

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PAMPA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL**

**AVALIAÇÕES FUNCIONAIS E BIOQUÍMICAS PARA TOUROS DE
ALTA FERTILIDADE**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

LIS SANTOS MARQUES

Uruguaiana, RS, Brasil
2017

LIS SANTOS MARQUES

**AVALIAÇÕES FUNCIONAIS E BIOQUÍMICAS PARA TOUROS DE
ALTA FERTILIDADE**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação *Strictu sensu* em Ciência Animal da Universidade Federal do Pampa, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

Orientador: Prof^a. Dr^a. Daniela dos Santos Brum
Co-orientador: Prof. Dr. Fabio Gallas Leivas

Uruguaiana

2017

LIS SANTOS MARQUES

**AVALIAÇÕES FUNCIONAIS E BIOQUÍMICAS PARA TOUROS DE
ALTA FERTILIDADE**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-graduação *Stricto sensu* em Ciência Animal da Universidade Federal do Pampa, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Ciência Animal.

Área de concentração: Biotecnologia da Reprodução.

Dissertação defendida e aprovada em 08 de dezembro de 2017.

Banca examinadora:

Prof^a. Dr^a. Daniela dos Santos Brum
Universidade Federal do Pampa - UNIPAMPA
Orientadora

Prof^a. Dr^a. Francielli Weber Santos Cebin
Universidade Federal do Pampa - UNIPAMPA

Prof. Dr. Gilson Antonio Pessoa
Universidade Federal de Santa Maria – UFSM

AGRADECIMENTOS

Às pessoas mais importantes da minha vida, sem os quais eu não teria conseguido alcançar essa conquista e ser a pessoa que sou hoje, minha mãe Ieda, meu pai Wilmar, meu irmão Gabriel e ao meu marido Charlie.

Aos membros do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Universidade Federal do Pampa pela oportunidade e por contribuírem com meu crescimento científico, em especial à Prof^a. Dr^a. Débora da Cruz Payão Pellegrini e à secretária Marciana Demarchi por toda a atenção e auxílio.

À professora e amiga Dr^a. Daniela dos Santos Brum, por ter aceitado ser minha orientadora, mas acima de tudo por acreditar no meu trabalho e me proporcionar a oportunidade de me tornar uma profissional melhor.

Ao meu co-orientador Prof. Dr. Fabio Gallas Leivas por todo apoio e aprendizado.

A prof^a. Dr^a. Francielli Weber Santos Cibirin pela paciência e atenção em sanar minhas dúvidas no ramo da bioquímica.

Aos colegas e amigos do Laboratório de Biotecnologia da Reprodução (BIOTECH), em especial as colegas veterinárias Daniele Missio, Hirya Pinto, Cecilia Machado, Bibiana Ribas, Karine Mattos e Eduarda Escobar pelo excelente convívio, por todo auxílio e carinho.

Aos membros da banca examinadora por aceitarem o convite para colaborar com este trabalho.

Ao meu amigo Rômulo Rodrigues pelas inúmeras discussões e ajuda na aplicação das metodologias estatísticas.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

“I do not know anyone who has got to the top without hard work. That is the recipe. It will not always get you to the top, but should get you pretty near.”

Margaret Thatcher

RESUMO

Dissertação de Mestrado
Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal
Universidade Federal do Pampa

AVALIAÇÕES FUNCIONAIS E BIOQUÍMICAS PARA TOUROS DE ALTA FERTILIDADE

AUTORA: Lis Santos Marques
ORIENTADORA: Daniela dos Santos Brum
Uruguaiana-RS, 08 de dezembro de 2017.

A predição da fertilidade de touros é uma área da pesquisa que tem recebido muita atenção devido a sua importância na indústria de bovinocultura de corte. Um modelo de predição de fertilidade baseado na avaliação precoce dos parâmetros da qualidade de sêmen permitiria identificar e remover indivíduos com fertilidade potencialmente baixa de programas de reprodução. Entretanto, parâmetros convencionais utilizados na avaliação espermática *in vitro* têm mostrado resultados limitados quanto à capacidade de predizer o potencial de fertilidade do sêmen *in vivo*. Portanto, o objetivo do presente estudo foi investigar a relação entre a qualidade do sêmen *in vitro* e a fertilidade *in vivo* de touros, por meio da correlação de dados de análises bioquímicas e de cinética espermática com a taxa de prenhez. Amostras de sêmen congelado de seis touros Aberdeen Angus foram classificadas como fertilidade alta ($n = 3$) e baixa ($n = 3$). O *pool* de sêmen foi avaliado para a cinética de espermática (sistema computadorizado de análise espermática; CASA), produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), peroxidação lipídica, atividade da enzima superóxido dismutase (SOD) e capacidade antioxidante total. As amostras foram avaliadas imediatamente após o descongelamento (PT); após teste de resistência térmica (TRT) a 36°C por 3 horas; após seleção de espermática (SS) pelo gradiente de densidade de Percoll; e após SS + TRT. Os parâmetros de cinética espermática: motilidade total (MTOT, $51,29 \pm 5,60\%$), motilidade progressiva (MP; $36,12 \pm 5,56\%$) e frequência de batimentos do flagelo (BCF; $8,11 \pm 0,77$ Hz) foram significativamente maiores em touros de baixa fertilidade quando comparados aos touros de alta fertilidade. A velocidade curvilínea (VCL; $40,15 \pm 7,92$ $\mu\text{m/s}$) foi maior em touros de alta fertilidade após SS + TRT. A velocidade linear (VSL; $r = -0,99$), a velocidade média do

percurso (VAP; $r=-0,99$), linearidade (LIN; $r = -0,98$) e BCF ($r = -0,99$) foram correlacionadas com alta fertilidade após SS + TRT. ROS demonstrou correlação ($r=-0,98$) com fertilidade após SS. Houve uma diminuição significativa dos níveis de FRAP e ROS após SS em touros de baixa e alta fertilidade ($P\leq 0,05$), enquanto que uma diminuição da peroxidação lipídica foi observada apenas em touros de alta fertilidade. Os resultados não mostraram diferença significativa entre touros de fertilidade baixa e alta na peroxidação lipídica. No entanto, houve uma correlação ($r=-0,99$) entre a peroxidação lipídica e alta fertilidade após PT e SS + TRT. Esses resultados sugerem que espermatozoides de touros de alta fertilidade são capazes de prevenir o dano induzido pelo estresse oxidativo. Os dados de cinética espermática obtidos pelo CASA demonstram que a avaliação das combinações dos parâmetros poderia prever a fertilidade *in vivo* de forma mais precisa do que a avaliação individual desses parâmetros. Além disso, a separação espermática em gradiente de Percoll reduziu os níveis de estresse oxidativo, consequentemente, melhorando a qualidade espermática. O presente estudo compartilha informações úteis para o desenvolvimento futuro de modelos de predição de fertilidade em touros.

Palavras-chave: Espermatozoide bovino. Fertilidade bovina. Função espermática. Estresse oxidativo.

ABSTRACT

Dissertation of Master's Degree
Program of Post-Graduation in Animal Science
Federal University of Pampa

FUNCTIONAL AND BIOCHEMICAL ASSESSMENTS FOR HIGH FERTILITY BULLS

AUTHOR: Lis Santos Marques
ADVISOR: Daniela dos Santos Brum
Uruguaiana-RS, December 08, 2017.

Prediction of bull fertility is an area of research that has received much attention due to its importance in the beef cattle industry. A prediction model of fertility based on early assess of semen quality parameters would allow identify and remove sires with potentially low fertility from breeding programs. However, conventional parameters used on *in vitro* sperm assessments have shown limited results in the ability to predict the fertility potential of semen *in vivo*. Therefore, the aim of the present study was to investigate the relationship between *in vitro* semen quality and *in vivo* fertility of bulls by correlating biochemical and sperm kinetics data with pregnancy rate. Frozen semen samples from six Aberdeen Angus bulls were classified as high (n=3) and low (n=3) fertility. Semen pool was evaluated to sperm kinetics (computer assisted sperm analysis; CASA), reactive oxygen species (ROS) production, lipid peroxidation, superoxide dismutase enzyme (SOD) activity and total antioxidant capacity. Samples were evaluated immediately after thawing (PT); after thermal-resistance test (TRT) at 36°C for 3 hours; after sperm selection (SS) by Percoll density gradient; and after SS + TRT. Sperm kinetic parameters: total motility (MTOT; 51.29±5.60%), progressive motile (MP; 36.12±5.56%) and beat cross-frequency (BCF; 8.11±0.77 hz) were significantly higher in low-fertility bulls when compared to high fertility ones. Curvilinear velocity (VCL; 40.15±7.92 µm/s) was greater in high fertility bulls after SS + TRT. Straight-line velocity (VSL; r=-0.99), average path velocity (VAP; r=-0.99), linearity (LIN; r=-0.98), and BCF (r=-0.99) were correlated to high fertility after SS + TRT. ROS showed correlation (r=-0.98) with fertility after SS. There was a significant decrease of FRAP and ROS levels following SS in

both low and high fertility bulls ($P \leq 0.05$), whereas a decrease of lipid peroxidation was observed only in high fertility bulls. The results showed no significant difference between low and high fertility bulls in lipid peroxidation. However, there was a correlation ($r = -0.99$) between lipid peroxidation and high fertility after PT and SS + TRT. Sperm kinetic data obtained by CASA showed that the assessment of a combination parameters could predict *in vivo* fertility more accurately than the assess of an individual one. In addition, spermatic separation by the Percoll gradient reduced oxidative stress levels, hence, improving sperm quality. The present study shares useful information for the future development of fertility prediction models in bulls.

Keywords: Bovine spermatozoa. Bovine fertility. Sperm function. Oxidative stress.

LISTA DE FIGURAS

Revisão

Figura 1 - Parâmetros de movimento obtidos pelo sistema computadorizado de análise espermática (CASA). VAP: velocidade de trajeto ($\mu\text{m/s}$); VSL: velocidade progressiva ($\mu\text{m/s}$); VCL: velocidade curvilinear ($\mu\text{m/s}$); ALH: amplitude de deslocamento lateral de cabeça (μm); BCF: frequência de batimentos do flagelo (Hz).....29

Artigo

Figure 1. Experimental design.....34

Figure 2. Sperm kinetics evaluated by the Computer Assisted Semen Analysis (CASA) of six Aberdeen Angus bulls. A. post-thaw (PT); B. thermal-resistance test (TRT); C. sperm selection (SS); D. SS + TRT. MTOT = total motility; MP= progressive motile; VCL= curvilinear velocity; VSL= straight-line velocity; VAP= average path velocity; LIN= linearity; STR = straightness; WOB= wobble; ALH= amplitude of lateral head displacement; BCF= beat cross-frequency; HYP = hyperactive cells.....38

Figure 3. A. Superoxide dismutase (SOD) activity; B. Thiobarbituric acid reactive substances (TBARS); C. Reactive oxygen species (ROS); D. Ferric reducing antioxidant potential (FRAP).39

LISTA DE TABELAS

Table 1. Correlation between fertility index and <i>in vitro</i> sperm kinetic parameters following thawing (post-thaw group; PT).....	39
Table 2. Correlation between field fertility index and <i>in vitro</i> oxidative stress assessments following thawing (post-thaw group; PT).	40
Table 3. Correlation between field fertility index and <i>in vitro</i> sperm kinetic parameters following thermal-resistance test (TRT group).	40
Table 4. Correlation between field fertility index and <i>in vitro</i> oxidative stress assessments following thermal-resistance test (TRT group).	41
Table 5. Correlation between field fertility index and <i>in vitro</i> sperm kinetic parameters following spermatic selection (SS group) by the discontinuous Percoll gradient.....	41
Table 6. Correlation between field fertility index and <i>in vitro</i> oxidative stress assessments following spermatic selection (SS group) by the discontinuous Percoll gradient.....	42
Table 7. Correlation between field fertility index and <i>in vitro</i> sperm kinetic parameters following spermatic selection by the discontinuous Percoll gradient and thermo-resistance test (TRT).	42
Table 8. Correlation between field fertility index and <i>in vitro</i> oxidative stress assessments following spermatic selection by the discontinuous Percoll gradient and thermo-resistance test (TRT).	43

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ALH - Amplitude de Deslocamento Lateral de Cabeça (do inglês: *Amplitude of Lateral Head Displacement*)

ASBIA - Associação Brasileira de Inseminação Artificial

ATP - Trifosfato de adenosina (do inglês: *Adenosine Triphosphate*)

BCF - Frequência de Batimentos do Flagelo (do inglês: *Beat Cross-Frequency*)

CASA - Sistema Computadorizado de Análise Espermática (do inglês: *Computer Assisted Sperm Analysis*)

CAT - Catalase

CBRA - Manual do Colégio Brasileiro de Reprodução Animal

DNA - Ácido Desoxirribonucleico (do inglês: *Deoxyribonucleic Acid*)

ERO – Espécies Reativas de Oxigênio

FRAP - Redução do Ferro (do inglês: *Ferric Reducing Antioxidant Power*)

H₂O₂ - Peróxido de Hidrogênio

IA - Inseminação Artificial

IATF - Inseminação Artificial em Tempo Fixo

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

GPx - Glutadiona Peroxidase

GRD - Glutadiona Redutase

LIN - Linearidade (do inglês: *Linearity*)

MDA - Malondialdeído

NADPH - Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Fosfato Reduzida

OH[•] - Radical Hidroxila

O₂^{•-} - Ânion Superóxido

PUFA - Ácidos Graxos Poli-insaturados (do inglês: *Polyunsaturated Fatty Acid*)

ROS - *Reactive Oxygen Species*

SOD - Enzima Superóxido Dismutase

STR - Retilinearidade (do inglês: *Straightness*)

TAC - Capacidade Antioxidante Total

TBARS - Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico

TTR - Teste de Termoresistência

TRT - *Thermal-Resistance Test*

UNIPAMPA - Universidade Federal do Pampa

USDA - *United States Department of Agriculture*

VAP - Velocidade Média do Percurso (do inglês: *Average Path Velocity*)

VCL - Velocidade Curvilínea (do inglês: *Curvilinear Velocity*)

VSL - Velocidade Progressiva (do inglês: *Straight-line Velocity*)

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
2	REVISÃO DE LITERATURA	17
2.1.	Composição do sêmen	17
2.2.	Espécies reativas de oxigênio (ERO) na fertilidade do macho	18
2.3.	Avaliação do estresse oxidativo.....	22
2.4.	Relação da qualidade do sêmen e a fertilidade <i>in vivo</i>	24
2.5.	Teste de termoresistência	26
2.6.	Seleção espermática	26
2.7.	Sistema computadorizado de análise espermática (CASA).....	27
3	OBJETIVOS.....	30
3.1.	Objetivo geral	30
3.2.	Objetivos específicos	30
4	ARTIGO CIENTÍFICO.....	31
5	CONCLUSÃO	52
6	PERSPECTIVAS FUTURAS	53
	REFERÊNCIAS	54

1 INTRODUÇÃO

A bovinocultura brasileira, principalmente a pecuária de corte, passa por um período de reconhecimento da importância do uso das biotecnologias da reprodução no setor produtivo, o que contribuiu para que o país fosse classificado como o maior rebanho comercial do mundo, atingindo o recorde de 215,2 milhões de cabeças em 2015 (IBGE, 2016). De acordo com o Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (United States Department of Agriculture, USDA), o Brasil é o segundo maior produtor de carne bovina, participando com 16,3% da produção global. A biotecnologia da reprodução se tornou uma ferramenta valiosa na produção animal, buscando a obtenção de um maior número de descendentes em um curto período de tempo com a maximização do potencial genético, qualidade dos produtos, custos reduzidos, retorno econômico e desenvolvimento sustentável.

Em bovinos, a Inseminação Artificial (IA) é uma biotécnica da reprodução bem estabelecida e tem sido utilizada em combinação com programas de seleção genética, que incluem testes de progênie e de avaliação de desempenho (BARBOSA e MACHADO, 2008). O sucesso na utilização e disseminação da IA se deve ao fato de ser uma técnica simples, econômica e eficiente quando comparada a outras biotecnologias da reprodução, como por exemplo, a produção *in vitro* de embriões e a transferência de embriões (VISHWANATH, 2003). De acordo com a Associação Brasileira de Inseminação Artificial (ASBIA), um total de 12.606.703 doses de sêmen foram comercializadas em 2015, correspondendo a um crescimento de 4,7% em relação ao ano anterior. O segmento de corte foi o grande responsável pelo resultado positivo, com comercialização de 8.274.084 doses. Nesse contexto, a IA aliada ao uso de protocolos que permitem a inseminação artificial em tempo fixo (IATF) possibilitam o melhor aproveitamento do potencial genético dos machos. Apesar do aumento da comercialização de doses e do desenvolvimento de novos protocolos de inseminação, a taxa de prenhez pode variar de 20 a 80%, mas em média, são atingidos resultados de 50% (MADUREIRA e FILHO, 2012). Acredita-se que 40% dos casos de infertilidade em rebanhos estão associados ao macho (SULLIVAN, 2004). Sabe-se que o melhor indicador do potencial reprodutivo dos touros é a taxa de prenhez e/ou a taxa de nascidos após IA. No entanto, estes dados são obtidos somente após o animal ser selecionado para utilização comercial na indústria de IA. No Manual do Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA, 2013), são descritas características mínimas que o sêmen bovino deve apresentar para ser considerado apto para comercialização e uso na IA, incluindo motilidade, vigor, morfologia e concentração espermática. Entretanto, algumas partidas consideradas satisfatórias para estas

características, quando utilizadas na IA resultam em baixo potencial fecundante, o qual pode estar relacionado a alterações em estruturas ou funções espermáticas não contempladas nas avaliações laboratoriais. Por outro lado, a avaliação automatizada da motilidade é importante devido ao fato de a cinética espermática ter relevância na determinação do potencial de fertilidade dos espermatozoides (YÁNIZ et al., 2015).

