativas de oxigênio parece ser semelhante. O peróxido de hidrogênio e o radical hidroxila foram as EROs mais deletérias ao sêmen criopreservado de touros.

REFERÊNCIAS

- ABIEC. Beef Report: Perfil da pecuária no Brasil. BeefREPORT, p. 49, 2020. Disponível em: <<http://www.abiec.com.br/control/uploads/arquivos/sumario2019portugues.pdf>>. Acesso em: 05 ago.2021
- ABIEC. Beef Report: Perfil da pecuária no Brasil. BeefREPORT, p. 04, 2021. Disponível em: <<https://drive.google.com/file/d/1-BE8JXs-FQ9CW9FfIEoqryU77uvwXCS/view>>. Acesso em: 05 ago.2021
- ABUD, CÁTIA OLIVEIRA GUIMARÃES, *ET AL.* "Comparação entre os sistemas automatizado e convencional de criopreservação de sêmen bovino." Embrapa Cerrados-Artigo em periódico indexado (2014).
- AGARWAL, ASHOK, AND TAMER M. SAID. "Oxidative stress, DNA damage and apoptosis in male infertility: a clinical approach." *BJU international* 95.4 (2005): 503-507.
- AGARWAL, ASHOK, SAJAL GUPTA, AND SURESH SIKKA. "The role of free radicals and antioxidants in reproduction." *Current Opinion in Obstetrics and Gynecology* 18.3 (2006): 325-332
- AITKEN, R.J.; KRAUSZ, C. Oxidative stress, DNA damage and the Y chromosome. *Reproduction*. v. 122(4), p. 497-506, 2001.
- AITKEN, R. JOHN, AND JANE S. CLARKSON. "Significance of reactive oxygen species and antioxidants in defining the efficacy of sperm preparation techniques." *Journal of andrology* 9.6 (1988): 367-376.
- ALVAREZ, JUAN G., *et al.* "Spontaneous lipid peroxidation and production of hydrogen peroxide and superoxide in human spermatozoa Superoxide dismutase as major enzyme protectant against oxygen toxicity." *Journal of andrology* 8.5 (1987): 338-348.
- ANDRADE, EVELYN R., *et al.* "Effects of ascorbic acid on in vitro culture of bovine preantral follicles." *Zygote* 20.4 (2012): 379-388.
- ANGRIMANI, D.S.R.; LOSANO, J.D.A.; RUI, B.R.; BICUDO, L.C.; ANDRADE, R.P.; CELEGUINI, E.C.C. Ferramentas para avaliação da funcionalidade da mitocôndria espermática. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v.39, n.2, p.277-283, Abr./Jun. 2015.
- ARUOMA, O. I.; HALLIWELL, B.; LAUGHTON, M. J.; QUINLAN, G. J.; GUTTERIDGE, J. M. The mechanism of initiation of lipid peroxidation. Evidence

against a requirement for an iron (II) – iron (III) complex. *Biochemical Journal*, v. 258, n. 2, p. 617-620, 1989.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL- ASBIA
Index ASBIA Mercado 2014, Uberaba, MG, 2015. 30p. Disponível em:
<<http://www.asbia.org.br/novo/upload/mercado/index2014.pdf>>.

BALL, BARRY A. "Oxidative stress, osmotic stress and apoptosis: impacts on sperm function and preservation in the horse." *Animal reproduction science* 107.3-4 (2008): 257-267.

BARUSELLI, P. S. *et al.* Evolução e perspectivas da inseminação artificial em bovinos. *Rev. Bras. Reprod. Anim.*, v. 43, p. 308–314, 2019.

BAUMBER, J. U. L. I. E., *et al.* "The effect of reactive oxygen species on equine sperm motility, viability, acrosomal integrity, mitochondrial membrane potential, and membrane lipid peroxidation." *Journal of andrology* 21.6 (2000): 895-902.

BILODEAU JF, CHATTERJEE S, SIRARD MA. Levels of antioxidant defenses are decrease in bovine spermatozoa after a cycle of freezing and thawing. *Mol Reprod Dev*, v.55, p.282-288, 2000.

BOLLWEIN, H.; BITTNER, L. Impacts of oxidative stress on bovine sperm function and subsequent in vitro embryo development. *Animal Reproduction (AR)*, v. 15, p. 703-710, 2018.

