



KARINA SOUZA DE CASTRO ALVES

**ESTÁGIO SUPERVISIONADO REALIZADO EM RENO, ESTADOS UNIDOS:
AVALIAÇÃO DO ESTRESSE OXIDATIVO E POSSIBILIDADE DE TRANSMISSÃO
HEREDITÁRIA POR MECANISMOS EPIGENÉTICOS EM TOUROS.**

LAVRAS - MG

2019

KARINA SOUZA DE CASTRO ALVES

**ESTÁGIO SUPERVISIONADO REALIZADO EM RENO, ESTADOS UNIDOS:
AVALIAÇÃO DO ESTRESSE OXIDATIVO E POSSIBILIDADE DE TRANSMISSÃO
HEREDITÁRIA POR MECANISMOS EPIGENÉTICOS EM TOUROS.**

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao Colegiado do curso de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Curso de Medicina Veterinária, para a obtenção do título de Bacharel em Medicina Veterinária.

Prof. Dr. João Bosco Barreto Filho

Orientador

LAVRAS - MG

2019

KARINA SOUZA DE CASTRO ALVES

**ESTÁGIO SUPERVISIONADO REALIZADO EM RENO, ESTADOS UNIDOS:
AVALIAÇÃO DO ESTRESSE OXIDATIVO E POSSIBILIDADE DE TRANSMISSÃO
HEREDITÁRIA POR MECANISMOS EPIGENÉTICOS EM TOUROS.**

**SUPERVISED TRAINEE REALIZED IN RENO, UNITED STATES: EVALUATION OF
OXIDATIVE STRESS AND POSSIBILITY OF HEREDITARY TRNSMISSION BY
EPIGENETIC MECHANISMS IN BULLS.**

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao Colegiado do curso de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Curso de Medicina Veterinária, para a obtenção do título de Bacharel em Medicina Veterinária.

APROVADO em 08 de Julho de 2019.

Prof. Dr. Bruna Rios Coelho Alves

Prof. Dr. Marcio Zangeronimo

Prof. Dr. João Bosco Barreto Filho

Orientador

LAVRAS-MG

2019

Dedico a Deus, a toda minha família, principalmente meu
pai, e aos meus amigos.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à Deus; à Universidade Federal de Lavras, especialmente ao Departamento de Medicina Veterinária e todo seu corpo docente e colaboradores; bem como ao Laboratório de Biotecnologia da Reprodução Animal e todos os seus integrantes.

Ao meu orientador, Professor Dr. João Bosco Barreto Filho, por todo conhecimento e experiência compartilhados. Pela cobrança, pelas oportunidades de trabalho oferecidas e por toda atenção dedicada a mim durante minha formação.

À minha prima e supervisora de estágio, Professora Bruna Alves, pela oportunidade a mim disponibilizada, não só de trabalhar no âmbito da pesquisa internacionalmente como das mais diversas experiências de se viver em outro país. Por ter me acolhido com tanto carinho, confiado na minha capacidade e no meu trabalho e, principalmente, por não ter medido esforços na transmissão dos seus conhecimentos em diferentes áreas.

Ao meu pai, por todo apoio e amor; por me dar forças para continuar mesmo em sua ausência e por ter feito de mim, juntamente com a minha mãe, a pessoa que eu sou hoje.

À minha mãe por todo carinho e dedicação. Por estar sempre ao meu lado independente dos conflitos de opiniões. E, principalmente, por ser meu porto seguro, para onde quero voltar nos momentos difíceis e onde eu quero comemorar cada vitória.

Ao meu irmão, por ter tornado essa experiência possível com muito trabalho e sempre colocando os meus sonhos acima dos seus próprios. À toda minha família e amigos que fizeram parte de alguma forma da minha trajetória e dessa conquista.

RESUMO

O estresse oxidativo em espermatozoides prejudica sua capacidade de fertilização e, como consequência, perdas financeiras e genéticas são impostas às fazendas de produção animal. A suplementação de touros com antioxidantes pode ajudar na manutenção da qualidade da célula espermática. Em animais de laboratório foi demonstrado que o estresse oxidativo pode interferir na assinatura de pequenos RNAs do sêmen e, com isso, contribuir para a transmissão epigenética de características relacionadas ao metabolismo na progênie. Trabalhos na espécie bovina são necessários para a averiguação de tal ocorrência. O presente estudo foi feito *na University of Nevada*, em Reno, Estados Unidos, utilizando-se sêmen advindo de touros da raça Angus. Seu acompanhamento foi realizado como parte das atividades propostas para a disciplina PRG-107, estágio supervisionado, da grade curricular do curso de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Lavras. O objetivo deste experimento foi avaliar a influência da suplementação com antioxidantes em parâmetros seminais dos touros. Um suplemento contendo antioxidantes por via subcutânea foi administrado em cinco desses animais, sendo outros quatro touros utilizados como grupo controle. As amostras de sêmen foi coletado um dia antes e setenta dias após a aplicação do suplemento, e foi avaliado antes e após criopreservação. Desenvolveram-se dois protocolos laboratoriais, um para a avaliação de estresse oxidativo em espermatozoides bovinos, e outro para o isolamento de RNAs a partir de sêmen bovino antes e após a criopreservação, para se avaliar a influência do uso de antioxidantes nos pequenos RNAs não codificadores dos espermatozoides e sua capacidade de transmissão de características relacionadas ao metabolismo à progênie. Até o momento, foi observado que não houve efeito da suplementação com antioxidantes na motilidade, morfologia e concentração espermáticas, e nem no número total de espermatozoides ejaculados.

Palavras-chave: Sêmen, bovinos, pequenos RNAs, estresse oxidativo, epigenética

ABSTRACT

The fertilization potential of spermatozoa under oxidative stress is reduced; which leads to financial and genetic to the production farms. Supplementing sires with antioxidants can help maintaining sperm quality. In laboratory animals the oxidative stress can potentially interfere with the small-RNA signature in semen, and consequently, involved with epigenetic transmission of traits related to metabolic-related traits to the progeny. However more studies in the bovine specie are necessary for elucidating this occurrence. This study was performed at the University of Nevada, Reno, USA, using semen obtained from nine Angus bulls, and it was carried out as part of the activities proposed by the discipline PRG-107, supervised trainee. The objective of this experiment was evaluating the influence of supplementation with antioxidants in bulls' seminal parameters. An antioxidant supplement was administrated subcutaneously in five of those animals, and four bulls remained as control group. Semen was collected one day before and 70 days after the application and was evaluated before and after cryopreservation. In addition, two laboratory protocols were developed: one for evaluation of oxidative stress in bovine semen, and other for RNA isolation from bovine snap-frozen and cryopreserved semen, to evaluate the influence of antioxidant supplementation on seminal parameters of those animals. Until this moment, no effect of antioxidant supplementation was observed in semen motility, morphology, concentration, nor in number of sperms in the ejaculate.

Keywords: Semen, cattle, small-RNAs, oxidative stress, epigenetics.

LISTA DE TABELAS

| | |
|---|----|
| Tabela 1: Idade e perímetro escrotal de touros Angus no decorrer do experimento..... | 40 |
| Tabela 2: Componentes e concentração de cada um deles no medicamento administrado aos touros no experimento, Multimin 90..... | 43 |
| Tabela 3: Peso e escore de condição corporal de touros Angus no decorrer do experimento..... | 41 |

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1: Gráficos de comparação do volume do ejaculado, concentração espermática e quantidade de espermatozoides médios, comparados entre a primeira (Dia 0) e a segunda (Dia 70) coleta. 51
- Figura 2: Gráfico de comparação da motilidade total e progressiva das amostras de espermatozoides fresco, bem como os descongelados, entre o grupo controle e tratado com antioxidante, na primeira (Dia 0) e segunda coleta (Dia 70). 52
- Figura 3: Gráfico de comparação da morfologia espermática quanto aos defeitos primários, secundários e células normais, entre o grupo controle e tratado com antioxidante, na primeira (Dia0) e na segunda coleta (Dia 70). 53
- Figura 4: Imagem de resultados obtidos na avaliação de qualidade de amostra de RNA espermático através de aparelho Nanodrop.....54

LISTA DE ABREVIATURAS

| | |
|----------|--|
| Dhe | Dihidroetídio |
| DNA | Ácido Desoxirribonucleico |
| DNMTs | DNA-metil-transferases |
| ESR | Ressonância de Rotação de Elétrons |
| FRAP | Habilidade Plasmática de Redução do Ferro |
| lncRNA | RNA longo não codificador |
| LH | Hormônio Luteinizante |
| MDA | Dialdeido Malônico |
| miRNA | Micro RNA |
| mitodRNA | RNA Codificado por Genoma Mitocondrial |
| NBT | Nitro Blue Terrazolium |
| sncRNA | pequenos RNA não codificadores |
| ORAC | Capacidade de Absorbância do Radical de Oxigênio |
| ORP | Potencial de Oxidação ou Redução |
| PCR | Proteína C Reativa |
| PIV | Velocimetria por Imagem de Partículas |
| PIVE | Produção in vitro de embriões |
| PV | Peso Vivo |
| RNA | Ácido Ribonucleico |
| ROS | Espécies Reativas de Oxigênio |
| siRNA | Pequenos RNAs de Interferência |

| | |
|-------|--|
| SO | Radicais Superóxido |
| SOD | Superóxido Dismutase |
| sRNA | Pequenos RNAs |
| stRNA | sRNA Temporal |
| TAC | Potencial Antioxidante Total |
| TEAC | Capacidade Antioxidante Trolox Equivalente |
| tsRNA | Pequeno RNA Derivado de RNA Transportador |

SUMÁRIO

| | |
|--|-----------|
| 1.INTRODUÇÃO | 12 |
| 2.MORFOLOGIA BÁSICA DO ESPERMATOZÓIDE | 14 |
| 2.1.Formação das espécies reativas ao oxigênio (ROS) | 15 |
| 2.2.Prejuízos causados pelo estresse oxidativo..... | 17 |
| 2.3.Antioxidantes | 19 |
| 2.4.Patologias relacionadas ao estresse oxidativo do aparelho reprodutor masculino | 26 |
| 3.MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO DO ESTRESSE OXIDATIVO | 28 |
| 3.1.Reações químicas relacionadas à oxidação celular..... | 28 |
| 3.2.Uso de sondas fluorescentes | 30 |
| 4.ALTERAÇÕES EPIGENÉTICAS NO SÊMEN | 32 |
| 4.1.Introdução às modificações epigenéticas..... | 33 |
| 4.2.Os sRNA espermáticos | 34 |
| 5.MATERIAL E MÉTODOS | 37 |
| 6.RESULTADOS E DISCUSSÃO | 40 |
| 7.CONCLUSÃO..... | 43 |
| 8.REFERÊNCIAS | 44 |

1. INTRODUÇÃO

A cidade de Reno, nos Estados Unidos da América, está situada a 42 quilômetros ao norte da capital do estado de Nevada, Carson City. Trata-se de uma região prevalentemente desértica onde o clima é bem definido, variando de muito frio no inverno (temperatura média de -10 °C) a muito quente no verão (com média de 30°C e máxima de 48°C).

No Estado de Nevada, a pecuária de corte é a maior indústria de produção agrícola, com produção total de US \$ 377 milhões sendo responsável por 11% dos empregos relacionados à produção agrícola de Nevada em 2015 (NDA, 2017). As operações com sistemas de cria são predominantes na indústria de gado na região oeste dos EUA, que inclui o estado de Nevada. Nessa região, é esperado um aumento expressivo do rebanho bovino nos próximos anos (HELMAR, 2016). Oportunidades para melhoria dos resultados da indústria de carne bovina, especialmente para as operações de sistemas de cria são altamente desejáveis e importantes, uma vez que têm o potencial de impactar a economia do Estado de Nevada e dos EUA.

A eficiência reprodutiva é o componente mais crítico da lucratividade das operações de sistemas de cria de gado de corte. A seleção guiada e o manejo adequado de touros são ações estratégicas para a geração de resultados desejáveis em rebanhos bovinos, como de maior produtividade e lucratividade (TAYLOR E FIELD, 1995; ARCHER et al., 1999). O uso de touros superiores, direcionando a transmissão de características desejáveis para seus descendentes, é um plano bem conhecido de gestão para melhorar a saúde, a fertilidade e a produtividade em rebanhos bovinos. O impacto de um único touro na determinação do perfil genético de um rebanho é central, dada a sua potencial capacidade de gerar muitas crias em um curto período (THUNDATHIL et al., 2016).

Em áreas de clima seco que são dominantes, por exemplo no estado de Nevada, Estados Unidos, a disponibilidade de forragem varia enormemente ao longo do ano e pode ser restrita até em algumas regiões (BAKER 1993, ADAMS et al., 1996). A deficiência de minerais (destacando-se selênio, zinco e cobre), que é característica do solo do estado de Nevada e estados vizinhos (HARTMAN, 1939; POOLE et al., 1994), compromete a qualidade das forrageiras e, conseqüentemente, a alimentação dos animais. Por este motivo, é comum se observar deficiência de micro minerais em bovinos mantidos em sistemas de pastagem em diversas regiões do mundo (BOHNERT et al., 2018). Os microminerais selênio, zinco e cobre contribuem em funções

celulares relacionadas ao combate a radicais livres, que trazem inúmeros prejuízos às células e ocasionam doenças nos mais variados sistemas, além dos grandes prejuízos no âmbito reprodutivo.

O sêmen produz, espontaneamente, uma variedade de espécies reativas de oxigênio (ROS) incluindo ânion superóxido, peróxido de hidrogênio e óxido nítrico (AITKEN et al., 2013). Essa produção, em pequenas quantidades, tem função importante na capacitação espermática. No entanto, o espermatozoide é uma célula especialmente vulnerável considerando sua deficiência de enzimas antioxidantes intracelulares e por possuírem alta quantidade de ácidos graxos polinsaturados em suas membranas celulares. O plasma seminal então é o responsável por contribuir com os agentes antioxidantes, prevenindo assim, os efeitos deletérios causados pelas ROS (GUATSI; PAPA, 2012). Contudo, um desequilíbrio na proporção entre as defesas antioxidantes e a produção de ROS induz ao estresse oxidativo.