A relação entre a fertilidade e processo de estresse oxidativo dos espermatozoides tem sido estudada *in vivo* e *in vitro*. O aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) resulta em danos peroxidativos, uma das principais causas da redução da viabilidade e da capacidade fecundante dos espermatozoides (LYDKA et al., 2012; KUMARESAN et al., 2017). De acordo com Alves et al. (2015), a detecção de ERO em amostras de sêmen é essencial para o diagnóstico da infertilidade. Além disso, o processo de peroxidação lipídica em espermatozoides tem sido correlacionado negativamente com a fertilidade em touros (KASIMANICKAM et al., 2007) e considerado um importante preditor das taxas de concepção (OLIVEIRA et al., 2013).

Neste contexto, o presente estudo tem como objetivo principal investigar a relação da qualidade do sêmen *in vitro* com a fertilidade *in vivo* de touros, através da correlação de dados de cinética espermática e de análises bioquímicas com a taxa de prenhez após IA.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Composição do sêmen

O ejaculado é uma mistura complexa de espermatozoides e componentes do plasma seminal, cuja combinação é crucial para o sucesso reprodutivo masculino (PERRY et al., 2013). O plasma seminal atua como diluidor e carreador dos espermatozoides através do trato genital feminino, viabilizando o processo de fecundação. Além disso, esta fração líquida do sêmen é responsável por suprir a energia necessária para os espermatozoides (MANN, 1945; 1946), controlar o pH e a osmolaridade (PETRUNKINA et al., 2001), estimular a motilidade espermática (BAAS et al., 1983), participar da modulação da capacitação espermática (MILLER et al., 1990), conter agentes antioxidantes que servem como mecanismo de defesa contra o estresse oxidativo (PESCH et al., 2006), agir como bactericida e ter efeito imunomodulatório (STRZEMIENSKI, 1989). Além disso, estudos na composição do plasma seminal de machos férteis e inférteis demonstram que o conteúdo do plasma está relacionado com a fertilidade em animais e humanos (KILLIAN et al., 1993; COLAGAR et al., 2009a; 2009b; KWON et al., 2015).

O plasma seminal é composto basicamente de ácido cítrico, ácido láctico, ergotioneína, frutose, sorbitol, glicerilfosforilcolina, ácido ascórbico, aminoácidos, peptídeos, lipídeos, ácidos graxos, enzimas e proteínas (GARNER e HAFEZ, 2004). As proteínas são os constituintes orgânicos encontrados em maior quantidade e estão presentes na forma de complexos associados (JELÍNKOVÁ et al., 2003). As funções e características dos espermatozoides que podem ser influenciadas pelas proteínas do plasma seminal incluem, por exemplo, a capacitação e a reação acrossômica (MANJUNATH e THÉRIEN, 2002), a motilidade espermática (CURI et al., 2003), e a integridade genômica (CHEN et al., 2002). Além disso, as proteínas conferem proteção contra efeitos oxidativos e imunológicos oriundos do aparelho reprodutor feminino (BROMFIELD, 2014).

A membrana plasmática é o componente mais externo e envolve todo o espermatozoide. A membrana espermática é uma estrutura fina, flexível, autosselante, semipermeável, e formada quase que inteiramente por proteínas e lipídios (GUYTON E HALL, 1997). Em geral a membrana plasmática contém aproximadamente 70% de fosfolipídios, 25% de lipídios neutros e 5% de glicolipídios (em base molar) (FLESH e GADELLA, 2000). Os fosfolipídios

parecem ser a fonte principal de substrato de energia endógena dos espermatozoides (HARTREE e MANN, 1960). Os tipos de fosfolipídios presentes nos espermatozoides variam de uma espécie para outra, sendo que nos bovinos 45% da composição dos fosfolipídeos de membrana são fosfoglicerídeos, enquanto que nas outras espécies a fração de fosfoglicerídeos é de 20% ou menos (WATSON, 1981). Os fosfoglicerídios são hidrolisados e há liberação de ácidos graxos, que são oxidados rapidamente, gerando energia (MILLS e SCOTT, 1969; AITKEN, 1995).

Os lipídeos são componente importante do plasma seminal e dos espermatozoides. O sêmen contém altos níveis de ácidos graxos poli-insaturados (PUFA), os quais estão envolvidos no metabolismo energético espermático e na fecundação (FLESCHE e GADELLA, 2000; ZANIBONI et al., 2006). Os lipídeos do plasma seminal parecem atuar na modulação do potencial anti ou pró-oxidativo do sêmen, deste modo, podendo estar diretamente ligados às alterações na integridade da membrana e do DNA de espermatozoides (MARTÍNEZ-SOTO et al., 2012). Os ácidos graxos, tais como o docosahexaenóico (DHA), eicopentanóico (EPA) e linoléico (ALA), são responsáveis pela fluidez e pela flexibilidade do espermatozoide (LENZI et al., 2000). Por outro lado, a presença de ligações duplas entre os carbonos nas moléculas dos ácidos graxos faz com que estes fiquem vulneráveis ao ataque dos radicais livres e à iniciação da cascata de peroxidação lipídica (BANSAL e BILASPURI, 2011).

O plasma seminal também é uma fonte rica de agentes oxidantes e antioxidantes capazes de controlar a ação deletéria de moléculas oxidantes. Entretanto, quando ocorre um desequilíbrio entre as espécies reativas de oxigênio (ERO) e os agentes oxidantes estabelece-se um quadro de estresse oxidativo. Para proteger os espermatozoides dos efeitos prejudiciais dos radicais livres, o plasma seminal é rico em agentes antioxidantes enzimáticos e não-enzimáticos, tais como a catalase e o ácido ascórbico, respectivamente (AGARWAL et al., 2014). Os antioxidantes não estão presentes apenas no plasma seminal, em espermatozoides bovinos foram encontrados principalmente superóxido dismutase e baixa concentração de glutathione peroxidase. Além disso, foi observada ausência de catalase em espermatozoides bovinos (BILODEAU et al., 2000), apesar de a catalase, presente no plasma seminal, tenha sido relacionada ao controle do estresse oxidativo nas células espermáticas (BUCAK et al., 2007).

2.2. Espécies reativas de oxigênio (ERO) na fertilidade do macho

O estresse oxidativo é uma condição biológica em que ocorre aumento de danos celulares induzidos pelo oxigênio e por suas formas oxidantes, também denominadas de espécies reativas de oxigênio (ERO) (SIKKA et al., 1995). Todos os radicais e não radicais derivados do oxigênio são considerados ERO, e devido à alta reatividade eletrônica e instabilidade dessas substâncias, elas podem reagir com um grande número de compostos adjacentes, atuando como receptores ou doadores de elétrons (BIRBEN et al., 2012). O espermatozoide é capaz de gerar e degradar ERO, as quais, em pequenas quantidades, são necessárias para o funcionamento normal da célula. Entretanto, a produção excessiva de ERO pode exceder a capacidade antioxidante do espermatozoide, tornando-o susceptível ao estresse oxidativo. Por outro lado, o plasma seminal, que é rico em antioxidantes, fornece proteção ao espermatozoide, compensando a sua baixa disponibilidade de enzimas antioxidantes. Contudo, em condições patológicas, a produção descontrolada de ERO excede a capacidade antioxidante do plasma seminal, resultando em estresse oxidativo (HENKEL, 2011; TRUSSELL, 2013). O estresse oxidativo é considerado uma importante causa idiopática de infertilidade masculina (AGARWAL et al., 2014), em que de acordo com dados dos Estados Unidos da América 30% a 40% dos homens inférteis apresentam níveis elevados de ERO no plasma seminal (LANZAFAME et al., 2009). A produção excessiva de ERO pode causar infertilidade por meio de dois mecanismos principais: (1) através de danos na membrana do espermatozoide, reduzindo a motilidade e a habilidade de fusão do espermatozoide com a membrana do óocito; (2) através de danos ao DNA espermático, podendo causar comprometimento da transmissão correta do genoma paterno ao embrião (SANOCKA et al., 1997; AITKEN et al., 2003; TREMELLEN, 2008). Os danos causados ao DNA são considerados graves, pois se a cadeia do DNA é quebrada, esta pode ser reconectada em outra posição alterando a ordem de suas bases. Deste modo, podendo ocorrer mutações. Uma enzima, na qual os aminoácidos foram alterados, pode perder sua atividade ou assumir uma atividade diferente (CLANCY, 2008).

As células espermáticas imaturas, assim como os leucócitos, são as principais fontes de ERO (GARRIDO et al., 2004), pois é durante a espermatogênese que ocorre eliminação do citoplasma, rico em antioxidantes. Falhas neste mecanismo de extrusão resultam em um excesso de citoplasma, chamado de citoplasma residual, fazendo com que o espermatozoide seja considerado imaturo e funcionalmente defeituoso (FISHER e AITKEN, 1997; SAID et al., 2005). O excesso de citoplasma residual contém altos níveis da enzima glicose-6-fosfato desidrogenase, responsável por uma alta produção de nicotinamida adenina dinucleotídeo

fosfato reduzida (NADPH), a qual resulta em ERO por meio de duas vias: (1) o sistema NADPH oxidase na membrana espermática e (2) a via da oxidoreductase NADPH-dependente nas mitocôndrias (RENGAN et al., 2012; O'FLAHERTY, 2015).

O espermatozoide é altamente susceptível aos danos causados por ERO devido à baixa concentração de enzimas antioxidantes em seu reduzido citoplasma e à alta concentração de lipídios encontrados na forma de PUFA (AITKEN, 1994). Os ácidos graxos PUFA presentes na membrana celular são essenciais na manutenção das propriedades da bicamada lipídica, além disso, são responsáveis pela fluidez e pela flexibilidade do espermatozoide (LENZI et al., 2000). Contudo, a presença de ligações duplas entre os carbonos em suas moléculas, torna o espermatozoide altamente susceptível aos radicais livres e à iniciação da cascata de peroxidação dos lipídios de membrana (BANSAL e BILASPURI, 2011). A peroxidação de lipídios ou lipoperoxidação é definida como a deterioração oxidativa de lipídios PUFA. Esse processo causa alterações na estrutura e na permeabilidade da membrana, resultando em perda da seletividade iônica, liberação do conteúdo de organelas e formação de produtos citotóxicos, levando a morte celular (REPETTO et al., 2012). A oxidação de lipídios, além de interferir no transporte ativo e passivo normal através da membrana celular, causa danos às membranas das mitocôndrias, reduzindo o potencial de membrana e a taxa de ATP intracelular, indispensáveis para o movimento flagelar, consequentemente, a motilidade espermática é comprometida (GUTHRIE e WELCH, 2012). Assim, a peroxidação lipídica é considerada uma importante causa de disfunção espermática. Em cordeiros, os parâmetros motilidade e morfologia espermática apresentaram correlação negativa com o nível de peroxidação lipídica no espermatozoide e no plasma seminal (KASIMANICKAM et al., 2006). Resultados similares foram relatados em bovinos, em que amostras de sêmen com menor motilidade e vigor apresentaram maior susceptibilidade à peroxidação lipídica (BEORLEGUI et al. 1997). Além disso, os espermatozoides do sêmen com maiores níveis de peroxidação lipídica apresentaram menor capacidade de sofrer reação acrossômica. Em um estudo recente com sêmen de búfalos de alta, média e baixa fertilidade, a peroxidação lipídica causou danos visíveis na peça intermediária dos espermatozoides (SINGH et al., 2016). Os autores relataram que em touros de alta fertilidade, a proporção de espermatozoides apresentando peroxidação lipídica foi significativamente menor do que a dos touros de média ou baixa fertilidade. Neste estudo, também foi observada uma alta correlação negativa entre o nível de peroxidação lipídica e fertilidade.

Sabe-se que o radical hidroxila ($\text{OH}^\cdot$) é um radical livre formado a partir do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) pela reação de Fenton, catalisado por íons ferro (Fe^{++}) ou cobre (Cu^{++}) (LLOYD et al., 1997). Esse radical é considerado iniciador da peroxidação lipídica, pois é capaz de reagir rapidamente com as biomoléculas, desencadeando a lipoperoxidação por meio da remoção de um átomo de hidrogênio dos ácidos graxos PUFA da membrana celular (BIRBEN et al., 2012). O H_2O_2 não é considerado um radical livre, pois não possui um elétron desemparelhado em sua última camada eletrônica, contudo, é uma ERO com alto potencial reativo. Além disso, o H_2O_2 possui vida longa e é capaz de atravessar membranas biológicas, sendo altamente tóxico para as células (HALLIWELL, 1991). Resultados de um estudo realizado com sêmen humano relatou que o H_2O_2 produzido pelos leucócitos ocasionou a inibição completa da produção de ATP e da motilidade espermática (ARMSTRONG et al., 1999).

O ânion superóxido (O_2^-) é produzido principalmente nas mitocôndrias, as quais são a maior fonte endógena de produção de radicais livres nos eucariotos (HEKIMI et al., 2011). Normalmente, os elétrons são transferidos através da cadeia transportadora das mitocôndrias para redução do oxigênio em água, entretanto, aproximadamente 1 a 3% de todos os elétrons escapam do sistema e reduzem o O_2 presente nas células gerando o ânion superóxido (BIRBEN et al., 2012). O ânion superóxido é um radical livre pouco reativo, que não possui capacidade de penetração através da membrana lipídica, agindo somente no compartimento onde é produzido (GUSKOVA et al., 1984). No entanto, o ânion superóxido participa da formação do H_2O_2 por meio da ação da enzima superóxido dismutase (SOD) (CRAPO et al., 1992). Outro papel importante desta ERO é a interação com íons ferro e cobre, os quais são muito ativos em reações de óxido-redução, o que os capacitam como potentes catalisadores das reações de geração de radicais livres, como, o radical hidroxila (BIRBEN et al., 2012). Em humanos, um estudo sugeriu que o desequilíbrio do radical O_2^- está relacionado à integridade do DNA espermático (IOMMIELLO et al., 2015). Esses autores observaram um índice de fragmentação de DNA superior ($\geq 30\%$) nas amostras de sêmen com alto nível de estresse oxidativo quando comparadas às amostras com baixo nível de estresse oxidativo ($P = 0,0379$).

As ERO não são apenas derivadas dos espermatozoides, mas também podem ser gerados por leucócitos, que produzem fisiologicamente até 1000 vezes mais ERO do que as células espermáticas (PLANTE et al., 1994). Essa produção elevada de ERO pelos leucócitos

desempenha um papel importante durante os mecanismos de defesa celular. No entanto, em casos de infecções e inflamações do trato genital masculino, a fertilidade é seriamente afetada, uma vez que os achados clínicos podem mostrar astenozoospermia, oligozoospermia ou até mesmo azoospermia. Os leucócitos e espermatozoides apresentam um mecanismo similar de geração de ERO, entretanto, os leucócitos liberam grandes quantidades de ânion superóxido em vesículas fagocíticas durante as respostas citotóxicas contra agentes patogênicos (HENKEL, 2011). Neste contexto, estudos têm investigado a correlação entre o estresse oxidativo e a leucocitospermia na diminuição da qualidade seminal. (AITKEN e BAKER, 1995; SALEH et al., 2002)

2.3. Avaliação do estresse oxidativo

A avaliação do estresse oxidativo pode ser realizada de três maneiras: (1) mensuração direta dos níveis de ERO ou de seus metabolitos; (2) mensuração dos danos causados as células; e (3) detecção dos níveis antioxidantes (HALLIWELL e WHITEMAN, 2004). A dosagem direta de ERO pode parecer o método mais óbvio, entretanto, muitas espécies reativas de oxigênio são bastante instáveis e difíceis de mensurar diretamente (BATTINO et al., 2016). Assim, muitos pesquisadores optam por mensurar os danos em proteínas, DNA, RNA, lipídios ou outras biomoléculas (SHULAEV e OLIVER, 2006). Apesar de serem uma abordagem indireta, muitos marcadores de danos são estáveis e, portanto, proporcionam um método mais confiável para medir o estresse oxidativo. Outra abordagem é medir os níveis de enzimas antioxidantes que estão presentes em diferentes compartimentos celulares e contribuem para o controle das ERO, mantendo a homeostase redox no sistema. Destacam-se entre as enzimas antioxidantes a superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutadiona peroxidase (GPx) e glutadiona redutase (GRD). Além disso, existem ensaios que podem testar a capacidade antioxidante em um sistema, e entre os principais metabólitos antioxidantes, encontram-se o ácido ascórbico. O processo de seleção de ensaios para medir o estresse oxidativo depende do tipo de amostra a ser estudada, uma vez que existem muitos marcadores de estresse oxidativo e que alguns são mais facilmente detectados em certos tipos de amostras. Em amostras de sêmen, além da produção de ERO ser relativamente mais baixa quando comparada a leucócitos, por exemplo, a meia vida das espécies reativas de oxigênio é muito curta (HENKEL, 2011), sendo necessário o uso de técnicas mais sensíveis.