CALAMERA, J. C.; FERNANDEZ, P. J.; BUFFONE, M. G.; ACOSTA, A. A.; DONCEL, G. F. Effects of long-term in vitro incubation of human spermatozoa: functional parameters and catalase effect. *Andrologia*, v. 33, n. 2, p. 79-86, 2001.

CASTELO TS, FROTA TR, SILVA AR. Considerações sobre a criopreservação do sêmen de caprinos. *Acta Vet Bras*, v.2, p.67-75, 2008

CARNEIRO GF, SILVA SV, MEDEIROS LRD, GOMES NETO O, PROCÓPIO OCS. Utilização prática de sêmen congelado. In: ASSIST (Simpósio Brasileiro de Reprodução Assistida em Caprinos e Ovinos), 1, 2007. Gravatá, PE 2007.

CELEGHINI, ENEIVA CARLA CARVALHO, *et al.* "Impacto da qualidade do sêmen sobre a fertilidade a campo em bovinos." *Rev. Bras. Reprod. Anim.*, Belo Horizonte-MG 41.1 (2017): 40-45.

CHAUDIERE, J., E. C. WILHELMSSEN, AND ALL TAPPEL. "Mechanism of selenium-glutathione peroxidase and its inhibition by mercaptocarboxylic acids and other mercaptans." *The Journal of biological chemistry* 259.2 (1984): 1043-1050.

DEPARTMENT OF AGRICULTURE. USDA.gov - United States Department of Agriculture. Disponível em: <<https://thetricontinental.org/pt-pt/brasil/analise-sobre-a-producao-de-carnes-no-brasil/>>.

DEL RIO, D.; STEWART, A. J.; PELLEGRINI, N. A review of recent studies on malondialdehyde as toxic molecule and biological marker of oxidative stress. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases*, v. 15, n. 4, p. 316-328, 2005.

DE CASTRO, L. S., *et al.* Sperm oxidative stress is detrimental to embryo development: a dose-dependent study model and a New and more sensitive oxidative status evaluation. *Oxid Med Cell Longev.* 2016, Vol. 2016: 8213071.

DE LAMIRANDE, E. V. E., AND CLAUDE GAGNON. "Reactive oxygen species and human spermatozoa. II. Depletion of adenosine triphosphate plays an important role in the inhibition of sperm motility." *Journal of Andrology* 13.5 (1992): 379-386.

DOWLING, D.K.; SIMMONS, L.W. Reactive oxygen species as universal constraints in life-history evolution. *Proceedings of the Royal Society B.* v.276, p.1737-1745, 2009.

DONNELLY, EILISH T., NEIL MCCLURE, AND SHEENA EM LEWIS. "Antioxidant supplementation in vitro does not improve human sperm motility." *Fertility and Sterility* 72.3 (1999): 484-495.

DRAPER, H. HADLEY M. Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation. *Methods Enzymol.*1990;186;421-31.

DROGE W . Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev* 82: 47-95. 2002.

EMERICK, LUCAS LUZ, *et al.* "Avaliação da integridade de membrana em espermatozoide bovino criopreservado para prever o índice de prenhez." *Ciência Animal Brasileira* 12.3 (2011): 536-546.

FRAGA, CESAR G., *et al.* "Ascorbic acid protects against endogenous oxidative DNA damage in human sperm." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 88.24 (1991): 11003-11006.

GURGEL, JOÃO RAFAEL CHINAIT. Efeito do plasma seminal sobre a susceptibilidade dos espermatozoides equinos às diferentes espécies reativas de oxigênio. São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo. Dissertação de Mestrado em Reprodução Animal.2012.

HALLIWELL B, GUTTERIDGE JMC. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. *Methods Enzymol* 1990; 186: 1-85

HALLIWELL, B. Reactive oxygen species in living systems: source, biochemistry and role in human disease. *American Journal of Medicine*, v. 91, n. 3, p. 14-22, 1991.

HALLIWELL, BARRY, AND JOHN MC GUTTERIDGE. *Free radicals in biology and medicine.* Oxford University Press, USA, 2015.