O estresse oxidativo é conhecido por ser uma das etiologias mais comuns de problemas da reprodução masculina, afetando 30-80% dos homens inférteis (AGARWAL et al., 2014). Ele resulta em danos diretos ao espermatozoide como peroxidação lipídica, mudanças proteicas, fragmentação do DNA e queda na motilidade, o que compromete diretamente a capacidade de fertilização do espermatozoide. Além disso, a fertilização de um oócito por um espermatozoide com DNA danificado pode comprometer o desenvolvimento embrionário ou, até mesmo levar a erros na replicação, transcrição ou tradução do genoma, contribuindo para o desenvolvimento de mutações nas gerações seguintes, sem mencionar os efeitos sistêmicos como a alteração dos níveis de testosterona e hormônio luteinizante (LH) (SIMÕES et al 2013).

Falhas no desenvolvimento embrionário e altas taxas de fragmentação nuclear blastocística, causada pelo estresse oxidativo, são problemas em sistemas de produção *in vitro* de embriões bovinos no Brasil (CASTRO et al., 2016). Nesse caso a suplementação de touros com antioxidantes é recomendada, visando o aumento da fertilidade. Porém, seus resultados são variáveis e, por isso, ainda requerem maior realização de trabalhos experimentais.

Recentemente, estudos em animais de laboratório verificaram que o uso de antioxidantes em camundongos machos reduz os efeitos deletérios da transmissão de doenças metabólicas às crias advindas de pais subnutridos (MCPHERSON et al., 2016). A propensão a alterações metabólicas nas crias é transmitida por um grupo de pequenos RNAs não codificantes (sncRNAs) que são encontrados no sêmen (CHEN et al., 2016). Os sncRNAs são moléculas compostas por,

em média, 20 a 40 nucleotídeos, capazes de regular a expressão de genes e, transmitir essas modificações para a progênie e, ainda, gerações mais distantes. Existe uma hipótese de que a suplementação com antioxidantes poderia alterar o perfil de sncRNAs no sêmen. Caso haja influência positiva da suplementação com antioxidantes nos miRNAs, características indesejáveis ligadas a esse mecanismo de transmissão genética podem ser evitadas, revolucionando então a seleção de touros para melhoramento.

Objetivando buscar alternativas na prevenção dos efeitos deletérios e da possível infertilidade causados pelo estresse oxidativo, desenvolveu-se um estudo preliminar para se mensurarem os efeitos de uma dieta antioxidante em parâmetros seminais de touros. Além disso, este trabalho também teve como objetivo a extração de RNA de sêmen de touros suplementados com antioxidantes, para uma possível exploração futura de seus efeitos no perfil de sncRNAs nos espermatozoides.

2. MORFOLOGIA BÁSICA DO ESPERMATOZOIDE

Os espermatozoides são células alongadas, móveis e altamente especializadas. São formados nos túbulos seminíferos testiculares, a partir de células tronco denominadas espermatogônias. Passam por divisões mitóticas dando origem a duas células diploides, chamadas espermatócitos primários e em seguida por duas divisões meióticas, gerando quatro células haploides, as espermatídes (este processo é denominado espermatocitogênese). A fase seguinte é a espermiogênese, onde acontece a diferenciação das estruturas dos espermatozoides. Estes são formados por uma cabeça, normalmente elipsoide, onde está contido o núcleo, e portanto, a maior parte do material genético da célula, que é conectada pelo colo a uma cauda com estrutura mecanicamente preparada para conceder a motilidade à essa célula (HAFEZ; HAFEZ, 2004).

A cabeça tem formato variável de acordo com a espécie, é composta basicamente pelo núcleo contendo uma cromatina altamente condensada, por um complexo de ácido desoxirribonucleico (DNA) e protaminas. As protaminas são proteínas ricas em arginina, que substituem as histonas na espermatogênese. Durante o trânsito epididimário, formam ligações dissulfeto que conferem a estabilização e condensação do DNA nos espermatozoides, de forma

que seu volume seja um sexto do núcleo de uma célula somática. Essa é uma medida compensatória à baixa capacidade de regeneração do DNA espermático, já que a compactação torna essas células mais resistentes à ataques exógenos (LEWIS; AITKEN, 2005).

A outra estrutura contida na cabeça do gameta masculino é o acrossomo, originado de fusões do complexo de Golgi. O acrossomo é uma fina cobertura com dupla camada de membranas e está intimamente ligado ao núcleo, separando-se do mesmo por um pequeno espaço subacrossomal. Contêm, em seu interior, enzimas hidrolíticas necessárias ao processo de fertilização, tais como a acrosina e a hialuronidase (HAFEZ; HAFEZ, 2004).

A cauda, por sua vez, é dividida em diferentes segmentos com funções específicas. O colo é uma peça de conexão à cabeça. A peça intermediária é constituída, em sua porção central, por nove pares de microtúbulos dispostos radialmente em relação a dois túbulos centrais (axonema), que se prolongam por todo o comprimento da cauda. Nesse segmento da cauda, o axonema ainda é circundado por nove fibras densas recobertas periféricamente por mitocôndrias. Essas organelas serão as responsáveis por gerar energia para a movimentação do flagelo. A peça principal é composta pelo axonema também associado às fibras densas e recoberto por uma camada fibrosa que estabiliza essa estrutura. A peça terminal contém apenas o axonema envolvido pela membrana plasmática.

A membrana plasmática é o componente mais externo e envolve todo o espermatozoide. Trata-se de uma estrutura fina, flexível e permeável a solutos polares. Constituída de uma bicamada lipídica (predominantemente formada por fosfolipídios), glicocálice e proteínas, integrais ou periféricas, que participam ativamente do transporte de substâncias transmembrana. O modelo mosaico da membrana é fluido, por não ser formado a partir de ligações covalentes. Os tipos de fosfolipídios da membrana variam de acordo com a espécie, mas nos bovinos o fosfoglicerídio plasmalogencolina é o principal. Qualquer mudança na composição dos ácidos graxos altera a estrutura da membrana e interfere na sua função como um todo (BORGES et al., 2011).

2.1. Formação das espécies reativas de oxigênio (ROS)

As ROS são intermediários químicos reativos, oriundos do metabolismo do oxigênio (MAIA; BICUDO, 2009), incluindo aquelas com um ou mais elétrons livres tais como íon de hidroxila e peroxila ou superóxido, assim como os derivados de oxigênio, tais como ozônio, peróxido lipídico e peróxido de hidrogênio dentre outros. As ROS podem ser formadas por uma fonte de energia externa, interna ou a partir de reações catalisadas por metais, principalmente o ferro e o cobre, até mesmo enzimas próprias do metabolismo da célula. Essa energia induz a remoção de um elétron do orbital dessas moléculas formando um átomo com um elétron extra. Devido a sua instabilidade e reatividade, essas substâncias conseguem remover elétrons de estruturas adjacentes, tornando-as radicais livres (MAIA; BICUDO, 2009).

O oxigênio, em condições normais, sofre redução tetravalente, com adição de quatro elétrons, resultando na formação de uma molécula de água e intermediários reativos. Os radicais superóxido (SO) representam um desses intermediários e são os principais geradores de espécies reativas, produzido geralmente em quantidades substanciais pela própria respiração celular. Trata-se de uma redução monovalente do oxigênio acrescido de um único elétron catalisada pela enzima xantina oxidase. No entanto, o organismo também dispõe de ferramentas enzimáticas que eliminam essa substância, como a superóxido dismutase e glutathione peroxidase, que funcionam como um mecanismo de proteção individual contra a toxicidade desses radicais livres (MAIA; BICUDO, 2009).

No espermatozoide, acredita-se que existem duas fontes principais de superóxido. Uma delas é a oxidoredutase dependente de NADH, localizada na membrana mitocondrial. A outra é a NADPH oxidase encontrada na membrana plasmática. Embora seja uma molécula relativamente não reativa, na presença de um átomo de hidrogênio o SO é transformado em peróxido de hidrogênio (H_2O_2) pela superóxido dismutase. O H_2O_2 é um metabólito do oxigênio extremamente deletério, de vida longa e com capacidade de atravessar membranas biológicas. No entanto, o peróxido de hidrogênio pode ser catalisado, por enzimas antioxidantes como a glutathione peroxidase, em água e oxigênio (GOSALVEZ; TVRDA; AGARWAL, 2017).

O peróxido de hidrogênio pode ainda, na presença de oxigênio, sofrer uma reação catalisada por íons de metais, denominada reação de Fenton. Consiste na redução do Ferro (Fe^{3+})

para íon ferroso (Fe^{2+}) seguida da conversão de H_2O_2 em radical hidroxila ($\text{OH}\bullet$), considerado o mais reativo em sistemas biológicos (MAIA; BICUDO, 2009).

No ejaculado, as principais fontes de ROS são os espermatozoides anormais, especialmente aqueles que possuem citoplasma remanescente (as gotas citoplasmáticas) e os leucócitos que podem estar presentes. Outros fatores ambientais tais como radiação, poluição e até medicamentos podem elevar os níveis de ROS no espermatozoide. Também, no caso do sêmen criopreservado, devido a manipulação, lavagem e diluição, tendem a potencializar o aparecimento de ROS, principalmente porque esses procedimentos diminuem as defesas antioxidantes e expõe a célula espermática a maiores quantidades de oxigênio (MAIA; BICUDO, 2009).

Baixas concentrações de H_2O_2 e SO , no entanto, são necessárias para as cascatas de fosforilação de algumas enzimas relacionadas com a capacitação espermática, hiperativação da motilidade, reação acrossomal e fusão dos gametas. Por outro lado, o excesso desses elementos causa baixa motilidade, capacitação prematura, reação acrossomal e morfologia anormal do espermatozoide, além de degradação de proteínas importantes para o metabolismo da célula, peroxidação lipídica, danos ao DNA, apoptose e prejuízo à embriogênese (GOSALVEZ; TVRDA; AGARWAL, 2017).

2.2. Prejuízos causados pelo estresse oxidativo

A mitocôndria exerce uma função imprescindível para a célula que é a geração de energia em forma de ATP. Essa produção depende de um alto potencial de membrana, obtido a partir do transporte de elétrons para fosforilação oxidativa. No entanto, essa organela é um importante local de formação de ROS, que resulta em uma interrupção no transporte de elétrons, levando a prejuízos na geração de energia e conseqüentemente, à motilidade do espermatozoide. Guthrie e Welch (2012), no entanto, observaram que a indução da formação de ROS através do peróxido de hidrogênio não interrompeu as funções mitocondriais, mas teve efeito negativo na motilidade do espermatozoide. Esses autores verificaram que o processo interferiu no funcionamento do axonema que, por sua vez, interrompeu a utilização do ATP ou afetou o mecanismo contrátil.

Outro dano induzido pelo estresse oxidativo é a peroxidação lipídica. Trata-se de um processo de oxidação que modifica lipídios e ácidos graxos, especialmente os poli-insaturados, na

membrana plasmática de diversas células, incluindo os gametas feminino e masculino (SINHA; GUPTA, 2018). A oxidação é uma reação em cadeia, dividida em etapas. A primeira delas, fase de iniciação, é causada pelo ataque de ROS a um lipídio, progredindo para o sequestro de um átomo de hidrogênio e um grupo metileno. Com isso obtêm-se radicais lipídicos e peroxila que se propagam até a autodestruição (MAIA; BICUDO, 2009). Esses radicais promovem a alteração da estrutura e permeabilidade da membrana, levando a modificação do transporte de íons, perda de conteúdo, formação de produtos citotóxicos e, conseqüentemente, morte celular (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1999).

A produção de ROS ocorre na porção hidrofóbica da membrana plasmática, onde se combinam com o oxigênio e formam o radical peroxil, que ataca as proteínas e oxida os ácidos graxos poli-insaturados mais próximos. Essa oxidação leva à formação de hidroperóxidos, que migram para a superfície da membrana, devido a sua estrutura hidrofílica, para interagir com os fluidos extracelulares, provocando a ruptura da membrana e a conseqüente perda de suas características estruturais, sua permeabilidade e sua fluidez (BORGES et al., 2011).

A cromatina do espermatozoide é altamente condensada, principalmente devido ao aumento nas ligações dissulfeto causado pela substituição de histonas por protaminas. Por isso, o DNA dessas células é, em condições normais, altamente resistentes à desnaturação. No entanto, aqueles indivíduos que, genética ou ambientalmente, adquiriram algum tipo de defeito na cromatina, tendem a maior instabilidade e sensibilidade à desnaturação do DNA causada pelo estresse oxidativo (LOPES et al., 1998). Um exemplo disso é a má formação de pontes dissulfeto devido a oxidação inadequada de tióis durante o trânsito epididimário. A susceptibilidade do espermatozoide a esses danos ao DNA começa, geralmente, da regulação negativa do sistema de reparo do DNA, no fim da espermatogênese (LEWIS; AITKEN, 2005).

O mecanismo de fragmentação do material genético conduzido pelo estresse oxidativo ainda não é totalmente elucidado. Acredita-se que as ROS têm a capacidade, através de metais de transição como o ferro, de iniciar reações de abstração de átomos de hidrogênio da unidade de ribose e, também, induzir a formação de adutos de base (um segmento de DNA ligado a um produto químico causador de câncer), o que desestabiliza a estrutura do DNA e leva à fragmentação na cadeia. O principal aduto de base formado é o 8-hidroxi-20-desoxiguanosina (8OHdG), presente em elevados níveis nos ejaculados de pacientes humanos subférteis. Esses achados supramencionados levam à conclusão de que o estresse oxidativo é um dos principais

contribuintes para danos no DNA na linhagem germinativa masculina em nível nuclear e, mais ainda, a mitocondrial (AITKEN; DE IULIIS, 2010).