A produção de espécies reativas no sêmen pode ser mensurada por meio de

imunocitoquímica (MORIELLI e O'FLAHERTY, 2015; GHARAGOZLOO et al., 2016), quimioluminescência (AITKEN et al., 1992; AGARWAL et al., 2004) e/ou dosagem enzimática (RICE-EVANS et al., 1991). A imunocitoquímica envolve a adição de anticorpos anti-antioxidantes específicos, os quais se ligam ao antioxidante presente na amostra, e a leitura é realizada com o auxílio de microscopia de fluorescência ou citometria de fluxo (SHARMA et al., 2017). A técnica de quimioluminescência, além de quantificar ERO intracelular e extracelular, pode diferenciar entre a produção de superóxido e H_2O_2 pelos espermatozoides, dependendo da sonda utilizada (AGARWAL et al., 2004). Uma vez que o estresse oxidativo é causado por um desequilíbrio entre os níveis de ERO produzidos e a proteção antioxidante, a medição do estresse oxidativo pode ser realizada tanto pela avaliação de ERO quanto pela capacidade antioxidante total (TAC). A TAC é medida por quimioluminescência ou ensaio colorimétrico (SHARMA et al., 1999; SAID et al., 2003). O desequilíbrio entre a produção ERO e a TAC no líquido seminal indica estresse oxidativo. Sharma et al. (1999) descreveu um escore ERO-TAC que mostrou ser superior aos parâmetros individuais de ERO ou TAC para avaliação do estresse oxidativo seminal e discriminação da população fértil e infértil em homens. O escore médio de ERO-TAC para homens férteis foi de 50 ± 10 , significativamente maior em comparação com homens inférteis ($35,8 \pm 15$; $P < 0,01$), além disso, a probabilidade de gestação bem sucedida aumentou à medida que o escore ERO-TAC aumentou. Um método relativamente simples, bastante utilizado para mensurar TAC é o método de redução do ferro (FRAP; *ferric reducing antioxidant power*) (COLAGAR et al., 2013; PAHUNE et al., 2013; MORTAZAVI et al., 2014). O ensaio FRAP é um método de avaliação antioxidante pela redução do Fe^{3+} em Fe^{2+} e é expresso em ácido ascórbico equivalente (BENZIE e STRAIN, 1996).

A dosagem enzimática é feita utilizando substratos que são catalisados por antioxidantes específicos. O consumo destes substratos pelos antioxidantes é quantificado com o auxílio de espectrofotometria. Os sistemas enzimáticos mais utilizados incluem a SOD, que catalisa a conversão de ânion superóxido em H_2O_2 , e a catalase, a qual converte o H_2O_2 em água e oxigênio (BIRBEN et al., 2012). A SOD atua na defesa antioxidante primária contra os radicais superóxidos, e o aumento na atividade de SOD corresponde ao aumento na resistência ao estresse oxidativo. Em amostras de sêmen humano normospermico, a atividade da SOD apresentou correlação positiva com o índice de peroxidação lipídica espontânea, indicando que a SOD está entre os principais mecanismos de proteção contra lipoperoxidação (ALVAREZ et al., 1987; GAVELLA et al., 1996). Sêmen criopreservado de touros com

baixo índice de peroxidação lipídica apresentaram maiores chances de produzir descendentes (KASIMANICKAM et al., 2007). De acordo com os autores, a diminuição do potencial de fecundação pode ser atribuída ao efeito deletério da peroxidação lipídica na integridade da membrana plasmática e no DNA espermático. O método mais usado para avaliar o nível de peroxidação lipídica sofrido pela célula é por meio da formação de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) (SANOCA e KURPISZ, 2004). Neste método, o produto final mensurado é o malondialdeído (MDA), um aldeído de cadeia curta, altamente tóxico para a célula (AYALA et al, 2014). Durante a fase de iniciação da lipoperoxidação, ocorre acúmulo de hidroperóxidos de lipídios na membrana espermática, que se decompõe formando vários aldeídos, entre eles o MDA (SANOCA e KURPISZ, 2004). A mensuração de MDA é realizada através de absorbância ou fluorescência.

2.4. Relação da qualidade do sêmen e a fertilidade *in vivo*

A taxa de prenhez é o parâmetro mais seguro e direto para mensurar a fertilidade do touro, no entanto, requer tempo e tem custo elevado. Deste modo, métodos *in vitro* são úteis para estimar a fertilidade de reprodutores doadores de sêmen. Entre os testes laboratoriais de rotina de avaliação de sêmen estão a motilidade, a concentração e a morfologia espermáticas, uma vez que são rápidos e relativamente fáceis de executar e com baixo custo (SHARMA et al., 2012). A motilidade espermática é considerada fundamental na análise laboratorial, pois está associada com a habilidade de fecundação do espermatozoide (VARNER, 2008). Autores têm relatado uma relação positiva entre a motilidade total (GILLAN et al., 2008) e progressiva (KATHIRAVAN et al., 2008; VINCENT et al., 2012) do sêmen bovino e a fertilidade no campo. Por outro lado, em um estudo recente, a maior taxa de fertilidade foi observada no touro que apresentava alta frequência de espermatozoides imóveis e menor taxa de motilidade total e progressiva (ALLOUCHE et al., 2017). De acordo com esses autores, o excesso de motilidade pode ser uma característica desfavorável à fertilidade, pois os espermatozoides avançariam rapidamente pelo oviduto antes da ovulação e não conseguiriam atingir e fecundar o oócito com sucesso. A integridade de membrana avaliada por sondas fluorescentes parece mais intimamente relacionada com a fertilidade do sêmen do que a motilidade dos espermatozoides. Oliveira et al., (2014) separaram partidas de sêmen em três grupos com características espermáticas similares de integridade de membrana plasmática, acrossoma intacto e alto potencial mitocondrial, e após IATF, as partidas que apresentaram maior percentual de membranas íntegras (44,5%), resultaram em maiores taxas de prenhez (64,7%).

De acordo com Oliveira et al., (2013) a avaliação da integridade e funcionalidade da membrana plasmática, bem como integridade do acrossoma foram considerados bons preditores das taxas de concepção. Em geral, a maioria dos pesquisadores concorda que a integridade da membrana plasmática é importante para determinar o potencial de fertilidade em amostras de sêmen de touros (JANUSKAUSKAS et al., 2003; PUGLISI et al., 2010; CHRISTENSEN et al., 2011; OLIVEIRA et al., 2014). Por outro lado, a maioria desses autores também identificou outras características importantes que contribuem para a fertilidade. Um exemplo é a peroxidação lipídica, a qual já foi correlacionada negativamente com a fertilidade em touros (KASIMANICKAM et al., 2007), e é um importante preditor das taxas de concepção (OLIVEIRA et al., 2013). Em equinos, a produção de espécies reativas de oxigênio e o potencial de membrana mitocondrial foram identificados como indicadores importantes de fertilidade (JOHANNISSON et al., 2014; MORRELL et al., 2017). Em homens com problemas de fertilidade, além de ter sido observada uma correlação positiva com os níveis de lipoperoxidação, também foi relatada uma correlação negativa entre atividade antioxidante e diferentes aspectos da função espermática, tais como, a capacidade de fusão do espermatozoide com o oócito, integridade morfológica e motilidade espermática (AITKEN e BAKER, 2002).

Sabe-se que a alta frequência de espermatozoides morfollogicamente anormais ou/e a alta incidência de um único defeito podem reduzir a fertilidade (SÖDERQUIST et al., 1991). Amostras de sêmen de touros com baixa fertilidade apresentam morfologia e atividade metabólica anormal, não sendo capazes de atravessar o trato reprodutivo feminino e atingir o local de fecundação em número suficiente, ou fecundar o oócito (NAIB et al., 2011; SAACKE, 2008). Tanto a morfologia quanto a motilidade espermática têm sido apontadas como importantes parâmetros na seleção de um ejaculado, sendo a determinação da porcentagem de espermatozoides, sendo o percentual de espermatozoides móveis, o teste mais utilizado para predizer a qualidade seminal (VERSTEGEN et al., 2002). A fertilidade *in vivo* de touros foi correlacionada, com os parâmetros de motilidade ($r=0,672$, $p=0,033$), velocidade linear ($r=0,636$, $p=0,048$), morfologia ($r=-0,762$, $p=0,010$), viabilidade ($r=0,635$, $p=0,048$) de amostras de sêmen congeladas após aquecimento (GILLAN et al., 2008). Também houve correlação, após seleção espermática por *swim-up*, entre a fertilidade e concentração ($r=0,649$, $p=0,042$) e morfologia ($r=-0,687$, $p=0,028$) espermática. Segundo esses autores, esses testes quando combinados produzem modelos fortemente correlacionados ($R(2)>0,9$) com a fertilidade.

2.5. Teste de termoresistência

O teste de termoresistência (TTR) foi proposto por Dimitropoulos (1967) para avaliação da fertilidade potencial de partidas de sêmen criopreservadas de touros. A prova consiste na incubação de uma amostra de sêmen à 38°C, em que após um período de 5 horas, se verifica a porcentagem de espermatozoides com motilidade progressiva. De acordo com Henry e Neves (1998), o sêmen bovino é de boa qualidade quando, depois de submetido ao TTR, apresenta pelo menos 15% de motilidade espermática progressiva e escore 3 (escala de 1 a 5) de vigor espermático. Nagy et al. (2004) relataram que imediatamente após a descongelação, apenas 3,45% dos espermatozoides apresentaram exocitose acrosomal. De acordo com esses autores, após incubação à 37°C por 4 horas, esse número aumentou significativamente para 67%.

A grande aceitação do TTR em bovinos decorreu de sua alta relação positiva e com a fertilidade a campo, confirmada pela taxa de prenhez aos 60 e 90 dias (DIMITROUPOLOS, 1967). Em contrapartida, Vianna et al., (2009) ao verificarem a eficiência de testes de termoresistência rápida (46°C por 30 min) e lenta (38°C por 5 h) na predição da fertilidade de sêmen congelado de touros, observaram uma baixa correlação destes testes com a fertilidade ($r=0,11$ e $0,14$, respectivamente). Assim, isoladamente, esses testes não são confiáveis para prever o comportamento *in vivo* do sêmen congelado de touros, tão pouco eficientes para estimar a fertilidade.

2.6. Seleção espermática

No trato reprodutivo da fêmea, os espermatozoides móveis migram rapidamente do local de deposição do sêmen em direção ao sítio de ligação na ampola do oviduto para realizar a fecundação. Durante esse processo, os espermatozoides penetram no muco viscoso secretado pelo epitélio uterino, sendo desta maneira removidos do plasma seminal, o qual contém espermatozoides imóveis, fatores decapacitantes e ERO originadas de debris celulares e espermatozoides mortos (MORRELL, 2006). Isso representa a maior barreira e pode ser mimetizada *in vitro* pelo teste de migração ascendente (*swim up*) para avaliar a qualidade espermática (VERBERCKMOES et al., 2002). Existem basicamente quatro abordagens para separação dos espermatozoides do meio de suspensão (plasma seminal ou diluidor): (1) diluição e lavagem (centrifugação e ressuspensão); (2) fracionamento seletivo de subpopulações (centrifugação em gradiente de densidade); (3) aderência (filtração diferencial em lã de vidro, esferas de vidro ou de polissacarídeos); e (4) métodos de migração (*Swim-up*)

(RODRÍGUES-MARTÍNEZ et al., 1997). Durante a separação dos espermatozoides saudáveis deseja-se obter espermatozoides com motilidade progressiva e linear típica, linearidade esta que é usada para superar as barreiras naturais como a cérvix, por onde eles migram através do muco rico em ácido siálico.

Explorando o fato de que os espermatozoides tem a tendência de migrar na maioria dos meios, ensaios como o *swim up* e *swim down*, colocam em contato amostras de sêmen em diferentes fluidos para mimetizar o que acontece *in vivo*. Essa técnica permitiu a seleção de espermatozoides com maiores taxas de motilidade e integridade de membrana, parâmetros essenciais para a fecundação (RODRIGUEZ-MARTINEZ et al., 1997). A utilização de métodos de seleção espermática tem se mostrado útil em prognóstico de fertilidade, uma vez que o número de espermatozoides viáveis após o *swim up* reflete a capacidade de fecundação inata da amostra de sêmen analisada (HALLAP et al., 2004).

A seleção espermática por fracionamento seletivo de subpopulações baseia-se no princípio de que, sob centrifugação em gradiente de densidade coloidal, os espermatozoides podem se mover para o gradiente correspondente a sua própria densidade. Os espermatozoides podem ser separados dos outros componentes do ejaculado, pois possuem diferente densidade que as células epiteliais, os leucócitos e os debris celulares (MORRELL, 2006). Entre os métodos de seleção espermática usando este princípio de centrifugação em gradiente de densidade, esta o gradiente descontínuo de Percoll, um meio comercial amplamente utilizado na produção *in vitro* (PIV) de embriões bovinos. De acordo com Avery e Greve (1995) a taxa de recuperação espermática obtida pelo Percoll é cinco a dez vezes maior que aquela obtida após o *swim up*. Segundo Tanghe et al., (2002), a seleção espermática em gradiente de Percoll é mais eficaz na recuperação de células móveis, principalmente, para o sêmen de touros de baixa fertilidade na PIV, quando comparados aos touros de alta fertilidade.

2.7. Sistema computadorizado de análise espermática (CASA)

Sistemas computadorizados de análise espermática (CASA; do inglês, *computer-assisted sperm analysis*) têm sido propostos e aplicados na tentativa de minimizar os efeitos da avaliação convencional do sêmen (YÁÑIZ et al., 2015). O CASA realiza a captura e a análise de sucessivas fotos dos espermatozoides, as quais, quando unidas, formam um filme com o trajeto de cada célula, permitindo deste modo a obtenção de informações mais precisas e acuradas do movimento de cada espermatozoide (AMANN e KARTZ, 2004). Os

espermatozoides são classificados quanto ao seu movimento em padrões definidos: móvel não progressivo, linear lento, linear rápido e imóvel (MORTIMER e MAXWELL, 1999). Para determinar esses padrões, são mensurados os seguintes parâmetros (MCKINNON et al., 2011; HOOD, 2016):

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

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

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

ALH: amplitude de deslocamento lateral de cabeça (μm). Corresponde à largura média da oscilação da cabeça do espermatozoide durante seu deslocamento. A mensuração desse parâmetro está relacionada com a capacidade de penetração na zona pelúcida do oócito-óvulo, assim a ALH é um dos parâmetros que tem efeito sobre a fecundação.

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

STR: retilinearidade (%). É a medida do afastamento médio da trajetória da célula espermática considerando-se uma linha reta. É calculada pela relação entre $(\text{VSL}/\text{VAP}) \times 100$. Estima a proximidade do percurso da célula a uma linha reta.

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

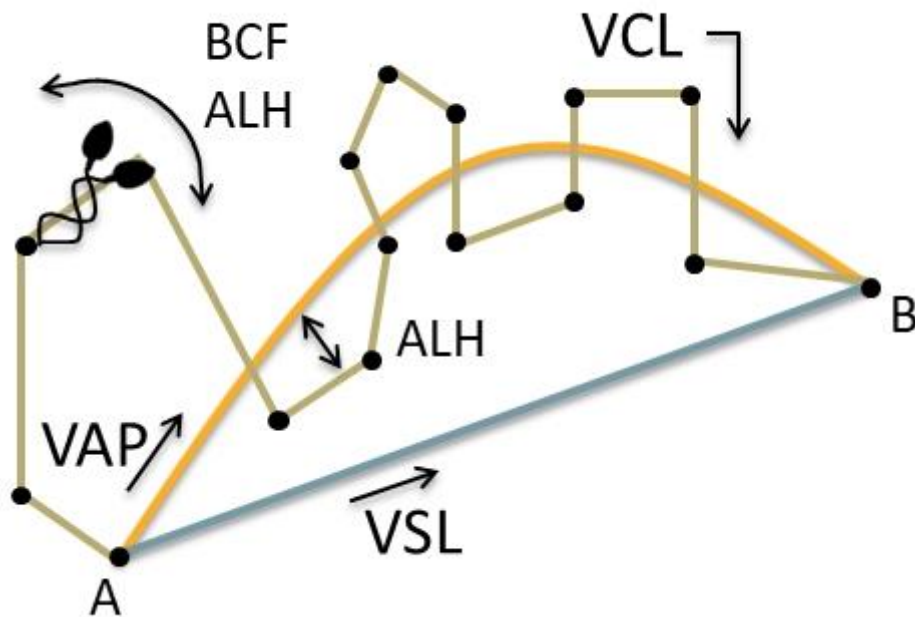


FIGURA 1 - Parâmetros de movimento obtidos pelo sistema computadorizado de análise espermática (CASA). VAP: velocidade de trajeto ($\mu\text{m/s}$); VSL: velocidade progressiva ($\mu\text{m/s}$); VCL: velocidade curvilínea ($\mu\text{m/s}$); ALH: amplitude de deslocamento lateral de cabeça (μm); BCF: frequência de batimentos do flagelo (Hz).

