

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
ESCOLA DE VETERINÁRIA
Programa de Pós-graduação em Ciência Animal

**Comparação de características estruturais e funcionais de espermatozoides
bubalinos com maior ou menor sensibilidade à criopreservação**

BEATRIZ PARZEWSKI NEVES

Belo Horizonte
2019

BEATRIZ PARZEWSKI NEVES

**Comparação de características estruturais e funcionais de espermatozoides
bubalinos com maior ou menor sensibilidade à criopreservação**

Trabalho de conclusão apresentado à Escola
de Veterinária da Universidade Federal de
Minas Gerais, como requisito parcial para
obtenção do grau de Doutor em Ciência
Animal, Área de concentração: Reprodução
Animal

Orientador: Marc Henry
Coorientadores: Maria Madalena P. Guerra
Mariana Machado Neves

**Belo Horizonte
2019**

N518c Neves, Beatriz Parzewski. 1988-
Comparação de características estruturais e funcionais de espermatozoides bubalinos com maior ou menor sensibilidade à criopreservação/ Beatriz Parzewski Neves – 2019.
88p.: il.

Orientador: Marc Henry
Coorientadoras: Maria Madalena P. Guerra
Mariana Machado Neves

Área de concentração: Reprodução Animal
Inclui bibliografia f. 65- 80.

Tese (Doutorado) apresentado a Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais.

Universidade 1- Búfalo - Reprodução – Teses - 2 – Sêmen – Reprodução - Teses – 3- criopreservação- Teses
I - Henry, Marc – II – Guerra, Maria Madalena P – III – Neves, Mariana Machado - IV–
Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária - V – Título.

CDD – 636.089

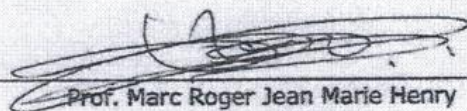
Bibliotecária responsável Cristiane Patrícia Gomes – CRB2569

FOLHA DE APROVAÇÃO

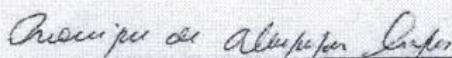
BEATRIZ PARZEWSKI NEVES

Tese submetida à banca examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIA ANIMAL, como requisito para obtenção do grau de DOUTOR em CIÊNCIA ANIMAL, área de concentração em REPRODUÇÃO ANIMAL.

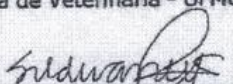
Aprovada em 30 de Abril de 2019 , pela banca constituída pelos membros:



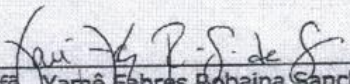
Prof. Marc Roger Jean Marie Henry
Presidente - Orientador



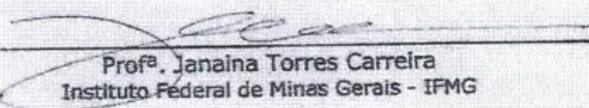
Profª. Monique de Albuquerque Lagares
Escola de Veterinária - UFMG



Profª. Sildivane Valcácia Silva
Universidade Federal da Paraíba - UFPB



Profª. Yarnê Fabres Robaina Sancler da Silva
Universidade Federal de Viçosa - UFV



Profª. Janaina Torres Carreira
Instituto Federal de Minas Gerais - IFMG

*Dedico esse trabalho à minha família,
aos meus pais, Egberto e Rosangela,
aos meus irmãos, Mariana e Pedro*

Agradecimentos

À CAPES pelo fornecimento da bolsa de doutorado.

À Escola de Veterinária da UFMG pelo seu corpo docente e pela sua estrutura, que foram a minha casa por tantos anos, por todas as experiências e conhecimento adquiridos.

Aos professores do Setor de Reprodução, por dividirem seus conhecimentos e experiências.

Ao meu orientador, Marc Henry, por todos os anos de orientação, desde a iniciação científica até o doutorado, participando de perto do meu crescimento científico e pessoal, minha gratidão.

Às minhas coorientadoras, profa. Maria Madalena P. Guerra e profa. Mariana Machado Neves, pelas sugestões no projeto e na finalização da tese.

Ao prof. Frederico Ozanam Papa pela liberação do laboratório CERAN/UNESP-Botucatu para as análises de citometria de fluxo e à Dra. Camila de Paula Freitas-Dell'Aqua pela realização das análises e ajuda nas dúvidas que surgiram. À profa. Fabíola de Oliveira Paes Leme pela liberação do laboratório LAPEQ-UFMG.

Às professoras que compuseram a banca de defesa da tese, profa. Monique de Albuquerque Lagares, profa. Sildivane Valcácia Silva, profa. Yamê Fabres Robaina Sancler da Silva, profa. Janaina Torres Carreira e como suplentes, profa. Maria Isabel Vaz de Melo e profa. Leticia Zoccolaro Oliveira pela participação e pelas sugestões oferecidas ao trabalho.

Ao Marcelino, pelo riso fácil, pela simplicidade e sabedoria, nos ensinando que a vida pode ser mais leve. Aos demais funcionários da Fazenda Modelo de Pedro Leopoldo, por ajudarem sempre que necessário.

Aos colegas de orientação, May e Pati, pela amizade e cumplicidade, Jaci e Verónica, pela ajuda nos dias de coleta. Aos que estiveram comigo nas coletas e às que estiveram comigo no laboratório, muito obrigada, não conseguiria sem vocês.

Aos meus amigos de Belo Horizonte, Lala, Natinha, Saulinho, Aninha, Bah e Carlinha, por estarem comigo desde o início, por entenderem minha ausência e por se fazerem presentes mesmo assim. À minha amiga da terrinha, Rad, obrigada pela amizade sincera, pelos momentos de amparo, mas também pelos de risos. Às primas plenitudes, Juh, Gabi, Má, Bebê e Ana, por cada uma do seu jeito achar graça no caos e nos dar forças para seguir adiante.

À Patinha e ao Gu, por me acolherem na sua casa, me incluírem na sua família, emprestando mãe, irmãos, avós, tios, primos e sobrinhos. Patinha, minha irmã de alma, por todos os momentos que a gente dividiu, os bons e os maus, uma levantando a outra...agradeço a gente ter se encontrado!! Não conseguiria sem você!! Ao Gu, pela sua rebeldia, apoiando as birutices, discutindo resultados ou criando projetos, obrigada por tudo! Vaca é fera!!

À minha mãe, meu exemplo de mulher maravilha, pelo seu amor e carinho. Ao meu pai pelo exemplo de persistência, que me permite continuar a sonhar. Aos meus irmãos, por todo amor e incentivo, sem vocês eu não seria nada.

Ao Adriano, sempre a minha calmaria, por todos esses anos de amor e aventuras, por me entender e me apoiar e se fazer presente quando a distância doía.

E a todos que torceram e rezaram por mim, e que de alguma forma me auxiliaram para chegar até aqui.

Muito obrigada!

*“Na vida, não existe nada a temer, mas a
entender.”*

Marie Curie

SUMÁRIO

RESUMO.....	17
ABSTRACT	18
1. INTRODUÇÃO.....	19
2. OBJETIVOS	20
2.1. Objetivo geral	20
2.2. Objetivos específicos	20
3. REVISÃO DE LITERATURA.....	20
3.1. Influência do processo de congelamento-descongelamento sobre o espermatozoide .	20
3.2. Composição da membrana plasmática e resistência ao processo de congelamento- descongelamento	22
3.3. Fisiopatogenia do estresse oxidativo	22
3.3.1. Formação de espécies reativas de oxigênio	23
3.3.2. Peroxidação lipídica.....	23
3.3.3. Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio no espermatozoide	24
3.3.4. Estresse oxidativo e fertilidade	26
3.4. Atividade antioxidante do espermatozoide e do plasma seminal	26
3.4.1. Atividade de antioxidantes enzimáticos no sêmen	27
3.4.1.1. Superóxido dismutase (SOD)	27
3.4.1.2. Catalase (CAT)	29
3.4.1.3. Glutathione peroxidase (GPx)	29
3.4.2. Atividade de antioxidantes não-enzimáticos no sêmen	31
3.4.2.1. Ácido ascórbico (Vitamina C).....	31
3.4.2.2. Alfa-tocoferol (Vitamina E).....	31
3.4.2.3. Taurina/hipotaurina.....	32
3.5. Avaliação da motilidade e cinética espermáticas por sistema computadorizado (CASA).....	32
3.6. Avaliação espermática por citometria de fluxo	34
3.6.1. Avaliação das membranas plasmática e acrossômica.....	35
3.6.2. Avaliação do potencial de membrana mitocondrial.....	36
3.6.3. Análise das espécies reativas de oxigênio e da peroxidação lipídica em espermatozoides	37
4. MATERIAL E MÉTODOS	38
4.1. Comissão de Ética no Uso de Animais – UFMG (CEUA/UFMG)	38
4.2. Animais e localização do experimento	38
4.3. Meio diluidor para congelamento de espermatozoides.....	38
4.4. Coleta de sêmen.....	39

4.5.	Análise do sêmen <i>in natura</i>	39
4.5.1.	Análises macroscópicas	39
4.5.2.	Análises microscópicas.....	39
4.5.2.1.	Turbilhonamento.....	39
4.5.2.2.	Motilidade e vigor.....	39
4.5.2.3.	Concentração espermática	40
4.5.2.4.	Morfologia espermática	40
4.5.2.5.	Teste hiposmótico.....	40
4.6.	Manipulação do sêmen e congelamento	40
4.7.	Análise do sêmen pré e pós-resfriamento	41
4.7.1.	Análise computadorizada do movimento espermático – CASA.....	41
4.8.	Teste de longevidade da motilidade espermática pós-descongelamento.....	42
4.9.	Seleção dos ejaculados e formação dos grupos experimentais	42
4.10.	Citometria de fluxo	43
4.10.1.	Integridade das membranas plasmática e acrossômica	43
4.10.2.	Estabilidade da membrana plasmática, potencial de membrana mitocondrial e produção de ânion superóxido mitocondrial	43
4.10.3.	Produção de peróxido de hidrogênio intracelular	44
4.10.4.	Peroxidação lipídica.....	44
4.10.4.1.	Peroxidação lipídica induzida por ácido araquidônico	44
4.11.	Fluxograma das etapas do processo de congelamento-descongelamento dos ejaculados.....	45
4.12.	Análise estatística	45
5.	RESULTADOS	46
5.1.	Caracterização dos grupos de ejaculados de touros bubalinos (<i>Bubalus bubalis</i>) de acordo com a resistência espermática ao processo de congelamento-descongelamento.....	46
5.2.	Comparação da qualidade seminal entre os grupos de ejaculados com resistência espermática boa e ruim ao processo de congelamento-descongelamento.....	48
5.3.	Avaliações de citometria de fluxo em espermatozoides com resistência boa ou ruim ao processo de congelamento-descongelamento.....	50
5.4.	Estudo das correlações entre as características estruturais e funcionais de espermatozoides bubalinos (<i>Bubalus bubalis</i>)	56
6.	DISCUSSÃO	61
7.	CONCLUSÕES	64
8.	CONSIDERAÇÕES FINAIS	64
	ANEXO 1	81
	ANEXO 2	81
	ANEXO 3	82
	ANEXO 4	83
	ANEXO 5	87

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Oxidação do ácido ascórbico.....	31
Figura 2. Representação esquemática de parâmetros cinéticos mensurados por análise espermática computadorizada (CASA)	33
Figura 3. Curva da queda média de temperatura, obtida durante o resfriamento dos 129 ejaculados	41
Figura 4. Fluxograma das etapas do processo de congelamento-descongelamento dos ejaculados de touros bubalinos (<i>Bubalus bubalis</i>).....	45
Figura 5. Motilidade total individual, em porcentagem, desde o pré-resfriamento aos 180 minutos pós-descongelamento, dos 90 ejaculados de touros bubalinos avaliados no CASA.	47
Figura 6. Média e erro padrão da motilidade total de espermatozoides bubalinos avaliados no CASA, por grupo, desde o pré-resfriamento aos 180 minutos pós-descongelamento.	48
Figura 7. Média e erro padrão dos parâmetros de motilidade e cinética de espermatozoides bubalinos avaliados no CASA, por grupo, desde o pré-resfriamento aos 180 minutos pós-descongelamento.	49
Figura 8. Integridade das membranas plasmática e acrossômica de espermatozoides bubalinos descongelados, analisados por citometria de fluxo, com as sondas fluorescentes FITC-PSA e iodeto de propídio... ..	51
Figura 9. Média e erro-padrão da porcentagem de células espermáticas (<i>Bubalus bubalis</i>) descongeladas com membrana plasmática estável, analisadas por citometria de fluxo, com a sonda fluorescente YOPRO-1	52
Figura 10. Alto potencial de membrana mitocondrial em espermatozoides bubalinos descongelados, analisados por citometria de fluxo com a sonda fluorescente MitoStatus Red..	53
Figura 11. Média e erro-padrão de espécies reativas de oxigênio em espermatozoides bubalinos descongelados, analisados por citometria de fluxo, com as sondas fluorescentes CM-H2DCFDA (peróxido de hidrogênio) e MitoSOX™ Red (ânion superóxido).....	54
Figura 12. Peroxidação lipídica em espermatozoides bubalinos descongelados, analisados por citometria de fluxo, com a sonda fluorescente C-11 BODIPY	55
Figura 13. Média e erro-padrão da peroxidação lipídica pós-desafio com ácido araquidônico em espermatozoides bubalinos descongelados (PD_T5), analisados por citometria de fluxo, com a sonda fluorescente C-11 BODIPY.	55

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Médias e desvios-padrão relatados na literatura para os parâmetros do CASA em espermatozoides bubalinos (<i>Bubalus bubalis</i>) descongelados	34
Tabela 2. Idade, peso corporal, escore corporal, perímetro escrotal e consistência testicular dos 13 touros búfalos (<i>Bubalus bubalis</i>) utilizados no experimento.....	38
Tabela 3. Valores de média, erro-padrão, mínimo e máximo do $\Delta R_{(MT)}$, por grupo de resistência espermática ao processo de congelamento-descongelamento de ejaculados de touros bubalinos (<i>Bubalus bubalis</i>).....	46

Tabela 4. Caracterização numérica de ejaculados e animais dos grupos de resistência espermática boa e ruim ao processo de congelamento-descongelamento.....	47
Tabela 5. Valores de média e erro-padrão das características dos ejaculados <i>in natura</i> de touros bubalinos (<u>Bubalus bubalis</u>), por grupo de resistência espermática ao processo de congelamento-descongelamento	48
Tabela 6. Correlação entre o $\Delta R_{(MT)}$ e as características de espermatozoides bubalinos (<u>Bubalus bubalis</u>) avaliados após o descongelamento (PD_T5), pelo CASA e por meio de citometria de fluxo	57
Tabela 7. Correlação entre o $\Delta R_{(MT)}$ e as características de espermatozoides bubalinos (<u>Bubalus bubalis</u>) avaliados após o descongelamento (PD_T180), pelo CASA e por meio de citometria de fluxo	58
Tabela 8. Correlações entre a sensibilidade espermática [$\Delta R_{(MT)}$] e as avaliações potencial de membrana mitocondrial e produção de espécies reativas de oxigênio de espermatozoides bubalinos (<u>Bubalus bubalis</u>) descongelados a 37 °C, nos dois tempos avaliados (PD_T5 e PD_T180)	59
Tabela 9. Correlações entre a sensibilidade espermática [$\Delta R_{(MT)}$], a peroxidação lipídica e as avaliações potencial de membrana mitocondrial em espermatozoides bubalinos (<u>Bubalus bubalis</u>) descongelados a 37 °C, nos dois tempos avaliados (PD_T5 e PD_T180).....	60
Tabela 10. Correlações entre a sensibilidade espermática [$\Delta R_{(MT)}$], a peroxidação lipídica e produção de espécies reativas de oxigênio em espermatozoides bubalinos (<u>Bubalus bubalis</u>) descongelados a 37 °C, nos dois tempos avaliados (PD_T5 e PD_T180).....	60

LISTA DE ABREVIATURAS

$\Delta R_{(MT)}$ – Declínio da motilidade total entre o início (PR) e 180 minutos após descongelamento
4-HNE – 4-hidroxinonal
8OHdG – 8-hidroxi-2'-deoxiguanosina
ALH – Amplitude de deslocamento lateral de cabeça (amplitude of lateral head displacement)
AMPC – Adenosina monofosfato cíclico (Cyclic adenosine monophosphate)
ATP – Adenosina trifosfato (adenosine triphosphate)
BCF – Frequência do batimento flagelar (beat cross frequency)
CASA – Computer assisted sperm analysis
CAT – Catalase
CBB – Centro de Biotecnologia em Bubalinocultura
DNA – Ácido desoxirribonucleico (deoxyribonucleic acid)
ERO – Espécies reativas de oxigênio
FAD – Flavina-adenina dinucleotídeo
FITC – Isoticianato de fluoresceína (fluorescein isothiocyanate)
GPx – Glutathione peroxidase
GR – Glutathione reductase
GSH – Glutathione
GSSH – Glutathione oxidada
H₂O₂ – Peróxido de hidrogênio
HMP – Alto potencial de membrana mitocondrial (High mitochondrial membrane potential)
HO – Hiposmótico
HOCl – Ácido hipocloroso
IF – Intensidade de fluorescência
IP – Iodeto de propídio
kDa – Quilodáton
LBD – Lipoproteína de baixa densidade
M – Molar
MDA – Malondialdeído
mOsm/L – miliosmol por litro
MP – Motilidade progressiva
MPA – Integridade das membranas plasmática e acrossômica
MPAI – Membranas plasmática e acrossômica íntegras
MPAL – Membranas plasmática e acrossômica lesadas
MPIAL – Membrana plasmática íntegra e acrossômica lesada
MPLAI – Membrana plasmática lesada e acrossômica íntegra
MSR – MitoSOX™ Red
MST – MitoStatus Red
MT – Motilidade total
N₂L – Nitrogênio líquido
NAD(P)H – Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate)
NADH – Nicotinamida adenina dinucleotídeo (Nicotinamide adenine dinucleotide)
O₂⁻ – Ânion superóxido
OH^{*} – Radical hidroxila
ONOO⁻ – Peroxinitrito
PC – Momento pré-congelamento
PD_T120 – Momento 120 minutos após o descongelamento

PD_T180 – Momento 180 minutos após o descongelamento
PD_T5 – Momento 5 minutos após o descongelamento
PD_T60 – Momento 60 minutos após o descongelamento
PMM – Potencial de membrana mitocondrial
PPTm – Poros de permeabilidade transitória mitocondrial
PR – Momento pré-resfriamento
PSA – Aglutinina de Pisum sativum (Pisum sativum agglutinin)
RB – Grupo de resistência espermática boa
RI – Grupo de resistência espermática intermediária
RNA – Ácido ribonucleico (Ribonucleic acid)
RR – Grupo de resistência espermática ruim
SOD – Superóxido dismutase
TBA – Teste do Ácido 2-Tiobarbitúrico
U.A. – Unidade arbitrária
VAP – Velocidade média da trajetória
VCL – Velocidade curvilínea
VSL – Velocidade linear

RESUMO

Este estudo teve como objetivo avaliar, em espermatozoides bubalinos, as diferenças estruturais e funcionais, que podem influenciar a sua resistência ao processo de congelamento-descongelamento. Um total de 90 ejaculados, coletados por meio de vagina artificial de 13 touros Murrah (*Bubalus bubalis*), foram avaliados, diluídos em meio Tris-ácido cítrico-frutose contendo 10% de lipoproteínas de baixa densidade, e submetidos ao congelamento-descongelamento. Durante o processo, os ejaculados foram avaliados por sistema computadorizado (CASA) em seis momentos: pré-resfriamento (PR), pré-congelamento (PC), cinco minutos pós-descongelamento (PD_T5) e a cada uma hora durante a incubação pós-descongelamento à 37 °C (PD_T60, PD_T120 e PD_T180). De acordo com a longevidade da motilidade total, obtida pela diferença entre as avaliações no PR e no PD_T180, foram formados dois grupos de acordo com a resistência espermática ao processo de congelamento-descongelamento: os ejaculados que perderam menos que 41,2% da motilidade total entre as duas avaliações compuseram o grupo de resistência espermática boa (RB, n=23), e aqueles que perderam mais que 65,1% compuseram o grupo de resistência espermática ruim (RR, n=22). Em cada ejaculado, foram avaliados por citometria de fluxo: integridade das membranas plasmática e acrossômica (MPA), estabilidade da membrana plasmática, potencial de membrana mitocondrial (HMP), produção de peróxido de hidrogênio intracelular (H₂O₂), produção de ânion superóxido (O₂⁻) e peroxidação lipídica (LPO), utilizando as sondas IP e FITC-PSA, YOPRO-1, MitoStatus Red, CM-H2DCFDA, MitoSOXTM Red e C11-BODYPY (Molecular Probes), respectivamente. Considerou-se como significativo $p \leq 0,05$. Os espermatozoides do grupo RR apresentaram motilidade progressiva e os parâmetros de cinética VCL, VSL, VAP, BCF e ALH inferiores, principalmente durante a incubação após o descongelamento. Também foram inferiores na MPA e na estabilidade da membrana plasmática, nos tempos PD_T5 e PD_T180. O metabolismo mitocondrial foi inferior nos espermatozoides do grupo RR, tanto na porcentagem de células com HMP, como na intensidade de HMP em células íntegras no PD_T5 e PD_T180, e em células lesadas, no PD_T5. No grupo RR, a produção de O₂⁻ foi superior e a produção de H₂O₂ foi inferior, tanto no PD_T5 quanto no PD_T180. A LPO foi semelhante entre os dois grupos, em ambos os tempos avaliados (PD_T5 e PD_T180), mesmo após o desafio com ácido araquidônico, realizado no PD_T5. Por este estudo, sugere-se que a diferença da resistência espermática ao congelamento-descongelamento, entre os ejaculados de touros bubalinos, se relaciona com a sensibilidade da membrana plasmática e com o metabolismo mitocondrial, que resultam em alterações dos parâmetros de motilidade e cinética espermáticas, sem induzir danos oxidativos como a peroxidação lipídica.

Palavras-chave: criopreservação espermática, CASA, citometria de fluxo, congelabilidade, búfalo.

ABSTRACT

This study aimed to evaluate the structural and functional differences in buffalo sperm that could influence its resistance to the freezing-thawing process. A total of 90 ejaculates, collected by artificial vagina method from 13 Murrah buffalo bulls (*Bubalus bubalis*), were evaluated, diluted in Tris-citric acid-fructose containing 10% of low-density lipoproteins extender and submitted to the freeze-thaw protocol. Computer Assisted Sperm Analysis (CASA) was undertaken in six different moments during the process: pre-cooling (PC), pre-freezing (PF) and five, 60, 120 and 180 minutes after thawing under incubation at 37 °C (PT_T5, PT_T60, PT_T120 and PT_T180, respectively). Sperm resistance to freezing-thawing was calculated for each ejaculate by the difference between total motility at PC and that at PT_T180 moment. Two groups of divergent sperm freezing-thawing resistances were then created: RB group (n=23) was composed by the ejaculates that had lost less than 41,2% of total motility and RR group (n=22) was composed by the ejaculates that had lost more than 65,1% of total motility. Flow cytometry analyses were performed for each ejaculate using the respective fluorescence probe: plasmatic and acrosomal membrane integrity (MPA; IP and FITC-PSA), plasmatic membrane stability (YOPRO-1), mitochondrial membrane potential (HMP; MitoStatus Red), intracellular hydrogen peroxide production (H₂O₂; CM-H2DCFDA), superoxide anion production (O₂^{-•}; MitoSOX™ Red) e lipid peroxide (LPO; C11-BODYPY). For all analyses, p≤0,05 was considered as significant. Progressive motility and the kinematic parameters VCL, VSL, VAP, BCF and ALH were lower in RR sperm cells, mainly on the post-thawing incubation moments. MPA and plasmatic membrane stability values were also lower in RR group at the both post-thawing evaluation times, PT_T5 and PT_T180. Besides, mitochondrial metabolism was lower in RR spermatozoa as lower values of the percentage of cells with HMP and, HMP intensity in intact cells at PT_T5 and PT_T180 and in non-intact cells at PT_T5 were observed in that group. Superoxide anion production was found greater, whereas H₂O₂ production was lower in RR group at the two evaluation times during post-thawing incubation period (PT_T5 and PT_T180). LPO did not differ between groups at PT_T5 and at PT_T180, even after arachidonic acid challenge of sperm cells at PT_T5. This study suggests that differences in sperm freezing-thawing resistance observed between buffalo bull ejaculates are related to plasmatic membrane sensibility and mitochondrial metabolism that results in altered motility and kinematic parameters, but not in oxidative damages as lipid peroxidation.

Keywords: sperm cryopreservation, CASA, flow cytometry, freezability, buffalo.

1. INTRODUÇÃO

O búfalo (*Bubalus bubalis*) é uma espécie originária da Ásia, que se difundiu praticamente por todos os continentes. No Brasil, o efetivo de bubalinos, em 2017, foi de 1,35 milhões de cabeças (MAPA, 2017). A região sudeste possui 13,23 % (178 883 cabeças) desse rebanho e, Minas Gerais passou do oitavo maior rebanho bubalino brasileiro em 2014 (51 239 cabeças) (MAPA, 2014), para sexto maior em 2017 (63 072 cabeças) (MAPA, 2017). Os bubalinos são animais com tripla aptidão, sendo utilizados como força de trabalho e para a produção de carne e de leite. Nas áreas centrais do Brasil, localizadas ao redor de grandes centros consumidores, o produto mais importante da bubalinocultura é o leite, com crescimento das indústrias de derivados do leite (Zava e Berdugo, 2014). Os estímulos para a expansão de unidades industriais especializadas na produção de derivados do leite de búfalas e de unidades criadoras vêm, principalmente, do maior desempenho industrial deste leite, do maior valor agregado dos produtos derivados e do maior retorno financeiro ao bubalinocultor (Bernardes, 2007). Para a expansão do rebanho bubalino como fonte de proteína é necessário, principalmente, a aplicação de programas de melhoramento genético, com processos de seleção e utilização de biotecnologias da reprodução (Baruselli et al., 2007).

A qualidade do espermatozoide criopreservado tem impacto direto sobre a fertilidade pós-inseminação ou pós-fertilização *in vitro*. Apesar dos avanços nas pesquisas, o processo de congelamento-descongelamento ainda provoca redução da qualidade, e, conseqüentemente da fertilidade dos espermatozoides congelados (Bailey et al., 2003). Além disso, em comparação a outras espécies de produção, na espécie bubalina, existem restrições técnicas adicionais à implementação de biotecnologias reprodutivas relacionadas à fêmea, como sazonalidade e baixa demonstração de cio (Baruselli e Carvalho, 2005). Portanto, o aprimoramento da qualidade seminal pós-criopreservação, nessa espécie, contribuirá para superar dificuldades na implementação de programas de inseminação artificial e de melhoramento genético.

Durante o processo de congelamento-descongelamento, o espermatozoide está sujeito a danos principalmente relacionados às mudanças de temperatura e de osmolaridade (Bailey et al., 2003). Associadas a esses danos, têm sido demonstradas injúrias resultantes da produção exacerbada de espécies reativas de oxigênio (ERO), que levam à peroxidação de lipídios das membranas e desencadeiam a cascata apoptótica no espermatozoide. As ERO são produtos intermediários das mais comuns vias metabólicas de uma célula viva. Em concentrações fisiológicas, elas auxiliam em muitas reações bioquímicas, mas em altas concentrações elas exercem efeito deletério na célula (revisado por Kothari et al., 2010). Por exemplo, o ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$) e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) são indutores do processo de capacitação espermática (Roy e Atreja, 2008), essencial para a fusão do espermatozoide ao oócito. Entretanto, a produção excessiva de ERO induz alterações estruturais, como a peroxidação lipídica que afeta a integridade das membranas plasmática, mitocondrial (Kadirvel et al., 2009) e acrossômica (Garg et al., 2009), e causa fragmentação de DNA (Zribi et al., 2010; Kumar et al., 2011). Estas alterações se manifestam com a redução da motilidade, da viabilidade (Kumar et al., 2011) e, conseqüentemente, do potencial de fertilidade do espermatozoide (Ansari et al., 2012).

Tem sido proposto que a resistência espermática ao congelamento-descongelamento está relacionada à estrutura da membrana plasmática – proporção de colesterol e fosfolipídios e porcentagem de ácidos graxos poliinsaturados – e a fatores bioquímicos e do metabolismo do espermatozoide (Poulos et al., 1973; Darin-Bennett e White, 1977; Gibb et al., 2014; Moraes e Meyers, 2018). Contudo, ejaculados que exibem parâmetros seminais semelhantes no início do congelamento-descongelamento (sêmen *in natura*) podem apresentar diferenças referentes à

resistência do espermatozoide ao longo do processo. Essas diferenças podem ocorrer tanto entre ejaculados de animais diferentes quanto de um mesmo animal, e são descritas em várias espécies (Jobim et al., 2004; Loomis e Graham, 2008; Casas et al., 2009; Rajak et al., 2016; Auler, 2018).

Os estudos sobre o congelamento de espermatozoides disponíveis na literatura têm auxiliado a minimizar os efeitos negativos do processo sobre a qualidade da célula após o descongelamento, por meio da adaptação de protocolos e de meios diluidores. Entretanto, ainda é necessário entender os fatores e os eventos envolvidos na variação, entre animais/ejaculados, da resposta dos espermatozoides ao processo de congelamento-descongelamento, especialmente quanto aos tipos de danos celulares e aos momentos em que ocorrem. Dessa forma, este trabalho visa investigar os danos causados pelo processo de congelamento-descongelamento ao espermatozoide bubalino, em ejaculados com diferenças na sensibilidade espermática.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Avaliar, em espermatozoides bubalinos, as diferenças estruturais e funcionais, que podem influenciar a sua sensibilidade ao processo de congelamento-descongelamento.

2.2. Objetivos específicos

Analisar a sobrevivência espermática ao congelamento e a longevidade após o descongelamento por meio da avaliação da motilidade total utilizando o sistema computadorizado de avaliação espermática (CASA).

Comparar os parâmetros de motilidade e cinética espermáticas entre os ejaculados que apresentaram resistência espermática boa e ruim ao processo de congelamento-descongelamento.

Comparar os parâmetros: integridade de membranas plasmática e acrossômica, estabilidade de membrana plasmática, potencial de membrana mitocondrial, produção de peróxido de hidrogênio intracelular e de ânion superóxido mitocondrial e intensidade da peroxidação lipídica, por meio de citometria de fluxo, entre os ejaculados de resistência espermática boa e ruim ao processo de congelamento-descongelamento.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1. Influência do processo de congelamento-descongelamento sobre o espermatozoide

Durante a fase final da espermatogênese, o espermatozoide se torna notavelmente simples em suas funções metabólicas, passando a ser dependente do ambiente externo para a suplementação de nutrientes e para a remoção de resíduos (Vishwanath e Shannon, 1997). Dessa maneira, a manipulação do ambiente em que o espermatozoide está inserido tem influência direta sobre ele. Com a finalidade de preservar o espermatozoide, são utilizados protocolos que além de modificarem seu ambiente, causam alterações celulares potencialmente prejudiciais.

Ao serem processados para a criopreservação, os espermatozoides são submetidos ao estresse osmótico, tanto durante a adição de agentes crioprotetores, quanto durante o processo de congelamento-descongelamento. O primeiro contato do espermatozoide com o meio diluidor causa o estresse osmótico transitório, que ocorre até que seja alcançado o equilíbrio dos compostos adicionados, entre os meios intra e extracelulares. No processo de congelamento, com

a redução da temperatura, cristais de gelo começam a se formar no meio extracelular, levando à concentração dos solutos no meio não congelado, que se torna hipertônico, causando desidratação espermática (saída de água e entrada de íons). Durante o descongelamento, o aumento da temperatura resulta no processo contrário, com restauração do volume celular. Neste momento, a entrada de água na célula pode causar ruptura da membrana plasmática (Holt, 2000). Independentemente de sua causa, o estresse osmótico favorece a desestabilização da membrana plasmática, tornando-a vulnerável ao ataque de espécies reativas de oxigênio (macaco: McCarthy et al., 2010; equino: Ertmer et al., 2017).

Além disso, a redução da temperatura em que o espermatozoide está envolvido induz modificações na organização da membrana plasmática, com alterações estruturais dos fosfolipídios e das proteínas de membrana, causando também a desestabilização da membrana plasmática. Esse tipo de estresse acontece mesmo com a redução lenta da temperatura e se deve a mudança de fase dos lipídios da membrana, causando a separação de fases entre os lipídios congelados e os não congelados. Ademais, as proteínas integrais da membrana são agrupadas pela separação de fase lipídica, o que pode alterar suas funções, principalmente de proteínas que sofrem algum tipo de modulação estrutural para desempenhar as suas funções, como por exemplo proteínas de canais iônicos. As transições induzidas no espermatozoide durante seu processamento para a criopreservação fragilizam a membrana plasmática espermática (revisado por Watson, 2000).

Adicionalmente às suas propriedades crioprotetoras, o meio diluidor é acrescentado ao ejaculado afim de se obter o número de espermatozoides estipulados para a dose inseminante. Nesse processo de diluição, a proporção entre espermatozoides e plasma seminal é alterada. A menor concentração dos constituintes do plasma seminal foi correlacionada com menor viabilidade dos espermatozoides bovinos após o congelamento-descongelamento (Garner et al., 1997) e durante a incubação a 37 °C (Baas et al., 1983). O que pode ser explicado, em partes, pela presença no plasma seminal de enzimas que possuem atividade antioxidante e que influenciam na competência funcional do espermatozoide criopreservado, como a superóxido dismutase, a glutathione peroxidase e a glutathione-S-transferase (bubalinos: Waheed et al., 2013). Contudo, após o congelamento-descongelamento, ocorre tanto a redução da atividade das enzimas antioxidantes no plasma seminal (bovinos: Bilodeau et al., 2000; bubalinos: Kadirvel et al., 2014), quanto a diminuição da concentração dessas enzimas no espermatozoide (suínos: Gadea et al., 2004; bovinos: Stradaioli et al., 2007; humanos: Gadea et al., 2011). A ação protetora dos constituintes antioxidantes do plasma seminal e do espermatozoide será discutida em um tópico deste trabalho.

O processo de congelamento e descongelamento ainda induz, no espermatozoide, alterações capacitantes que deveriam acontecer na presença do oócito (mamíferos; Graham e Mocé, 2005). Tais alterações envolvem a reorganização e a desestabilização da membrana plasmática, o aumento do cálcio intracelular, a fosforilação da tirosina de proteínas e a produção de ERO, reduzindo a viabilidade e a fertilidade do espermatozoide congelado (revisadas por Bailey et al., 2000). A membrana plasmática do espermatozoide capacitado é frágil e mais susceptível aos danos, assim como à reação acrossômica espontânea, o que pode levar à morte espermática, caso a fertilização não ocorra. Deste modo, a vida fértil do espermatozoide é restringida e a fertilidade é determinada pela proporção de espermatozoides crio capacitados presente na dose inseminante (Bailey et al., 2003).