Comprovou-se que espermatozoides danificados tendem não só a perder a capacidade de fertilização como interferir no desenvolvimento genético e epigenético da progênie, sendo o estresse oxidativo um contribuinte recorrente para tais danos. Parte disso se deve à necessidade da fluidez de membrana plasmática para exocitose acrossomal e fusão com o oolema. Essa fluidez é perdida com a alteração nas propriedades físicas da membrana plasmática no processo de peroxidação lipídica ocasionada pelo excesso de ROS. Foi observado que embriões fertilizados com espermatozoides submetidos ao estresse oxidativo tendem a apresentar baixos índices de clivagem (AITKEN; BAKER, 2006). O comprometimento do material genético com a fragmentação do DNA, dependendo da região afetada, altera o desenvolvimento embrionário pré-implantação, induz a apoptose embrionária e aumenta as taxas de aborto e disfunção genética da progênie (AITKEN; BAKER, 2006).

Estudos mostram que não há diferença na formação de blastocistos entre grupos submetidos ao estresse oxidativo e o grupo controle (DENNERY, 2010). Embriões que tiveram o seu desenvolvimento *in vitro* interrompido, geralmente tem níveis elevados de ROS e PC66 SHC, uma proteína adaptada à resposta à apoptose induzida pelo estresse oxidativo. Isto se deve à manipulação dos gametas, masculino e feminino, no momento da fertilização *in vitro*, a qual aumenta a exposição dos mesmos à maiores quantidades de oxigênio. Aparentemente, independente da susceptibilidade ao estresse oxidativo, o oócito e até mesmo o próprio espermatozoide possuem mecanismos de reversão de danos causados por fatores diversos. Dessa forma, embriões que conseguirem sobreviver à fase de bloqueio embrionário serão capazes de alcançar o estágio de blastocisto.

Acredita-se que a apoptose de blastocistos tenha duas causas principais. A primeira delas é a fragmentação do DNA, já que é um dano que, dependendo do grau, pode não afetar a fertilização, justificando a fase em que ocorre a morte celular. A outra, que não pode ser descartada, é a peroxidação lipídica, que gera um acúmulo de hidroperóxido lipídico na membrana plasmática. O hidroperóxido, mais tarde, se decompõe em dialdeído malônico (MDA), também conhecido como malonaldeído, uma substância extremamente mutagênica, suspeita de participar do processo de apoptose celular. A presença de células mortas pode danificar a homeostase embrionária levando a morte do blastocisto (SIMÕES et al., 2013).

2.3. Antioxidantes

A oxidação é uma reação de transferência de elétrons para um agente oxidante que pode ou não gerar radicais livres. Esses radicais livres iniciam uma reação em cadeia extremamente prejudicial às células de uma maneira geral. Os antioxidantes são quaisquer substâncias capazes de inibir ou atrasar a oxidação, desempenhando assim, a função de evitar danos causados pelos radicais livres aos componentes celulares (YOUNG; WOODSIDE, 2001). Podem ser divididos em enzimáticos, antioxidantes quebradores de cadeia e proteínas de ligação a metais de transição (YOUNG; WOODSIDE, 2001).

Para proteger-se dos efeitos deletérios da formação das ROS, o espermatozoide conta com um sistema de defesa antioxidante composto pela tríade enzimática: a superóxido dismutase (SOD), a catalase, e a glutatona em suas duas formas, peroxidase e redutase, além dos compostos não enzimáticos, como ácido ascórbico (Vitamina C) e o α -tocoferol (Vitamina E). Entretanto, a principal defesa do sêmen contra o estresse oxidativo é o plasma seminal. Nele encontram-se eficientes redutores de radicais livres como o ácido ascórbico, ácido úrico, albumina, tióis, taurina, hipotaurina e vitamina E, além das três enzimas, também contidas no espermatozoide, catalase, SOD, glutatona (MAIA; BICUDO, 2009).

Entre as principais enzimas antioxidantes conhecidas, a catalase se destaca por atuar na conversão do peróxido de hidrogênio em água e oxigênio. Essa enzima pode ser encontrada dentro de peroxissomos (onde também se encontram as enzimas produtoras do peróxido de hidrogênio), nas mitocôndrias, no retículo endoplasmático nos lisossomos. No humano e nos ratos ela pode ser encontrada nos espermatozoides, porém, nas outras espécies ela se encontra principalmente no plasma seminal e é produzida na próstata. A catalase é constituída de quatro subunidades proteicas, um grupo heme e uma molécula de NADPH. Ela também ativa a capacitação espermática através de um mecanismo complexo que faz uso do peróxido de hidrogênio e é induzido por óxido nítrico (WALCZAK–JEDRZEJOWSKA; WOLSKI; SLOWIKOWSKA–HILCZER, 2013).

A glutatona, por outro lado, é um tripeptídeo que se apresenta em forma oxidada ou reduzida. A forma oxidada, conhecida como glutatona peroxidase, é encontrada em seu aspecto plasmático principalmente no rim, e na versão intracelular mais comumente na mitocôndria e no

citosol das células hepáticas. No espermatozoide é encontrada principalmente na matriz mitocondrial mas também pode ser encontrada na cabeça por possuir funções na condensação da cromatina e na proteção do DNA contra a fragmentação causada pelo estresse oxidativo. Também é encontrada em quantidades substanciais no plasma seminal humano, levando a concluir que se trata de uma enzima também originária da próstata ou de outras glândulas sexuais acessórias. Esta enzima catalisa a redução de peróxido de hidrogênio e outros peróxidos orgânicos, incluindo aqueles derivados da peroxidação lipídica da membrana plasmática (WALCZAK–JEDRZEJOWSKA; WOLSKI; SLOWIKOWSKA–HILCZER, 2013).

A glutationa é dependente de selênio, portanto, na ausência deste elemento sua atividade é deficiente, podendo levar a perda das células germinativas do epitélio seminífero. A suplementação com selênio, por sua vez, pode melhorar o perfil histopatológico testicular e diminuir a peroxidação lipídica nas membranas (AITKEN & SHAUN, 2008). Já a glutationa redutase é responsável pela regeneração da glutationa na presença de NADPH, impedindo a paralisação do ciclo metabólico dessa substância. Esta enzima participa da conjugação a centros eletrofílicos, através do grupo sulfidríla, em substratos que estão em preparação para excreção pela célula. Essa função é de suma importância no metabolismo de xenobióticos e principalmente na detoxificação dos lipídios peroxidados (AITKEN & SHAUN, 2008)

A superóxido dismutase catalisa a transformação do superóxido em peróxido de hidrogênio, prevenindo sua participação na formação dos radicais hidroxil. Esse peróxido de hidrogênio deve então, ser removido pela catalase ou pela glutationa peroxidase. A superóxido dismutase se apresenta em três diferentes formas. A primeira delas é constituída por duas subunidades proteicas contendo cada uma um átomo de cobre e de zinco ativos. É encontrada no citoplasma de todas as células e exerce função de proteção do DNA contra os danos causados pelo estresse oxidativo, prevenindo o vazamento de Citocromo C (substância indutora de apoptose) das mitocôndrias (AITKEN; SHAUN 2008).

Já a manganês superóxido dismutase, encontrada na mitocôndria, é composta por quatro subunidades proteicas, responsável por controlar a formação de superóxido na peça intermediária. Nos testículos, o mRNA para a síntese desta enzima está presente majoritariamente, em comparação com os das outras enzimas antioxidantes. Esses mRNAs são regulados em termos de desenvolvimento celular, apresentando altos níveis de expressão em células germinativas pouco diferenciadas.

A última das enzimas antioxidantes descrita é a superóxido dismutase extracelular, sintetizada pelos fibroblastos, células endoteliais e, no caso do testículo, nas células de Sertoli e nas germinativas, através da ação de citocinas como a interleucina-1 α . É expressa na superfície da célula e também contém cobre e zinco.

Os antioxidantes quebradores de corrente são moléculas que podem receber ou doar elétrons para um radical livre com a formação de subprodutos estáveis. A vitamina C (ácido ascórbico), por exemplo, elimina os radicais livres do compartimento aquoso, principalmente o superóxido, peróxido de hidrogênio, radical de hidroxila e o ácido hipocloroso, e é cofator de várias enzimas que catalisam as reações de hidroxilação.

Inicialmente o ácido ascórbico sofre uma redução de dois elétrons, se transformando em um radical semideidroascorbil que posteriormente se tornará desidroascorbato, uma molécula instável que se hidrolisa em ácido dicetogulônico e depois em ácido oxálico. Essa reação é catalisada por uma desidroascorbato redutase, presente em abundância nos testículos. Sua atuação principal é na proteção do DNA contra os efeitos deletérios das ROS, mas também contribui em parte na espermatogênese, de forma que participa da redução do α -tocoferol. Uma deficiência dessa vitamina no plasma seminal pode levar à diminuição da motilidade do espermatozoide, defeitos físicos, fragmentação do material genético e deficiências na espermatogênese e produção de testosterona. A suplementação de ácido ascórbico estimula a produção de espermatozoides e testosterona e evita o estresse oxidativo testicular induzido pela exposição a pró-oxidantes, chumbo, cromo ou aflatoxina.

O grupo tiol ligado a proteínas também representa um importante mecanismo de defesa presente no plasma sanguíneo. Seu principal componente é a glutatona, que tem a capacidade de reconstruir os grupos tiol nas proteínas que participaram da eliminação desses radicais. Dessa forma, o grupo tiol previne a formação de oxigênio livre e protege a membrana plasmática, e sua deficiência causa prejuízos a estabilidade da membrana da peça intermediária principalmente, levando a distúrbios de motilidade. A glutatona tem sido muito usada para suplementação nos casos de inflamação no sistema urogenital, apresentando melhoras nos parâmetros seminais. O fornecimento de ácido pantotênico auxilia no aumento dos níveis séricos de glutatona (AITKEN & SHAUN, 2008).

Outro tiol significativo no sistema antioxidante é o aminoácido cisteína. A cisteína é caracterizada por sua capacidade de transpor membranas e eliminar radicais livres protegendo

assim a membrana plasmática, exercendo, portanto, efeito crioprotetor. Este efeito se dá principalmente nas mitocôndrias, preservando a motilidade dos espermatozoides pós-descongelamento e, ainda melhorando as taxas de fertilização e maturação do oócito *in vitro*. A cisteína é também precursora da glutatona intracelular, o que quer dizer que sua deficiência traz prejuízos relacionados a peça intermediária da célula espermática. O inositol, por sua vez, possui capacidade antioxidante especialmente porque promove um aumento da atividade da glutatona e uma melhora na integridade das membranas e na fisiologia do espermatozoide. É extremamente eficiente como crioprotetor, beneficiando a qualidade do sêmen congelado (BANSAL; BILASPURI, 2011).

Grupos sulfidrilas neutralizam as ROS doando um elétron e formando um radical proteico, devido a sua ligação com as proteínas plasmáticas. A albumina também, se liga aos átomos de cobre impedindo a peroxidação lipídica dependente deste elemento, e elimina o produto fagocítico do ácido hipocloroso. A Carnitina por sua vez, removem o excesso de Acetil-CoA prevenindo a formação de ROS na mitocôndria.

Os quebradores de corrente de fase lipídica são os principais responsáveis por evitar a peroxidação lipídica, dano comum a espermatozoides sob estresse oxidativo. O principal deles é a vitamina E, que se apresenta de oito formas estruturalmente diferentes, todas elas lipossolúveis. Está presente nas células de Sertoli, nos espermatócitos e nas espermátides. De uma forma geral, o α -tocoferol (vitamina E) interage mais rapidamente com os radicais de peróxido do que os lipídios da membrana, evitando possíveis danos à mesma. A cadeia lateral do tocoferol mistura-se com os ácidos graxos de cadeia longa da membrana celular, e removem os radicais peroxil doando um átomo de hidrogênio do seu grupo hidroxila, antes que eles oxidem os ácidos graxos adjacentes. A suplementação de α -tocoferol na dieta melhora a motilidade e a capacidade de fertilização dos espermatozoides e diminui a formação de dialdeído malônico, composto derivado da peroxidação lipídica. O α -tocoferol diminui também a formação de ROS causada principalmente pela exposição ao ozônio, sobrecarga de ferro, exercício excessivo, aflatoxina ou formaldeído no sêmen. Atua sinergicamente a vitamina C.

Os carotenoides são compostos lipossolúveis presentes em uma variedade de vegetais. O β -caroteno contribui com a metabolização do oxigênio e aprisiona radical de peróxido. São responsáveis também por regular a proliferação das células epiteliais, participam indiretamente da espermatogênese e da proteção à membrana celular. Essa classe de carotenoides é ainda

percussora do retinol, principal componente da vitamina A, outro agente importante e independente dos níveis de oxigênio.

O selênio é um micronutriente essencial ao trato reprodutivo masculino, participando no desenvolvimento testicular, espermatogênese e motilidade espermática. A deficiência desse nutriente pode levar a patologias como a degeneração testicular, atrofia de túbulos seminíferos e deficiências na maturação epididimária, como também ao aumento na proporção de defeitos maiores e menores nos espermatozoides, além de baixa motilidade(YOUNG, I.; WOODSIDE, J. 2001).

O zinco é um importante componente de diversas enzimas envolvidas na produção de ácidos nucleicos e de proteínas. Dentre elas estão as principais enzimas antioxidantes como a superóxido dismutase (WALCZAK–JEDRZEJOWSKA; WOLSKI; SLOWIKOWSKA–HILCZER, 2013). Também atua na defesa contra a peroxidação lipídica deslocando metais de transição como o ferro e cobre, impedindo que eles desencadeiem a formação de ROS. A sua deficiência pode levar ao aumento dos danos a membrana plasmática advindos do estresse oxidativo e uma significativa queda no potencial antioxidante do plasma seminal.

A melatonina também é considerada um importante antioxidante devido a sua capacidade de se difundir em ambientes lipídicos ou aquosos. Consegue captar até dois elétrons por vez, o que potencializa sua capacidade de eliminação dos radicais livres. Pacientes humanos com problemas reprodutivos como azoospermia, leucocitospermia ou varicocele apresentam baixos níveis de melatonina (AITKEN; ROMAN, 2008), ao passo que sua suplementação levou a menores índices de estresse oxidativo. Existe também nos testículos uma forma do citocromo C, que desempenha papel importante no metabolismo do peróxido de hidrogênio e também participa dos processos de apoptose da célula, contribuindo para eliminação das células da linhagem germinativa danificadas (AITKEN; ROMAN, 2008).