A avaliação *in vitro* da cinética espermática utilizando o CASA tem mostrado correlação entre os parâmetros de motilidade e fertilidade *in vivo* (BROEKHUIJSE et al., 2012). Farrell et al., (1998) demonstraram que a avaliação das combinações múltiplas de variáveis obtidas pelo CASA tem maior correlação com a fertilidade de touros do que a avaliação isolada desses parâmetros. Nesse sentido, a motilidade total foi fracamente correlacionada com a fertilidade, enquanto, a motilidade progressiva, a amplitude de movimento lateral da cabeça, o batimento flagelar e velocidade retilínea (VSL) foram fortemente correlacionados com a fertilidade. Por outro lado, Nagy et al., (2015) relataram que a velocidade de trajeto (VAP) é um importante parâmetro isolado preditivo de potencial de fertilidade de amostras de sêmen frescas e congeladas de touros.

3 OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Investigar a relação da qualidade do sêmen *in vitro* com a fertilidade *in vivo* de touros, através da correlação de dados de cinética espermática e de análises bioquímicas com as taxas de prenhez.

3.2. Objetivos específicos

Analisar parâmetros de cinética espermática e estresse oxidativo em amostras de sêmen de touros de alta e baixa fertilidade em quatro momentos diferentes: (1) imediatamente após aquecimento, (2) após teste de termoresistência, (3) após seleção espermática em gradiente Percoll, e (4) após seleção espermática seguida de teste de termoresistência.

4 ARTIGO CIENTÍFICO

Artigo científico é apresentado conforme as normas da revista científica internacional *Theriogenology*, na qual o manuscrito será submetido.

Correlation between *in vitro* sperm kinetic, oxidative stress assessments and field fertility following sperm selection of bull semen by discontinuous Percoll gradient

Lis S. Marques*, Daniele Missio, Cecilia U. M. Pavin, Karine Mattos, Francielli W. S. Cibir, Fabio G. Leivas, Daniela S. Brum.

Laboratório de Biotecnologia da Reprodução (BIOTECH), Curso de Medicina Veterinária, Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Universidade Federal do Pampa (UNIPAMPA), 97.500-970, Uruguaiana, RS, Brasil.

*Corresponding author: lismarx@gmail.com

Abstract

The present study assessed parameters of sperm kinetic and oxidative stress after post-thaw (PT), thermal-resistance test (TRT), sperm selection (SS) by discontinuous Percoll gradient, and SS + TRT in bulls of known fertility to identify useful indicators of field fertility. Frozen semen from six Aberdeen Angus bulls were classified as high (n=3) and low (n=3) fertility. Semen pool was evaluated for sperm kinetics (computer assisted sperm analysis; CASA), reactive oxygen species (ROS) production, lipid peroxidation, superoxide dismutase enzyme (SOD) activity, and ferric reducing antioxidant potential (FRAP). Sperm kinetic parameters: total motility (MTOT; $51.29 \pm 5.60\%$), progressive motile (MP; $36.12 \pm 5.56\%$) and beat cross-frequency (BCF; 8.11 ± 0.77 Hz) were significantly higher in low-fertility bulls when compared to high fertility ones. However, curvilinear velocity (VCL; 40.15 ± 7.92 $\mu\text{m/s}$) was greater in high fertility bulls after SS + TRT. Straight-line velocity (VSL; $r=-0.99$), average path velocity (VAP; $r=-0.99$), linearity (LIN; $r=-0.98$), and BCF ($r=-0.99$) were correlated to high fertility after SS + TRT. ROS showed correlation ($r=-0.98$) with fertility after SS. Besides there was a significant decrease of FRAP and ROS levels following SS in both low and high fertility bulls ($P \leq 0.05$), whereas a decrease of lipid peroxidation was observed only in high fertility bulls. The results showed no significant difference between low and high fertility bulls in lipid peroxidation. However, there was a correlation ($r=-0.99$) between lipid peroxidation and high fertility after PT and SS + TRT. High fertility bulls seem to be more susceptible to lipid peroxidation, and the reduction of lipid peroxidation only observed in high fertility ones suggests that their spermatozoa are able to repair the damage induced by oxidative stress. Information achieved from this study will help in developing assessment tools to identify useful indicators of *in vivo* fertility.

Keywords: bull spermatozoa; fertility prediction; sperm function; high fertility bulls.

1 Introduction

Birth of a calf is essential to generate breeding stock and animals to produce meat; hence, herd fertility directly affects the farmer profitability. It is known that bulls have different *in vitro* fertilization capacity [1, 2]; besides, there is the “bull effect”, a variable that influences field fertility [3]. In this context, prediction of male fertility offers a huge benefit for economic success of livestock due to the improvement on herd conception and pregnancy rates. Consequently, there is a great interest in finding a set of sperm features related to field fertility which could be used to predict the performance of a bull or its frozen semen in the field. Therefore, sires with potentially low fertility would be identified and removed instead of keeping them in a breeding program. In spite of many laboratory tests have been developed to assess sperm quality, no method has yet been able to explore all the sperm attributes that must be present in the semen sample to guarantee its real fertility [4]. In addition, the results of such sperm analyses performed *in vitro* do not always correlate with the field fertility of an insemination dose [5]. The relationship between oxidative stress on sperm and fertility has been studied *in vitro* as well as *in vivo*. Increased levels of reactive oxygen species (ROS) have been correlated to decreased motility parameters in bulls [6, 7, 8]; besides, it is widely known that ROS excess contributes to sperm DNA damage and lipid peroxidation which has harmful effects on male fertility [9, 3, 10]. However, the relationship between field fertility and oxidative stress assessments in bull sperm remains poorly understood.

Sperm selection is a term use to describe techniques to separate seminal plasma, diluents and cryoprotectants from spermatozoa. Sperm selection also separates live from dead spermatozoa, avoiding deleterious effects and improving the chances of *in vitro* fertilization (IVF) success [11]. Selection by Percoll density gradient centrifugation is widely used in bovine IVF laboratories. Moreover, Percoll discontinuous gradient increases the percentage of total and progressive sperm motility, beat frequency, rectilinear motility, linearity and rapidly moving cells [12]. In addition, Percoll selection enhances the percentage of cells with normal morphology [13], intact plasma membrane and mitochondrial membrane potential [12]. Studies have been assessing the relationship between post-thaw sperm parameters and fertility [14, 15, 16, 17, 18, 11]; however, few researchers investigated the relationship between field fertility and semen parameters after sperm selection [14, 19, 20].

In this framework, the purpose of the present study was to assess parameters of sperm kinetic and oxidative stress after post-thaw (PT) or after sperm selection (SS) by

discontinuous Percoll gradient in bulls of known fertility to identify useful indicators of *in vivo* fertility.

2 Materials and Methods

2.1. Chemicals

All chemical reagents used for this experiment were purchased from Sigma Chemical Company (St. Louis, MO, USA), unless otherwise stated.

2.2. Experimental Design

Commercial frozen semen doses were obtained from six Aberdeen Angus bulls (CRV Lagoa, São Paulo, Brazil). Three of the bulls were classified as high fertility and three as low (three replicates) according to IFert™ index provided by international breeding company CRV Lagoa. IFert™ is a fertility index value obtained by statistical evaluation, able to predict the fertility potential of beef cattle used in programs of artificial insemination (AI) at fixed time. The IFert™ database contains more than 143,000 inseminations, comprising 462 breeding bulls. Straws (0.25 mL) from three different batches of each bull were thawed for 30 s at 35°C in a water bath and pooled to reduce the batch variability. Semen pool was distributed in four groups to be evaluated: post-thaw (PT) group; thermal-resistance test (TRT) group; sperm selection group (SS); and SS + TRT group. Samples were evaluated for sperm kinetics (CASA), reactive oxygen species (ROS) production, lipid peroxidation, superoxide dismutase enzyme (SOD) activity and total antioxidant capacity (Figure 1).

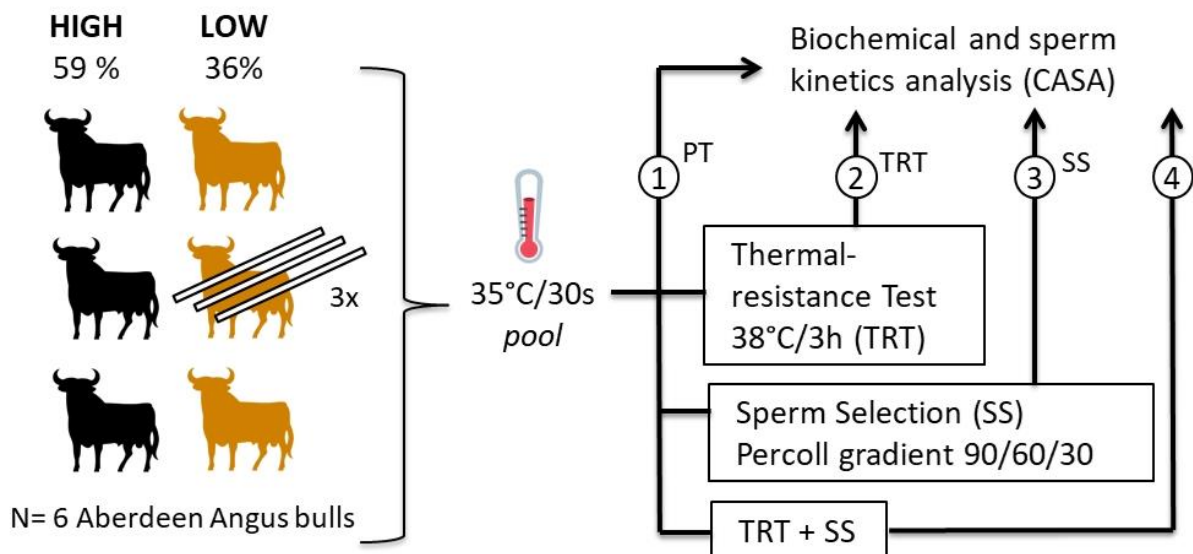


Figure 1. Experimental design

2.3. Percoll gradient

An isotonic Percoll solution was used for the preparation of 90, 60 and 30% solutions with modified Talp-Fert media [21]. The Percoll density gradient was performed by layering of 300 μ L of each solution into a 1.5 mL microtube, starting with the 90% Percoll solution in the bottom of the tube. On the top of the gradient, 300 μ L of thawed semen was layered, and the tubes were centrifuged for 5 min at $2200 \times g$ [22]. Then, the resultant pellet was re-suspended with 300 μ L of sp-TALP and centrifuged again for 1 min at $2200 \times g$. After centrifugation, the sperm samples were used to analyze the sperm kinetics, reactive oxygen species production, lipid peroxidation, superoxide dismutase enzyme activity and total antioxidant capacity.

2.4. Sperm thermal-resistance test (TRT)

The thermal-resistance test (TRT) was carried out to verify longevity of sperm from bulls with low and high fertility. Before and after sperm selection by Percoll gradient, an aliquot of 100 μ L of semen was put into a warmed microcentrifuge tube, which remained incubated at 36°C. After 180 min of incubation (3 h) the following parameters were assessed: sperm kinetics, reactive oxygen species production, lipid peroxidation, superoxide dismutase enzyme activity and total antioxidant capacity.

2.5. Sperm quality parameters assessment

2.5.1. Assessment of sperm kinetics

Sperm kinetics was evaluated by the Computer Assisted Semen Analysis (CASA) system fitted with the Sperm Class Analyzer (SCA) software (Version 5.1; Microptic, Barcelona, Spain). The following parameters were analyzed: the percentage of total motile sperm (MTOT; %), the percentage of progressive motile sperm (MP; %), curvilinear velocity (VCL, μ m/s; the average velocity measured over the actual point to point track followed by the cell), straight-line velocity (VSL, μ m/s; the average velocity measured in a straight line from the beginning to the end of the track), average path velocity (VAP, μ m/s; the average velocity of the smoothed cell path), linearity (LIN, %; the average value of the ratio VSL/VCL), straightness (STR), wobble (WOB = $(VAP/VCL \times 100, \%)$; a measure of the oscillation of the actual trajectory about its spatial average path), amplitude of lateral head displacement (ALH, μ m; the mean width of the head oscillation as the sperm cells swim), beat cross-frequency

(BCF, Hz; the frequency of sperm head crossing the average path in either direction), and hyperactivity (HYP; % of sperm with VCL>35 $\mu\text{m/s}$, ALH>2.5 μm and STR>85 $\mu\text{m/s}$).

2.5.2. Assessment of production of reactive oxygen species

Reactive oxygen species (ROS) levels were measured by a spectrofluorimetric method [23] where the sperm was incubated in Tris-HCl in the presence of 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCHF-DA) for 60 min at 37°C in the dark. This dye is a fluorogenic probe commonly used to detect cellular ROS production. DCHF-DA is a stable, cell-permeable non-fluorescent probe. It is de-esterified intracellularly and becomes the highly fluorescent 2',7'-dichlorofluorescein (DCF) upon oxidation. The oxidation of DCHF-DA to fluorescent dichlorofluorescein was used to detect and measure the intracellular ROS. The DCF fluorescence intensity emission was recorded at 520 nm (with 480 nm excitation) using a Shimadzu spectrofluorometer (model RF5301PC, Japan). ROS levels were expressed as arbitrary units of fluorescence (UF).

2.5.3. Assessment of lipid peroxidation

Lipid peroxidation was performed by the formation of thiobarbituric-acid-reactive substances (TBARS) during an acid-heating reaction as previously described by Ohkawa et al. [24]. An aliquot of spermatozoa was incubated at 95°C for 2 h. The absorbance was read at 532 nm (Hidex Plate Chameleon V Multitechnology Platerreader, model 425–156). The data were expressed as nmol malondialdehyde (MDA)/mg protein.

2.5.4. Determination of superoxide dismutase (SOD) activity

Superoxide dismutase activity was measured as described by Misra and Fridovic [25]. This method is based on the ability of SOD to inhibit the auto-oxidation of epinephrine to adrenochrome. The color reaction can be monitored at 480 nm. One enzymatic unit (1 IU) is defined as the amount of enzyme necessary to inhibit the epinephrine auto-oxidation rate by 50% at 26°C.

2.5.5. Ferric reducing antioxidant potential (FRAP)

Total antioxidant capacity in the sperm was measured using the FRAP assay with slight modifications [26]. Antioxidant capacity was determined as the “ferric reducing antioxidant potential”, where the antioxidants present in sample were evaluated as reducers of Fe^{+3} to Fe^{+2} , which is chelated by 2,4,6-Tri-(2-pyridyl)-s-triazine (TPTZ) to form the complex Fe^{+2} .

TPTZ, evaluated using the maximal absorption at 593 nm. An ascorbic acid standard curve was performed, and the results are expressed as the equivalent to micrograms of ascorbic acid.

2.6. Statistical analysis

All statistical analyses were performed using SAS (Statistical Analysis System) version 9.4 (SAS Institute Inc). Normality and variance homogeneity were previously examined by Shapiro-Wilk and Levene's test, respectively. Statistical analysis was performed using litter-based values by one-way analysis of variance (ANOVA) with Student's t-test. One way ANOVA followed by Tukey's test was used to identify significant differences among the four groups (PT, TRT, SS and TRT + SS). Means were considered significantly different when $P \leq 0.05$. Data were correlated with pregnancy rates of corresponding bulls (Pearson correlation). All results are reported as the mean $\pm$ standard error (SEM).

3 Results

High fertility bulls had a significantly higher pregnancy rate (59.08 ± 7.10) than low fertility bulls (35.61 ± 6.36 ; $P < 0.01$; Figure 1). The results of different sperm kinetic parameters (mean $\pm$ SEM) for high and low fertile bulls are presented in Figure 1. Sperm kinetic parameters MP ($36.12 \pm 5.56\%$; $P = 0.05$), BCF (8.11 ± 0.77 hz, $P = 0.01$), and MTOT ($51.29 \pm 5.60\%$; $P = 0.03$) were significantly higher in low-fertility bulls after TRT, SS and SS + TRT, respectively. VCL (40.15 ± 7.92 $\mu\text{m/s}$; $P = 0.03$) was greater in high-fertility bulls after SS + TRT.

