

KEN KAWAOKA NAGAI

Status oxidativo sazonal no sêmen de touros *Bos indicus* e *Bos taurus* em região tropical

São Paulo

2022

KEN KAWAOKA NAGAI

Status oxidativo sazonal no sêmen de touros *Bos indicus* e *Bos taurus* em região tropical

Dissertação apresentada à 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
2022

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)

4267
FMVZ

Nagai, Ken Kawaoka
Status oxidativo sazonal no sêmen de touros *Bos indicus* e *Bos taurus* em região tropical
/ Ken Kawaoka Nagai. – 2022.
79 f. : il.

Mestrado (Dissertação) – Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Reprodução Animal, São Paulo, 2022.

Programa de Pós-Graduação: Reprodução Animal.

Área de concentração: Reprodução Animal.

Orientador: Prof. Dr. Marcilio Nichi.

Coorientador: Prof. Dr. João Diego de Agostini Losano.

1. Radicais livres. 2. Sêmen animal. 3. Bovinos. 4. Estresse. 5. Danos de DNA. I. Título.



Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia Universidade de São Paulo

Comissão de Ética no Uso de Animais

São Paulo, 21 de novembro de 2022
CEUAx N [4130300522](#)

Ilmo(a). Sr(a).
Responsável: Marcilio Nichi
Área: Reprodução Animal
Equipe envolvida: Ken Kawaoka Nagai - (pós-graduando);

Título da proposta: "Status oxidativo sazonal no sêmen de touros *Bos indicus* e *Bos taurus* em região tropical".

Parecer Consubstanciado da CEUA FMVZ

A Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia Universidade de São Paulo, na reunião de 05/10/2022, **ANALISOU e APROVOU** a proposta acima referenciada. A partir desta data, é dever do pesquisador:

1. Comunicar toda e qualquer alteração.
2. Comunicar imediatamente ao Comitê qualquer evento adverso ocorrido durante o desenvolvimento da proposta.
3. Os dados individuais de todas as etapas da pesquisa devem ser mantidos em local seguro por 5 anos para possível auditoria dos órgãos competentes.
4. **Relatórios parciais** de andamento deverão ser enviados **anualmente** à CEUA até a conclusão da proposta.

Prof. Dr. Marcelo Bahia Labruna
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
Universidade de São Paulo

Profa. Dra. Camilla Mota Mendes
Vice-Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
Universidade de São Paulo



Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia Universidade de São Paulo

*Comissão de Ética no
Uso de Animais*

São Paulo, 21st November 2022

CERTIFIED

We certify that the proposal entitled: "*Oxidative status on Bos indicus and Bos taurus semen under seasonal tropical conditions*", protocol number CEUAX 4130300522 (ID 002328), under the responsibility Marcilio Nichi, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Ethic Committee in the Use of Animals of School of Veterinary Medicine and Animal Science (University of São Paulo), and was approved in the meeting of day October 05, 2022.

Certificamos que a proposta intitulada: "*Status oxidativo sazonal no sêmen de touros Bos indicus e Bos taurus em região tropical*", protocolado sob o CEUAX nº 4130300522, sob a responsabilidade de Marcilio Nichi, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia Universidade de São Paulo, e foi aprovado na reunião de 05 de outubro de 2022.

Prof. Dr. Marcelo Bahia Labruna
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
Universidade de São Paulo

Profa. Dra. Camilla Mota Mendes
Vice-Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
Universidade de São Paulo

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: NAGAI, Ken Kawaoka

Título: Status oxidativo sazonal no sêmen de touros *Bos indicus* e *Bos taurus* em região tropical

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Mestre em Ciências.

Data: ___/___/___

Banca Examinadora

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

DEDICATÓRIA

Dedico esta conquista à Ritsu Kawaoka, minha querida batchan, minha eterna professora da vida. Desde os tempos que me conheço por gente até sua partida, me ensinou a ser uma pessoa melhor e nunca desistir dos meus sonhos. Diante de todas as adversidades da vida, lutou até o fim por seus sonhos, sempre atrelado à família.

*“Grab your coat and get your hat
Leave your worry on the doorstep
Just direct your feet
To the sunny side of the street*

*Can't you hear a pitter-pat?
And that happy tune is your step
Life can be so sweet
On the sunny side of the street*

*I used to walk in the shade
With those blues on parade,
But now I'm not afraid
This rover crossed over*

*If I never have a cent,
I'll be rich as Rockefeller
Gonna set my feet
On the sunny side of the street ”*

On the Sunny Side of the Street – Jimmy McHugh & Dorothy Fields (1930)

AGRADECIMENTOS

Primeiramente gostaria de agradecer meus pais, Julieta e Hideyuki e meu irmão Allan. Todos esses anos de carinho, amor, dedicação e superação de obstáculos foram fundamentais para que eu alcançasse meus objetivos profissionais e pessoais. Sem o apoio deles, muitas das minhas conquistas e sonhos não poderiam ser concretizados.

À minha namorada Fabiana, que me acompanhou nessa trajetória, por todo carinho, compreensão e parceria.

Aos meus grandes companheiros de laboratório Henrique, Fabio , Raphaela, Roberta e Álvaro por cada momento juntos marcando essa amizade que cultivamos nesses anos de convivência dentro e fora da pós-graduação.

Aos meus amigos, Num, Ask, Fuleco, Francis, Rick, Hideki, Lya, Egg, Leo, Jean, Lu e Irene por toda força que sempre me deram.

Ao corpo docente da FMVZ-USP e todos os profissionais que me orientaram. Em especial aos professores Marcilio, Mayra, Claudia, Visintin, Cris, George e Pietro. Agradeço a todo apoio, dedicação e disponibilidade para transmitirem seus conhecimentos tanto para minha vida profissional quanto pessoal.

À Harumi, Camila, Irailton, Thais, Clau e Luiz por todo suporte durante o mestrado, no projeto, nas atividades administrativas, na lida com os animais e na preparação das aulas.

Por fim, gostaria de agradecer meu psicólogo Vitor, pela paciência e comprometimento em nossas reflexões, as quais me fizeram evoluir.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

RESUMO

NAGAI, K. K. **Status oxidativo sazonal no sêmen de touros *Bos indicus* e *Bos taurus* em região tropical** [Oxidative status on *Bos indicus* and *Bos taurus* semen under seasonal tropical conditions]. 2022 79 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2022.

A utilização de raças *Bos taurus* nos rebanhos brasileiros tem aumentado a fim de atender às novas demandas de mercado e de consumo da carne bovina. Entretanto, quando criados em climas mais quentes, esses animais não apresentam as mesmas capacidades adaptativas em comparação aos *Bos indicus*. Dentre os problemas associados a essa diferença, destaca-se o estresse térmico, que pode comprometer não só a saúde do animal mas também seu potencial reprodutivo, devido principalmente à maior formação de EROs (espécies reativas de oxigênio) relacionada a este fenômeno. Quando isso ocorre em touros utilizados em programas de reprodução o impacto é maior, uma vez que distúrbios reprodutivos podem passar despercebidos ao exame andrológico comum. Um exemplo disso é a alteração no DNA espermático, que pode resultar em perdas embrionárias até doenças transgeracionais, prejudicando a produtividade e, conseqüentemente, causando grandes prejuízos a setor. Diante disso, foram utilizados 10 touros da raça Nelore (*Bos taurus indicus*) e oito da raça Simental (*Bos taurus taurus*) criados a pasto, na região de Dourados, Mato Grosso do Sul, para conduzir o estudo visando verificar o perfil oxidativo e o DNA espermático em cada raça (Simental e Nelore) e estação do ano (verão e inverno), formando um arranjo fatorial 2x2. As amostras foram descongeladas e analisadas por meio dos testes de susceptibilidade ao estresse oxidativo (TBARS), mensuração da atividade de enzimas intracelulares (SOD e GPx), susceptibilidade à fragmentação do DNA espermático (SCSA), atividade mitocondrial (DAB), potencial de membrana mitocondrial (JC-1), integridade de membranas plasmática e acrossomal (E/N;FITC-PSA), motilidade (CASA) e deficiência de protaminação (CMA3). Observou-se efeito de estação sobre a variável potencial de membrana mitocondrial ($85.55 \pm 2.21\%$ e $74.58 \pm 3.30\%$, verão e inverno respectivamente; $p = 0.0175$) e efeito raça na deficiência de

protaminação ($0.52 \pm 0.09\%$ e $0.20 \pm 0.10\%$, Simental e Nelore respectivamente; $p = 0.0376$). Verificou-se, no inverno, correlações entre variáveis relacionadas à motilidade com variáveis de potencial de membrana mitocondrial e TBARS com SOD. Já no verão, as variáveis de motilidade correlacionam com os níveis de atividade mitocondrial e o TBARS com SOD e GPx. Na análise de componentes principais, tanto no efeito estação quanto na raça, os *loadings* com maior valor selecionados foram apenas de variáveis relacionadas ao metabolismo energético e ao perfil oxidativo. Esses dados evidenciam a importância do metabolismo energético e o possível efeito negativo do calor no seu funcionamento. Os resultados sugerem que a maior deficiência de protaminação no *Bos taurus* não esteja relacionada ao estresse térmico, mas sim a uma característica de raça. Ainda que esta deficiência não esteja acompanhada de estresse oxidativo, a mesma parece não afetar a susceptibilidade à fragmentação do DNA espermático. Além disso, o caráter multifatorial e dinâmico dos parâmetros do sêmen proporcionou desafios para a identificação dos efeitos estudados, uma vez que elementos como a nutrição ou até mecanismos compensatórios do espermatozóide podem ter amenizado as diferenças esperadas.

Palavras-chave: Radicais livres. Sêmen animal. Bovinos. Estresse. Danos de DNA.

ABSTRACT

NAGAI, K. K. **Oxidative status on *Bos indicus* and *Bos taurus* semen under seasonal tropical conditions** [Status oxidativo sazonal no sêmen de touros *Bos indicus* e *Bos taurus* em região tropical]. 2022 79 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2022.

The use of *Bos taurus* breeds in Brazilian herds has increased in order to meet new market demands and beef consumption. However, when raised in warmer climates, these animals do not present the same adaptive capabilities compared to *Bos indicus*. Among the problems associated with this difference, heat stress stands out, which can compromise not only the animals' health but also its reproductive

potential, mainly due to the greater formation of ROS (reactive oxygen species) related to this phenomenon. When it affects bulls used in breeding programs the impact is even more significant, since reproductive disorders can go unnoticed by the common andrological examination. An example is the alteration in sperm DNA, which can result in embryonic lethality to transgenerational diseases, impairing productivity and, consequently, causing great losses to the industry. Therefore, 10 bulls of the Nelore breed (*Bos indicus*) and eight of the Simmental breed (*Bos taurus*) bred on pasture in the region of Dourados, Mato Grosso do Sul, were used to conduct the study to verify the oxidative profile and the Sperm DNA in each breed (Simmental and Nelore) and season of the year (summer and winter) forming a 2x2 factorial arrangement. The samples were thawed and analyzed through oxidative stress susceptibility (TBARS), measurement of intracellular enzyme activity (SOD and GPx), sperm DNA fragmentation susceptibility (SCSA), mitochondrial activity (DAB), mitochondrial membrane potential (JC-1), plasma membrane and acrosome integrity (E/N;FITC-PSA), motility (CASA) and protamination deficiency (CMA3). There was an seasonal effect on the mitochondrial membrane potential variable ($85.55 \pm 2.21\%$ and $74.58 \pm 3.30\%$, summer and winter respectively; $p = 0.0175$) and breed showed an effect on protamination deficiency ($0.52 \pm 0.09\%$ and $0.20 \pm 0.10\%$, Simmental and Nelore respectively; $p = 0.0376$). During winter, correlations were found between variables related to motility with mitochondrial membrane potential variables and TBARS with SOD. In summer, motility variables correlate with levels of mitochondrial activity and TBARS with SOD and GPx. In the principal component analysis, for the season and breed effects, the selected higher loadings were only of variables related to energy metabolism and oxidative profile. These data show the importance of energy metabolism and the possible negative effect of heat upon its functioning. The results suggest that the greater protamination deficiency in *Bos taurus* is not related to heat stress, but to a breed trait. Although not accompanied by oxidative stress, it does not seem to affect the susceptibility to sperm DNA fragmentation. Furthermore, the multifactorial and dynamic features of the semen parameters provided challenges to identify the aimed effects, since elements such as nutrition or even sperm compensatory mechanisms may have mitigated the expected differences.

Keywords: Free radicals. Animal semen. Bovine. Stress. DNA damage.

Sumário

1. INTRODUÇÃO	12
2. HIPÓTESE	15
3. OBJETIVOS	15
4. REVISÃO DE LITERATURA	15
4.1. RAÇA x CLIMA	15
4.2. ESTRESSE TÉRMICO x FERTILIDADE.....	17
4.3. ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO x ESPERMATOZOIDE	18
4.4. ESTRESSE OXIDATIVO x DANOS NO ESPERMATOZOIDE	19
4.4.1 Membrana	19
4.4.2. Mitocôndria	21
4.4.3. DNA espermático	23
5. MATERIAIS E MÉTODOS	26
5.1. LOCAL E PERÍODO EXPERIMENTAL	26
5.2. ANIMAIS.....	29
5.3. COLETA DE SÊMEN.....	29
5.4. PROCESSAMENTO DO SÊMEN	29
5.5. ANÁLISES DO SÊMEN	30
5.5.1. Análise computadorizada da motilidade (casa)	30
5.5.2. Avaliação da integridade da membrana plasmática	31
5.5.3. Avaliação de atividade mitocondrial	31
5.5.4. Avaliação da susceptibilidade a peroxidação lipídica	32
5.5.5. Avaliação da deficiência de protaminação	33
5.5.6. Mensuração de enzimas antioxidantes intracelulares	34
5.5.7 Citometria de fluxo capilar para avaliação da integridade de membranas plasmática e acrossomal, potencial de membrana mitocondrial e susceptibilidade da cromatina a fragmentação de DNA	36
5.5.8. Análise estatística	38
6 RESULTADOS	39
6.1. RESULTADOS DE INTERAÇÃO E DIFERENÇA ENTRE OS GRUPOS.....	39
6.2. ANÁLISE DE CORRELAÇÃO.....	43
6.3. ANÁLISE DE COMPONENTES PRINCIPAIS.....	48
7 DISCUSSÃO	51
8 CONCLUSÃO	57
9 REFERÊNCIAS	58

1. INTRODUÇÃO

Nos últimos 40 anos, a agropecuária brasileira tem sido considerada crucial para o crescimento econômico do país, bem como para o fornecimento de alimentos em escala mundial. Em 2020, a pecuária de corte representou 10% do PIB total do Brasil, sendo o segundo maior produtor e o maior exportador de carne bovina mundial. A região do Centro-Oeste brasileiro destaca-se pelo seu rebanho bovino, detendo 34,6% do rebanho nacional. Esta região, de clima tropical úmido, apresenta uma média de temperatura de 20 a 24 °C, sendo a máxima de 35 °C e a mínima ao redor de 10 °C (IBGE,2021).

Um dos principais desafios para a expansão desse setor foi a disponibilidade de novas áreas de pastagem (BODDEY et al., 2008) que, em 2020, totalizaram 165,2 milhões de hectares (ABIEC, 2020). Neste contexto, estratégias relacionadas ao melhoramento da nutrição, sanidade e genética, a aplicação de biotecnologias e a otimização do uso da terra podem não apenas aumentar a produtividade por hectare, como também melhorar a qualidade do produto (EUCLIDES FILHO,2000).

Um exemplo disso é a utilização do cruzamento industrial, o qual busca incorporar características desejáveis de cada raça em suas progênes (HANSEN, 2006). Enquanto animais *Bos taurus indicus* apresentam boa habilidade materna, maior resistência a parasitas e maior adaptabilidade a temperaturas mais elevadas, os animais provenientes da raça *Bos taurus taurus* possuem maiores taxas de precocidade, maior potencial de crescimento e melhor acabamento de carcaça (ABHB, 2018).

Entretanto, sabe-se que touros *Bos taurus taurus* são mais suscetíveis ao estresse térmico quando criados em regiões tropicais, o que se deve, principalmente, às diferenças evolutivas no controle da temperatura corporal, pois touros zebuínos possuem um sistema de vascularização mais adaptado para a dissipação de calor (HANSEN, 2004).

Estudos apontam que animais em estresse térmico podem apresentar menor ingestão de alimentos, menor taxa de crescimento, diminuição da produção de carne, maior vulnerabilidade a doenças e parasitas e maiores problemas

relacionados à fertilidade. (SILANIKOVE N; KOLUMAN, 2015; TAKAHASHI, 2012). Quando considerada a homeotermia do testículo, a variação térmica é ainda mais relevante, uma vez que nos mamíferos em geral, esta estrutura permanece, em média, 4 a 5 °C abaixo da temperatura corporal para seu funcionamento (BRITO et al., 2004).

Quando o animal é submetido ao calor que excede sua capacidade termorregulatória, a temperatura do testículo aumenta, elevando seu metabolismo e, conseqüentemente, sua demanda por oxigênio (RAHMAN; SCHELLANDER; SOOM, 2018). Somado a isso, este órgão apresenta menor resposta vasodilatadora frente ao aumento da temperatura, não havendo o fluxo necessário para suprir o parênquima testicular, que já se encontra necessitado de maior aporte de oxigênio. Assim, é induzido um quadro de hipóxia testicular, comprometendo o tecido e reduzindo o potencial reprodutivo do animal (SETCHELL, 1978; COOK; COULTER; KASTELIC, 1994; PAUL; TENG; SAUNDERS, 2009).

No contexto da produção por monta natural, utiliza-se a proporção de touro:vaca em torno de 1:30 (COSTA E SILVA et al., 2013), a qual pode ter sua produção de bezerros reduzida em 25 a 50% devido a um touro com baixa fertilidade (CARRILLO, 1998). Em programas de inseminação artificial o prejuízo é ainda maior, considerando que um ejaculado pode gerar até 500 doses (DIAS et al., 2012). Assim, evidencia-se ainda mais o impacto da fertilidade do macho e a importância da seleção de reprodutores bem adaptados às condições climáticas.

Muitos estudos relacionam a redução da fertilidade de animais em estresse calórico com níveis elevados de espécies reativas de oxigênio (EROs) (NICHI et al., 2006). As EROs são produtos da redução enzimática do oxigênio na produção de energia durante o metabolismo celular dentro das mitocôndrias, sendo extremamente reativas devido a seus elétrons não pareados.

Em quantidades ideais, as EROs exercem papel fisiológico fundamental para o espermatozoide como, por exemplo, no processo de capacitação espermática e na reação acrossomal (DE LAMIRANDE; GAGNON, 1993). Por outro lado, o aumento excessivo de EROs é extremamente nocivo às células espermáticas (BALIC et al., 2012).

Devido ao seu citoplasma reduzido, o espermatozóide não apresenta capacidade de sintetização (AITKEN; SAWYER, 2003). Dessa forma, há maior possibilidade de que os níveis de EROs excedam os de antioxidante da célula, promovendo o estresse oxidativo. Danos como: maiores índices de peroxidação lipídica, oxidação de proteína (BALIC et al., 2012), queda da motilidade e fragmentação de DNA estão relacionados às condições do desbalanço oxidativo, ressaltando a importância desse fator para a viabilidade do espermatozoide (DOROSTGHOAL et al., 2017).

Dentre os efeitos acima mencionados, destacam-se os danos referentes ao DNA espermático, pois, devido à dificuldade de diagnóstico e às limitações de sua identificação em exame andrológico comum, muitas vezes não são avaliados. Ou seja, o sêmen examinado pode apresentar todos os parâmetros aceitáveis e, ao mesmo tempo, conter o DNA comprometido (MAJZOUN; AGARWAL; ESTEVES, 2019; FONSECA; VALE FILHO; MIES FILHO, 1992)

Apesar de os oócitos possuírem mecanismos de reparo do DNA espermático após a fecundação (MÉNÉZO; DALE; COHEN, 2010), a reparação não é eficaz para níveis elevados de fragmentação. Assim sendo, estes espermatozóides danificados apresentam menores taxas de fecundação e maiores taxas de falhas no desenvolvimento embrionário inicial (MÉNÉZO; DALE; COHEN, 2010; AITKEN; DE LULLIS, 2007). Além disso, o comprometimento do DNA espermático tem implicações transgeracionais, pois altos índices de fragmentação podem mudar os padrões de metilação e desmetilação, causando possíveis doenças e alterações nas gerações subsequentes (MARCHETTI; WYROBEK, 2005; ENCISO et al., 2011; MCPHERSON; LANE, 2015)

Diante desses fatores, o presente estudo visou investigar a variação do perfil oxidativo (susceptibilidade ao estresse oxidativo e mensuração da atividade de enzimas intracelulares) no sêmen de touros Nelore e Simental submetidos a condições tropicais e seus efeitos na sua qualidade (susceptibilidade à fragmentação do DNA, atividade mitocondrial, potencial de membrana mitocondrial, integridade de membrana, motilidade e deficiência de protaminação).

2. HIPÓTESE

Espermatozoides de Touros *Bos taurus* submetidos ao clima tropical apresentam maiores índices de estresse oxidativo no verão e, conseqüentemente, níveis mais elevados de alterações no DNA espermático comparado ao touro *Bos indicus* sob as mesmas condições.

3. OBJETIVOS

Avaliar o perfil oxidativo e seu efeito no DNA espermático de amostras seminais criopreservadas provenientes de touros Simental (*Bos taurus*) e Nelore (*Bos indicus*) coletadas no verão e inverno.