A taurina é um aminoácido muito utilizado como diluente para a criopreservação do sêmen por tornar o meio extracelular hipertônico e assim provocar uma reação osmótica de desidratação do espermatozoide, prevenindo a formação de cristais que possam vir a romper a célula durante o congelamento. Também interage com os fosfolipídios de membrana e aumenta a atividade da catalase, que irá combater a formação do superóxido (BANSAL; BILASPURI, 2011).

Durante a criopreservação do sêmen, vários processos mecânicos aos quais os espermatozoides são submetidos, como as centrifugações, aumentam sua exposição ao oxigênio e conseqüentemente à susceptibilidade a formação de ROS. As defesas antioxidantes do espermatozoide encontram-se principalmente no citoplasma, que é quase totalmente perdido no processo de maturação, no trânsito epididimário, e que também sofre modificações durante o processo de congelamento (BUCAK et al., 2010). Técnicas como a migração e sedimentação dos espermatozoides, centrifugação por gradiente de densidade e filtração em lã de vidro, tendem a diminuir a manipulação e o número de leucócitos do sêmen, o que reduz significativamente a incidência do estresse oxidativo.

Uma alternativa para contornar a formação de ROS em excesso durante o processo de criopreservação é a adição de antioxidantes aos diluentes utilizados no processo. Para os bovinos, principalmente a taurina e a cisteína e, no caso dos equinos, a glutatona redutase e o ácido ascórbico, têm sido efetivos na melhora da qualidade seminal pós-descongelamento. De acordo com o experimento realizado por Bucak et al. (2010), a carnitina e o inositol podem influenciar positivamente a integridade do axonema e das mitocôndrias, provendo aumento na motilidade das células descongeladas. Também a vitamina E aumenta a motilidade e a viabilidade espermática quando adicionada aos diluentes. Porém, a vitamina E não têm a capacidade de impedir a peroxidação lipídica, apesar de prevenir a fragmentação do DNA.

Na produção *in vitro* de embriões (PIVE), o uso de meios com antioxidantes melhora o desenvolvimento embrionário pré e pós-implantação, aumenta a eclosão de blastocistos e reduz as taxas de apoptose. De acordo com Agarwal et al. (2005), o uso de meios suplementados com enzimas como a superóxido dismutase e a catalase, na PIVE, contribuiu para maiores taxas de recuperação de parâmetros espermáticos pós-descongelamento, conseqüentemente melhores taxas de fertilização, além de ter prevenido a peroxidação lipídica causada pelo estresse oxidativo, bem comum nesse tipo de procedimento.

Alguns estudos comprovaram também que a administração de antioxidantes orais, como a cisteína, tendem a melhorar a qualidade do sêmen de homens inférteis. Nos Estados Unidos foi aprovada a suplementação dietética em homens com déficits de fertilidade com pentoxifilina, um derivado de metilxantina que participa na inibição da fosfodiesterase. Efeitos positivos na motilidade espermática foram observados, assim como a diminuição da formação de superóxido e melhora nas reações acrossômicas. Em experimento realizado por Ferreira (2009), em homens,

concluiu-se que a suplementação com vitamina E, pentoxifilina e L-carnitina melhorou os parâmetros seminais de uma maneira geral, não influenciando apenas no volume do ejaculado. No entanto, pouco se sabe ainda sobre a correlação entre a ingestão de agentes antioxidantes e o estresse oxidativo no sêmen (AGARWAL et al., 2014).

2.4. Patologias relacionadas ao estresse oxidativo do aparelho reprodutor masculino

O aumento da temperatura testicular causada pelo criptorquidismo, bem como da temperatura ambiente, influencia significativamente a formação de ROS e ocasiona um déficit na atividade das principais enzimas antioxidantes, especialmente a catalase e a superóxido dismutase. Isso se deve ao aumento da formação de peróxido de hidrogênio causado pela exposição das células germinativas a altas temperaturas, aumentando conseqüentemente as vias de apoptose e os níveis de danos ao DNA espermático (AITKEN; ROMAN, 2008).

A torção testicular por sua vez, quando caracteriza um quadro de isquemia prolongado, aumenta a formação de peróxido de hidrogênio e óxido nítrico, levando ao estresse oxidativo. Isso se deve ao mecanismo de conversão da enzima xantina desidrogenase em xantina oxidase pela oxidação do grupo SH ocasionada pela isquemia, o que resulta na peroxidação lipídica das membranas espermáticas, baixa atividade das enzimas antioxidantes, principalmente a glutathione peroxidase, além do acúmulo de isoprostano, e aumento das vias de apoptose mediadas pelas mitocôndrias nas células germinativas, interrompendo assim a espermatogênese. A xantina oxidase pode no entanto ser inibida pelo alupurinol, e os efeitos deletérios causados pelo estresse oxidativo podem ser minimizados pela administração de antioxidantes exógenos tais como o selênio ou a L-carnitina (AITKEN; SHAUN 2008).

O hipertireoidismo também ocasiona o estresse oxidativo devido ao aumento da formação de peróxido de hidrogênio e geração de carbono. Aparentemente trata-se de um reflexo do aumento da atividade mitocondrial dependente de tiroxina e, conseqüentemente, um desbalanço na corrente de transporte de elétrons da mesma. O resultado é um aumento progressivo de peroxidação lipídica, de glutathione peroxidase e outras enzimas antioxidantes. Em decorrência disso um sêmen de baixa motilidade e qualidade (AITKEN; ROMAN, 2008).

O estresse oxidativo relacionado a indivíduos diabéticos apresenta-se principalmente em forma de danos ao DNA das células da linhagem germinativa testicular, culminando com

elevados índices de perda embrionária. A formação de elevadas quantidades de ROS ocasionada por diabetógenos como a estreptozotocina, induz também a peroxidação lipídica e a expressão da proteína carbonil no testículo. Esses efeitos podem, no entanto, serem amenizados pela administração de ácido ascórbico, taurina ou melatonina (AITKEN; ROMAN, 2008).

Processos inflamatórios levam a formação de mediadores como a interleucina 1 β que induzem a ativação da óxido nítrico sintetase e da cicloxigenase 2, ambas enzimas produtoras de potenciais radicais livres. As células de Leydig são extremamente sensíveis ao estresse oxidativo, sofrendo peroxidação lipídica rapidamente e conseqüentemente, uma redução drástica na esteroidogênese (AGARWAL; GUPTASHARMA, 2005). O excesso de exercício físico, também pode levar ao estresse oxidativo, caracterizado pela peroxidação lipídica e diminuição da atividade das enzimas antioxidantes, provocando efeito inibitório na esteroidogênese e na diferenciação das células germinativas testiculares (AGARWAL et al., 2014).

O desbalanço hormonal, principalmente relacionado aos hormônios reprodutivos como a testosterona, leva a uma redução da atividade das enzimas antioxidantes glutathione peroxidase, superóxido desmutase e catalase. Tratamentos com alguns tipos de medicamentos podem interferir negativamente nesse balanço hormonal, tais como os fármacos do grupo das ciclofosfamidas ou do sulfonato dimetano e esteroides exógenos como o estrógeno e andrógenos. Como resultado, além dos prejuízos à atividade enzimática, há um aumento progressivo na peroxidação lipídica, especialmente nas células de Leydig, podendo chegar até a interrupção da espermatogênese devido a apoptose das células germinativas (AITKEN; DE IULIIS, 2010).

Também um desbalanço endógeno causado por alterações em estruturas componentes do sistema de produção e armazenamento hormonal, como por exemplo o hipo ou hipergonadotrofismo, induz a um aumento da produção de ROS no espermatozoide e, conseqüentemente, leva a um quadro característico de estresse oxidativo (AITKEN; ROMAN, 2008).

Nas células de Sertoli, o estresse oxidativo pode ser induzido pelo excesso de ácido trans-retinoico, cofator indispensável para espermatogênese, o que explica a degeneração testicular causada por excesso de vitamina A ou β -caroteno na alimentação. Deficiência de ácido ascórbico na dieta também tem influência no aumento da fragmentação do DNA resultante do estresse oxidativo. Alguns metais como o cromo e o ferro tem efeito tóxico ao testículo, contribuindo para a formação de ROS (AITKEN; ROMAN, 2008), bem como metais pesados, como o cádmio, o

urânio e o arsênio. Alguns medicamentos frequentemente usados também podem exercer influência na geração de ROS, principalmente as ciclofosfamidas, estreptomicina e o ozônio, que vêm sendo amplamente utilizados em tratamentos fisioterápicos, especialmente em equinos. A radiação emitida pelos aparelhos de radiografia, contato direto com formaldeído e derivados ou toxinas, como a aflatoxina, também pode ter esse efeito (AITKEN; ROMAN, 2008).

2.5. Nutrição e estresse oxidativo em espermatozoides

Em um trabalho realizado por MCPerson et al., (2016), com a restrição dietética em camundongos e conseqüentemente, perda de peso do animal, aumentaram-se as taxas de estresse oxidativo nos espermatozoides, com danos consideráveis ao material genético e severa redução da metilação do DNA. As progênies desses animais apresentaram peso reduzido ao nascer e crescimento retardado, um aumento das células adiposas e dislipidemia, predispondo então a obesidade. A suplementação de animais subnutridos com antioxidantes na dieta (licopeno, vitamina E, ácido fólico, zinco e extrato de chá verde), no entanto, normalizou as alterações causadas pelo estresse oxidativo nos espermatozoides e preveniu o acúmulo de adipócitos e a dislipidemia nas crias.

3. MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO DO ESTRESSE OXIDATIVO

Devido aos prejuízos causados pelo estresse oxidativo, surge a necessidade de métodos de detecção dos mesmos, não só para diagnósticos de infertilidade, mas para pesquisas em torno de tratamentos e prevenções que possam, inclusive, impactar a economia difundindo as técnicas reprodutivas laboratoriais. Existem métodos diretos e indiretos para mensurar o estresse oxidativo. Os diretos são aqueles que avaliam a presença de ROS, ao nitrogênio ou aos radicais livres.

As técnicas indiretas são aquelas que detectam a presença de produtos das reações causadas pelo estresse oxidativo como a forma da NADPH-oxidase ou a forma reduzida da oxidoredutase dependente de NAD na mitocôndria. Até mesmo a identificação da peroxidação lipídica, elementos secundários a produção de ROS ou os níveis de antioxidantes presentes, são

também considerados métodos indiretos de diagnóstico do estresse oxidativo (AGARWAL et al., 2014).

3.1. Reações químicas relacionadas à oxidação celular

O método mais utilizado é a avaliação da formação de ROS extra e intracelular usando luminol, ou apenas extracelular com lucigenina que, por outro lado, é específica para detecção do ânion superóxido. Esse método é realizado por quimioluminescência e é caracterizado por extrema sensibilidade devido à sua capacidade de interação com uma grande variedade de ROS em pH neutro. A produção da fluorescência advém da interação dessas espécies com os reagentes anteriormente citados, luminol ou lucigenina, levando a formação de um endoperóxido instável ou de um dioxetano. Ambos se decompõem em um produto excitável eletronicamente que posteriormente volta ao seu estado fundamental liberando um fóton e emitindo a luz. Trata-se de um método que avalia quantitativamente a presença de ROS, e não os danos causados por eles, e necessita de um grande volume amostral, não podendo ser realizado em sêmen criopreservado. Além disso, a presença de leucócitos no ejaculado pode interferir nos resultados do teste (AGARWAL; QIUSHARMA, 2018).

O potencial de redução (ORP) é um dos mais modernos testes desenvolvidos, baseado em um galvanostato. Tem capacidade de medir a transferência de elétrons de um antioxidante para um agente oxidante, mensurando assim o equilíbrio entre esses dois elementos (potencial redutor) em um sistema biológico qualquer, além de conseguir avaliar os parâmetros seminais e o potencial de fertilização do sêmen. Os resultados podem variar com a viscosidade da amostra, porém, é um método efetivo na avaliação do sêmen fresco ou congelado (AGARWAL; QIUSHARMA, 2018).

A redução do citocromo C ou NBT (*nitro blue tetrazolium*) é um método em que são usados reagentes específicos (NBT ou Cyt (ferrocitocromo C)) que se reduzem na presença de superóxido no meio extracelular, no caso do Cyt, ou de qualquer molécula causadora do estresse oxidativo liberada no meio extracelular, tratando-se do NBT (AGARWAL; QIUSHARMA, 2018).

A ressonância de rotação de elétrons (ESR) é usada para detectar radiação eletromagnética de elétrons desemparelhados. É uma alternativa no diagnóstico de estresse

oxidativo em proteínas e lipídios. Porém, essa técnica não consegue detectar moléculas de vida curta ou de baixa concentração como o superóxido ou o radical hidroxil (AGARWAL; PRABAKARAN, 2005).

Vários métodos foram desenvolvidos para analisar o potencial antioxidante total (TAC) de um meio, como o de capacidade de absorvência do radical de oxigênio (ORAC), habilidade plasmática de redução do ferro (FRAP) e a capacidade antioxidante trolox equivalente (TEAC). O TAC é um teste calorimétrico usado para avaliar a capacidade dos antioxidantes não enzimáticos disponíveis no plasma seminal, após serem extraídas as células nele presentes. Ele mensura a absorvência de uma amostra acrescida de peróxido de hidrogênio para induzir a reação de oxidação. Valores baixos obtidos neste teste indicam grandes quantidades de ROS ou baixa atividade de antioxidantes e conseqüentemente o acometimento pelo estresse oxidativo. O TAC, no entanto, é um método oneroso, inespecífico e que não abrange os antioxidantes enzimáticos. Isso contribui para a crescente busca de técnicas mais efetivas (AGARWAL; QIUSHARMA, 2018).