HAMMERSTEDT RH, GRAHAM JK, NOLAN JP. Cryopreservation of mammalian sperm: what we ask them to survive. *J Androl*, v.11, p.73-88, 1990

HOLT, W. V., AND R. D. NORTH. "Effects of temperature and restoration of osmotic equilibrium during thawing on the induction of plasma membrane damage in cryopreserved ram spermatozoa." *Biology of Reproduction* 51.3 (1994): 414-424.

HOLT, W. V. "Basic aspects of frozen storage of semen." *Animal reproduction science* 62.1-3 (2000): 3-22.

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*. 1987, Vol. 10, pp. 809-28.

IBGE, 2021. Indicadores do IBGE; Estatística da produção pecuária. p. 09Disponível em: <https://ftp.ibge.gov.br/Producao_Pecuaria/Fasciculo_Indicadores_IBGE/abate-leite-couro-ovos_202002caderno.pdf>

JEULIN, C., *et al.* "Catalase activity in human spermatozoa and seminal plasma." *Gamete research* 24.2 (1989): 185-196

KANKOFER, MARTA, *et al.* "Activity of glutathione peroxidase, superoxide dismutase and catalase and lipid peroxidation intensity in stallion semen during storage at 5 C." *Theriogenology* 63.5 (2005): 1354-1365.

KAWAI GKV, GURGEL JRC, LOSANO JDDA, DALMAZZO A, ROCHA CC, TSUNODA RH, GOES PAA, RUI BR, ANGRIMANI DSR, ASSUMPCAP MEOA, MENDES CM, BARNABE VH, NICHI M. Susceptibility of Stallion Spermatozoa to Different Oxidative Challenges: Role of Seminal Plasma. *Journal of Equine Veterinary Science*. 2017;55:76-83.

KOPPERS AJ, DE IULIIS GN, FINNIE JM, MCLAUGHLIN E A, AITKEN RJ. Significance of mitochondrial reactive oxygen species in the generation of oxidative stress in spermatozoa. *J Clin Endocrinol Metab*, v.93, p.3199-3207,2008

LADHA, S. Lipid heterogeneity and membrane fluidity in a high polarized cell, the mammalian. *Journal of Membrane Biology*, v. 165, n. 1, p.1-10, 1998.

LANGLAIS, J.; ROBERTS, K. D. A molecular membrane model of capacitation and the acrosome reaction of mammalian sperm membranes. *Gamete Research*, v. 12, n. 1, p. 183- 224, 1985.

LENZI, A., *et al.* "Andrology: Glutathione treatment of dyspermia: effect on the lipoperoxidation process." *Human Reproduction* 9.11 (1994): 2044-2050.

LUCIO CF, REGAZZI FM, SILVA LC, ANGRIMANI DS, NICHI M, VANNUCCHI CI. Oxidative stress at different stages of two-step semen cryopreservation procedures in dogs. *Theriogenology*. 2016;85:1568-75.

MAIA MS. Viabilidade espermática e geração de metabólitos Reativos do Oxigênio (ROS) no semen ovino criopreservado em diluidor aditivado de Lauril Sulfato de Sódio (OEP), Trolox-C e Catalase. 2006. Tese (doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Botucatu, 2006.

MAIA, M. S.; BICUDO, S. D.; SICHERLE, C. C.; RODELLO, L., GALLEGO, I. C. S. Lipid peroxidation and generation of hydrogen peroxide in frozen-thawed ram semen cryopreserved in extenders with antioxidants. *Animal Reproduction Science*, v. 122, n. 1-2, p. 118-123, 2010.

MAIA, M. S.; BICUDO, S. D.; RODELLO, L. Effect of hydrogen peroxide on thawed ovine sperm motility. *Animal Reproduction*. Belo Horizonte: Brazilian Coll Animal Reproduction, v. 11, n. 2, p. 119-123, 2014. Disponível em: <<http://hdl.handle.net/11449/117701>>.

MEDEIROS, A. S. L., *et al.* "Cryopreservation of stallion sperm using different amides." *Theriogenology* (2002): 273-276.

NICHI, MARCILIO. Sistemas de proteção enzimática e níveis de peroxidação espontânea dos lipídios seminais de touros zebuínos e taurinos criados a campo na região de Dourados, MS. Diss. Universidade de São Paulo, 2003.