4. REVISÃO DE LITERATURA

4.1. RAÇA x CLIMA

Devido à sua vasta amplitude territorial, o Brasil apresenta grande diversidade climática. Fundamentado na climatologia dinâmica e nos padrões de circulação atmosférica, o território brasileiro abrange desde zonas de clima temperado no sul, a equatorial no norte (IBGE, 2012). Apesar de a região ser predominantemente quente, a variedade de climas possibilita o maior aporte de raças bovinas e seus cruzamentos. Por outro lado, a inserção de raças com menor potencial de adaptação a uma região climatologicamente heterogênea, pode comprometer o potencial produtivo do rebanho (JOHNSTON; NAELAPAA; FRYE, 1963).

Atualmente, a maior concentração da pecuária de corte se localiza no Centro-Oeste do país, responsável por 34,6% do rebanho nacional. Esta região corresponde a 18% do território brasileiro (ALVES, 2009) e apresenta uma média de temperatura de 20 a 24 °C, sendo a máxima de 35 °C e a mínima ao redor de 10 °C (IBGE, 2021). Embora o Cerrado seja o principal bioma da região, este não

apresenta características de homogeneidade, pois o próprio bioma, o relevo e os sistemas atmosféricos são bastante heterogêneos, resultando em subtipos do clima tropical propriamente dito (MENDONÇA; DANNI-OLIVEIRA, 2007).

A extensão do território, a proximidade dos centros produtores de grãos e indústrias de abate foram essenciais para o avanço do setor pecuário nesta região (IBGE, 2017). Além disso, pode-se destacar a adaptação do gado *Bos indicus* às condições ambientais submetidas, apresentando maior resistência ao calor, menor incidência de parasitas e bom desempenho reprodutivo desses animais (MACEDO, 2006; TURNER, 1980).

Visando atender às diferentes demandas do mercado e buscando maior eficiência produtiva, raças taurinas vêm sendo incluídas no rebanho por meio de programas de cruzamento industrial (CI) e melhoramento genético (PACHECO et al., 2005; BIANCHINI et al., 2007). No entanto, animais *Bos taurus*, quando criados em regiões mais quentes, não apresentam a mesma eficiência adaptativa quando comparados aos *Bos indicus* (SKINNER; LOUW, 1996; CASADY; MYERS; LEGATES, 1953).

Na tentativa de amenizar essa diferença, o cruzamento industrial pode ser uma alternativa. O CI geralmente é feito entre um touro *Bos taurus* e uma vaca *Bos indicus* com objetivo de obter a prole com o máximo de heterose, isto é, a combinação de características extremas entre as raças. Assim, se busca adquirir a rusticidade, resistência à parasitas e doenças, habilidade materna e adaptação ao clima tropical do zebuíno e, ao mesmo tempo, a precocidade produtiva, reprodutiva e características desejáveis de carcaça do taurino (ARTHUR; HEARNshaw; STEPHENSON, 1999; CARTWRIGHT, 1955; KAHN et al., 2000; TEODORO; MADALENA; SMITH, 1996).

A escolha da raça a ser utilizada deve ser feita criteriosamente, não se baseando apenas no rendimento de carcaça e no potencial de ganho de peso, mas considerando a eficiência produtiva e capacidade de adaptação dos animais ao clima (OLIVIER, 2000). Quando não considerados, esses fatores podem favorecer o estresse térmico, causando perda de apetite, menor crescimento e baixa fertilidade (HANSEN, 2013; MATHEVON; BUHR; DEKKERS, 1998).

4.2. ESTRESSE TÉRMICO x FERTILIDADE

Acredita-se que as raças *Bos indicus* e seus cruzamentos tenham melhores capacidades reguladoras de calor sob alto estresse térmico do que raças *Bos taurus* devido a diferenças na taxa metabólica, consumo de água e comida e taxa de sudorese, bem como características da pelagem e cor (VERCOE, 1970).

O estresse térmico é a condição onde o animal não consegue utilizar de mecanismos fisiológicos para minimizar sua exposição ao calor e regular a temperatura corpórea (BLACKSHAW; BLACKSHAW, 1994). Essa condição leva a uma queda no consumo de alimento, perda de ganho de peso, redução na produção, entre outros.

Os efeitos do estresse térmico na reprodução são mais profundos e persistem além do período de insulto, como resultado da resposta do eixo hipotalâmico-hipofisário-gonadal (ROTH, 2017). Em machos a resposta ao estresse térmico pode aparecer depois de semanas do insulto, com redução da qualidade espermática e conseqüente redução do potencial de fertilidade (COLLIER; RENQUIST; XIAO, 2017).

Para a espermatogênese ocorrer, os testículos não devem estar acima de 33 a 34 °C (WILDEUS; ENTWISTLE, 1983). A contração ou relaxamento muscular permitem que eles sejam aproximados ou distanciados do abdômen de acordo com as condições de temperatura do ambiente (SENGER, 2012).

Outro mecanismo de regulação da temperatura testicular é o sistema vascular, onde a artéria testicular forma uma rede superficial de vasos que contribuem para a dissipação do calor. A artéria testicular fornece sangue aos testículos, é tortuosa e entrelaçada com um complexo venoso, o plexo pampiniforme, que por sua vez carrega o sangue para longe dos testículos pelo cone vascular. Esses vasos entrelaçados formam um mecanismo de troca de calor por contracorrente, resfriando o sangue que chega aos testículos e esquentando o sangue que volta ao corpo (SENGER, 2012).

Os testículos trabalham na beira da hipóxia (BARTH; BOWMAN, 1994). O aumento na temperatura ambiente leva a um aumento no metabolismo testicular, havendo necessidade de um maior aporte de oxigênio para suprir o metabolismo aeróbico. No entanto, o fluxo sanguíneo testicular aumenta pouco em resposta ao

aumento da temperatura e, conseqüentemente, o testículo fica em estado de hipóxia, o qual gera efeitos deletérios ao tecido (AITKEN; ROMAN, 2008; WAITES; SETCHELL, 1964)

Acredita-se que a hipóxia leva a um aumento da produção de EROs por conta do mecanismo de isquemia-reperfusão que consiste no retorno do metabolismo e o aporte de oxigênio à normalidade, que acaba gerando o excesso de oxigênio circulante e conseqüentemente, maior formação de espécies reativas (FILHO et al., 2004). Assim, uma hipótese para a redução de fertilidade em touros *Bos Taurus* em relação a *Bos indicus* criados em condições tropicais, seria o maior estresse oxidativo testicular, como mostrado por Nichi (2006).

4.3. ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO x ESPERMATOZOIDE

As EROs possuem um papel fisiológico na função espermática, atuando em importantes processos como a hiperativação espermática (DE LAMIRANDE; CAGNON, 1993), capacitação espermática (AITKEN et al., 2004), reação acrossomal (DE LAMIRANDE et al., 1998), e interação entre o espermatozoide e a zona pelúcida (AITKEN et al., 1995), atuando geralmente como gatilhos destas reações.

Apesar de seu papel fisiológico, são necessários sistemas de proteção para impedir a formação excessiva de EROs. Quando há um desequilíbrio entre a formação e a eliminação dessas espécies, o sistema se encontra no chamado estresse oxidativo. Nestas condições, o espermatozoide, por ter um conteúdo citoplasmático reduzido, e conseqüente limitação na quantidade de antioxidantes e mecanismos de reparação de danos celulares, é particularmente suscetível aos efeitos deletérios das EROs (NICHII, 2009). Além disso, a membrana plasmática do espermatozoide é rica em ácidos graxos poliinsaturados, essenciais à fisiologia espermática porém mais susceptíveis a oxidação pelas EROs (NICHII et al., 2007). Ademais, os produtos da peroxidação lipídica, como o malondialdeído (MDA), podem ser tão tóxicos aos espermatozoides quanto as próprias EROs. Assim, o desbalanço oxidativo pode causar danos às diferentes estruturas do espermatozoide, como as membranas plasmática e acrossomal, a mitocôndria e o DNA espermático. Essa situação é agravada pelo fato do espermatozoide não

possuir um mecanismo de reparo de danos oxidativos severos (AGARWAL et al., 2014; NICHI et al., 2007; VERNET; AITKEN; DREVET, 2004).

4.4. ESTRESSE OXIDATIVO x DANOS NO ESPERMATOZOIDE

4.4.1 Membrana

A membrana plasmática do espermatozóide possui particularidades estruturais necessárias para o seu funcionamento. Caracterizada pelo alto teor de ácidos graxos poliinsaturados, essa estrutura é extremamente suscetível a danos causados pelas EROs, as quais possuem grande afinidade pelas duplas ligações entre carbonos (MACK; EVERINGHAM; ZANEVELD, 1986; POULOS; WHITE, 1973).

A integridade de membrana está diretamente relacionada à qualidade espermática, uma vez que seus elementos envolvem processos desde a espermiogênese no testículo, até a reação acrossomal do espermatozóide no trato reprodutivo feminino (AITKEN, 2013; YEAGLE, 1994). Dessa forma, a membrana plasmática está em constante mudança de modo a interagir com o meio em que se encontra (PARKS; HAMMERSTEDT, 1985; AVELDANO; ROTSTEIN; VERMOUTH, 1992).

Sabe-se que o Ácido Docosahexaenoico (DHA) exerce papel fundamental na fluidez da membrana e na regulação da espermatogênese. Este ácido graxo de 22 carbonos e 6 ligações duplas é um dos mais longos e pode compor até 60% da membrana plasmática. Células germinativas e espermatozoides imaturos apresentaram maiores concentrações de DHA em comparação aos espermatozoides maduros, indicando sua redução durante a maturação e reforçando sua importância nos processos iniciais da célula (STUBBS; SMITH, 1984; OLLERO; POWERS; ALVAREZ, 2000).

Com relação ao processo de capacitação do espermatozoide, pode-se citar a presença de esfingomielina, um fosfolípido que controla a taxa de perda de esteróis (o colesterol, por exemplo) que, além de contribuir com a fluidez e a permeabilidade da membrana, permite, em seu efluxo, a entrada de Ca^{2+} extracelular, sendo essencial para a reação acrossomal (BENOFF, 1993; SCHROEDER et al., 1991). Além disso, foi observada a perda de desmosterol, assim como a translocação da

fosfatidilserina da peça intermediária durante a capacitação (KOTWICKA; JENDRASZAK; WARCHOL, 2002).

Ademais, compostos lipídicos presentes na membrana plasmática do espermatozoide auxiliam na sua interação com o oócito. A sulfo galactosil glicolípido e as lisofosfatidilcolinas, por exemplo, são conhecidas por induzir mudanças na zona pelúcida e oolema, promovendo a fusão dos gametas (WEERACHATYANUKUL et al., 2001; RIFFO; PAGARRA, 1997).

O efeito deletério das EROs para esta estrutura não se resume à sua maior afinidade pelas duplas ligações as quais a membrana é extremamente rica, mas principalmente na reação em cadeia que este dano culmina. A peroxidação lipídica se inicia quando a espécie reativa de oxigênio retira um átomo de hidrogênio da dupla ligação da cadeia acila, formando radicais de lipídio que logo reagem com o O₂, produzindo radicais Peroxil e Alcoxil (SEMCHYSHYN; LUSHCHAK, 2012). Estes, então, são capazes de roubar o hidrogênio de carbonos adjacentes, ou até mesmo de insaturações de outras moléculas, dando origem a novos radicais de lipídeos e, dessa forma, propagando-se até que o substrato ou a reação se acabe (AITKEN; CLARKSON; FISHEL, 1989)

Além disso, a peroxidação lipídica libera aldeídos de baixa massa molecular como a acroleína, o 4-hidroxinonenal (4-HNE) e o malondialdeído (MDA). Devido às características citotóxicas, eletrofílicas e nucleofílicas, esses aldeídos são extremamente nocivos à célula espermática, podendo não só causar alterações no DNA, mas também se ligam a proteínas mitocondriais alterando seu funcionamento e, assim, desencadeando a produção de mais EROs (JONES; MANN; SHERINS, 1979; ESTERBAUER et al., 1990; SEMCHYSHYN; LUSHCHAK, 2012; ESTERBAUER; ZOLLNER; SCHAUR, 1988).

Diante desses fatores, a peroxidação lipídica pode não só afetar o funcionamento dos componentes da membrana espermática, mas também comprometer a viabilidade celular devido à propagação em cadeia de radicais oxidantes e à liberação de aldeídos citotóxicos.

4.4.2. Mitocôndria

Sabe-se que a mitocôndria desempenha papéis fundamentais nas células eucarióticas, atuando no metabolismo (DIAZ et al., 2011), sinalização (BAUGHMAN et al., 2011) e proliferação celular (ARANY et al., 2008), regulação genética (YLIKALLIO et al., 2010), diferenciação (AGATHOCLEOUS; HARRIS, 2013) e morte celular (NUNNARI; SUOMALAINEN, 2012; SHEU; NAUDURI; ANDERS, 2006; OROURKE; VAN EYK; FOSTER, 2011). No âmbito reprodutivo, esta organela está associada à síntese de hormônios esteróides pela enzima p450_{scc}, a qual converte o colesterol em pregnenolona, um importante precursor de hormônios esteróides (MANNA et al., 2016; WING; EWING; ZIRKIN, 1984; STOCCO; MCPHAUL, 2006).

As mitocôndrias espermáticas, assim como a espermátide, passam por uma série de mudanças morfofuncionais durante a espermatogênese. Durante esse processo, parte dessas organelas são perdidas nos corpos residuais e o restante é realocado e ancorado na porção anterior das fibras densas externas, formando a peça intermediária do espermatozóide (HO; WEY, 2007).

Dessa forma, um dos seus papéis é fornecer ATP via fosforilação oxidativa, para contribuir na movimentação da célula (INABA, 2011). Essa reação se inicia pelo fornecimento de acetil-CoA para o ciclo de Krebs via glicólise e/ou pela beta oxidação de ácidos graxos. Esse ciclo reduz carregadores de elétrons (NADH e FADH₂), que são oxidados pelos complexos presentes na membrana interna da organela e fazem a cadeia transportadora de elétrons finalizada pela redução de oxigênio, produzindo água (NICHOLS; FERGUSON, 2002). Durante a passagem de elétrons nessa cadeia, periodicamente uma parcela é liberada pelos complexos e reagem com o oxigênio, formando diretamente o ânion superóxido (KOPPERS et al., 2008).

Nesse processo, cria-se um gradiente químico osmótico de prótons (H⁺) entre membranas, fazendo com que ocorra a fosforilação de ADP pela ATP sintase, liberando ATP (NICHOLS; FERGUSON, 2002). Esse gradiente de prótons é derivado pela diferença química, determinada pelo pH, e elétrica, mensurada em Volts, denominada Potencial de Membrana Mitocondrial (EVENSON; DARZYNKIEWICZ; MELAMED, 1982)

Devido a carga negativa que a matriz mitocondrial apresenta, esta organela tem a capacidade de capturar e acumular Ca^{2+} através da entrada pelos canais uniporter e também sua liberação pelo trocador Na-Ca₂ atuando na homeostase dos níveis de cálcio celular (GUNTER et al., 2000; BERNARDI, 1999; KIRICHOK; KRAPIVINSKY; CLAPHAM, 2004). O cálcio por sua vez, estimula a taxa da produção de ATP pela maior liberação de NADH provenientes do piruvato desidrogenase (PDH), isocitrato desidrogenase (ICDH), e alfa-cetoglutarato desidrogenase (α-KGDH)(MCCORMACK; HALESTRAP; DENTON, 1990). Deste modo, a quantidade excessiva de cálcio na mitocôndria resulta em maior produção de EROs (BROEKEMEIER et al., 2002; LEMASTERS et al., 2002) e porventura a apoptose celular (ORRENIUS; ZHIVOTOVSKY; NICORETA, 2003).

Tanto a alta concentração de EROs quanto a quantidade de cálcio podem estimular a abertura dos poros de transição de permeabilidade mitocondrial (WANG et al., 2013; ZOROV et al., 2000). Diante disso, há a liberação dos componentes da matriz e a organela se torna incapaz de manter o gradiente de prótons. Nesse caso, se houver o rompimento da membrana externa da mitocôndria, a exposição da citocromo C no citoplasma faz com que se inicie um processo de apoptose celular (BERNARDI, 1999; JEONG; SEOL, 2008; MIURA et al., 2002).

Em um estudo em que células espermáticas foram expostas ao sistema xantina-xantina oxidase foi observado que as EROs geradas inibiram algumas enzimas importantes para o metabolismo energético (DE LAMIRADE; GAGNON, 1992; OLIVER et al., 1987). Um exemplo é a inibição da Glicose 6 fosfato desidrogenase, que atua no ciclo das pentoses, a qual, além de fornecer energia, é a principal via de produção de NADPH da célula. Deste modo, a capacidade antioxidante do sistema da glutathiona peroxidase será reduzida, já que o NADPH é um importante cofator para o funcionamento deste sistema (GRIVEAU et al., 1995).

Embora a mitocôndria seja considerada a principal fonte de EROs, ela também está sujeita a danos oxidativos capazes de promover efeitos extremamente deletérios para o sêmen (DIANOV et al., 2001; KOPPERS et al., 2008). Isso ocorre porque qualquer alteração que resulte no mal funcionamento ou até mesmo na sua disfunção, pode levar a maiores produções de EROs, agravando o quadro oxidativo (RADI et al., 2002; KOPPERS; GARG; AITKEN, 2010). Além disso, essas espécies

reativas podem ocasionar a oxidação de proteínas relacionadas ao metabolismo energético, diminuindo a produção de ATP (PALMIERI, 1994).

Esta organela possui DNAs e ribossomos próprios para a síntese de proteínas de sua composição (AMARAL; RAMALHO-SANTOS; ST JOHN, 2007). Entretanto, esse material genético é desprovido de histonas, fazendo com que esta estrutura seja mais vulnerável a fatores oxidantes como, por exemplo, o 4-HNE, mencionado anteriormente (MELEGH et al., 1997; YAKES; VAN HOUTEN, 1997).

Danos mitocondriais são preocupantes, pois além de o mecanismo de reparação do DNA mitocondrial ser limitado (DIANOV et al., 2001), células com grandes quantidades de mitocôndrias danificadas não são capazes de completar o processo de apoptose. Somado a isso, acredita-se que fragmentos do DNA mitocondrial podem ser inseridos no genoma nuclear, ativando genes tumorais (SHAMSI et al., 2008; TURNER et al., 2003).

4.4.3. DNA espermático

O DNA espermático é extremamente condensado (JOHNSON et al., 2011) devido às proteínas nucleares que se ligam no material genético, proporcionando maior proteção contra agentes físicos e químicos no trajeto do trato reprodutivo feminino (WARD, 2010). Essa alta compactação da cromatina faz com que esse DNA seja transcricionalmente inativo (YANAGIMACHI, 1994).

A presença de espermatozoides com fragmentação de DNA no sêmen está associada a fatores, tanto da espermatogênese, como do seu armazenamento no epidídimo, ressaltando que alterações nas etapas de sua produção podem acarretar em danos posteriores.

Dentre os papéis essenciais que a célula de Sertoli exerce na reprodução, pode-se citar sua ação seletiva nas células espermáticas. De acordo com o estudo de SUGIHARA e colaboradores, esta célula tem capacidade de expressão da proteína Fas Ligando, a qual reconhece células germinativas marcadas pela Fas e as induz ao processo de apoptose, que tem como produto final a fragmentação do DNA mediado pela DNase via ativação da caspase (ENARI et al., 1998; LEE et al., 1997). Em contrapartida, a morte celular pode ser evitada pelos níveis de hormônios

esteróides produzidos pela mesma (HENRIKSEN; HAKOVIRTA; PARVINEN, 1995; TAPANAINEN et al., 1993; ERKKILA et al., 1997).

Esse mecanismo ocorre continuamente e é extremamente importante para o controle da produção de espermatozoides. A célula de Sertoli, limita o número de células germinativas ligadas a ela, regulando de acordo com sua capacidade de supri-las (AITKEN et al., 2011; RODRIGUEZ et al., 1997). Da mesma forma, o processo apoptótico ocorre em células marcadas pela Fas devido a alguma alteração morfológica. Isso faz com que menos células anormais sejam liberadas e que as restantes tenham recursos disponíveis para seu desenvolvimento (SOFIKITIS et al., 2008).

Entretanto, este sistema possui limitações, uma vez que uma parcela dessas células não são eliminadas, o que resulta na presença de células com alterações de DNA no ejaculado, reduzindo sua qualidade (SAKKAS; MARIETHOZ; ST JOHN, 1999). Situações de estresse térmico acompanhadas pelo aumento de espécies reativas de oxigênio, podem ocasionar a disfunção mitocondrial e comprometer a capacidade de síntese das células de Sertoli, o que altera a produção de hormônios esteróides, induzindo a apoptose de células germinativas (WANG et al., 2007; PÉREZ-CRESPO; PINTADO; GUTIÉRREZ-ADÁN, 2008). Nesse contexto, a oxidação de proteínas e a menor capacidade de síntese associada a esse fenômeno, pode comprometer ainda mais o reconhecimento e a retirada dessas células (HOUSTON et al., 2018; HIKIM et al., 2003).

Além disso, sabe-se que dentre os estágios celulares do ciclo espermático, espermátides e espermátocitos II são mais suscetíveis ao aumento de temperatura (SETCHELL, 1998; PAUL et al., 2008; PÉREZ-CRESPO; PINTADO; GUTIÉRREZ-ADÁN, 2008). Essa sensibilidade está relacionada às transformações que estas células estão sujeitas, tais como o processo de divisão meiótica, no caso dos espermátocitos II, e a condensação da cromatina, nas espermátides. Nesses estágios, essas células apresentam menor capacidade de reparação a danos no DNA e menor resposta apoptótica decorrentes às alterações (RAHMAN et al., 2011; PÉREZ-CRESPO; PINTADO; GUTIÉRREZ-ADÁN, 2008).