O biomarcador de danos ao DNA 8-hidroxideoxiguanosina (8-OhdG) é muito utilizado na detecção de um dos principais efeitos deletérios causados pelo estresse oxidativo devido a sua alta especificidade, potencial mutagênico, e abundância no DNA, principalmente humano. Esse biomarcador pode ser rastreado de duas maneiras: cromatografia líquida de alta performance com detecção eletroquímica ou espectrometria cromatográfica de massa gasosa. No entanto, tanto o procedimento analítico quanto a extração de DNA podem induzir ao estresse oxidativo e alterar os resultados do teste. Além disso, é uma técnica que exige quantidades substanciais de DNA, o que limita a sua utilização (SHEN; ONG, 2000).

O processo de peroxidação lipídica induzido na membrana plasmática pelo estresse oxidativo tende a formar aldeídos como subprodutos, principalmente o malonaldeído. O ensaio com ácido tiobarbitúrico é utilizado na detecção de alterações nas concentrações desse aldeído no sêmen via cromatografia líquida de alta performance, espectrofotometria ou espectrofluorescência. Outro produto comum da peroxidação de ácidos graxos polinsaturados é o isoprostano. O que leva a eficiência da utilização de um marcador dessa molécula na detecção desse tipo de consequência do estresse oxidativo (BANSAL; BILASPURI, 2011).

3.2. Uso de sondas fluorescentes

Compostos como sondas fluorescentes sensíveis à oxidação são ferramentas importantes na avaliação da integridade espermática e também na detecção do estresse oxidativo em espermatozoides. A avaliação dessas sondas é feita por citometria de fluxo ou microscopia comum ou de fluorescência (GOSALVEZ; TVRDA; AGARWAL, 2017).

A citometria de fluxo é uma tecnologia disseminada devido a sua versatilidade. Ela consegue analisar características físicas do espermatozoide e da movimentação do mesmo, e ainda, o perfil de fluorescência gerado em diferentes testes simultaneamente. O citômetro de fluxo é um aparelho que tem capacidade de avaliação de milhares de espermatozoides em poucos segundos. Ele é composto principalmente por: um fluxo de células, uma fonte de luz (lasers de alto desempenho), um detector e conversor de sistema analógico para digital (mensura a dimensão e a complexidade das células, bem como a intensidade de fluorescência), um sistema de amplificação e um computador para análise dos resultados.

A amostra passa em meio líquido, em fluxo, quando um ou mais feixes de luz, de comprimento de onda conhecidos, incidem sobre ela. Cada partícula exposta ao laser apresentará um comportamento. O sistema óptico eletrônico então, registra a forma de dispersão das estruturas e os diferentes comprimentos de onda da luz emitida por elas. Lentes apropriadamente posicionadas e uma combinação de feixes e filtros são responsáveis por orientar a fluorescência das moléculas excitadas na amostra, para que detectores consigam transformar em sinais eletrônicos proporcionais aos sinais ópticos que os atingem. Os dados obtidos são armazenados no computador e analisados de variadas formas dependendo dos objetivos do ensaio (PEÑA; MARTÍN; ORTEGA, 2016).

O dihidroetídio (DHE) é uma sonda não-fluorescente muito usada na detecção do estresse oxidativo já que se oxida na presença principalmente do superóxido, resultando em 2-hidroietídio. A partir dessa reação, emite fluorescência vermelha. Sua afinidade é pelo DNA, mas não tem capacidade de diferenciar as células vivas e mortas. Como alternativa, ela pode ser combinada a um marcador de vitalidade fluorescente como a SYTOX™ Green (Molecular Probes, Invitrogen, cat. n. S34860). Porém, em testes realizados recentemente foi comprovado a

inabilidade de distinção dos estágios de estresse oxidativo por essa sonda especificamente, ao contrário das sondas do grupo CellROX® (Molecular Probes, Invitrogen). Essa última, de coloração vermelha, verde ou laranja (cat. n. C10422, C10444 e C10443, respectivamente) se tornam fluorescentes quando oxidadas dentro das células. Sendo assim, quando comparadas à DHE, apresentam diferentes graus de luminescência variando de acordo com a gravidade do estresse oxidativo.

O corante SYBER-14 tem capacidade de penetrar na membrana plasmática e sua afinidade é pelo material genético liberando coloração verde. Ao contrário, a YO-PRO™-1 Iodide (Molecular Probes, Invitrogen, cat. n. Y3603) que apesar de também se apresentar em fluorescência verde, não tem capacidade de penetração na membrana íntegra. O iodeto de propídio (IP) também penetra em células com a membrana plasmática danificada em busca do DNA, pelo qual tem afinidade, emitindo uma fluorescência vermelha. Já o Hoechst 33342 (Thermo Scientific, cat. n. 62249) é uma sonda que emite coloração azul, utilizada principalmente como marcador de cabeça de espermatozoides que possuem membrana plasmática intacta, combinado com outras sondas ou para análises de morfometria espermática (BERGSTEIN; WEISS; BICUDO, 2014).

No caso de análise de peroxidação lipídica, utiliza-se a sonda BODIPY™ 581/591 C11 (Molecular Probes, Invitrogen, cat. no D3861), que tem afinidade pela membrana plasmática e é peroxidada pelas ROS, juntamente com os ácidos graxos polinsaturados. Quando oxidada, esta sonda muda sua fluorescência de vermelho para verde, detectando apenas a presença das ROS na célula. E no caso da sonda H₂DCF (*dichlorofluorescein diacetate*), esta atravessa a membrana em sua forma não fluorescente e na presença do peróxido de hidrogênio emitirá a fluorescência (GOSALVEZ; TVRDA; AGARWAL, 2017).

Já a sonda MitoSOX™ Red (Molecular Probes, Invitrogen, cat. n. M36008) detecta o íon superóxido especificamente na mitocôndria. Por sua afinidade pela mitocôndria, esta sonda é direcionada a peça intermediária do espermatozoide. É sensível a oxidação pelo radical hidroxil e pelo ânion superóxido, portanto eficiente na detecção de ROS. No garanhão, no entanto, foi demonstrado que devido à fosforilação oxidativa para geração de energia pelas mitocôndrias que gera uma dispersão de elétrons e aumento da produção de oxigênio, essa sonda pode marcar mitocôndrias ativas confundindo-se com a presença de ROS. (ALVES et al., 2015).

A sonda JC-1 (*5,5',6,6'-tetrachloro-1,1', 3,3'- tetraethylbenzimidazolcarbocyanine iodide*) mensura o potencial mitocondrial da célula, integrando-se em mitocôndrias com alto potencial de membrana e formando agregados multiméricos que emitem a coloração laranja. Nas mitocôndrias inativadas ela forma monômeros que emitem coloração esverdeada. É considerada a mais sensível por ser capaz de mensurar mudanças no potencial mitocondrial. Já a MitoTracker™ (Molecular Probes, Invitrogen, cat. n. M7512) se liga aos tióis de mitocôndrias ativas emitindo fluorescência vermelha. É uma sonda de fácil manuseio e pode ser utilizada combinada com outras sondas para avaliação de mais parâmetros simultaneamente (PEÑA; MARTÍN; ORTEGA, 2016).

O ensaio cometa é uma técnica de fluorescência que vem sendo testada como uma alternativa na detecção de fragmentação de DNA. Enfrenta, no entanto, problemas advindos da dificuldade de extração e avaliação do material genético do espermatozoide devido à cromatina altamente condensada característica desse tipo de célula. Outra técnica de fluorescência crescente no diagnóstico de danos ao DNA advindos do estresse oxidativo é a TUNEL, que foi projetada inicialmente para mensurar esse tipo de defeito em células apoptóticas, mas tem sido efetivo até mesmo na diferenciação de células de homens férteis e inférteis, se conectando às extremidades fragmentadas do DNA (SHEN; ONG, 2000).

4. ALTERAÇÕES EPIGENÉTICAS NO SÊMEN

4.1. Introdução às modificações epigenéticas

A epigenética compreende o processo de regulação e expressão gênica, reversível e herdável, sem interferir, no entanto, na sequência de nucleotídeos do DNA, ou seja, atuando a nível transcricional ou pós-transcricional. Alterações epigenéticas podem ocorrer por influência do ambiente, da alimentação e do estresse, por exemplo, através de mecanismos como a metilação do DNA ou do RNA, modificação de histonas ou interferência dos RNAs não codificadores (ncRNAs) (COSTA; PACHECO, 2013).

A metilação do DNA é uma reação catalisada por enzimas DNA-metil-transferases (DNMTs), que participam não só da formação, mas da manutenção dessas reações. Trata-se, mais comumente, da adição de um radical metil (CH₃) ao carbono 5 da base citosina do DNA, se tornando 5-metil-citosina. Interfere principalmente no silenciamento de genes de forma a levar ao recrutamento de proteínas que causam a compactação da cromatina, o que impede a ligação da enzima responsável pela transcrição, RNA-polimerase, e conseqüentemente, a expressão gênica. Essa reação desempenha um papel importante no desenvolvimento embrionário normal e na inativação do cromossomo X, porém, um desequilíbrio na mesma pode representar carcinogênese ou idade avançada (MULLER; PRADO, 2008).

A acetilação das histonas, por sua vez, altera a conformação da cromatina através da adição de um radical acetil (COCH₃) aos resíduos de lisina dessas proteínas, o que resulta na descompactação da cromatina permitindo a transcrição gênica. Já a deacetilação, promovida pelas histonas deacetilases retiram o grupo acetil, promovendo a condensação da cromatina e, conseqüentemente, dificultando a expressão gênica. A metilação das histonas também é possível, através das histonas-metil-transferases, que podem tanto suprimir quanto ativar a expressão gênica, dependendo do resíduo de aminoácido onde atua (MULLER; PRADO, 2008).

RNAs não codificadores (sncRNAs) são moléculas de RNA que não codificam proteínas, podendo ser divididos em pequenos (sncRNA; menos de 200 nucleotídeos) ou longos (lncRNAs; mais de 200 nucleotídeos) RNAs. Os sncRNAs são subdivididos em diversas categorias, dentre elas os micro RNAs (miRNA), os pequenos RNAs de interferência (siRNA), os pequenos RNAs derivados de RNA transportador (tsRNA), os sRNA codificado por genoma mitocondrial (mitosRNA) e sRNA temporal (stRNA). Os sncRNAs regulam a expressão gênica a nível pós-transcricional dos RNAs codificadores de proteínas (os RNA mensageiros ou mRNAs). Isso ocorre devido a sua complementariedade de aminoácidos a determinados trechos do RNA alvo, principalmente a região 3'UTR, se ligando a elas, inibem ou degradam o mRNA, impedindo assim, a transcrição das proteínas. Os sncRNAs são conhecidos por sua capacidade de regulação da metilação do DNA, da modificação de histonas e da transcrição ou tradução de RNAs mensageiros (CHEN et al., 2015).

Um único sncRNA pode ter milhares de alvos, e conseqüentemente, regular diversos genes diferentes. Os ncRNA participam das vias de apoptose, das células sanguíneas e das tumorais, dos processos de desenvolvimento (inclusive embrionário), da diferenciação e

proliferação celular, do metabolismo de gordura e da secreção de insulina, além da atuação na epigenética.

Os sncRNAs mais estudados até o momento são os miRNA. Esses são transcritos pela enzima RNA Polimerase 2 a partir do DNA, gerando primeiramente um pri-miRNA, que ainda dentro do núcleo será clivado em pre-miRNA pelas enzimas Drocha e DGCR8. A enzima Exportina 5 realiza o transporte do pri-miRNA do núcleo para o citoplasma, onde a enzima Dicer cliva sua cabeça em formato de grampo retando apenas a dupla fita. Essa estrutura conhecida agora como “miRNA duplex” encontra-se com um grupo de proteínas chamado complexo de RISC. Nesse momento apenas uma fita será selecionada, devido a sua complementariedade, para se ligar a determinado trecho dessa proteína e assim, regular a transcrição gênica ou silenciar o mesmo degradando seu RNA mensageiro. Essas moléculas podem estar associadas aos polissomos e aos complexos ribonucleoproteicos.

Mutações nas enzimas envolvidas nesse processo, especialmente na Dicer, podem modificar a conformação dos miRNA e causar diversos defeitos no desenvolvimento da linha germinativa que levarão ao desenvolvimento de linfoma como no caso do miR-155, de câncer de pulmão como o miR-99a ou até mesmo defeitos genéticos letais como no caso do miR-9 e miR-131. A deficiência do micro RNA miR-14, um importante inibidor do apoptose celular, leva a morte de células responsáveis pelo metabolismo lipídico, causando um desbalanço metabólico significativo (HE; HANNON, 2004).

Os miRNAs tem ainda participação na regulação estrutural da cromatina, podendo então interferir na conformação da mesma, dobrando trechos e tornando impossível sua replicação, resultando no silenciamento de características genéticas herdáveis. As modificações nos RNAs podem tornar essas estruturas mais estáveis, o que tende a prolongar sua meia vida mesmo depois da fertilização, garantindo a transmissão de suas características, idem a suas alterações.

Tem se discutido a participação de diferentes enzimas nesses processos. A mais provável é a DNA metiltransferase DNMT2 que adiciona os grupos m^5C aos diferentes miRNAs (CHEN; YANDUAN, 2016).

4.2. Os RNAs espermáticos

Os RNAs espermáticos são conhecidos por sua importância em eventos fisiológicos, principalmente na primeira clivagem do zigoto. Essa molécula, no entanto, tem estrutura extremamente instável, especialmente quando comparada ao DNA. Isso significa que são ainda mais sensíveis ao estresse oxidativo induzido pela presença das ROS. Levando em consideração a participação ativa desses RNAs na transcrição de proteínas, o acometimento dos mesmos poderia ocasionar efeitos deletérios não só ao desenvolvimento embrionário, mas à expressão gênica (CASTRO et al., 2016). Já os sncRNAs participam de processos imprescindíveis no espermatozoide, como a compactação da cromatina espermática, que confere proteção contra agentes externos, e a codificação de proteínas, que induzem a uma transferência de herança genética através de mecanismos não mendelianos (CHEN et al., 2015).

Fatores ambientais, alimentação e condições de estresse aos quais os progenitores são submetidos poderiam então ter influência direta na progênie por mecanismos epigenéticos, dependendo da capacidade de retenção de memória dos sRNAs e de sua propagação após a fecundação (CHEN et al., 2015).