3.2. Composição da membrana plasmática e resistência ao processo de congelamento-descongelamento

De acordo com o modelo de mosaico fluido, as membranas biológicas são caracterizadas como um fluido bidimensional de proteínas e lipídios. A estrutura da bicamada da membrana é resultado da combinação entre interações hidrofóbicas e hidrofílicas. Nesta composição, as cadeias de ácidos graxos dos fosfolipídios são sequestradas para longe do contato com a água, enquanto os grupos iônicos ou zwitteriônicos (grupos neutros, que contêm cargas opostas em átomos diferentes) estão em contato direto com a fase aquosa na superfície exterior da bicamada (Singer e Nicolson, 1972).

A composição da membrana plasmática espermática, quanto ao seu teor de colesterol, aos tipos de fosfolipídios e de cadeias de ácido graxos, está relacionada diretamente com a resistência do espermatozoide às crioinjúrias. Na constituição da membrana plasmática, os espermatozoides de humanos e de coelhos possuem maior proporção de colesterol em relação aos fosfolipídios (0,99 e 0,88, respectivamente), quando comparados com os espermatozoides de bovinos e ovinos (0,45 e 0,38, respectivamente). O conteúdo de colesterol na membrana plasmática do espermatozoide confere, à essa membrana, fluidez e resistência ao congelamento (Darin-Bennett e White, 1977).

Na composição dos fosfolipídios da membrana plasmática, a relação entre os teores de ácidos graxos poli-insaturados e de ácidos graxos saturados influencia a resistência da membrana à peroxidação lipídica. Os espermatozoides de humanos e de coelhos possuem essa relação perto de 1, enquanto os espermatozoides de bovino, ovino e suíno apresentam uma relação maior, com valores entre 2,5 e 3,3 (Poulos et al., 1973). A maior porcentagem de ácidos graxos poli-insaturados no espermatozoide destas últimas espécies fragiliza a membrana plasmática contra o estresse térmico (Darin-Bennett e White, 1977). Além disso, os ácidos graxos poli-insaturados são os principais alvos da peroxidação lipídica (humano; Jones et al., 1979), principalmente os ácidos docosa-hexanóico e araquidônico (humano: Jones e Mann, 1976; Alvarez e Storey, 1995).

O espermatozoide bubalino é considerado muito sensível ao processo de congelamento-descongelamento, devido, principalmente, aos seus teores de fosfolipídios e de colesterol. O conteúdo de fosfolipídios no espermatozoide bubalino, em média, é de 0,548 mg/10⁹ células, enquanto, por exemplo, o espermatozoide bovino possui 0,416 mg/10⁹ células. Nos espermatozoides bubalinos, a distribuição de ácidos graxos saturados (47,8 %) e de insaturados (49,8 %) é quase igual, porém o conteúdo de ácidos graxos poli-insaturados é alto (>70 % dos ácidos graxos insaturados). O teor de colesterol no espermatozoide bubalino é de 21,67 µg/10⁸ células (Van Tran et al., 2017), enquanto a proporção de colesterol em relação aos fosfolipídios é de aproximadamente 0,3 (Rajoriya et al., 2016).

3.3. Fisiopatogenia do estresse oxidativo

O metabolismo de oxigênio produz, inevitavelmente, ânion superóxido (O₂^{•-}), radical hidroxil (OH[•]) e peróxido de hidrogênio (H₂O₂), especialmente na redução do oxigênio pelo sistema de transferência de elétrons na mitocôndria. Estas três espécies, juntamente com os intermediários instáveis da peroxidação de lipídios, são referenciadas como espécies reativas de oxigênio (Winterborn, 2008).

Em concentrações fisiológicas, as ERO auxiliam diversas reações bioquímicas, porém em desequilíbrio podem exercer efeito deletério sobre as células espermáticas (humano; Kothari et al., 2010). O estresse oxidativo é definido como o desequilíbrio entre oxidantes e antioxidantes,

em favor dos oxidantes, levando a uma interrupção da sinalização e controle redox e/ou dano molecular (Sies, 2007).

Durante o processamento do sêmen para a criopreservação (resfriamento ou congelamento), o espermatozoide é submetido a várias situações adversas que podem induzir a produção exacerbada de ERO ou a redução do sistema antioxidante, deixando-o sujeito ao estresse oxidativo. Os danos oxidativos foram relacionados a queda da fertilidade do espermatozoide humano (Aitken e Clarkson, 1988; Oehninger et al., 1995), murino (Mammoto et al., 1996), bovino (Blondin et al., 1997) e suíno (Roca et al., 2005).

3.3.1. Formação de espécies reativas de oxigênio

O ânion superóxido é formado pela adição de um elétron ao oxigênio molecular, processo mediado pela nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfatase [NAD(P)H] oxidase ou pela xantina ou pela cadeia transportadora de elétrons da mitocôndria. Sob a ação de superóxido dismutases ou de maneira espontânea, o $O_2^{\cdot-}$ é convertido em H_2O_2 (revisado por Fridovich, 1997).

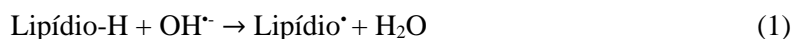
O peróxido de hidrogênio também é produzido pela xantina oxidase, pela aminoácido-oxidase e pela NAD(P)H oxidase, com o consumo de um oxigênio molecular em reações metabólicas. Nas reações de Haber-Weiss e Fenton, com a presença de metais de transição como Fe^{2+} e Cu^{2+} , o H_2O_2 é quebrado em OH^{\cdot} (revisado por Barbusiński, 2009).

O radical hidroxil também pode ser gerado pela reação espontânea entre $O_2^{\cdot-}$ e H_2O_2 . Este radical é o mais reativo das ERO, podendo danificar proteínas, carboidratos, lipídios e ácidos nucleicos (DNA e RNA), além de ser o iniciador da peroxidação lipídica ao tomar um elétron de ácidos graxos poli-insaturados. Uma vez iniciada, as reações em cadeia da peroxidação lipídica podem formar os radicais peroxil e hidroperoxil. Os radicais hidroperoxil lipídicos são muito instáveis e se decompõem facilmente em produtos secundários, como aldeídos e malondialdeído (MDA) (revisado por Birben et al., 2012).

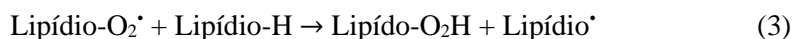
3.3.2. Peroxidação lipídica

A peroxidação lipídica é considerada como um dos principais mecanismos moleculares envolvidos no dano oxidativo de estruturas celulares (Repetto et al., 2012). Ela envolve a formação e propagação de radicais lipídicos, reações com o oxigênio, rearranjo de duplas ligações de lipídios insaturados e eventual destruição de membranas lipídicas, com produção de subprodutos como: álcoois, cetonas, alcanos, aldeídos e éteres (Dianzani e Barrera, 2008).

A peroxidação lipídica acontece em três etapas, nomeadas de iniciação, propagação e terminação. O ataque de qualquer espécie que contenha reatividade suficiente para abstrair um átomo de hidrogênio pode dar início à peroxidação lipídica na membrana (vide reação 1). Como o átomo de hidrogênio só contém um elétron, ele deixa para trás um elétron desemparelhado no átomo de carbono. O radical carbono (Lipídio $^{\cdot}$) gerado no ácido graxo poli-insaturado tende a ser estabilizado por um rearranjo molecular que produz um dieno conjugado, que reage rapidamente com O_2 e gera um radical hidroperoxil (Lipídio- O_2^{\cdot}) (vide reação 2). O radical hidroperoxil abstrai átomos de hidrogênio de outras moléculas lipídicas, dando continuidade à reação em cadeia da peroxidação lipídica (vide reação 3). O radical hidroperoxil combina com o átomo de hidrogênio que ele abstrai, gerando um hidroperóxido lipídico (Lipídio- O_2H) (vide reação 3) (Halliwell e Gutteridge, 1984).



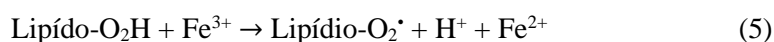
(depois do rearranjo molecular)



A decomposição do hidropéroxido pode ser catalisada por metais de transição, contribuindo para a propagação da peroxidação lipídica em membranas lipídicas. Compostos de ferro reduzido reagem com hidropéroxido lipídico, gerando radical alcoxil (Lipídio-O[•]).



Com um composto de Fe(III) é formado um radical peroxil (Lipídio-O₂[•])



Tanto o radical alcoxil como o radical peroxil são capazes de estimular as reações em cadeia da peroxidação lipídica, ao abstrair outro átomo de hidrogênio (equação 3) (Halliwell e Gutteridge, 1984). A fase de terminação da peroxidação lipídica diz respeito à conversão de radicais na forma não radical. O radical alcoxil pode interagir com outro radical e formar R-R, o radical peroxil pode interagir com radical alquil e formar ROOR e dois radicais peroxil podem interagir e formar ROOR e O₂ (Lahir, 2015).

3.3.3. Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio no espermatozoide

Para o espermatozoide, o peróxido de hidrogênio é o mais prejudicial de todos os pró-oxidantes, formado principalmente em temperatura ambiente (animais domésticos; Vishwanath e Shannon, 1997). A enzima L-aminoácido oxidase, presente na membrana do espermatozoide (bovino; Shannon e Curson, 1981; equino; Aitken et al., 2015), é liberada ativada por espermatozoides mortos (bovino; Shannon e Curson, 1972). Esta enzima produz peróxido de hidrogênio e amônia pela desaminação oxidativa de fenilalanina, de tirosina e de triptofano (bovino; Macmillan et al., 1972).

O processo de congelamento e descongelamento de espermatozoides suínos aumenta a produção de H₂O₂, sem alterar a concentração de O₂^{•-}, provavelmente pela curta meia vida do O₂^{•-} e pela alta atividade da enzima superóxido dismutase nos espermatozoides suínos (Kim et al., 2011). O aumento da concentração de H₂O₂ não afeta instantaneamente a viabilidade da membrana plasmática, porém está relacionada com a redução da motilidade espermática (ovino, Peris et al., 2007; suíno, Awda et al., 2009; macaco, McCarthy et al., 2010). Da mesma maneira, o dano causado ao DNA de espermatozoides humanos pelo H₂O₂ parece acontecer mais tardiamente (2-24 h), após o estresse oxidativo (Li et al., 2006).

Apesar do cálcio não participar diretamente da cadeia respiratória ou de processos de oxidação e redução, a homeostase mitocondrial do cálcio é fundamental para o funcionamento desta organela (Peng e Jou, 2010). O aumento da produção de H₂O₂ pelo espermatozoide induz o aumento da concentração de cálcio citoplasmático, causando: prolongamento da abertura de poros mitocondriais; redução do potencial de membrana mitocondrial; alteração da fosforilação oxidativa; diminuição da produção de ATP; e aumento da produção de ERO (humano; Treulen et al., 2015).

A abertura breve dos poros de permeabilidade transitória mitocondrial (PPTm) é fisiologicamente importante para a manutenção saudável da homeostase da mitocôndria. A ativação desses poros pelo estresse oxidativo provoca alteração do ambiente redox intra e inter-mitocondrial, levando à

liberação de ERO. Esse ciclo regenerativo de formação e liberação de ERO mitocondrial é chamado de Liberação de ERO induzida por ERO. Brevemente, a liberação de ERO associada à abertura reversível de PPTm aparentemente constitui uma função de adaptação para a liberação de ERO e Ca^{2+} , quando há acúmulo dessas moléculas em níveis potencialmente tóxicos. Contudo, em quantidades mais elevadas de ERO, acontece um prolongamento da abertura de tais poros, com liberação de uma grande quantidade de ERO levando à destruição da mitocôndria, que se propaga de mitocôndria para mitocôndria, destruindo a célula como um todo (revisado por Zorov et al., 2014).

A mitocôndria é a fonte mais importante de ERO em células altamente susceptíveis, embora outras fontes possam estar envolvidas. O ânion superóxido produzido no complexo III (coenzima-Q citocromo-C redutase) da cadeia transportadora de elétrons é rapidamente dismutado em peróxido de hidrogênio no citoplasma e liberado para o meio extracelular, causando pouco dano oxidativo na célula. Enquanto as ERO produzidas pelo complexo I (NADH-ubiquinona oxidoreductase) da cadeia transportadora de elétrons são mantidas na matriz mitocondrial, os danos oxidativos no espermatozoide humano só foram detectados quando a concentração de ERO na matriz mitocondrial atingiu altas concentrações (humano; Koppers et al., 2008).

A alteração do complexo I da cadeia transportadora de elétrons na mitocôndria reduziu a motilidade de espermatozoides equinos, devido à redução da produção de ATP e aumento da produção de ERO (Davila et al., 2015). A presença de ácidos graxos poli-insaturados no espermatozoide desencadeia a produção de ERO mitocondrial, pelos complexos I e III da cadeia transportadora de elétrons, o que sobrecarrega o sistema antioxidante celular. Isso resulta no estado de estresse oxidativo, que induz danos peroxidativos na membrana espermática, redução da motilidade e aumento da fragmentação do DNA (humano; Koppers et al., 2008).

O peroxinitrito (ONOO^-) foi relacionado com a queda da viabilidade de espermatozoides humanos, com redução ou inibição da motilidade ao inibir a produção de ATP, tanto pela via fosforilação oxidativa quanto pelas enzimas da via glicolítica (Uribe et al., 2016). O peroxinitrito causa a oxidação de grupos tiol presentes, por exemplo, em enzimas, proteínas estruturais e moléculas antioxidantes. A produção de ONOO^- foi associada à queda da motilidade de espermatozoides humanos, sendo sugerida a lesão do axonema e não da membrana plasmática, devido à maior porcentagem de espermatozoides imóveis do que com membrana danificada (Cabrillana et al., 2016).

O 4-hidroxinonal (4-HNE), produto da oxidação dos ácidos graxos poli-insaturados ω -6, tem sua produção aumentada depois do congelamento e descongelamento de espermatozoides equinos, sendo um marcador do estresse oxidativo e relacionado com ejaculados de baixa qualidade pós-descongelamento (Muñoz et al., 2016). As mitocôndrias da peça intermediária do espermatozoide são o principal alvo do 4-HNE com o ataque à succinato desidrogenase e alteração do metabolismo mitocondrial, causando o aumento da produção de ERO (humano; Aitken et al., 2012). O aumento de 4-HNE foi relacionado com o aumento da atividade da caspase-3 em espermatozoides equinos (Muñoz et al., 2016).

Cronologicamente, o dano causado pelo 4-HNE acontece primeiro na mitocôndria com aumento da produção de ERO mitocondriais, para mais tarde acontecer a redução da motilidade espermática e do potencial de membrana mitocondrial. A liberação de citocromo-c da mitocôndria, acontece antes de alterações de viabilidade ou outras alterações apoptóticas. O processo apoptótico demorou mais a ser percebido, com aumento significativo da fragmentação do DNA 72 h após a exposição ao 4-HNE (humano; Aitken et al., 2012). A liberação gradual de citocromo-c favorece a formação mitocondrial de O_2^- de duas formas: a) o citocromo-c é um

sequestrador de $O_2^{\cdot-}$ e b) como o citocromo-c é liberado, a cadeia respiratória fica limitada, uma vez que o fluxo de elétrons entre o Complexo III e IV fica prejudicado (Cai e Jones, 1998).

O estresse osmótico induz a produção de $O_2^{\cdot-}$, tanto em condição hipo quanto hiperosmótica. Em espermatozoides equinos, o estresse hiperosmótico induz a produção deste radical e a fosforilação de tirosina em proteínas, tendo sido proposto que o envolvimento da fosfolipase A_2 e de seus produtos na ativação da NAD(P)H oxidase causa aumento da produção de $O_2^{\cdot-}$ (Burnaugh et al., 2010). A atividade da fosfolipase A_2 também influencia na peroxidação lipídica da membrana de espermatozoides equinos, com consequente queda de motilidade espermática (Awda et al., 2009).

3.3.4. Estresse oxidativo e fertilidade

Espermatozoides de garanhões mais férteis apresentam menor viabilidade de membrana e mais danos oxidativos que espermatozoides de garanhões menos férteis. Foi sugerido que espermatozoides dos animais mais férteis são metabolicamente mais ativos e esgotam-se mais cedo, com acúmulo de subprodutos metabólicos, tais como ERO e aldeídos lipídicos (Gibb et al., 2014). A produção de $O_2^{\cdot-}$ é essencial para o estímulo da hiperativação e início e progressão do processo de capacitação espermática (humano; Lamirande e Gagnon, 1995). Contudo, a liberação de $O_2^{\cdot-}$ pela cadeia transportadora de elétrons da mitocôndria aumenta a peroxidação lipídica, levando à perda de motilidade e de viabilidade (equino; Gibb et al., 2014).

O espermatozoide que sofre estresse oxidativo pode ser caracterizado pelo acúmulo de hidroperóxidos lipídicos em sua membrana plasmática, que são relativamente estáveis até que sejam induzidos à decomposição, como no ensaio de TBA (Teste do Ácido 2-Tiobarbitúrico), quando por adição do promotor íon ferroso liberam MDA. O potencial do espermatozoide em gerar MDA está associado com o comprometimento da sua capacidade de fusão com o oócito (humano; Aitken et al., 1993), assim como a alta produção de ERO está correlacionada com a inabilidade do espermatozoide humano em se ligar a oócitos de hamster livres de zona pelúcida (Aitken e Clarkson, 1987) e com a redução da fertilidade *in vivo* (Aitken et al., 1991).

A redução da habilidade do espermatozoide de fundir-se ao oócito também é correlacionada com as mudanças físicas e químicas causadas pelo H_2O_2 a esta célula. A rigidez da membrana induzida por peróxidos (Block, 1991) pode estar relacionada com a inabilidade do espermatozoide de iniciar os eventos de fusão de membrana associados à reação acrossômica e à fusão com o oócito. Apesar do dano oxidativo ao DNA não afetar diretamente a fertilidade do espermatozoide, influencia sua habilidade em suportar um desenvolvimento embrionário normal (humano; Lewis e Aitken, 2005).

3.4. Atividade antioxidante do espermatozoide e do plasma seminal

O sêmen é constituído pela suspensão de espermatozoides em um meio fluido chamado de plasma seminal. O espermatozoide é uma célula altamente especializada, com um conjunto de características estruturais e funcionais que lhe proporcionam a capacidade de entregar ao oócito o genoma masculino (Eddy, 2006).

O espermatozoide é estruturalmente dividido em cabeça e cauda, unidos pela peça de ligação (pescoço). A cabeça contém o núcleo, o acrossoma, estruturas do citoesqueleto e uma pequena quantidade de citoplasma. A partir do pescoço a cauda é dividida em peça intermediária, peça principal e peça final. Ela contém um complexo central que forma o axonema, que é rodeado por fibras densas externas, que se estendem desde o pescoço até a peça principal. A peça intermediária contém a bainha mitocondrial, uma hélice fortemente envolvida de mitocôndrias que rodeiam as

fibras externas densas e o axonema. A cauda, assim como a cabeça, possui pouco citoplasma e é intimamente relacionada com a membrana plasmática. Embora a maioria dos espermatozoides de mamíferos possuam essas características gerais, existem diferenças espécie-específicas no tamanho, na forma e nos constituintes (Eddy, 2006).

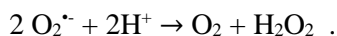
O plasma seminal é um fluido complexo e intermedeia as funções químicas do ejaculado. Os componentes bioquímicos do plasma seminal são secretados pelo epidídimo, pela ampola, pelas glândulas vesiculares, pela próstata e pelas glândulas bulbouretrais (Senger, 2003). A função do plasma seminal na fisiologia normal é associada à ejeção dos espermatozoides e subsequente sobrevivência destas células no trato reprodutor feminino. O plasma seminal é composto por íons (Na^+ , K^+ , Zn^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} , Cl^-), substratos energéticos (frutose, sorbitol, glicerilfosfolina), compostos orgânicos (ácido cítrico, aminoácidos, peptídeos, proteínas de baixo e alto peso molecular, lipídios, hormônios e citocinas), entre outros (revisado por Juyena e Stelletta, 2012).

Como discutido anteriormente, o metabolismo celular produz ERO, que estão envolvidas em alguns processos fisiológicos do espermatozoide. A manutenção da concentração fisiológica das ERO é realizada por componentes do espermatozoide e do plasma seminal que possuem atividade antioxidante. As moléculas de defesa antioxidante são classificadas em duas categorias: enzimáticas e não-enzimáticas. Fazem parte da defesa antioxidante enzimática a superóxido dismutase (SOD), a catalase, a glutathione peroxidase, entre outras enzimas; e da defesa antioxidante não enzimática, moléculas como α -tocoferol (vitamina E), β -caroteno (vitamina A), ascorbato (vitamina C), glutathione, taurina e seus precursores, e outros tipos moleculares (Mruk et al., 2002).

3.4.1. Atividade de antioxidantes enzimáticos no sêmen

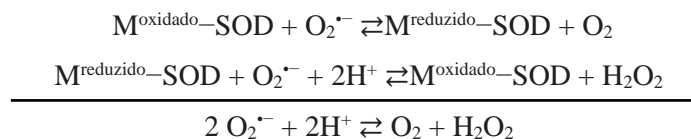
3.4.1.1. Superóxido dismutase (SOD)

A enzima superóxido dismutase é uma metaloproteína que catalisa a dismutação do ânion superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$), representada na seguinte equação:



O $\text{O}_2^{\cdot-}$ é um intermediário comum da redução do oxigênio e, por ser um substrato instável, pode estar presente apenas em pequenas quantidades. A reação de dismutação do $\text{O}_2^{\cdot-}$ acontece em rápida taxa, mesmo na ausência da enzima. Ainda assim, a enzima é essencial para a sobrevivência de células aeróbicas. Em sistemas com pH próximo ao neutro (7,4), a reação da enzima com o ânion superóxido acontece muito mais rapidamente ($\times 10^4$) que a reação de dismutação espontânea. Além disso, em condições normais, a concentração da enzima dentro das células excede a concentração do ânion, sendo maior a probabilidade de o ânion colidir com a enzima do que com outro ânion (Fridovich, 1975).

Dependendo do metal de transição encontrado em seu sítio ativo, a SOD é categorizada em 3 tipos: cobre/zinco (Cu/Zn) SOD, manganês (Mn) SOD e ferro (Fe) SOD. A Cu/Zn SOD é encontrada principalmente no citoplasma de células eucariontes, em cloroplastos e em algumas bactérias; a Mn SOD em mitocôndrias de eucariontes e procariontes e; a Fe SOD em procariontes (revisado por Mruk et al., 2002). Todas as SODs conhecidas precisam de um metal de transição redox ativo em seu sítio ativo para realizar a degradação catalítica do ânion superóxido. O mecanismo genérico da dismutação dependente da metaloenzima está descrito a seguir.



Os metais cofatores catalisam tanto uma oxidação de um elétron (ver primeiro passo) quanto uma redução de um elétron (segundo passo) de $\text{O}_2^{\cdot-}$ para dar a reação global (Culotta et al., 2006).

A atividade da SOD é encontrada no espermatozoide e no plasma seminal de ovinos, bovinos, equinos, asininos, suínos, humanos (Mennela e Jones, 1980), bubalinos (Nair et al., 2006) e caninos (Koziorowska-Gilun e Strzeżek, 2011). No espermatozoide, são encontradas SODs pertencentes ao grupo de proteínas de superfície da membrana plasmática e outro grupo ligadas às organelas (suíno, Orzolek et al., 2013). A SOD do citoplasma espermático é uma enzima com duas subunidades, cada uma contendo um átomo de cobre e um de zinco (suíno; Mennella e Jones, 1980; bovino; Magnes e Li, 1980; humanos; Peeker et al., 1997).

A atividade da SOD no espermatozoide está relacionada com melhor motilidade e viabilidade espermáticas após a refrigeração (4 °C) (bovino e bubalino, Nair et al., 2006). Após o congelamento e descongelamento, o espermatozoide perde atividade da SOD, talvez por perda da enzima para o meio extracelular (humano, Lasso et al., 1994; bovino, Beorlegui et al., 1997; ovino, Marti et al., 2008) ou por inativação da enzima pela baixa temperatura (bovino, Beorlegui et al., 1997). A queda da atividade no espermatozoide e o aumento da atividade no plasma seminal da SOD, durante o armazenamento refrigerado, reforçam a hipótese de perda citoplasmática desta enzima (bovino e bubalino, Nair et al., 2006). Menor peroxidação lipídica é diretamente correlacionada com a atividade de SOD no espermatozoide (canino, Cassani et al., 2005).

No plasma seminal, as SODs encontradas são do tipo extracelular contendo Cu/Zn SOD (EC-SOD; enzima tetramérica com quatro átomos de cobre e quatro de zinco em cada molécula) (humano, Peeker et al., 1997; suíno, Kowalowka et al., 2008) e do tipo citoplasmático (humano; Peeker et al., 1997). A SOD do plasma seminal apresenta atividade em diferentes pH (7,5-10,5), com atividade máxima em pH 9,5. A inativação dessa enzima acontece em temperaturas maiores que 50 °C, e aos 80 °C a atividade da SOD foi completamente inibida (suíno, Kowalowka et al., 2008). Na ejaculação, 90 % da EC-SOD perde a alta afinidade por heparina, desse modo apenas uma pequena porção dessa enzima permanece capaz de se ligar ao espermatozoide (humano; Peeker et al., 1997).

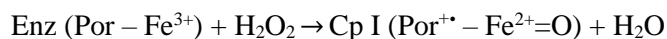
A expressão de CuZnSOD no plasma seminal humano apresenta forte correlação positiva com a motilidade espermática e a expressão de MnSOD com a porcentagem de espermatozoides morfológicamente normais (Macanovic et al., 2015). Em cães astenozoospermicos (motilidade espermática < 50 %), a atividade da superóxido dismutase do plasma seminal é menor que de cães com espermatozoides com motilidade normal (Kawakami et al., 2007). A atividade de SOD do plasma seminal foi correlacionada com a maior motilidade espermática e menor peroxidação lipídica, no pós-descongelamento (bovino, Beorlegui et al., 1997; canino, Neagu et al., 2011).

A atividade da SOD no plasma seminal é maior que a atividade da catalase, e a motilidade espermática em meio contendo SOD também é maior que em meio contendo catalase, por isso acredita-se que a SOD é uma enzima antioxidante mais efetiva e mais importante para manutenção da motilidade espermática (canino, Kawakami et al., 2007). A superóxido dismutase é sensível a altas concentrações de H_2O_2 e como durante a dismutação do $\text{O}_2^{\cdot-}$ ela produz peróxido de hidrogênio, sua habilidade antioxidante depende da eliminação do excesso de H_2O_2 . Por isso, a atividade da SOD ligada a ação de enzimas como a catalase e peroxidases (Bowler et al., 1992).

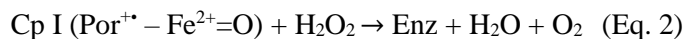
3.4.1.2. Catalase (CAT)

Existem algumas diferenças entre espécies de mamíferos na sequência de aminoácidos que compõe a catalase, contudo, as sequências de aminoácido com importância funcional ao conservadas. A catalase de mamíferos é um homotetrâmero (complexo proteico com quatro subunidades iguais) com subunidades de baixo peso molecular (~ 60 kDa). Cada subunidade contém um grupo heme, ferriprotoporfirina IX, no sítio ativo. O grupo heme fica localizado internamente e é acessível por uma passagem estreita, explicando a capacidade da enzima de utilizar apenas substratos de tamanho pequeno (revisado por Kirkman e Gaetani, 2007).

Na reação catalítica, o H₂O₂ oxida o ferro do grupo heme da enzima em repouso para formar um grupo oxiferril com um radical porfirina π -catiônica, designado composto I:



Esta etapa é seguida pela oxidação de uma segunda molécula de H₂O₂ pelo composto I:



O somatório das equações 1 e 2 é: $2 \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow 2\text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$. 'Enz' denota o estado de repouso ou de base da enzima (também chamada de ferricatalase) e 'Cp' (composto) se refere aos outros estados da enzima (Zidoni e Kremer, 1974).

A catalase é inativada pelo ânion superóxido e pelo radical hidroxil. Dessa maneira, no caso de estresse oxidativo tal inibição poderia ocorrer, levando a um irreversível processo auto catalítico em que a taxa de produção dos oxidantes será continuamente aumentada, levando à morte celular (Pigeolet et al., 1990).

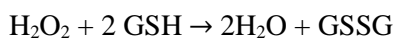
Em espermatozoides, a atividade da catalase é muito baixa comparada a de outras enzimas (SOD, GPx e GSH) no sêmen fresco e chega a zero após o congelamento e descongelamento (bovino, Bilodeau et al., 2000; bubalinos, Kadirvel et al., 2014). Nenhum traço de atividade da catalase foi encontrada em espermatozoides caninos in natura (Strzeżek et al., 2009). Para o espermatozoide, a atividade da catalase na decomposição do peróxido de hidrogênio parece ser menos importante que a atividade da glutathiona peroxidase (canino, Kozirowska-Gilun e Strzeżek, 2011).

Os achados para a catalase no plasma seminal são controversos. A atividade da catalase no plasma seminal de equinos é alta e relacionada com a presença de gotas citoplasmáticas proximais (Ball et al., 2000). A expressão de catalase no plasma seminal apresentou correlação positiva com a motilidade e a morfologia normal espermáticas (bubalinos, Alavi-Shoushtari et al., 2009; humanos, Macanovic et al., 2015) e relação com menor produção de MDA (humanos, Tavilani et al., 2008). Enquanto no estudo de Shiva et al., 2011 (humano) a atividade da catalase no plasma seminal não representa nenhuma influência sobre a motilidade e a morfologia espermáticas. As diferenças nos métodos de ensaio para a determinação da atividade da catalase entre os estudos dificultam a comparação direta.

3.4.1.3. Glutathiona peroxidase (GPx)

A glutathiona peroxidase é uma enzima tetramérica, com monômeros simétricos molecularmente, constituídos por uma cadeia de peptídica única com 178 resíduos de aminoácido. Os sítios ativos da GPx estão localizados em depressões planas na superfície molecular, sendo cada centro ativo composto por duas subunidades. Selenocisteínas cataliticamente ativas são encontradas na extremidade N-terminal das longas α -hélices de cada subunidade (Ladenstein et al., 1979). Essa enzima é capaz de eliminar tanto o peróxido de hidrogênio como hidroperóxidos lipídicos

protegendo a membrana plasmática contra a desintegração oxidativa (Rotruck et al., 1973). A GPx transforma peróxidos tóxicos em moléculas não tóxicas:



(Petiau-De Vries e Baeyens-Volant, 2000).

A GPx precisa reduzir a glutatona (GSH) para detoxificar peróxidos. Quando oxidada (GSSG), a glutatona é reduzida de volta a GSH pela glutatona reductase. A glutatona reductase é uma enzima dimérica que contém FAD em seus sítios ativos, que utilizam NADPH para reduzir GSSG. NADPH é regenerado a partir da reação catalisada pela glicose-6-fosfato desidrogenase durante o ciclo das pentoses fosfato (Michiels et al., 1994). Deste modo, a reciclagem de GSH reduzida é essencial para a manutenção da atividade da GPx no espermatozoide (humano, camundongo, coelho, Alvarez e Storey, 1989).

A atividade de GPx é encontrada nos espermatozoides e plasma seminal de bovinos (Brown et al., 1977), de humanos (Saaranen et al., 1989), de ovinos (Kasimanickam et al., 2006), de suínos (Jelezarsky et al., 2008), de caninos (Koziorowska-Gilun e Strzeżek, 2011) e de bubalinos (Waheed et al., 2013).

No espermatozoide, a GPx é mais importante na decomposição do H_2O_2 que a catalase (canino, Koziorowska-Gilun e Strzeżek, 2011). Na ausência de catalase ou com expressão muito fraca desta enzima, a GPx torna-se a maior proteção contra o ataque ao espermatozoide mediado por peróxido de hidrogênio. Contudo, enquanto a atividade da catalase é maior em altas concentrações de H_2O_2 ($>10^{-6}$ M), a GPx garante o ajuste fino das concentrações de H_2O_2 sob condições fisiológicas (humano, Drevet, 2006). A ação da GPx é dependente da redução da glutatona oxidada (GSSH). Essa reciclagem é feita pela glutatona reductase (GR) e necessita de NADPH como cofator redutor. Como o ciclo das pentoses fosfato é a principal fonte de NADPH no espermatozoide, a inibição dessa via metabólica pode ser um importante fator de inativação da proteção exercida pelo sistema antioxidante dependente de glutatona (humano, Griveau et al., 1995).

No espermatozoide de homens normozoospermicos, a absorção da GPx do plasma seminal pela superfície da membrana plasmática proporciona proteção contra a peroxidação lipídica de fosfolipídios e de ácidos graxos ligados aos fosfolipídios (Tavilani et al., 2008). O hidroperóxido lipídico é um intermediário chave da peroxidação lipídica e a remoção desse hidroperóxido pela GPx protege os espermatozoides contra essa reação em cadeia (humano, camundongo, coelho, Alvarez e Storey, 1989).

A atividade de GPx do plasma seminal foi correlacionada negativamente com a velocidade espermática (CASA) após o descongelamento (canino; Neagu et al., 2011). No plasma seminal de homens astenozoospermicos, a atividade da GPx não difere da atividade dessa enzima no plasma seminal de normozoospermicos, apesar da peroxidação lipídica ser maior no sêmen da primeira categoria (Hsieh et al., 2006; Tavilani et al., 2008). Apesar da atividade da GPx não ser alterada após o congelamento e descongelamento (humano, Alvarez e Storey, 1992; ovino, Marti et al., 2008), a distribuição desta enzima muda consideravelmente na membrana plasmática do espermatozoide. Após o descongelamento, aumenta a subpopulação de espermatozoides com GPx nas regiões pós-acrossomal, apical e cauda (ovino, Marti et al., 2008).

3.4.2. Atividade de antioxidantes não-enzimáticos no sêmen

3.4.2.1. Ácido ascórbico (Vitamina C)

Estruturalmente, o ácido ascórbico é uma das vitaminas mais simples. É relacionada aos açúcares de C₆, pertencente ao grupo orgânico das lactonas, que são ácidos carboxílicos que se transformam em ésteres cíclicos. A dissociação do segundo hidroxil acontece em pH 11,6. Sua molécula polar possui quatro hidroxilas (OH^{*}), sendo que duas delas estão na posição C=C e podem interagir entre si por pontes de hidrogênio, resultando num aumento de acidez da vitamina C (Davey et al., 2000).