Durante a espermiogênese, a maior parte das histonas ligadas à cromatina são substituídas por proteínas de transição e, posteriormente, pelas protaminas

(HECHT, 1998; MEISTRICH et al., 2003). O processo de inclusão dessas proteínas nucleares é extremamente importante para o DNA espermático, uma vez que sua ausência pode resultar no comprometimento do potencial reprodutivo do macho (DOGAN et al., 2015; SIMON et al., 2011; HENKEL; FRANKEN., 2011; MANOCHANTR; CHIAMCHANYA; SOBHON , 2012).

Problemas na protaminação do DNA espermático foram relatados em casos de obesidade (LA VIGNERA et al., 2012a), afecções de glândulas anexas (LA VIGNERA et al., 2012b), varicocele (BLUMER et al., 2008) e estresse térmico (RAHMAN et al., 2011). Nessas condições, observa-se a ocorrência do estresse oxidativo, apontado como um dos principais causadores desse fenômeno.

A baixa fertilidade está ligada ao maior nível de fragmentação de DNA em espermatozoides com deficiência de protaminação. Isto ocorre devido à menor compactação do material genético, o qual se torna mais exposto e, desta forma, mais suscetível a danos por radicais livres (SAKKAS; ALVAREZ, 2010; BLUMER et al., 2008). Somado a isso, acredita-se que, durante a substituição das histonas pelas proteínas, cortes no DNA são efetuados pelas endonucleases com objetivo de aliviar a torção das fitas e, assim, facilitar a protaminação. Deste modo, alterações desse processo podem resultar em fragmentação do material genético remanescente (MCPHERSON; LONGO, 1993; MARCON; BOISSONNEAULT, 2004).

A análise harmônica de Fourier é uma técnica que classifica a forma do núcleo espermático em 6 amplitudes harmônicas, variando seu contorno de acordo com aos diferentes aspectos da cromatina (OSTERMEIER et al., 2001a). No estudo em que se comparou touros de raças leiteiras e de corte, quando submetidos a insulação escrotal, o sêmen apresentou diferentes padrões de forma (GEIGER, 2003). O mesmo foi observado por OSTERMEIER em relação a touros de alta e baixa fertilidade, inferindo que mudanças na forma do núcleo espermático sejam provenientes de problemas na compactação do DNA (OSTERMEIER et al., 2001b).

Ainda, sabe-se que falhas na protaminação podem ter efeitos epigenéticos, ou seja, causam mudanças na funcionalidades de genes específicos que são transmitidas pelas divisões celulares sem que haja alterações na sequência de DNA (BIRD, 2007). Um exemplo, é a variação da quantidade de proteínas inseridas que

influenciam o número de histonas remanescentes (JENKINS; CARRELL, 2012), as quais participam em mecanismos de regulação transcricional, influenciando no desenvolvimento embrionário (STUPPIA et al., 2015).

Durante a espermatogênese ocorre a metilação do DNA, considerada um dos principais fatores de mudanças epigenéticas que afetam o DNA em mamíferos (PORTELA; ESTELLER, 2010). Essa etapa consiste na adição de um grupo metil na citosina, formando 5-metilcitosina catalisada pelas enzimas da família DNA metiltransferase (NG; BIRD, 1999). Quando esta ligação é feita em regiões promotoras, a metilação é capaz de ativar e reprimir a transcrição de genes específicos, atuando no imprinting alelo-específico de alguns genes, na regulação da expressão gênica e na inativação do cromossomo X (BRONNER et al., 2007; SURANI, 1998).

Estudos prévios relatam que níveis elevados de fragmentação de DNA causados pelo estresse oxidativo geram quebras nas fitas de DNA e alteram suas bases nitrogenadas, as quais dificultam a ação da enzima DNA metiltransferase, comprometendo o mecanismo de metilação (DE LULIIS et al., 2009).

5. MATERIAIS E MÉTODOS

O presente estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUAX) da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (FMVZ/USP;Nº4130300522) e realizado de acordo com as diretrizes éticas para estudos não envolvendo animais vertebrados vivos.

5.1. LOCAL E PERÍODO EXPERIMENTAL

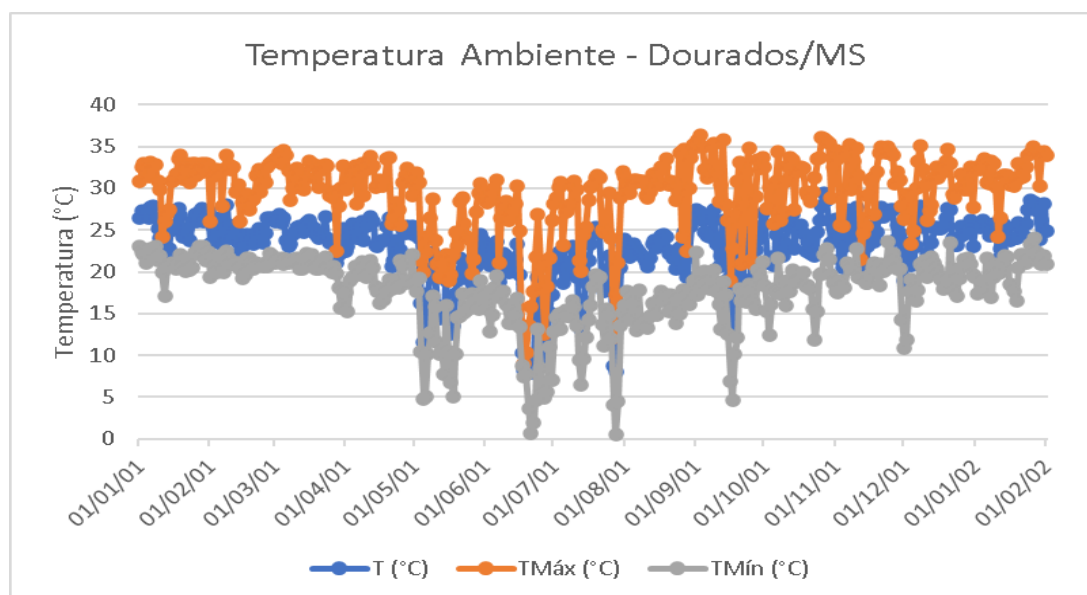
As coletas de semên foram realizadas na Fazenda Don Pierino, região da cidade de Dourados, Mato Grosso do Sul, localizada a 22º latitude sul e 54º longitude oeste, em uma altitude de 458 metros, em relação ao nível do mar. Esta região apresenta clima tropical quente úmido com temperatura mínima em torno de 10 °C, máxima de 35 °C e temperatura média de 20 a 24 °C. A precipitação

pluviométrica média anual é de 1500 - 1600 mm, com período de menor incidência no inverno e predomínio das chuvas no verão.

Foram realizadas 4 coletas de sêmen no período de 2 anos. Estas coletas foram realizadas em quatro períodos: Agosto de 2000 (inverno), Fevereiro de 2001 (verão), Julho de 2001 (inverno) e Fevereiro de 2002 (verão).

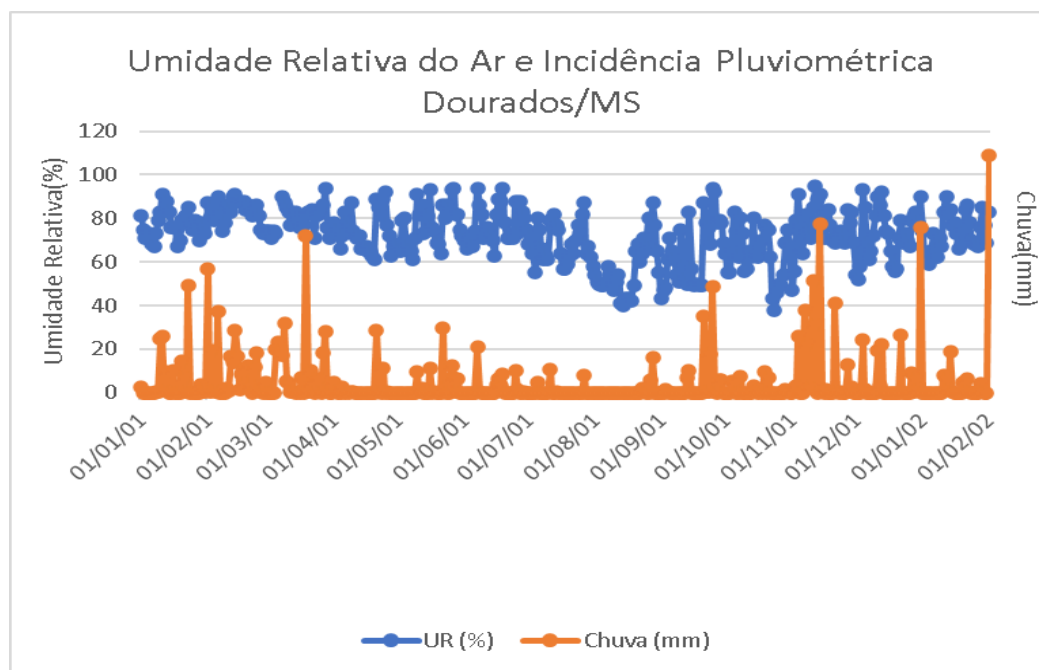
Os dados meteorológicos retratados nos gráficos (**Gráfico 1**, **Gráfico 2**) foram registrados pela estação meteorológica automática da Embrapa Agropecuária Oeste, a qual começou a operar efetivamente em Janeiro de 2001.

Gráfico 1 – Dados meteorológicos (temperaturas médias, máximas e mínimas) da região de Dourados/MS durante o período experimental – jan 2001/fev 2002.



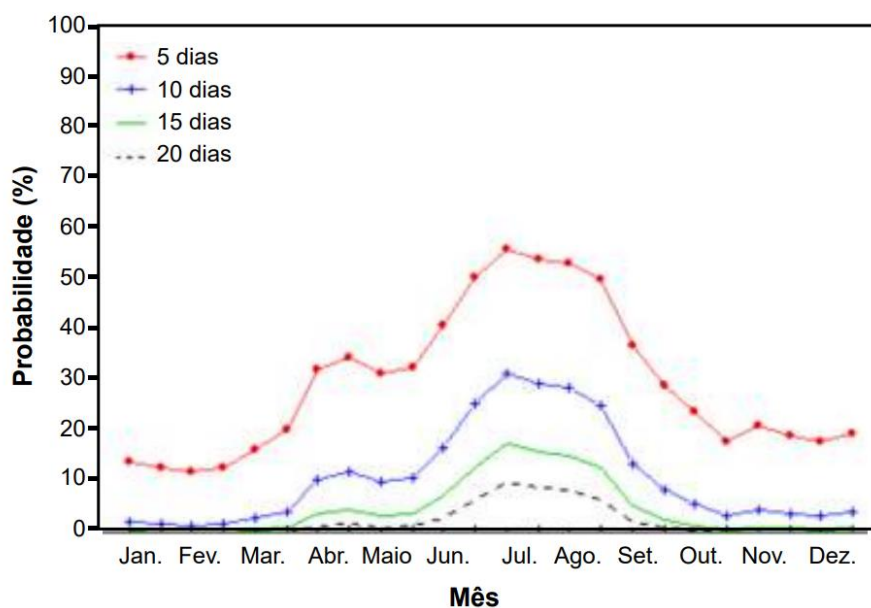
Fonte: Estação Agroclimatológica da EMBRAPA Agropecuária Oeste (EMBRAPA-CPAO).

Gráfico 2 – Umidade relativa do ar (%) e incidência pluviométrica (mm) da região de Dourados/MS durante o período experimental – jan 2001/fev 2002



Fonte: Estação Agroclimatológica da EMBRAPA Agropecuária Oeste (EMBRAPA-CPAO).

Gráfico 3 – Probabilidade de ocorrência de dias sem chuva com, no mínimo, 5, 10, 15 e 20 dias na região de Dourados.



Fonte: Estação Agroclimatológica da EMBRAPA Agropecuária Oeste (EMBRAPA-CPAO).

5.2. ANIMAIS

Foram utilizados 18 touros adultos, dentre eles 10 da raça Nelore (*Bos taurus indicus*) e 8 da raça Simental (*Bos taurus taurus*), com idade entre 3 e 4 anos. Os touros eram criados a campo e utilizados para monta natural, sendo mantidos nas mesmas condições de manejo e pastagem (*Brachiaria* sp).

Das 36 palhetas descongeladas, 17 (9 Nelore e 8 Simental) foram utilizadas para o estudo, as quais apresentaram mais de 30% de motilidade, valor mínimo aceito pelo CBRA (2013).

5.3. COLETA DE SÊMEN

O sêmen foi coletado pelo método de eletroejaculação e, na sequência, submetidos ao protocolo de criopreservação e armazenados a -196 °C.

5.4. PROCESSAMENTO DO SÊMEN

As palhetas foram descongeladas a 37 °C por 30 segundos e transferidas para tubos de 1,5 mL armazenados em banho-maria a 37 °C.

Após o descongelamento das palhetas, aproximadamente 300 µL foram encaminhados para lavagem e utilizados nas análises de citometria de fluxo e ensaio TBARS. O restante foi armazenado a 37 °C em banho-maria para as demais análises.

A lavagem foi realizada com o objetivo de retirar o diluidor de criopreservação da amostra, as sujidades e detritos celulares. Deste modo, amenizou-se possíveis interferências de leitura na citometria, assim como, na análise de susceptibilidade da peroxidação lipídica retirando qualquer efeito antioxidante presente no meio.

Para isso, 300 µL foram adicionados a 400 µL de solução Percoll 30% e centrifugados (6600 ×g por 5 minutos). Os sedimentos no fundo do tubo foram retirados com auxílio de uma pipeta e diluídos em 1 mL de Sperm-Talp suplementado com 0.3% de EFAF-BSA (*essential fatty acid free bovine serum albumin*) sendo novamente centrifugada (1100 ×g por 3 minutos). Por fim, o

sobrenadante foi descartado e foi feita a concentração espermática do sedimento remanescente com a câmara de Neubauer.

5.5. ANÁLISES DO SÊMEN

5.5.1. Análise computadorizada da motilidade (casa)

As variáveis de cinética espermática foram mensuradas pelo Sistema Computadorizado da Motilidade (CASA - Computer Assisted Sperm Analysis; Hamilton-Thorne) dentre elas, a velocidade média de percurso (VAP, $\mu\text{m/s}$), velocidade retilínea (VSL, $\mu\text{m/s}$), velocidade curvilínea (VCL, $\mu\text{m/s}$), amplitude do deslocamento lateral da cabeça (ALH, μm), frequência de batimento cruzado (BCF, Hz), retilinearidade (STR, %), linearidade (LIN, %), motilidade (MOT, %) e motilidade progressiva (PROG, %)(GOOVAERTS et al., 2006). Para esta análise, utilizou-se o setup para espécie bovina previamente estabelecido pelo fabricante do aparelho. Uma alíquota de amostra (10 μL) foi depositada entre lâmina e lamínula aquecidas a 37°C e os campos foram selecionados aleatoriamente até a contagem de 1000 células aproximadamente. O resultado foi gerado a partir da média das células nos campos observados.

Setup utilizado no Sistema Computadorizado de Análise Espermática (CASA - Computer Assisted Sperm Analysis; Hamilton Thorne, Ivos 12.3, Beverly, MA - USA) para a avaliação da cinética espermática

	Image Capture
Frames per second (Hz)	60
Number of frames	30
	Cell Detection
Minimum contrast	80
Minimum cell size (plx)	5
	Progressive Cells
Path velocity (VAP - μs)	50
Straightness (STR - %)	70
	Defaults (if <5 motile cells)
Cell size (plx)	5
Cell intensity	70
	Slow Cells
VAP cutoff (μs)	30
VSL cutoff (μs)	15
	Static Intensity Gates
Minimum	0.3
Maximum	1.7
	Static Size Gates
Minimum	0.1
Maximum	3.4
	Static Elongation Gates
Minimum	8
Maximum	97

Fonte: Hamilton Thorne Technical Guide for IVOS, TOX/IVOS, CEROS version 12.3 (2008).

5.5.2. Avaliação da integridade da membrana plasmática

Para avaliar a integridade da membrana plasmática foi utilizada a coloração Eosina - Nigrosina (E/N) descrita por Campbell et al.(1956). Uma alíquota de sêmen (5µL) foi misturada ao corante (5µL) em mesa aquecida a 37 °C. Após 30 segundos de incubação, foi realizado o esfregaço com o auxílio de outra lâmina e a análise sob aumento de 1000 vezes em imersão em microscópio óptico (Nikon, Eclipse E200, Japan). Os resultados foram expressos em porcentagens (%), onde foram contadas 100 células por lâmina, sendo classificadas como: Membrana Íntegra: coloração branca, pois não permitem a entrada do corante eosina e há um contraste com o plano de fundo escuro da nigrosina; e Membrana lesionada: coloração rosa, pois devido à alteração na permeabilidade da membrana a eosina consegue penetrar na célula.

5.5.3. Avaliação de atividade mitocondrial

A atividade mitocondrial foi avaliada pelo ensaio citoquímico da 3 '3 Diaminobenzidina (DAB). A amostra foi diluída (1:1) em solução de DAB em PBS 1 mg/mL e incubada por 1 hora a 37 °C na ausência de luminosidade. Essa substância sofre um processo oxidativo quando reage com a Citocromo C Oxidase (enzima relacionada com o metabolismo aeróbio nas mitocôndrias), formando, nas mitocôndrias ativas, um complexo de coloração marrom. Em seguida, o esfregaço foi feito com 20µL da amostra em lâmina convencional fixando-a em formol a 10% por 15 minutos para análise microscópica (Nikon, Eclipse E200, Japan), sob aumento de 1000 vezes, em imersão.

Os resultados foram expressos em porcentagens (%), nos quais foram contadas 100 células categorizadas em 4 classes, de acordo com a intensidade da coloração (HRUDKA, 1987): Classe I (DABI): células espermáticas com peça intermediária totalmente corada, indicando atividade mitocondrial total; Classe II (DABII): células espermáticas com mais da metade da peça intermediária corada,

indicando alta atividade mitocondrial; Classe III (DABIII): células espermáticas com menos da metade da peça intermediária corada, indicando baixa atividade mitocondrial; e Classe IV (DABIV): células espermáticas com a peça intermediária totalmente não corada, indicando ausência de atividade mitocondrial. A partir desses dados, foi calculado o índice de atividade mitocondrial (IAM) conforme a equação abaixo:

$$\text{IAM} = (\text{DAB I} \times 1.0) + (\text{DAB II} \times 0.5) + (\text{DAB III} \times 0.25) + (\text{DAB IV} \times 0)$$

5.5.4. Avaliação da susceptibilidade a peroxidação lipídica

A avaliação foi realizada de acordo com a metodologia descrita por Ohkawa et al. (1979). Esse método é baseado na reação entre duas moléculas de ácido tiobarbitúrico (TBA) e uma de malondialdeído (MDA), subproduto da peroxidação lipídica, em alta temperatura e pH ácido, resultando em um cromógeno de coloração rósea que pode ser quantificado por espectrofotometria.

Para isso, foi retirada uma alíquota de 200 µL da amostra lavada e adicionados 50 µL de ferro (4 mM, diluído em PBS) e 50 µL de vitamina C (20 mM, diluído em PBS) nesta ordem, e incubados com os tubos abertos por 1 hora e 30 minutos a 37°C. Este sistema produz radicais hidroxila, promovendo um desafio oxidativo às células espermáticas.

Após a incubação, foram adicionados 600 µL de ácido tricloroacético 10% (TCA) a 5 °C e novamente centrifugado (20.800xg durante 15 minutos a 5 °C), para a precipitação das proteínas.

Foram transferidos 800 µL do sobrenadante para criotubos, armazenando-os no freezer para posterior avaliação. No momento das análises, as amostras foram descongeladas e acrescidas a 800 µL de ácido tiobarbitúrico (TBA, 1% diluído em 0.05 N de hidróxido de sódio). Os criotubos foram então incubados em banho-maria (100 °C) por 15 minutos e imediatamente resfriados no gelo (0° C), com o intuito de interromper a reação.

A concentração de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) foi quantificada em leitura em espectrofotômetro (Ultrospec 3300 pro®, Amersham Biosciences, Cambridge, United Kingdom), com comprimento de onda de 532 nm. Os resultados foram comparados a uma curva padrão, previamente estabelecida, de

uma solução padrão de malondialdeído e, assim, expressos em nanogramas de MDA. Por fim, a concentração de malondialdeído foi ajustada de acordo com a concentração da amostra lavada para cada 1×10^6 espermatozóides (ng/ 10^6 sptz).

5.5.5. Avaliação da deficiência de protaminação

A avaliação da deficiência de protaminação foi realizada utilizando-se o corante Cromomicina A3 (CMA3), descrito por Bianchi e adaptado por Castro e colaboradores (2018). O CMA3 é um fluorocromo específico que atua nas regiões de união citosina-guanina, competindo pelos mesmos sítios de ligação da proteína, sendo assim, quando esta se encontra prejudicada, o corante é incorporado na curvatura menor das fitas do DNA.

A lâmina foi feita com esfregaço manual contendo, aproximadamente, 30 milhões de espermatozóides e fixada em solução Carnoy (3:1 de etanol e ácido acético; Merck, Darmstadt, Germany) a 4 °C, por 5 minutos. Em seguida as lâminas foram colocadas em cubetas com solução PBS sem cálcio e magnésio por 5 minutos. Na sequência, o PBS foi descartado, e as lâminas foram lavadas e colocadas em água destilada por mais 5 minutos. Depois disto, as lâminas foram retiradas da cubeta e deixadas à temperatura ambiente para secagem.