Ainda de acordo com um experimento realizado por Chen et al. (2016), os miRNAs (20 nucleotídeos) e os tsRNAs (30 a 34 nucleotídeos) sofreram influência de mudanças bruscas na dieta. Principalmente os tsRNAs refletiram no sequenciamento dos RNAs e na expressão gênica da progênie, levando a desordens metabólicas tais como diabetes, obesidade, intolerância a glicose e resistência a insulina. As mudanças ocorridas nos tsRNAs foram principalmente as caracterizadas do tipo m^5C e m^2G , que estavam aumentadas nos animais com dietas de alta gordura. Sendo a m^5C um importante contribuinte para a estabilidade do RNA transportador, e tendo em vista que os tsRNAs se ligam preferencialmente às regiões promotoras dos genes, mudanças nessas moléculas acarretam o silenciamento dos mesmos desestabilizando a estrutura do tRNA, refletindo assim na transcrição proteica. Essa desregulação gênica tem potencial para interferir, via cascata transcricional, em processos como a apoptose células, estresse oxidativo, transporte transmembrana de glicose e ainda, na transmitância de características às gerações futuras.

De acordo com Capra et al. (2017) defeitos moleculares provocados por fatores diversos afetam a capacidade de fertilização do espermatozoide interferindo na morfologia, bem como na

motilidade e na qualidade seminal. Essas modificações foram capazes de se estabelecer mesmo depois da espermatogênese ou até mesmo da capacitação e fecundação, o que justifica a preocupação desde os eventos mais básicos, como a alimentação ao longo da vida do animal, assim como a exposição à radiação, altas temperaturas, patologias testiculares ou métodos inadequados de fertilização artificial. Os miRNAs são conhecidos por regular a renovação de células tronco espermatogoniais a nível pós-transcricional, regular a diferenciação dessas células e por sofrerem alterações de acordo com o estágio da espermatogênese.

A ingestão de volumoso contaminado por alcaloides, por exemplo, apresentou efeitos na mutação dos miRNA, e conseqüentemente interferiu negativamente na reprodução e no desenvolvimento dos animais em um experimento realizado por Capra et al. (2017). Alguns miRNAs presentes no plasma seminal são marcadores eficientes que contribuem para a diferenciação de homens férteis e inférteis. Diferentes genes também sofrem mudanças em sua conformação e expressão em animais subnutridos, o que acarreta a interrupção da espermatogênese. Outros aumentam a apoptose das células germinativas e prejudicam a função das células de Sertoli quando são alterados como o miR10b, miR-26, miR-34c e miR-99a. A inibição da via de interação dos miRNAs com os genes alvo conhecida como STAT no espermatozoide aumenta a formação das ROS e os níveis de cálcio na célula, além de diminuir o potencial de membrana mitocondrial (CAPRA et al., 2017).

O método pelo qual as mudanças genômicas ocorridas por fatores como o estresse, dieta, sensibilidade medicamentosa, susceptibilidade à irradiação ou ingestão de substâncias tóxicas, ao longo da vida do macho, são transmitidas para as gerações subsequentes ainda não é completamente elucidado. Um dos mecanismos que potencialmente realiza a comunicação entre as células somáticas e o espermatozoide, mediando o transporte de miRNAs, é através de vesículas extracelulares, produzidas pelo epitélio epididimário, conhecidas como epididimossomos (Sharma et al., 2016) Esse tipo de vesícula é encontrado em praticamente todos os fluidos biológicos como o sangue, líquido e outros, mas especialmente nos órgãos reprodutivos. Os epididimossomos se fundem aos miRNAs das células epiteliais e transmitem essas moléculas aos espermatozoides. Para se movimentar fora das células, os RNAs precisam passar por modificações ou ter uma estrutura secundária específica. Já as vesículas conseguem entrar e sair das células com certa facilidade. Algumas espécies de moscas apresentam canais específicos de passagens dos miRNAs ou possuem proteínas capazes de fazer esse transporte como a SID-1 ou

SID-2. As células neuronais podem ainda capturar miRNAs com conformação G-quadruplex, sugerindo a possibilidade de utilização dessa via para transporte até os espermatozoides (CHEN; YANDUAN, 2016).

Espera-se que a suplementação com antioxidantes possa não só diminuir os danos causados ao material genético pelo estresse oxidativo como também, interferir na modificação dos sncRNAs que serão transmitidos ao espermatozoide posteriormente, tendo em vista que eles estão diretamente ligados às alterações metabólicas, e assim participar das alterações na assinatura epigenética do sêmen, e conseqüentemente das crias.

5. MATERIAIS E MÉTODOS

5.1. Modelo experimental

Durante o estágio supervisionado foi acompanhado um trabalho realizado com nove touros da raça Angus, alocados na fazenda *Main Station Field Laboratory* (MSFL) da Universidade de Nevada em Reno, localizada em Reno, NV. Esses touros haviam sido movidos das pastagens da fazenda para um galpão de alimentação aproximadamente aos 10 meses de idade (em Fevereiro de 2018), onde receberam feno de capim e de alfafa à vontade até o mês de Julho, quando se iniciou a adaptação para o experimento. As idades e os valores de perímetro escrotal dos touros nos diversos momentos do experimento encontram-se na Tabela 1.

Tabela 1: Idade e perímetro escrotal de touros Angus no decorrer do experimento.

| | 7/2/2018 | | 2/7/2018 | | 29/8/2018 | | 7/11/2018 | |
|---------------------|------------------------|-------------|------------------|-------------|-------------------------|-------------|--------------------------|----------------|
| | Entrada feedlot | | Adaptação | | Dia 0 - Coleta 1 | | Dia 70 - Coleta 2 | |
| | IDADE | PE | IDADE | PE | IDADE | PE | IDADE | PE |
| GRUPO | (M) | (CM) | (M) | (CM) | (M) | (CM) | (M) | PE (CM) |
| | 9,6 | ± 29,3 | ± 14,4 | ± 34,3 | ± 16,3 | ± 37,9 | ± 18,6 | ± |
| Antioxidante | 0,4 | 1,7 | 0,4 | 3,1 | 0,4 | 3,1 | 0,4 | 39,1 ± 3,5 |
| | 9,7 | ± 30,4 | ± 14,5 | ± 36,1 | ± 16,4 | ± 38,9 | ± 18,7 | ± |
| Controle | 0,2 | 1,1 | 0,2 | 1,7 | 0,2 | 1,9 | 0,2 | 39,6 ± 1,7 |

Fonte: do autor, 2019.

Médias \pm desvios-padrão das idades (meses) e perímetros escrotais (cm) de touros Angus em diversos momentos do período experimental. A aplicação do antioxidante se deu no dia experimental 1.

No dia 2 de Julho, os animais foram alocados em currais individuais e receberam alimentação composta por feno de capim (Orchard grass - *Dactylis* spp.) em quantidades limitadas, calculadas para ganho diário de 2% do peso vivo (PV). Os animais permaneceram na adaptação por 58 dias, até o dia 0 do experimento (29 de Agosto), quando foram submetidos à primeira coleta de sêmen. No dia experimental 1, os animais passaram a receber dieta composta por feno de capim e concentrado (composto por milho, aveia, polpa de beterraba, calcário, ureia e sal comum), contendo em média 13% de proteína bruta e 2.4Mcal/Kg de matéria seca. A quantidade oferecida foi calculada para ganho de 2.3% do peso vivo, e a oferta foi realizada 1 vez ao dia, pela manhã. Nesse mesmo dia, os animais foram divididos aleatoriamente em dois grupos: controle (n=4) e antioxidante (n=5). Esses últimos receberam injeção subcutânea de 1 ml/68 kg de peso vivo de um composto contendo elementos antioxidantes (Multimin 90® – Multimin North America Corporation). A composição do suplemento antioxidante encontra-se na Tabela 2.

Tabela 2: Componentes e suas concentrações no medicamento administrado aos touros no experimento, Multimin 90.

| COMPONENTE | CONCENTRAÇÃO |
|-------------------|---------------------|
| Zinco | 60 mg/ml |
| Manganês | 10 mg/ml |
| Selênio | 5 mg/ml |
| Cobre | 15 mg/ml |

Fonte:multiminusa.com.

Os animais foram avaliados em relação ao peso, escore corporal e perímetro escrotal a cada 14 dias. No dia experimental 70, os animais foram submetidos à segunda coleta de sêmen. O peso e o escore de condição corporal (ECC) dos animais nos diversos momentos do experimento se encontram na Tabela 3.

Tabela 3: Peso e escore de condição corporal de touros Angus no decorrer do experimento.

| | 7/2/2018 | 2/7/2018 | | 29/8/2018 | | 7/11/2018 | |
|---------------------|----------------|------------------|--------------|-------------------------|--------------|--------------------------|--------------|
| | Feedlot | Adaptação | | Dia 0 - Coleta 1 | | Dia 70 - Coleta 2 | |
| | PESO | PESO | ECC | PESO | ECC | PESO | ECC |
| GRUPO | (KG) | (KG) | (1-9) | (KG) | (1-9) | (KG) | (1-9) |
| Antioxidante | 281 ± 24 | 362 ± 26 | 4,6 ± 0,8 | 374 ± 32 | 4,8 ± 0,2 | 451 ± 31 | 5,4 ± 0,2 |
| Controle | 299 ± 11 | 357 ± 14 | 4,0 ± 0 | 382 ± 11 | 4,5 ± 0,2 | 467 ± 11 | 5,5 ± 0 |

Fonte: do autor, 2019.

Médias ± desvios-padrão dos pesos vivos (Kg) e escores de condição corporal (ECC – escala de 1 a 9) de touros Angus em diversos momentos do período experimental. Os pesos e ECC foram obtidos no período da manhã, antes da oferta de alimento. A aplicação do antioxidante se deu no dia experimental 1.

A coleta de sêmen foi realizada com o auxílio de um eletroejaculador. O sêmen foi colhido em um tubo livre de RNAase acoplado e um funil, aquecido e envolvido em uma espuma com fita isolante no intuito de proteger os espermatozoides da luminosidade e da temperatura. Em seguida foram realizados testes de motilidade, total e progressiva, e vigor ao microscópio de luz. O volume de 5 µl do ejaculado foi adicionado a uma solução de formalina 1% na proporção de 1:200 para a análise de concentração e confecção de esfregaço, corado com eosina nigrosina para avaliação da morfologia espermática. A concentração foi mensurada através da contagem de espermatozoides em 5 quadrados que correspondem a 80 quadrinhos (5x16), de cada um dos dois lados da câmara de Neubauer, avaliada sob microscopia de luz. Como a diluição foi de 1:200 e o resultado é expresso em número de células por cm³, multiplicou-se a média entre as duas contagens por 10⁶ (área contada multiplicada pela altura da câmara e diluição da amostra) obtendo assim um valor estimado da concentração espermática de cada animal.

O volume de sêmen restante foi submetido à criopreservação em palhetas de 0,5ml, contendo um número total de 12,5x10⁶ espermatozoides (independente da motilidade) por palheta. O volume calculado de acordo com a concentração seminal de cada animal foi adicionado a fração A do diluente TWO-STEP™ Extender (Continental Plastic Corp., Delavan, WI) perfazendo-se um total de 15 ml, e imediatamente resfriado a 4°C por 4 horas. Logo após as

amostras foram acrescidas de 15ml da fração B do diluente, envasadas nas palhetas por sucção e lacradas com álcool polivinílico. As diluições foram realizadas de acordo com as recomendações do fabricante, resultando numa concentração final do crioprotetor glicerol de 6.5%. Os demais componentes do diluidor são água, tampão TRIS, ácido cítrico, frutose, gema de ovo e antibióticos). As palhetas contendo o sêmen resfriado foram alocadas 5cm acima do nitrogênio líquido por 10 minutos e em seguida mergulhadas nele.

5.2. Atividade 1: Avaliação dos parâmetros seminais.

Aproximadamente 200 dias após o início do experimento algumas amostras criopreservadas (4 a 7 palhetas de sêmen por animal) obtidas nas duas coletas foram descongeladas e analisadas quanto a motilidade total e progressiva, e análise morfológica, sob coloração com eosina-nigrosina. Para a avaliação da morfologia espermático, utilizou-se o método de (Barth,A.D.;Oko,R.J. 1989), classificando-se as anormalidades espermáticas em defeitos primários e secundários. Compararam-se então, os parâmetros dos ejaculados, entre as diferentes coletas e os diferentes tratamentos.

Utilizou-se o pacote estatístico XLSTAT 2019 para Microsoft Excel® para a avaliação dos dados obtidos através das avaliações espermáticas, sendo que os dados que não apresentaram distribuição normal de resíduos foram submetidos à transformação de Johnson. O modelo utilizado foi o de ANOVA com mediadas repetidas, sendo os touros considerados os Sujeitos; e Dia da coleta (Dia 0 ou Dia 70) e tratamento (Antioxidante ou Controle) os fatores fixos. Foram computados os efeitos de independente de Dia e a interação Dia x Tratamento. Valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos.

5.3. Atividade 2: extração de RNA seminal.

Para extração do RNA as amostras foram descongeladas em duplicatas, a 36°C, no descongelador eletrônico, por 30 segundos. Em seguida foi alocada uma gota de cada amostra em duas lâminas, uma para análise de motilidade por microscopia de luz e à outra foi adicionada eosina nigrosina e realizado o esfregaço para análise morfológica. O restante do conteúdo das palhetas foi alocado em um eppendorf, aproximadamente 1ml por tubo e centrifugados a 3000g a 4°C, por 5 minutos.

Foi realizada uma lavagem com 1 ml de PBS, seguida de 5 minutos de centrifugação a 3000g a 4°C por 5 minutos e descarte do sobrenadante. A lavagem seguinte foi realizada da mesma maneira, no entanto acrescida de 1ml de solução detergente (0,5% triton, 1% SDS) e encubada no gelo por 10 minutos antes da centrifugação e descarte do sobrenadante. Logo após, outra lavagem com 1ml de PBS, centrifugação a mesma velocidade e temperatura por 5 minutos. O *pelet* foi então ressuspendido em 500 µl de trizol e homogeneizado, invertendo os tubos por 30 segundos e em seguida por seringa de 1ml e agulha de insulina 5 vezes.