O ácido ascórbico pode agir como um antioxidante quebrador de cadeia na peroxidação lipídica. Essa molécula pode tanto reagir diretamente com radicais peroxil ou indiretamente, pela redução do radical α -tocoferoxilo para regenerar o α -tocoferol (vitamina E). Em pH fisiológico, o ácido ascórbico existe como um ânion monovalente (AH⁻ - ascorbato, pKa = 4,25). O composto também pode sofrer um processo de oxidação reversível de dois passos para formar o ácido dehidroascórbico (A), com a formação de um radical ascorbil (A^{-•}) como um intermediário (Fig. 1). A natureza deslocalizada do elétron desapareado do radical ascorbil o torna relativamente não reativo. Dessa maneira, o radical ascorbil é capaz de reagir com outros radicais livres, terminando efetivamente a propagação de reações de peroxidação lipídica do ambiente em que está envolvido: $2 A^{\bullet} + H^+ \rightarrow AH^- + A$ (Bendich et al., 1986).

Presença de ácido ascórbico no plasma seminal de suínos (Strzeżek et al., 1999), de humanos (Song et al., 2006), de bovinos e de bubalinos (Banerjee e Ganguli, 1973). A concentração de ácido ascórbico detectada no plasma seminal está relacionada com maior porcentagem de espermatozoides normais, menor produção intracelular de ERO (humano, Thiele et al., 1995) e maior integridade do DNA de espermatozoides (humanos, Song et al., 2006). Homens inférteis apresentam menor concentração de ácido ascórbico no plasma seminal que pacientes saudáveis (Thiele et al., 1995).

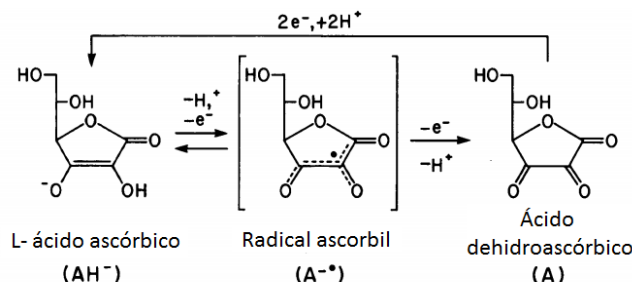
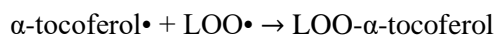
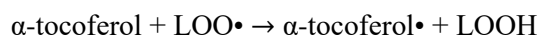


Figura 1. Oxidação do ácido ascórbico. Adaptado de Bendich et al., 1986

3.4.2.2. Alfa-tocoferol (Vitamina E)

A vitamina E é um inibidor eficaz da etapa de propagação da peroxidação lipídica. Cada molécula de α -tocoferol pode reagir com dois radicais peroxil, como mostrado abaixo:



O primeiro produto é o radical α -tocoferoxilo (α -tocoferol[•]), que é um radical centrado no oxigênio, estabilizado por ressonância. O radical α -tocoferoxilo pode reagir com outro radical peroxil para formar um aducto estável (Krinsky, 1992).

O α -tocoferol pode formar complexos estáveis com fosfolipídios de membrana contendo resíduos araquidonil, nos quais os grupos metil dos carbonos C4' e C8' do tocoferol se encaixam em regiões criadas pelas duplas ligações *cis* do ácido graxo. Essa interação permite que a vitamina E se ancore em membranas biológicas. A formação desse complexo inibe a destruição oxidativa de ácido graxos poli-insaturados das membranas e confere estabilidade à membrana (Lucy, 1972).

A concentração de α -tocoferol no espermatozoide é diretamente associada com a atividade das enzimas SOD e GPx, com a porcentagem de espermatozoides móveis e com a porcentagem de espermatozoides normais (humano, Thérond et al., 1996). No espermatozoide de homens com sêmen normozoospermico a concentração de α -tocoferol é maior que daqueles com sêmen astenoteratozoospermico (Nouri et al., 2008).

3.4.2.3. Taurina/hipotaurina

A taurina (ácido 2-aminoetanossulfônico) é um β -aminoácido livre, presente em altas concentrações em diversos tipos celulares. Duas fontes de taurina podem explicar as concentrações intracelulares deste aminoácido: uma via biossintética a partir da cisteína e/ou a absorção específica a partir do espaço extracelular. A taurina extracelular pode ser proveniente de fontes alimentares ou de alguns tecidos que é sintetizado e libertado em circulação. A biossíntese de taurina envolve a formação de hipotaurina (precursor imediato de taurina) através da participação de cisteína-ácido sulfínico descarboxilase (enzima limitante para a síntese de taurina) (revisado por Wright et al., 1986). Nas células espermáticas, a taurina é o aminoácido presente em maior concentração e tem origem extracelular, sendo absorvida principalmente durante o trânsito epididimário do espermatozoide (Holmes et al., 1992a).

A taurina não reage com H_2O_2 ou com $O_2^{\cdot-}$, porém é capaz de sequestrar o radical hidroxil, apesar de ser menos eficiente que o manitol. O produto da reação de taurina com HOCl ainda é suficientemente oxidante, sendo capaz de inativar a α_1 -antiproteínase, a principal alvo extracelular de ataque HOCl *in vivo*. Entretanto a hipotaurina (ácido 2-aminoetanossulfínico) é um ótimo sequestrador de HOCl, assim como de OH^{\cdot} , mas também é incapaz de reagir com H_2O_2 ou com $O_2^{\cdot-}$ (Aruoma et al., 1988).

A concentração de taurina e de hipotaurina é maior no espermatozoide que no plasma seminal (humanos, Holmes et al., 1992b). A hipotaurina está presente no espermatozoide e no plasma seminal de suínos, de bovinos, de caninos (Van Der Horst e Grooten, 1966), de hamster, de cobaias (Meizel et al., 1980), de humanos (Holmes et al., 1992b). Nos espermatozoides de homens inférteis, a concentração a baixa concentração de hipotaurina e a alta concentração de taurina sugerem que a oxidação de hipotaurina em taurina pode acontecer em espermatozoides de baixa qualidade (Holmes et al., 1992b).

3.5. Avaliação da motilidade e cinética espermáticas por sistema computadorizado (CASA)

O CASA (Computer Assisted Sperm Analysis) é um sistema automático que permite a avaliação objetiva de diferentes características espermáticas: motilidade, velocidade e morfologia. Utilizando a imagem digital do trajeto de cada célula espermática, os sistemas CASA são capazes de analisar, processando algoritmos, as propriedades da motilidade espermática (Verstegen et al., 2002).

Os parâmetros de motilidade e cinética espermáticas mais comumente avaliados pelo CASA são: motilidade total (porcentagem de células móveis); motilidade progressiva (porcentagem de

células movendo-se progressivamente); VAP ($\mu\text{m/s}$) – velocidade média da trajetória (velocidade média considerando a trajetória curvilínea (real), mas desprezando o deslocamento lateral do espermatozoide); VSL ($\mu\text{m/s}$) – velocidade linear (velocidade do espermatozoide considerando uma linha reta entre o ponto inicial e final da trajetória); VCL ($\mu\text{m/s}$) – velocidade curvilínea (velocidade do espermatozoide considerando cada posição da célula ao longo da sua trajetória - trajetória real do espermatozoide); ALH (μm) – amplitude do deslocamento lateral da cabeça (largura média da oscilação da cabeça do espermatozoide durante sua trajetória real); BCF (Hz) – frequência do batimento do flagelo (frequência com que a cabeça do espermatozoide atravessa a trajetória média, em qualquer direção), representados na Fig. 2, além dos fatores: LIN (%) – linearidade (valor médio da razão (VSL/VCL) x 100, que estima a proximidade da trajetória real do espermatozoide a uma linha reta); STR (%) – retilinearidade (valor médio da razão (VSL/VAL) x 100, que estima a proximidade da trajetória média do espermatozoide a uma linha reta) e WOB (%) – oscilação (valor médio da razão (VAP/VCL) x 100, que estima a oscilação da cabeça do espermatozoide) (Verstegen et al., 2002).

Como a trajetória de um espermatozoide é determinada pela função de seu flagelo, características como velocidade espermática, frequência de batimento flagelar e amplitude do deslocamento lateral de cabeça podem refletir o estado fisiológico da célula (Abaigar et al., 1999).

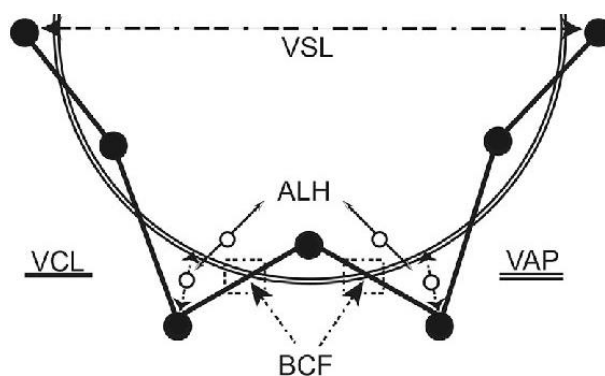


Figura 2. Representação esquemática de parâmetros cinéticos mensurados por análise espermática computadorizada (CASA). VAP = velocidade média da trajetória; VSL = velocidade linear; VCL = velocidade curvilínea; ALH = amplitude do deslocamento lateral de cabeça; BCF = frequência do batimento do flagelo

Assim como em outras espécies (Holt et al., 1997; Silva et al., 2006; Rodriguez-Martinez, 2013) nos bubalinos, a utilização do CASA para a avaliação dos parâmetros de motilidade e de cinética espermática tem permitido a análise mais objetiva da qualidade seminal e a correlação desses parâmetros com outros indicadores de qualidade espermática (Mandal et al., 2003) e com a fertilidade (Singh et al., 2017). Por exemplo, em ejaculados de touros bubalinos avaliados *in natura*, aqueles com menos de 50 % dos espermatozoides reativos ao teste hiposmótico apresentaram menor motilidade total, VSL, VCL e VAP, do que aqueles com mais de 50 % dos espermatozoides reativos. Ainda nesse trabalho, foi demonstrada a correlação positiva significativa ($p < 0,01$) entre a integridade funcional da membrana plasmática com os parâmetros: motilidade total, VSL, VCL e VAP (Mandal et al., 2003). Também em ejaculados de touros bubalinos, os parâmetros motilidade, VAP, VSL, VCL e ALH – avaliados após o descongelamento dos espermatozoides – apresentaram correlação positiva com a fertilidade a campo destes animais (Singh et al., 2017) e com a taxa de clivagem *in vitro* (Sohail et al., 2013).

Os valores médios de parâmetros do CASA encontrados na literatura para espermatozoides bubalinos avaliados após o descongelamento são apresentados na Tab. 1.

Tabela 1. Médias e desvios-padrão relatados na literatura para os parâmetros do CASA em espermatozoides bubalinos (*Bubalus bubalis*) descongelados

MT (%)	MP (%)	VAP ($\mu\text{m/s}$)	VCL ($\mu\text{m/s}$)	VSL ($\mu\text{m/s}$)	ALH (μm)	BCF (Hz)	Referência
	48,2 \pm 1,9	98,0 \pm 1,4	133,1 \pm 1,8	95,2 \pm 1,4	3,2 \pm 0,1		Koonjaenak et al., 2007
57,2 \pm 4,3							Kadirvel et al., 2009
82,42							Reddy et al., 2010
68,8 \pm 1,5	24,7 \pm 1,6	21,5 \pm 2,6	39,3 \pm 1,8	15,7 \pm 2,3	1,8 \pm 0,1	14,2 \pm 1,5	Rastegarnia et al., 2012
83,50	20,90	75,18	108,94	62,18	4,78	7,72	Sohail et al., 2013
56,9 \pm 3,2	16,6 \pm 1,1	87,2 \pm 2,4	156,5 \pm 4,3	68,9 \pm 1,9	6,8 \pm 0,1	34,0 \pm 0,4	Kumar et al., 2014b
15,3 \pm 5,8	5,0 \pm 3,4	20,7 \pm 6,2	38,5 \pm 9,8	14,7 \pm 5,1	2,3 \pm 0,8	8,2 \pm 3,9	Shahverdi et al., 2014
56,2 \pm 1,7	27,8 \pm 1,4	29,7 \pm 0,7	44,9 \pm 0,8	23,3 \pm 0,6	2,4 \pm 0,04	9,9 \pm 0,09	Topraggaleh et al., 2014
45,6 \pm 7,4	24,0 \pm 9,0	90,53 \pm 12,1	155,3 \pm 10,0	78,3 \pm 8,8	6,1 \pm 0,6	35,5 \pm 1,8	Kumar et al., 2015
	9,83	56,22	91,08	45,32	6,22	25,28	Shah et al., 2016

3.6. Avaliação espermática por citometria de fluxo

A citometria de fluxo permite analisar ou separar subpopulações de células, de acordo com o padrão de coloração visto com marcadores de fluorescência (Morrell, 1991). Fundamentada em meados de 1930 e aprimorada desde então, a citometria de fluxo tornou-se uma ferramenta cada vez mais utilizada, tanto na pesquisa quanto no domínio clínico (Jaroszeski e Radcliff, 1999).

A capacidade dos citômetros de fluxo de processar individualmente milhares de partículas ou de células, em questão de segundos, justifica sua extensa utilização (Jaroszeski e Radcliff, 1999). Apesar de serem perdidas algumas características morfológicas e localização subcelular que apenas a microscopia pode fornecer, a citometria de fluxo oferece ao pesquisador poder estatístico para rapidamente analisar e caracterizar milhões de células (ThermoFisher, 2018b).

Utilizada na andrologia, avaliando espermatozoides de diferentes espécies, a citometria de fluxo permite investigar a viabilidade da membrana plasmática, o conteúdo de DNA, a integridade do acrossoma (revisado por Morrell, 1991), o potencial de membrana mitocondrial, a peroxidação lipídica (revisado por Silva e Gadella, 2006), além de outros parâmetros espermáticos que também podem estar relacionados com a fertilidade do reprodutor.

Existem inúmeros parâmetros espermáticos que podem ser avaliados por citometria de fluxo, assim como existem inúmeras sondas fluorescentes que podem ser utilizadas para a avaliação destes parâmetros. Por isso, serão apresentadas a seguir apenas as avaliações realizadas neste trabalho, caracterizando o modo de ação das sondas fluorescentes e o objetivo do seu uso.

3.6.1. Avaliação das membranas plasmática e acrossômica

O espermatozoide é compartimentado pelas membranas plasmática, acrossômica e mitocondrial e a competência desta célula depende de que cada um destes compartimentos esteja intacto. A avaliação individual desses compartimentos não prediz com eficiência a fertilidade da amostra, contudo, a combinação de várias análises pode indicar um melhor resultado (Graham et al., 1990).

Por vezes, o termo viabilidade espermática é usado referenciando a avaliação da membrana plasmática (Morrell, 1991; Silva e Gadella, 2006; Love, 2016). Isto porque a integridade dessa membrana não é apenas essencial para o metabolismo geral da célula, como também corretas mudanças em sua estrutura são necessárias para o sucesso da fusão do espermatozoide com o oócito (capacitação, reação acrossômica, e ligação do espermatozoide na superfície do oócito). Assim, a integridade das membranas é de fundamental importância no processo de fertilização e a sua avaliação pode ser um indicador da capacidade fertilizante do espermatozoide (Jeyendran et al., 1984).

Como discutido anteriormente (item 3.1), o processo de criopreservação pode induzir a alterações capacitantes, que podem estar relacionadas ao estresse oxidativo e levar à redução da fertilidade da amostra. Além da desestabilização da membrana plasmática, essas alterações podem modificar a estrutura do acrossoma. A integridade do acrossoma também é um pré-requisito para a fertilização e está altamente correlacionada com a fertilidade do sêmen congelado (Medeiros et al., 2002). Durante a manipulação do sêmen, desde seu estado líquido até o processo de congelamento e descongelamento, há um aumento de espermatozoides com acrossoma lesado. Acredita-se que o momento de maior dano à essa estrutura seja durante o descongelamento (Kumar et al., 2016).

Também foi discutido anteriormente o papel do meio diluidor no processo de criopreservação espermática (item 3.1). Contudo, neste momento vale ressaltar que com a utilização dos diluidores, acrescentam-se, ao ambiente do espermatozoide, partículas não-espermáticas (gema de ovo, lipoproteínas de baixa densidade ou partículas lipídicas do leite), que podem interferir na análise por citometria de fluxo. Essas partículas não contêm DNA, portanto, a utilização de associações de sondas fluorescentes ligantes de DNA combate o erro de leitura pelo citômetro de fluxo de partículas não espermáticas (Silva e Gadella, 2006). A fim de assegurar que apenas as células espermáticas fossem lidas, neste estudo, as sondas fluorescentes de integridade de membrana (iodeto de propídio e YO-PRO-1) foram associadas com a sonda fluorescente Hoechst 33342. A sonda Hoechst 33342 é uma molécula sintética membrana permeante, que tem seleção por pares de Adenina-Timina e se liga ao DNA, corando células com membrana íntegra. Essa sonda é excitada com luz ultra violeta (UV) ou outras fontes de excitação, apresentando excitação/emissão de ~350/460 (Garner, 2009). Além disso, é uma sonda amplamente utilizada para a coloração de espermatozoides no processo de seleção celular por cromossomo sexual por meio de citometria de fluxo (Garner, 2009; Vazquez et al., 2009; Petrunkina et al., 2010; Li et al., 2016)

Neste trabalho, para a avaliação da integridade das membranas plasmática e acrossômica foi utilizada a combinação das sondas fluorescentes iodeto de propídio e aglutinina de Pisum sativum. A utilização dessa combinação de sondas para a avaliação da integridade das membranas plasmática e acrossômica é relatada tanto em espécies de animais domésticos, como em humanos (humano – Miyazaki et al., 1990; equino – Wilhelm et al., 1996; canino – Peña et al., 1999; suíno – de Andrade et al., 2007; ovino – Celeghini et al., 2010; bovino – Leite et al., 2010; búfalo – Selvaraju et al., 2010).

O iodeto de propídio (IP) é um composto fluorogênico capaz de se ligar a ácidos nucleicos e a emissão fluorescente produzida é proporcional ao conteúdo de DNA da célula (Riccardi e Nicoletti, 2006). A membrana celular intacta consegue impedir a entrada do iodeto de propídio, assim, a fluorescência (vermelha) induzida por laser é vista apenas em núcleos de células mortas ou com membrana lesada (Krishan, 1975).

A aglutinina de Pisum sativum (PSA) é uma lecitina da ervilha, que se liga especificamente a glicoproteínas (α -manose e α -galactose) da matriz acrossômica. A conjugação dessa lecitina ao isotocianato de fluoresceína (FITC) permite a emissão de fluorescência (Graham et al., 1990). Como a PSA não consegue penetrar na membrana acrossômica intacta, apenas espermatozoides com acrossoma reagido ou danificado serão marcados (Gillan et al., 2005).

As células PSA/IP positivas identificam espermatozoides com as membranas acrossômica e plasmática danificadas, e a ausência de fluorescência identifica espermatozoides com o acrossoma intacto. Este teste permite a avaliação do acrossoma, mas tem a limitação de que o espermatozoide viável é identificado pela ausência de fluorescência e não por estar fluorescente, baseando-se na suposição de que todos os objetos que não adquirem a fluorescência do IP são viáveis (Love, 2016).

Com a utilização da sonda YOPRO-1 é possível avaliar a permeabilidade da membrana plasmática. A YOPRO-1 se liga ao DNA e é membrana impermeante, podendo entrar em células com desestabilização de membrana, quando há inativação de transportadores. Assim, é possível utilizá-la como ferramenta útil para detectar a permeabilidade precoce da membrana (revisado por Hossain et al., 2011). As células coradas com YOPRO-1 emitem fluorescência verde e em alguns trabalhos são consideradas como uma subpopulação de células em início de apoptose (Aboagla e Terada, 2003; Peña et al., 2005; Ortega-Ferrusola et al., 2008).

3.6.2. Avaliação do potencial de membrana mitocondrial

A sua função de produzir ATP destaca a mitocôndria como uma das organelas celulares mais importantes. Além de produzir ATP, a mitocôndria participa de outros processos fisiológicos, tais como a homeostase do cálcio, o metabolismo de lipídios e de aminoácidos, e a apoptose (revisado por Luo et al., 2013).

No espermatozoide, a mitocôndria possui algumas características diferentes das mitocôndrias encontradas em outros tipos celulares. Elas estão localizadas exclusivamente na peça intermediária do espermatozoide, intimamente enoveladas no axonema e possuem isoformas de proteínas e isoenzimas específicas que diferenciam funcionalmente a mitocôndria espermática de mitocôndrias de outras células (revisado por Piomboni et al., 2012).

A motilidade espermática é uma das principais características do espermatozoide e é fundamental para a fertilidade do macho. Basicamente, existem dois tipos de motilidade espermática; a motilidade ativada, observada no espermatozoide ejaculado, e a motilidade hiperativada, observada no espermatozoide no local da fertilização. Sabe-se que os dois tipos requerem adequado fornecimento de ATP, contudo, existem controvérsias quanto qual via metabólica, glicólise ou fosforilação oxidativa, está envolvida na motilidade espermática (revisado por Piomboni et al., 2012).

O potencial de membrana mitocondrial (PMM) é um parâmetro fisiológico, e está ligado à capacidade da célula de gerar ATP pela fosforilação oxidativa (Perry et al., 2011). Apesar das vias metabólicas associadas com a motilidade não estarem completamente esclarecidas, o PMM tem sido relacionado com alguns parâmetros espermáticos.

Em diferentes espécies, a motilidade já foi associada com o PMM (búfalo – Kadirvel et al., 2009; equino – Brum et al., 2008; humano – Evenson et al., 1982; Paoli et al., 2011), assim como a viabilidade espermática (bovino – Bollwein et al., 2008; búfalo – Selvaraju et al., 2008; humano – Evenson et al., 1982; suíno – Spinaci et al., 2005). Além disso, o PMM foi positivamente relacionado com o potencial de fertilidade de espermatozoides humanos (Marchetti et al., 2004; Barroso et al., 2006) e equinos (Yeste et al., 2015) e negativamente com a fragmentação de DNA (humanos – Marchetti et al., 2002). No espermatozoide, assim como em outras células aeróbicas, a mitocôndria é a principal fonte de ERO. Em células apoptóticas ou em estresse oxidativo, o potencial de membrana mitocondrial (PMM) se torna depolarizado (revisado no item 3.3.3).

Para a avaliação do potencial de membrana mitocondrial podem ser utilizadas sondas catiônicas e lipofílicas, que se acumulam dentro de mitocôndrias de células saudáveis, mas não dentro de células com perda de PMM. A sonda fluorescente MitoStatus Red (MST) é rapidamente sequestrada para dentro da mitocôndria ativa, permitindo a análise por citometria de fluxo ou por imagem da depolarização mitocondrial. Células com mitocôndrias depolarizadas apresentam menor fluorescência (BD Pharmingen, 2018). Há relatos recentes do uso da MitoStatus Red para a avaliação em citometria de fluxo de espermatozoides equinos (Carneiro et al., 2018; Dell’Aqua Júnior et al., 2018; Freitas-Dell’Aqua et al., 2018) e bovinos (Cruz et al., 2018).

3.6.3. Análise das espécies reativas de oxigênio e da peroxidação lipídica em espermatozoides

A relevância das ERO e da peroxidação lipídica na fisiologia e na patologia dos espermatozoides foram discutidas no item 3.3. Por isso, aqui será feita apenas a apresentação das sondas utilizadas para a avaliação desses parâmetros neste trabalho.

A produção de ânion superóxido pela mitocôndria pode ser registrada com o uso da sonda MitoSOX™. Esta sonda consegue penetrar em células vivas, onde seletivamente atinge as mitocôndrias e rapidamente sofre oxidação pelo ânion superóxido. Outras ERO e espécies reativas de nitrogênio não são capazes de oxidar a MitoSOX™. Após se ligar ao ácido nucleico, o produto formado pela oxidação se torna altamente fluorescente (ThermoFisher, 2018a). A utilização da sonda MitoSOX™ para mensuração de ânion superóxido mitocondrial foi relatada em estudos com espermatozoides bovinos (Kiernan et al., 2013; Gürlér et al., 2016), equinos (Murphy et al., 2014), humanos (Koppers et al., 2008; Marques et al., 2014) e suínos (Zarzycka et al., 2014).

A sonda CM-H2DCFDA também é um indicador (não específico) de ERO nas células. Ela se difunde passivamente para dentro das células, onde seus grupos acetato são clivados pelas esterases intracelulares e seu grupo cloro-metílico tiol reativo reage com glutatona e outros tiols intracelulares. A subsequente oxidação produz adutos fluorescentes que ficam presos na célula (ThermoFisher, 2018d). A associação dessa sonda com o iodeto de propídio permite detectar ERO em células viáveis (IP negativa) (Ameziane-el-Hassani e Dupuy, 2013). Essa associação foi utilizada para avaliar a produção de ERO em espermatozoides bovinos (Kiernan et al., 2013), suínos (Martinez-Alborcia et al., 2012) e ovinos (Del Olmo et al., 2015).

Para a mensuração da peroxidação lipídica no espermatozoide, pode ser utilizada a sonda BODIPY^{581/591}-C11. Ela é um ácido graxo fluorescente considerado sensível para reportar a peroxidação lipídica. Sua fluorescência muda, após a oxidação do segmento fenilbutadieno do fluoróforo, de vermelha para verde. Essa alteração de emissão dependente de oxidação permite a visualização da taxa de fluorescência da peroxidação lipídica em células vivas (ThermoFisher, 2018c). A sonda BODIPY^{581/591}-C11 foi empregada para a análise da peroxidação lipídica em espermatozoides de espécies domésticas (bovinos – Silva et al., 2007; bubalinos – Dalal et al.,

2016; Kumar et al., 2018; caninos – Neagu et al., 2011; equinos – Ortega-Ferrusola et al., 2009; Gibb et al., 2014; ovinos – Lymberopoulos et al., 2010; Souza et al., 2017; suínos – Guthrie e Welch, 2007) e de humanos (Aitken et al., 2007).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Comissão de Ética no Uso de Animais – UFMG (CEUA/UFMG)

Este trabalho foi realizado com autorização da CEUA/UFMG, como registrado no Protocolo nº.357/2015 (Anexo 1).

4.2. Animais e localização do experimento

Os animais utilizados neste trabalho pertenciam ao Centro de Biotecnologia em Bubalinocultura (CBB), da Universidade Federal de Minas Gerais. Os búfalos eram mantidos em regime extensivo, com complementação de volumoso, durante a época da seca, na Central de coleta e processamento de sêmen do CBB, localizada no município de Pedro Leopoldo, Minas Gerais (19°38'20''S e 44°02'57''O).

Neste estudo, foram utilizados treze touros bubalinos (*Bubalus bubalis*), da raça Murrah, sexualmente maduros (idade mediana: 4 anos) e condicionados à coleta de sêmen com vagina artificial. Antes do início do experimento, foi feito exame andrológico dos búfalos, atestando a higidez dos animais trabalhados. Seguem os dados obtidos no exame andrológico dos animais (Tab. 2):

Tabela 2. Idade, peso corporal, escore corporal, perímetro escrotal e consistência testicular dos 13 touros búfalos (*Bubalus bubalis*) utilizados no experimento

Características	
Idade (anos)	2,5-6,0 ¹
Peso corporal (Kg)	737 ± 72 ²
Escore corporal	4,0 ³
Perímetro escrotal (cm)	33,0 ± 3,1 ²
Consistência testicular	3-4 ³

¹Mínimo – Máximo

²Média e desvio-padrão

³Mediana

4.3. Meio diluidor para congelamento de espermatozoides

Neste trabalho, para o congelamento de espermatozoides foi utilizado o meio diluidor Tris-ácido cítrico-frutose, com 10 % de lipoproteína de baixa densidade extraídas da gema de ovo.

Este diluidor foi formulado com: 2,42 g de Tris [Tris (hidroximetil) aminometano], 1,36 g de ácido cítrico, 1,0 g de frutose, 100 mg de estreptomicina, 31,31 mg de penicilina, 7,0 mL de glicerol e 10 mL de lipoproteína de baixa densidade (LBD), todos diluídos em 100 mL de água deionizada (q.s.p.). O pH do diluidor foi corrigido com solução Tris (1,0 M) para 6,86 e a osmolaridade final foi de 1394 mOsm/L. No período de coletas de 2017-2018, os antibióticos utilizados foram substituídos pelo antibiótico amicacina. Porém, antes da substituição, foram feitos testes para ajuste da concentração de amicacina, para que não houvesse influência do antibiótico sobre a qualidade do sêmen congelado-descongelado (dados não publicados). A concentração de amicacina utilizada foi de 83,7 µg/mL.

Para a purificação das LBD, foram utilizados ovos frescos de galinha (*Gallus domesticus*) obtidos em granja comercial. O protocolo de extração de LBD utilizado foi proposto por Moussa et al. (2002), com algumas modificações sugeridas por Neves et al. (2014).

O meio diluidor foi mantido congelado (-20 °C) até o dia do uso.

4.4. Coleta de sêmen

As coletas de sêmen foram realizadas nos períodos de abril a dezembro de 2016 (110 ejaculados) e dezembro de 2017 e janeiro de 2018 (19 ejaculados). Foram realizadas coletas dos treze touros bubalinos, visando obter um total de 5-10 ejaculados de um mesmo animal ao final do período.

Durante todo esse período foi mantido o regime de coleta de sêmen uma vez por semana para todos os animais. Animais que recusaram a monta em uma semana, não eram utilizados na semana seguinte. Este padrão foi adotado para que a qualidade do sêmen obtido se mantivesse dentro dos padrões preconizados para o congelamento de espermatozoides. Intervalos menores que 6 dias prejudicaram o ritmo de coleta dos touros bubalinos utilizados neste trabalho.

A coleta de sêmen dos touros foi realizada por meio de vagina artificial (42 °C), utilizando como manequim uma fêmea bubalina devidamente contida. Logo após a coleta, o sêmen era encaminhado para o laboratório para avaliação e processamento. No laboratório, o sêmen era fracionado em duas alíquotas, uma para as avaliações *in natura*, outra para o congelamento de espermatozoides.

4.5. Análise do sêmen *in natura*

4.5.1. Análises macroscópicas

Logo após cada coleta, a amostra de sêmen foi avaliada macroscopicamente quanto ao seu volume (mL, em tubo graduado de 15 mL), aspecto (aquoso, leitoso e cremoso), odor e cor (branco, amarelo).

4.5.2. Análises microscópicas

As análises microscópicas realizadas foram: turbilhonamento (0-5), motilidade (%), vigor (0-5), morfologia (defeitos maiores e menores, %), concentração (espermatozoides/mL), número de espermatozoides por ejaculado e teste hiposmótico. As análises do sêmen fresco foram realizadas de acordo com a metodologia sugerida pelo Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (2013).

4.5.2.1. Turbilhonamento

Para a avaliação do turbilhonamento, uma gota de sêmen foi colocada sobre uma lâmina, previamente aquecida a 37 °C, a qual foi avaliada em microscópio, com aumento de final 100x.

4.5.2.2. Motilidade e vigor

A motilidade e o vigor foram determinados pela deposição de uma gota de sêmen entre lâmina e lamínula pré-aquecidas a 37 °C. A motilidade foi determinada pela porcentagem de espermatozoides com movimento e o vigor avaliado com base na qualidade do movimento retilíneo-progressivo e sua velocidade, em uma escala de 1 a 5 (CBRA, 2013). Ambas as avaliações foram realizadas sob microscopia óptica, em aumento final de 200 a 400x.

4.5.2.3. Concentração espermática

O procedimento para se obter a concentração espermática consistiu na contagem das células na Câmara de Neubauer (CBRA, 2013). Para a contagem, o sêmen foi diluído na proporção de 1:200 em solução de formol salina tamponado (Hancock, 1957).

4.5.2.4. Morfologia espermática

Para a análise da morfologia espermática, uma alíquota de 50 µL de sêmen foi diluída em 1 mL de formol salina tamponado (Hancock, 1957) e mantida em refrigerador (5 °C) para posterior análise. Cada amostra de sêmen foi avaliada utilizando-se a técnica de preparação úmida, que consiste na deposição de uma gota de sêmen diluído sobre a lâmina, coberta por lamínula e analisada em microscópio de contraste de fase (Nikon®, modelo E-200), com aumento de 1000x, sob óleo de imersão. A avaliação da morfologia espermática foi realizada com a contagem de 200 espermatozoides, analisando-se as alterações de forma e estrutura, e classificando-as em defeitos de cabeça, de acrossoma, de peça intermediária e de peça principal.

4.5.2.5. Teste hiposmótico

O teste hiposmótico (HO) foi realizado para avaliação da integridade funcional da membrana plasmática (Jeyendran et al., 1984), imediatamente após a coleta do sêmen. Uma alíquota de 50 µL de sêmen foi adicionada em 500 µL de solução hiposmótica, mantida a 37 °C [- 100 mOsm/L; (Kumar et al., 2014a) 2,702 g de frutose em 100 mL de água deionizada + 1,324 g de citrato de sódio em 100 mL de água deionizada].

Após a adição do sêmen, a solução foi incubada por 30 minutos em banho-maria a 37 °C e fixada em 200 µL de formol salina tamponada, para posterior análise em microscópio de contraste de fase (Loaiza-Echeverri et al., 2015). Foram avaliadas 100 células, de acordo com a presença ou não de cauda enrolada, usando microscópio de contraste de fase (Nikon®, modelo E-200), com aumento final de 1000x, sob óleo de imersão.

Do valor obtido, foi subtraída a porcentagem de células apresentando alterações na região da cauda antes do teste HO, avaliadas na morfologia espermática (item 4.5.2.4.), segundo a fórmula abaixo (Melo e Henry, 1999):

$$\text{HO} = (\% \text{ de alterações na região da cauda após teste HO}) - (\% \text{ de alterações na região da cauda antes do teste HO}).$$

4.6. Manipulação do sêmen e congelamento

Foram utilizados apenas ejaculados que apresentaram motilidade $\geq 70\%$, máximo de 30 % de anormalidades e concentração mínima de 300×10^6 espermatozoides/mL. Cada ejaculado foi então diluído com meio Tris-frutose-ác. Cítrico-10 % LBD, para a concentração final de 50×10^6 spz/mL. O sêmen diluído foi envasado em palhetas de 0,25 mL, submetido ao processo de resfriamento e congelado.