Devido a fotossensibilidade dos corantes utilizados, os procedimentos de coloração das lâminas foram realizados no escuro. Foram aliqüotados 100 µl da solução do corante CMA3 (0.25 mg/mL) diluído em tampão McIlvaine (7 mL ácido cítrico 0.1M + 32.9 mL Na₂HPO₄-7H₂O, 0.2 M, pH 7.0, contendo 10 mM MgCl₂) e cobertas com uma lamínula por 20 minutos. Em seguida, as lamínulas foram retiradas e o excesso do corante restante na lâmina foi lavado com água destilada. Após a lavagem as lâminas foram tratadas com solução Hoechst 33342 (1µL/mL) por 2 a 5 minutos e novamente submersas na cubeta contendo PBS sem cálcio e magnésio por 5 minutos para remoção da solução utilizada. Depois de secas, as lâminas foram tratadas com 30 µL de solução 1,4 diazabicyclo(2.2.2) octane (DABCO) com o objetivo de prolongar o efeito da fluorescência e cobertas com lamínulas fixadas com esmalte, sendo armazenadas a 4 °C, até a leitura.

A leitura das lâminas foi feita em microscópio de fluorescência (Olympus IX80, Olympus Corporation) utilizando amplificação de 200x. Os resultados são expressos em porcentagem (%). Para isso, foram contadas 500 células por lâmina,

sendo o total de células identificado pela coloração de Hoechst (filtros: 460-490 nm de excitação e 520 nm de emissão) e os espermatozoides positivos pela coloração de CMA3 (filtros: 330-385 nm de excitação e 420 nm de emissão).

5.5.6. Mensuração de enzimas antioxidantes intracelulares

5.5.6.1. EXTRAÇÃO DE ENZIMAS ANTIOXIDANTES

As enzimas antioxidantes intracelulares foram extraídas de acordo com protocolo descrito por Castro e colaboradores (2016). Para a remoção do diluidor, 200 µL de cada amostra foram diluídos em 800 µL (1:5) em Sperm-TALP e adicionados com cuidado em 7.5 mL de solução de sacarose (NaCl 0.9%, sacarose 7.5% e glicose 0.18%).

As amostras foram submetidas a duas centrifugações (200 xg, por 5 minutos e 900 xg, por 10 minutos) e 7.5 mL do sobrenadante foram removidos e descartados. Após a segunda centrifugação, foram adicionados 200 µL de Triton 4% à mistura e foi feita a incubação durante 30 minutos em banho-maria com agitação a 25 °C. Em seguida, as amostras foram novamente centrifugadas (600 xg, por 8 minutos) e 500 µL do sobrenadante foram removidos e armazenados a -20 °C para análise posterior.

5.5.6.2. QUANTIFICAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DA ENZIMA SUPERÓXIDO DISMUTASE (SOD)

A atividade da enzima antioxidante superóxido dismutase (SOD) foi quantificada por espectrofotometria (Ultrospec 3300 PRO® , Amersham Biosciences, EUA), de acordo com protocolo descrito por Nichi e colaboradores (2007). A mensuração da atividade da SOD foi realizada indiretamente, por meio da redução do citocromo C pelo superóxido ($O_2^{\bullet-}$). O sistema xantina-xantina oxidase produz $O_2^{\bullet-}$, o qual reduz o citocromo C gradativamente. Deste modo, ocorre uma competição entre SOD e citocromo C, convertendo o superóxido em peróxido de hidrogênio, diminuindo a taxa de redução do citocromo C (FLOHÉ; ÖTTING, 1984). Nesta técnica, a absorbância foi mensurada a cada 5 segundos e determinada a cada 5 minutos em espectrofotômetro comprimento de onda de 550 nm a 25 °C.

Para a leitura foram adicionados, em cubetas de plástico, 10 µL do sobrenadante, 835 µL de solução citocromo C (1 mM) e Xantina (50 mM), e 15 µL de xantina oxidase diluída em tampão fosfato de sódio/EDTA (50 and 100 mM,

respectivamente, pH 7.8). A concentração de xantina oxidase utilizada foi calculada de acordo com a quantidade de O_2^- gerado no sistema e assim mensurando a taxa de redução da citocromo C padronizada em 0.025 unidades de absorvância/min. Considerando essa quantidade de xantina oxidase como base, a quantificação de SOD da amostra é feita pela taxa de decaimento da citocromo C reduzida da mistura em comparação com a solução de concentração de xantina oxidase determinada (branco).

O resultado é expresso em U/mL/10⁶espermatozoides, calculado pela da diferença das unidades de absorvância/minuto da mistura e do branco, dividido pela absorvância do branco multiplicado pelo dobro da diluição, pois 1 unidade de atividade da SOD total equivale a 50 % deste valor.

5.5.6.3. QUANTIFICAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DA ENZIMA GLUTATIONA PEROXIDASE (GPX)

A mensuração da atividade da GPx foi feita de acordo com o protocolo de Beutler adaptado por Homem de Bittencourt (1998). A quantificação da atividade da GPx foi realizada indiretamente, por meio do consumo de NADPH por espectrofotometria (Ultrospec 3300 PRO® , Amersham Biosciences, EUA). O hidroperóxido reage com a glutaciona reduzida (GSH) catalisada pela enzima GPx, formando glutaciona dissulfeto (GSSG-glutaciona oxidada) e esta, pela catalisação da enzima glutaciona redutase(GSSG), reage com o NADPH, liberando GSH.

Para a leitura, foram aliqotados 10 µL de azida sódica (0.12 mM), 500 µL de NADPH (0.12 mM) 50 µL de GSH (1 mM), 10 µL de GSSGr (0.25 U/mL), 330 µL de solução tampão fosfato de sódio/EDTA (143 mM; 6.3 mM; pH 7.5) e 50 µL de amostra. A azida sódica é colocada para inibir a ação da catalase no hidroperóxido. Após a estabilização da mistura, a reação foi iniciada adicionando 50 µL de hidroperóxido tertbutyl (1.2 mM) e o consumo de NADPH analisado a cada 5 segundos por 5 minutos em comprimento de onda de 340nm a 37°C. O resultado é dado em U/mL do semen sendo calculado pela fórmula $(-\text{slope}/0.00622) \times 20$, sendo 6.22 o coeficiente de extinção do NADPH.

5.5.7 Citometria de fluxo capilar para avaliação da integridade de membranas plasmática e acrossomal, potencial de membrana mitocondrial e susceptibilidade da cromatina a fragmentação de DNA.

A avaliação da integridade de membranas plasmática e acrossomal, potencial de membrana mitocondrial e susceptibilidade da cromatina espermática a fragmentação de DNA foi realizada por citometria de fluxo capilar (Guava EasyCyte Mini System – Guava Technologies®) para amostras de 25×10^6 espermatozoides/mL. Os gráficos destas avaliações foram analisados utilizando-se o software v8.7 (Flow Cytometry Analysis Software – Tree Star Inc., Ashland, Oregon, USA). Para análise dos gráficos, a população de interesse foi identificada e selecionada segundo o tamanho e a fluorescência das mesmas.

5.5.7.1. INTEGRIDADE DE MEMBRANA PLASMÁTICA E ACROSSOMAL

Para análise da integridade da membrana plasmática e acrossomal de uma mesma população celular, foi adicionado na mesma amostra as sondas iodeto de propídeo [PI (0.5% mg/mL, 0.9% NaCl v/v)] e *Pisum sativum* (PSA) conjugada ao fluoróforo isotiocianato de fluoresceína FITC-PSA (100 µg/mL, azida sódica 10% m/v, DPBS q.s.p. 20 mL)], conforme Hamilton et al. (2016). O Pi se liga ao DNA e emite fluorescência vermelha, indicando que a membrana plasmática está lesionada, enquanto o FITC-PSA se liga às glicoproteínas da membrana acrossomal externa, emitindo fluorescência verde quando a membrana acrossomal está lesionada. A leitura foi feita em ambiente escuro, onde a solução de FITC-PSA foi preparada adicionando-se 190 µL de azida 1% e 10 µL de FITC (24.3 µg/mL) e posteriormente foi adicionado 11.3 µL de PI (6.87 µg/mL) . Cerca de 13 µL dessa solução foi colocada em microtubos juntamente com 175000 espermatozoides em 7.5 uL e 30 µL de CZB-Hepes (NaCl 0.476 g, KCl 0.036 g, KH₂PO₄ 0.016 g, MgSO₄.7H₂O 0.029 g, NaHCO₃ 0.042 g, CaCl₂.2H₂O 0.025 g, NaEDTA.2H₂O 0.004 g, L-Glutamine 0.015 g, Sodium Lactate Syrup 396 µL, Sodium Pyruvate 0.003 g, Glucose 0.1 g, Hepes-Sodium 0.052, PVA 0.01 g, em pH 7.4). Após 5 minutos foi adicionado 300 µL de PBS (phosphate buffered saline) sem cálcio e magnésio para realização da leitura em citômetro de fluxo microcapilar (Guava Easy Cyte™ Mini System) feita sob excitação de 488 nm e emissão de 630-650 nm para a sonda Pi e 515-530 nm para a sonda FITC.

5.5.7.2. POTENCIAL DE MEMBRANA MITOCONDRIAL

A sonda JC-1 [(iodeto de 5,5',6,6'-tetracloro-1,1,3,3-tetrametilbenzimidazole carbocianina (76.5 μ M)] identifica a diferença do potencial mitocondrial. Os procedimentos foram feitos em sala escura, devido à fotossensibilidade da sonda. Foi adicionado 0.5 μ L de JC-1 (1 μ M), 175000 espermatozoides em 7.5 μ L e 30 μ L de meio CZB-Hepes. Após incubação de 5 minutos adicionou-se 300 μ L de PBS (phosphate buffered saline) sem cálcio e magnésio para realização da leitura em citômetro de fluxo microcapilar (Guava Easy Cyte™ Mini System) sob excitação de 488 nm e detecção a 590 nm. As amostras foram classificadas em potencial baixo, intermediário e alto de acordo com a fluorescência emitida (verde, laranja e vermelho respectivamente).

5.5.7.3. AVALIAÇÃO DA SUSCEPTIBILIDADE DA CROMATINA ESPERMÁTICA À FRAGMENTAÇÃO DE DNA

Esta avaliação é baseada no teste *Sperm Chromatin Structure Assay* (SCSA; EVENSON; JOST, 2000). É utilizada a sonda laranja de acridina (LA), que se intercala ao DNA espermático após a sua desestabilização das duplas fitas provocada pelo detergente ácido. O LA pode estar ligado a uma fita simples (emite fluorescência vermelha) sugerindo uma possível desnaturação da estrutura da cromatina, ou dupla (emite fluorescência verde) confirmando a integridade da dupla fita (BOE-HANSEN et al., 2005).

Este procedimento foi realizado com 375.000 células. Em sala escura, as amostras que foram congeladas com 100 μ L de tampão TNE (Tris-HCl 0.01M, NaCl 0.15M, EDTA 1mM e água destilada, pH 7.4), foram descongeladas e centrifugadas por 3 minutos a 2000 \times g. Logo após, foi retirado o sobrenadante, o pellet foi ressuspensionado em 50 μ L de tampão TNE e depois disso, 100 μ L de detergente ácido (HCl 0.08 M, NaCl 0.15 M, Triton X-100 0.1% em água destilada, pH 1.2). Após 30 segundos, adicionou-se 300 μ L LA (ácido cítrico 0.1 M, Na₂HPO₄ 0.2 M, EDTA 0.001 M, NaCl 0.15 M, estoque de LA 6 μ g / mL em água destilada, pH 6). Após 10 minutos realizou a leitura em citômetro de fluxo microcapilar (Guava Easy Cyte™ Mini System).

Para validar esse teste, foi determinado, de acordo com Castro et al. (2018), um controle positivo (LA+) e negativo (LA-). Para isso, o semen com TNE (Tris-HCl

0.01M, NaCl 0.15M, EDTA 1mM e água destilada, pH 7.4) foi descongelado, dividido igualmente em 2 tubos e centrifugados (6500 \times g por 2 minutos). O sobrenadante foi descartado e o restante ressuspensionado com 50 μ L de TNE, adicionando 100 μ L de TNE para o controle LA- e 100 μ L de detergente super ácido 10%[HCl fumegante (1.2 M) + detergente ácido (pH 0.1); 1:10] para controle LA+ incubando-os por 5 minutos para induzir a fragmentação total do DNA espermático.

Em seguida, foram adicionados 300 μ L de TNE e centrifugado (6500 \times g por 2 minutos). Aproximadamente 500 μ L do sobrenadante foi descartado e o *pellet* foi ressuspensionado em 50 μ L de TNE, adicionando mais 100 μ L de detergente ácido por 30 segundos. Posteriormente, foram adicionados 300 μ L de Laranja de Acridina (LA) e o LA+ (100%) foi misturado com o controle LA- (sem indução por HCl e detergente ácido) na proporção de 0%, 25%, 50%, 75% e 100%. A leitura das amostras foi realizada pelo Citômetro de Fluxo EasyCyte (Guava Easy CyteTM Mini System) com excitação de 488 nm e emissão de 630-650 nm (vermelho) e 515-530 nm (verde).

5.5.8. Análise estatística

Os dados foram analisados no programa do *SAS System for Windows* (SAS Institute Inc., NC, E.U.A) e testados para normalidade dos resíduos e homogeneidade das variâncias pelo aplicativo *SAS Guided Data Analysis*.

Variáveis que não seguiram estas premissas foram transformadas (logaritmo na base 10 - $\text{Log}_{10}X$; Raiz quadrada - RQ X; Quadrado - X^2). Nos casos em que a normalidade não foi obtida, empregou-se o procedimento NPAR1WAY de análise de variância não paramétrica.

O experimento foi delineado em fatorial 2x2, verificando-se a interação entre efeitos de raça e estação do ano (Nelore/Inverno vs Nelore/Verão vs Simental/Inverno vs Simental/Verão) com o procedimento GLM (general linear models). No caso das variáveis que não apresentaram interação significativa, seus efeitos foram analisados separadamente, aplicando-se o teste T (Verão vs Inverno e Nelore vs Simental).

Nas análises paramétricas, o nível de significância usado para rejeitar H₀ (hipótese de nulidade) foi de 5%. Já para a análise das variáveis não paramétricas utilizou-se o nível de significância do teste Wilcoxon. Os resultados foram apresentados em médias não transformadas \pm erro padrão da média.

As análises de correlação foram feitas com os dados não transformados pelo teste Spearman com ranqueamento dos resultados. Deste modo, foi feita a comparação dos resultados obtidos da correlação das variáveis de maior importância para o estudo, nas diferentes estações do ano.

A análise de componentes principais (PCA) foi realizada com o programa Past 4.0 (HAMMER; HARPER; RYAN, 2001). Este teste foi utilizado para verificar quais variáveis tiveram maior impacto na variância entre os grupos (Estação e Raça). Para isso, os dados foram normalizados pela transformação por log e escala centralizada pela média. Deste modo, considerou-se os valores de *loadings* para determinar o efeito da variável em cada componente principal ou seja, *loadings* maiores (positivos ou negativos) indicam maior efeito, enquanto valores positivos e negativos indicam que a variável e o componente principal estão positivamente ou inversamente correlacionados. Os resultados são apresentados em gráficos *biplot* (amostras e variáveis) onde as amostras dos diferentes grupos são apresentadas em clusters circundados por elipses de intervalo de confiança de 95%. As variáveis com maiores *loadings* são apresentadas com escala *eigenvalue*, a qual indica o nível de importância da mesma para os grupos analisados.

6 RESULTADOS

6.1. RESULTADOS DE INTERAÇÃO E DIFERENÇA ENTRE OS GRUPOS

Não foi possível observar interação entre raça e estação (RAÇA*ESTAÇÃO) em relação às variáveis analisadas, ou seja, os grupos de cada raça (NELORE e SIMENTAL) não se comportam diferente dentro de cada estação (VERÃO e INVERNO) e/ou que os grupos de cada estação não se diferem nos grupos de cada raça (**Tabela 1**).

Tabela 1 – Resultados da análise de interação de raça (NELORE vs SIMENTAL) e estação (VERÃO e INVERNO) de atributos espermáticos do sêmen bovino.

VARIÁVEL	INTERAÇÃO		p
	RAÇA	ESTAÇÃO	
Motilidade total (%)	0,6836	0,9845	0,3045
Motilidade progressiva (%)	0,5223	0,6402	0,8711
VAP - Velocidade média (µm/s)	0,865	0,6938	0,2086
VSL - Velocidade linear (µm/s)	0,742	0,878	0,1453
VCL - Velocidade curvilínea (µm/s)	0,3852	0,5161	0,8733
ALH - Amplitude do movimento lateral da cabeça (µm)	0,989	0,6193	0,8699
BCF - Frequência de batimento cruzado (Hz)	0,8593	0,4567	0,2519
STR - Retilinearidade (%)	0,5829	0,8859	0,8517
LIN - Linearidade (%)	0,9048	0,8689	0,5753
Velocidade rápida (%)	0,2527	0,6676	0,722
Velocidade média (%)	0,3104	0,4557	0,179
Velocidade lenta (%)	0,5026	0,3656	0,2775
Estáticos (%)	0,6836	0,9845	0,3045
Atividade mitocondrial alta - DAB I (%)	0,1469	0,5327	0,8849
Atividade mitocondrial média - DAB II (%)	0,6024	0,8146	0,6274
Atividade mitocondrial baixa - DAB III (%)	0,5289	0,177	0,4408
Ausência de atividade mitocondrial - DAB IV (%)	0,1286	0,7615	0,4706
Índice de atividade mitocondrial (%)	0,1108	0,4835	0,9293
Potencial de membrana mitocondrial baixo (%)	0,6713	0,0299	0,3462
Potencial de membrana mitocondrial médio (%)	0,8622	0,4548	0,6957
Potencial de membrana mitocondrial alto (%)	0,6641	0,0706	0,61
Integridade de membrana plasmática (%)	0,6585	0,9978	0,7643
Membrana acrossomal lesionada e membrana plasmática íntegra (%)	0,9693	0,1526	0,7342
Membrana acrossomal íntegra a e membrana plasmática lesionada (%)	0,8359	0,4828	0,4715
Suscetibilidade a fragmentação de DNA (%)	0,8667	0,7511	0,3747
TBARS (ng de MDA/106 espermatozoides)	0,4143	0,7403	0,8091
CMA3 - Deficiência de protaminação (%)	0,0361	0,5009	0,5551
Atividade enzimática da Glutaciona Peroxidase (U/mL)	0,9264	0,4028	0,6768

Valores de $p < 0.05$ foram considerados como interação entre os fatores.

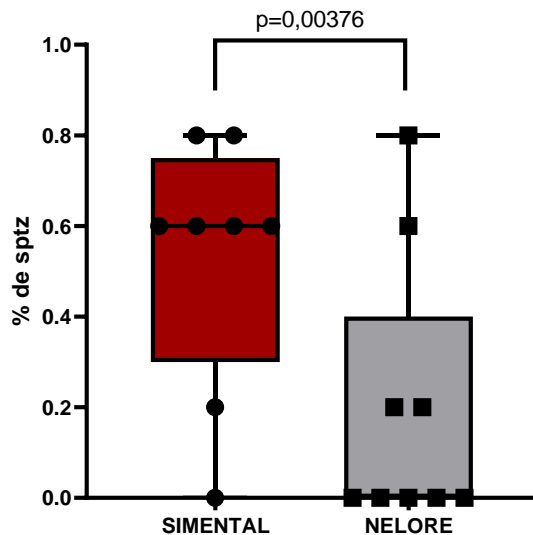
Ao juntar as amostras de estações diferentes e comparar o efeito da raça, observou-se que touros da raça Simental apresentaram maior percentual de espermatozoides com deficiência de protaminação (CMA3) em relação aos touros da raça Nelore ($0.52 \pm 0.09\%$ e $0.20 \pm 0.10\%$, respectivamente; $p = 0.0376$; **Tabela 2; Gráfico 4**). Da mesma forma, quando considerado apenas o fator da estação do ano, touros coletados no verão apresentaram maior percentual de células com baixo potencial de membrana mitocondrial em relação às amostras coletadas no inverno ($85.55 \pm 2.21\%$ e $74.58 \pm 3.30\%$, respectivamente; $p = 0.0175$; **Tabela 3; Gráfico 5**)

Tabela 2 – Efeito da raça (NELORE e SIMENTAL) nos atributos espermáticos do sêmen bovino.