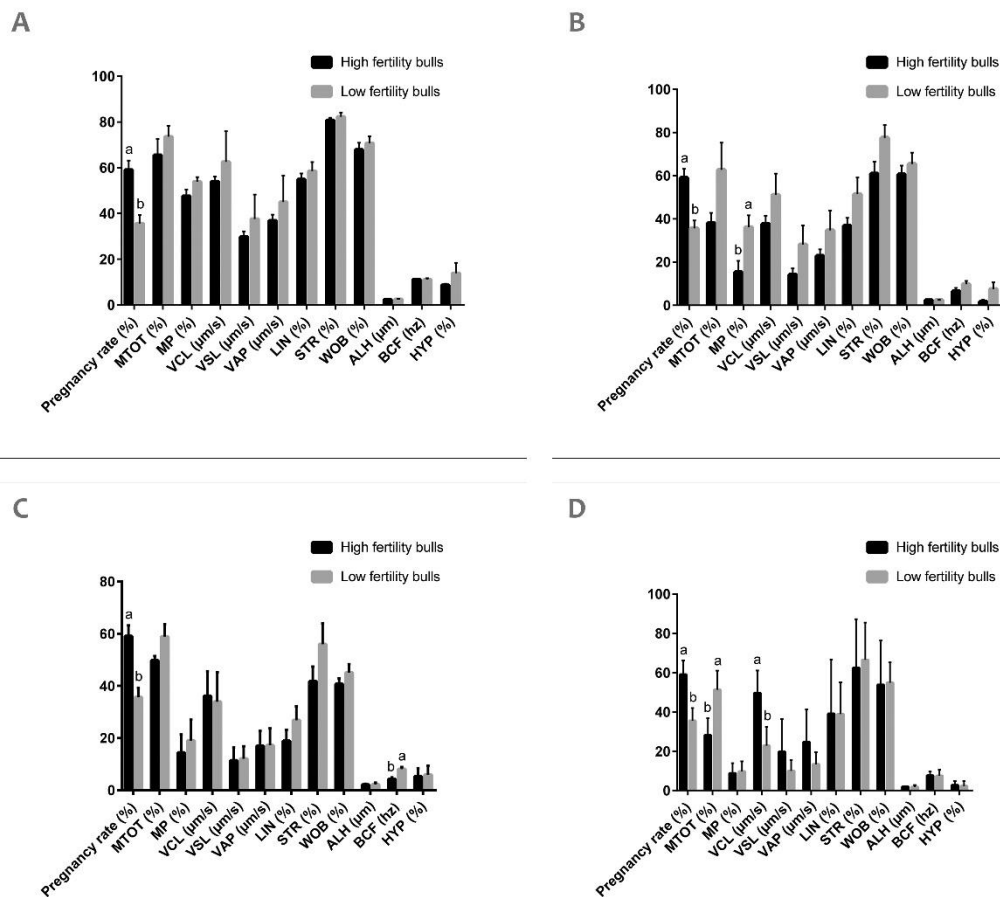


Figure 2. Sperm kinetics evaluated by the Computer Assisted Semen Analysis (CASA) of six Aberdeen Angus bulls. A. post-thaw (PT); B. thermal-resistance test (TRT); C. sperm selection (SS); D. SS + TRT. MTOT = total motility; MP= progressive motile; VCL= curvilinear velocity; VSL= straight-line velocity; VAP= average path velocity; LIN= linearity; STR = straightness; WOB= wobble; ALH= amplitude of lateral head displacement; BCF= beat cross-frequency; HYP = hyperactive cells. a,b Different letters in the columns indicate statistical difference ($P < 0.05$) by Student's t-test between high ($n=3$) and low ($n=3$) fertility bulls.

SOD activity was significant lower in high fertility bulls (35.66 ± 8.22) immediately after thawing (PT) when compare to low fertility bulls (62.64 ± 5.43 ; $P=0.05$; Figure 2.A). ROS levels showed a significant difference between high (10.87 ± 0.75) and low (16.08 ± 2.22) fertility bulls after SS + TRT ($P < 0.05$; Figure 2.C). Figure 2 also shows a significant decrease of ROS and FRAP after spermiatic selection in both low and high fertility bulls ($P \leq 0.05$), whereas a decrease of TBARS was observed only in high fertility bulls.

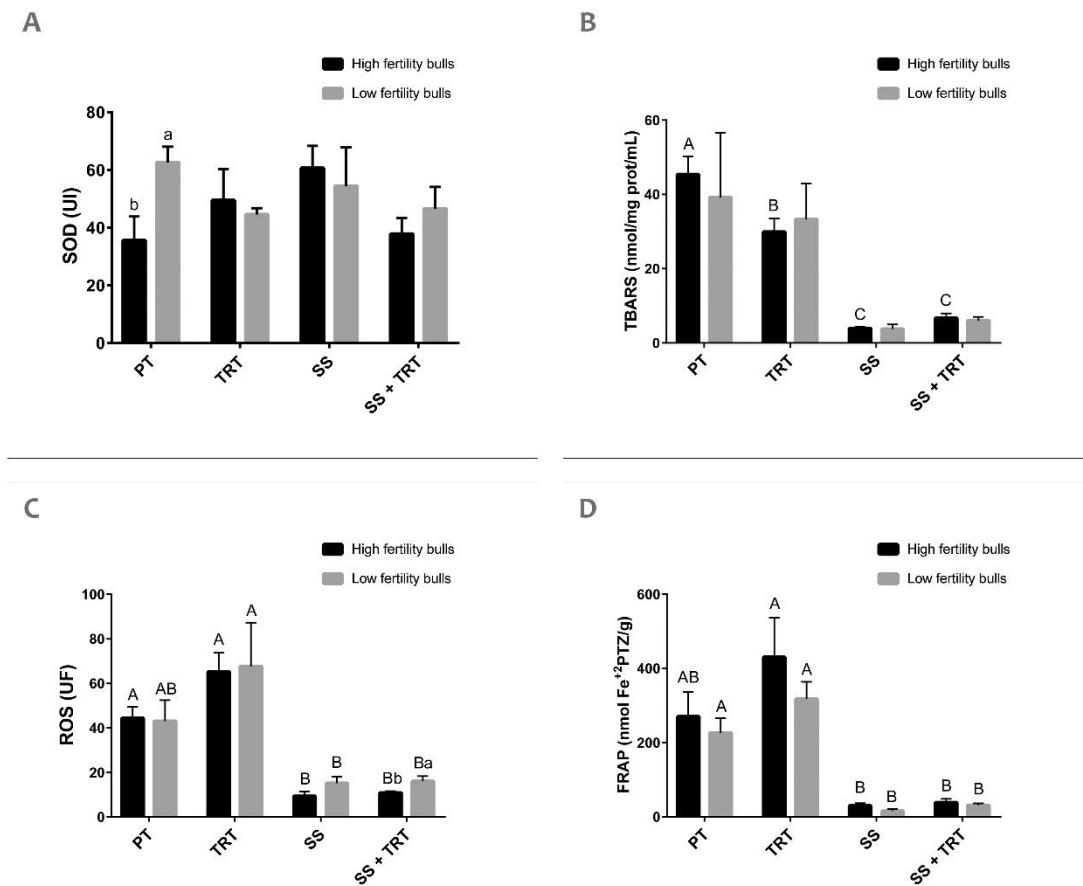


Figure 3. A. Superoxide dismutase (SOD) activity; B. Thiobarbituric acid reactive substances (TBARS); C. Reactive oxygen species (ROS); D. Ferric reducing antioxidant potential (FRAP). ^{a,b} Different lowercase letters in the columns indicate statistical difference ($P < 0.05$) by Student's t-test between high ($n=3$) and low ($n=3$) fertility bulls. ^{A, B, C} Different capital letters in the columns indicate statistical difference among post-thaw (PT), thermal-resistance test (TRT), sperm selection (SS) and TRT + SS groups ($P \leq 0.05$; ANOVA followed by Tukey's test).

The correlation between field fertility and different sperm kinetic parameters after thawing (PT group) is given in Table 1. The relationship of LIN kinetic parameter ($r=0.99$; $P=0.03$) with high fertility was positive and significant.

Table 1. Correlation between fertility index and *in vitro* sperm kinetic parameters following thawing (post-thaw group; PT).

Parameter	High fertility bulls (n=3)			Low fertility bulls (n=3)		
	Mean $\pm$ SEM	Correlation Coefficient r	P-value	Mean $\pm$ SEM	Correlation Coefficient r	P-value
Pregnancy rate (%)	59.08 $\pm$ 7.10	-	-	35.61 $\pm$ 6.36	-	-
MTOT (%)	65.50 $\pm$ 7.14	NS	NS	73.57 $\pm$ 4.84	NS	NS
MP (%)	47.61 $\pm$ 2.90	NS	NS	53.96 $\pm$ 1.95	NS	NS
VCL (μ m/s)	54.01 $\pm$ 2.18	NS	NS	62.54 $\pm$ 13.63	NS	NS

VSL ($\mu\text{m/s}$)	29.77 $\pm$ 2.38	NS	NS	37.58 $\pm$ 10.70	NS	NS
VAP ($\mu\text{m/s}$)	36.81 $\pm$ 2.64	NS	NS	45.02 $\pm$ 11.60	NS	NS
LIN (%)	54.92 $\pm$ 2.63	0.99	0.03*	58.58 $\pm$ 3.91	NS	NS
STR (%)	80.75 $\pm$ 1.15	NS	NS	82.29 $\pm$ 1.86	NS	NS
WOB (%)	67.95 $\pm$ 2.98	NS	NS	70.80 $\pm$ 2.98	NS	NS
ALH (μm)	2.30 $\pm$ 0.08	NS	NS	2.47 $\pm$ 0.16	NS	NS
BCF (hz)	11.11 $\pm$ 0.40	NS	NS	11.09 $\pm$ 0.54	NS	NS
HYP (%)	8.64 $\pm$ 0.63	NS	NS	13.83 $\pm$ 4.57	NS	NS

MTOT = total motility; MP= progressive motile; VCL= curvilinear velocity; VSL= straight-line velocity; VAP= average path velocity; LIN= linearity; STR = straightness; WOB= wobble; ALH= amplitude of lateral head displacement; BCF= beat cross-frequency; HYP = hyperactive cells. Three replicates (straws) were assessed from each of three ejaculates for each bull; All parameters were correlated back to individual pregnancy rates; NS = non-significant. *($P \leq 0.05$).

Correlations between field fertility and *in vitro* oxidative stress assessments after thawing (PT group) are given in Table 2. TBARS ($r=-0.99$; $P=0.05$) and FRAP ($r=-0.99$; $P=0.06$) showed negative correlation with fertility.

Table 2. Correlation between field fertility index and *in vitro* oxidative stress assessments following thawing (post-thaw group; PT).

Parameter	High fertility bulls			Low fertility bulls		
	Mean $\pm$ SEM	Correlation Coefficient r	P-value	Mean $\pm$ SEM	Correlation Coefficient r	P-value
Pregnancy rate	59.08 $\pm$ 7.10	-	-	35.61 $\pm$ 6.36	-	-
SOD	35.66 $\pm$ 8.22	NS	NS	62.64 $\pm$ 5.43	NS	NS
TBARS	45.39 $\pm$ 4.87	-0.99	0.05*	39.23 $\pm$ 17.42	NS	NS
ROS	44.39 $\pm$ 5.11	NS	NS	42.99 $\pm$ 9.49	NS	NS
FRAP	270.05 $\pm$ 67.04	-0.99	0.06**	226.42 $\pm$ 39.95	NS	NS

Reactive oxygen species (ROS); Ferric reducing antioxidant potential (FRAP); Superoxide dismutase (SOD) activity; Thiobarbituric acid reactive substances (TBARS). Three replicates (straws) were assessed from each of three ejaculates for each bull; All parameters were correlated back to individual pregnancy rates; NS = non-significant. *($P \leq 0.05$), **($P \leq 0.10$).

After TRT, there was a positive correlation between WOB ($r=0.99$; $P=0.05$, Table 3) and high fertility, whereas LIN ($r=0.99$; $P=0.08$), STR ($r=1.00$; $P<0.01$), and ALH ($r=0.99$; $P=0.02$) showed a positive correlation with low fertility.

Table 3. Correlation between field fertility index and *in vitro* sperm kinetic parameters following thermal-resistance test (TRT group).

Parameter	High fertility bulls			Low fertility bulls		
	Mean $\pm$ SEM	Correlation Coefficient r	P-value	Mean $\pm$ SEM	Correlation Coefficient r	P-value
Pregnancy rate (%)	59.08 $\pm$ 7.10	-	-	35.61 $\pm$ 6.36	-	-
MTOT (%)	38.08 $\pm$ 4.72	NS	NS	62.73 $\pm$ 12.57	NS	NS
MP (%)	15.31 $\pm$ 5.28	NS	NS	36.12 $\pm$ 5.56	NS	NS

VCL (µm/s)	37.69±3.81	NS	NS	51.12±9.89	NS	NS
VSL (µm/s)	14.14±2.91	NS	NS	28.13±8.85	NS	NS
VAP (µm/s)	22.90±3.04	NS	NS	34.74±9.10	NS	NS
LIN (%)	36.82±3.67	NS	NS	51.46±7.69	0.99	0.08**
STR (%)	60.96±5.56	NS	NS	77.55±5.95	1.00	<0.01*
WOB (%)	60.64±4.03	0.99	0.05*	65.49±5.21	NS	NS
ALH (µm)	2.27±0.22	NS	NS	2.38±0.10	0.99	0.02*
BCF (hz)	6.51±1.52	NS	NS	9.74±1.53	NS	NS
HYP (%)	1.64±1.00	NS	NS	7.47±3.11	NS	NS

MTOT = total motility; MP= progressive motile; VCL= curvilinear velocity; VSL= straight-line velocity; VAP= average path velocity; LIN= linearity; STR = straightness; WOB= wobble; ALH= amplitude of lateral head displacement; BCF= beat cross-frequency; HYP = hyperactive cells. Three replicates (straws) were assessed from each of three ejaculates for each bull; All parameters were correlated back to individual pregnancy rates; NS = non-significant. *($P \leq 0.05$) **($P \leq 0.10$).

Table 4 shows a negative correlation between high fertility and oxidative stress parameter ROS ($r=-0.99$; $P=0.05$) and FRAP ($r=-0.99$; $P=0.06$) after TRT.

Table 4. Correlation between field fertility index and *in vitro* oxidative stress assessments following thermal-resistance test (TRT group).

Parameter	High fertility bulls			Low fertility bulls		
	Mean ± SEM	Correlation Coefficient r	P-value	Mean ± SEM	Correlation Coefficient r	P-value
Pregnancy rate	59.08±7.10	-	-	35.61±6.36	-	-
SOD	49.51±10.83	NS	NS	44.59±2.21	NS	NS
TBARS	29.93±3.53	NS	NS	33.34±9.60	NS	NS
ROS	65.24±8.45	-0.99	0.05*	67.68±19.58	NS	NS
FRAP	430.80±105.77	-0.99	0.06**	317.85±46.20	NS	NS

Reactive oxygen species (ROS); Ferric reducing antioxidant potential (FRAP); Superoxide dismutase (SOD) activity; Thiobarbituric acid reactive substances (TBARS). Three replicates (straws) were assessed from each of three ejaculates for each bull; All parameters were correlated back to individual pregnancy rates; NS = non-significant. *($P \leq 0.05$), **($P \leq 0.10$).

After SS by the discontinuous Percoll gradient no correlation was observed between field fertility index and sperm kinetic parameters (Table 5).

Table 5. Correlation between field fertility index and *in vitro* sperm kinetic parameters following spermatoc selection (SS group) by the discontinuous Percoll gradient.

Parameter	High fertility bulls			Low fertility bulls		
	Mean ± SEM	Correlation Coefficient r	P-value	Mean ± SEM	Correlation Coefficient r	P-value
Pregnancy rate (%)	59.08±7.10	-	-	35.61±6.36	-	-

MTOT (%)	49.76±3.01	NS	NS	58.89±8.29	NS	NS
MP (%)	14.39±12.19	NS	NS	19.04±13.88	NS	NS
VCL (µm/s)	36.11±16.52	NS	NS	33.90±19.69	NS	NS
VSL (µm/s)	11.35±8.88	NS	NS	12.06±8.39	NS	NS
VAP (µm/s)	17.01±9.96	NS	NS	17.25±11.25	NS	NS
LIN (%)	18.88±7.44	NS	NS	26.85±9.23	NS	NS
STR (%)	41.76±9.84	NS	NS	56.02±13.82	NS	NS
WOB (%)	40.70±3.89	NS	NS	45.10±5.63	NS	NS
ALH (µm)	2.15±0.59	NS	NS	2.24±1.22	NS	NS
BCF (hz)	4.29±1.08	NS	NS	8.11±1.32	NS	NS
HYP (%)	5.32±.43	NS	NS	5.93±6.05	NS	NS

MTOT = total motility; MP= progressive motile; VCL= curvilinear velocity; VSL= straight-line velocity; VAP= average path velocity; LIN= linearity; STR = straightness; WOB= wobble; ALH= amplitude of lateral head displacement; BCF= beat cross-frequency; HYP = hyperactive cells. Three replicates (straws) were assessed from each of three ejaculates for each bull; All parameters were correlated back to individual pregnancy rates; NS = non-significant.

Table 6 shows negative correlation coefficients between high fertility and oxidative stress parameters SOD ($r=-0.99$; $P=0.06$) and ROS ($r=-0.98$; $P=0.09$) after SS by the discontinuous Percoll gradient.

Table 6. Correlation between field fertility index and *in vitro* oxidative stress assessments following spermatic selection (SS group) by the discontinuous Percoll gradient.

Parameter	High fertility bulls			Low fertility bulls		
	Mean ± SEM	Correlation Coefficient r	P-value	Mean ± SEM	Correlation Coefficient r	P-value
Pregnancy rate	59.08±7.10	-	-	35.61±6.36	-	-
SOD	60.70±7.68	-0.99	0.06**	54.40±13.45	NS	NS
TBARS	3.98±0.37	NS	NS	3.80±1.17	NS	NS
ROS	9.37±2.07	-0.98	0.09**	15.18±2.87	NS	NS
FRAP	30.29±6.70	NS	NS	15.89±5.24	NS	NS

Reactive oxygen species (ROS); Ferric reducing antioxidant potential (FRAP); Superoxide dismutase (SOD) activity; Thiobarbituric acid reactive substances (TBARS). Three replicates (straws) were assessed from each of three ejaculates for each bull; All parameters were correlated back to individual pregnancy rates; NS = non-significant. *($P \leq 0.05$), **($P \leq 0.10$).