O resfriamento foi realizado em geladeira com temperatura regulada para 4 °C, utilizando-se cubas em polipropileno de 4,2 L, preenchidas com 2,6 L de água, a aproximadamente 5 °C. Após o envase, as palhetas foram acondicionadas em sacos plásticos e posteriormente inseridas em recipiente de vidro contendo 700 mL de água em temperatura média de 25 °C (24,4 – 25,7 °C), na qual permaneceram submersas durante todo o protocolo. Para o início do resfriamento, o

recipiente de vidro contendo as palhetas foi colocado no interior das cubas com água a 5 °C (média: 4,72 °C; mínimo: 4,0 °C; máximo: 5,5 °C), mantidas na geladeira.

As amostras foram submetidas às seguintes taxas de resfriamento, de acordo com a curva de resfriamento previamente padronizada: -0,27 °C/min até 15 °C; -0,11 °C/min de 15 °C a 12 °C; -0,05 °C/min até 8 °C. As curvas de resfriamento obtidas em todos os congelamentos (Fig. 3) foram registradas a partir da mensuração da temperatura da água contida no recipiente de vidro. Adotou-se um tempo total de 5 h do início do resfriamento até o congelamento. Para o congelamento, foi utilizada uma caixa de isopor com, no mínimo, 5 cm de nitrogênio líquido (N₂L). Nesta caixa, as palhetas foram colocadas a uma altura de 3 cm da superfície do N₂L, por 20 minutos, e posteriormente imersas no N₂L. As amostras foram armazenadas em botijão de N₂L, para posterior análise.

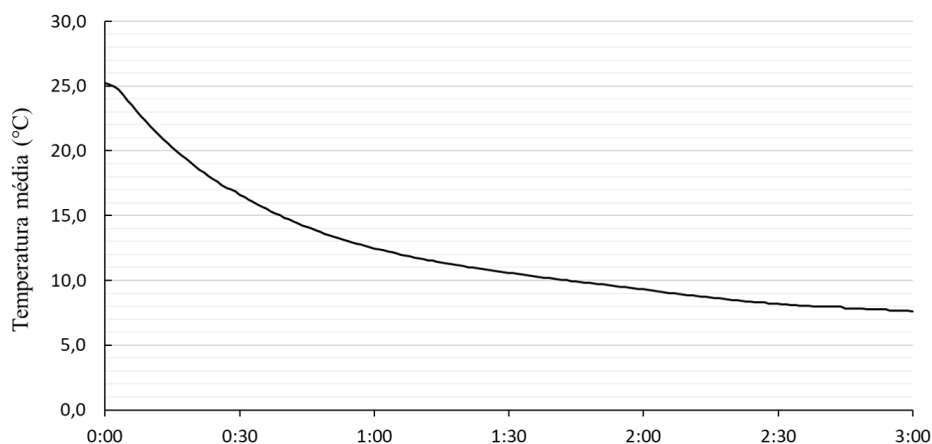


Figura 3. Curva da queda média de temperatura, obtida durante o resfriamento dos 129 ejaculados. Tempo máximo apresentado: 3 h

4.7. Análise do sêmen pré e pós-resfriamento

4.7.1. Análise computadorizada do movimento espermático – CASA

O sistema CASA foi utilizado para a avaliação do sêmen diluído nos tempos pré-resfriamento (PR – até uma hora e meia após diluição e justo antes do resfriamento) e pré-congelamento (PC – ao final das 5 h). Para a análise, uma gota de 5,0 µL da amostra foi colocada entre lâmina e lamínula, previamente aquecidas a 37 °C, utilizando o sistema Sperm Class Analyzer (SCA ® v.4.0). Para a análise de cada amostra, foram capturados cinco campos, homogêneos, com um mínimo de 100 e máximo de 200 células espermáticas em cada um deles. Os parâmetros para calibração do sistema (Setup) estão descritos no Anexo 2.

Os parâmetros de motilidade e cinética espermáticas avaliados pelo CASA foram:

- Motilidade total (%);
- Motilidade progressiva (%);
- VAP (µm/s) – velocidade média da trajetória;
- VSL (µm/s) – velocidade linear;
- VCL (µm/s) – velocidade curvilínea;
- ALH (µm) – amplitude do deslocamento lateral da cabeça;
- BCF (Hz) – frequência do batimento do flagelo.

O CASA também foi utilizado na avaliação da motilidade e cinética espermáticas durante a incubação a 37 °C, uma das avaliações do sêmen no pós-descongelamento (Item 4.8.).

4.8. Teste de longevidade da motilidade espermática pós-descongelamento

O teste resume-se em manter o sêmen a 37 °C, após o descongelamento (37 °C/30 s), por um período de até 180 minutos, com avaliações da motilidade e cinética espermáticas (CASA) realizadas a cada 60 min (PD_T5, PD_T60, PD_T120, PD_T180). Antes da primeira avaliação, eram respeitados 5 min de incubação (PD_T5).

4.9. Seleção dos ejaculados e formação dos grupos experimentais

Ao final do período experimental, foram obtidos, dos treze búfalos, um total de 139 ejaculados. Contudo, 10 desses ejaculados não apresentaram qualidade morfológica (defeitos totais > 30 %) para serem processados e foram eliminados. Os 129 ejaculados restantes foram congelados e descongelados e avaliados no sistema CASA, em seis momentos distintos, a recordar:

PR: Pré-resfriamento;

PC: Pré-congelamento;

PD_T5: Pós-descongelamento – 5 minutos;

PD_T60: Pós-descongelamento – 60 minutos;

PD_T120: Pós-descongelamento – 120 minutos;

PD_T180: Pós-descongelamento – 180 minutos.

A partir dos resultados de motilidade total (MT), obtidos nestas avaliações, os ejaculados que apresentaram variações discrepantes no decorrer dos tempos de avaliação foram eliminados. Desta maneira, para a formação dos grupos, foram utilizados 90 ejaculados.

A seleção dos ejaculados com a população espermática mais resistente ao processo de congelamento e descongelamento e aqueles cuja população espermática foi menos resistente, utilizou-se o critério $\Delta R_{(MT)}$, seguindo metodologia de Auler (2018). Tal critério é definido pelo declínio da motilidade total (MT) entre o início (PR) e 180 minutos após descongelamento (PD_T180):

$$\Delta R_{(MT)} = PR_{(MT)} - PD_T180_{(MT)}.$$

Para a formação dos grupos experimentais, foram calculados os percentis 25 e 75 para o $\Delta R_{(MT)}$, nos 90 ejaculados. Sendo assim, foram definidos dois grupos experimentais de acordo com a resistência espermática (boa ou ruim) ao processo de congelamento-descongelamento. O grupo de resistência espermática boa (RB) foi composto pelos ejaculados que obtiveram declínios de motilidade total ao longo do processo de congelamento-descongelamento abaixo do percentil 25, apresentando os menores valores de $\Delta R_{(MT)}$. Por sua vez, o grupo de resistência espermática ruim (RR) foi formado pelos ejaculados com declínios de motilidade total ao longo do processo de congelamento-descongelamento acima do percentil 75, com os maiores valores de $\Delta R_{(MT)}$.

A partir deste ponto, o termo resistência espermática será utilizado como referência à avaliação dos ejaculados quanto ao declínio da motilidade total ($\Delta R_{(MT)}$ – descrito acima).

4.10. Citometria de fluxo

As análises de citometria de fluxo foram realizadas em parceria com o Laboratório CERAN, da Unesp-Botucatu, sob coordenação do prof. Dr. Frederico Ozanam Papa e responsabilidade técnica da Dra. Camila de Paula Freitas-Dell'Aqua. Para a avaliação espermática por citometria de fluxo foi utilizado o equipamento BD LSR Fortessa (Becton Dickinson, Mountain View, CA, USA) equipado com lasers de excitação: azul 488-nm, 100 mW e filtros de emissão 530/30nm (FITC, YOPRO, CM-H2DCFDA e C11-BODYPY) e 695/40nm (Iodeto de propídio e MitoSOX Red); vermelho 640-nm, 40 mW com filtro 660/20 nm (MitoStatus Red); e o violeta 405-nm, 100 mW, com o filtro 450/50 nm (Hoechst). No mínimo 10.000 células por amostra foram analisadas e os dados foram avaliados pelo software BD FACSDiva™ software v 6.1.

Para tanto, as amostras eram diluídas em TALP-PVA, segundo Parrish et al. (1988) modificado: 100 mM NaCl, 3,1 mM KCl, 25,0 mM NaHCO₃, 0,3mM NaH₂PO₄, 21,6 mM DL-lactato de sódio 60%, 2,0 mM CaCl₂, 0,4 mM MgCl₂, 10,0 mM Hepes-livre de ácido, 1,0 mM piruvato de sódio, 1,0 mg/mL álcool polivinil-PVA e 25 µg/mL gentamicina) na concentração de 5 x 10⁶ espermatozoide/mL.

As avaliações por citometria de fluxo foram realizadas no tempo 5 e 180 minutos pós-descongelamento, utilizando os protocolos descritos a seguir, para as análises: integridade das membranas plasmática e acrossômica, estabilidade da membrana plasmática, potencial de membrana mitocondrial, produção de ânion superóxido mitocondrial, produção de peróxido de hidrogênio intracelular, peroxidação lipídica e peroxidação lipídica induzida por ácido araquidônico. Em todas as avaliações, com exceção das avaliações de peroxidação lipídica, foi utilizada a sonda Hoechst 33342 para a diferenciação entre espermatozoides e partículas não-espermáticas componentes do diluidor usado.

4.10.1. Integridade das membranas plasmática e acrossômica

Para a avaliação de integridade de membrana plasmática e acrossômica, utilizou-se a associação de Hoechst 33342, iodeto de propídio (IP) e FITC-PSA (aglutinina de Pisum sativum conjugada ao isotiocianato de fluoresceína), de acordo com Freitas-Dell'Aqua (2012). Assim, em uma amostra de 200 µL de sêmen diluído foram adicionados 7 µM de Hoechst 33342, 1,5 µM de IP e 2 ng de FITC-PSA. As amostras foram incubadas durante 15 min a 37 °C, ao abrigo da luz.

As células PSA/IP positivas identificam espermatozoides com as membranas acrossômica e plasmática danificadas, e a ausência de fluorescência identifica espermatozoides com o acrossoma intacto. Dessa maneira, foram identificadas quatro populações de espermatozoides:

- MPAI: membranas plasmática e acrossômica íntegras (PI -/FITC-PSA -);
- MPIAL: membrana plasmática íntegra e acrossômica lesada (PI -/FITC-PSA +);
- MPAL: membranas plasmática e acrossômica lesadas (PI +/FITC-PSA +);
- MPLAI: membrana plasmática lesada e acrossômica íntegra (PI +/FITC-PSA +).

4.10.2. Estabilidade da membrana plasmática, potencial de membrana mitocondrial e produção de ânion superóxido mitocondrial

Para avaliação da desestabilização de membrana plasmática, potencial de membrana mitocondrial e produção de ânion superóxido (O₂^{•-}) na matriz mitocondrial, foi utilizada a associação de Hoechst 33342, YOPRO (YP; marcação para célula com membrana plasmática desestabilizada), MitoStatus Red (MST; potencial de membrana mitocondrial) e MitoSOX™ Red (MSR; geração

de ânion superóxido na matriz mitocondrial), de acordo com Freitas-Dell'Aqua et al. (2018). Assim, em uma amostra de 500 µL de sêmen diluído foram adicionados 7 µM Hoechst 33342, 25 nM YP, 20 µM de MST e 2 µM de MSR, seguido por incubação a 37 °C por 20 minutos.

A leitura da coloração dos espermatozoides, nessa análise, foi a seguinte:

YP +: sem estabilidade da membrana plasmática;

YP -: com estabilidade da membrana plasmática;

MST +: com potencial de membrana mitocondrial;

MST -: membrana mitocondrial depolarizada;

MSR +: com alta produção de ânion superóxido na matriz mitocondrial;

MSR -: sem alta produção de ânion superóxido na matriz mitocondrial.

4.10.3. Produção de peróxido de hidrogênio intracelular

Para a avaliação da produção de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) intracelular, utilizou-se CM-H2DCFDA (C6827, Life Technologies), associado a Hoechst 33342 e iodeto de propídio, assim, em 500 µL da solução de sêmen diluído foram adicionados 7 µM Hoechst 33342, 1,5 µM de iodeto de propídio e 1 µM de CM-H2DCFDA. A incubação foi realizada por 20 min a 37 °C. A leitura da coloração dos espermatozoides, nessa análise, foi a seguinte:

CM-H2DCFDA +: com alta produção de peróxido de hidrogênio intracelular;

CM-H2DCFDA -: sem alta produção de peróxido de hidrogênio intracelular.

4.10.4. Peroxidação lipídica

Para a peroxidação lipídica, utilizou-se protocolo de acordo com Guasti et al. (2012), utilizando a sonda C11-BODIPY (D-3861; Molecular Probes). Assim, em 500 µL de sêmen diluído em TALP-PVA foram adicionados 5 µM de C11-BODIPY581/591, seguido por incubação por 30 minutos a 37 °C. Após a incubação, foram realizadas 2 lavagens consecutivas por centrifugação a 300g por 5 minutos, com TALP-PVA e o pellet ressuspendido em 300 µl de TALP-PVA. A coloração com C11-BODIPY 581/591, permitiu identificar duas populações de espermatozoides:

C11-BODIPY 581/591 +: com peroxidação lipídica;

C11-BODIPY 581/591 -: sem peroxidação lipídica.

4.10.4.1. Peroxidação lipídica induzida por ácido araquidônico

Para a indução da peroxidação lipídica, as amostras eram expostas ao ácido araquidônico (AA; A3555, Sigma), na concentração de 50 µM a 37 °C, por 15 minutos. Após esse período, as mesmas eram lavadas (centrifugação 300g/5minutos) e então ressuspendidas no volume de 500 µL para incubação com a sonda C11-BODIPY.

4.11. Fluxograma das etapas do processo de congelamento-descongelamento dos ejaculados

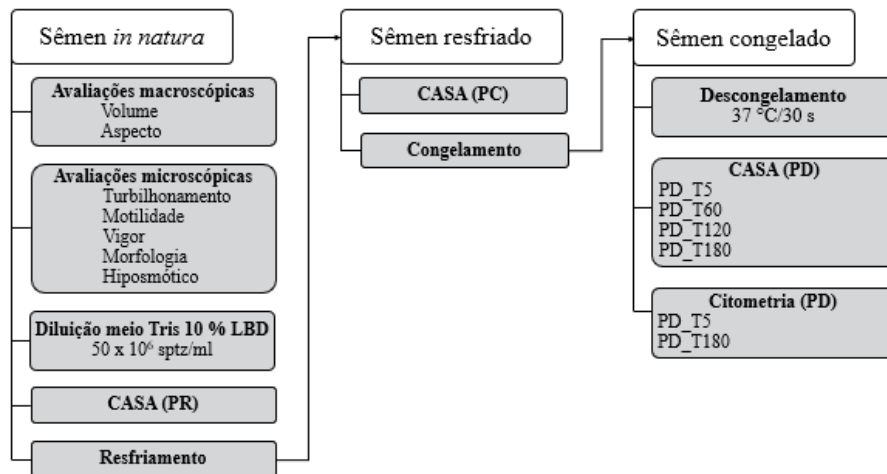


Figura 4. Fluxograma das etapas do processo de congelamento-descongelamento dos ejaculados de touros bubalinos (*Bubalus bubalis*). PR: Pré-resfriamento; PC: Pré-congelamento; PD_T5: Pós-descongelamento – 5 minutos; PD_T60: Pós-descongelamento – 60 minutos; PD_T120: Pós-descongelamento – 120 minutos; PD_T180: Pós-descongelamento – 180 minutos.

4.12. Análise estatística

Os dados foram avaliados quanto à normalidade pelo teste Shapiro-Wilk e à igualdade de variâncias. Para as variáveis que assumiram o pressuposto de normalidade, as médias entre os dois grupos experimentais – ejaculados de resistência espermática boa (RB) e ruim (RR) ao processo de congelamento-descongelamento – foram comparadas pelo teste t de Student não pareado para variâncias iguais ou diferentes, assumindo o ejaculado como unidade experimental. Quando da violação desses pressupostos, os dados foram transformados em $\text{Log}(x)$ ou \sqrt{x} . Para as variáveis que violaram o pressuposto de normalidade, mesmo após a transformação, as médias entre os grupos foram comparadas pelo teste de Mann Whitney. As médias entre os dois tempos experimentais – PD_T5 e PD_T180 – foram comparadas pelo teste t de Student pareado, quando respeitaram a normalidade e homocedasticidade. As variáveis não paramétricas e as variáveis paramétricas que não respeitaram os princípios de normalidade e homocedasticidade mesmo após a transformação foram analisadas pelo teste não paramétrico de Friedman. Os efeitos do grupo (RB e RR) em cada momento do processo de congelamento-descongelamento (PR, PC, PD_T5, PD_T60, PD_T120 e PD_T180), e do momento dentro de cada grupo foram avaliados separadamente. Foi utilizado o coeficiente de correlação de Pearson para estimar e testar a correlação linear entre as variáveis contínuas. Considerou-se como estatisticamente significativo $p \leq 0,05$.

5. RESULTADOS

5.1. Caracterização dos grupos de ejaculados de touros bubalinos (*Bubalus bubalis*) de acordo com a resistência espermática ao processo de congelamento-descongelamento

Com a utilização do parâmetro $\Delta R_{(MT)}$, os 90 ejaculados foram classificados de acordo com a resistência espermática ao processo de congelamento-descongelamento. Os ejaculados que apresentaram valores de $\Delta R_{(MT)}$ abaixo de 41,2 % [P (25)] foram classificados como resistência espermática boa (RB), pois obtiveram os menores declínios de motilidade total ao longo do período compreendido entre o início do resfriamento e o fim da incubação pós-descongelamento. Enquanto os ejaculados que apresentaram valores de $\Delta R_{(MT)}$ acima de 65,1 % [P (75)] foram classificados como resistência espermática ruim (RR), apresentando os maiores declínios de motilidade total ao longo do período compreendido entre o início do resfriamento e o fim da incubação pós-descongelamento. Os ejaculados que apresentaram valores de $\Delta R_{(MT)}$ entre 41,2 e 65,1 % foram classificados como resistência espermática intermediária (RI). Desta maneira, os grupos foram formados com as seguintes características (Tab. 3):

Tabela 3. Valores de média, erro-padrão, mínimo e máximo do $\Delta R_{(MT)}$ por grupo de resistência espermática ao processo de congelamento-descongelamento de ejaculados de touros bubalinos (*Bubalus bubalis*)

Parâmetro	Grupo		
	RB $\Delta R_{(MT)} \leq 41,2 \%$	RI $41,2 \% < \Delta R_{(MT)} < 65,1 \%$	RR $\Delta R_{(MT)} \geq 65,1 \%$
Número de ejaculados	23	45	22
Média \pm erro padrão (%)	33,33 \pm 1,20	53,80 \pm 1,05	77,80 \pm 2,20
Máximo – mínimo (%)	20,80 - 41,20	42,50 - 65,08	65,12 - 97,50

$\Delta R_{(MT)}$: declínio da motilidade total entre o início (PR) e 180 minutos após descongelamento (PD_T180) [$\Delta R_{(MT)} = (PR_{(MT)} - PD_T180_{(MT)})$].

RB: grupo de resistência espermática boa; RI: grupo de resistência espermática intermediária; RR: grupo de resistência espermática ruim.

Com a seleção dos ejaculados e a classificação de acordo com a resistência espermática ao processo de congelamento-descongelamento, pôde-se observar as diferenças entre os perfis de motilidade total dos grupos formados (Fig. 5). Foram encontradas diferenças de resistência espermática tanto entre animais quanto entre ejaculados de um mesmo animal (Tab. 4). Como o objetivo deste trabalho era estudar os danos espermáticos em ejaculados com diferença na resistência, a fim de minimizar fatores de confundimento, os ejaculados classificados como de resistência intermediária ao processo de congelamento-descongelamento foram eliminados.

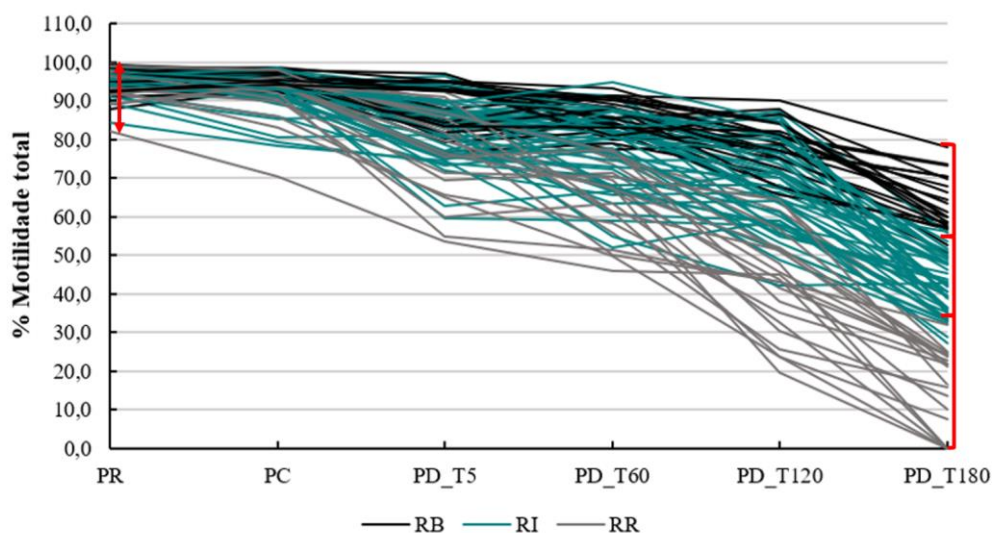


Figura 5. Motilidade total individual, em porcentagem, desde o pré-resfriamento aos 180 minutos pós-descongelamento, dos 90 ejaculados de touros bubalinos avaliados no CASA. PR: pré-resfriamento; PC: pré-congelamento; PD_T5: pós-descongelamento, 5 min.; PD_T60: pós-descongelamento, 60 min.; PD_T120: pós-descongelamento, 120 min.; PD_T180: pós-descongelamento, 180 min; RB: grupo de resistência espermática boa; RI: grupo de resistência espermática intermediária; RR: grupo de resistência espermática ruim. ↑: ressalta a semelhança entre os ejaculados da motilidade total no pré-resfriamento. ↓: agrupa os ejaculados com declínios da motilidade total semelhantes.

Tabela 4. Caracterização numérica de ejaculados e animais dos grupos de resistência espermática boa e ruim ao processo de congelamento-descongelamento

	Grupo	
	RB ($\Delta R_{(MT)} \leq 41,2\%$)	RR ($\Delta R_{(MT)} \geq 65,1\%$)
Número total de ejaculados	23	22
Número total de animais ¹	10 (23)	8 (22)
Número de ejaculados/animal	1-4	1-10
Nº de animais exclusivos do grupo ²	5 (14)	3 (13)
Nº de animais presentes em ambos os grupos ³	5 (9)	5 (9)

Dados apresentados em números absolutos. $\Delta R_{(MT)}$: declínio da motilidade total entre o início (PR) e 180 minutos após descongelamento (PD_T180) [$\Delta R_{(MT)} = (PR_{(MT)} - PD_{T180(MT)})$]; RB: grupo de resistência espermática boa; RR: grupo de resistência espermática ruim. ¹Número total de animais que apresentaram ejaculados em cada grupo, em um total de 13 touros utilizados para o estudo. ^{2,3} Número de animais que apresentaram ejaculados classificados somente em um grupo e em ambos os grupos, respectivamente. Os valores entre parênteses () representam o número de ejaculados obtidos a partir do respectivo número de animais.

5.2. Comparação da qualidade seminal entre os grupos de ejaculados com resistência espermática boa e ruim ao processo de congelamento-descongelamento

As médias das avaliações realizadas no sêmen *in natura* estão apresentadas na Tab. 5, por grupo de resistência espermática ao processo de congelamento-descongelamento. As características de qualidade do sêmen *in natura* não diferiram entre os grupos.

Tabela 5. Valores de média e erro-padrão das características dos ejaculados *in natura* de touros bubalinos (*Bubalus bubalis*), por grupo de resistência espermática ao processo de congelamento-descongelamento

Características	Grupos	
	RB	RR
Volume (mL)	2,15 ± 0,2 ^a	2,8 ± 0,3 ^a
Turbilhonamento (1-5) *	3,0 ^a	3,0 ^a
Motilidade (%)	88,6 ± 1,4 ^a	86,4 ± 1,7 ^a
Vigor (1-5) *	3,0 ^a	3,0 ^a
Espermatozoides totais	2634,2 ± 402,8 ^a	2928,1 ± 605,9 ^a
Espermatozoides normais (%)**	80,0 ± 1,06 ^a	80,5 ± 1,12 ^a
Células reativas ao teste hiposmótico (%)	81,9 ± 2,1 ^a	79,2 ± 1,9 ^a

a: Médias seguidas de letras iguais não diferem significativamente ($p > 0,05$). * : mediana; ** : resultados da análise de morfologia espermática no Anexo 4. RB: grupo de resistência espermática boa; RR: grupo de resistência espermática ruim.

Comparando os parâmetros de motilidade e cinética fornecidos pelo CASA (Anexo 3), os grupos de resistência espermática apresentaram algumas diferenças importantes. O grupo de resistência espermática boa (RB) exibiu motilidade total significativamente ($p \leq 0,05$) maior que o grupo de resistência espermática ruim (RR) nos tempos que seguiram o descongelamento (PD_T5, PD_T60, PD_T120 e PD_T180). As médias de motilidade total de cada grupo de resistência espermática estão representadas na Fig. 6.

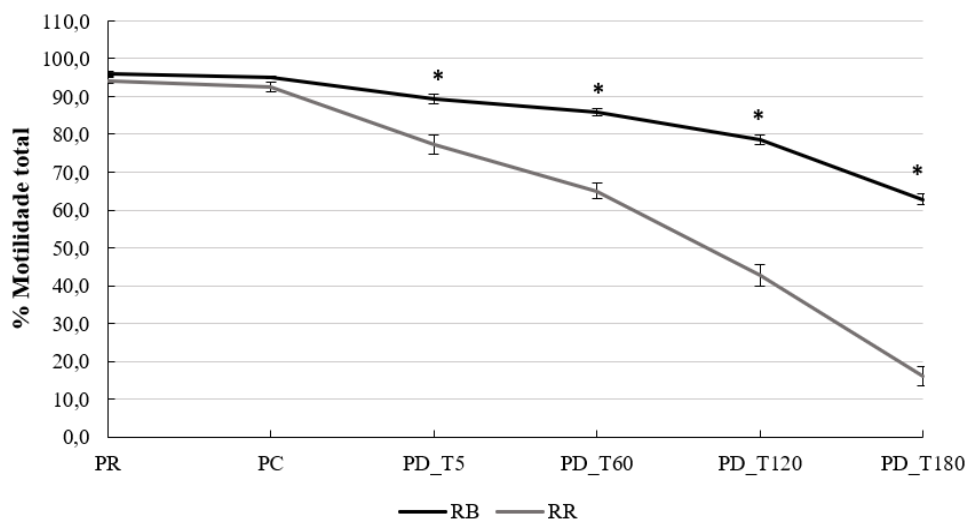


Figura 6. Média e erro padrão da motilidade total de espermatozoides bubalinos avaliados no CASA., por grupo, desde o pré-resfriamento aos 180 minutos pós-descongelamento, PR: pré-resfriamento; PC: pré-congelamento; PD_T5: pós-descongelamento, 5 min.; PD_T60: pós-descongelamento, 60 min.; PD_T120: pós-descongelamento, 120 min.; PD_T180: pós-descongelamento, 180 min.; RB: grupo de resistência espermática boa; RR: grupo de resistência espermática ruim.

Assim como a motilidade total, a motilidade progressiva foi significativamente ($p \leq 0,05$) maior no grupo RB comparada ao grupo RR, nos mesmos momentos (PD_T5, PD_T60, PD_T120 e PD_T180). Nos parâmetros de velocidade espermática (VCL, VSL e VAP), o grupo RB mostrou-se significativamente ($p \leq 0,05$) superior ao grupo RR, desde o início (PR) até o fim das avaliações (PD_T180). Os parâmetros ALH e BCF também foram significativamente ($p \leq 0,05$) superiores no grupo RB, nos momentos PD_T60, PD_T120 e PD_T180, sendo que o ALH apresentou diferença também no tempo PR. As médias de cada um desses parâmetros por grupo de resistência espermática estão representados na Fig. 7.

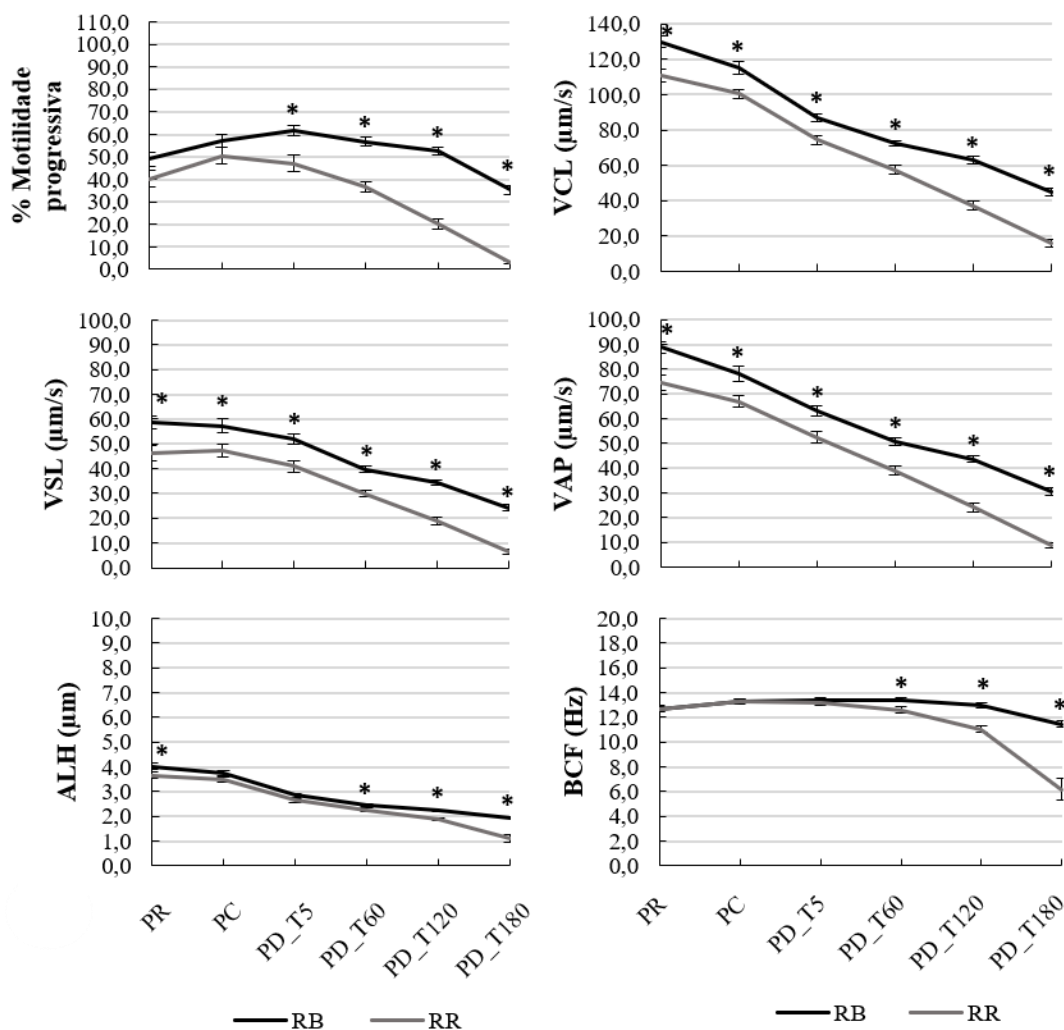


Figura 7. Média e erro padrão dos parâmetros de motilidade e cinética de espermatozoides bubalinos avaliados no CASA, por grupo, desde o pré-resfriamento aos 180 minutos pós-descongelamento.

PR: pré-resfriamento; PC: pré-congelamento; PD_T5: pós-descongelamento, 5 min.; PD_T60: pós-descongelamento, 60 min.; PD_T120: pós-descongelamento, 120 min.; PD_T180: pós-descongelamento, 180 min. RB: grupo de resistência espermática boa; RR: grupo de resistência espermática ruim.

* : indica diferença significativa entre os grupos ($p \leq 0,05$).

5.3. Avaliações de citometria de fluxo em espermatozoides com resistência boa ou ruim ao processo de congelamento-descongelamento

As avaliações realizadas por meio de citometria de fluxo permitiram encontrar diferenças estruturais e funcionais nos espermatozoides oriundos de ejaculados com diferentes resistências espermáticas ao processo de congelamento-descongelamento.

Na análise das membranas plasmática e acrossômica, com a utilização das sondas IP e FITC-PSA, os grupos RB e RR apresentaram porcentagens significativamente ($p \leq 0,05$) diferentes de espermatozoides com ambas as membranas íntegras (MPAI - Fig. 8A), tanto no tempo PD_T5 ($67,8 \pm 1,5$ vs. $49,1 \pm 3,7$ %, grupos RB e RR, respectivamente), quanto no tempo PD_T180 ($61,1 \pm 2,1$ vs. $45,6 \pm 3,1$ %, grupos RB e RR, respectivamente). A porcentagem de espermatozoides com ambas as membranas íntegras diminuiu significativamente ($p \leq 0,05$) apenas no grupo RB, ao longo do tempo (PD_T5 vs. PD_T180).

As porcentagens de espermatozoides com a membrana plasmática íntegra, mas com a acrossômica lesada (MPIAL - Fig. 8B) foram semelhantes ($p > 0,05$) entre os grupos nos dois tempos avaliados (PD_T5: $0,2 \pm 0,04$ vs. $0,3 \pm 0,05$ %; PD_T180: $1,1 \pm 0,12$ vs. $1,1 \pm 0,19$ %, grupo RB e RR, respectivamente). Contudo, dentro de cada grupo essas porcentagens aumentaram significativamente ($p \leq 0,05$) ao longo do tempo (PD_T5 vs. PD_T180).

A população de espermatozoides com a membrana plasmática lesada, mas com a acrossômica íntegra (MPLAI - Fig. 8C) foi significativamente ($p \leq 0,05$) diferente entre os grupos apenas no primeiro tempo avaliado (PD_T5: $18,1 \pm 1,0$ vs. $26,8 \pm 2,8$ %; PD_T180: $15,9 \pm 1,2$ vs. $21,9 \pm 2,8$ %, grupo RB e RR, respectivamente). Dentro dos grupos, houve alteração ($p \leq 0,05$) nas porcentagens desse tipo de população espermática ao longo do tempo (PD_T5 vs. PD_T180), apenas no grupo RR.