VARIÁVEL	RAÇA		P
	NELORE (N=9)	SIMENTAL (N=8)	
Motilidade total (%)	43.22±3.84	41.00±3.84	0,689
Motilidade progressiva (%)	21.44±2.81	18.50±1.58	0,38
VAP - Velocidade média (µm/s)	81.50±4.19	78.36±4.00	0,597
VSL - Velocidade linear (µm/s)	66.56±1.40	65.70±2.18	0,263
VCL - Velocidade curvilínea (µm/s)	135.4±14.39	121.3±9.99	0,281
ALH - Amplitude do movimento lateral da cabeça (µm)	5.44±0.54	5.55±0.49	0,888
BCF - Frequência de batimento cruzado (Hz)	24.28±1.47	24.11±0.98	0,922
STR - Retilinearidade (%)	82.88±2.55	84.87±2.08	0,556
LIN - Linearidade (%)	58.44±3.83	59.00±3.39	0,915
Velocidade rápida (%)	27.88±3.22	22.12±2.10	0,158
Velocidade média (%)	5.11±0.84	6.25±0.92	0,376
Velocidade lenta (%)	9.88±1.45	12.62±2.10	0,415
Estáticos (%)	56.77±3.84	59.00±3.84	0,689
Atividade mitocondrial alta - DAB I (%)	49.00±6.31	37.87±3.43	0,147
Atividade mitocondrial média - DAB II (%)	31.11±3.22	33.75±2.34	0,518
Atividade mitocondrial baixa - DAB III (%)	13.33±2.40	11.00±2.22	0,842
Ausência de atividade mitocondrial - DAB IV (%)	9.55±3.57	17.37±2.67	0,101
Índice de atividade mitocondrial (%)	67.13±4.74	57.50±3.07	0,111
Potencial de membrana mitocondrial baixo (%)	77.93±2.79	81.72±4.30	0,476
Potencial de membrana mitocondrial médio (%)	12.61±1.88	13.09±3.68	0,696
Potencial de membrana mitocondrial alto (%)	10.04±1.38	9.91±2.46	0,962
Integridade de membrana plasmática (%)	41.88±4.42	39.12±2.58	0,599
Membrana acrossomal lesionada e membrana plasmática íntegra (%)	8.66±1.51	13.42±3.96	0,653
Membrana acrossomal íntegra e membrana plasmática lesionada (%)	14.73±1.26	14.65±2.03	1,974
Suscetibilidade a fragmentação de DNA (%)	0.44±0.41	0.51±0.20	0,79
TBARS (ng de MDA/106 espermatozoides)	10.94±2.41	11.25±4.18	0,433
CMA3 - Deficiência de protaminação (%)	0.20±0.10	0.52±0.09	0,038
Atividade enzimática da Glutaciona Peroxidase (U/mL)	1.62±0.53	3.16±1.95	0,706

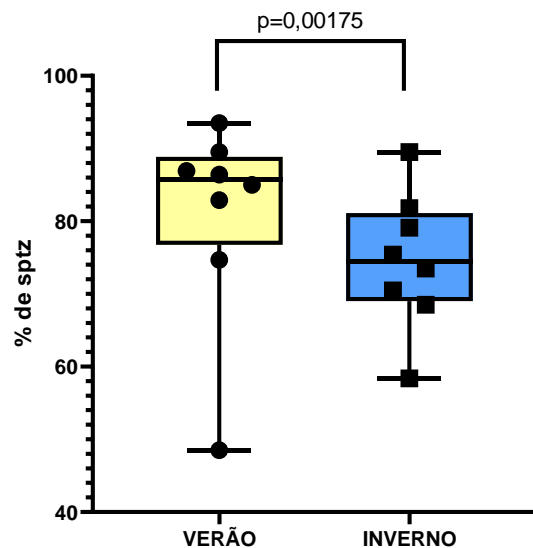
Resultados em média ±SEM e valor de P. Valores de P<0.05, são apresentados em vermelho.

Gráfico 4 – Gráfico de deficiência de protaminação (CMA3) das raças (NELORE e SIMENTAL)



Resultados apresentados em *boxplot* com mediana, espaço interquartis, limites mínimo e máximo e média (+)

Gráfico 5 – Gráfico de Potencial de membrana mitocondrial baixo das amostras em cada estação (VERÃO e INVERNO)



Resultados apresentados em *boxplot* com mediana, espaço interquartis, limites mínimo e máximo e média (+)

Tabela 3 – Efeito da estação (VERÃO e INVERNO) nos atributos espermáticos do sêmen bovino.

VARIÁVEL	ESTAÇÃO		P
	VERÃO (N=8)	INVERNO (N=9)	
Motilidade total (%)	41.87±3.45	42.44±4.15	0,9175
Motilidade progressiva (%)	18.75±1.52	21.22±2.87	0,4614
VAP - Velocidade média (µm/s)	78.47±4.57	81.06±3.75	0,6685
VSL - Velocidade linear (µm/s)	66.15±2.47	66.11±1.32	0,9872
VCL - Velocidade curvilínea (µm/s)	133±15.38	125.1±10.42	0,6777
ALH - Amplitude do movimento lateral da cabeça (µm)	5.71±0.51	5.30±0.52	0,5826
BCF - Frequência de batimento cruzado (Hz)	23.43±1.20	24.88±1.29	0,4243
STR - Retilinearidade (%)	83.87±1.82	83.77±2.74	0,9769
LIN - Linearidade (%)	58.37±3.20	59±3.95	0,904
Velocidade rápida (%)	23.37±2.47	26.77±3.22	0,4157
Velocidade média (%)	5.37±0.86	5.88±0.91	0,6897
Velocidade lenta (%)	12.87±2.14	9.66±1.35	0,2445
Estáticos (%)	58.12±3.45	57.55±4.15	0,91
Atividade mitocondrial alta - DAB I (%)	44.62±6.07	43±5.24	0,8424
Atividade mitocondrial média - DAB II (%)	33.25±2.43	31.55±3.20	0,68
Atividade mitocondrial baixa - DAB III (%)	8.37±2.44	12.66±1.97	0,1945
Ausência de atividade mitocondrial - DAB IV (%)	13.75±3.49	12.77±3.51	0,8472
Índice de atividade mitocondrial (%)	63.34±5.09	61.94±3.87	0,8302
Potencial de membrana mitocondrial baixo (%)	85.55±2.21	74.58±3.30	0,0175
Potencial de membrana mitocondrial médio (%)	12.16±3.66	13.54±1.89	0,3843
Potencial de membrana mitocondrial alto (%)	7.44±1.51	12.51±1.95	0,0609
Integridade de membrana plasmática (%)	40.12±2.45	41±4.52	0,8679
Membrana acrossomal lesionada e membrana plasmática íntegra (%)	13.66±3.27	8.44±2.42	0,1065
Membrana acrossomal íntegra a e membrana plasmática lesionada (%)	15.53±1.58	13.94±1.64	0,4971
Suscetibilidade a fragmentação de DNA (%)	0.37±0.08	0.57±0.21	0,6987
TBARS (ng de MDA/106 espermatozoides)	13.02±3.98	9.36±2.50	0,9317
CMA3 - Deficiência de protaminação (%)	0.35±0.11	0.35±0.11	0,4607
Atividade enzimática da Glutathiona Peroxidase (U/mL)	3.65±1.96	1.18±0.18	0,3261

Resultados em média ±SEM e valor de P. Valores de P<0.05, são apresentados em vermelho.

6.2. ANÁLISE DE CORRELAÇÃO

Nas amostras coletadas no inverno, houve correlação positiva entre a motilidade total dos espermatozoides e o PMM alto ($r = 0.9518$, $p = 0.0003$), velocidade rápida ($r = 0.8739$, $p = 0.0021$), motilidade progressiva ($r = 0.7763$, $p = 0.0139$), velocidade média ($r = 0.7404$, $p = 0.0225$) e negativa com espermatozoides estáticos ($r = -1$, $p = <.0001$) e PMM baixo ($r = -0.8434$, $p = 0.0085$). O PMM alto correlacionou positivamente com a motilidade total ($r = 0.9518$, $p = 0.0003$), velocidade rápida ($r = 0.7619$, $p = 0.028$) e motilidade progressiva ($r = 0.7185$, $p =$

0.0446), por outro lado correlacionou negativamente com espermatozoides estáticos ($r = -0.9518$, $p = 0.0003$) e PMM baixo ($r = -0.8095$, $p = 0.0149$). Além disso, o TBARS correlacionou positivamente com a SOD ($r = 0.8833$, $p = 0.0016$)(**Quadro 1**).

Em relação às amostras coletadas no verão, a motilidade total correlacionou positivamente a motilidade progressiva ($r = 0.8024$, $p = 0.0165$) e velocidade rápida ($r = 0.7273$, $p = 0.040$) e negativamente o VSL ($r = -0.8214$, $p = 0.0234$), espermatozoides estáticos ($r = -1$, $p = <.0001$) e VAP ($r = -0.8929$, $p = 0.0068$). A variável da velocidade média apresentou correlação positiva com o DABIII ($r = 0.7805$, $p = 0.0223$), LIN ($r = 0.8486$, $p = 0.0077$), STR ($r = 0.80013$, $p = 0.0171$), BCF ($r = 0.7637$, $p = 0.0274$) e velocidade baixa ($r = 0.7561$, $p = 0.0299$), e negativa com VAP ($r = -0.9819$, $p = <.0001$), VSL ($r = -0.9456$, $p = 0.0013$), VCL ($r = -0.8486$, $p = 0.0077$), ALH ($r = -0.7806$, $p = 0.0223$), DABI ($r = -0.7153$, $p = 0.0461$) e IAM ($r = -0.7153$, $p = 0.0461$). O DABI correlacionou positivamente com IAM ($r = 1$, $p = <.0001$), VCL ($r = 0.8333$, $p = 0.0102$), VAP ($r = 0.7857$, $p = 0.0362$) e ALH ($r = 0.7784$, $p = 0.0229$), e negativamente com DABIV ($r = -0.9102$, $p = 0.0017$), STR ($r = -0.9047$, $p = 0.002$), BCF ($r = -0.8571$, $p = 0.0065$), DABIII ($r = -0.8503$, $p = 0.0075$), LIN ($r = -0.8095$, $p = 0.0149$), velocidade média ($r = -0.7153$, $p = 0.0461$). Por fim, o TBARS correlacionou positivamente com a atividade da GPX ($r = 0.9285$, $p = 0.0009$) e da SOD ($r = 0.9047$, $p = 0.002$) (**Quadro 2**).

Quadro 1 – Correlações de variáveis funcionais das amostras coletadas no INVERNO

VAP	VCL	STR	ALH	LIN
	0.95 <.0001	-0.89919 0.001	0.87867 0.0018	-0.85 0.0037
VSL	DABIV			
	-0.67229 0.0473			
VCL	STR	VAP	LIN	ALH
	-0.96642 <.0001	0.95 <.0001	-0.93333 0.0002	0.92888 0.0003
ALH	STR	LIN	VCL	VAP
	-0.97047 <.0001	-0.96235 <.0001	0.92888 0.0003	0.87867 0.0018
STR	LIN	ALH	VCL	VAP
	0.99163 <.0001	-0.97047 <.0001	-0.96642 <.0001	-0.89919 0.001
LIN	STR	ALH	VCL	VAP

	0.99163 <.0001	-0.96235 <.0001	-0.93333 0.0002	-0.85 0.0037		
MOTILE	STATIC	PMMalto	RAPID	PMMbaixo	PROG	MEDIUM
	-1 <.0001	0.95188 0.0003	0.87398 0.0021	-0.84343 0.0085	0.77638 0.0139	0.74043 0.0225
PROG	RAPID	MOTILE	STATIC	PMMalto		
	0.86193 0.0028	0.77638 0.0139	-0.77638 0.0139	0.71858 0.0446		
RAPID	MOTILE	STATIC	PROG	PMMalto		
	0.87398 0.0021	-0.87398 0.0021	0.86193 0.0028	0.7619 0.028		
MEDIUM	MOTILE	STATIC				
	0.74043 0.0225	-0.74043 0.0225				
SLOW	IAM					
	-0.72242 0.0279					
STATIC	MOTILE	PMMalto	RAPID	PMMbaixo	PROG	MEDIUM
	-1 <.0001	-0.95188 0.0003	-0.87398 0.0021	0.84343 0.0085	-0.77638 0.0139	-0.74043 0.0225
DABI	DABII	IAM				
	-0.80591 0.0087	0.70294 0.0347				
DABII	DABI					
	-0.80591 0.0087					
DABIII	PMMinter					
	0.85031 0.0075					
DABIV	IAM	VSL				
	-0.84877 0.0038	-0.67229 0.0473				
IAM	DABIV	SLOW	DABI			
	-0.84877 0.0038	-0.72242 0.0279	0.70294 0.0347			
PMMalto	MOTILE	STATIC	PMMbaixo	RAPID	PROG	
	0.95188 0.0003	-0.95188 0.0003	-0.80952 0.0149	0.7619 0.028	0.71858 0.0446	
PMMinter	PMMbaixo	DABIII				
	-0.90476 0.002	0.85031 0.0075				
PMMbaixo	PMMinter	STATIC	MOTILE	PMMalto		
	-0.90476 0.002	0.84343 0.0085	-0.84343 0.0085	-0.80952 0.0149		
SOD	TBARS					
	0.88333					

	0.0016
TBARS	SOD
	0.88333
	0.0016

Correlação com dados não transformados pelo teste de Spearman com ranqueamento. Correlações inversas são apresentadas em quadros vermelhos e correlações positivas verdes. A primeira linha abaixo do nome da variável é o valor de r e a segunda linha o valor de P.

Quadro 2 – Correlações de variáveis funcionais das amostras coletadas no VERÃO

VAP	MEDIUM	VCL	VSL	LIN	STR	STATIC	MOTILE	ALH	BCF	SLOW	DABI	IAM	DABIII
	-0.982 <.0001	0.9643 0.0005	0.9643 0.0005	-0.929 0.0025	-0.929 0.0025	0.8929 0.0068	-0.8929 0.0068	0.8829 0.0085	-0.857 0.0137	-0.7928 0.0334	0.7857 0.0362	0.7857 0.0362	-0.7748 0.0408
VSL	VAP	MEDIUM	VCL	BCF	ALH	LIN	STR	EN	MOTILE	STATIC			
	0.96429 0.0005	-0.946 0.0013	0.8929 0.0068	-0.893 0.0068	0.8829 0.0085	-0.857 0.0137	-0.8571 0.0137	-0.8547 0.0143	-0.821 0.0234	0.8214 0.0234			
VCL	LIN	STR	VAP	ALH	VSL	MEDIUM	IAM	DABI	DABIII	BCF			
	-0.9762 <.0001	-0.976 <.0001	0.9643 0.0005	0.9581 0.0002	0.8929 0.0068	-0.849 0.0077	0.8333 0.0102	0.8333 0.0102	-0.826 0.0114	-0.7857 0.0208			
ALH	VCL	LIN	STR	VAP	VSL	MEDIUM	IAM	DABI	BCF	DABIII			
	0.9581 0.0002	-0.934 0.0007	-0.9342 0.0007	0.8829 0.0085	0.8829 0.0085	-0.781 0.0223	0.7785 0.0229	0.7785 0.0229	-0.778 0.0229	-0.7349 0.0378			
BCF	VSL	VAP	STR	IAM	DABI	DABIII	VCL	ALH	MEDIUM	LIN	DABII		
	-0.8929 0.0068	-0.857 0.0137	0.8571 0.0065	-0.857 0.0065	-0.857 0.0065	0.8024 0.0165	-0.7857 0.0208	-0.7785 0.0229	0.7638 0.0274	0.7619 0.028	0.7619 0.028		
STR	VCL	ALH	VAP	LIN	IAM	DABI	VSL	BCF	DABIII	DABIV	MEDIUM		
	-0.9762 <.0001	-0.934 0.0007	-0.9286 0.0025	0.9286 0.0009	-0.905 0.002	-0.905 0.002	-0.8571 0.0137	0.8571 0.0065	0.8264 0.0114	0.8024 0.0165	0.8001 0.0171		
LIN	VCL	ALH	VAP	STR	DABIII	VSL	MEDIUM	DABI	IAM	SLOW	BCF		
	-0.9762 <.0001	-0.934 0.0007	-0.9286 0.0025	0.9286 0.0009	0.8623 0.0059	-0.857 0.0137	0.8486 0.0077	-0.8095 0.0149	-0.81 0.0149	0.7785 0.0229	0.7619 0.028		
MOTILE	STATIC	VAP	VSL	PROG	RAPID								
	-1 <.0001	-0.893 0.0068	-0.8214 0.0234	0.8024 0.0165	0.7274 0.0409								
PROG	RAPID	MOTILE	STATIC										
	0.95129 0.0003	0.8024 0.0165	-0.8024 0.0165										
RAPID	PROG	MOTILE	STATIC										
	0.95129 0.0003	0.7274 0.0409	-0.7274 0.0409										
MEDIUM	VAP	VSL	VCL	LIN	STR	DABIII	ALH	BCF	SLOW	DABI	IAM		
	-0.982 0.0001	-0.946 0.0005	-0.8486 0.0005	0.8486 0.0009	0.8001 0.0009	0.7806 0.0009	-0.7806 0.0009	0.7638 0.0009	0.7562 0.0009	-0.7153 0.0009	-0.715 0.0009		

	<.0001	0.0013	0.0077	0.0077	0.0171	0.0223	0.0223	0.0274	0.0299	0.0461	0.0461
SLOW	VAP	LIN	MEDIUM								
	-0.7928	0.7785	0.7562								
	0.0334	0.0229	0.0299								
STATIC	MOTILE	VAP	VSL	PROG	RAPID						
	-1	0.8929	0.8214	-0.802	-0.727						
	<.0001	0.0068	0.0234	0.0165	0.0409						
DABI	IAM	DABIV	STR	BCF	DABIII	VCL	LIN	VAP	ALH	MEDIU M	
	1	-0.91	-0.9048	-0.857	-0.85	0.8333	-0.8095	0.7857	0.7785	-0.7153	
	<.0001	0.0017	0.002	0.0065	0.0075	0.0102	0.0149	0.0362	0.0229	0.0461	
DABII	BCF										
	0.7619										
	0.028										
DABIII	LIN	DABI	IAM	STR	VCL	BCF	MEDIUM	VAP	ALH		
	0.86229	-0.85	-0.8503	0.8264	-0.826	0.8024	0.7806	-0.7748	-0.735		
	0.0059	0.0075	0.0075	0.0114	0.0114	0.0165	0.0223	0.0408	0.0378		
DABIV	DABI	IAM	STR								
	-0.9102	-0.91	0.8024								
	0.0017	0.0017	0.0165								
IAM	DABI	DABIV	STR	BCF	DABIII	VCL	LIN	VAP	ALH	MEDIU M	
	1	-0.91	-0.9048	-0.857	-0.85	0.8333	-0.8095	0.7857	0.7785	-0.7153	
	<.0001	0.0017	0.002	0.0065	0.0075	0.0102	0.0149	0.0362	0.0229	0.0461	
PMMalto											
PMMinter	TBARS										
	-0.7143										
	0.0465										
PMMbaixo											
GPX	SOD	TBARS									
	0.97619	0.9286									
	<.0001	0.0009									
SOD	GPX	TBARS									
	0.97619	0.9048									
	<.0001	0.002									
TBARS	GPX	SOD	PMMinter								
	0.92857	0.9048	-0.7143								
	0.0009	0.002	0.0465								

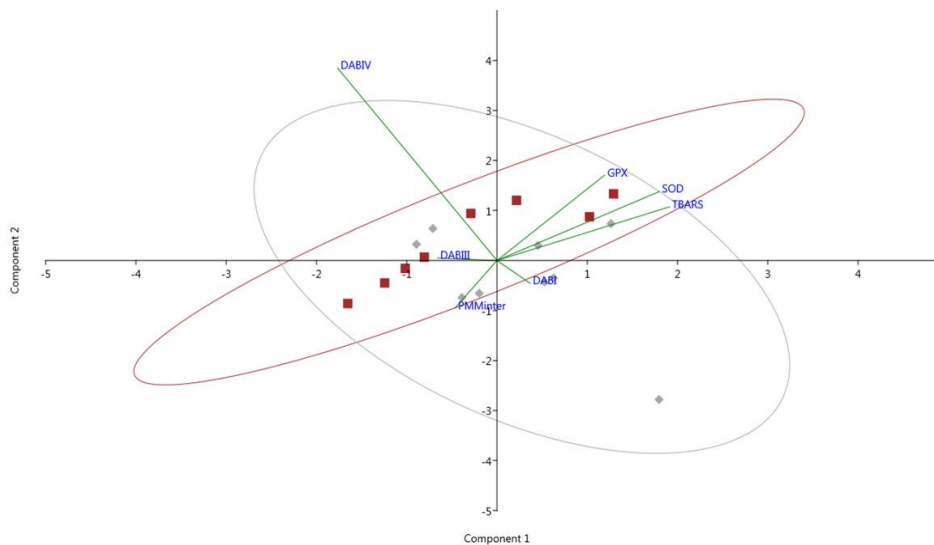
Correlação com dados não transformados pelo teste de Spearman com ranqueamento. Correlações inversas são apresentadas em quadros vermelhos e correlações positivas verdes. A primeira linha abaixo do nome da variável é o valor de r e a segunda linha o valor de P.

6.3. ANÁLISE DE COMPONENTES PRINCIPAIS

A PCA das amostras seminais descongeladas de touros da raça Nelore e Simental foi realizada após a normalização dos dados e resultou na seleção pelos valores de *loadings* de 7 variáveis, sendo elas, DAB I, DAB III e DAB IV, Potencial de membrana mitocondrial intermediário, GPX, SOD e TBARS. O componente principal 1 foi responsável por 53.072% da variância e o componente 2, por 29.612%, totalizando 82.684%. O PCA *biplot* mostra que não houve separação entre os grupos, mas apesar do número amostral ser baixo (Simental = 8; Nelore = 9), este teste permite analisar a importância das variáveis para cada amostra individualmente. Deste modo, observou-se que a atividade mitocondrial baixa (DAB III) e o potencial de membrana intermediário tem influência em 4 amostras da raça Simental, assim como a atividade da GPX, SOD e o TBARS têm grande peso para outras 3 amostras da mesma raça. Na raça Nelore, por sua vez, verificou-se que a alta atividade mitocondrial (DABI) teve forte influência para 3 amostras (33.3%) (**Figura 1**).