As duas amostras do mesmo touro foram então combinadas, formando um volume final de 1ml, que foram acrescidas de 3 µl de glicogênio e colocadas no vórtex por 10 segundos. Então duas incubações foram realizadas, a primeira delas a 65°C por 15 minutos e a segunda a temperatura ambiente por 5 minutos. Foram adicionados 500 µl de clorofórmio e homogeneizado com a própria pipeta, depois ao vórtex por 40 segundos e novamente incubado a temperatura ambiente por 10 minutos. As amostras foram então mais uma vez homogeneizadas manualmente 6 vezes e centrifugadas a 13000g por 20 minutos a temperatura de 4°C. Nesse momento a amostra se dividiu em 3 fases, a mais superficial foi coletada cuidadosamente para que a intermediária, onde estava contido o DNA, e a mais profunda onde se encontravam as proteínas, não se misturassem.

A amostra foi acrescida de 0,5ml de isopropanol, homogeneizada por pipetagem e incubada a -20°C por uma noite. Em seguida centrifugada a 16000g, a 4°C por 35 minutos sendo descartado o sobrenadante. Para purificação da amostra foi realizada uma lavagem com 1ml de etanol 80%, homogeneizada no vórtex e centrifugada a 18000g por 5 minutos a uma temperatura de 4°C, descartando o sobrenadante. Uma última centrifugação foi realizada para extração do álcool remanescente, a 16000g por 1 minuto. Logo após, a amostra foi seca a 65°C por 5 minutos, sem perder a solubilidade. Então o *pelet* foi ressuspendido com 25 µl de água livre de RNAase, homogeneizado e analisado quanto à concentração e pureza no aparelho NanoDrop.

5.4. Atividade 3: Desenvolvimento de protocolo para a avaliação de processo oxidativo em espermatozoides.

Utilizaram-se trabalhos da literatura, realizados nas espécies bovina e equina, para a proposição de um protocolo para a avaliação de oxidação dos espermatozoides dos touros Angus. Essas avaliações ainda se encontram em andamento.

A análise com as sonda fluorescente CellROX® deep red (Molecular Probes, Invitrogen, cat. n. C10422), SYTOX® green (Molecular Probes, Invitrogen, cat. n. S7020) e HOESCHT 33342 (Thermo Scientific, cat. n. 62249) será realizada seguindo o protocolo adaptado a partir do trabalho de Alves et al. (2015). Três palhetas de sêmen criopreservado, de cada touro e de cada coleta (1 ou 2), serão descongeladas a 37°C por 30 segundos e combinadas em um tudo de microcentrífuga. A motilidade da amostra combinada será avaliada sob microscopia óptica, utilizando-se 2 µl da mesma. Em seguida, 700 µl de meio TALP será adicionado à amostra, que será centrifugada a 700G por 3 minutos, e o sobrenadante posteriormente descartado. Repetir-se-á o processo de lavagem por mais duas vezes, para a retirada do diluidor de sêmen, e o pelet obtido após a última lavagem será ressuspensionado em 500 µl de TALP.

Um volume de 100 µl da amostra lavada será imediatamente submetido a coloração com a sonda. Para tanto, esse volume será transferido para outro tube de micro centrífuga, onde serão acrescentados 100 µl de TALP, 0.5 µl da sonda CellROX® deep red e 0.3 µl da sonda SYTOX® green (diluídos anteriormente em DMSO a uma concentração de 1mM), além de 1µ de HOESCHT 33342. Esta amostra será incubada no escuro a 37°C por 30 minutos, posteriormente centrifugada por 5 minutos a 2000G e o pelet ressuspensionado em 200 µl de TALP.

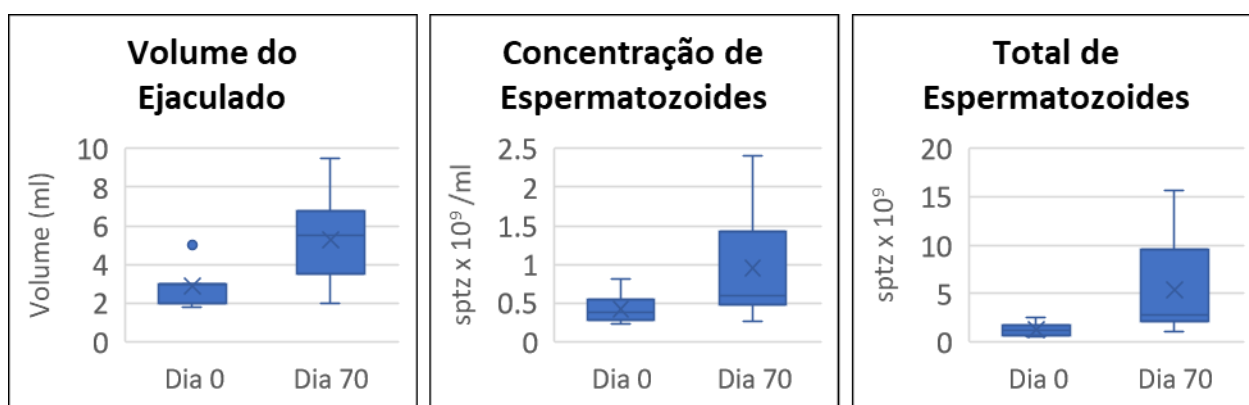
Um outro volume de 100 µl da amostra lavada será submetido ao estresse oxidativo. Para tanto, este volume será transferido para outro tube de microcentrífuga, onde serão acrescentados 50µl de sulfato de ferro (4mM) e 50µl de ascorbato de sódio (20mM) e incubado a 37°C por 90 minutos. Após esta incubação, esta amostra será acrescida das sondas CellROX®, SYTOX® e HOESCHT 33342, seguindo as mesmas proporções e metodologia descritas acima.

Uma alíquota de 4µl das amostras coradas será extraída para realização do esfregaço, posteriormente, analisado por microscopia de epifluorescência. Em cada lâmina serão contados 200 espermatozoides (todos com núcleos corados de azul – HOESCH), classificados quanto ao estresse oxidativo (quando presente, caracterizado pela presença de fluorescência vermelha no citoplasma, principalmente na peça intermediária - CellROX®) e à integridade de membrana (presença ou ausência de fluorescência verde no núcleo indicando comprometimento de membrana plasmática - SYTOX®).

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Por se tratar de touros jovens, com idades variando entre 16 e 19 meses, estima-se que na primeira coleta, alguns deles não tenham atingido a maturidade sexual e o sêmen tenha apresentado características que configurem puberdade recente, como menor concentração espermática, concentração e número total de espermatozoides.

Figura 1: Gráficos de comparação do volume do ejaculado, concentração espermática e quantidade de espermatozoides médios, comparados entre a primeira (Dia 0) e a segunda (Dia 70) coleta.



| | Dia 0 | Dia 70 | p (Dia) | p (Trat x Dia) |
|--|-------------|-------------|---------|----------------|
| Volume do Ejaculado (ml) | 2,9 ± 0,9 | 5,3 ± 2,1 | 0,012 | 0,590 |
| Concentração (*10⁹/ml) | 0,42 ± 0,18 | 0,95 ± 0,65 | 0,022 | 0,273 |
| Total spts (*10⁹) | 1,21 ± 0,67 | 5,32 ± 4,73 | 0,002 | 0,387 |

Os parâmetros de morfologia e motilidade não apresentaram diferença ($p < 0,05$) quando comparadas as duas coletas, ou entre o grupo controle e o grupo tratado como mostram as figuras 2 e 3, portanto, a aplicação de antioxidantes, não influenciou os parâmetros físicos espermáticos.

O volume do ejaculado variou entre a primeira e a segunda coleta, porém não teve significância quando correlacionado com os grupos tratado e controle, o que significa que essa variação se deve, provavelmente, ao desenvolvimento e maturidade dos animais 70 dias após a primeira coleta. O mesmo é observado no caso da concentração espermática e total de células.

Figura 2: Gráfico de comparação da motilidade total e progressiva das amostras de espermatozoides fresco, bem como os descongelados, entre o grupo controle e tratado com antioxidante, na primeira (Dia 0) e segunda coleta (Dia 70).

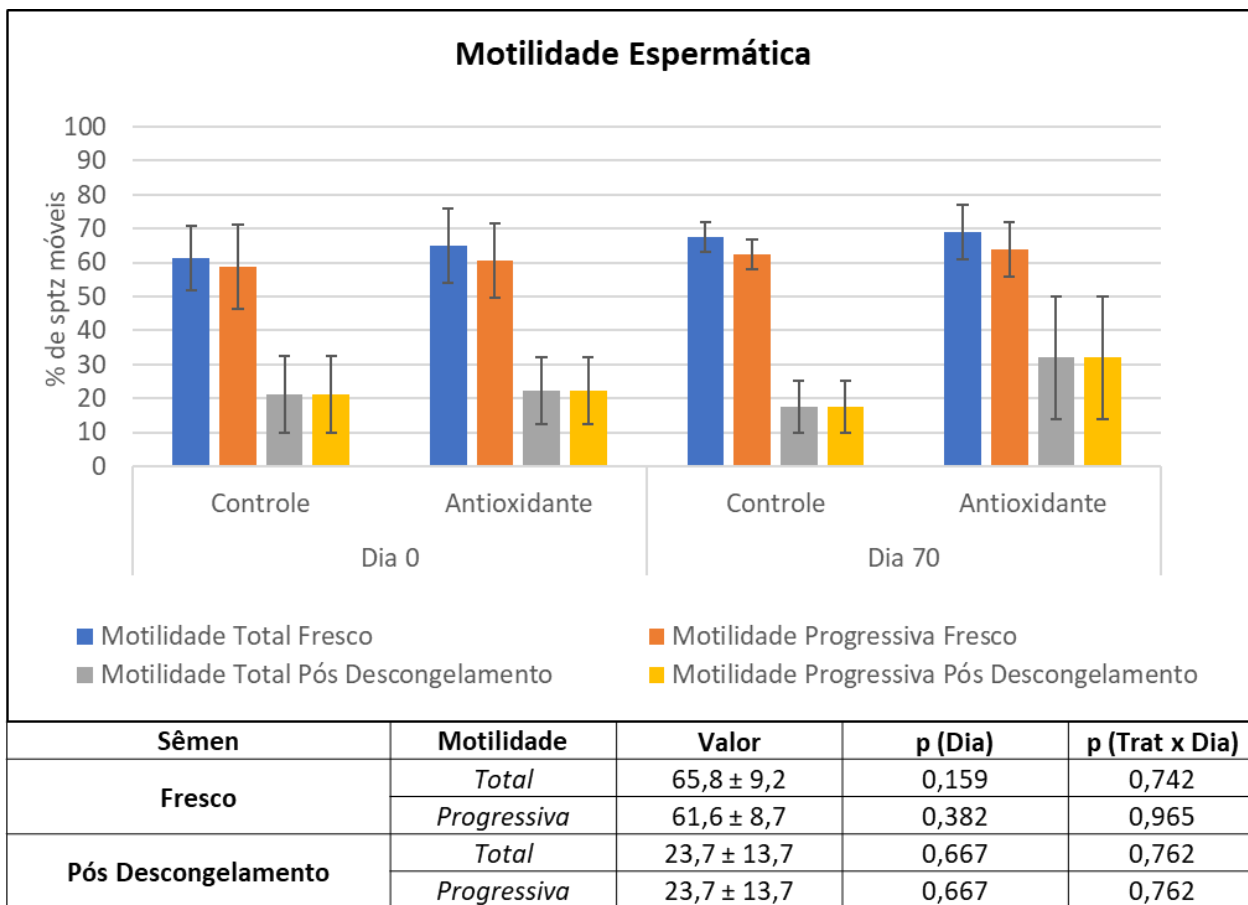
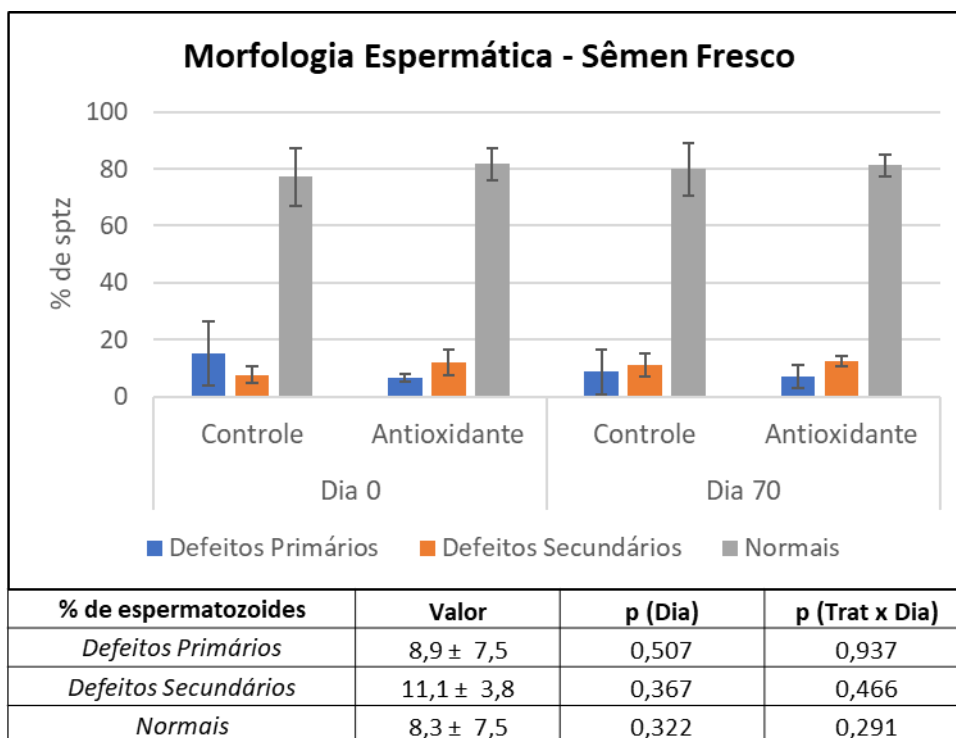


Figura 3: Gráfico de comparação da morfologia espermática quanto aos defeitos primários, secundários e células normais, entre o grupo controle e tratado com antioxidante, na primeira (Dia0) e na segunda coleta (Dia 70).