No primeiro tempo avaliado (PD_T5), o grupo RB apresentou significativamente ($p \leq 0,05$) menor porcentagem de espermatozoides com ambas as membranas lesadas ($13,9 \pm 0,8$ vs. $23,8 \pm 1,8$ %, grupos RB e RR, respectivamente) (MPAL - Fig. 8D). Do mesmo modo, no tempo PD_T180, a porcentagem desta população de espermatozoides foi significativamente ($p \leq 0,05$) menor no grupo RB ($23,8 \pm 1,4$ vs. $31,3 \pm 1,3$ %, respectivamente). Dentro dos grupos, as porcentagens de espermatozoides com ambas as membranas lesadas aumentaram significativamente ($p \leq 0,05$) entre os tempos (PD_T5 vs. PD_T180).

Ainda avaliando a membrana plasmática, por meio da sonda YOPRO, o grupo RB apresentou maior ($p \leq 0,05$) porcentagem de espermatozoides com estabilidade de membrana (Fig. 9) que o grupo RR, nos dois tempos avaliados ($57,1 \pm 1,8$ vs. $40,5 \pm 3,5$ % e $58,1 \pm 2,0$ vs. $42,3 \pm 3,0$ %, tempos PD_T5 e PD_T180, respectivamente). A estabilidade de membrana foi semelhante ($p > 0,05$) entre os tempos em cada um dos grupos.

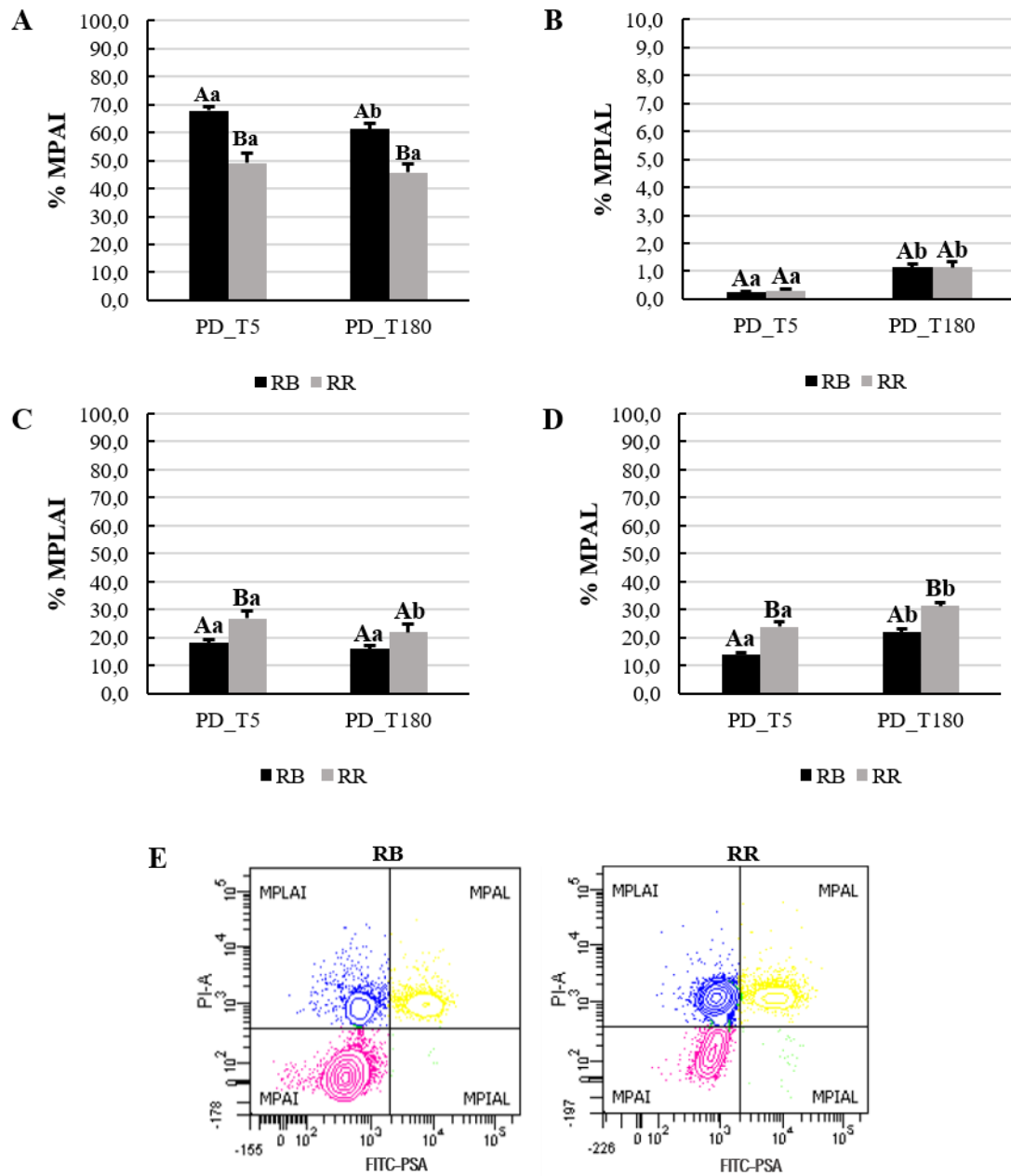


Figura 8. Integridade das membranas plasmática e acrossômica de espermatozoides bubalinos descongelados, analisados por citometria de fluxo, com as sondas fluorescentes FITC-PSA e iodeto de propídio. A: porcentagem da população espermática com membranas plasmática e acrossômica íntegras (MPAI); B: porcentagem da população espermática com membrana plasmática íntegra e acrossômica lesada (MPIAL); C: porcentagem da população espermática com membrana plasmática lesada e acrossômica íntegra (MPLAI); D: porcentagem da população espermática com membranas plasmática e acrossômica lesadas (MPAL); E: *Dot plots* ilustrativos mostrando a frequência de células nas quatro populações de espermatozoides entre os grupos RB e RR. PD_T5: pós-descongelamento, 5 min.; PD_T180: pós-descongelamento, 180 min. RB: grupo de resistência espermática boa; RR: grupo de resistência espermática ruim. A, B: letras maiúsculas distintas indicam diferença entre os grupos em cada tempo ($p \leq 0,05$). a, b: letras minúsculas distintas indicam diferença entre os tempos em cada grupo ($p \leq 0,05$).

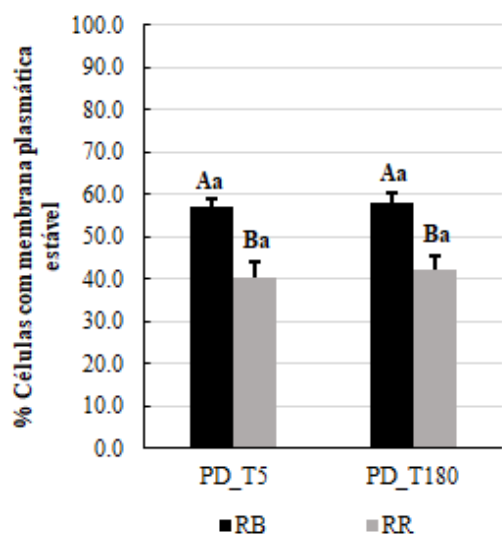


Figura 9. Média e erro-padrão da porcentagem de células espermáticas (*Bubalus bubalis*) com membrana plasmática estável, analisadas por citometria de fluxo, com a sonda fluorescente YOPRO-1.

PD_T5: pós-descongelamento, 5 min.; PD_T180: pós-descongelamento, 180 min.

RB: grupo de resistência espermática boa; RR: grupo de resistência espermática ruim.

A,B: letras maiúsculas distintas indicam diferença significativa entre os grupos em cada tempo ($p \leq 0,05$).

a,b: letras minúsculas distintas indicam diferença

A intensidade de fluorescência no total de células espermáticas com alto potencial de membrana mitocondrial (Fig. 10A), avaliado com o uso da sonda MitoStatus Red, foi significativamente ($p \leq 0,05$) maior no grupo RB, em cada um dos tempos avaliados. No tempo inicial pós-descongelamento (PD_T5), os valores dos grupos RB e RR foram $17.691,7 \pm 2.064,4$ e $7.607,7 \pm 1.586,3$ U.A., respectivamente. No tempo final pós-descongelamento (PD_T180), os valores para os grupos RB e RR foram $20.842,0 \pm 3.026,5$ e $6.445,1 \pm 1.773,3$ U.A., respectivamente. Dentro de cada grupo, não houve diferença ($p > 0,05$) em nenhum dos dois tempos avaliados (PD_T5 e PD_T180).

Considerando apenas as células espermáticas íntegras (YOPRO-1 negativo) (Fig. 10B), a intensidade de fluorescência de alto potencial de membrana mitocondrial também foi significativamente ($p \leq 0,05$) maior no grupo RB, em cada um dos tempos avaliados. No tempo PD_T5, esses valores foram $36.216,5 \pm 2.347,0$ e $29.342,5 \pm 1.898,0$ U.A., para os grupos RB e RR, respectivamente, enquanto no tempo PD_T180, os valores foram $37.365,0 \pm 2.368,1$ e $28.241,5 \pm 2.387,3$ U.A., respectivamente. Dentro de cada grupo, as intensidades de fluorescência permaneceram semelhantes ($p > 0,05$) entre os dois tempos avaliados (PD_T5 e PD_T180).

Ao considerar apenas as células espermáticas lesadas (YOPRO-1 positivo) (Fig. 10C), o grupo RB ainda apresentou significativamente ($p \leq 0,05$) maior intensidade de fluorescência de alto potencial de membrana mitocondrial que o grupo RR, no tempo PD_T5, sendo semelhantes ($p > 0,05$) no tempo PD_T180. Mas dentro de cada grupo, o grupo RB apresentou significativamente ($p \leq 0,05$) menor intensidade de fluorescência no tempo PD_T180 quando comparado ao PD_T5, enquanto no grupo RR as intensidades de fluorescência foram semelhantes entre os dois tempos. No tempo PD_T5, as intensidades de fluorescência foram $2.667,0 \pm 352,7$ e $1.863,5 \pm 182,7$ U.A., para os grupos RB e RR, respectivamente, enquanto no tempo PD_T180, esses valores foram $1.589,6 \pm 95,7$ e $1569,4 \pm 74,1$ U.A., respectivamente.

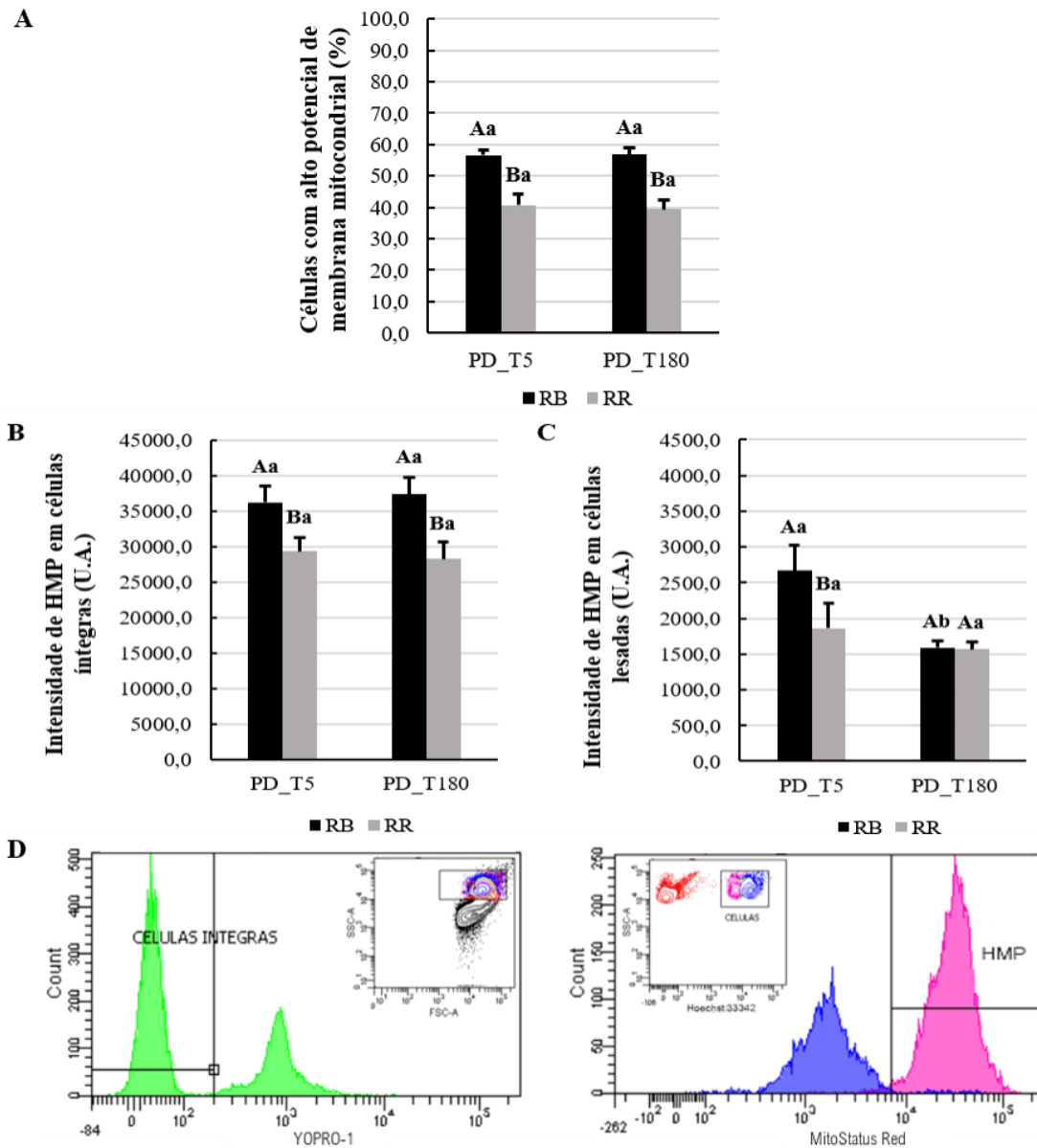


Figura 10. Alto potencial de membrana mitocondrial em espermatozoides bubalinos descongelados, analisados por citometria de fluxo com a sonda fluorescente MitoStatus Red. A: Porcentagem de células com alto potencial de membrana mitocondrial; B: intensidade de fluorescência de HMP, em células íntegras (U.A.); C: intensidade de fluorescência de HMP, em células lesadas (U.A.); D: à esquerda, histograma representativo mostrando a intensidade de fluorescência das células espermática íntegras e não íntegras e “Side scatter x Forward scatter dot plot” (canto superior direito), quadrante contém população de células de interesse; à direita, histograma representativo mostrando a intensidade de fluorescência em células íntegras (rosa) e lesadas (azul) de HMP e “Side scatter x Forward scatter dot plot” (canto superior esquerdo) com células íntegras (rosa), não íntegras (azul) e mortas (vermelho) – quadrante contém população de células de interesse.

HMP: alto potencial de membrana mitocondrial (*High mitochondrial membrane potential*).

Valores expressos como média e erro padrão.

A, B: letras maiúsculas distintas indicam diferença significativa entre os grupos em cada tempo ($p \leq 0,05$).

a, b: letras minúsculas distintas indicam diferença significativa entre os tempos em cada grupo ($p \leq 0,05$).

Ao analisar as ERO nos espermatozoides, foram observadas diferenças significativas entre os grupos de resistência espermática. Nos dois tempos avaliados, a porcentagem de espermatozoides com alto peróxido de hidrogênio intracelular (Fig. 11A), avaliado com o uso da sonda CM-H2DCFDA, foi significativamente ($p \leq 0,05$) maior no grupo RB ($58,2 \pm 1,8$ e $56,3 \pm 1,7$ %, tempos PD_T5 e PD_T180, respectivamente) que no grupo RR ($43,0 \pm 3,7$ e $38,7 \pm 2,9$ %, tempos PD_T5 e PD_T180, respectivamente). Porém, não houve diferença ($p > 0,05$) entre os tempos em nenhum dos dois grupos.

A porcentagem de espermatozoides com alto ânion superóxido (Fig. 11B), avaliado com a utilização da sonda MitoSOX™ Red, foi significativamente ($p \leq 0,05$) maior no grupo RR ($65,2 \pm 3,3$ e $71,0 \pm 2,8$ %, tempos PD_T5 e PD_T180, respectivamente) que no grupo RB ($53,9 \pm 2,6$ e $55,4 \pm 2,6$ %, tempos PD_T5 e PD_T180, respectivamente), nos dois tempos avaliados. Não houve diferença ($p > 0,05$) entre os tempos em cada grupo.

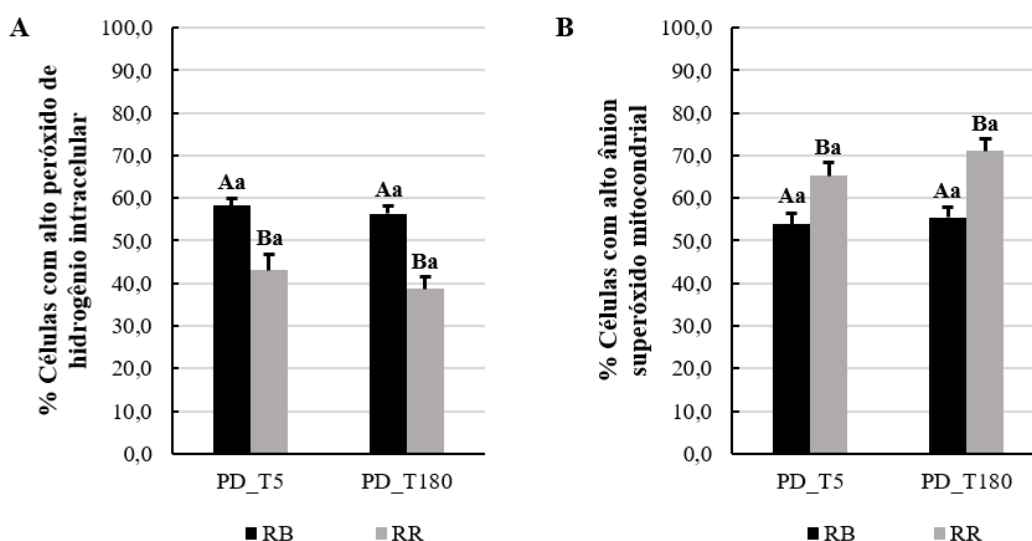


Figura 11. Média e erro-padrão de espécies reativas de oxigênio em espermatozoides bubalinos descongelados, analisados por citometria de fluxo, com as sondas fluorescentes CM-H2DCFDA (peróxido de hidrogênio) e MitoSOX™ Red (ânion superóxido). A: porcentagem de células com alto peróxido de hidrogênio intracelular; D: porcentagem de células com alto ânion superóxido mitocondrial. PD_T5: pós-descongelamento, 5 min.; PD_T180: pós-descongelamento, 180 min. RB: grupo de resistência espermática boa; RR: grupo de resistência espermática ruim. IF: intensidade de fluorescência. U.A.: unidade arbitrária.

A, B: letras maiúsculas distintas indicam diferença significativa entre os grupos em cada tempo ($p \leq 0,05$).

a, b: letras minúsculas distintas indicam diferença significativa entre os tempos em cada grupo ($p \leq 0,05$).

Apesar de haver diferenças entre os grupos de resistência espermática nas porcentagens de células com alta concentração de ERO, não foi possível encontrar diferença ($p > 0,05$) entre eles na avaliação da intensidade da peroxidação lipídica com a sonda BODIPY, em nenhum dos dois tempos avaliados (Fig. 12). No tempo PD_T5, a intensidade da peroxidação lipídica foi $221,57 \pm 11,4$ e $211,27 \pm 8,5$ U.A., no grupo RB e RR, respectivamente, enquanto no tempo PD_T180, os valores foram $385,26 \pm 20,4$ e $332,77 \pm 16,1$ U.A., respectivamente. Em cada um dos grupos, foi observado aumento significativo ($p \leq 0,05$) da peroxidação lipídica com o decorrer do tempo.

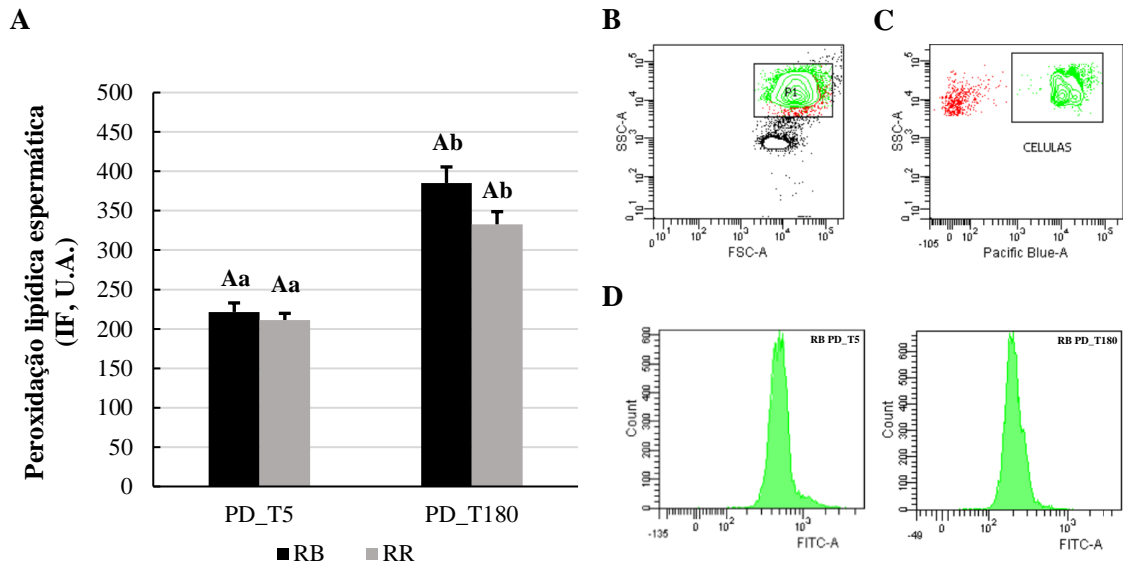


Figura 12. Peroxidação lipídica em espermatozoides bubalinos descongelados, analisados por citometria de fluxo, com a sonda fluorescente C-11 BODIPY. A: Média e erro-padrão da peroxidação lipídica espermática (IF, U.A.); B: Figura representativa “Side scatter x Forward scatter dot plot”, quadrante P1 contém população de células de interesse. C: “Dot plot” representativo mostrando as populações espermáticas íntegras (verde) e lesadas (vermelho); D: Histogramas representativos mostrando o aumento da intensidade de fluorescência da peroxidação lipídica de um mesmo ejaculado, entre os tempos PD_T5 (à esquerda) e PD_T180 (à direita).

A, B: letras maiúsculas distintas indicam diferença significativa entre os grupos em cada tempo ($p \leq 0,05$).
a, b: letras minúsculas distintas indicam diferença significativa entre os tempos em cada grupo ($p \leq 0,05$).

Quando os espermatozoides foram desafiados na incubação com ácido araquidônico (Fig. 13), a peroxidação lipídica, também avaliada com a utilização da sonda C11-BODIPY, foi semelhante ($p > 0,05$) entre os dois grupos de resistência espermática ($589,4 \pm 17,9$ e $640,9 \pm 37,1$ U.A., nos grupos RB e RR, respectivamente).

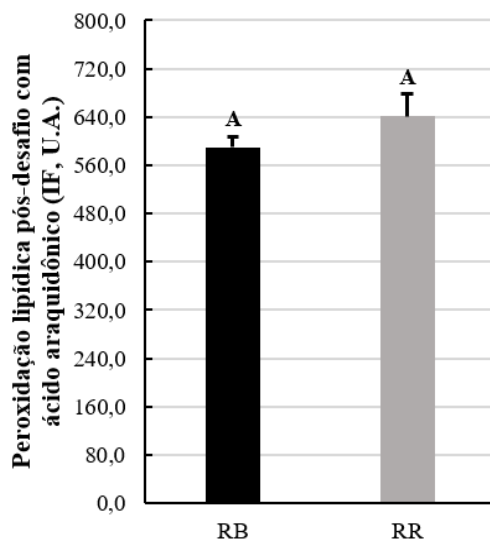


Figura 13. Média e erro-padrão da peroxidação lipídica pós-desafio com ácido araquidônico em espermatozoides bubalinos descongelados (PD_T5), analisados por citometria de fluxo, com a sonda fluorescente C-11 BODIPY.

RB: grupo de resistência espermática boa; RR: grupo de resistência espermática ruim.

A: letras iguais não diferem significativamente ($p > 0,05$)

5.4. Estudo das correlações entre as características estruturais e funcionais de espermatozoides bubalinos (Bubalus bubalis)

Nesta seção, foram avaliadas as relações entre os parâmetros espermáticos avaliados ao longo do trabalho. Para tanto, relembram-se algumas definições utilizadas na metodologia:

- O critério de separação dos grupos, $\Delta R_{(MT)}$, é composto pelo declínio da motilidade total entre o início (PR) e 180 minutos após descongelamento (PD_T180) [$\Delta R_{(MT)} = (PR_{(MT)} - PD_T180_{(MT)})$]. Assim, quanto maior o $\Delta R_{(MT)}$, menor a resistência espermática.
- A integridade das membranas plasmática e acrossômica, avaliada por citometria de fluxo, foi considerada como característica estrutural, enquanto os parâmetros de motilidade e cinética avaliados pelo CASA, o teste hiposmótico e as demais características avaliadas por citometria de fluxo (estabilidade da membrana plasmática, potencial de membrana mitocondrial, produção de peróxido de hidrogênio intracelular, produção de ânion superóxido mitocondrial e peroxidação lipídica) foram considerados como características funcionais dos espermatozoides.

Nas Tab. 6 e Tab. 7, observam-se as correlações entre a sensibilidade espermática ($\Delta R_{(MT)}$) e os outros parâmetros do CASA (motilidade progressiva, VCL, VSL, VAP e ALH), no tempo PD_T5 e no tempo PD_T180, respectivamente. A resistência espermática é correlacionada negativamente ($p \leq 0,05$) com tais parâmetros, ilustrando que espermatozoides mais resistentes possuem maiores padrões de movimento. Nota-se, ainda, que a maior resistência espermática também está negativamente correlacionada ($p \leq 0,05$) com a integridade estrutural (membranas plasmática e acrossômica íntegras) e funcional (estabilidade da membrana plasmática) da membrana espermática e com a produção de peróxido de hidrogênio intracelular. Enquanto a menor resistência espermática está correlacionada positivamente ($p \leq 0,05$) com lesões das membranas plasmática e acrossômica (membrana plasmática lesada e acrossômica íntegra e membranas plasmática e acrossômica lesadas) e com a produção de ânion superóxido.

No tempo PD_T180 (Tab. 7), os parâmetros de velocidade e cinética (motilidade total, motilidade progressiva, VCL, VSL, VAP, ALH e BCF) se correlacionam diretamente ($p \leq 0,05$) com o potencial de membrana mitocondrial. Enquanto no tempo PD_T5 (Tab. 6), apenas as motilidades total e progressiva apresentam correlação ($p \leq 0,05$) com o metabolismo mitocondrial. Em ambos os tempos (PD_T5 e PD_T180), o metabolismo mitocondrial possui alta correlação direta ($p \leq 0,05$) com a integridade da membrana plasmática, tanto estrutural (membranas plasmática e acrossômica íntegras), quanto funcional (estabilidade da membrana plasmática).

A resistência espermática está também correlacionada ($p \leq 0,05$) com o metabolismo mitocondrial, tanto na porcentagem de espermatozoides com alto metabolismo mitocondrial, quanto na intensidade de fluorescência em células íntegras (Tab. 8). Além de se correlacionar ($p \leq 0,05$) com a produção de espécies reativas de oxigênio, quanto mais resistente, maior a produção de peróxido de hidrogênio intracelular e menor a produção de ânion superóxido (Tab. 8). O metabolismo mitocondrial está relacionado positivamente ($p \leq 0,05$) com a produção de peróxido de hidrogênio intracelular e negativamente ($p \leq 0,05$) com a produção de ânion superóxido. Enquanto a peroxidação lipídica (Tab. 9 e Tab. 10) não está correlacionada ($p > 0,05$) com o metabolismo mitocondrial ou com a produção de espécies reativas de oxigênio (peróxido de hidrogênio e ânion superóxido).

Tabela 6. Correlação entre o $\Delta R_{(MT)}$ e as características de espermatozoides bubalinos (*Bubalus bubalis*) avaliados após o descongelamento (PD_T5), pelo CASA e por meio de citometria de fluxo.

	$\Delta R_{(MT)}$	MT	MP	VCL	VSL	VAP	ALH	BCF	MPL AI	MPAL	MPAI	MPIAL	Estab.	HMP	HMP íteg.	HMP les.	Alto H ₂ O ₂	Alto O ₂
MT	-0,52*																	
MP	-0,47*	0,80*																
VCL	-0,53*	0,42*	0,39*															
VSL	-0,56*	0,51*	0,75*	0,80*														
VAP	-0,55*	0,49*	0,60*	0,93*	0,94*													
ALH	-0,32*	-0,03	-0,12	0,74*	0,36*	0,51*												
BCF	-0,23	0,12	0,34*	0,67*	0,65*	0,65*	0,50*											
MPLAI	0,34*	-0,66*	-0,51*	-0,04	-0,15	-0,08	0,21	0,12										
MPAL	0,60*	-0,59*	-0,32*	-0,15	-0,12	-0,14	0,03	0,21	0,44*									
MPAI	-0,53*	0,74*	0,51*	0,10	0,16	0,12	-0,16	-0,19	-0,89*	-0,81*								
MPIAL	0,23	-0,24	-0,18	0,08	-0,06	-0,001	0,25	0,15	0,19	0,34*	-0,31*							
Estab.	-0,51*	0,72*	0,47*	0,04	0,11	0,08	-0,25	-0,22	-0,80*	-0,81*	0,95*	-0,33*						
HMP	-0,49*	0,71*	0,44*	0,03	0,07	0,06	-0,25	-0,25	-0,79*	-0,82*	0,94*	-0,30*	0,995*					
HMP íteg.	-0,38*	0,09	-0,05	0,46*	0,20	0,34*	0,46*	0,22	0,17	-0,20	-0,01	0,12	0,04	0,06				
HMP les.	-0,27	0,10	0,004	0,26	0,09	0,17	0,29	0,17	0,13	-0,13	-0,02	0,12	-0,02	0,03	0,65*			
Alto H₂O₂	-0,45*	0,74*	0,48*	-0,01	0,05	0,02	-0,26	-0,25	-0,80*	-0,78*	0,93*	-0,32*	0,96*	0,96*	0,05	0,03		
Alto O₂	0,38*	-0,45*	-0,32*	0,07	-0,04	0,02	0,19	0,36*	0,46*	0,61*	-0,62*	0,31*	-0,69*	-0,69*	-0,06	-0,05	-0,67*	
LPO	-0,05	-0,03	-0,01	0,18	0,10	0,19	0,11	-0,04	0,03	0,15	-0,10	0,10	-0,10	-0,07	0,11	0,14	-0,13	0,20

$\Delta R_{(MT)}$: declínio da motilidade total entre o início (PR) e 180 minutos após descongelamento (PD_T180) [$\Delta R_{(MT)} = (PR_{(MT)} - PD_{T180(MT)})$]. MT: motilidade total. MP: motilidade progressiva. VCL: velocidade curvilínea. VSL: velocidade linear. VAP: velocidade média da trajetória. ALH: amplitude do deslocamento lateral da cabeça. BCF: frequência do batimento do flagelo MPAI: células com membranas plasmática e acrossômica íntegras; MPIAL: células com membrana plasmática íntegra e acrossômica lesada; MPAL: células com membranas plasmática e acrossômica lesadas; MPLAI: células com membrana plasmática lesada e acrossômica íntegra. Estab.: estabilidade da membrana plasmática. HMP: células com alto potencial de membrana mitocondrial. HMP íteg.: alto potencial de membrana mitocondrial em células íntegras. HMP les.: alto potencial de membrana mitocondrial em células lesadas. Alto H₂O₂: produção de peróxido de hidrogênio intracelular. Alto O₂: produção de ânion superóxido mitocondrial. LPO: peroxidação lipídica. * : p≤0,05.

Tabela 7. Correlação entre o $\Delta R_{(MT)}$ e as características de espermatozoides bubalinos (*Bubalus bubalis*) avaliados após o descongelamento (PD_T180), pelo CASA e por meio de citometria de fluxo.

	$\Delta R_{(MT)}$	MT	MP	VCL	VSL	VAP	ALH	BCF	MPL AI	MPAL	MPAI	MPIAL	Estab.	HPM	HMP ínteg.	HMP les.	Alto H ₂ O ₂	Alto O ₂
MT	-0,99*																	
MP	-0,94*	0,95*																
VCL	-0,93*	0,93*	0,91*															
VSL	-0,92*	0,91*	0,93*	0,98*														
VAP	-0,92*	0,91*	0,92*	0,99*	0,997*													
ALH	-0,81*	0,80*	0,68*	0,86*	0,79*	0,81*												
BCF	-0,83*	0,82*	0,73*	0,89*	0,85*	0,86*	0,98*											
MPLAI	0,25	-0,31*	-0,26	-0,14	-0,14	-0,14	-0,04	-0,04										
MPAL	0,68*	-0,71*	-0,62*	-0,62*	-0,57*	-0,59*	-0,58*	-0,57*	0,31*									
MPAI	-0,55*	0,61*	0,53*	0,45*	0,42*	0,43*	0,36*	0,35*	-0,86*	-0,75*								
MPIAL	0,02	-0,001	-0,12	-0,12	-0,16	-0,14	-0,07	-0,09	-0,28	-0,15	0,23							
Estab.	-0,55*	0,61*	0,54*	0,46*	0,44*	0,45*	0,38*	0,35*	-0,76*	-0,75*	0,93*	0,26						
HMP	-0,59*	0,64*	0,57*	0,48*	0,47*	0,48*	0,40*	0,37*	-0,71*	-0,77*	0,91*	0,25	0,99*					
HMP ínteg.	-0,38*	0,41*	0,33*	0,32*	0,28	0,29	0,30*	0,29	-0,46*	-0,42*	0,53*	0,29	0,55*	0,59*				
HMP les.	0,01	-0,004	-0,02	-0,01	-0,04	-0,02	0,03	0,02	0,02	-0,08	0,02	0,22	0,15	0,19	0,58*			
Alto H₂O₂	-0,60*	0,64*	0,57*	0,48*	0,47*	0,47*	0,40*	0,38*	-0,72*	-0,67*	0,86*	0,14	0,88*	0,87*	0,52*	0,08		
Alto O₂	0,49*	-0,53*	-0,54*	-0,42*	-0,44*	-0,44*	-0,25	-0,25	0,50*	0,6*	-0,70*	-0,01	-0,75*	-0,78*	-0,46*	-0,25	-0,68*	
LPO	-0,31*	0,34*	0,40*	0,38*	0,37*	0,37*	0,24	0,24	-0,10	-0,01	0,08	-0,09	0,17	0,16	0,06	-0,24	0,25	-0,03

$\Delta R_{(MT)}$: declínio da motilidade total entre o início (PR) e 180 minutos após descongelamento (PD_T180) [$\Delta R_{(MT)} = (PR_{(MT)} - PD_{T180(MT)})$]. MT: motilidade total. MP: motilidade progressiva. VCL: velocidade curvilinear. VSL: velocidade linear. VAP: velocidade média da trajetória. ALH: amplitude do deslocamento lateral da cabeça. BCF: frequência do batimento do flagelo MPAL: células com membranas plasmática e acrossômica íntegras; MPIAL: células com membrana plasmática íntegra e acrossômica lesada; MPAL: células com membranas plasmática e acrossômica lesadas; MPLAI: células com membrana plasmática lesada e acrossômica íntegra. Estab.: estabilidade da membrana plasmática. HMP: células com alto potencial de membrana mitocondrial. HMP ínteg.: alto potencial de membrana mitocondrial em células íntegras. HMP les.: alto potencial de membrana mitocondrial em células lesadas. Alto H₂O₂: produção de peróxido de hidrogênio intracelular. Alto O₂: produção de ânion superóxido mitocondrial. LPO: peroxidação lipídica. * : p≤0,05.