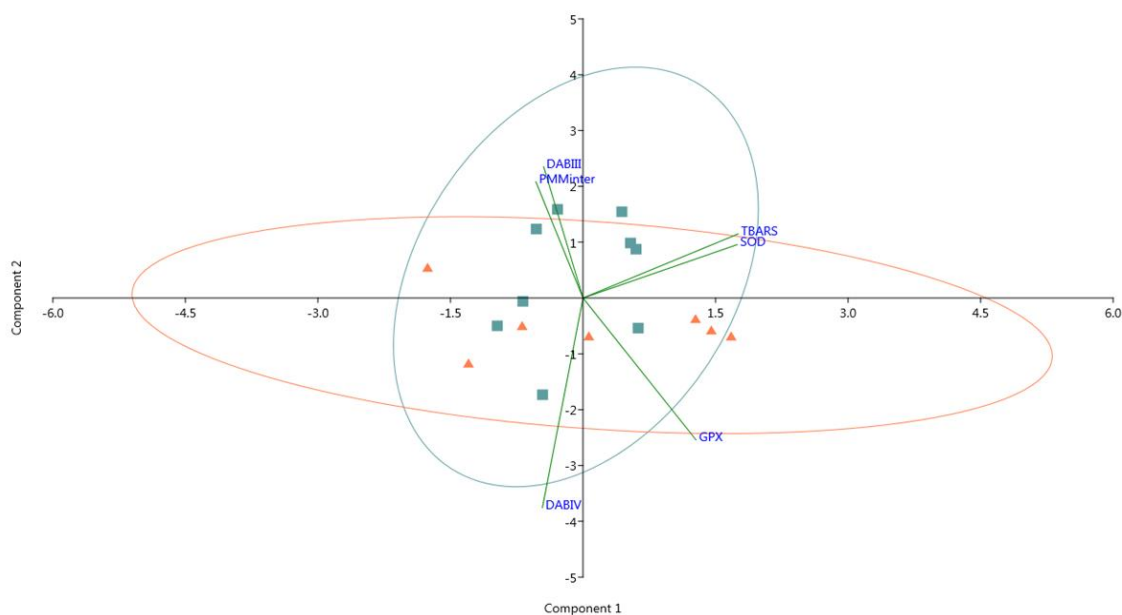
Já para a PCA das amostras de touros coletados no verão e inverno, foi feita da mesma forma descrita anteriormente e foram selecionadas pelos valores de *loadings* as variáveis de DAB III, DAB IV, Potencial de membrana mitocondrial intermediário, GPX, SOD e TBARS. Nesse caso o componente principal 1 foi responsável por 65.647% da variância e o componente 2, 17.007%, totalizando 82.654%. Analisando o PCA *biplot*, não foi observada a separação entre os grupos, mas indicou que a atividade da GPX possui maior peso para as amostras coletadas no verão (57%) e a atividade da SOD juntamente com o TBARS tiveram maior peso nas amostras coletadas no inverno (33.3%) (**Figura 2**).

Figura 1 – PCA em apresentação *biplot* de variáveis nas raças (NELORE e SIMENTAL)



Representação gráfica da separação entre os grupos NELORE(cinza) e SIMENTAL(vinho) com os componentes principais 1 e 2, que correspondem por uma variância total de 82.684%. Os clusters das amostras dos grupos são circundados por elipses de IC. As linhas e texto indicam as variáveis selecionadas e a importância das mesmas (escala eigenvalue) na variância e separação dos grupos.

Figura 2 – PCA em apresentação *biplot* de variáveis nas estações (VERÃO e INVERNO)



Representação gráfica da separação entre os grupos VERÃO (laranja) e INVERNO (verde) com os componentes principais 1 e 2, que correspondem por uma variância total de 82.654%. Os clusters das amostras dos grupos são circundados por elipses de IC. As linhas e texto indicam as variáveis selecionadas e a importância das mesmas (escala eigenvalue) na variância e separação dos grupos.

7 DISCUSSÃO

O estresse térmico é um dos principais fatores relacionados à redução do potencial de fertilidade em reprodutores (GABALDI; WOLF, 2002), visto que o aumento da temperatura testicular pode causar desde processos degenerativos irreversíveis até a produção de espermatozoides de menor qualidade (OHASHI et al., 2011). Do ponto de vista econômico, a subfertilidade de touros tem maior impacto na produtividade, uma vez que 1 touro subfertil utilizado em monta natural, inseminação artificial e IATF resulta em mais fêmeas vazias. Além disso, a complexidade de sua identificação faz com que a análise convencional do sêmen seja insuficiente, havendo a necessidade da aplicação de avaliações mais específicas (AITKEN et al., 2006).

Dentre os principais fatores associados a esse problema, pode-se citar o estresse oxidativo. Sabe-se que o aumento exacerbado das espécies reativas de oxigênio pode resultar na disfunção espermática por meio de diferentes mecanismos como a peroxidação lipídica da membrana plasmática, o desbalanço do metabolismo energético do espermatozoide e alterações do DNA espermático reduzindo, deste modo, a sobrevivência das células, a motilidade, a capacidade de fertilização e qualidade do embrião (ARMSTRONG et al., 1999; SPANO et al., 2000; OLSZEWSKA et al., 2017).

Os efeitos do estresse térmico em bovinos vêm sendo amplamente estudados. Modelos em que os animais são submetidos à insulação artificial, às diferentes sazonalidades, climas e a utilização de raças mais suscetíveis ao calor como o *Bos taurus*, foram propostos para comparar a influência do calor nos atributos espermáticos e, conseqüentemente, no potencial reprodutivo de touros (RAHMAN et al., 2011; JOHNSTON; NAELAPAA; FRYE, 1963; SKINNER; LOUW, 1966; MATHEVON; BUHR; DEKKERS, 1998; CASADY; MYERS; LEGATES, 1953; BALIC et al., 2012; NICHI et al., 2006; SOREN; VIR SINGH; SINGH, 2018).

No presente estudo, comparou-se as diferentes raças nas estações quentes e frias do ano. Apesar de não apresentar efeito de interação entre elas e o número amostral não ser o suficiente para fazer a análise do efeito da estação em cada raça e vice-versa, quando comparados juntamente foram observadas variações indicativas do efeito de cada uma sob os parâmetros espermáticos analisados.

No teste de mensuração da deficiência de protaminação, touros da raça Simental apresentaram maior taxa de células com defeitos comparados aos touros Nelore. Essa diferença seria esperada se a temperatura do inverno de Dourados permanecesse alta para o conforto térmico de touros Simental, já que o estresse térmico seguido do aumento de EROs resultaria em menores níveis de protaminação (AGARWAL; SALEH; BEDAIWY, 2003; AGARWAL; ALLAMANENI, 2005).

Entretanto, os valores encontrados são extremamente baixos (<0.8%) como verificados em outros estudos, variando de 0 a 1% (SIMÕES et al., 2009; RAHMAN et al., 2011; CARREIRA et al., 2015; NAGAKI, 2021) em touros considerados normospérmicos e em touros submetidos a insulação apresentando no máximo 3.5% de deficiência (RAHMAN et al., 2011). Somado a isto, não houve diferença nos parâmetros oxidativos, sugerindo que essa discrepância observada entre as raças pode não ser relacionada ao estresse térmico. No estudo de NAGAKI (2021), foi observada uma maior expressão gênica de Protamina 1 em touros da raça Nelore em comparação aos touros Angus (0.052 ± 0.012 , 0.986 ± 0.396 , respectivamente; $p = 0.0409$). Deste modo, infere-se que houve menor produção de protaminas no sêmen de touros Simental, o que leva a menor protaminação da cromatina apontada pelo resultado de CMA3 atrelando-o mais à questão racial do que à estação do ano.

Além disso, esta diferença parece não influenciar na susceptibilidade da cromatina. Distintamente do que foi observado nos estudos anteriores (FORTES et al., 2014; D'OCCHIO et al., 2013; CARREIRA et al., 2015), não houve diferença significativa no teste de SCSA entre as raças, sugerindo que a fragmentação de DNA espermático pode estar associada a níveis mais elevados de falhas na protaminação e/ou acompanhada do estresse oxidativo.

Na análise de correlação entre estações, nota-se que variáveis relacionadas ao metabolismo energético se correlacionam fortemente com as variáveis referentes à motilidade espermática. Este padrão reflete a contribuição da mitocôndria no fornecimento de ATP para a movimentação da célula. Entretanto, nas amostras coletadas no inverno, os parâmetros de cinética espermática apresentaram forte correlação positiva com o potencial de membrana mitocondrial, uma vez que o aumento deste associa-se ao maior percentual de células móveis, progressivas e

rápidas, relacionadas a melhor qualidade espermática. Por outro lado, para as amostras coletadas no verão, suas variáveis de cinética se correlacionam fortemente com a atividade mitocondrial, sendo que quanto maior a atividade maior o VCL, ALH e menor STR, LIN, BCF e velocidade média. Diante disso, infere-se que esses espermatozoides têm maior potencial à hiperativação precoce, pois células neste processo apresentam maior amplitude do movimento lateral de cabeça, aumento da velocidade curvilínea e menor linearidade (MARQUEZ; SUAREZ, 2006).

No estudo de LEITE et al., (2022) em que se comparou touros Angus e Nelore em relação a fertilidade e congelabilidade das amostras seminais, padrões semelhantes de cinética espermática foram observadas em Angus de baixa fertilidade e baixa congelabilidade acompanhados pela queda de potencial de membrana mitocondrial, o que corrobora com o presente estudo, em que as amostras coletadas no verão apresentaram percentual de células com baixo potencial de membrana mitocondrial significativamente maior que no inverno. Este fenômeno pode ser ocasionado devido a um mecanismo compensatório em que há um aumento na frequência de transporte de elétrons visando bombear mais prótons pelos complexos mitocondriais para o espaço entre membranas e assim tentar restabelecer o potencial de membrana (LOSANO et al., 2018)

Além disso, no estudo de SOREN et al., (2017) em que se comparou amostras seminais de touros Karan Fries (*Bos taurus*) nas diferentes estações do ano, foi observado que no verão houve menor expressão gênica de enzimas mitocondriais como a citrato sintase e succinato desidrogenase (complexo II). A falta desses fatores pode ocasionar o mau funcionamento desta organela, uma vez que fazem parte do ciclo de Krebs, o qual fornece parte do NADH e FADH₂ necessários para o funcionamento da cadeia transportadora de elétrons (BULKELEY et al., 2021). Diante desses fatores, a maior correlação observada entre as variáveis de motilidade espermática e atividade mitocondrial nos touros coletados no verão, possivelmente indica que as mitocôndrias estão tentando compensar o baixo potencial pelo aumento da atividade, mas não são capazes devido à limitação de NADH e FADH₂.

Pode-se observar que, na PCA, as variáveis selecionadas pelos maiores *loadings*, ou seja de maior importância, estão fortemente ligadas ao metabolismo energético e o estresse oxidativo tanto na comparação do efeito raça como de estação. Na comparação entre raças há quatro amostras de touros Simental, que representam quase metade dos animais analisados, que estão associadas à baixa atividade mitocondrial e ao potencial de mitocôndria intermediário, inferindo que as mitocôndrias desse grupo não estão funcionando adequadamente e resultando possivelmente no processo de desligamento desta organela.

Por outro lado, nota-se na PCA entre raças, três amostras de Simental e duas de Nelore estão sob maior influência do TBARS e as atividades das enzimas antioxidantes. Já no efeito estação, TBARS e SOD possuem maior influência em 3 amostras de inverno, enquanto o GPX é predominante para 4 amostras coletadas no verão. Estes resultados somados à forte correlação positiva do TBARS com a SOD no inverno e do TBARS com a SOD e GPX no verão, refletem o peso do status oxidativo para estas amostras. O aumento da atividade das enzimas antioxidantes associadas à maior susceptibilidade ao estresse oxidativo foi observado em estudos com homens inférteis (MAIORINO et al., 2003), estresse do exercício físico em humanos (BOUZID et al., 2014), e estresse térmico em touros (SOREN; VIR SINGH; SINGH, 2018) e carneiros (HAMILTON et al., 2016). De acordo com os autores, esse fenômeno possivelmente ocorre, em resposta ao aumento das espécies reativas de oxigênio, como um mecanismo de proteção e, conseqüentemente, a manutenção da capacidade de fertilizar o oócito e, sendo assim, é considerado um potencial marcador de desequilíbrio oxidativo.

Além disso, a maior atividade da SOD pode ser causada pelo aumento do funcionamento da mitocôndria. Em seu estado fisiológico, parte dos elétrons escapam da cadeia transportadora, (principalmente nos complexos I e III) e são capturados pelo oxigênio, formando o ânion superóxido (MITTLER, 2002). Deste modo, esta enzima pode agir como um indicador do *status* mitocondrial, uma vez que a maior atividade desta organela resultará na maior produção de superóxido e, assim, induzindo o aumento da SOD para a manutenção do equilíbrio oxidativo (CASTRO et al., 2016).

A enzima GPx, responsável por reduzir os níveis de peróxido de hidrogênio, age de forma mais rápida comparada às demais, por mecanismos ainda não elucidados. Foi sugerido que a ativação desta pode ocorrer por meio de fatores pós transcricionais, tornando sua resposta mais ágil e efetiva do que a síntese de novas enzimas (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007; GARRIDO et al., 2004). A alta correlação positiva da atividade desta enzima com o TBARS apresentado no estudo, pode estar associado não só apenas ao potencial estresse térmico acompanhado de maiores níveis de espécies reativas, mas também à capacidade de sua produção.

Sabe-se que a GPx tem como seu cofator o selênio, um elemento essencial para inúmeros processos fisiológicos em mamíferos, inclusive para a fertilidade (FLORESTA et al., 2002). Este mineral, por sua vez, é obtido pela alimentação, na pastagem, na qual o nível de selênio presente depende da sua quantidade e disponibilidade no solo (HALL et al., 2009; HALL et al., 2012; ALHIDARY, 2016). Somado a isto, a região Centro-oeste do Brasil é pobre em macro e microminerais (Carvalho et al., 2003) sendo muitas vezes necessário fazer a suplementação adequada para os animais de produção (GIERUS., 2007).

Nesse contexto, muitos estudos foram conduzidos com o objetivo de verificar os efeitos da suplementação de selênio no âmbito reprodutivo. Foi observado, por exemplo, o aumento das concentrações de GPx no ejaculado, proporcionando melhorias na qualidade seminal (SERGERSON; JOHNSON, 1980; BARTLE; SENGER; HILLERS, 1980; PASA, 2010; MARAI et al., 2009). Considerando-se o índice pluviométrico da região de Dourados (**Gráfico 2**), onde as chuvas se concentram no verão, com períodos secos e alta probabilidade de dias consecutivos sem chuva no inverno (**Gráfico 3**), pode-se inferir que os touros utilizados no estudo, criados à pasto, tiveram maior aporte nutricional na época do verão proporcionando mais minerais e assim, aumentando a capacidade de produção de GPX.

Diante desses fatores, os efeitos da temperatura sobre os aspectos espermáticos podem não estar evidenciados, uma vez que em climas mais quentes, em que os animais supostamente iriam apresentar mais problemas tais como o

estresse oxidativo, eles tiveram acesso à forragem de melhor qualidade e, conseqüentemente, maior potencial para controlar o desbalanço oxidativo.

8 CONCLUSÃO

- Não houve efeito raça ou estações do ano em relação à susceptibilidade de fragmentação do DNA (SCSA).
- Não houve efeito de raça ou estações do ano em relação à susceptibilidade de peroxidação lipídica (TBARS).
- Os touros da raça Simental apresentaram maior percentual de deficiências na protaminação.
- As amostras coletadas no verão apresentaram mais espermatozoides com potencial de membrana mitocondrial baixo.

Com os resultados obtidos no presente estudo, não foi possível identificar de forma isolada os efeitos da raça e das estações no perfil oxidativo em relação aos parâmetros de integridade do DNA espermático. No entanto, os dados observados nas análises de correlação e de componentes principais evidenciam a importância do metabolismo energético, sendo um dos aspectos que podem influenciar o *status* oxidativo e a qualidade seminal. Além disso, deve-se destacar a questão multifatorial da homeostase oxidativa, a qual pode estar sujeita à elementos diretamente relacionados à maior produção de espécies reativas de oxigênio, como no estresse térmico, mas também, indiretamente devido à menor capacidade de sintetização de enzimas antioxidantes, como por exemplo, no menor aporte de minerais na nutrição.

9 REFERÊNCIAS

ABHB. **A raça Braford**. ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE HEREFORD E BRAFORD. Disponível em: <<https://www.abhb.com.br/as-racas/braford/>>. Acesso em: 06 set. 2022.

ABIEC. Beef Report: Perfil da Pecuária no Brasil 2020. **Associação Brasileira das Indústrias Exportadoras de Carne**. Disponível em: <<https://www.abiec.com.br/publicacoes/beef-report-2020/>>. Acesso em: 06 de set. de 2022.

AGARWAL, A. et al. Effect of Oxidative Stress on Male Reproduction. **The World Journal of Men's Health**, v. 32, n. 1, p. 1–17, 2014.

AGATHOCLEOUS M, HARRIS WA. Metabolism in physiological cell proliferation and differentiation. **Trends Cell Biol**, v.23, p. 484-492, 2013.

AITKEN, J. R.; ROMAN, S. D. Antioxidant systems and oxidative stress in the testes. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 1, n. 1, p. 15–24, 2008.

AITKEN, R. J. et al. Redox regulation of tyrosine phosphorylation in human spermatozoa and its role in the control of human sperm function. **Journal of Cell Science**, v. 108, n. 5, p. 2017–2025, 1995.

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. Sperm function tests and fertility. **Int J Androl**, v. 1, p. 69-75, 2006.

AITKEN, R. J. & DE IULIIS, G. N. () Origins and consequences of DNA damage in male germ cells. **Reproductive Biomedicine Online**, v. 14, p. 727–733, 2007.

AITKEN, R. J., CLARKSON, J. S. & FISHEL, S. Generation of reactive oxygen species, lipid peroxidation, and human sperm function. **Biol. Reprod**, v. 41, p. 183–197, 1989.

AITKEN RJ, SAWYER D. The human spermatozoon - not waving but drowning. **Adv Exp Med Biol**, v. 518, p. 85-98, 2003.

AITKEN, R. J., FINDLAY, J. K., HUTT, K. J. & KERR, J. B. Apoptosis in the germ line. **Reproduction**, v. 141, p. 139–150, 2011.

AITKEN, R. J. Human spermatozoa: revelations on the road to conception. **F1000Prime Rep.**, v. 5, p. 39, 2013.

ALHIDARY I.A., ABDELRAHMAN M.M., KHAN R.U., HAROON R.M. Antioxidant status and immune responses of growing camels supplemented a long-acting multi-trace minerals rumen bolus. **Italian J Anim Sci.**, v. 15, p. 343–349, 2016.

ALVES, L. M. Clima da região Centro-Oeste do Brasil. Em: **Tempo e clima no Brasil**. São Paulo: Oficina de Textos, 2009. cap. 15, p. 235-241.

AMARAL A, RAMALHO-SANTOS J & ST JOHN JC. The expression of polymerase gamma and mitochondrial transcription factor A and the regulation of mitochondrial DNA content in mature human sperm. **Human Reproduction**, v. 22, p. 1585–1596, 2007.

ARANY Z, FOO SY, MA Y, RUAS JL, BOMMI-REDDY A, GIRNUN G, COOPER M, LAZNIK D, CHINSOMBOON J, RANGWALA SM, BAEK KH, ROSENZWEIG A, SPIEGELMAN BM. HIF-independent regulation of VEGF and angiogenesis by the transcriptional coactivator PGC-1 alpha. **Nature**, v. 451, p.1008–1012, 2008.

ARMSTRONG JS, RAJASEKARAN M, CHAMULITRAT W, GATTI P, HELLSTROM WJ, SIKKA SC. Characterization of reactive oxygen species induced effects on human spermatozoa movement and energy metabolism. **Free Radic Biol Med**, v. 26, 1999.

ARTHUR, P. F.; HEARNshaw, H.; STEPHENSON, P. D. Direct and maternal additive and heterosis effects from crossing *Bos indicus* and *Bos taurus* cattle: Cow and calf performance in two environments. **Livestock Production Science**, v. 57, n. 3, p. 231–241, 1999.

AVELDANO MI, ROTSTEIN NP, VERMOUTH NT: Lipid remodeling during epididymal maturation of rat spermatozoa. Enrichment in plasmenylcholines containing long-chain polyenoic fatty acids of the n-9 series. **Biochem J**, v. 283, p. 235-241, 1992.

BALIC IM, MILINKOVIC-TUR S, SAMARDZIJA M, VINCE S. Effect of age and environmental factors on semen quality, glutathione peroxidase activity and oxidative parameters in Simmental bulls. **Theriogenology**, v. 78, n. 2, p. 423-31, 2012.

BARTLE JL, SENGER PL, HILLERS JK. Influence of injected selenium in dairy bulls on blood and semen selenium, glutathione peroxidase and seminal quality. **Biol Reprod.**, v. 23, p. 1007-1013, 1980.

BARTH, A. D.; BOWMAN, P. A. The sequential appearance of sperm abnormalities after scrotal insulation or dexamethasone treatment in bulls. **The Canadian veterinary journal**, v. 35, n. 2, p. 93–102, 1994.

BAUGHMAN JM, PEROCCHI F, GIRGIS HS, PLOVANICH M, BELCHER-TIMME CA, SANCAK Y, BAO XR, STRITTMATTER L, GOLDBERGER O, BOGORAD RL, KOTELIANSKY V, MOOTHA VK. Integrative genomics identifies MCU as an essential component of the mitochondrial calcium uniporter. **Nature**, v. 19, n. 476(7360), p. 341-5, 2011.