Table 7 shows negative correlation between high fertility and sperm kinetic parameters VSL ($r=-0.99$; $P=0.06$), VAP ($r=-0.99$; $P=0.07$), LIN ($r=-0.98$; $P=0.09$) and BCF ($r=-0.99$; $P=0.08$) after SS + TRT.

Table 7. Correlation between field fertility index and *in vitro* sperm kinetic parameters following spermatic selection by the discontinuous Percoll gradient and thermo-resistance test (TRT).

Parameter	High fertility bulls			Low fertility bulls		
	Mean ± SEM	Correlation Coefficient r	P-value	Mean ± SEM	Correlation Coefficient r	P-value

		Coefficient t r			Coefficient nt r	
Pregnancy rate (%)	59.08±7.10	-	-	35.61±6.35	-	-
MTOT (%)	28.09±8.73	NS	NS	51.29±9.69	NS	NS
MP (%)	8.80±5.11	NS	NS	9.70±5.13	NS	NS
VCL (µm/s)	49.69±11.42	NS	NS	22.80±9.52	NS	NS
VSL (µm/s)	19.80±16.67	-0.99	0.06**	10.04±5.47	0.99	0.05**
VAP (µm/s)	24.71±16.62	-0.99	0.07**	13.36±6.15	NS	NS
LIN (%)	39.11±27.51	-0.98	0.09**	38.94±16.10	NS	NS
STR (%)	62.43±24.86	NS	NS	66.48±19.05	NS	NS
WOB (%)	53.81±22.52	NS	NS	54.87±10.33	NS	NS
ALH (µm)	1.93±0.33	NS	NS	1.82±1.00	NS	NS
BCF (hz)	7.68±1.98	-0.99	0.08*	7.49±3.06	NS	NS
HYP (%)	2.78±1.95	NS	NS	2.29±2.53	NS	NS

MTOT = total motility; MP= progressive motile; VCL= curvilinear velocity; VSL= straight-line velocity; VAP= average path velocity; LIN= linearity; STR = straightness; WOB= wobble; ALH= amplitude of lateral head displacement; BCF= beat cross-frequency; HYP = hyperactive cells. Three replicates (straws) were assessed from each of three ejaculates for each bull; All parameters were correlated back to individual pregnancy rates; NS = non-significant. *($P \leq 0.05$), **($P \leq 0.10$).

After SS + TRT, there was a negative correlation between TBARS ($r=-0.99$; $P=0.06$) and high fertility (Table 8).

Table 8. Correlation between field fertility index and *in vitro* oxidative stress assessments following spermatic selection by the discontinuous Percoll gradient and thermo-resistance test (TRT).

Parameter	High fertility bulls			Low fertility bulls		
	Mean ± SEM	Correlation Coefficient r	P-value	Mean ± SEM	Correlation Coefficient r	P-value
Pregnancy rate	59.08±7.10	-	-	35.61±6,36	-	-
SOD	37.86±5.51	NS	NS	46.61±7.52	NS	NS
TBARS	6.76±1.19	-0.99	0.06**	6.09±0.91	NS	NS
ROS	10.87±0.75	NS	NS	16.08±2.22	NS	NS
FRAP	39.00±9.54	NS	NS	31.94±4.61	NS	NS

Reactive oxygen species (ROS); Ferric reducing antioxidant potential (FRAP); Superoxide dismutase (SOD) activity; Thiobarbituric acid reactive substances (TBARS). Three replicates (straws) were assessed from each of three ejaculates for each bull; All parameters were correlated back to individual pregnancy rates; NS = non-significant. *($P \leq 0.05$), **($P \leq 0.10$).

4 Discussion

In order to identify the suitable parameters and provide a reliable prediction of fertility, we assess the correlation between *in vitro* sperm kinetic, oxidative stress assessments and field fertility. In the present study, eleven kinetic parameters were measured by CASA (MTOT, MP, VCL, VSL, VAP, LIN, STR, WOB, ALH, BCF and HYP). *In vitro* assess of sperm kinetics using CASA has shown a correlation between motility parameters and *in vivo* fertility [27, 28]. However, our results showed higher MTOT, MP and BCF values in low fertility bulls when compared to high fertility bulls. In spite of motility being the most commonly used parameter in routine assessments performed in AI centers, its correlation with fertility is not universally accepted. The literature reports conflicting data concerning the association between fertility and motility [29, 20]. According to Allouche et al. [20], excessive motility may be an unfavorable fertility trait, because sperm would advance rapidly through the oviduct before ovulation, and could not reach and fertilize a successful oocyte. Likewise, BCF and LIN parameters have shown a positive correlation with the pregnancy rate in some studies, yet negative in others [27]. On the other hand, in our study, VCL parameter was greater in high fertility bulls after SS + TRT. High values of VSL, VCL, and VAP have been correlated with higher fertility [30, 31]. However, these velocity parameters should not be individually related to fertility. According to Farrell et al. [29] the following combinations of parameters had the highest correlation values: ALH, BCF, LIN, VAP, VSL ($r=0.98$); BCF, LIN, VSL, VCL, STR ($r=0.97$); BCF, LIN, VAP, VSL, STR ($r=0.97$); and VSL, VAP, VCL, LIN, BCF ($r=0.97$). In our results, a similar combination of sperm kinetic parameters (VSL, VAP, LIN, and BCF) was correlated to high fertility after SS + TRT. Sperm selection by density gradient centrifugation separates spermatozoa according to their density and favors the isolation of motile. Hence, Percoll selection improves sperm motility as well as other parameters such as VCL, VSL, VAP and LIN [32]. Viana et al. [33] evaluated the efficiency of rapid (46°C for 30 min) and slow (38°C for 5 h) TRT test in the prediction of frozen semen fertility. These authors reported a low correlation between rapid ($r=0.11$) or slow ($r=0.14$) TRT test with fertility. Thus, TRT tests, when used alone, are not reliable for estimating *in vivo* fertility. However, according to results obtained in our study, the sperm selection followed by TRT test could be efficient to predict bull fertility.

Spermatozoa is capable of generating and degrading ROS, which at low and controlled concentrations are necessary for specific sperm functions, such as hyperactivation,

capacitation, and acrosome reaction [34]. However, oxidative stress is known to be an important factor that contributes to male infertility [7]. For this reason, in the present study, four parameters associated to oxidative stress were evaluated (ROS, SOD, FRAP and lipid peroxidation by TBARS) after PT, TRT, SS and SS + TRT. Our results showed no significant difference between low and high fertility bulls in lipid peroxidation. However, there was a negative correlation between lipid peroxidation and high fertility following thawing (PT group) and SS + TRT. Sperm has high levels of polyunsaturated fatty acids in its membrane, making it susceptible to oxygen-induced damage and, consequently, lipid peroxidation [35]. A quick loss of ATP, due to lipid peroxidation, leads to axonal damage, decreased viability, and mid-piece morphological defects, which contribute to decrease sperm motility [7, 36]. In this sense, high fertility bulls seem to be more susceptible to lipid peroxidation than low fertility bulls, since high fertility bulls showed lower motility and negative correlation between fertility and lipid peroxidation.

SOD is one of the main enzymes involved in detoxification of ROS in mammalian spermatozoa, and its activity differs among species. SOD spontaneously dismutase superoxide anion to form oxygen and hydrogen peroxide, protecting mature spermatozoa against excessive superoxide anion accumulation [37]. In our results, SOD activity in spermatozoa was significantly lower in high fertility bulls after thawing (PT) when compared to low fertility bulls. A comparative study monitoring the activities of some antioxidant enzymes in cattle and buffalo bull sperm reported that the SOD activity declined successively in spermatozoa and increased in the seminal plasma during storage at refrigeration temperature over a period of 72 h [38]. According to these authors, decreased activity of SOD in spermatozoa could be related to the leakage of intracellular enzyme to seminal plasma as a result of sperm membrane damage due to lipid peroxidation, thereby, leading to successive increase of SOD activity in the seminal plasma. Similar results are reported in boars [39] and fowls [40], where SOD activity during storage decreases in spermatozoa and increases in seminal plasma. In this sense, it is probable that the bulls of high fertility in our study could have higher SOD activity in the seminal plasma than in spermatozoa. In addition, mature spermatozoa have little capacity for repairing oxidative damage because their cytoplasm contains low concentrations of antioxidants [41]. Probably for these reason there was no significant difference between low and high fertility bulls in total antioxidant capacity measured in spermatozoa. Seminal plasma is endowed with many enzymatic and nonenzymatic antioxidants which protect the spermatozoa against oxidative stress [42].

Therefore, further studies that would include measurement of SOD activity and FRAP levels of seminal plasma are needed to confirm the prediction mentioned above.

Sperm selection in IVF is extremely important in order to provide a healthy embryo. However, sperm selection procedure results in high levels of ROS production [43], predisposing the cells to irreversible damage that could reduce sperm motility. Seminal plasma contains a number of antioxidant systems that act as free radical scavengers to protect spermatozoa against oxidative stress. In contrast, spermatozoa possess a low amount of cellular ROS defense system [44]. Therefore, after Percoll centrifugation, the spermatozoa have little capacity for repairing oxidative damage [6]. In the present study, ROS showed negative correlation with fertility after SS. On the other hand, there was a significant decrease of FRAP and ROS levels following spermatoc selection in both low and high fertility bulls, whereas a decrease of TBARS was observed only in high fertility bulls after SS. Arias et al. [43] reported that ROS levels were higher in the spermatozoa separated by Percoll when compared with BoviPure or Swim-up. However, the mentioned authors used different Percoll gradients (45 and 90%) and centrifugation force (700 g for 15 min) from the ones used in the present study. The sperm selection protocol chosen for our study was the best result obtained in a previous study, where the effect of different forces (9000×g, 6500×g, 4500×g and 2200×g) in bovine sperm separation by discontinuous Percoll gradients (30, 60 and 90%) were assessed on the efficiency of IVF [22]. These authors demonstrated that although centrifugation at 2200×g showed high ROS levels, sperm penetration and fertilization rates enhanced without reducing sperm recovery. In the present study, the reduction of lipid peroxidation only observed in high fertility bulls suggests that high fertility bull spermatozoa are able to prevent the damage induced by oxidative stress.

The present study demonstrated that some sperm kinetic and oxidative stress parameters correlate with bull field fertility. Our results highlight that the assessment of a combination of *in vitro* sperm kinetic parameters could predict *in vivo* fertility more accurately than the assessment of an individual kinetic parameter. Our data also indicates that lipid peroxidation of spermatozoa is an important indicator of fertility in bulls. Besides, sperm separation using discontinuous Percoll density gradient enhances the parameters of oxidative stress for high and low fertility bulls. This paper shares findings that will help to develop assessment tools to identify useful indicators of *in vivo* fertility. On the other hand, it is known that the cryopreservation of spermatozoa may induce cellular damage and cause cells to lose their antioxidant defense

systems. Thus, further studies are required to assess the relationship between field fertility and oxidative stress in fresh sperm instead of frozen sperm.

Acknowledgements

The authors are grateful to CRV Lagoa company for providing the sperm samples.

References

- [1] Hillery FL, Parrish JJ, First NL. Bull specific effect on fertilization and embryo development in vitro. *Theriogenology* 1990;33:249. doi:10.1016/0093-691X(90)90673-H.
- [2] Palma GA, Sinowatz F. Male and Female Effects on the In Vitro Production of Bovine Embryos. *Anat Histol Embryol J Vet Med Ser C* 2004;33:257–62. doi:10.1111/j.1439-0264.2004.00543.x.
- [3] Oliveira LZ, de Arruda RP, de Andrade AFC, Celeghini ECC, dos Santos RM, Beletti ME, et al. Assessment of field fertility and several in vitro sperm characteristics following the use of different Angus sires in a timed-AI program with suckled Nelore cows. *Livest Sci* 2012;146:38–46. doi:10.1016/j.livsci.2012.02.018.
- [4] Utt MD. Prediction of bull fertility. *Anim Reprod Sci* 2016;169:37–44. doi:10.1016/j.anireprosci.2015.12.011.
- [5] Zhang, Larsson, Lundeheim, Haard, Rodriguez-Martinez. Prediction of bull fertility by combined in vitro assessments of frozen-thawed semen from young dairy bulls entering an AI-programme. *Int J Androl* 1999;22:253–60. doi:10.1046/j.1365-2605.1999.00178.x.
- [6] Bilodeau J-F, Blanchette S, Cormier N, Sirard M-A. Reactive oxygen species-mediated loss of bovine sperm motility in egg yolk Tris extender: protection by pyruvate, metal chelators and bovine liver or oviductal fluid catalase. *Theriogenology* 2002;57:1105–22. doi:10.1016/S0093-691X(01)00702-6.
- [7] Bansal AK, Bilaspuri GS. Impacts of Oxidative Stress and Antioxidants on Semen Functions. *Vet Med Int* 2011;2011:1–7. doi:10.4061/2011/686137.
- [8] de Castro LS, de Assis PM, Siqueira AFP, Hamilton TRS, Mendes CM, Losano JDA, et al. Sperm Oxidative Stress Is Detrimental to Embryo Development: A Dose-Dependent Study Model and a New and More Sensitive Oxidative Status Evaluation. *Oxid Med Cell Longev* 2016;2016:1–12. doi:10.1155/2016/8213071.
- [9] Kasimanickam R, Kasimanickam V, Thatcher CD, Nebel RL, Cassell BG. Relationships among lipid peroxidation, glutathione peroxidase, superoxide dismutase, sperm parameters, and competitive index in dairy bulls. *Theriogenology* 2007;67:1004–12. doi:10.1016/j.theriogenology.2006.11.013.

- [10] Walczak–Jedrzejowska R, Wolski JK, Slowikowska–Hilczner J. The role of oxidative stress and antioxidants in male fertility. *Cent Eur J Urol* 2013;65:60–7. doi:10.5173/ceju.2013.01.art19.
- [11] Morrell JM, Sabes Alsina M, Abraham MC, Sjunnesson Y. Practical applications of sperm selection techniques for improving reproductive efficiency. *Anim Reprod* 2016;13:340–5. doi:10.21451/1984-3143-AR876.
- [12] Oliveira LZ, Arruda RP, Celeghini ECC, de Andrade AFC, Perini AP, Resende M V., et al. Effects of discontinuous Percoll gradient centrifugation on the quality of bovine spermatozoa evaluated with computer-assisted semen analysis and fluorescent probes association. *Andrologia* 2012;44:9–15. doi:10.1111/j.1439-0272.2010.01096.x.
- [13] Prakash P. Preparation by Differential Gradient Centrifugation is Better Than Swim-Up in Selecting Sperm With Normal Morphology (Strict Criteria). *Fertil Steril* 1998;69:722–6. doi:10.1016/S0015-0282(98)00002-8.
- [14] Hallap T, Håård M, Jaakma Ü, Larsson B, Rodríguez-Martínez H. Does cleansing of frozen-thawed bull semen before assessment provide samples that relate better to potential fertility? *Theriogenology* 2004;62:702–13. doi:10.1016/j.theriogenology.2003.11.017.
- [15] Al-Makhzoomi A, Lundeheim N, Håård M, Rodríguez-Martínez H. Sperm morphology and fertility of progeny-tested AI dairy bulls in Sweden. *Theriogenology* 2008;70:682–91. doi:10.1016/j.theriogenology.2008.04.049.
- [16] Oliveira LZ, Arruda RP de, Andrade AFC de, Celeghini ECC, Reeb PD, Martins JPN, et al. Assessment of in vitro sperm characteristics and their importance in the prediction of conception rate in a bovine timed-AI program. *Anim Reprod Sci* 2013;137:145–55. doi:10.1016/j.anireprosci.2013.01.010.
- [17] Singh RK, Kumaresan A, Chhillar S, Rajak SK, Tripathi UK, Nayak S, et al. Identification of suitable combinations of in vitro sperm-function test for the prediction of fertility in buffalo bull. *Theriogenology* 2016;86:2263–2271.e1. doi:10.1016/j.theriogenology.2016.07.022.
- [18] Kumaresan A, Johannisson A, Al-Essawe EM, Morrell JM. Sperm viability, reactive oxygen species, and DNA fragmentation index combined can discriminate between above- and below-average fertility bulls. *J Dairy Sci* 2017;100:5824–36. doi:10.3168/jds.2016-12484.
- [19] García-Álvarez O, Maroto-Morales A, Ramón M, del Olmo E, Montoro V, Dominguez-Rebolledo AE, et al. Analysis of selected sperm by density gradient centrifugation might aid in the estimation of in vivo fertility of thawed ram spermatozoa. *Theriogenology* 2010;74:979–88. doi:10.1016/j.theriogenology.2010.04.027.
- [20] Allouche L, Madani T, Mechmeche M, Clement L BA. Bull fertility and its relation with density gradient selected sperm. *Int J Fertil Steril* 2017;11:55–62. doi:10.22074/ijfs.2016.4721.