Tabela 8. Correlações entre a sensibilidade espermática [$\Delta R_{(MT)}$] e as avaliações potencial de membrana mitocondrial e produção de espécies reativas de oxigênio de espermatozoides bubalinos (*Bubalus bubalis*) descongelados a 37 °C, nos dois tempos avaliados (PD_T5 e PD_T180)

	$\Delta R_{(MT)}$	HMP PD_T5	HMP íntegras PD_T5	HMP lesadas PD_T5	HMP PD_T180	HMP íntegras PD_T180	HMP lesadas PD_T180	Alto H ₂ O ₂ PD_T5	Alto H ₂ O ₂ PD_T180	Alto O ₂ PD_T5
HMP PD_T5	-0,49*									
HMP íntegras PD_T5	-0,38*	0,06								
HMP lesadas PD_T5	-0,27	0,03	0,65*							
HMP PD_T180	-0,59*	0,75*	0,20	0,19						
HMP íntegras PD_T180	-0,38*	0,42*	0,29	0,03	0,59*					
HMP lesadas PD_T180	0,01	-0,14	0,14	0,07	0,19	0,58*				
Alto H₂O₂ PD_T5	-0,45*	0,96*	0,05	0,03	0,76*	0,41*	-0,08			
Alto H₂O₂ PD_T180	-0,60*	0,84*	0,16	0,13	0,87*	0,52*	0,08	0,83*		
Alto O₂ PD_T5	0,38*	-0,69*	-0,06	-0,05	-0,55*	-0,13	0,21	-0,67*	-0,67*	
Alta O₂ PD_T180	0,49*	-0,57*	-0,27	-0,32*	-0,78*	-0,46*	-0,25	-0,52*	-0,68*	0,60*

$\Delta R_{(MT)}$: declínio da motilidade total entre o início (PR) e 180 minutos após descongelamento; HMP: células com alto potencial de membrana mitocondrial. HMP íntegras: alto potencial de membrana mitocondrial em células íntegras. HMP lesadas: alto potencial de membrana mitocondrial em células lesadas. Alto H₂O₂: produção de peróxido de hidrogênio intracelular. Alto O₂: produção de ânion superóxido mitocondrial. PD_T5: pós-descongelamento, 5 min. PD_T180: pós-descongelamento, 180 min. * : p≤0,05.

Tabela 9. Correlações entre a sensibilidade espermática [$\Delta R_{(MT)}$], a peroxidação lipídica e as avaliações potencial de membrana mitocondrial em espermatozoides bubalinos (*Bubalus bubalis*) descongelados a 37 °C, nos dois tempos avaliados (PD_T5 e PD_T180)

	$\Delta R_{(MT)}$	LPO PD_T5	LPO PD_T180	HMP PD_T5	HMP íntegras PD_T5	HMP lesadas PD_T5	HMP PD_T180	HMP íntegras PD_T180
LPO PD_T5	-0,05							
LPO PD_T180	-0,31*	0,10						
HMP PD_T5	-0,49*	-0,07	0,27					
HMP íntegras PD_T5	-0,38*	0,11	0,6	0,06				
HMP lesadas PD_T5	-0,27	0,14	-0,02	0,03	0,65*			
HMP PD_T180	-0,59*	-0,08	0,16	0,75*	0,20	0,19		
HMP íntegras PD_T180	-0,38*	0,20	0,06	0,42*	0,29	0,03	0,59*	
HMP lesadas PD_T180	0,01	0,21	-0,24	-0,14	0,14	0,07	0,19	0,58*

$\Delta R_{(MT)}$: declínio da motilidade total entre o início (PR) e 180 minutos após descongelamento (PD_T180) [$\Delta R_{(MT)} = (PR_{(MT)} - PD_{T180(MT)})$]. LPO: peroxidação lipídica. HMP: células com alto potencial de membrana mitocondrial. HMP íntegras: alto potencial de membrana mitocondrial em células íntegras. HMP lesadas: alto potencial de membrana mitocondrial em células lesadas. PD_T5: pós-descongelamento, 5 min. PD_T180: pós-descongelamento, 180 min. * : $p \leq 0,05$.

Tabela 10. Correlações entre a sensibilidade espermática [$\Delta R_{(MT)}$], a peroxidação lipídica e produção de espécies reativas de oxigênio em espermatozoides bubalinos (*Bubalus bubalis*) descongelados a 37 °C, nos dois tempos avaliados (PD_T5 e PD_T180)

	$\Delta R_{(MT)}$	LPO PD_T5	LPO PD_T180	% Alto H ₂ O ₂ PD_T5	% Alto H ₂ O ₂ PD_T180	% Alto O ₂ T5
LPO PD_T5	-0,05					
LPO PD_T180	-0,31*	0,10				
Alto H₂O₂ PD_T5	-0,45*	-0,13	0,28			
Alto H₂O₂ PD_T180	-0,60*	-0,06	0,25	0,83*		
Alto O₂ PD_T5	0,38*	0,20	-0,17	-0,67*	-0,67*	
Alto O₂ PD_T180	0,49*	-0,07	-0,03	-0,52*	-0,68*	0,60*

$\Delta R_{(MT)}$: declínio da motilidade total entre o início (PR) e 180 minutos após descongelamento (PD_T180) [$\Delta R_{(MT)} = (PR_{(MT)} - PD_{T180(MT)})$]. LPO: peroxidação lipídica. Alto H₂O₂: produção de peróxido de hidrogênio intracelular. Alto O₂: produção de ânion superóxido mitocondrial. PD_T5: pós-descongelamento, 5 min. PD_T180: pós-descongelamento, 180 min. * : $p \leq 0,05$.

6. DISCUSSÃO

Neste trabalho, foram estudadas as diferenças estruturais e funcionais, que poderiam influenciar a resistência de espermatozoides bubalinos ao processo de congelamento-descongelamento. Entender os tipos de danos aos quais o espermatozoide é exposto durante a criopreservação é essencial quando se busca maximizar a qualidade seminal pós-descongelamento. As diferenças entre os grupos de resistência espermática boa (RB) ou ruim (RR) ao processo de congelamento-descongelamento se encontraram principalmente na sensibilidade da membrana plasmática e no metabolismo mitocondrial. Este é um dos primeiros trabalhos a demonstrar que o potencial de membrana mitocondrial está relacionado com a diferença entre ejaculados de touros bubalinos na resistência dos espermatozoides ao congelamento-descongelamento.

Primeiramente, ressalta-se que apesar da fêmea bubalina apresentar sazonalidade reprodutiva, a qualidade seminal dos touros bubalinos não sofre influência das estações do ano na região sudeste do Brasil (Andrade, 2016). Do mesmo modo, neste trabalho, apesar dos ejaculados terem sido coletados ao longo de dois anos, as ocorrências de ejaculados com resistência espermática boa ou ruim ao processo de congelamento-descongelamento foram uniformes ao longo do período experimental. Além disso, a resistência espermática pode ser afetada por fatores relacionados com os procedimentos para o congelamento dos espermatozoides, como taxa da queda de temperatura, diluidor e crioprotetor (Holt, 2000). Por este motivo, para que a resistência espermática não fosse influenciada pela metodologia, todos os ejaculados foram submetidos ao mesmo protocolo de congelamento.

De acordo com os critérios propostos por Vale (2011) para a espécie bubalina, os ejaculados utilizados apresentaram qualidade inicial (*in natura*) excelente. Embora tenha sido demonstrada a semelhança da qualidade inicial, houve grande variação entre os ejaculados da motilidade total após o descongelamento. Em concordância com os resultados encontrados por Auler (2018) em ejaculados bubalinos, a variação da resistência espermática ao processo de congelamento-descongelamento aconteceu tanto entre ejaculados de animais diferentes, quanto entre ejaculados de um mesmo animal. Essa variabilidade da resistência espermática é descrita em várias espécies (Jobim et al., 2004; Waterhouse et al., 2006; Loomis e Graham, 2008; Filho et al., 2014; Rickard et al., 2016) e, em bubalinos, foi detalhadamente estudada por Auler (2018), podendo ser resultado de fatores relacionados ao espermatozoide (Waterhouse et al., 2006) ou ao plasma seminal (Jobim et al., 2004; Asadpour et al., 2007; Rickard et al., 2016; Auler, 2018), ou ainda da interação entre eles (Rickard et al., 2016).

Durante o processo de espermatogênese, quando passa a ser uma célula altamente especializada, o espermatozoide também se torna dependente do ambiente externo para suplementação de nutrientes e remoção de resíduos (Vishwanath e Shannon, 1997). Assim, a manipulação do ambiente em que o espermatozoide está inserido tem influência direta sobre ele. O espermatozoide bubalino é considerado muito sensível ao processo de congelamento-descongelamento (Mughal et al., 2017). Porém, com a adaptação do protocolo de resfriamento e do meio diluidor, foi possível encontrar, no pós-descongelamento, qualidade espermática (ex. médias de motilidade total e de integridade das membranas plasmáticas e acrossômica) com médias acima das relatadas na literatura (Kadirvel et al., 2009; Reddy et al., 2010; Kumar e Atreja, 2012; El-Nattat et al., 2016), mesmo no grupo RR.

De toda maneira, a susceptibilidade dos espermatozoides, aos danos causados pelo processo de congelamento-descongelamento, se mostrou diferente entre os grupos. Na avaliação da funcionalidade espermática, por meio dos parâmetros de motilidade e cinética, as diferenças apareceram na motilidade total e na motilidade progressiva após o descongelamento (PD_T5),

enquanto as diferenças nas velocidades (VCL, VSL e VAP) já apareceram desde o primeiro momento, antes mesmo do processo de resfriamento. Em outros trabalhos, tais parâmetros foram correlacionados à maior fertilidade de touros bubalinos, tanto *in vitro* (Sohail et al., 2013), quanto *in vivo* (Kumar et al., 2014b; Ahmed et al., 2017). Além desses, os parâmetros BCF e ALH, que são relacionados com o tipo de movimento flagelar espermático, também foram inferiores no grupo RR. A motilidade e a velocidade do espermatozoide são determinados pelo batimento flagelar, que impulsionado pela disponibilidade de ATP, se relaciona diretamente com o metabolismo mitocondrial (Agnihotri et al., 2016; Pereira et al., 2017). No presente trabalho, as menores motilidade, progressividade e velocidade dos espermatozoides encontradas no grupo RR foram relacionadas com a menor qualidade do metabolismo mitocondrial encontrada nesse grupo. Existem trabalhos que associam a queda da motilidade espermática entre as etapas do processo de congelamento-descongelamento com a redução do metabolismo mitocondrial, tanto em espermatozoides bubalinos (Kadirvel et al., 2009), como em outras espécies (Schober et al., 2007; Awda et al., 2009; Paoli et al., 2011; Gürler et al., 2016). Contudo, neste trabalho, estudou-se a relação do metabolismo mitocondrial com a diferença, entre ejaculados, da sensibilidade espermática ao processo de congelamento-descongelamento, como será discutido mais adiante.

Ao serem congeladas, as células são submetidas a estresses resultantes das interações entre água e soluto, que surgem através da cristalização do gelo. A exposição da célula ao meio hipertônico, ainda não congelado, causa retirada da água intracelular, com conseqüente retração celular e possível influxo de íons. No descongelamento, a célula sofre o processo inverso e a entrada de água pode causar ruptura da membrana plasmática. Além da desidratação e da formação de cristais de gelo, a mudança na temperatura também afeta a organização da bicamada de fosfolípidios da membrana plasmática, podendo alterar a funcionalidade da estrutura (Holt, 2000). Visto que os principais danos à membrana plasmática ocorrem durante o congelamento e o descongelamento dos espermatozoides (Rasul et al., 2001), pode-se entender que os espermatozoides do grupo RR sofreram mais com o processo, apresentando menor integridade da membrana plasmática, tanto estrutural, como funcionalmente. A maior susceptibilidade dos espermatozoides do grupo RR, aos danos causados à membrana plasmática, pode estar relacionada com sua composição estrutural. O colesterol confere à membrana plasmática maior fluidez e, durante o processo de congelamento-descongelamento, maior resistência. Em bubalinos, a correlação entre o maior conteúdo de colesterol espermático e a melhor congelabilidade espermática foi demonstrada por Singh et al. (2014). A atuação dos aspectos mecânicos sobre a célula espermática durante o processo de congelamento-descongelamento e a maior sensibilidade da membrana plasmática dos espermatozoides (Parks e Graham, 1992) do grupo RR podem explicar a diferença da integridade no primeiro momento pós-descongelamento, contudo, não esclarecem a diferença do declínio da motilidade ao longo do tempo de incubação pós-descongelamento.

Tem sido sugerido que a mitocôndria é a organela espermática mais afetada pelo processo de congelamento-descongelamento (Peña et al., 2011). Um dos aspectos mais notáveis da mitocôndria é sua função de produção de energia química na forma de ATP; e parte da energia utilizada pelo espermatozoide na manutenção da motilidade vem do ATP mitocondrial (Pereira et al., 2017). O potencial de membrana mitocondrial descreve o gradiente de prótons formado pela passagem de elétrons ao longo da cadeia transportadora de elétrons, que serão então usados para a produção de ATP. A diminuição no potencial, ou depolarização, indica dano mitocondrial e a inabilidade da célula em atender à demanda energética (Moraes e Meyers, 2018). Com a utilização de uma sonda fluorescente catiônica (neste trabalho, MitoStatus Red), a funcionalidade da mitocôndria é avaliada pelo acúmulo da sonda em seu interior. As mitocôndrias mais polarizadas (por exemplo, hiperpolarizadas, onde o interior é mais negativo) acumulam mais

sonda catiônica, e mitocôndrias depolarizadas (interior menos negativo) acumulam menos sonda (Perry et al., 2011). As diferenças entre os grupos, no metabolismo mitocondrial, são notadas tanto na porcentagem de células com alto potencial de membrana mitocondrial, quanto na intensidade do metabolismo em células íntegras e em células lesadas. Mesmo nas células lesadas, a intensidade do metabolismo mitocondrial dos espermatozoides do grupo RR é inferior logo após o descongelamento, se igualando ao grupo RB apenas ao final da incubação, quando o metabolismo mitocondrial do grupo RB decai. Isto sugere que a maior sensibilidade ao processo de congelamento-descongelamento dos espermatozoides do grupo RR se expresse também na membrana mitocondrial, podendo estar relacionada com a menor motilidade encontrada neste grupo. De fato, foram demonstradas altas correlações do metabolismo mitocondrial tanto com a integridade estrutural das membranas plasmática e acrossômica, como com a estabilidade da membrana plasmática, avaliadas por citometria de fluxo.

As mitocôndrias são anatomicamente definidas por duas membranas – membrana mitocondrial externa, que envolve a membrana mitocondrial interna, responsável pela transdução de energia. Na membrana mitocondrial interna, estão localizados os dois componentes principais do mecanismo de fosforilação oxidativa, a cadeia transportadora de elétrons e a ATP-sintetase, sendo que a síntese de ATP pela mitocôndria depende do fino equilíbrio entre eles. A cadeia transportadora de elétrons envolve reações de oxidação/redução que liberam energia para a formação do ATP (Morais e Meyers, 2018). Deste modo, além de ser fonte de energia, a mitocôndria é a principal fonte de ERO no espermatozoide (Ferramosca e Zara, 2017). A maior concentração de ânion superóxido, nos espermatozoides do grupo RR, pode estar relacionada com a disfunção mitocondrial, resultando no desvio do ânion da cadeia transportadora de elétrons e no aumento da produção de ânion superóxido (Aitken, 2017). Enquanto que a menor produção de peróxido de hidrogênio, pelos espermatozoides do grupo RR, pode estar relacionada com menor capacidade de defesa antioxidante do ejaculado (espermatozoide e/ou plasma seminal), de modo que, por mais que o grupo RR possua maior produção de substrato (ânion superóxido) para a enzima SOD, há menor produção de peróxido de hidrogênio (Fridovich, 1997). Ejaculados de touros bubalinos com maior ou menor longevidade espermática apresentam diferenças na abundância de proteínas do plasma seminal (Auler et al., 2018), podendo também este ser um fator envolvido na capacidade antioxidante do ejaculado. De toda maneira, foi demonstrada a correlação positiva entre o alto metabolismo mitocondrial e a maior produção de peróxido de hidrogênio, enquanto a maior produção de ânion superóxido correlacionou-se negativamente com o alto metabolismo mitocondrial.

Embora tenham sido encontradas diferenças entre os grupos na produção de ERO, indicando que há diferença nas reações de oxidação/redução, a intensidade com que a peroxidação lipídica acontece é a mesma entre eles. De fato, o peróxido de hidrogênio e o ânion superóxido não possuem energia suficiente para iniciar o processo de peroxidação lipídica. Contudo, tal processo pode ser desencadeado por outros radicais como alcoxil, peroxil e hidroxil, e apresenta a característica de auto perpetuação, com esses radicais participando como iniciadores ou subprodutos (Blake et al., 1987). O aumento da intensidade da peroxidação lipídica com o tempo de incubação, observada nos dois grupos, pode ser resultado da sua propriedade de auto perpetuação. Além disso, a sensibilidade espermática não mostrou correlação com a peroxidação lipídica no primeiro momento após o descongelamento.

Corroborando com este raciocínio, quando os espermatozoides foram desafiados com ácido araquidônico (indutor de peroxidação lipídica, Aitken et al., 2013), a intensidade do processo de peroxidação lipídica foi semelhante entre os espermatozoides dos dois grupos, podendo ser sugerido que a susceptibilidade espermática a tal processo é igual entre eles. Os aldeídos formados

na cascata da peroxidação lipídica, tais como acroleína, malondialdeído e 4-HNE, se ligam preferencialmente em proteínas mitocondriais, e a adução destas proteínas causa desregulação do fluxo de elétrons ao longo da cadeia transportadora de elétrons e, conseqüentemente, da produção de ERO (Aitken et al., 2012). Dessa maneira, ainda que a peroxidação lipídica não esteja relacionada com a diferença de resistência espermática entre os grupos, seus subprodutos poderiam ser causadores da diferença no metabolismo mitocondrial, caso haja maior sensibilidade da membrana mitocondrial nos espermatozoides do grupo RR.

7. CONCLUSÕES

A diferença na resistência de espermatozoides bubalinos está mais relacionada à longevidade após o descongelamento, do que à sobrevivência ao processo de congelamento-descongelamento.

Os ejaculados que apresentam maior longevidade espermática após o descongelamento são aqueles cuja população de espermatozoides possui maior velocidade antes do resfriamento e maiores parâmetros de motilidade e cinética após o descongelamento.

O grupo de ejaculados mais resistente ao processo de congelamento-descongelamento possui espermatozoides menos susceptíveis aos danos na membrana plasmática que poderiam alterar sua estrutura e/ou funcionalidade. Esses ejaculados também possuem espermatozoides com maior metabolismo mitocondrial, o que foi associado com os seus maiores parâmetros de motilidade e cinética. Apesar de existir desproporção quanto à produção de peróxido de hidrogênio e ânion superóxido, a diferença na resistência espermática não foi relacionada aos danos causados por peroxidação lipídica.

8. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Sugere-se que o metabolismo mitocondrial seja um dos principais fatores de diferença na resistência ao processo de congelamento-descongelamento em espermatozoides bubalinos. Desse modo, novas pesquisas são necessárias a fim de entender como esse processo influencia na integridade mitocondrial e como surgem as diferenças em seu metabolismo.

Com o intuito de melhorar a qualidade espermática pós-descongelamento, a adição de reagentes que protejam especificamente a mitocôndria pode ser avaliada para a produção de diluidores para a criopreservação de espermatozoides bubalinos.

9. REFERÊNCIAS

- ABAIGAR, T.; HOLT, W.V.; HARRISON, R.A.; DEL BARRIO, G. Sperm subpopulations in boar (*Sus scrofa*) and gazelle (*Gazella dama mhorr*) semen as revealed by pattern analysis of computer-assisted motility assessments. *Biol. Reprod.*, v. 60, n. 1, p. 32-41, 1999.
- ABOAGLA, E.M.-E.; TERADA, T. Trehalose-enhanced fluidity of the goat sperm membrane and its protection during freezing. *Biol. Reprod.*, v. 69, n. 4, p. 1245-1250, 2003.
- AGARWAL, A.; IKEMOTO, I.; LOUGHLIN, K.R. Effect of sperm washing on levels of reactive oxygen species in semen. *Arch. Andrology*, v. 33, n. 3, p. 157-162, 1994.
- AGNIHOTRI, S.K.; AGRAWAL, A.K.; HAKIM, B. A.; et al. Mitochondrial membrane potential (MMP) regulates sperm motility. *In Vitro Cell. Dev.-An.*, v. 52, n. 9, p. 953-960, 2016.
- AHMED, H.; ANDRABI, S.M.H.; ANWAR, M.; JAHAN, S. Use of post-thaw semen quality parameters to predict fertility of water buffalo (*Bubalus bubalis*) bull during peak breeding season. *Andrologia*, v. 49, n. 4, e12639, 2017.
- AITKEN, J.B.; NAUMOVSKI, N.; CURRY, B.; et al. Characterization of an L-Amino Acid Oxidase in Equine Spermatozoa. *Biol. Reprod.*, v. 92, n. 5, p. 1-13, 2015.
- AITKEN, R.J. Reactive oxygen species as mediators of sperm capacitation and pathological damage. *Mol. Reprod. Dev.*, v. 84, n. 10, p. 1039-1052, 2017.
- AITKEN, R.J.; BAKER, M.A. Causes and consequences of apoptosis in spermatozoa; contributions to infertility and impacts on development. *Int. J. Dev. Biol.*, v. 57, n. 2-3-4, p. 265-272, 2013.
- AITKEN, R.J.; CLARKSON, J.S. Cellular basis of defective sperm function and its association with the genesis of reactive oxygen species by human spermatozoa. *J. Reprod. Fertil.*, v. 81, p. 459-469, 1987.
- AITKEN, R.J.; CLARKSON, J.S. Significance of reactive oxygen species and antioxidants in defining the efficacy of sperm preparation techniques. *J. Androl.*, v. 9, n. 6, p. 367-376, 1988.
- AITKEN, R.J.; GIBB, Z.; BAKER, M.A.; et al. Causes and consequences of oxidative stress in spermatozoa. *Reprod. Fert. Dev.*, v. 28, n. 2, p. 1-10, 2016.
- AITKEN, R.J.; HARKISS, D.; BUCKINGHAM, D. Relationship between iron-catalysed lipid peroxidation potential and human sperm function. *J. Reprod. Fertil.*, v. 98, n. 1, p. 257-265, 1993.
- AITKEN, R.J.; IRVINE, D.S.; WU, F. C. Prospective analysis of sperm-oocyte fusion and reactive oxygen species generation as criteria for the diagnosis of infertility. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, v. 164, n. 2, p. 542-551, 1991.
- AITKEN, R.J.; IULIIS, G.N.; FINNIE, J.M. et al. Analysis of the relationships between oxidative stress, DNA damage and sperm vitality in a patient population: development of diagnostic criteria. *Hum. Reprod.*, v. 25, p. 10, p. 2415-2426, 2010.
- AITKEN, R.J.; SMITH, T.B.; LORD, T.; et al. On methods for the detection of reactive oxygen species generation by human spermatozoa: analysis of the cellular responses to catechol oestrogen, lipid aldehyde, menadione and arachidonic acid. *Andrology*, v. 1, n. 2, p. 192-205, 2013.
- AITKEN, R.J.; WHITING, S.; IULIIS, G.N.; et al. Electrophilic aldehydes generated by sperm metabolism activate mitochondrial reactive oxygen species generation and apoptosis by targeting succinate dehydrogenase. *J. Biol. Chem.*, v. 287, n. 39, p. 33048-33060, 2012.
- AITKEN, R.J.; WINGATE, J.K.; DE IULIIS, G.N.; MCLAUGHLIN, E.A. Analysis of lipid peroxidation in human spermatozoa using BODIPY C11. *Mol. Hum. Reprod*, v. 13, n. 4, p. 203-211, 2007.

- ALAVI-SHOUSHTARI, S.M.; REZAI, S.A.; ANSARI, M.H.; KHAKI, A. Effects of the seminal plasma zinc content and catalase activity on the semen quality of water buffalo (*Bubalus bubalis*) bulls. *Pakistan J. Biol. Sci.: PJBS*, v. 12, n. 2, p. 134-139, 2009.
- ALVAREZ, J.G.; LASSO, J.L.; BLASCO, L. et al. Centrifugation of human spermatozoa induces sublethal damage; separation of human spermatozoa from seminal plasma by a dextran swim-up procedure without centrifugation extends their motile life. *Hum. Reprod.*, v. 8, p. 1087-1092, 1993.
- ALVAREZ, J.G.; STOREY, B.T. Differential incorporation of fatty acids into and peroxidative loss of fatty acids from phospholipids of human spermatozoa. *Mol. Reprod. Dev.*, v. 42, n. 3, p. 334-346, 1995.
- ALVAREZ, J.G.; STOREY, B.T. Evidence for increased lipid peroxidative damage and loss of superoxide dismutase activity as a mode of sublethal cryodamage to human sperm during cryopreservation. *J. Androl.*, v. 13, 1992.
- ALVAREZ, J.G.; STOREY, B.T. Role of glutathione peroxidase in protecting mammalian spermatozoa from loss of motility caused by spontaneous lipid peroxidation. *Gamete Res.*, v. 23, n. 1, p. 77-90, 1989.
- AMEZIANE-EL-HASSANI, R.; DUPUY, C. Detection of intracellular reactive oxygen species (CM-H2DCFDA). *Bio-protocol*, v. 3, n. 1, e313, 2013.
- ANDRADE, G.O. *Avaliação da sazonalidade nas características sexuais de touros bubalinos (*Bubalus bubalis*) criados em clima subtropical úmido (19° latitude sul)*. 2016. 68f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.
- ANSARI, M.S.; RAKHA, B.A.; ANDRABI, S.M.H.; et al. Glutathione-supplemented tris-citric acid extender improves the post-thaw quality and in vivo fertility of buffalo (*Bubalus bubalis*) bull spermatozoa. *Reprod. Biol.*, v.12, p. 271-276, 2012.
- ARUOMA, O.I.; HALLIWELL, B.; HOEY, B.M.; BUTLER, J. The antioxidant action of taurine, hypotaurine and their metabolic precursors. *Biochem. J.*, v. 256, n. 1, p. 251-255, 1988.
- ASADPOUR, R.; ALAVI-SHOUSHTARI, S.M.; REZAI, S.A.; ANSARI, M.K. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of buffalo bulls seminal plasma proteins and their relation with semen freezability. *Anim. Reprod. Sci.*, v. 102, n. 3-4, p. 308-313, 2007.
- AULER, P.A. *Relação do perfil proteômico diferencial do plasma seminal de búfalos com a longevidade espermática pós-descongelamento*. 98f. Tese (Doutorado em Ciência Animal) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.
- AWDA, B.J.; MACKENZIE-BELL, M.; BUHR, M.M. Reactive oxygen species and boar sperm function. *Biol. Reprod.*, v. 81, n. 3, p. 553-561, 2009.
- BAAS, J.W.; MOLAN, P.C.; SHANNON, P. Factors in seminal plasma of bulls that affect the viability and motility of spermatozoa. *J. Reprod. Fertil.*, v. 68, n. 2, p. 275-280, 1983.
- BAILEY, J.L.; BILODEAU, J.F.; CORMIER, N. Semen cryopreservation in domestic animals: a damaging and capacitating phenomenon. *J. Androl.*, v. 21, n. 1, p. 1-7, 2000.
- BAILEY, J.L.; MORRIER, A.; CORMIER, N. Semen cryopreservation: Successes and persistent problems in farm species. *Can. J. Anim. Sci.*, v. 83, p. 393-401, 2003.
- BALL, B. A.; GRAVANCE, C.G.; MEDINA, V.; et al. Catalase activity in equine semen. *Am. J. Vet. Res.*, v. 61, n. 9, p. 1026-1030, 2000.
- BANERJEE, A.K.; GANGULI, N.C. Some aspects of the composition of buffalo semen. *J. Reprod. Fertil.*, v. 33, n. 1, p. 171-173, 1973.
- BARBUSIŃSKI, K. Fenton reaction-controversy concerning the chemistry. *Ecol. Chem. Eng. S.*, v. 16, n.3, p. 347-358, 2009.

- BARROSO, G.; TAYLOR, S.; MORSHEDI, M.; et al. Mitochondrial membrane potential integrity and plasma membrane translocation of phosphatidylserine as early apoptotic markers: a comparison of two different sperm subpopulations. *Fertil. Steril.*, v. 85, n. 1, p. 149-154, 2006.
- BARUSELLI, P.S.; CARVALHO, N.A.T. Biotechnology of reproduction in buffalo (*Bubalus bubalis*). *Rev. Bras. Reprod. Anim.*, v. 29, p. 4-17, 2005.
- BARUSELLI, P.S.; GIMENES, L.U.; CARVALHO, N.A.T.; et al. O estado atual da biotecnologia reprodutiva em bubalinos: perspectiva de aplicação comercial. *Rev. Bras. Reprod. Anim.*, v.31, n.3, p.285-292, 2007.
- BD PHARMINGEN. Disponível em: <<http://www.bdbiosciences.com/ds/pm/tds/564697.pdf>>. Acessado: 26 de set 2018.
- BENDICH, A.; MACHLIN, L.J.; SCANDURRA, O.; et al. The antioxidant role of vitamin C. *Adv. Free Radical Bio.*, v. 2, n. 2, p. 419-444, 1986.
- BEORLEGUI, N.; CETICA, P.; TRINCHERO, G.; et al. Comparative study of functional and biochemical parameters in frozen bovine sperm. *Andrologia*, v. 29, n. 1, p. 37-42, 1997.
- BERNARDES, O. Buffaloes breeding in Brazil. *Ital. J. Anim. Sci.*, vol. 6, s. 2, p. 162-167, 2007.
- 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.*, v. 55, n. 3, p. 282-288, 2000.
- BIRBEN, E.; SAHINER, U. M.; SACKESSEN, C.; et al. Oxidative stress and antioxidant defense. *World Allergy Organization J.*, v. 5, n. 1, p. 9-19, 2012.
- BLAKE, D.R.; ALLEN, R.E.; LUNEC, J. Free radicals in biological systems—a review orientated to inflammatory processes. *Brit. Med. Bull.*, v. 43, n. 2, p. 371–385, 1987.
- BLOCK, E.R. Hydrogen peroxide alters the physical state and function of the plasma membrane of pulmonary artery endothelial cells. *J. Cell Physiol.*, v. 146, p. 362-369, 1991.
- BLONDIN, P.; COENEN, K.; SIRARD, M.A. The impact of reactive oxygen species on bovine sperm fertilizing ability and oocyte maturation. *J. Androl.*, v. 18, p. 454-460, 1997.
- BOLLWEIN, H.; FUCHS, I.; KOESS, C. Interrelationship between plasma membrane integrity, mitochondrial membrane potential and DNA fragmentation in cryopreserved bovine spermatozoa. *Reprod. Domest. Anim.*, v. 43, n. 2, p. 189-195, 2008.
- BOWLER, C.; MONTAGU, M.V.; INZE, D. Superoxide dismutase and stress tolerance. *Annu. Rev. Plant Biol.*, v. 43, n. 1, p. 83-116, 1992.
- BROWN, D.V.; SENGER, P.L.; STONE, S.L.; et al. Glutathione peroxidase in bovine semen. *J. Reprod. Fertil.*, v. 50, n. 1, p. 117-118, 1977.
- BRUM, A.M.; SABEUR, K.; BALL, B.A. Apoptotic-like changes in equine spermatozoa separated by density-gradient centrifugation or after cryopreservation. *Theriogenology*, v. 69, n. 9, p. 1041-1055, 2008.
- BURNAUGH, L.; BALL, B.A.; SABEUR, K.; et al. Osmotic stress stimulates generation of superoxide anion by spermatozoa in horses. *Anim. Reprod. Sci.*, v. 117, n. 3, p. 249-260, 2010.
- CABRILLANA, M.E.; URIBE, P.; VILLEGAS, J.V.; et al. Thiol oxidation by nitrosative stress: Cellular localization in human spermatozoa. *Syst. Biol. Reprod. Med.*, v. 62, n. 5, p. 325-334, 2016.
- CAI, J.Y.; JONES, D.P. Superoxide in apoptosis. Mitochondrial generation triggered by cytochrome-c loss. *J. Biol. Chem.*, v. 273, p. 11401–11404, 1998.