BENOFF S: Preliminares to fertilization: the role of cholesterol during capacitation of human spermatozoa. **Hum Reprod**, v. 8, p. 2001-2008, 1993.

BERNARDI P. Mitochondrial transport of cations: channels, exchangers, and permeability transition. **Physiological Reviews**, v. 79, p. 1127–1155, 1999.

BIANCHI PG, MANICARDI GC, URNER F, CAMPANA A, SAKKAS D. Chromatin packaging and morphology in ejaculated human spermatozoa: evidence of hidden anomalies in normal spermatozoa. **Mol Hum Reprod**, v. 2, p. 139–144, 1996.

BIANCHINI, W., SILVEIRA, A.C., JORGE, A.M., ARRIGONI, M.D.B., MARTINS, C.L., RODRIGUES, É., HADLICH, J.C. AND ANDRIGHETTO, C. Efeito do grupo genético sobre as características de carcaça e maciez da carne fresca e maturada de bovinos superprecoces. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 36, p. 2109-2117, 2007.

BIRD A. Perceptions of epigenetics. **Nature**, v. 447, n. 7143, p. 396-8, 2007.

BLACKSHAW, J. K.; BLACKSHAW, A. W. Heat stress in cattle and the effect of shade on production and behaviour: a review. **Australian Journal of Experimental Agriculture**, 1994.

C. G. BLUMER, R. M. FARIELLO, A. E. RESTELLI, D. M. SPAINE, R. P. BERTOLLA, AND A. P. CEDENHO. Sperm nuclear DNA fragmentation and mitochondrial activity in men with varicocele. **Fertility and Sterility**, v. 90, n. 5, p. 1716–1722, 2008.

BOE-HANSEN GB, FORTES MRS, SATAKE N. Morphological defects, sperm DNA integrity, and protamination of bovine spermatozoa. **Andrology**, v. 6, n. 4, p. 627-633, 2018.

M. A. BOUZID, O. HAMMOUDA, R. MATRAN, S. ROBIN, AND C. FABRE. Changes in oxidative stress markers and biological markers of muscle injury with aging at rest and in response to an exhaustive exercise. **PLoS ONE**, v. 9, n. 3, 2014.

BRITO LFC, SILVA AEDF, BARBOSA RT, KASTELIC JP. Testicular thermoregulation in *Bos indicus*, crossbred and *Bos taurus* bulls: relationship with scrotal, testicular vascular cone and testicular morphology, and effects on semen quality and sperm production. **Theriogenology**, v. 61, n. 2-3, p. 511-28, 2004.

BRONNER C, CHATAIGNEAU T, SCHINI-KERTH VB, LANDRY Y. The Epigenetic Code Replication Machinery, ECREM: a promising drugable target of the epigenetic cell memory. **Curr Med Chem**, v. 14, n. 25, p. 2629-41, 2007.

BROEKEMEIER, K.M., IBEN, J.R., LE VAN, E.G., CROUSER, E.D. AND PFEIFFER, D.R. **Biochemistry**, v. 41, p. 7771–7780, 2002.

BULKELEY EA, FOUTOUHI A, WIGNEY K, SANTISTEVAN AC, COLLINS C, MCNABB B, MEYERS S. Effects from disruption of mitochondrial electron transport chain function on bull sperm motility. **Theriogenology**, v. 176, p. 63-72, 2021.

CAMPBELL, R. C.; DOTT, H. M.; GLOVER, T. D. Nigrosin eosin as a stain for differentiating live and dead spermatozoa. **The Journal of Agricultural Science**, v. 48, n. 01, p. 1-8, 1956.

CASTRO LS, HAMILTON TR, MENDES CM, NICHI M, BARNABE VH, VISINTIN JA, ASSUMPÇÃO ME. Sperm cryodamage occurs after rapid freezing phase: flow cytometry approach and antioxidant enzymes activity at different stages of cryopreservation. **J Anim Sci Biotechnol**, v. 5, p. 7-17, 2016.

CASTRO, L. S. Effect of bovine sperm chromatin integrity evaluated using three different methods on in vitro fertility. **Theriogenology**, v. 107, p. 142-148, 2018.

CASTRO LS, HAMILTON TR, MENDES CM, NICHI M, BARNABE VH, VISINTIN JA, ASSUMPÇÃO ME. Sperm cryodamage occurs after rapid freezing phase: flow cytometry approach and antioxidant enzymes activity at different stages of cryopreservation. **J Anim Sci Biotechnol**, v. 5, p. 7-17, 2016.

CARRILLO, J. Manejo de un rodeo de cría. Buenos Aires: 2ª ed., **INTA CERBAS EEA Balcarce**, p. 194, 1998.

CARTWRIGHT, T. C. RESPONSES OF BEEF CATTLE TO HIGH AMBIENT TEMPERATURES. **Texas Agricultural Experiment Station 3**, 1955.

J.T. CARREIRA , J.T. TREVIZAN , B.H. KIPPER , S.H.V. PERRI , I.R. CARVALHO , L.H. RODRIGUES , C. SILVA , M.B. KOIVISTO. Impaired protamination and sperm DNA damage in a Nellore bull with high percentages of morphological sperm defects in comparison to normospermic bulls. **Veterinary Medicine • Arq. Bras. Med. Vet. Zootec**, v. 2, p. 67, 2015.

CASADY RB, MYERS RM, LEGATES JE. The effect of exposure to high ambient temperature on spermatogenesis in the dairy bull. **J Dairy Sci**, v. 36, n. 1, p. 14-23, 1953.

COLÉGIO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO - Cbra. Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal. 3.ed. Belo Horizonte: CBRA, 2013. Disponível em: <www.cbra.org.br>. Acesso em: 02 ago. 2022.

COLLIER, R. J.; RENQUIST, B. J.; XIAO, Y. A 100-Year Review: Stress physiology including heat stress. **Journal of Dairy Science**, v. 100, n. 12, p. 10367–10380, 2017.

CONRAD M, INGOLD I, BUDAY K, KOBAYASHI S, ANGELI JP. ROS, thiols and thiol-regulating systems in male gametogenesis. **Biochim Biophys Acta**, v. 1850, p. 1566-74, 2015.

COOK RB, COULTER GH, KASTELIC JP. The testicular vascular cone, scrotal thermoregulation and their relationship to sperm production and seminal quality in beef bulls. **Theriogenology**, v. 41, p. 653–7, 1994.

COSTA E SILVA, E. V.; FERREIRA, B. X.; QUEIROZ, V. L. D.; COSTA FILHO, L. C. C.; ZÚCCARI, C. E. S. N. Precocidade sexual de touros a campo em condições tropicais. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, v.37, n.2, p.97-104, 2013.

HOMEM DE BITTENCOURT, P. I., JR, MIYASAKA, C. K., CURI, R., & WILLIAMS, J. F. Effects of the antiproliferative cyclopentenone prostaglandin A1 on glutathione metabolism in human cancer cells in culture. **Biochemistry and molecular biology international**, v. 45, n. 6, p. 1255-1264, 1998.

DE LAMIRANDE E, GAGNON C. A positive role for the superoxide anion in triggering hyperactivation and capacitation of human spermatozoa. **Int J Androl**, v. 16, n. 1, p. 215, 1993.

DE LAMIRANDE, E. & GAGNON, C. Reactive oxygen species and human spermatozoa. II ± Depletion of adenosine triphosphate plays an important role in the inhibition of sperm motility. **Journal of Andrology**, v. 13, p. 5379-5386, 1992.

DE LAMIRANDE, E. *et al.* Involvement of reactive oxygen species in human sperm arcosome reaction induced by A23187, lysophosphatidylcholine, and biological fluid ultrafiltrates. **Journal of Andrology**, v. 19, n. 5, p. 585–594, 1998.

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

DIANOV GL, SOUZA-PINTO N, NYAGA SG, THYBO T, STEVNSNER T, BOHR VA. Base excision repair in nuclear and mitochondrial DNA. **Prog Nucleic Acid Res Mol Biol**, v. 68, p. 285-97, 2001.

DIAS, F. E. F.; NUNES, C. M.; CAVALCANTE, T. V.; SANTOS, H. D.; MINHARRO, S.; GARCIA, J. F. PCR Multiplex fluorescente para detecção de bactérias em sêmen bovino. **Pesqui. Vet. Bras.**, v. 32, n. 3, p. 211-216, 2012.

DIAZ F, KOTARSKY H, FELLMAN V, MORAES CT. Mitochondrial disorders caused by mutations in respiratory chain assembly factors. **Semin. Fetal Neonatal Med**, v. 16, p. 197–204, 2011.

DOROSTGHOAL, M., KAZEMINEJAD, S., SHAHBAZIAN, N., POURMEHDI, M., & JABBARI, A.. Oxidative stress status and sperm DNA fragmentation in fertile and infertile men. **Andrologia**, p. 49, 2017.

DOGAN S, VARGOVIC P, OLIVEIRA R, BELSER LE, KAYA A, MOURA A, SUTOVSKY P, PARRISH J, TOPPER E, MEMILI E. Sperm protamine-status correlates to the fertility of breeding bulls. **Biol Reprod**, v. 92, n. 4, p. 92, 2015.

D'OCCHIO MJ, HENGSTBERGER KJ, TUTT D, HOLROYD RG, FORDYCE G, BOE-HANSEN GB & JOHNSTON SD. Sperm chromatin in beef bulls in tropical environments. **Theriogenology**, v. 79, p. 946–952, 2013.

E. BEUTLER. **Red cell metabolism, a manual of biochemical methods**. New York, Grune & Stratton, 1975.

ENARI M, SAKAHIRA H, YOKOYAMA H, OKAWA K, IWAMATSU A, NAGATA S.A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD. **Nature**, v. 391, p. 43–50, 1998.

ENCISO, M., CISALE, H., JOHNSTON, S. D., SARASA, J. Major morphological sperm abnormalities in the bull are related to sperm DNA damage. **Theriogenology**, v.76, p. 23-32, 2011.

ERKKILA", K., K. HENRIKSEN, V. HIRVONEN, S. RANNIKKO, J. SALO, M. PARVINEN, AND L. DUNKEL. Testosterone regulates apoptosis in adult human seminiferous tubules in vitro. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v. 82, p. 2314–2321, 1997.

ESTERBAUER H, ZOLLNER H, SCHAUR RJ: Hydroxyalkenals:cytotoxic products of lipid peroxidation. **Atlas of science: Biochemistry**, v. 1, n. 63, p. 311-319, 1988.

ESTERBAUER H, ROTHENEDER-DIEBER M, WAEG G, STRIEGL G, JURGENS G: Biochemical, structural, and functional properties of oxidized low-density lipoprotein. **Chem Res Toxicol**, v. 3, p. 77-92, 1990.

EUCLIDES FILHO, K. Produção de bovinos de corte e o trinômio genótipo-ambiente-mercado. **Embrapa Gado de Corte**, p. 61, 2000.

EVENSON DP, DARZYNKIEWICZ Z, MELAMED MR. Simultaneous measurement by flow cytometry of sperm cell viability and mitochondrial membrane potential related to cell motility. **J Histochem Cytochem**, v. 30, p. 279–80, 1982.

EVENSON D, JOST L. Sperm chromatin structure assay is useful for fertility assessment. **Methods Cell Sci.**, v. 22, n. 2-3, p. 169-89, 2000.

FILHO, D. W. *et al.* **Spermatic cord torsion, reactive oxygen and nitrogen species and ischemia-reperfusion injury. Molecular Aspects of Medicine**, 2004.

FONSECA, V.O., VALE FILHO, V., MIES FILHO, A. *et al.* **Procedimentos para exame andrológico e avaliação de sêmen animal.** Colégio Brasileiro de Reprodução Animal, Belo Horizonte, 1992, p. 79.

FORTES MRS, SATAKE N, CORBET DH, CORBET NJ, BURNS BM, MOORE SS, BOEHANSEN GB. Sperm protamine deficiency correlates with sperm DNA damage in *Bos indicus* bulls. **Andrology**, v. 2, n. 3, p. 370-8, 2014.

FLOHÉ L., ÖTTING F. Formation or removal of oxygen radicals. **Methods Enzymol**, v. 105, p. 92-104, 1984.

C. FORESTA, L. FLOHE, A. GAROLLA, A. ROVERI, F. URSINI, M. Maiorino Male fertility is linked to the selenoprotein phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase. **Biol. Reprod.**, v. 67, p. 967-971, 2002.

GABALDI, S.H.; WOLF, A. A importancia da termorregulacao testicular na qualidade do semen em touros. **Ciencias Agrarias e Saude. FEA, Andradina**, v. 2, n. 2, p. 66-70, 2002.

GARRIDO N, MESEGUER M, SIMON C, PELLICER A, REMOHI J. Pro-oxidative and anti-oxidative imbalance in human semen and its relation with male fertility. **Asian Journal of Andrology**, vol. 6, no. 1, pp. 59–65, 2004.

GEIGER LN. Bovine sperm nuclear morphology related to breeds, sperm separation methods and scrotal insulation. **Department of Animal Sciences, University of Wisconsin-Madison, USA**. MS Thesis, 2003, pp. 136.

GOOVAERTS, I. G. F.; HOFACK, G. G.; VAN SOOM, A.; DEWULF, J.; NICHI, M.; DE KRUIF, A.; BOLS, P. E. J. Evaluation of epididymal semen quality using the Hamilton–Thorne analyser indicates variation between the two caudae epididymides of the same bull. **Theriogenology**, v. 66, n. 2, p. 323-330, 2006.

GRIVEAU, J. F., DUMONT, E., RENARD, P. & LE LANNOU, D. Reactive oxygen species, lipid peroxidation and enzymatic defense systems in human spermatozoa. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 103, p. 17-26, 1995.

T.E. GUNTER, L. BUNTINAS, G. SPARAGNA, R. ELISEEV, K. GUNTER. **Cell Calcium**, v. 28, p. 285– 296, 2000.

HALLIWELL B, GUTTERIDGE J. M. C. Cellular responses to oxidative stress: adaptation, damage, repair, senescence and death. **Free Radicals in Biology and Medicine**, pp. 187–268, Oxford University Press, Oxford, UK, 4th edition, 2007.

HAMMER, ØYVIND, HARPER, DAVID A.T., AND PAUL D. RYAN,. Past: Paleontological Statistics Software Package for Education and Data Analysis. **Palaeontologia Electronica**, vol. 4, n. 1, p. 4, 2001.

HAMILTON TR, MENDES CM, DE CASTRO LS, DE ASSIS PM, SIQUEIRA AF, DELGADO JDE C, GOISSIS MD, MUIÑO-BLANCO T, CEBRIÁN-PÉREZ JÁ, NICHI M, VISINTIN JA, ASSUMPÇÃO ME. Evaluation of Lasting Effects of Heat Stress on Sperm Profile and Oxidative Status of Ram Semen and Epididymal Sperm. **Oxid Med Cell Longev.**, 2016.

HALL J.A., VAN SAUN R.J., BOBE G., STEWART W.C., VORACHEK W.R., MOSHER W.D., NICHOLS T.. Organic and inorganic selenium: I. Oral bioavailability in ewes. **J Anim Sci.**, v. 90, p. 568-576, 2012.

HALL J.A., VAN SAUN R.J., NICHOLS T., MOSHER W., PIRELLI G. Comparison of selenium status in sheep after short-term exposure to high-selenium- fertilized forage or mineral supplement. **Small Ruminant Res.**, v. 8,p. 40-45, 2009.

HANSEN, P . J. Effects of Enviroment on Bovine Reproduction. **Current Therapy in Large Animal Theriogenology**, p. 431-442, 2007.

HANSEN, P. J. Cellular and molecular basis of therapies to ameliorate effects of heat stress on embryonic development in cattle. **Anim Reprod**, v. 10, p. 322-33, 2013.

HANSEN, P . J. Physiological and cellular adaptations of zebu cattle to thermal stress. **Animal Reproduction Science**, v. 82-83, p. 349-360, 2004.

HECHT NB. Molecular mechanisms of male germ cell differentiation. **BioEssays**, v. 20, n. 7, p. 555-61, 1998.

HENKEL, R. R., & FRANKEN, D. R. Sperm DNA fragmentation: Origin and impact on human reproduction. **Journal of Reproductive and Stem Cell Biotechnology**, v. 2, n. 2, 88–108, 2011.

HENRIKSEN, K., H. HAKOVIRTA, AND M. PARVINEN. Testosterone inhibits and induces apoptosis in rat seminiferous tubules in a stage-specific manner: in situ quantification in squash preparations after administration of ethane dimethane sulfonate. **Endocrinology**, v. 136, p. 3285–3291, 1995.

HIKIM, A.P.S.; LUE, Y.; YAMAMOTO, C.M.; VERA, Y.; RODRIGUEZ, S.; YEN, P.H.; SOENG, K.; WANG, C.; SWERDLOFF, R.S. Key Apoptotic Pathways for Heat-Induced Programmed Germ Cell Death in the Testis. **Endocrinology**, v. 144, p. 3167–3175, 2003.

HO HC & WEY S. Three dimensional rendering of the mitochondrial sheath morphogenesis during mouse spermiogenesis. **Microscopic Research and Technique**, v. 70, p. 719–723, 2007.

HOUSTON, B.J.; NIXON, B.; MARTIN, J.H.; DE LULIIS, G.N.; TRIGG, N.A.; BROMFIELD, E.G.; MCEWAN, K.E.; AITKEN, R.J. Heat exposure induces oxidative stress and DNA damage in the male germ line. **Biol. Reprod**, v. 98, p. 593–606, 2018.

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

IBGE. PPM 2020: rebanho bovino cresce 1,5% e chega a 218,2 milhões de cabeças. **Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística**, 2021. Disponível em: <<https://tinyurl.com/yx9re6wc>>. Acesso em: 29 jan. 2022.

IBGE. Rebanho de bovinos tem maior expansão da série histórica. **Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística**, 2017. Disponível em: <<https://agenciadenoticias.ibge.gov.br/agencia-noticias/2012-agencia-de-noticias/noticias/16994-rebanho-de-bovinos-tem-maior-expansao-da-serie-historica>>. Acesso em: 06 set. 2022.

IBGE - Sistema de Informações Geográficas (SIG). Mapa de Clima do Brasil. **Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística**, 2012. Disponível em: <<http://mapasinterativos.ibge.gov.br/sigibge/#idmap=Climas>>. Acesso em 15 fev. 2021.

INABA K. Sperm flagella: comparative and phylogenetic perspectives of protein components. **Mol Hum Reprod.**, v. 17, n. 8, p. 524-38, 2011.

JENKINS TG, CARRELL DT. The sperm epigenome and potential implications for the developing embryo. **Reproduction**, v. 143, n 6, p. 727-34, 2012.

JEONG SY & SEOL DW. The role of mitochondria in apoptosis. **BMB Reports**, v. 41, p. 11–22, 2008.

JOHNSTON JE, NAELAPAA H, FRYE JB. Physiological responses of Holstein, Brown Swiss and Red Sindhi crossbreed bulls exposed to high temperatures and humidities. **J Anim Sci**, v. 22, p. 432–6, 1963.

JOHNSON GD, LALANCETTE C, LINNEMANN AK, LEDUC F, BOISSONNEAULT G, KRAWETZ SA. The sperm nucleus: chromatin, RNA, and the nuclear matrix. **Reproduction**, v. 141, n. 1, p. 21-36, 2011.

JONES R, MANN T, SHERINS R: Peroxidative breakdown of phospholipids in human spermatozoa. Spermicidal properties of fatty acid peroxides, and protective action of seminal plasma. **Fertil Steril**, v. 31, n. 62, p. 531-537, 1979.

KAHI A. K, THORPE W, NITTER G, VAN ARENDONK J.A.M, GALL C.F, Economic evaluation of crossbreeding for dairy production in a pasture based production system in Kenya. **Livestock Production Science**, v. 65, n. 1–2, p. 167–184, 2000.

KIRICHOK Y, KRAPIVINSKY G & CLAPHAM DE. The mitochondrial calcium uniporter is a highly selective ion channel. **Nature**, v. 427, p. 360–364, 2004.

KOPPERS AJ, DE IULIIS GN, FINNIE JM, MCLAUGHLIN EA, AITKEN RJ. Significance of mitochondrial reactive oxygen species in the generation of oxidative stress in spermatozoa. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 93, n. 8, p. 3199-207, 2008.

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

KOTWICKA M, JENDRASZAK M, WARCHOL JB: Plasma membrane translocation of phosphatidylserine in human spermatozoa. **Folia Histochem Cytobiol**, v. 40, p. 111-112, 2002.

LA VIGNERA S, CONDORELLI R, D'AGATA R, VICARI E, CALOGERO AE. Semen alterations and flow-citometry evaluation in patients with male accessory gland infections. **J Endocrinol Invest**, v. 35, p. 219-23, 2012.

LA VIGNERA S, CONDORELLI RA, VICARI E, CALOGERO AE. Negative effect of increased body weight on sperm conventional and nonconventional flow cytometric sperm parameters. **J Androl**, v. 33, p. 53-8, 2012.

LEE, J., J. H. RICHBURG, S. C. YOUNKIN, AND K. BOEKELHEIDE. The Fas system is a key regulator of germ cell apoptosis in the testis. **Endocrinology**, v. 138, p. 2081–2088, 1997.

LEITE, R. F. **Análise lipídômica, metabolômica e dos atributos espermáticos de touros com diferentes taxas de fertilidade e perfis de congelação de semen. 2022.** 383 f. Tese (Doutorado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2022.