- [21] Parrish JJ, Susko-Parrish JL, Leibfried-Rutledge ML, Critser ES, Eyestone WH, First NL. Bovine in vitro fertilization with frozen-thawed semen. *Theriogenology* 1986;25:591–600. doi:10.1016/0093-691X(86)90143-3.
- [22] Guimarães ACG, Leivas FG, Santos FW, Schwengber EB, Giotto AB, Machado CIU, et al. Reduction of centrifugation force in discontinuous percoll gradients increases in vitro fertilization rates without reducing bovine sperm recovery. *Anim Reprod Sci* 2014;146:103–10. doi:10.1016/j.anireprosci.2014.02.016.
- [23] Loetchutinat C, Kothan S, Dechsupa S, Meesungnoen J, Jay-Gerin J-P, Mankhetkorn S. Spectrofluorometric determination of intracellular levels of reactive oxygen species in drug-sensitive and drug-resistant cancer cells using the 2',7'-dichlorofluorescein diacetate assay. *Radiat Phys Chem* 2005;72:323–31. doi:10.1016/j.radphyschem.2004.06.011.
- [24] Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem* 1979;95:351–8. doi:10.1016/0003-2697(79)90738-3.
- [25] Misra HP FI. The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. *J Biol Chem* 1972;247:3170–3175.
- [26] Benzie IFF, Strain JJ. The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of “Antioxidant Power”: The FRAP Assay. *Anal Biochem* 1996;239:70–6. doi:10.1006/abio.1996.0292.
- [27] Verstegen J, Iguer-Ouada M, Onclin K. Computer assisted semen analyzers in andrology research and veterinary practice. *Theriogenology* 2002;57:149–79. doi:10.1016/S0093-691X(01)00664-1.
- [28] Broekhuijse MLWJ, Sostaric E, Feitsma H, Gadella BM. Application of computer-assisted semen analysis to explain variations in pig fertility. *J Anim Sci* 2012;90:779–89. doi:10.2527/jas.2011-4311.
- [29] Farrell PB, Presicce GA, Brockett CC, Foote RH. Quantification of bull sperm characteristics measured by computer-assisted sperm analysis (CASA) and the relationship to fertility. *Theriogenology* 1998;49:871–9. doi:10.1016/S0093-691X(98)00036-3.
- [30] Muiño R, Tamargo C, Hidalgo CO, Peña AI. Identification of sperm subpopulations with defined motility characteristics in ejaculates from Holstein bulls: Effects of cryopreservation and between-bull variation. *Anim Reprod Sci* 2008;109:27–39. doi:10.1016/j.anireprosci.2007.10.007.
- [31] Nagy Á, Polichronopoulos T, Gáspárdy A, Solti L, Cseh S. Correlation between bull fertility and sperm cell velocity parameters generated by computer-assisted semen analysis. *Acta Vet Hung* 2015;63:370–81. doi:10.1556/004.2015.035.
- [32] Watkins AM, Chan PJ, Patton WC, Jacobson JD, King A. Sperm Kinetics and Morphology Before and After Fractionation on Discontinuous Percoll Gradient for Sex

- Preselection: Computerized Analyses. *Arch Androl* 1996;37:1–5. doi:10.3109/01485019608988494.
- [33] Vianna FP, Papa FO, Zahn FS, Melo CM, Dell'Aqua JA. Thermoresistance sperm tests are not predictive of potential fertility for cryopreserved bull semen. *Anim Reprod Sci* 2009;113:279–82. doi:10.1016/j.anireprosci.2008.06.009.
 - [34] Bailey JL, Bilodeau JF CN. Semen Cryopreservation in Domestic Animals: A Damaging and Capacitating Phenomenon Minireview. *J Androl* 2000;21:1–7. doi:10.1002/J.1939-4640.2000.TB03268.X.
 - [35] Aitken RJ, Wingate JK, De Iuliis GN, McLaughlin EA. Analysis of lipid peroxidation in human spermatozoa using BODIPY C11. *MHR Basic Sci Reprod Med* 2007;13:203–11. doi:10.1093/molehr/gal119.
 - [36] Gharagozloo P, Aitken RJ. The role of sperm oxidative stress in male infertility and the significance of oral antioxidant therapy. *Hum Reprod* 2011;26:1628–40. doi:10.1093/humrep/der132.
 - [37] Sikka SC. Oxidative stress and role of antioxidants in normal and abnormal sperm function. *Front Biosci a J Virtual Libr* 1996;1:78–86.
 - [38] Nair SJ, Brar AS, Ahuja CS, Sangha SPS, Chaudhary KC. A comparative study on lipid peroxidation, activities of antioxidant enzymes and viability of cattle and buffalo bull spermatozoa during storage at refrigeration temperature. *Anim Reprod Sci* 2006;96:21–9. doi:10.1016/j.anireprosci.2005.11.002.
 - [39] Zakošek Pipan M, Mrkun J, Kosec M, Nemec Svete A, Zrimšek P. Superoxide Dismutase: A Predicting Factor for Boar Semen Characteristics for Short-Term Preservation. *Biomed Res Int* 2014;2014:1–7. doi:10.1155/2014/105280.
 - [40] Partyka A, Łukaszewicz E, Niżański W. Effect of cryopreservation on sperm parameters, lipid peroxidation and antioxidant enzymes activity in fowl semen. *Theriogenology* 2012;77:1497–504. doi:10.1016/j.theriogenology.2011.11.006.
 - [41] Alvarez JG, Storey BT. Role of glutathione peroxidase in protecting mammalian spermatozoa from loss of motility caused by spontaneous lipid peroxidation. *Gamete Res* 1989;23:77–90. doi:10.1002/mrd.1120230108.
 - [42] Kim J, Parthasarathy S. Oxidation and the Spermatozoa. *Semin Reprod Med* 1998;16:235–339. doi:10.1055/s-2007-1016283.
 - [43] Arias ME, Andara K, Briones E, Felmer R. Bovine sperm separation by Swim-up and density gradients (Percoll and BoviPure): Effect on sperm quality, function and gene expression. *Reprod Biol* 2017;17:126–32. doi:10.1016/j.repbio.2017.03.002.
 - [44] Bilodeau J-F, Chatterjee S, Sirard M-A, Gagnon C. Levels of antioxidant defenses are decreased in bovine spermatozoa after a cycle of freezing and thawing. *Mol Reprod Dev* 2000;55:282–8. doi:10.1002/(SICI)1098-2795(200003)55:3<282::AID-MRD6>3.0.CO;2-7.

5 CONCLUSÃO

Apesar dos resultados terem apresentado maiores valores de MTOT, MP e BCF em touros de baixa fertilidade quando comparados com touros de alta fertilidade, as avaliações de cinética espermática não devem ser desconsideradas em estudos de predição de fertilidade. A avaliação das combinações de parâmetros de cinética obtidas pelo CASA pode ser utilizada em conjunto com outras análises de qualidade espermática em busca de um diagnóstico de potencial de fertilidade. Por exemplo, após a seleção espermática em Percoll seguido pelo teste de termoresistência (SS + TTR), os níveis de ERO foram mais elevados em touros de baixa fertilidade e o valor de VCL foi superior em touros de alta fertilidade. Além disso, a peroxidação lipídica teve correlação negativa com a fertilidade. Com base nesses resultados, pode-se sugerir que após SS + TTR, o parâmetro de cinética VCL e os níveis de ERO e peroxidação lipídica sejam considerados na predição da fertilidade da amostra.

Assim, os resultados obtidos no presente estudo demonstram que um só parâmetro não deve ser considerado isoladamente na predição da fertilidade, uma vez que a qualidade espermática é uma questão multifatorial associada a diferentes características de integridade funcional e estrutural.

6 PERSPECTIVAS FUTURAS

Uma melhor compreensão sobre a qualidade espermática de amostras seminais é fundamental para que em um futuro próximo as avaliações *in vitro* possam projetar de forma segura expectativas de fertilidade a campo. Nesse sentido são propostos estudos futuros investigando a relação entre a fertilidade *in vivo* e o estresse oxidativo *in vitro* utilizando amostras de sêmen frescas, pois se sabe que a criopreservação de sêmen pode induzir danos celulares e fazer com que as células percam seus sistemas antioxidantes de defesa.

REFERÊNCIAS

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

AGARWAL, A.; ALLAMANENI, S.S.; SAID, T.M. Chemiluminescence technique for measuring reactive oxygen species. **Reproductive Biomedicine Online**, Cambridge, v. 9, n. 4, p.466-468, jan. 2004.

AITKEN, R.J. Free radicals, lipid peroxidation and sperm function. **Reproduction, Fertility, And Development**, East Melbourne, v. 7, n. 4, p.659-668, 1995.

AITKEN, R.J.; BAKER, H.W. Seminal leukocytes: Passengers, terrorists or good Samaritans? **Human reproduction**, Oxford, v.10, n.7, p.1736-1739, jul. 1995.

AITKEN, R.J.; BAKER, M.A. Reactive oxygen species generation by human spermatozoa: a continuing enigma. **International Journal of Andrology**, Copenhagen, v. 25, n. 4, p.191-194, ago. 2002.

AITKEN, R.J.; BAKER, M.A.; SAWYER, D. Oxidative stress in the male germ line and its role in the aetiology of male infertility and genetic disease. **Reproductive biomedicine online**, Cambridge, v. 7, n. 1, p.65-70, jul-ago. 2003.

AITKEN, R. J.; BUCKINGHAM, D. W.; WEST, K. M. Reactive oxygen species and human spermatozoa: Analysis of the cellular mechanisms involved in luminol- and lucigenin-dependent chemiluminescence. **Journal of cellular physiology**, New York, v. 151, n. 3, p.466-477, jun. 1992.

AITKEN, R.J; FISHER, H. Reactive oxygen species generation and human spermatozoa: The balance of benefit and risk. **Bioessays**, Cambridge, v. 16, n. 4, p.259-267, abr. 1994.

ALLOUCHE, L. et al. Bull fertility and its relation with density gradient selected sperm. **International journal of fertility and sterility**, Tehran, v. 11, n. 1, p.55-62, jan. 2017.

ALVAREZ, J.G. et al. Spontaneous lipid peroxidation and production of hydrogen peroxide and superoxide in human spermatozoa. Superoxide dismutase as major enzyme protectant against oxygen toxicity. **Journal of andrology**, Philadelphia, v. 8, n. 5, p.338-348, set-out. 1987.

ALVES, M.B.R. et al. An efficient technique to detect sperm reactive oxygen species: the Cell Rox Deep Red® fluorescent probe. **Biochemistry and Physiology**, v. 4, n. 5, p.1-5, abr. 2015.

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

ASBIA. **Associação Brasileira de Inseminação Artificial**. INDEX, 2015.

ARMSTRONG, J.S.; RAJASEKARAN, M.; CHAMULITRAT, W. Characterization of reactive oxygen species induced effects on human spermatozoa movement and energy metabolism. **Free radical biology and medicine**, New York, v.26, n.7-8, p.869-880, abr. 1999.

AVERY, B.; GREVE, T. Impact of percoll® on bovine spermatozoa used for in vitro insemination. **Theriogenology**, Los Altos, v.44, n.6, p.871-878, out. 1995.

AYALA, A.; MUÑOZ, M.F.; ARGÜELLES, S. Lipid Peroxidation: Production, Metabolism, and Signaling Mechanisms of Malondialdehyde and 4-Hydroxy-2-Nonenal. **Oxidative medicine and cellular longevity**, Austin, p.1-31, mai. 2014.

BAAS, J.W.; MOLAN, P.C.; SHANNON, P. Factors in seminal plasma of bulls that affect the viability and motility of spermatozoa. **Journal of reproduction and fertility**, Cambridge, v. 68, n. 2, p.275-280, jul. 1983.

BANSAL, A.K.; BILASPURI, G.S. Impacts of Oxidative Stress and Antioxidants on Semen Functions. **Veterinary medicine international**, Cairo, p.1-7, set. 2011.

BENZIE, I.F.; STRAIN, J.J. The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of "Antioxidant Power": The FRAP Assay. **Analytical biochemistry**, Orlando, v. 239, n. 1, p.70-76, jul. 1996.

BARBOSA, R.T.; MACHADO, R. **Panorama da inseminação artificial em bovinos**. Documentos 84. Embrapa Pecuária Sudeste. São Carlos. 2008.

BATTINO, M.; GREABU, M.; CALENIC, B. Oxidative stress in oral cavity: interplay between reactive oxygen species and antioxidants in health, inflammation, and cancer. In: ARMSTRONG, Donald; STRATTON, Robert D. (Ed.). **Oxidative Stress and Antioxidant Protection: The Science of Free Radical Biology and Disease**. Hoboken: John Wiley & Sons, 2016. Cap. 10. p. 155-166.

BEORLEGUI, N. et al. Comparative study of functional and biochemical parameters in frozen bovine sperm. **Andrologia**, Berlin, v. 29, n. 1, p.37-42, jan-fev. 1997.

BILODEAU, J.F. et al. Levels of antioxidant defenses are decreased in bovine spermatozoa after a cycle of freezing and thawing. **Molecular reproduction and development**, New York, v. 55, n. 3, p.282-288, mar. 2000.

BIRBEN, E. et al. Oxidative Stress and Antioxidant Defense. **World allergy organization journal, London**, v. 5, n. 1, p.9-19, jan. 2012.

BROEKHUIJSE, M.L.W.J. et al. Application of computer-assisted semen analysis to explain variations in pig fertility. **Journal of animal science**, Champaign, v. 90, n. 3, p.779-789, mar. 2012.

BUCAK, M.N. et al. The influence of trehalose, taurine, cysteamine and hyaluronan on ram semen. **Theriogenology**, Los Altos, v. 67, n. 5, p.1060-1067, mar. 2007.

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

CHEN, H. et al. Protection of sperm DNA against oxidative stress in vivo by accessory sex gland secretions in male hamsters. **Reproduction**, Cambridge, v. 124, n. 4, p.491-499, out. 2002.

CRAPO, J.D. et al. Copper, zinc superoxide dismutase is primarily a cytosolic protein in human cells. **Proceedings Of The National academy of sciences of the United States Of America**, Washington, v. 89, n. 21, p.10405-10409, dez. 1992.

CHRISTENSEN, P. et al. Relationship among seminal quality measures and field fertility of young dairy bulls using low-dose inseminations. **Journal of dairy science**, Lacaster, v. 94, n. 4, p.1744-1754, abr. 2011.

CLANCY, S. DNA damage & repair: mechanisms for maintaining DNA integrity. **Nature Education**, v. 1, n. 1, p.103-106, 2008.

COLAGAR, A.H. et al. Relationship between seminal malondialdehyde levels and sperm quality in fertile and infertile men. **Brazilian archives of biology and technology**, Curitiba, v. 52, n. 6, p.1387-1392, dez. 2009a.

COLAGAR, A.H.; MARZONY, E.T.; CHAICHI, M.J. Zinc levels in seminal plasma are associated with sperm quality in fertile and infertile men. **Nutrition research**, New York, v. 29, n. 2, p.82-88, fev. 2009b.

CURI, S.M. et al. Asthenozoospermia: analysis of a large population. **Archives of andrology**, New York, v. 49, n. 5, p.343-349, jan. 2003.

Dimitropoulos, R. La signification du test de la thermorésistance dans l'appreciation de la valeur fécondant du sperma congelé. **Annales de medecine veterinaire**, v. 4, 215–224, 1967.

FARRELL, P.B. et al. Quantification of bull sperm characteristics measured by computer-assisted sperm analysis (CASA) and the relationship to fertility. **Theriogenology**, Los Altos, v. 49, n. 4, p.871-879, mar. 1998.

FISHER, H.M.; AITKEN, R.J. Comparative analysis of the ability of precursor germ cells and epididymal spermatozoa to generate reactive oxygen metabolites. **The Journal of experimental zoology**, New York, v. 277, n. 5, p.390–400, abr. 1997.

FLESH, F.M.; GADELLA, B.M. Dynamics of the mammalian sperm plasma membrane in the process of fertilization. **Biochimica et biophysica acta (bba) - reviews on biomembranes**, Amsterdam, v. 1469, n. 3, p.197-235, nov. 2000.

GARNER, D.L.; HAFEZ, E.S.E. Espermatozóides e plasma seminal. In: HAZEZ, E.S.E.; HAFEZ, B. **Reprodução Animal**, 7ed. Manole: São Paulo, 2004. p. 97-110.

GARRIDO, N. et al. Pro-oxidative and anti-oxidative imbalance in human semen and its relation with male fertility. **Asian journal of andrology**, Beijing, v. 6, n. 1, p.59-65, mar. 2004

GAVELLA, M. et al. Relationship of sperm superoxide dismutase-like activity with other sperm-specific enzymes and experimentally induced lipid peroxidation in infertile men. **Andrologia**, Berlin, v. 28, n. 4, p.223-229, jul-ago. 1996.

GHARAGOZLOO, P. et al. A novel antioxidant formulation designed to treat male infertility associated with oxidative stress: promising preclinical evidence from animal models. **Human Reproduction**, Oxford, v. 31, n. 2, p.252-262, jan. 2016.

GILLAN, L. et al. Assessment of in vitro sperm characteristics in relation to fertility in dairy

bulls. **Animal reproduction science**, Amsterdam, v. 103, n. 3-4, p.201-214, jan. 2008.