- CARNEIRO, J.A.; CANISSO, I.F.; BANDEIRA, R.S.; et al. Effects of coenzyme Q10 on semen cryopreservation of stallions classified as having good or bad semen freezing ability. *Anim. Reprod. Sci.*, v. 192, p. 107-118, 2018.
- CASAS, I.; SANCHO, S.; BRIZ, M.; et al. Freezability prediction of boar ejaculates assessed by functional sperm parameters and sperm proteins. *Theriogenology*, v. 72, n. 7, p. 930-948, 2009.
- CASSANI, P.; BECONI, M.T.; O'FLAHERTY, C. Relationship between total superoxide dismutase activity with lipid peroxidation, dynamics and morphological parameters in canine semen. *Anim. Reprod. Sci.*, v. 86, n. 1, p. 163-173, 2005.
- CBRA. *Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal*. 3.ed. Belo Horizonte: CBRA, 2013.
- CELEGHINI, E.C.C.; NASCIMENTO, J.; RAPHAEL, C.F.; et al. Simultaneous assessment of plasmatic, acrosomal, and mitochondrial membranes in ram sperm by fluorescent probes. *Arq. Bras. Med. Vet. Zoo.*, v. 62, n. 3, p. 536-543, 2010.
- CRUZ, T.E.; MARTINS, A.; MARQUI, F.N.; et al. Evaluation of lipid membrane peroxidation, mitochondrial membrane potential and oxidative stress on bull semen frozen with reduced sperm number after colloidal single layer centrifugation. *Anim. Reprod. Sci.*, v. 194, p. e25-e26, 2018.
- CULOTTA, V.C.; YANG, M.; O'HALLORAN, T.V. Activation of superoxide dismutases: putting the metal to the pedal. *BBA-Mol. Cell. Res.*, v. 1763, n. 7, p. 747-758, 2006.
- DALAL, J.; KUMAR, A.; HONPARKHE, M.; et al. Minimization of apoptosis-like changes in cryopreserved buffalo bull sperm by supplementing extender with Bcl-2 protein. *Veterinary World*, v. 9, n. 5, p. 432-436, 2016.
- DARIN-BENNETT, A.; WHITE, I.G. Influence of the cholesterol content of mammalian spermatozoa on susceptibility to cold-shock. *Cryobiology*, v. 14, n. 4, p. 466-470, 1977.
- DAVEY, M.W.; MONTAGU, M.V.; INZÉ, D.; et al. Plant L-ascorbic acid: chemistry, function, metabolism, bioavailability and effects of processing. *J. Sci. Food Agr.*, v. 80, n. 7, p. 825-860, 2000.
- DAVILA, M.P.; MUÑOZ, P.M.; TAPIA, J.A.; et al. Inhibition of mitochondrial complex I leads to decreased motility and membrane integrity related to increased hydrogen peroxide and reduced ATP production, while the inhibition of glycolysis has less impact on sperm motility. *PLoS One*, v. 10, n. 9, e0138777, 2015.
- DE ANDRADE, A.F.C.; DE ARRUDA, R.P.; CELEGHINI, E.C.C.; et al. Fluorescent stain method for the simultaneous determination of mitochondrial potential and integrity of plasma and acrosomal membranes in boar sperm. *Reprod. Domest. Anim.*, v. 42, n. 2, p. 190-194, 2007.
- DEL OLMO, E.; BISBAL, A.; GARCÍA-ÁLVAREZ, O.; et al. Free-radical production after post-thaw incubation of ram spermatozoa is related to decreased in vivo fertility. *Reprod. Fertil. Develop.*, v. 27, n. 8, p. 1187-1196, 2015.
- DELL'AQUA JUNIOR, J.A.; CAMPOS, G.A.; GARCIA, V.C.; et al. Association of sodium caseinate and cholesterol improved fertility of chilled stallion semen. *J. Equine Vet. Sci.*, v. 66, p. 51, 2018.
- DIANZANI, M.; BARRERA, G. Pathology and physiology of lipid peroxidation and its carbonyl products. In: ÁLVAREZ, S.; EVELSON, P. (ed.), *Free Radical Pathophysiology*, Transworld Research Network: Kerala, India, p. 19-38, 2008.
- DREVET, J.R. The antioxidant glutathione peroxidase family and spermatozoa: a complex story. *Mol. Cell Endocrinol.*, v. 250, n. 1, p. 70-79, 2006.
- EDDY, E.M. The spermatozoon. In: KNOBIL, E.; NEILL, J.D. *Knobil and Neill's physiology of reproduction*. Vol. 2., p. 3-38. Gulf Professional Publishing, San Diego, 2006.

- EL-NATTAT, W.S.; EL-SHESHTAWY, R.I.; EL-BATAWY, K.A.; et al. (2016). Preservability of buffalo bull semen in tris-citrate extender enriched with bee's honey. *J. Innov. Pharm. Biol. Sci.*, v. 3, p. 180-185, 2016.
- ERTMER, F.; OLDENHOF, H.; SCHÜTZE, S.; et al. Induced sub-lethal oxidative damage affects osmotic tolerance and cryosurvival of spermatozoa. *Reprod. Fert. Develop.*, v. 29, n. 9, p. 1739-1750, 2017.
- EVENSON, D.P.; DARZYNKIEWICZ, Z.; MELAMED, M.R. Simultaneous measurement by flow cytometry of sperm cell viability and mitochondrial membrane potential related to cell motility. *J. Histochem. Cytochem.*, v. 30, p. 279-280, 1982.
- FERRAMOSCA, A.; ZARA, V. Mitochondria and fertility: the mitochondria critical role on spermatozoa function. *J. Interdiscipl. Res. Appl. Med.*, v. 1, n.1, p. 21-26, 2017.
- FERRUSOLA, C.O.; FERNÁNDEZ, L.G.; MORRELL, J.M.; et al. Lipid peroxidation, assessed with BODIPY-C11, increases after cryopreservation of stallion spermatozoa, is stallion-dependent and is related to apoptotic-like changes. *Reproduction*, v. 138, n. 1, p. 55-63, 2009.
- FILHO A.C.M.; BREZINSKY R.M.; YOUNGBLOOD R.C.; et al. 55 Differential expression of aquaporins and spermadhesins in frozen-thawed 'good freezer' and 'poor freezer' boar spermatozoa. *Reprod. Fert. Dev.*, v. 26, p. 141-142, 2014.
- FREITAS-DELL'AQUA, C.P.; GUAISTI, P.N.; MONTEIRO, G.A.; et al. Flow cytometric analysis of fertile and sub fertile frozen stallion spermatozoa. *Anim. Reprod.*, v. 9, p. 941, 2012.
- FREITAS-DELL'AQUA, C.P.; GUAISTI, P.N.; PAPA, F.O.; et al. Superoxide anion is reduced in gradient selected cryopreserved stallion despite high mitochondrial potential. *J. Equine Vet. Sci.*, v. 67, p. 57, 2018.
- FRIDOVICH, I. Superoxide anion radical (O₂⁻), superoxide dismutases, and related matters. *J. Biol. Chem.*, v. 272, n. 30, p. 18515-18517, 1997.
- FRIDOVICH, I. Superoxide dismutases. *Annu. Rev. Biochem.*, v. 44, n. 1, p. 147-159, 1975.
- GADEA, J., MOLLA, M., SELLES, E.; et al. Reduced glutathione content in human sperm is decreased after cryopreservation: effect of the addition of reduced glutathione to the freezing and thawing extenders. *Cryobiology*, v. 62, n. 1, p. 40-46, 2011.
- GADEA, J.; SELLÉS, E.; MARCO, M.A.; et al. Decrease in glutathione content in boar sperm after cryopreservation: Effect of the addition of reduced glutathione to the freezing and thawing extenders. *Theriogenology*, v. 62, n. 3, p. 690-701, 2004.
- GARG, A.; KUMARESAN, A.; ANSARI, M.R. effects of hydrogen peroxide (H₂O₂) on fresh and cryopreserved buffalo sperm functions during incubation at 37 °C in vitro. *Reprod. Dom. Anim.*, v. 44, p. 907-912, 2009.
- GARNER, D.L. Hoechst 33342: The dye that enabled differentiation of living X-and Y-chromosome bearing mammalian sperm. *Theriogenology*, v. 71, p. 11-21, 2009.
- GARNER, D.L.; THOMAS, C.A.; ALLEN, C.H. Effect of semen dilution on bovine sperm viability as determined by dual-DNA staining and flow cytometry. *J. Androl.*, v. 18, n. 3, p. 324-331, 1997.
- GHOBRIAL, I.M.; WITZIG, T.E.; ADJEI, A.A. Targeting apoptosis pathways in cancer therapy. *CA: a cancer journal for clinicians*, v. 55, n. 3, p. 178-194, 2005.
- GIBB, Z.; LAMBOURNE, S.R.; AITKEN, R.J. The paradoxical relationship between stallion fertility and oxidative stress. *Biol. Reprod.*, v. 91, n. 3, p. 1-10, 2014.
- GILLAN, L.; EVANS, G.; MAXWELL, W.M.C. Flow cytometric evaluation of sperm parameters in relation to fertility potential. *Theriogenology*, v. 63, n. 2, p. 445-457, 2005.
- GRAHAM, J.K.; KUNZE, E.; HAMMERSTEDT, R.H. Analysis of sperm cell viability, acrosomal integrity, and mitochondrial function using flow cytometry. *Biol. Reprod.*, v. 43, n. 1, p. 55-64, 1990.

- GRAHAM, J.K.; MOCÉ, E. Fertility evaluation of frozen/thawed semen. *Theriogenology*, v. 64, n. 3, p. 492-504, 2005.
- GRIVEAU, J.F.; DUMONT, E.; RENARD, P.; et al. Reactive oxygen species, lipid peroxidation and enzymatic defense systems in human spermatozoa. *J. Reprod. Fertil.*, v. 103, n. 1, p. 17-26, 1995.
- GRUNEWALD, S.; PAASCH, U.; SAID, T.M.; et al. Caspase activation in human spermatozoa in response to physiological and pathological stimuli. *Fertil. Steril.*, v. 83, n. 4, p. 1106-1112, 2005.
- GRÜTTER, M.G. Caspases: key players in programmed cell death. *Curr. Opin. Struc. Biol.*, v. 10, n. 6, p. 649-655, 2000.
- GUASTI, P.N.; FREITAS-DELL'AQUA, C.P.; MAZIERO, R.R.D.; et al. Validation of flow cytometry for assessment of membrane lipid peroxidation of equine spermatozoa. *Anim Reprod*, v. 9, p. 929, 2012.
- GÜRLER, H.; MALAMA, E.; HEPPELMANN, M.; et al. Effects of cryopreservation on sperm viability, synthesis of reactive oxygen species, and DNA damage of bovine sperm. *Theriogenology*, v. 86, n. 2, p. 562-571, 2016.
- GUTHRIE, H.D.; WELCH, G.R. Use of fluorescence-activated flow cytometry to determine membrane lipid peroxidation during hypothermic liquid storage and freeze-thawing of viable boar sperm loaded with 4, 4-difluoro-5-(4-phenyl-1, 3-butadienyl)-4-bora-3a, 4a-diaza-s-indacene-3-undecanoic acid. *J. Anim. Sci.*, v. 85, n. 6, p. 1402-1411, 2007.
- HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M. Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. *Biochem. J.*, v. 219, n. 1, p. 1, 1984.
- HANCOCK, J.L. The morphology of boar spermatozoa. *J. Roy. Microsc. Soc.*, v. 76, p. 84-97, 1957.
- HENKEL, R.; KIERSPEL, E.; STALF, T.; et al. Effect of reactive oxygen species produced by spermatozoa and leukocytes on sperm functions in non-leukocytospermic patients. *Fertil. Steril.*, v. 83, n. 3, p. 635-642, 2005.
- HOLMES, R.P.; GOODMAN, H.O.; HURST, C.H.; et al. Hypotaurine in male reproduction. In: LOMBARDINI, J.B.; SCHAFFER, S.W.; AZUMA, J. eds. *Taurine. Nutritional Value and Mechanisms of Action*. New York, Plenum Press, p. 437-441, 1992a.
- HOLMES, R.P.; GOODMAN, H.O.; SHIHABI, Z.K.; JARROW, J.P. The taurine and hypotaurine content of human semen. *J. Androl.*, v. 13, p. 289-292, 1992b.
- HOLT, C.; HOLT, W.V.; MOORE, H.D.; et al. Objectively measured boar sperm motility parameters correlate with the outcomes of on-farm inseminations: results of two fertility trials. *J. Androl.*, v. 18, p. 312-323, 1997.
- HOLT, W.V. Basic aspects of frozen storage of semen. *Anim. Reprod. Sci.*, v. 62, p. 3-22, 2000.
- HOSSAIN, M.S.; JOHANNISSON, A.; WALLGREN, M.; et al. Flow cytometry for the assessment of animal sperm integrity and functionality: state of the art. *Asian J. Androl.*, v. 13, n. 3, p. 406-419, 2011.
- HSIEH, Y.Y.; CHANG, C.C.; LIN, C.S. Seminal malondialdehyde concentration but not glutathione peroxidase activity is negatively correlated with seminal concentration and motility. *Int. J. Biol. Sci.*, v. 2, n. 1, p. 23-9, 2006.
- IULIIS, G.N.; THOMSON, L.K.; MITCHELL, L.A.; et al. DNA damage in human spermatozoa is highly correlated with the efficiency of chromatin remodeling and the formation of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine, a marker of oxidative stress. *Biol. Reprod.*, v. 81, n. 3, p. 517-524, 2009.
- JAROSZESKI, M.J.; RADCLIFF, G. Fundamentals of flow cytometry. *Mol. Biotechnol.*, v. 11, n.1, p. 37-53, 1999.

- JELEZARSKY, L.; VAISBERG, C.; CHAUSHEV, T.; SAPUNDJIEV, E. Localization and characterization of glutathione peroxidase (GPx) in boar accessory sex glands, seminal plasma, and spermatozoa and activity of GPx in boar semen. *Theriogenology*, v. 69, n. 2, p. 139-145, 2008.
- JEYENDRAN, R.S.; VAN DER VEN, H.H.; PEREZ-PELAEZ, M.; et al. Development of an assay to assess the functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to other semen characteristics. *J. Reprod. Fertil.*, v. 70, n. 1, p. 219-228, 1984.
- JOBIM, M.I.M.; OBERST, E.R.; SALBEGO, C.G.; et al. Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis of bovine seminal plasma proteins and their relation with semen freezability. *Theriogenology*, v. 61, n. 2-3, p. 255-266, 2004.
- JONES, R.; MANN, T. Lipid peroxides in spermatozoa; formation, role of plasmalogen, and physiological significance. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biol. Sci.*, v. 193, n. 1113, p. 317-333, 1976.
- JONES, R.; MANN, T.; SHERINS, R. Peroxidative breakdown of phospholipids in human spermatozoa, spermicidal properties of fatty acid peroxides, and protective action of seminal plasma. *Fertil. Steril.*, v. 31, n. 5, p. 531-537, 1979.
- JUYENA, N.S.; STELLETTA, C. Seminal plasma: an essential attribute to spermatozoa. *J. Androl.*, v. 33, n. 4, p. 536-551, 2012.
- KADIRVEL, G.; KUMAR, S.; KUMARESAN, A. Lipid peroxidation, mitochondrial membrane potential and DNA integrity of spermatozoa in relation to intracellular reactive oxygen species in liquid and frozen-thawed buffalo semen. *Anim. Reprod. Sci.*, v. 114, n.1-3, p. 125-134, 2009.
- KADIRVEL, G.S.K.G.; KUMAR, S.; GHOSH, S.K.; PERUMAL, P. Activity of antioxidative enzymes in fresh and frozen thawed buffalo (*Bubalus bubalis*) spermatozoa in relation to lipid peroxidation and semen quality. *Asian Pac. J. Reprod.*, v. 3, n. 3, p. 210-217, 2014.
- KASIMANICKAM, R.; PELZER, K. D.; KASIMANICKAM, V.; et al. Association of classical semen parameters, sperm DNA fragmentation index, lipid peroxidation and antioxidant enzymatic activity of semen in ram-lambs. *Theriogenology*, v. 65, n. 7, p. 1407-1421, 2006.
- KAWAKAMI, E.; TAKEMURA, A.; SAKUMA, M.; et al. Superoxide dismutase and catalase activities in the seminal plasma of normozoospermic and asthenozoospermic Beagles. *J. Vet. Med. Sci.*, v. 69, n. 2, p. 133-136, 2007.
- KESSOPOULOU, E.; TOMLINSON, M.J.; BARRATT, C.L.R. et al. Origin of reactive oxygen species in human semen: spermatozoa or leucocytes? *J. Reprod. Fertil.*, v. 94, n. 2, p. 463-470, 1992.
- KIERNAN, M.; FAHEY, A.G.; FAIR, S. The effect of the in vitro supplementation of exogenous long-chain fatty acids on bovine sperm cell function. *Reprod. Fertil. Develop.*, v. 25, n. 6, p. 947-954, 2013.
- KIM, S.; LEE, Y.J.; KIM, Y.J. Changes in sperm membrane and ROS following cryopreservation of liquid boar semen stored at 15 °C. *Anim. Reprod. Sci.*, v. 124, n. 1, p. 118-124, 2011.
- KIRKMAN, H.N.; GAETANI, G.F. Mammalian catalase: a venerable enzyme with new mysteries. *Trends Biochem. Sci.*, v. 32, n. 1, p. 44-50, 2007.
- KOONJAENAK, S.; PONGPENG, P.; WIROJWUTHIKUL, S.; et al. Seasonality affects post-thaw plasma membrane intactness and sperm velocities in spermatozoa from Thai AI swamp buffaloes (*Bubalus bubalis*). *Theriogenology*, v. 67, n. 9, p. 1424-1435, 2007.
- KOPPERS, A. J.; MITCHELL, L. A.; WANG, P. et al. Phosphoinositide 3-kinase signaling pathway involvement in a truncated apoptotic cascade associated with motility loss and oxidative DNA damage in human spermatozoa. *Biochem. J.*, v. 436, p. 687-698, 2011.

- KOPPERS, A.J.; DE IULIIS, G.N.; FINNIE, J.M.; et al. Significance of mitochondrial reactive oxygen species in the generation of oxidative stress in spermatozoa. *J. Clin. Endocr. Metab.*, v. 93, n. 8, p. 3199-3207, 2008.
- KOTHARI, S.; THOMPSON, A.; AGARWAL, A.; PLESSIS, S.S. Free radicals: Their beneficial and detrimental effects on sperm function. *Indian J. Exp. Biol.*, v. 48, p. 425-435, 2010.
- KOWALOWKA, M.; WYSOCKI, P.; FRASER, L.; STRZEZEK, J. Extracellular superoxide dismutase of boar seminal plasma. *Reprod. Domest. Anim.*, v. 43, n. 4, p. 490-496, 2008.
- KOZIOROWSKA-GILUN, M.; STRZEŻEK, R. Molecular forms of selected antioxidant enzymes in dog semen-electrophoretical identification. *Pol. J. Vet. Sci.*, v. 14, n. 1, p. 29-33, 2011.
- KRINSKY, N.I. Mechanism of action of biological antioxidants. *Exp. Biol. Med.*, v. 200, n. 2, p. 248-254, 1992.
- KRISHAN, A. Rapid flow cytofluorometric analysis of mammalian cell cycle by propidium iodide staining. *J. Cell Biol.*, v. 66, n. 1, p. 188-193, 1975.
- KUMAR, A.; SAXEMA, A.; VERMA, A.K.; PERUMAL, P. Hypo-osmotic swelling test on buffalo (*Bubalus bubalis*) semen. *Buffalo Bulletin*, v. 33, n. 1, p. 111-117, 2014a.
- KUMAR, D.; KUMAR, P.; SINGH, P.; et al. Assessment of sperm damages during different stages of cryopreservation in water buffalo by fluorescent probes. *Cytotechnology*, v. 68, n. 3, p. 451-458, 2016.
- KUMAR, D.; KUMAR, P.; SINGH, P.; et al. Characteristics of frozen thawed semen in predicting the fertility of buffalo bulls. *Indian J. Anim. Sci.*, v. 84, n. 4, p. 389-392, 2014b.
- KUMAR, P.; MOHANTY, T.K.; KUMARESAN, A.; et al. Incubation of spermatozoa with Anandamide prior to cryopreservation reduces cryocapacitation and improves post-thaw sperm quality in the water buffalo (*Bubalus bubalis*). *Anim. Reprod. Sci.*, v. 189, p. 77-83, 2018.
- KUMAR, P.; SAINI, M.; KUMAR, D.; et al. Liposome-based semen extender is suitable alternative to egg yolk-based extender for cryopreservation of buffalo (*Bubalus bubalis*) semen. *Anim. Reprod. Sci.*, v. 159, p. 38-45, 2015.
- KUMAR, R.; ATREJA, S.K. Effect of incorporation of additives in tris-based egg yolk extender on buffalo (*Bubalus bubalis*) sperm tyrosine phosphorylation during cryopreservation. *Reprod. Domest. Anim.*, v. 47, p. 3, p. 485-490, 2012.
- KUMAR, R.; MOHANARAO, G.J.; ATREJA, S.K. Freeze-thaw induced genotoxicity in buffalo (*Bubalus bubalis*) spermatozoa in relation to total antioxidant status. *Mol. Biol. Rep.*, v. 38, p. 1499-1506, 2011.
- LADENSTEIN, R.; EPP, O.; BARTELS, K.; et al. Structure analysis and molecular model of the selenoenzyme glutathione peroxidase at 2.8 Å resolution. *J. Mol. Biol.*, v. 134, n. 2, p. 199-218, 1979.
- LAHIR, Y.K. Lipid oxidation in biological systems: Biochemical, Biological and Biophysical aspects. *Global JB B.*, v. 4, p. 224-233, 2015.
- LAMIRANDE, E.; GAGNON, C. Impact of reactive oxygen species on spermatozoa: a balancing act between beneficial and detrimental effects. *Hum. Reprod.*, v. 10, suppl. 1, p. 15-21, 1995.
- LASSO, J.L.; NOILES, E.E.; ALVAREZ, J.G.; STOREY, B.T. Mechanism of superoxide dismutase loss from human sperm cells during cryopreservation. *J. Androl.*, v. 15, p. 255-255, 1994.
- LEITE, T.G.; DO VALE FILHO, V.R.; DE ARRUDA, R.P.; et al. Effects of extender and equilibration time on post-thaw motility and membrane integrity of cryopreserved Gyr bull semen evaluated by CASA and flow cytometry. *Anim. Reprod. Sci.*, v. 120, n. 1-4, p. 31-38, 2010.
- LEWIS, S.E.M.; AITKEN, R.J. DNA damage to spermatozoa has impacts on fertilization and pregnancy. *Cell Tissue Res.*, v. 322, p. 33-41, 2005.

- LI, Z.; YANG, J.; HUANG, H. Oxidative stress induces H2AX phosphorylation in human spermatozoa. *FEBS letters*, v. 580, n. 26, p. 6161-6168, 2006.
- LOAIZA-ECHEVERRI, A.M.; CRUZ, B.C.; SNOECK, P.P.N.; et al. Low-density lipoproteins added to an extender frozen or lyophilized are evenly efficient in cryoprotecting ovine sperm cells than when 16% whole egg yolk was added. *Semin-Cienc. Agrar.*, v. 36, n.3, p. 1335-1346, 2015.
- LOOMIS, P.R.; GRAHAM, J.K. Commercial semen freezing individual male variation in cryosurvival and the response of stallion sperm to customized freezing protocols. *Anim. Reprod. Sci.*, v. 105, n. 1-2, p. 119-128, 2008.
- LOVE, C.C. Modern techniques for semen evaluation. *Vet. Clin. Equine*, v. 32, n. 3, p. 531-546, 2016.
- LUCY, J.A. Functional and structural aspects of biological membranes: a suggested structural role for vitamin E in the control of membrane permeability and stability. *Ann. NY Acad. Sci.*, v. 203, n. 1, p. 4-11, 1972.
- LUO, S.M.; SCHATTEN, H.; SUN, Q.Y. Sperm mitochondria in reproduction: good or bad and where do they go? *J. Genet. Genomics*, v. 40, n. 11, p. 549-556, 2013.
- LYMBEROPOULOS, A.G.; TSAKMAKIDIS, I.A.; KHALIFA, T.A.A. Effect of ram age on structural and functional competence of frozen-thawed spermatozoa in dairy sheep. *Reprod. Domest. Anim.*, v. 45, n. 4, p. 572-578, 2010.
- MACANOVIC, B.; VUCETIC, M.; JANKOVIC, A.; et al. Correlation between sperm parameters and protein expression of antioxidative defense enzymes in seminal plasma: a pilot study. *Dis. Markers*, v. 2015, Artigo ID 436236, 5p., 2015.
- MACMILLAN, K.L.; TIKU, J.L.; HART, N.L. Toxic effects of aromatic amino acids on the livability of bull spermatozoa. *Aust. J. Biol. Sci.*, v. 25, n. 5, p. 1039-1046, 1972.
- MAGNES, I.J.; LI, T.K. Isolation and properties of superoxide dismutase from bovine spermatozoa. *Biol. Reprod.*, v. 22, p. 965-969, 1980.
- MAHFOUZ, R.Z.; PLESSIS, S.S.; AZIZ, N.; et al. Sperm viability, apoptosis, and intracellular reactive oxygen species levels in human spermatozoa before and after induction of oxidative stress. *Fertil. Steril.*, v. 93, n.3, p. 814-821, 2010.
- MAMMOTO, A.; MASUMOTO, N.; TAHARA, M.; et al. Reactive oxygen species block sperm-egg fusion via oxidation of sperm sulfhydryl proteins in mice. *Biol. Reprod.*, v. 55, p. 1063-1068, 1996.
- MANDAL, D.K.; NAGPAUL, P.K.; GUPTA, A.K. Motion characteristics of Murrah buffalo bull spermatozoa in various seasons and its relationship with functional integrity of the plasmallema. *Theriogenology*, v. 60, n. 2, p. 349-358, 2003.
- MAPA. *Dados de rebanho bovino e bubalino no Brasil – 2014*. Serviço Veterinários Estaduais. Disponível em: http://www.agricultura.gov.br/arq_editor/file/Dados%20de%20rebanho%20bovino%20e%20bubalino%20do%20Brasil%202014.pdf>. Acessado em: 20 set 2016.
- MAPA. *Dados de rebanho bovino e bubalino no Brasil – 2017*. Serviço Veterinários Estaduais. Disponível em: http://www.agricultura.gov.br/assuntos/sanidade-animal-e-vegetal/saude-animal/programas-de-saude-animal/febre-aftosa/documentos-febre-aftosa/DadosderebanhobovinoebubalinodoBrasil_2017.pdf>. Acessado em: 07 mai 2019.
- MARCHETTI, C.; JOUY, N.; LEROY-MARTIN, B.; et al. Comparison of four fluorochromes for the detection of the inner mitochondrial membrane potential in human spermatozoa and their correlation with sperm motility. *Human Reproduction*, v. 19, p. 2267-2276, 2004.

- MARCHETTI, C.; OBERT, G.; DEFFOZEZ, A.; et al. Study of mitochondrial membrane potential, reactive oxygen species, DNA fragmentation and cell viability by flow cytometry in human sperm. *Hum. Reprod.*, v. 17, p. 1257-1265, 2002.
- MARQUES, M.; SOUSA, A.P.; PAIVA, A.; et al. Low amounts of mitochondrial reactive oxygen species define human sperm quality. *Reproduction*, v. 147, n. 6, p. 817-824, 2014.
- MARTI, E.; MARTI, J.I.; MUIÑO-BLANCO, T.; CEBRIÁN-PÉREZ, J.A. Effect of the cryopreservation process on the activity and immunolocalization of antioxidant enzymes in ram spermatozoa. *J. Androl.*, v. 29, n. 4, p. 459-467, 2008.
- MARTINEZ-ALBORCIA, M.J.; MORRELL, J.M.; PARRILLA, I.; et al. Improvement of boar sperm cryosurvival by using single-layer colloid centrifugation prior freezing. *Theriogenology*, v. 78, n. 5, p. 1117-1125, 2012.
- MCCARTHY, M.J.; BAUMBER, J.; KASS, P.H.; MEYERS, S. A. Osmotic stress induces oxidative cell damage to rhesus macaque spermatozoa. *Biol. Reprod.*, v. 82, n. 3, p. 644-651, 2010.
- MEDEIROS, C.M.O.; FORELL, F.; OLIVEIRA, A.T.D.; RODRIGUES, J.L. Current status of sperm cryopreservation: why isn't it better? *Theriogenology*, v. 57, n. 1, p. 327-344, 2002.
- MEIZEL, S.; LUI, C.W.; WORKING, P.K.; MRSNY, R.J. Taurine and hypotaurine: their effects on motility, capacitation and the acrosome reaction of hamster sperm in vitro and their presence in sperm and reproductive tract fluids of several mammals. *Dev. Growth Differ.*, v. 22, n. 3, p. 483-494, 1980.
- MELO, M.I.V.; HENRY, M. Teste hiposmótico na avaliação do sêmen equino. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.51, p.77-78, 1999.
- MENNELLA, M.R.F.; JONES, R. Properties of spermatozoal superoxide dismutase and lack of involvement of superoxides in metal-ion-catalysed lipid-peroxidation and reactions in semen. *Biochem. J.*, v. 191, n. 2, p. 289-297, 1980.
- MICHELIS, C.; RAES, M.; TOUSSAINT, O.; REMACLE, J. Importance of Se-glutathione peroxidase, catalase, and Cu/Zn-SOD for cell survival against oxidative stress. *Free Radical Biol. Med.*, v. 17, n. 3, p. 235-248, 1994.
- MIYAZAKI, R.; FUKUDA, M.; TAKEUCHI, H.; et al. Flow cytometry to evaluate acrosome-reacted sperm. *Arch. Andrology*, v. 25, n. 3, p. 243-251, 1990.
- MORAES, C.R.; MEYERS, S. The sperm mitochondrion: Organelle of many functions. *Anim. Reprod. Sci.*, v. 194, p. 71-80, 2018.
- MORRELL, J.M. Applications of flow cytometry to artificial insemination: a review. *Vet. Rec.*, v. 129, n. 17, p. 375-378, 1991.
- MOUSSA, M.; MARTINET, V.; TRIMECHE, A.; et al. Low-density lipoproteins from hen egg yolk by an easy method: cryoprotective effect on frozen-thawed bull semen. *Theriogenology*, v. 57, p. 1695-1706, 2002.
- MRUK, D.D.; SILVESTRINI, B.; MO, M.Y.; CHENG, C.Y. Antioxidant superoxide dismutase-a review: its function, regulation in the testis, and role in male fertility. *Contraception*, v. 65, n. 4, p. 305-311, 2002.
- MUGHAL, D.H.; IJAZ, A.; YOUSAF, M.S.; et al. Cryopreservation of buffalo (*Bubalus bubalis*) semen-limitations and expectations. *Buffalo Bulletin*, v. 36, n. 1, p. 1-14, 2017.
- MUÑOZ, P.M.; FERRUSOLA, C.O.; LOPEZ, L.A.; et al. Caspase 3 activity and lipoperoxidative status in raw semen predict the outcome of cryopreservation of stallion spermatozoa. *Biol. Reprod.*, v. 95, n. 3, p. 1-12, 2016.

- MURPHY, C.; ENGLISH, A.M.; HOLDEN, S.A.; FAIR, S. Cholesterol-loaded-cyclodextrins improve the post-thaw quality of stallion sperm. *Anim. Reprod. Sci.*, v. 145, n. 3-4, p. 123-129, 2014.
- NAIR, S.J.; BRAR, A.S.; AHUJA, C. S.; et al. 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.*, v. 96, n. 1, p. 21-29, 2006.
- NEAGU, V.R.; GARCÍA, B.M., RODRÍGUEZ, A. M.; et al. Determination of glutathione peroxidase and superoxide dismutase activities in canine seminal plasma and its relation with sperm quality and lipid peroxidation post thaw. *Theriogenology*, v. 75, n. 1, p. 10-16, 2011.
- NEVES, M.M.; HENEINE, L.G.D.; HENRY, M. Cryoprotection effectiveness of low concentrations of natural and lyophilized LDL (low density lipoproteins) on canine spermatozoa. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.66, n.3, p.769-777, 2014.
- NOBLANC, A.; DAMON-SOUBEYRAND, C.; KARRICH, B.; et al. DNA oxidative damage in mammalian spermatozoa: where and why is the male nucleus affected? *Free Radical Biol. Med.*, v. 65, p. 719-723, 2013.
- NOURI, M.; GHASEMZADEH, A.; FARZADI, L.; et al. Vitamins C, E and lipid peroxidation levels in sperm and seminal plasma of asthenoteratozoospermic and normozoospermic men. *Int. J. Reprod. Bio. Med.*, v. 6, n. 1, p. 1-5, 2008.
- OEHNINGER, S.; BLACKMORE, P.; MAHONY, M.; HODGEN, G. Effects of hydrogen peroxide on human spermatozoa. *J. Assist. Reprod. Gen.*, v. 12, n. 1, p. 41-47, 1995.
- OHNO, M.; SAKUMI, K.; FUKUMURA, R.; et al. 8-Oxoguanine causes spontaneous de novo germline mutations in mice. *Sci. Rep.*, v. 4, p. 4689, 2014.
- ORTEGA-FERRUSOLA, C.; FERNÁNDEZ, L.G.; MORRELL, J.M.; et al. Lipid peroxidation, assessed with BODIPY-C11, increases after cryopreservation of stallion spermatozoa, is stallion-dependent and is related to apoptotic-like changes. *Reproduction*, v. 138, n. 1, p. 55-63, 2009.
- ORTEGA-FERRUSOLA, C.; SOTILLO-GALAN, Y.; VARELA-FERNANDEZ, E.; et al. Detection of "apoptosis-like" changes during the cryopreservation process in equine sperm. *J. Androl.*, v. 29, n. 2, p. 213-221, 2008.
- ORZOLEK, A.; WYSOCKI, P.; STRZEŻEK, J.; KORDAN, W. Superoxide dismutase (SOD) in boar spermatozoa: Purification, biochemical properties and changes in activity during semen storage (16 C) in different extenders. *Reprod. Biol.*, v. 13, n. 1, p. 34-40, 2013.
- PAASCH, U.; GRUNEWALD, S.; AGARWAL, A.; GLANDERA, H.J. Activation pattern of caspases in human spermatozoa. *Fertil. Steril.*, v. 81, p. 802-809, 2004.
- PAOLI, D.; GALLO, M.; RIZZO, F.; et al. Mitochondrial membrane potential profile and its correlation with increasing sperm motility. *Fertil. Steril.*, v. 95, n. 7, p. 2315-2319, 2011.
- PARKS, J.E.; GRAHAM, J.K. Effects of cryopreservation procedures on sperm membranes. *Theriogenology*, v. 38, n. 2, p. 209-222, 1992.
- PARRISH, J.J.; SUSKO-PARRISH, J.; WINER, M.A.; FIRST, N.L. Capacitation of bovine sperm by heparin. *Biol. Reprod.*, v. 38, n. 5, p. 1171-1180, 1988.
- PEEKER, R.; ABRAMSSON, L.; MARKLUND, S.L. Superoxide dismutase isoenzymes in human seminal plasma and spermatozoa. *Mol. Hum. Reprod.*, v. 3, n. 12, p. 1061-1066, 1997.
- PEÑA, A.I.; QUINTELA, L.A.; HERRADON, P.G. Flow cytometric assessment of acrosomal status and viability of dog spermatozoa. *Reprod. Domest. Anim.*, v. 34, n. 6, p. 495-502, 1999.