LEMASTERS, J.J., QIAN, T., HE, L., KIM, J.S., ELMORE, S.P., CASCIO, W.E. AND BRENNER, D.A. **Antioxid. Redox. Signal.**, v. 4, p. 769–781, 2002.

Losano JDA, Angrimani DSR, Ferreira Leite R, Simões da Silva BDC, Barnabe VH, Nichi M. Spermatic mitochondria: role in oxidative homeostasis, sperm function and possible tools for their assessment. **Zygote**, v. 26, n. 4, p. 251-260, 2018.

MACEDO, L. O. B. Modernização da pecuária de corte bovina no Brasil e a importância de crédito rural. **Informações Econômicas**, São Paulo, v. 36, n. 7, p. 83-95, 2006.

MACK SR, EVERINGHAM J, ZANEVELD LJD: Isolation and partial characterization of the plasma membrane from human spermatozoa. **J Exp Zool**, v. 240, p. 127-136, 1986.

MAJZOUB, A., AGARWAL, A., & ESTEVES, S. C. Clinical utility of sperm DNA damage in male infertility. **Panminerva Medica**, v. 61, n. 2, p. 118–127, 2019.

MANNA PR, STETSON CL, SLOMINSKI AT, PRUITT K. Role of the steroidogenic acute regulatory protein in health and disease. **Endocrine**, v. 51, n. 1, p. 7-21, 2016.

MANOCHANTR, S., CHIAMCHANYA, C., & SOBHON, P. Relationship between chromatin condensation, DNA integrity and quality of ejaculated spermatozoa from infertile men. **Andrologia**, v. 44, n. 3, p. 187–199, 2012.

MARAI IFM, EL-DARAWANY AA, ISMAIL EA, ABDEL-HAFEZ MAM. Reproductive and physiological traits of Egyptian Suffolk rams as affected by selenium dietary supplementation and housing heat radiation effects during winter of the sub-tropical environment of Egypt. **Arch. Tierz.**, 2009.

MARCHETTI, F., & WYROBEK, A. J. Mechanisms and consequences of paternally-transmitted chromosomal abnormalities. **Birth Defects Research. Part C, Embryo Today**, v. 75, p. 112-129, 2005.

MARCON L, BOISSONNEAULT G. Transient DNA strand breaks during mouse and human spermiogenesis new insights in stage specificity and link to chromatin remodeling. **Biol Reprod**, v. 70, p. 910–8, 2004.

MARQUEZ, B.; SUAREZ, S.S. Bovine Sperm Hyperactivation Is Promoted by Alkaline Stimulated Ca²⁺ Influx1. **Biology of Reproduction**, v.76, n.4, p.660–665, 2006.

MATHEVON M, BUHR MM, DEKKERS JC. Environmental, management, and genetic factors affecting semen production in Holstein bulls. **J Dairy Sci**, v. 81, n. 12, p. 3321-30, 1998.

MEISTRICH ML, MOHAPATRA B, SHIRLEY CR, ZHAO M. Roles of transition nuclear proteins in spermiogenesis. **Chromosoma**, v. 111, n. 8, p. 483-8, 2003.

MENDONÇA, F.; DANNI-OLIVEIRA, I. M. **Climatologia: noções básicas e climas do Brasil**. 1 ed. São Paulo. Ed. Oficinas de Textos, 2007.

MÉNÉZO Y, DALE B, COHEN M. DNA damage and repair in human oocytes and embryos: a review. **Zygote**, v. 18, p. 357-365, 2010.

MCCORMACK, J.G., HALESTRAP, A.P. DENTON, R.M. **Physiol. Rev.**, v. 70, p. 391–425, 1990.

MCPHERSON, N. O., & LANE, M. Male obesity and subfertility, is it really about increased adiposity? **Asian Journal of Andrology**, v. 17, n. 3, p. 450–458, 2015.

MCPHERSON S, LONGO FJ. Chromatin structure–function alterations during mammalian spermatogenesis: DNA nicking and repair in elongating spermatids. **Eur J Histochem**, v. 37, p. 109–28, 1993.

MELEGH B, BOCK I, GA`TI I, ME`HES K. Multiple mitochondrial DNA deletions and persistent hyperthermia in a patient with Brachmann–de Lange phenotype. **Am J Med Genet**, v. 65, p. 82–8, 1996.

MITTLER, R. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. **Trends in Plant in Science**, v.9, p.405-410, 2002.

M. Maiorino, V. Bosello, F. Ursini et al., “Genetic variations of gpx-4 and male infertility in humans,” **Biology of Reproduction**, v. 68, n. 4, p. 1134–1141, 2003.

MIURA M, SASAGAWA I, SUZUKI Y, NAKADA T, FUJII J. Apoptosis and expression of apoptosis-related genes in the mouse testis following heat exposure. **Fertil Steril**, v. 77, n. 4, p. 787-93, 2002.

NAGAKI, C. P. **Determinacao da protamina 1 e protamina 2 em touros de alta e baixa fertilidade a campo**. 2021. 58 f. Dissertacao (Mestrado em Ciencias) - Faculdade de Medicina Veterinaria e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2021.

NG HH, BIRD A. DNA methylation and chromatin modification. **Curr Opin Genet Dev**, v. 9, n. 2, p. 158-63, 1999.

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**, v. 67, n. 2, p. 334–340, 2007.

NICHI, M. **Efeito do tratamento com antioxidantes e ácidos graxos poli-insaturados em amostras espermáticas epididimárias de touros.** [s.l: s.n.].

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

NICHI M, GOOVAERTS IGF, CORTADA CNM, BARNABE VH, DE CLERCQ JBP, BOLS PEJ. Roles of lipid peroxidation and cytoplasmic droplets on in vitro fertilization capacity of sperm collected from bovine epididymides stored at 4 and 34°C. **Theriogenology**, v. 67, p. 334–40, 2007.

NICHOLS DG & FERGUSON SJ 2002 *Bioenergetics*, 3rd edn. **Amsterdam: Academic Press.**

NUNNARI J & SUOMALAINEN A. Mitochondria: in sickness and in health. **Cell**, v. 148, p. 1145–1159, 2012.

OHASHI, O.M.; SANTOS, S.S.D., MIRANDA, M.S.; CORDEIRO, M.S.; COSTA, N.N.; SILVA, T.V.G. Morfologia do sistema genital, distúrbio reprodutivo e manejo do macho bubalino (*Bubalus bubalis*). **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v.35, n.2, p.88-94, abr./jun. 2011.

OHKAWA, H.; OHISHI, N.; YAGI, K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. **Analytical Biochemistry**, v. 95, n. 3, p. 351-358, 1979.

OLIVER, C. N., AHN, B. W., MOERMAN, E. J., GOLDSTEIN, S. & STADTMAN, E. R. Age-related changes in oxidized proteins. **Journal of Biological Chemistry**, v. 262, p. 5488-5491, 1987.

OLIVIER, J. J. **Breeding plans for Dorper sheep and Boer goats in South Africa.** In: **SIMPÓSIO INTERNACIONAL SOBRE CAPRINOS E OVINOS DE CORTE**, 2000, João Pessoa-PB. Anais. João Pessoa: EMEPA-PB, 2000, p. 213- 230.

OLLERO M, POWERS RD, ALVAREZ JG: Variation of docosahexaenoic acid content in subsets of human spermatozoa at different stages of maturation: implications for sperm lipoperoxidative damage. **Mol Reprod Develop**, v. 55, p. 326-334, 2000.

OLSZEWSKA, M., BARCISZEWSKA, M., FRACZEK, M., HULEYUK, N., CHERNYKH, V., ZASTAVNA, D., KURPISZ, M. Global methylation status of sperm DNA in carriers of chromosome structural aberrations. **Asian Journal of Andrology**, v. 19, p. 117–124, 2017.

OROURKE B, VAN EYK JE, FOSTER DB. Mitochondrial protein phosphorylation as a regulatory modality: implications for mitochondrial dysfunction in heart failure. **Congest Heart Fail**, v. 17, n. 6, p. 269-82, 2011.

ORRENIUS S, ZHIVOTOVSKY B, NICOTERA P. Regulation of cell death: The calcium-apoptosis link. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 4, p. 552–65, 2003.

OSTERMEIER GC, SARGEANT GA, YANDELL BS, PARRISH JJ. Measurement of bovine sperm nuclear shape using Fourier harmonic amplitudes. **J Androl**, v. 22, p. 584 –94, 2001a.

OSTERMEIER GC, SARGEANT GA, YANDELL BS, EVENSON DP, PARRISH JJ. Relationship of bull fertility to sperm nuclear shape. **J Androl**, v. 22, p. 595– 603, 2001b.

PACHECO, P.S., RESTLE, J., SILVA, J.H.S.D., BRONDANI, I.L., PASCOAL, L.L., ALVES FILHO, D.C., ARBOITTE, M.Z. AND FREITAS, A.K.D. Composição física da carcaça e qualidade da carne de novilhos jovens e superjovens de diferentes grupos genéticos. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 34, p. 1691-1703, 2005.

PALMIERI F. Mitochondrial carrier proteins. **FEBS Lett**, v. 346, p. 48–54, 1994.

PARKS JE, HAMMERSTEDT RH: Developmental changes occurring in the lipids of ram epididymal spermatozoa plasma membrane. **Biol Reprod**, v., 32, n. 35, p. 653-658, 1985.

PASA C. Relação reprodução animal e os minerais. **Rev Biod**, v. 9, n. 1, p. 101-122, 2010.

PAUL, C.; TENG, S.; SAUNDERS, P.T.K. A Single, Mild, Transient Scrotal Heat Stress Causes Hypoxia and Oxidative Stress in Mouse Testes, Which Induces Germ Cell Death. **Biol. Reprod.**, v. 80, p. 913–919, 2009

PAUL, C.; MURRAY, A.A.; SPEARS, N.; SAUNDERS, P.T.K. A single, mild, transient scrotal heat stress causes DNA damage, subfertility and impairs formation of blastocysts in mice. **Reproduction**, v. 136, p. 73–84, 2008.

PÉREZ-CRESPO, M.; PINTADO, B.; GUTIÉRREZ-ADÁN, A. Scrotal Heat Stress Effects on Sperm Viability, Sperm DNA Integrity, and the Offspring Sex Ratio in Mice. **Mol. Reprod. Dev.**, v. 75, p. 40–47, 2008.

PORTELA A, ESTELLER M. Epigenetic modifications and human disease. **Nat Biotechnol**, v. 28, n. 10, p. 1057-68, 2010.

POULOS A, WHITE IG: The phospholipid composition of human spermatozoa and seminal plasma. **J Reprod Fertil**, v. 35, p. 265-272, 1973.

RADI R, CASSINA A, HODARA R, QUIJANO C, CASTRO L. Peroxynitrite reactions and formation in mitochondria. **Free Radic Biol Med**, v. 33, p. 1451–64, 2002.

RAHMAN, M.B.; SCHELLANDER, K.; LUCEÑO, N.L.; SOOM, A.V. Heat stress responses in spermatozoa: Mechanisms and consequences for cattle fertility. **Theriogenology**, v. 113, p. 102–112, 2018.

RAHMAN, M. B., VANDAELE, L., RIJSSELAERE, T., MAES, D., HOOGEWIJS, M., FRIJTERS, A., NOORDMAN, J., GRANADOS, A., DERNELLE, E., SHAMSUDDIN, M., PARRISH, J. J., AND VAN SOOM, A. Scrotal insulation and its relationship to abnormal morphology, chromatin protamination and nuclear shape of spermatozoa in Holstein–Friesian and Belgian Blue bulls. **Theriogenology**, v. 76, 1246–1257, 2011.

RIFFO MS, PARRAGA M. Role of phospholipase A2 in mammalian sperm-egg fusion: development of hamster oolemma fusibility by lysophosphatidylcholine. **J Exp Zool**, v. 279, p. 81-88, 1997.

ROBERT M. BODDEY, DEISE F. XAVIER, BRUNO J. R. ALVES, S. URQUIAGA. Brazilian agriculture: the transition to sustainability. **Journal of Crop Production**, v. 9, n. 1, p. 593-621, 2008.

RODRIGUEZ I, ODY C, ARAKI K, GARCIA I & VASSALLI P. An early and massive wave of germinal cell apoptosis is required for the development of functional spermatogenesis. **EMBO Journal**, v. 16, p. 2262–2270, 1997.

ROTH, Z. Effect of Heat Stress on Reproduction in Dairy Cows: Insights into the Cellular and Molecular Responses of the Oocyte. **Annual Review of Animal Biosciences Annual Reviews Inc.**, 2017.

SAKKAS, D., MARIETHOZ, E., & ST JOHN, J. Abnormal sperm parameters in humans are indicative of an abortive apoptotic mechanism linked to the Fas-mediated pathway. **Experimental and Cellular Research**, v. 251, p. 350–355, 1999.

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

SEMCHYSHYN, H. M. & LUSHCHAK, V. I. in **Oxidative Stress — Molecular Mechanisms and Biological Effects**, p. 15–46, 2012.

SCHROEDER F, JEFFERSON JR, KIER AB, KNITTEL J, SCALLEN TJ, WOOD WG, HAPALA I: Membrane cholesterol dynamics: cholesterol domains and kinetics pools. **Proc Soc Exp Biol Med**, v. 196, p. 235-252, 1991.

SENGER, P. L. (PHILLIP L.). **Pathways to pregnancy & parturition**. 3. ed. [s.l: s.n.].

Sergerson EC, Johnson BH. Selenium and reproductive function in yearling Angus bulls. **J Anim Sci.**, v. 51, p. 395-401, 1980.

SETCHELL BP. The mammalian testis. Em: **Reproductive biology handbooks**. London: Elek, 1978.

SHAMSI MB, KUMAR R, BHATT A, BAMEZAI RN, KUMAR R, GUPTA NP, DAS TK, DADA R. Mitochondrial DNA Mutations in etiopathogenesis of male infertility. **Indian J Urol.**, v. 24, n. 2, p. 150-4, 2008.

SHEU SS, NAUDURI D, ANDERS MW. Targeting antioxidants to mitochondria: a new therapeutic direction. **Biochem Biophys Acta**, v. 1762, p. 256–265, 2006.

SILANIKOVE N, KOLUMAN N. Impact of climate change on the dairy industry in temperate zones: predictions on the overall negative impact and on the positive role of dairy goats in adaptation to earth warming. **Small Rumin Res**, v. 123, n. 1, p. 27-34, 2015.

R SIMÕES, WB FEITOSA, CM MENDES, AV. PROF. DR. MG MARQUES, AC NICACIO, FRO DE BARROS, JA VISINTIN & MEOA ASSUMPCÃO. Use of chromomycin A3 staining in bovine sperm cells for detection of protamine deficiency. **Biotechnic & Histochemistry**, v. 84, n. 3, p. 79-83, 2009.

SIMON L, CASTILLO J, OLIVA R, LEWIS SEM. Relationships between human sperm protamines, DNA damage and assisted reproduction outcomes. **Reprod Biomed Online**, v. 23, n. 6, p. 724-34, 2011.

SIMSON SOREN, SOHAN VIR SINGH & PAWAN SINGH. Seasonal variation of mitochondria activity related and heat shock protein genes in spermatozoa of Karan Fries bulls in tropical climate. **Biological Rhythm Research**, v. 49, n. 3, p. 366-381, 2018.

SKINNER JD, LOUW GN. Heat stress and spermatogenesis in *Bos indicus* and *Bos taurus* cattle. **J Appl Physiol**, v. 21, n. 6, p. 1784-90, 1996.

SOFIKITIS, N., GIOTITSAS, N., TSOUNAPI, P., BALTOGIANNIS, D., GIANNAKIS, D., & PARDALIDIS, N. Hormonal regulation of spermatogenesis and spermiogenesis. **Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 109, n. 3–5, p. 323–330, 2008.

SPANO M, BONDE JP, HJOLLUND HI, KOLSTAD HA, CORDELLI E, LETER G. Sperm chromatin damage impairs human fertility. The Danish First Pregnancy Planner Study Team. **Fertil Steril**, v. 73, p. 43–50, 2000.

STOCCO D & MCPHAUL M 2006 Physiology of testicular steroidogenesis. In **Knobil and Neill's Physiology of Reproduction**, 3rd ed., p 977–1016.

STUBBS CD, SMITH AD: The modification of polyunsaturated fatty acids composition in relation to membrane fluidity and function. **Biochim Biophys Acta**, v. 779, p. 89-137, 1984.

STUPPIA L, FRANZAGO M, BALLERINI P, GATTA V, ANTONUCCI I. Epigenetics and male reproduction: the consequences of paternal lifestyle on fertility, embryo development, and children lifetime health. **Clin Epigenetics**, v. 7, p. 120, 2015.

SUGIHARA, A., S. SAIKI, M. TSUJI, T. TSUJIMURA, Y. NAKATA, A.KUBOTA, T. KOTAKE, AND N. TERADA. Expression of Fas and Fasligand in the testes and testicular germ cell tumors—an immuno-histochemical study. **Anticancer Res.**, v. 17, p. 3861–3865, 1997.

SURANI MA. Imprinting and the initiation of gene silencing in the germ line. **Cell** v. 93, n. 3, p. 309-12, 1998.

TAKAHASHI M. Heat stress on reproductive function and fertility in mammals. **Reprod Med Biol**, v. 11, n. 1, p. 37-47, 2012.

TAPANAINEN, J. S., J. L. TILLY, K. K. VIHKO, AND A. J. HSUEH. Hormonal control of apoptotic cell death in the testis: gonadotropins and androgens as testicular cell survival factors. **Mol. Endocrinol.**, v. 7, p. 643–650, 1993.

TEODORO, R. L.; MADALENA, F. E.; SMITH, C. The value of F1 dairy Bos taurus-Bos indicus embryos for milk production in poor environments. **Journal of Animal Breeding and Genetics**, v. 113, n. 1–6, p. 471–482, 1996.

TURNER J. Genetic and biological aspects of Zebu adaptability. **J Anim Sci**, v. 50, p. 1201–5, 1980.

TURNER C, KILLORAN C, THOMAS NS, ROSENBERG M, CHUZHANOVA NA, JOHNSTON J, KEMEL Y, COOPER DN, BIESECKER LG. Human genetic disease caused by de novo mitochondrial-nuclear DNA transfer. **Hum Genet.**, v 112, n. 3, p. 303-9, 2003.

VERCOE, J. E. The fasting metabolism of Brahman, Africander and HerefordxShorthorn cattle. **British Journal of Nutrition**, v. 24, n. 3, p. 599–606, set. 1970.

VERNET, P.; AITKEN, R. J.; DREVET, J. R. Antioxidant strategies in the epididymis. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 216, p. 31–39, 2004.

YEAGLE PL: Lipids and lipid-intermediate structures in the fusion of biological membranes. **Curr Top Membr**, v. 4, p. 197-214, 1994.

YAKES FM, VAN HOUTEN B. Mitochondrial DNA damage is more extensive and persists longer than nuclear DNA damage in human cells following oxidative stress. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 94, p. 514–19, 1997.

YANAGIMACHI R. Mammalian fertilization. In: Knobil E, Neill JD, editors. The physiology of reproduction. second ed. **New York, USA: Raven Press**, p. 189-317. 1994.

YLIKALLIO E, TYYNISMAA H, TSUTSUI H, IDE T, SUOMALAINEN A. High mitochondrial DNA copy number has detrimental effects in mice. **Hum Mol Genet.**, v. 19, p. 2695–705, 2010.

WAITES, G. M. H.; SETCHELL, B. P. EFFECT OF LOCAL HEATING ON BLOOD FLOW AND METABOLISM IN THE TESTIS OF THE CONSCIOUS RAM. **Reproduction**, v. 8, n. 3, p. 339–349, 1 dez. 1964.

WANG Z, CAI F, CHEN X, LUO M, HU L, LU Y. The role of mitochondria derived reactive oxygen species in hyperthermia-induced platelet apoptosis. **PLoS One**, 2013.

WANG C, CUI YG, WANG XH, JIA Y, SINHAHIKIM A, LUE YH, TONG JS, QIAN LX, SHA JH & ZHOU ZM, HULL L, LEUNG A, SWERDLOFF RS. 2007 Transient scrotal hyperthermia and levonorgestrel enhance testosterone-induced spermatogenesis suppression in men through increased germ cell apoptosis. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 92, n. 8, p. 3292–3304, 2007.

WARD WS. Function of sperm chromatin structural elements in fertilization and development. **Mol Hum Reprod**, v. 16, n. 1, p. 30-6, 2010.

WEERACHATYANUKUL W, RATTANACHAIYANONT M, CARMONA E, FURIMSKY A, MAI A, SHOUSHARIAN A, SIRICHOTIYAKUL S, BALLAKIER H, LEADER A, TANPHAICHITR N: Sulfogalactosylglycerolipid is involved in human gamete interaction. **Mol Reprod Dev**, v. 60, p. 569-578, 2001.

WILDEUS, S.; ENTWISTLE, K. W. Spermogram and sperm reserves in hybrid Bos indicus x Bos taurus bulls after scrotal insulation. **Reproduction**, v. 69, n. 2, p. 711–716, 1983.

WING TY, EWING LL, ZIRKIN BR. Effects of luteinizing hormone withdrawal on Leydig cell smooth endoplasmic reticulum and steroidogenic reactions which convert pregnenolone to testosterone. **Endocrinology**, v. 115, n. 6, 2290-6, 1984.

ZOROV, D.B., FILBURN, C.R., KLOTZ, L.O., ZWEIER, J.L. AND SOLLOTT, S.J. Reactive oxygen species (ROS)-induced Ros release: a new phenomenon accompanying induction of the mitochondrial permeability transition in cardiac myocytes. **J. Exp. Med.**, v. 192, p. 1001–1014, 2000.