NICHI, M., *et al.* "Roles of lipid peroxidation and cytoplasmic droplets on in vitro fertilization capacity of sperm collected from bovine epididymides stored at 4 and 34 C." *Theriogenology* 67.2 (2007): 334-340

NORDBERG J, ARNER ES. Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. *Free Radic Biol Med*; 31 (11): 1287-1312. 2001.

O'FLAHERTY C, BEORLEGUI N, BECONI MT. Participation of superoxide anion in the capacitation of cryopreserved bovine sperm. *Int J Androl*, v.26, p.109-114, 2003.

PARKS, J. E.; HAMMERSTEDT, R. H. Development changes occurring in the lipids of ram epididymal spermatozoa plasma membrane. *Biology of Reproduction*, v. 32, n. 3, p. 653- 668, 1985.

PARRISH, J. J., *et al.* Capacitation of Bovine Sperm by Heparin. *Biology of reproduction*. 1988, Vol. 38, pp. 1171-80.

Purdy PH. A review on goat sperm cryopreservation. *Small Rumin Res*, v.63, p.215-225, 2006.

POPE, C. E.; ZHANG, Y. Z.; DRESSER, B. L. A simple staining method for evaluating acrosomal status of cat spermatozoa. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, v. 22, n. 1, p. 87-95, 1991.

RODRIGUES, M. P. Perfil oxidativo e avaliação funcional de sêmen criopreservado de touros (*Bos taurus taurus* e *Bos taurus indicus*) criados em clima tropical. 2009. 144 p. Dissertação (Mestrado em Reprodução Animal) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, University of São Paulo, São Paulo, 2009.

RUI BR, SHIBUYA FY, KAWAOKU AJ, LOSANO JD, ANGRIMANI DS, DALMAZZO A, NICHI M, PEREIRA RJG. Impact of induced levels of specific free radicals and malondialdehyde on chicken semen quality and fertility. *Theriogenology*. 2017;90:11-9.

SARTORI, R. *et al.* Update and overview on assisted reproductive technologies (ARTs) in Brazil. *Animal Reproduction*, v. 13, n. 3, p. 300–312, 2016.

SILVA, RICARDO TOMAZ DA. Proteoma nuclear e micro-rnas de espermatozoides de bovinos férteis e subférteis. 2018. 77 f. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias) Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2018. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.14393/ufu.te.2018>>.

SILVA, R.A.L.; PIO, L.A.S.; PASQUAL, M.; OLIVEIRA, A.C.L. DE; RODRIGUES, F.A.; SILVA, S. DE O. E. An assessment of software for flow cytometry analysis in banana plants. *Semina: Ciências Agrárias*, v.35, p.775-780, 2014. DOI: 10.5433/1679-0359.2014v35n2p775

THOMAS CA, GARNER DL, DEJARNETTE JM, MARSHALL CE. Effect of cryopreservation on bovine sperm organelle function and viability as determined by flow cytometry. *Biol Reprod*, v.58, p.786-793, 1998.

VERSTEGEN, J., M. IGUER-OUADA, AND K. ONCLIN. "Computer assisted semen analyzers in andrology research and veterinary practice." *Theriogenology* 57.1 (2002): 149-179.

WATSON, P. F. "The roles of lipid and protein in the protection of ram spermatozoa at 5 C by egg-yolk lipoprotein." *Journal of Reproduction and Fertility* 62.2 (1981): 483-492.

WATSON PF. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Anim Reprod Sci*, v.60/61, p.481-492, 2000.

APÊNDICE

I - Configuração utilizada para avaliação de cinética espermática (Hamilton Thorne – IVOS 12.1)

IMAGE CAPTURE	
Frames Per. Sec	60 Hz
No of Frames	30
CELL DETECTION	
Minimum Contrast	80
Minimum Cell Size	5 pix
DEFAULTS (IF < 5 Motile Cells)	
Cell Size	5 pix
Cell Intensity	70
PROGRESSIVE CELLS	
Path Velocity (VAP)	50 μ /s
Straightness (STR)	70%
SLOW CELLS	
Slow Cells	Static
VAP Cutoff	30.0 μ /s
VSL Cutoff	15.0 μ /s
Static Gates (on QC Plots)	
STATIC INTENSITY GATES	
Minimum	0.30
Maximum	1.70
STATIC SIZE GATES	
Minimum	0.10
Maximum	3.40
STATIC ELONGATION GATES	
Minimum	8
Maximum	97