- PEÑA, F. J.; SARAVIA, F.; JOHANNISSON, A.; et al. A new and simple method to evaluate early membrane changes in frozen–thawed boar spermatozoa. *Int. J. Androl.*, v. 28, n. 2, p. 107-114, 2005.
- PEÑA, F.J.; GARCÍA, B.M.; SAMPER, J.C.; et al. Dissecting the molecular damage to stallion spermatozoa: the way to improve current cryopreservation protocols? *Theriogenology*, v. 76, n. 7, p. 1177-1186, 2011.
- PENG, T.I.; JOU, M.J. Oxidative stress caused by mitochondrial calcium overload. *Ann. NY Acad. Sci.*, v. 1201, n. 1, p. 183-188, 2010.
- PEREIRA, R.; SÁ, R.; BARROS, A.; SOUSA, M. Major regulatory mechanisms involved in sperm motility. *Asian J. Androl.*, v. 19, n. 1, p. 5-14, 2017.
- PERIS, S.I.; BILODEAU, J.F.; DUFOUR, M.; BAILEY, J.L. Impact of cryopreservation and reactive oxygen species on DNA integrity, lipid peroxidation, and functional parameters in ram sperm. *Mol. Reprod. Dev.*, v. 74, n. 7, p. 878-892, 2007.
- PERRY, S.W.; NORMAN, J.P.; BARBIERI, J.; et al. Mitochondrial membrane potential probes and the proton gradient: a practical usage guide. *Biotechniques*, v. 50, n. 2, p. 98-115, 2011.
- PETIAU-DE VRIES, G.M.; BAEYENS-VOLANT, D. The Biochemistry of Redox Reactions. In: *The Redox State and Circadian Rhythms*. Springer Netherlands, 2000. p. 27-57.
- PETRUNKINA, A.M.; WABERSKI, D.; BOLLWEIN, H.; SIEME, H. Identifying non-sperm particles during flow cytometric physiological assessment: a simple approach. *Theriogenology*, v. 73, p. 995-1000, 2010.
- PIGEOLET, E.; CORBISIER, P.; HOUBION, A.; et al. Glutathione peroxidase, superoxide dismutase, and catalase inactivation by peroxides and oxygen derived free radicals. *Mech. Ageing Dev.*, v. 51, n. 3, p. 283-297, 1990.
- PIOMBONI, P.; FOCARELLI, R.; STENDARDI, A.; et al. The role of mitochondria in energy production for human sperm motility. *Int. J. Androl.*, v. 35, n. 2, p. 109-124, 2012.
- POULOS, A.; DARIN-BENNETT, A.; WHITE, I.G. The phospholipid-bound fatty acids and aldehydes of mammalian spermatozoa. *Comp. Biochem. Phys. B.*, v. 46, n. 3, p. 541-549, 1973.
- RAJAK, S. K.; THIPPESWAMY, V. B.; KUMARESAN, A.; et al. Testicular cytology indicates differences in Sertoli cell counts between “good freezer” and “poor freezer” bulls. *Indian J. Exp. Biol.*, v. 54, p. 17-25, 2016.
- RAJORIYA, J.S.; PRASAD, J.K.; RAMTEKE, S.S.; et al. Enriching membrane cholesterol improves stability and cryosurvival of buffalo spermatozoa. *Anim. Reprod. Sci.*, v. 164, p. 72-81, 2016.
- RASTEGARNIA, A.; SHETABI, N.; TOPRAGGALEAH, T.R.; NASIRI, Y. Effects of exogenous glutathione supplementation in Biocell® extender on quality of cryopreserved buffalo (*Bubalus bubalis*) semen. *J. Anim. Vet. Adv.*, v. 11, n. 18, p. 3437-3443, 2012.
- RASUL, Z.; AHMAD, N.; ANZAR, M. Changes in motion characteristics, plasma membrane integrity, and acrosome morphology during cryopreservation of buffalo spermatozoa. *J. Androl.*, v. 22, n. 2, 278-283, 2001.
- REDDY, N.S.S.; MOHANARAO, G.J.; ATREJA, S.K. Effects of adding taurine and trehalose to a tris-based egg yolk extender on buffalo (*Bubalus bubalis*) sperm quality following cryopreservation. *Anim. Reprod. Sci.*, v. 119, n. 3-4, p. 183-190, 2010.
- REPETTO, M.; BOVERIS, A.; SEMPRINE, J. Lipid peroxidation: chemical mechanism, biological implications and analytical determination. Croatia: INTECH Open Access Publisher, p. 1-30, 2012.
- RICCARDI, C.; NICOLETTI, I. Analysis of apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. *Nat. Protoc.*, v. 1, n. 3, p. 1458-1461, 2006.

- RICKARD, J.P.; SCHMIDT, R.E.; MADDISON, J.W.; et al. Variation in seminal plasma alters the ability of ram spermatozoa to survive cryopreservation. *Reprod. Fert. Dev.*, v. 28, n. 4, p. 516-523, 2016.
- ROCA, J.; RODRÍGUEZ, M.J.; GIL, M.A.; et al. Survival and in vitro fertility of boar spermatozoa frozen in the presence of superoxide dismutase and/or catalase. *J. Androl.*, v. 26, n. 1, p. 15-24, 2005.
- RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Semen evaluation techniques and their relationship with fertility. *Anim. Reprod.*, v. 10, p. 148-159, 2013.
- ROTRUCK, J.T.; POPE, A.L.; GANTHER, H.E.; et al. Selenium: biochemical role as a component of glutathione peroxidase. *Science*, v. 179, n. 4073, p. 588-590, 1973.
- ROY, S.C.; ATREJA, S.K. Effect of reactive oxygen species on capacitation and associated protein tyrosine phosphorylation in buffalo (*Bubalus bubalis*) spermatozoa. *Anim. Reprod. Sci.*, v. 107, n. 1-2, p. 68-84, 2008.
- SAARANEN, M.; SUISTOMAA, U.; VANHA-PERTTULA, T. Semen selenium content and sperm mitochondrial volume in human and some animal species. *Hum. Reprod.*, v. 4, n. 3, p. 304-308, 1989.
- SCHOBER, D.; AURICH, C.; NOHL, H.; GILLE, L. Influence of cryopreservation on mitochondrial functions in equine spermatozoa. *Theriogenology*, v. 68, n. 5, p. 745-754, 2007.
- SELVARAJU, S.; NANDI, S.; SUBRAMANI, T. S.; et al. Improvement in buffalo (*Bubalus bubalis*) spermatozoa functional parameters and fertility in vitro: Effect of insulin-like growth factor-I. *Theriogenology*, v. 73, n. 1, p. 1-10, 2010.
- SELVARAJU, S.; RAVINDRA, J. P.; GHOSH, J.; et al. Evaluation of sperm functional attributes in relation to in vitro sperm-zona pellucida binding ability and cleavage rate in assessing frozen thawed buffalo (*Bubalus bubalis*) semen quality. *Anim. Reprod. Sci.*, v. 106, n. 3-4, p. 311-321, 2008.
- SENGER, P. L. Endocrinology of the male and spermatogenesis. In: Pathways to pregnancy and parturition. Pullman, WA: *Current Conceptions*. 2003, p. 214-239.
- SHAH, S.A.H.; ANDRABI, S.M.H. ; QURESHI, I.Z. Effect of equilibration times, freezing, and thawing rates on post-thaw quality of buffalo (*Bubalus bubalis*) bull spermatozoa. *Andrology*, v. 4, p. 972-976, 2016.
- SHAHVERDI, A.; RASTEGARNIA, A.; TOPRAGGALEH, T.R. Effect of extender and equilibration time on post thaw motility and chromatin structure of buffalo bull (*Bubalus bubalis*) spermatozoa. *Cell J.*, v. 16, n. 3, p. 279-288, 2014.
- SHANNON, P.; CURSON, B. Site of aromatic L-amino acid oxidase in dead bovine spermatozoa and determination of between-bull differences in the percentage of dead spermatozoa by oxidase activity. *J. Reprod. Fertil.*, v. 64, n. 2, p. 469-473, 1981.
- SHANNON, P.; CURSON, B. Toxic effect and action of dead sperm on diluted bovine semen. *J. Dairy Sci.*, v. 55, n. 5, p. 614-620, 1972.
- SHIVA, M.; GAUTAM, A.K.; VERMA, Y.; et al. Association between sperm quality, oxidative stress, and seminal antioxidant activity. *Clin. Biochem.*, v. 44, n. 4, p. 319-324, 2011.
- SIES, H.; JONES, D. Oxidative stress, 2nd ed., In: G. Fink (Ed.), *Encyclopedia of Stress*, 3, Elsevier, Amsterdam (2007) 45-48.
- SILVA, A.R.; CARDOSO, R.D.C.S.; SILVA, L.D.M.; et al. Prognostic value of canine frozen-thawed semen parameters on in vitro sperm-oocyte interactions. *Theriogenology*, v. 66, p. 456-462, 2006.
- SILVA, P.F.N.; GADELLA, B.M. Detection of damage in mammalian sperm cells. *Theriogenology*, v. 65, n. 5, p. 958-978, 2006.

SILVA, P.F.N; GADELLA, B.M.; COLENBRANDER, B.; ROELEN, B. A. Exposure of bovine sperm to pro-oxidants impairs the developmental competence of the embryo after the first cleavage. *Theriogenology*, v. 67, n. 3, p. 609-619, 2007.

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

SINGH, M.; GHOSH, S.K.; PRASAD, J.K.; et al. Seminal PDC-109 protein vis-a-vis cholesterol content and freezability of buffalo spermatozoa. *Anim. Reprod. Sci.*, v. 144, n. 1-2, p. 22-29, 2014.

SINGH, R.K.; KUMARESAN, A.; MIR, M.A.; et al. Computer assisted sperm analysis: Relationship between the movement characteristics of buffalo spermatozoa and sire fertility. *Indian J. Anim. Res.*, v. 51, n. 4, p. 660-664, 2017.

SOHAIL, A.; ANDRABI, S.M.H.; ANWAR, M.; et al. Assessment of buffalo bull semen quality based on sperm motility parameters, motion characteristics and in vitro fertilization rate. *Pak. Vet. J.*, v. 33, n. 1, p. 53-56, 2013.

SONG, G.J.; NORKUS, E.P.; LEWIS, V. Relationship between seminal ascorbic acid and sperm DNA integrity in infertile men. *Int. J. Androl.*, v. 29, n. 6, p. 569-575, 2006.

SOUZA, H.M.; ARRUDA, L.C.; MONTEIRO, M.M.; et al. The Effect of Canthaxanthin on the Quality of Frozen Ram Spermatozoa. *Biopreserv. Biobank.*, v. 15, n. 3, p. 220-227, 2017.

SPINACI, M.; DE AMBROGI, M.; VOLPE, S.; et al. Effect of staining and sorting on boar sperm membrane integrity, mitochondrial activity and in vitro blastocyst development. *Theriogenology*, v. 64, n. 1, p. 191-201, 2005.

SRIVASTAVA, N.; GOCHHAIT, S.; BOER, P.; BAMEZAI, R.N. Role of H2AX in DNA damage response and human cancers. *Mutat. Res./Reviews Mutat. Res.*, v. 681, n. 2, p. 180-188, 2009.

STRADAIOLI, G.; NORO, T.; SYLLA, L.; MONACI, M. Decrease in glutathione (GSH) content in bovine sperm after cryopreservation: comparison between two extenders. *Theriogenology*, v. 67, n. 7, p. 1249-1255, 2007.

STRZEŻEK, J.; LAPKIEWICZ, S.; LECEWICZ, M. A note on antioxidant capacity of boar seminal plasma. *Anim. Sci. Pap. Rep.*, v. 17, n. 4, p. 181-188, 1999.

STRZEZEK, R.; KOZIOROWSKA-GILUN, M.; KOWALÓWKA, M.; STRZEZEK, J. Characteristics of antioxidant system in dog semen. *Pol. J. Vet. Sci.*, v. 12, p. 55-60, 2009.

TAVILANI, H.; GOODARZI, M.T.; VAISI-RAYGANI, A.; et al. Activity of antioxidant enzymes in seminal plasma and their relationship with lipid peroxidation of spermatozoa. *Int. Braz. J. Urol.*, v. 34, n. 4, p. 485-491, 2008.

THERMOFISHER. Disponível em: <<https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/mp36008.pdf>>. Acessado: 23 de out 2018a.

THERMOFISHER. Disponível em: <<https://www.thermofisher.com/br/en/home/life-science/cell-analysis/cell-analysis-learning-center/molecular-probes-school-of-fluorescence/flow-cytometry-basics/flow-cytometry-fundamentals/how-flow-cytometer-works.html>>. Acessado: 05 de set 2018b.

THERMOFISHER. Disponível em: <<https://www.thermofisher.com/br/en/home/references/molecular-probes-the-handbook/probes-for-reactive-oxygen-species-including-nitric-oxide/generating-and-detecting-reactive-oxygen-species.html>>. Acessado: 26 de out 2018c.

THERMOFISHER. Disponível em: <<https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/C6827?SID=srch-srp-C6827>>. Acessado: 25 de out 2018d.

- THÉRON, P.; AUGER, J.; LEGRAND, A.; JOUANNET, P. α -Tocopherol in human spermatozoa and seminal plasma: relationships with motility, antioxidant enzymes and leukocytes. *Mol. Hum. Reprod.*, v. 2, n. 10, p. 739-744, 1996.
- THIELE, J.J.; FREISLEBEN, H.J.; FUCHS, J.; OCHSENDORF, F.R. Ascorbic acid and urate in human seminal plasma: determination and interrelationships with chemiluminescence in washed semen. *Hum. Reprod.*, v. 10, n. 1, p. 110-115, 1995.
- TOPRAGGALEH, T.R.; SHAHVERDI, A.; RASTEGARNIA, A.; et al. Effect of cysteine and glutamine added to extender on post-thaw sperm functional parameters of buffalo bull. *Andrologia*, v. 46, p. 777-783, 2014.
- TOSIC, J. Mechanism of hydrogen peroxide formation by spermatozoa and the role of amino acids in sperm motility. *Nature*, v. 159, n. 4042, p. 544-544, 1947.
- TREULEN, F.; URIBE, P.; BOGUEN, R.; VILLEGAS, J.V. Mitochondrial permeability transition increases reactive oxygen species production and induces DNA fragmentation in human spermatozoa. *Hum. Reprod.*, v.30, n.4, p. 767-776, 2015.
- UPRETI, G.C.; JENSEN, K.; MUNDAY, R.; et al. Studies on aromatic amino acid oxidase activity in ram spermatozoa: role of pyruvate as an antioxidant. *Anim. Reprod. Sci.*, v. 51, n. 4, p. 275-287, 1998.
- URIBE, P.; TREULEN, F.; BOGUEN, R.; et al. Nitrosative stress by peroxynitrite impairs ATP production in human spermatozoa. *Andrologia*, p. 1-8, 2016.
- VACA, C.E.; WILHELM, J.; HARMS-RINGDAHL, M. Interaction of lipid peroxidation products with DNA. A review. *Mutat. Res./Reviews Gen. Toxicol.*, v. 195, n. 2, p. 137-149, 1988.
- VALE, W. G. Avances biotecnológicos em reprodução de búfalos. *Tecnología em marcha*. v. 24, n. 5, p. 89-104, 2011.
- VAN DER HORST, C.J.G.; GROOTEN, H.J.G. The occurrence of hypotaurine and other sulfur-containing amino acids in seminal plasma and spermatozoa of boar, bull and dog. *BBA-Gen. Subjects*, v. 117, n. 2, p. 495-497, 1966.
- VAN TRAN, L.; MALLA, B.A.; KUMAR, S.; TYAGI, A.K. Polyunsaturated fatty acids in male ruminant reproduction – a review. *Asian. Austral. J. Anim.*, v. 30, n. 5, p. 622-637, 2017.
- VAZQUEZ, J.M.; PARRILLA, I.; ROCA, J.; et al. Sex-sorting sperm by flow cytometry in pigs: Issues and perspectives. *Theriogenology*, v. 71, p. 80-88, 2009.
- VERSTERGEN, J.; IGUER-OUADA, M.; ONCLIN, K. Computer assisted semen analyzers in andrology research and veterinary practice. *Theriogenology*, v. 57, p. 149-179, 2002.
- VISHWANATH, R.; SHANNON, P. Do sperm cells age? A review of the physiological changes in sperm during storage at ambient temperature. *Reprod. Fertil. Dev.*, v. 9, n. 3, p. 321-332, 1997.
- WAHEED, M.M.; GOUDA, E.M.; KHALIFA, T.A.A. Impact of seminal plasma superoxide dismutase and glutathione peroxidase on cryopreserved buffalo spermatozoa. *Anim. Reprod. Sci.*, v. 142, n. 3, p. 126-130, 2013.
- WATERHOUSE, K.E.; HOFMO, P.O.; TVERDAL, A.; MILLER, R.R. Within and between breed differences in freezing tolerance and plasma membrane fatty acid composition of boar sperm. *Reproduction*, v. 131, n. 5, p. 887-894, 2006.
- WATSON, P.F. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Anim. Reprod. Sci.*, v. 60, p. 481-492, 2000.
- WILHELM, K.M.; GRAHAM, J.K.; SQUIRES, E.L. Comparison of the fertility of cryopreserved stallion spermatozoa with sperm motion analyses, flow cytometric evaluation, and zona-free hamster oocyte penetration. *Theriogenology*, v. 46, n. 4, p. 559-578, 1996.

WINTERBOURN, C.C. Reconciling the chemistry and biology of reactive oxygen species. *Nat. Chem. Biol.*, v. 4, n. 5, p. 278-286, 2008.

WRIGHT, C.E.; TALLAN, H.H.; LIN, Y.Y. Taurine: biological update. *Ann. Rev. Biochem.*, v. 55, n. 1, p. 427-453, 1986.

YESTE, M.; ESTRADA, E.; ROCHA, L. G.; et al. Cryotolerance of stallion spermatozoa is related to ROS production and mitochondrial membrane potential rather than to the integrity of sperm nucleus. *Andrology*, v. 3, n. 2, p. 395-407, 2015.


ZARZYCKA, M.; KOTWICKA, M.; JENDRASZAK, M.; et al. Hydroxyflutamide alters the characteristics of live boar spermatozoa. *Theriogenology*, v. 82, n. 7, p. 988-996, 2014.

ZIDONI, E.; KREMER, M.L. Kinetics and mechanism of catalase action: Formation of the intermediate complex. *Arch. Biochem. Biophys.*, v. 161, n. 2, p. 658-664, 1974.

ZOROV, D.B.; JUHASZOVA, M.; SOLLITT, S.J. Mitochondrial reactive oxygen species (ROS) and ROS-induced ROS release. *Physiol. Rev.*, v. 94, n. 3, p. 909-950, 2014.

ZRIBI, N.; CHAKROUN, N.F.; EUCH, H.E.; et al. Effects of cryopreservation on human sperm deoxyribonucleic acid integrity. *Fert. Steril.*, v. 93, n. 1, 2010.

ANEXO 1

 UFMG	UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS CEUA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS
CERTIFICADO Certificamos que o Protocolo nº. 357 / 2015, relativo ao projeto intitulado "Desenvolvimento de processos de preservação espermática para maximização do uso da inseminação artificial em búfalos", que tem como responsável Marc Roger Jean Marie Henry, está de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFMG), tendo sido aprovado na reunião de 09/12/2015. Este certificado expira-se em 09/12/2020.	
CERTIFICATE We hereby certify that the Protocol nº. 357 / 2015, related to the Project entitled "Development of sperm preservation processes for maximizing the use of artificial insemination in buffaloes", under the supervision of Marc Roger Jean Marie Henry, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Experimentation, adopted by the Ethics Committee in Animal Experimentation (CEUA/UFMG), and was approved in 09/12/2015. This certificate expires in 09/12/2020.	
Cleuza Maria de Faria Rezende Coordenador(a) da CEUA/UFMG Belo Horizonte, 09/12/2015.	
Atenciosamente.	
Sistema CEUA-UFMG https://www.ufmg.br/bioetica/cetea/ceua/	
Universidade Federal de Minas Gerais Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005 31270-901 – Belo Horizonte, MG – Brasil Telefone: (31) 3499-4516 – Fax: (31) 3499-4592 www.ufmg.br/bioetica/cetea - cetea@prpq.ufmg.br	

ANEXO 2

Setup utilizado para análise do sêmen da espécie bubalina no programa de análise computadorizada da motilidade espermática – SCA®

Área da partícula: 20 a 70 microns²

VCL: 10 < SLOW < 25 < MEDIUM < 50 < RAPID

Progressividade: > 70% STR

Circular: < 50% LIN

Pontos para o VAP: 5; Conectividade: 12

ANEXO 3

Média e erro-padrão dos parâmetros de motilidade e cinética de espermatozoides bubalinos, desde o pré-resfriamento até 180 minutos pós-descongelamento

Tempo	MT (%)	MP (%)	VCL ($\mu\text{m/s}$)	VSL ($\mu\text{m/s}$)	VAP ($\mu\text{m/s}$)	ALH (μm)	BCF (Hz)
RB (n=23)							
PR	95,88 \pm 0,63 ^A	49,11 \pm 3,19 ^A	129,89 \pm 3,47 ^A	58,80 \pm 2,61 ^A	88,83 \pm 2,36 ^A	4,03 \pm 0,11 ^A	12,71 \pm 0,26 ^A
PC	95,02 \pm 0,39 ^A	57,10 \pm 2,82 ^A	115,44 \pm 3,68 ^A	57,40 \pm 3,02 ^A	78,21 \pm 2,88 ^A	3,73 \pm 0,11 ^A	13,34 \pm 0,20 ^A
PD_T5	89,35 \pm 1,28 ^A	61,50 \pm 2,30 ^A	86,87 \pm 2,37 ^A	51,83 \pm 2,08 ^A	63,30 \pm 2,05 ^A	2,85 \pm 0,08 ^A	13,37 \pm 0,17 ^A
PD_T60	85,97 \pm 0,92 ^A	56,74 \pm 1,86 ^A	72,58 \pm 1,63 ^A	39,82 \pm 1,18 ^A	50,83 \pm 1,38 ^A	2,46 \pm 0,04 ^A	13,42 \pm 0,18 ^A
PD_T120	78,52 \pm 1,37 ^A	52,49 \pm 1,87 ^A	62,99 \pm 1,86 ^A	34,34 \pm 1,11 ^A	43,71 \pm 1,39 ^A	2,22 \pm 0,04 ^A	12,99 \pm 0,21 ^A
PD_T180	62,82 \pm 1,49 ^A	35,27 \pm 1,99 ^A	44,88 \pm 1,89 ^A	24,23 \pm 1,27 ^A	30,43 \pm 1,55 ^A	1,94 \pm 0,03 ^A	11,46 \pm 0,25 ^A
RR (n=22)							
PR	94,23 \pm 0,88 ^A	40,33 \pm 3,66 ^A	110,99 \pm 3,76 ^B	46,41 \pm 3,19 ^B	74,51 \pm 3,16 ^B	3,66 \pm 0,12 ^B	12,67 \pm 0,25 ^A
PC	92,46 \pm 1,31 ^A	50,55 \pm 3,75 ^A	100,38 \pm 2,77 ^B	47,20 \pm 2,55 ^B	66,96 \pm 2,17 ^B	3,49 \pm 0,11 ^A	13,32 \pm 0,20 ^A
PD_T5	77,31 \pm 2,49 ^B	47,14 \pm 3,58 ^B	74,32 \pm 2,59 ^B	40,96 \pm 2,28 ^B	52,48 \pm 2,21 ^B	2,63 \pm 0,08 ^A	13,15 \pm 0,17 ^A
PD_T60	65,08 \pm 2,06 ^B	36,68 \pm 2,31 ^B	57,47 \pm 2,49 ^B	29,80 \pm 1,29 ^B	39,07 \pm 1,74 ^B	2,26 \pm 0,04 ^B	12,59 \pm 0,23 ^B
PD_T120	42,73 \pm 2,80 ^B	20,37 \pm 2,31 ^B	37,23 \pm 2,41 ^B	19,04 \pm 1,46 ^B	24,35 \pm 1,82 ^B	1,89 \pm 0,04 ^B	11,05 \pm 0,27 ^B
PD_T180	16,09 \pm 2,40 ^B	2,97 \pm 0,68 ^B	15,81 \pm 2,11 ^B	6,28 \pm 0,98 ^B	8,84 \pm 1,27 ^B	1,11 \pm 0,16 ^B	6,18 \pm 0,90 ^B

PR: pré-resfriamento; PC: pré-congelamento; PD_T5: pós-descongelamento, 5 min.; PD_T60: pós-descongelamento, 60 min.; PD_T120: pós-descongelamento, 120 min.; PD_T180: pós-descongelamento, 180 min.

RB: grupo de resistência espermática boa; RR: grupo de resistência espermática ruim.

A, B: letras maiúsculas distintas na coluna indicam diferença significativa entre os grupos em cada tempo ($p \leq 0,05$).

ANEXO 4

Resultados da análise de morfologia espermática de cada um dos 90 ejaculados utilizados de touros bubalinos (*Bubalus bubalis*)

Animal	Ejaculado	Grupo	Defeitos de cabeça (%)	Defeitos de acrossoma (%)	Defeitos de peça principal (%)	Defeitos de peça intermediária (%)	Normais (%)	Anormais (%)
12	1	RR	2,50	3,00	9,00	2,00	83,50	16,50
12	4	RB	4,50	3,00	8,50	4,50	79,50	20,50
12	5	RI	2,00	3,00	9,50	3,00	82,50	17,50
12	7	RI	2,50	1,50	10,00	4,00	82,00	18,00
12	9	RI	3,00	2,00	13,00	1,50	80,50	19,50
12	11	RR	3,50	4,50	4,00	4,50	83,50	16,50
13	1	RI	9,50	5,50	7,00	7,50	70,50	29,50
13	4	RI	8,50	3,00	6,50	10,00	72,00	28,00
13	5	RI	7,00	4,00	7,50	4,50	77,00	23,00
13	7	RR	5,00	6,00	10,50	7,50	71,00	29,00
13	18	RR	6,00	3,00	10,50	7,00	73,50	26,50
14	1	RR	2,50	4,00	7,50	3,50	82,50	17,50
14	4	RI	1,00	0,00	16,00	6,50	76,50	23,50
14	6	RI	4,00	2,00	4,50	11,00	78,50	21,50
14	8	RI	4,00	1,50	9,50	4,50	80,50	19,50
14	9	RB	4,50	2,00	4,00	6,00	83,50	16,50
14	10	RI	4,50	2,00	7,50	5,00	81,00	19,00
14	11	RB	2,50	0,50	6,50	7,50	83,00	17,00
14	15	RR	4,00	0,00	5,50	10,50	80,00	20,00
28	2	RR	3,00	3,50	14,50	6,50	72,50	27,50
29	1	RI	4,00	1,50	8,50	2,50	83,50	16,50
29	4	RI	1,00	2,00	14,50	10,00	72,50	27,50

continua

Animal	Ejaculado	Grupo	Defeitos de cabeça (%)	Defeitos de acrossoma (%)	Defeitos de peça principal (%)	Defeitos de peça intermediária (%)	Normais (%)	Anormais (%)
29	5	RB	3,50	3,50	7,00	4,50	81,50	18,50
29	6	RB	3,50	1,00	9,00	11,50	75,00	25,00
29	8	RB	2,50	0,00	6,00	9,50	82,00	18,00
29	15	RI	2,50	0,50	4,00	3,50	89,50	10,50
29	16	RI	3,00	2,50	3,00	1,50	90,00	10,00
30	2	RI	8,50	2,00	4,00	4,00	81,50	18,50
30	3	RI	4,50	3,00	9,50	2,50	80,50	19,50
30	5	RB	3,50	2,50	1,00	9,50	83,50	16,50
30	6	RI	5,50	2,50	7,50	9,00	75,50	24,50
30	8	RI	7,50	4,50	8,50	7,00	72,50	27,50
30	9	RI	2,00	2,50	13,00	9,50	73,00	27,00
31	1	RB	3,00	1,50	7,00	1,50	87,00	13,00
31	3	RB	5,00	3,50	3,50	4,00	84,00	16,00
31	4	RI	3,00	4,50	4,00	4,00	84,50	15,50
31	5	RI	2,00	2,00	8,50	5,00	82,50	17,50
31	7	RB	5,00	0,50	9,50	4,00	81,00	19,00
31	8	RI	3,50	2,00	8,50	10,50	75,50	24,50
31	9	RI	3,50	6,00	6,50	6,50	77,50	22,50
31	10	RI	3,00	2,00	7,50	7,50	80,00	20,00
31	17	RB	2,00	1,00	2,50	2,00	92,50	7,50
32	1	RI	2,00	0,50	16,50	3,00	78,00	22,00
32	2	RR	4,50	2,00	11,00	1,00	81,50	18,50
32	3	RI	5,50	11,50	6,00	4,00	73,00	27,00
32	4	RR	1,50	2,00	6,00	7,50	83,00	17,00
32	7	RB	3,50	0,50	8,00	1,50	86,50	13,50

continua

Animal	Ejaculado	Grupo	Defeitos de cabeça (%)	Defeitos de acrossoma (%)	Defeitos de peça principal (%)	Defeitos de peça intermediária (%)	Normais (%)	Anormais (%)
303	1	RI	7,00	1,00	14,50	2,50	75,00	25,00
303	2	RI	8,50	1,50	6,50	3,00	80,50	19,50
303	3	RR	6,50	1,00	12,50	3,50	76,50	23,50
303	5	RB	4,00	5,50	15,50	4,50	70,50	29,50
303	7	RI	9,50	4,00	12,50	4,00	70,00	30,00
303	8	RI	6,00	2,50	18,50	3,00	70,00	30,00
303	9	RI	7,00	2,00	10,50	3,00	77,50	22,50
303	10	RB	8,00	1,50	6,00	7,00	77,50	22,50
313	1	RI	3,00	0,00	17,50	7,50	72,00	28,00
313	3	RI	9,00	1,00	5,00	9,50	75,50	24,50
313	4	RB	2,50	1,50	6,50	10,50	79,00	21,00
313	5	RB	9,00	3,50	7,50	4,50	75,50	24,50
313	6	RI	7,00	5,00	7,50	6,50	74,00	26,00
313	8	RB	1,50	0,00	18,50	3,50	76,50	23,50
313	15	RI	3,50	0,00	9,00	7,50	80,00	20,00
313	16	RB	8,50	2,50	9,00	8,50	71,50	28,50
313	17	RI	5,00	2,00	8,50	5,00	79,50	20,50
324	3	RI	7,00	4,00	2,00	5,00	82,00	18,00
324	4	RB	8,50	1,00	5,50	4,00	81,00	19,00
324	5	RI	8,00	1,00	10,00	8,50	72,50	27,50
324	6	RI	8,00	5,50	4,50	4,00	78,00	22,00
324	7	RI	6,00	4,50	5,00	6,50	78,00	22,00
324	8	RI	10,50	3,00	6,50	4,50	75,50	24,50
324	9	RB	9,00	1,00	5,00	6,00	79,00	21,00
324	10	RI	11,00	1,00	8,00	8,00	72,00	28,00

continua

Animal	Ejaculado	Grupo	Defeitos de cabeça (%)	Defeitos de acrossoma (%)	Defeitos de peça principal (%)	Defeitos de peça intermediária (%)	Normais (%)	Anormais (%)
334	1	RR	1,00	0,00	10,00	3,00	86,00	14,00
334	2	RR	3,00	1,50	18,50	0,50	76,50	23,50
334	3	RI	3,00	1,00	11,00	0,50	84,50	15,50
334	6	RI	1,00	1,00	14,50	3,00	80,50	19,50
334	7	RR	3,00	3,00	9,00	3,00	82,00	18,00
334	8	RR	4,50	1,00	9,00	2,00	83,50	16,50
334	9	RR	3,00	2,00	9,00	2,50	83,50	16,50
334	11	RR	5,00	2,50	10,00	3,50	79,00	21,00
334	12	RR	7,00	2,50	9,50	6,00	75,00	25,00
334	13	RR	3,00	6,50	9,50	5,00	76,00	24,00
334	14	RR	2,00	2,50	2,00	1,50	92,00	8,00
334	15	RR	3,50	0,00	4,00	3,00	89,50	10,50
351	2	RR	4,00	3,00	8,00	4,50	80,50	19,50
351	3	RR	4,00	4,50	3,00	8,50	80,00	20,00
351	6	RB	3,50	4,50	3,50	9,50	79,00	21,00
351	7	RB	7,00	6,00	7,50	5,00	74,50	25,50
351	9	RB	4,50	3,50	6,50	7,50	78,00	22,00
351	11	RI	7,00	2,00	9,50	3,50	78,00	22,00

conclusão

ANEXO 5

Correlações entre as avaliações da integridade estrutural e funcional da membrana plasmática de espermatozoides bubalinos (*Bubalus bubalis*)

	HO <i>in natura</i>	MPLAI T5	MPAL T5	MPAI T5	MPIAL T5	MPLAI T180	MPAL T180	MPAI T180	MPIAL T180	Estab. T5
MPLAI_T5	-0,12									
MPAL_T5	-0,33*	0,44*								
MPAI_T5	0,25	-0,89*	-0,81*							
MPIAL_T5	-0,37*	0,19	0,34*	-0,31*						
MPLAI_T180	-0,25	0,83*	0,45*	-0,78*	0,15					
MPAL_T180	-0,36*	0,21	0,73*	-0,51*	0,36*	0,31*				
MPAI_T180	0,37*	-0,69*	-0,70*	0,81*	-0,30*	-0,86*	-0,75*			
MPIAL_T180	-0,07	-0,28	-0,16	0,26	0,04	-0,28	-0,15	0,23		
Estabilidade_T5	0,30	-0,80*	-0,81*	0,95*	-0,33*	-0,77*	-0,52*	0,81*	0,19	
Estabilidade_T180	0,36*	-0,67*	-0,71*	0,81*	-0,27	-0,76*	-0,75*	0,93*	0,26	0,76*

HO: espermatozoides reativos ao teste hiposmótico. MPAI: células com membranas plasmática e acrossômica íntegras; MPIAL: células com membrana plasmática íntegra e acrossômica lesada; MPAL: células com membranas plasmática e acrossômica lesadas; MPLAI: células com membrana plasmática lesada e acrossômica íntegra. Estab.: estabilidade da membrana plasmática. T5: pós-descongelamento, 5 min. T180: pós-descongelamento, 180 min. * : $p \leq 0,05$.