GUS'KOVA, R.A. et al. Permeability of bilayer lipid membranes for superoxide (O_2^-) radicals. **Biochimica et biophysica acta (bba) - Biomembranes**, Amsterdam, v. 778, n. 3, p.579-585, dez. 1984.

GUTHRIE, H.D.; WELCH, G.R. Effects of reactive oxygen species on sperm function. **Theriogenology**, Los Altos, v. 78, n. 8, p.1700-1708, nov. 2012.

GUYTON, A.C.; HALL, J.E. **Tratado de fisiologia médica**. 9. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1996. 1014 p.

HALLAP, T. et al. Does cleansing of frozen-thawed bull semen before assessment provide samples that relate better to potential fertility? **Theriogenology**, Los Altos, v. 62, n. 3-4, p.702-713, ago. 2004.

HALLIWELL, B. Reactive oxygen species in living systems: Source, biochemistry, and role in human disease. **The American journal of medicine**, New York, v. 91, n. 3, p.14-22, set. 1991.

HALLIWELL, B.; WHITEMAN, M. Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? **British journal of pharmacology**, London, v. 142, n. 2, p.231-255, mai. 2004.

HARTREE, E. F., MANN, T. Phospholipids in mammalian semen. **Journal of reproduction and fertility**, Cambridge, v. 1, 23-29, fev. 1960.

HEKIMI, S.; LAPOINTE, J.; WEN, Y. Taking a “good” look at free radicals in the aging process. **Trends in cell biology**, Cambridge, v. 21, n. 10, p.569-576, out. 2011.

Henkel RR. Leukocytes and oxidative stress: dilemma for sperm function and male fertility. **Asian Journal of Andrology**. 2011;13(1):43-52. doi:10.1038/aja.2010.76.

HENKEL, R.R. Leukocytes and oxidative stress: dilemma for sperm function and male fertility. **Asian journal of andrology**, Beijing, v. 13, n. 1, p.43-52, 15 nov. 2011.

HOOD, R.D. **Developmental and Reproductive Toxicology: A Practical Approach**. 3. ed. Crc Press, 2016. 1168 p.

IOMMIELLO, V.M. et al. Ejaculate oxidative stress is related with sperm DNA fragmentation and round cells. **International journal of endocrinology**, Cairo, p.1-6, fev. 2015.

COLAGAR, A.H.; KARIMI, F.; JORSARAEI, S.G.A. Correlation of sperm parameters with semen lipid peroxidation and total antioxidants levels in astheno- and oligoastheno-teratospermic men. **Iranian red crescent medical journal**, Dubai, v. 15, n. 9, p.780-785, set. 2013.

IBGE. **Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Indicadores IBGE – Estatísticas da Produção Pecuária**. 2016.

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

JOHANNISSON, A. et al. Naturally and stimulated levels of reactive oxygen species in cooled stallion semen destined for artificial insemination. **Animal**, Cambridge, v. 8, n. 10, p.1706-1714, jun. 2014.

KASIMANICKAM, R. et al. Association of classical semen parameters, sperm DNA fragmentation index, lipid peroxidation and antioxidant enzymatic activity of semen in ram-lambs. **Theriogenology**, Los Altos, v. 65, n. 7, p.1407-1421, abr. 2006.

KASIMANICKAM, R. et al. Relationships among lipid peroxidation, glutathione peroxidase, superoxide dismutase, sperm parameters, and competitive index in dairy bulls. **Theriogenology**, Los Altos, v. 67, n. 5, p.1004-1012, mar. 2007.

KATHIRAVAN, P. et al. Computer automated motion analysis of crossbred bull spermatozoa and its relationship with in vitro fertility in zona-free hamster oocytes. **Animal reproduction science**, Amsterdam, v. 104, n. 1, p.9-17, fev. 2008.

KILLIAN, G.J.; CHAPMAN, D.A.; ROGOWSKI, L.A. Fertility-associated proteins in Holstein bull seminal plasma. **Biology of reproduction**, Champaign, v.49, n.6, p.1202-1207, dez. 1993.

KWON, W.S. et al. Increased male fertility using fertility-related biomarkers. **Scientific reports**, London, v. 5, n. 1, p.1-11, out. 2015.

JELÍNKOVÁ, P. et al. Proteinase inhibitors in aggregated forms of boar seminal plasma proteins. **International journal of biological macromolecules**, Amsterdam, v. 32, n. 3-5, p.99-107, set. 2003.

LANZAFAME, F.M. et al. Oxidative stress and medical antioxidant treatment in male infertility. **Reproductive biomedicine online**, Cambridge, v. 19, n. 5, p.638-659. Nov. 2009.

LENZI, A. et al. Fatty acid composition of spermatozoa and immature germ cells. **Molecular human reproduction**, Oxford, v. 6, n. 3, p.226-231, mar. 2000.

LLOYD, R.V.; HANNA, P.M.; MASON, R. P. The origin of the hydroxyl radical oxygen in the renton reaction. **Free radical biology and medicine**, New York, v. 22, n. 5, p.885-888, jan. 1997.

LYDKA, M. et al. Administration of flutamide alters sperm ultrastructure, sperm plasma membrane integrity and its stability, and sperm mitochondrial oxidative capability in the boar: in vivo and in vitro approach. **Reproduction in domestic animals**, Berlin, v. 147, n. 4, p.635-643, ago. 2012.

MADUREIRA E. H.; FILHO M. M. **Avanços tecnológicos no emprego de fármacos para controle da reprodução de fêmeas bovinas destinadas à IATF**. In: 5º Simpósio Internacional de Reprodução Animal Aplicada, p. 93-108, 2012, Londrina. Anais. Londrina, 2012.

MANJUNATH, P.; THÉRIEN, I. Role of seminal plasma phospholipid-binding proteins in sperm membrane lipid modification that occurs during capacitation. **Journal of reproductive immunology**, Amsterdam, v. 53, n. 1-2, p.109-119, jan. 2002.

MANN, T. Studies on the metabolism of semen: 1. General aspects. Occurrence and distribution of cytochrome, certain enzymes and coenzymes. **Biochemical journal**, London, v.39, n.5, p.451-458, 1945.

MANN, T. Studies on the metabolism of semen: 3. Fructose as a normal constituent of seminal plasma. Site of formation and function of fructose in semen. **Biochemical journal**, London, v.40, n.4, p.481-491, 1946.

MARTÍNEZ-SOTO, J.C.; LANDERAS, J.; GADEA, J. Spermatozoa and seminal plasma fatty acids as predictors of cryopreservation success. **Andrology**, London, v. 1, n. 3, p.365-375, nov. 2012.

MCKINNON, Angus O et al. **Equine Reproduction**. 2. ed. New Jersey: John Wiley & Sons,

2011. 3288 p.

MILLS, S.C.; SCOTT, T.W. Metabolism of fatty acids by testicular and ejaculated ram spermatozoa. **Journal of reproduction and fertility**, Cambridge, v.18, p.367-369, mar. 1969.

MILLER, D.J.; WINER, M.A.; AX, R.L. Heparin-binding proteins from seminal plasma bind to bovine spermatozoa and modulate capacitation by heparin. **Biology of reproduction**, Champaign, v. 42, n. 5-6, p.899-915, mai-jul. 1990.

MORIELLI, T.; O'FLAHERTY, C. Oxidative stress impairs function and increases redox protein modifications in human spermatozoa. **Reproduction**, Cambridge, v. 149, n. 1, p.113-123, jan. 2015.

MORTAZAVI, M. et al. Protective Effects of Antioxidants on Sperm Parameters and Seminiferous Tubules Epithelium in High Fat-fed Rats. **Journal of reproduction and infertility**, Tehran, v. 15, n. 1, p.22-28, jan-mar. 2014.

MORTIMER, S.T.; MAXWEL, W.M.C. Kinematic definition of ram sperm hyperactivation. **Reproduction, fertility, and development**, East Melbourne, v. 11, n. 1, p.25-30, 1999.

MORRELL, J.M. Update on Semen Technologies for Animal Breeding. **Reproduction in domestic animals**, Berlin, v. 41, n. 1, p.63-67, fev. 2006.

MORRELL, J. M. et al. Effect of Single Layer Centrifugation on reactive oxygen species and sperm mitochondrial membrane potential in cooled stallion semen. **Reproduction, fertility and development**, East Melbourne, v. 29, n. 5, p.1039-1045, abr. 2017.

NAIB, A. et al. In vitro assessment of sperm from bulls of high and low field fertility. **Theriogenology**, Los Altos, v. 76, n. 1, p.161-167, jul. 2011.

NAGY, S. et al. Changes in plasma membrane and acrosome integrity of frozen-thawed bovine spermatozoa during a 4 h incubation as measured by multicolor flow cytometry. **Animal reproduction science**, Amsterdam, v. 80, n. 3-4, p.225-235, Fev. 2004.

NAGY, Á. et al. Correlation between bull fertility and sperm cell velocity parameters generated by computer-assisted semen analysis. **Acta veterinaria hungarica**, Budapest, v. 63, n. 3, p.370-381, set. 2015.

O'Flaherty C. Redox regulation of mammalian sperm capacitation. **Asian journal of andrology**, Beijing, v. 17, n. 4, p.583-590, jul-ago. 2015.

OLIVEIRA, L.Z. et al. Assessment of in vitro sperm characteristics and their importance in the prediction of conception rate in a bovine timed-AI program. **Animal reproduction science**, Amsterdam, v.137, n. 3-4, p.145-155, mar. 2013.

OLIVEIRA, B.M. et al. Fertility and uterine hemodynamic in cows after artificial insemination with semen assessed by fluorescent probes. **Theriogenology**, Los Altos, v. 82, n. 5, p.767-772, set. 2014.

PAHUNE, P.P.; CHOUDHARI, A.R.; MULEY, P.A. The Total Antioxidant Power of Semen and Its Correlation with the Fertility Potential of Human Male Subjects. **Journal of clinical and diagnostic research**, India, v. 7, n. 6, p.991-995, jun. 2013.

PERRY, J.C.; SIROT, L.; WIGBY, S. The seminal symphony: how to compose an ejaculate. **Trends in ecology and evolution**, Amsterdam, v.28, n.7, p.414-422, jul. 2013.

PESCH, S.; BERGMANN, M.; BOSTEDT, H. Determination of some enzymes and macro- and microelements in stallion seminal plasma and their correlations to semen quality. **Theriogenology**, Los Altos, v. 66, n. 2, p.307-313, jul. 2006.

PETRUNKINA, A.M. et al. Sperm-cell volumetric measurements as parameters in bull semen function evaluation: correlation with nonreturn rate. **Andrologia**, Berlin, v.33, n.6, p.360-367, nov. 2001.

PLANTE, M.; LAMIRANDE, E.; GAGNON, C. Reactive oxygen species released by activated neutrophils, but not by deficient spermatozoa, are sufficient to affect normal sperm motility. **Fertility and sterility**, New York, v. 62, n. 2, p.387-393, ago. 1994.

PUGLISI, R. et al. In vitro competitive binding index using fluorochrome-labelled spermatozoa for predicting bull fertility. **Zygote**, Cambridge, v. 18, n. 04, p.281-291, jun. 2010.

RENGAN, A.K. et al. An investigation of excess residual cytoplasm in human spermatozoa and its distinction from the cytoplasmic droplet. **Reproductive biology and endocrinology**, London, v. 10, p.1-8, nov. 2012.

REPETTO, M.; SEMPRINE, J.; BOVERIS, A.. Lipid Peroxidation: Chemical Mechanism, Biological Implications and Analytical Determination. In: CATALA, A. **Lipid Peroxidation**. London: Intech, 2012. Cap. 1. p. 3-30. Disponível em: <
<http://www.intechopen.com/books/lipid-peroxidation>>. Acesso em: 17 nov. 2017

RICE-EVANS, C. A.; DIPLOCK, A. T.; SYMONS, M. C. R. **Techniques in free radical research**: Laboratory techniques in biochemistry and molecular biology. Amsterdam: Elsevier Science, 1991. 291 p.

RODRIGUEZ-MARTINEZ, H.; LARSSON, B.; PERTOFT, H. Evaluation of sperm damage and techniques for sperm clean-up. **Reproduction, fertility, and development**, East Melbourne, v. 9, n. 3, p.297-308, 1997.

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

SAID, T.M. et al. Impact of sperm morphology on DNA damage caused by oxidative stress induced by γ -nicotinamide adenine dinucleotide phosphate. **Fertility and sterility**, New York, v. 83, n. 1, p.95-103, jan. 2005.

SAID, T.M. et al. Enhanced Chemiluminescence Assay vs Colorimetric Assay for Measurement of the Total Antioxidant Capacity of Human Seminal Plasma. **Journal of andrology**, Philadelphia, v. 24, n. 5, p.676-680, 10 set. 2003.

SALEH, R.A. et al. Leukocytospermia is associated with increased reactive oxygen species production by human spermatozoa. **Fertility and sterility**, New York, v. 78, n. 6, p.1215-1224, dez. 2002.

SANOCKA, D.; KURPISZ, M. Reactive oxygen species and sperm cells. **Reproductive biology and endocrinology**, London, v. 2, n. 1, p.12-26, mar. 2004.

SANOCKA, D. et al. Effect of reactive oxygen species and the activity of antioxidant systems on human semen; association with male infertility. **International journal of andrology**, Copenhagen, v. 20, n. 5, p.255-264, out. 1997.

SHARMA, R.K. et al. The reactive oxygen species—total antioxidant capacity score is a new measure of oxidative stress to predict male infertility. **Human reproduction**, Oxford, v. 14, n. 11, p.2801-2807, nov. 1999.

SHARMA, R. K. et al. Methods to Measure Reactive Oxygen Species (ROS) and Total Antioxidant Capacity (TAC) in the Reproductive System. In: AGARWAL, A. et al (Ed.). **Oxidative Stress in Human Reproduction**. Springer, 2017. Cap. 2. p. 17-46.

SHARMA, M. et al. Inter relationship between some routine semen evaluation parameters in

Jersey X local hill cattle crossbred bulls. **Open veterinary journal**, Tripoli, v. 2, n. 1, p.26-31, mai. 2012.

SHULAEV, V.; OLIVER, D.J. Metabolic and Proteomic Markers for Oxidative Stress. New Tools for Reactive Oxygen Species Research. **Plant physiology**, Lancaster, v. 141, n. 2, p.367-372, 1 jun. 2006.

SIKKA, S.C.; RAJASEKARAN, M.; HELLSTROM, W.J.G. Role of oxidative stress and antioxidants in male infertility. **Journal of Andrology**, Philadelphia, v. 16, n. 6, p.464–468, nov-dez. 1995;

SÖDERQUIST, L. et al. Sperm Morphology and Fertility in A. I. Bulls. **Journal of veterinary medicine series A**, Berlin, v. 38, n. 1-10, p.534-543, 12 fev. 1991.

STRZEMIENSKI, P.J. Effect of bovine seminal plasma on neutrophil phagocytosis of bull spermatozoa. **Journals of reproduction and fertility**, Cambridge, v. 87, p.519-528, 1989.

SULLIVAN, R. Male fertility markers, myth or reality. **Animal reproduction science**, Amsterdam, v. 82-83, p.341-347, jul. 2004.

TANGHE, S. et al. Assessment of different sperm quality parameters to predict in vitro fertility of bulls. **Reproduction domestic animal**, Berlin, v.37, p.127-132, jun. 2002.

TREMELLEN, K. Oxidative stress and male infertility—a clinical perspective. **Human Reproduction update**, Oxford, v. 14, n. 3, p.243-258, fev. 2008.

TRUSSELL, J.C. Optimal Diagnosis and Medical Treatment of Male Infertility. **Seminars in reproductive medicine**, New York, v. 31, n. 04, p.235-236, jun. 2013.

VARNER, D.D. Developments in stallion semen evaluation. **Theriogenology**, Los Altos, v. 70, n. 3, p.448-462, ago. 2008.

VERBERCKMOES, S et al. Migration of bovine spermatozoa in a synthetic medium and its relation to in vivo bull fertility. **Theriogenology**, Los Altos, v. 58, n. 5, p.1027-1037, set. 2002.

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

179, jan. 2002.

VIANNA, F.P. et al. Thermoresistance sperm tests are not predictive of potential fertility for cryopreserved bull semen. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 113, n. 1-4, p.279-282, jul. 2009.

VINCENT, P. et al. Bovine semen quality control in artificial insemination centers. **Animal reproduction**, Belo Horizonte, v. 9, n. 3, p.153–165, jul-set. 2012.

VISHWANATH, R. **Artificial insemination: the state of the art. Theriogenology**, Los Altos, v. 59, n. 2, p.571-584, jan. 2003.

WATSON, P.F. The effects of cold shock on sperm cell membranes. In: MORRIS, G.J.; CLARKE, A. **Effects of low temperatures on biological membranes**. London, Academic Press, 1981. p.189.

YÁÑIZ, J.I.; SOLER, C.; SANTOLARIA, P. Computer assisted sperm morphometry in mammals: A review. **Animal reproduction science**, Amsterdam, v. 156, p.1-12, mai. 2015.

ZANIBONI, L.; RIZZI, R.; CEROLINI, S.. Combined effect of DHA and α -tocopherol enrichment on sperm quality and fertility in the turkey. **Theriogenology**, Los Altos, v. 65, n. 9, p.1813-1827, jun. 2006.