Alguns fatores têm que ser considerados, tais como o número reduzido de animais utilizados no experimento, escore corporal bom e homogêneo entre os touros, nutrição e ambiência adequadas e a variabilidade esperada nos parâmetros de produção espermática. Com a utilização do protocolo desenvolvido, consegue-se obter RNA de espermatozoides, em quantidades variáveis, como exposto na Figura 4.

Figura 4: Imagem de resultados obtidos na avaliação de qualidade de amostra de RNA espermático através de aparelho Nanodrop.

| Report | Test Type | Date/time | Page # | | | | | | |
|-----------|--------------|--------------------|----------|---------|--------|--------|---------|---------|----------|
| | Nucleic Acid | 3/20/2019 10:13 PM | | | | | | | |
| Sample ID | User ID | Date | Time | ng/ul | A260 | A280 | 260/280 | 260/230 | Constant |
| ago 1 | Default | 3/20/2019 | 10:03 PM | 59.46 | 1.487 | 0.819 | 1.82 | 0.66 | 40.00 |
| ago 3 | Default | 3/20/2019 | 10:04 PM | 105.78 | 2.644 | 1.403 | 1.88 | 0.45 | 40.00 |
| ago 3-2 | Default | 3/20/2019 | 10:05 PM | 110.22 | 2.756 | 1.461 | 1.89 | 0.45 | 40.00 |
| ago 5 | Default | 3/20/2019 | 10:06 PM | 219.92 | 5.498 | 2.827 | 1.94 | 0.61 | 40.00 |
| ago 9 | Default | 3/20/2019 | 10:07 PM | 1959.42 | 48.985 | 29.380 | 1.67 | 1.27 | 40.00 |
| ago 11 | Default | 3/20/2019 | 10:08 PM | 27.24 | 0.681 | 0.330 | 2.07 | 0.08 | 40.00 |
| ago 13 | Default | 3/20/2019 | 10:09 PM | 76.97 | 1.924 | 1.009 | 1.91 | 0.24 | 40.00 |
| ago 15 | Default | 3/20/2019 | 10:11 PM | 78.83 | 1.971 | 1.243 | 1.59 | 0.29 | 40.00 |
| nov 13 | Default | 3/20/2019 | 10:13 PM | 49.13 | 1.228 | 0.707 | 1.74 | 0.45 | 40.00 |

Espera-se que as análises de estresse oxidativo através da probe CellRox, especialmente nas amostras de sêmen criopreservado, já que os processos de manipulação das mesmas diminuem os fatores antioxidantes. Tendo isso em vista, os animais tratados se sobressairiam, com uma defesa mais bem estruturada e com menores índices de estresse oxidativo. No entanto as análises ainda não foram concluídas devido ao tempo de espera de liberação de algumas substâncias necessárias a reação, pelo departamento de química da universidade, pelo qual passam todas e quaisquer substâncias químicas para análise.

7. CONCLUSÃO

O estresse oxidativo nos espermatozoides é um problema crescente pelas condições de estresse às quais são submetidos os animais, bem como pela deficiência de antioxidantes no solo da região de Reno, no estado de Nevada nos Estados Unidos, onde foi realizado o experimento. Diversos prejuízos reprodutivos podem surgir como consequência, gerando perdas econômicas significativas. A busca por meios de amenizar esses efeitos negativos se faz importante para diagnóstico de sub ou infertilidade, para evitar alguns tipos de doenças que podem se instalar

devido a deficiência de antioxidantes e para potencializar os índices de sucesso em tecnologias da reprodução, principalmente a PIVE.

Comprovadamente o estresse oxidativo tem a capacidade de induzir a modificações do material genético da célula, bem como os antioxidantes, que influem nas modificações dos RNAs espermáticos. Não só características adquiridas ao longo da vida do progenitor são disseminadas, mas também, mutações genômicas ocorridas devido a procedimento inadequado de fertilização dentre outros.

Com isso, mais estudos são necessários, no entanto para comprovar a eficácia da aplicação de antioxidantes via subcutânea na prevenção do estresse oxidativo e os prejuízos causados pelo mesmo. Além das respectivas modificações nos RNAs não codificadores e as consequências delas no fenótipo do animal e na transmissão do mesmo para a prole.

O estágio supervisionado realizado na Universidade de Nevada, em Reno, teve então, grande significância no aprendizado, principalmente na área de pesquisas científicas, mas também na clínica e reprodução de bovinos.

8. REFERÊNCIAS

AGARWAL, A. et al. **Effect of Oxidative Stress on Male Reproduction.** World J Mens Health, v. 32, n. 1, p. 1-7, 2014.

AGARWAL, A.; GUPTA, S.; SHARMA, R. **Oxidative stress and its implications in female infertility – a clinician's perspective.** Reproductive BioMedicine Online, v. 11, n. 5, p. 641-650, 2005.

AGARWALA, A.; GUPTAA, S.; SIKKAB, S. **The role of free radicals and antioxidants in reproduction.** Current Opinion in Obstetrics and Gynecology, p. 325-332, 2006.

AGARWAL, A.; MAKKER, K.; SHARMA, R. **Clinical Relevance of Oxidative Stress in Male Factor Infertility: An Update.** American Journal of Reproductive Immunology, v. 59, n. 1, p. 2-11, 2008.

AGARWAL, A.; PRABAKARAN, S. A. **Mechanism, measurement, and prevention of oxidative stress in male reproductive physiology.** Indian Journal of Experimental Biology, v. 43, n. 11, p. 963-974, 2005.

AGARWAL, A.; PRABAKARAN, S. A.; SAID, T. M. **Prevention of Oxidative Stress Injury to Sperm.** Journal of Andrology, v. 26, n. 6, p. 654-660, 2005.

AGARWAL, A.; QIU, E.; SHARMA, R. **Laboratory assessment of oxidative stress in semen.** Arab Journal of Urology, v. 16, n. 1, p. 77-86, 2018.

AITKEN, R.; BAKER, M. **Oxidative stress, sperm survival and fertility control.** Molecular and Cellular Endocrinology, v. 250, n. 1-2, p. 66-69, 2006.

AITKEN, R.; DE IULIIS, G. **On the possible origins of DNA damage in human spermatozoa.** Molecular Human Reproduction, v. 16, n. 1, p. 3-13, 2010.

AITKEN, R. 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.; ROMAN, S. **Antioxidant Systems and Oxidative Stress in the Testes.** Oxidative Medicine and Cellular Longevity, v. 1, n. 1, p. 15-24, 2008.

ALLEN, R.; BALIN, A. **Oxidative influence on development and differentiation:** An overview of a free radical theory of development. Free Radical Biology and Medicine, v. 6, n. 6, p. 631-661, 1989.

ALVES, M. R. et al. **An Efficient Technique to Detect Sperm Reactive Oxygen Species:** The CellRox Deep Red® Fluorescent Probe. Biochemistry & Physiology: Open Access, v. 04, n. 02, 2015.

ARCHER, J.A.; RICHARDSON E.C.; HERD R.M.; ARTHUR P.F. **Potential for selection to improve efficiency of feed use in beef cattle:** a review. Australian Journal of Agricultural Research.;50(2):147-62, 1999.

BANSAL, A.; BILASPURI, G. **Antioxidant effect of vitamina E on motility, viability and lipid peroxidation of cattle spermatozoa under oxidative stress.** *Animal Science Papers and Reports*, v. 27, n. 1, p. 5-14, 2009.

BANSAL, A.; BILASPURI, G. **Effect of ferrous sulphate and ascorbic acid on motility, viability and lipid peroxidation of crossbred cattle bull spermatozoa.** *Animal*, v. 2, n. 1, p. 100-104, 2008.

BANSAL, A.; BILASPURI, G. **Effect of manganese on bovine sperm motility, viability, and lipid peroxidation in vitro.** *Animal Reproduction*, v. 5, n. 3, p. 90-96, 2008.

BANSAL, A.; BILASPURI, G. **Impacts of Oxidative Stress and Antioxidants on Semen Functions.** *Veterinary Medicine International*, v. 2011, p. 1-7, 2011.

BARBOSA, F. F. da S. **Influência dos antioxidantes na qualidade do sémen de homens em tratamento de fertilidade.** Mestrado—[s.l.] Universidade de Lisboa, 2009.

BARBOSA, T. et al. **High-fat diet reprograms the epigenome of rat spermatozoa and transgenerationally affects metabolism of the offspring.** *Molecular Metabolism*, v. 5, n. 3, p. 184-197, 2016.

BARROSO, G.; MORSHEDI, M.; OEHNINGER, S. **Analysis of DNA fragmentation, plasma membrane translocation of phosphatidylserine and oxidative stress in human spermatozoa.** *Human Reproduction*, v. 15, n. 6, p. 1338-1344, 2000.

BERGSTEIN, T.; WEISS, R.; BICUDO, S. **Técnicas de análise de sêmen**. Revista Brasileira de Reprodução Animal, v. 38, n. 4, p. 186-194, 2014.

BINDER, N.; MITCHELL, M.; GARDNER, D. **Parental diet-induced obesity leads to retarded early mouse embryo development and altered carbohydrate utilisation by the blastocyst**. Reproduction, Fertility and Development, v. 24, n. 6, p. 804, 2012.

BOHNERT, D. W; DAVY, J. S.; RAO, D. **Mineral Supplementation Of Beef Cows In The Western United States**. Western Beef Resource Committee - Cattle Producer's Handbook. Western Beef Resource Committee - Cattle Producer's Handbook, 2018.

BORGES, J. et al. **Membrana plasmática de espermatozoides bovinos: efeito de metabólitos do oxigênio, antioxidantes e criopreservação**. Revista Brasileira de Reprodução Animal, v. 35, n. 3, p. 303-314, 2011.

BRINKHOF, B. et al. **A mRNA landscape of bovine embryos after standard and MAPK-inhibited culture conditions: a comparative analysis**. BMC Genomics, v. 16, n. 1, 2015.

BROWN, B. **A review of nutritional influences on reproduction in boars, bulls and rams**. Reproduction Nutrition Development, v. 34, n. 2, p. 89-114, 1994.

BUCAK, M. et al. **Effects of antioxidants on post-thawed bovine sperm and oxidative stress parameters: Antioxidants protect DNA integrity against cryodamage**. Cryobiology, v. 61, n. 3, p. 248-253, 2010.

CAMARGO, L. **Expressão de RNAs não codificadores intrônicos longos em linhagens celulares humanas e o seu controle epigenético por metilação do DNA.** Pós Graduação—[s.l.] Universidade de São Paulo, 2012.

CAPRA, E. et al. **Small RNA sequencing of cryopreserved semen from single bull revealed altered miRNAs and piRNAs expression between High- and Low-motile sperm populations.** BMC Genomics, v. 18, n. 1, 2017.

CARONE, B. et al. **Paternaly Induced Transgenerational Environmental Reprogramming of Metabolic Gene Expression in Mammals.** Cell, v. 143, n. 7, p. 1084-1096, 2010.

CASAS, E.; CAI, G.; NEILL, J. **Characterization of circulating transfer RNA-derived RNA fragments in cattle.** Frontiers in Genetics, v. 6, 2015.

CASTRO, L. S., et al. **Sperm Oxidative Stress Is Detrimental to Embryo Development: A Dose-Dependent Study Model and a New and More Sensitive Oxidative Status Evaluation.** Oxidative Medicine and Cellular Longevity, n. 2016, 2016.

CATT, J.; HENMAN, M. **Toxic effects of oxygen on human embryo development.** Human Reproduction, v. 15, n. suppl 2, p. 199-206, 2000.

CHEN, Q. et al. **Sperm tsRNAs contribute to intergenerational inheritance of an acquired metabolic disorder.** Science, v. 351, n. 6271, p. 397-400, 2015.

CHEN, Q.; YAN, W.; DUAN, E. **Epigenetic inheritance of acquired traits through sperm RNAs and sperm RNA modifications.** Nature Reviews Genetics, v. 17, n. 12, p. 733-743, 2016.

COSTA, E. B. O; PACHECO, C. **Epigenética**: regulação da expressão gênica em nível transcricional e suas implicações. *Semina: Ciências Biológicas e da Saúde*, v. 34, n. 2, p. 125, 2013.

DENNERY, P. **Effects of oxidative stress on embryonic development**. *Birth Defects Research Part C: Embryo Today: Reviews*, v. 81, n. 3, p. 155-162, 2007.

DENNERY, P. **Oxidative stress in development**: Nature or nurture?. *Free Radical Biology and Medicine*, v. 49, n. 7, p. 1147-1151, 2010.

EL SISY, G.; ABO EL-MAATY, A.; RAWASH, Z. **Comparative blood and seminal plasma oxidant/antioxidant status of Arab stallions with different ages and their relation to semen quality**. *Asian Pacific Journal of Reproduction*, v. 5, n. 5, p. 428-433, 2016.

EVENSON, D.; LARSON, K.; JOST, L. **Sperm Chromatin Structure Assay**: Its Clinical Use for Detecting Sperm DNA Fragmentation in Male Infertility and Comparisons With Other Techniques. *Journal of Andrology*, v. 23, n. 1, p. 25-43, 2002.

FAGERLIND, M. et al. **Expression of miRNAs in Bull Spermatozoa Correlates with Fertility Rates**. *Reproduction in Domestic Animals*, v. 50, n. 4, p. 587-594, 2015.

GHAREEB, S. et al. **Post-Thaw Evaluation of Cryopreserved Bull Semen Extended In Four Different Semen Extenders**. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences*, v. 11, n. 5, p. 80-87, 2017.

GOSALVEZ, J.; TVRDA, E.; AGARWAL, A. **Free radical and superoxide reactivity detection in semen quality assessment: past, present, and future.** Journal of Assisted Reproduction and Genetics, v. 34, n. 6, p. 697-707, 2017.

GUASTI, P.; MONTEIRO, G.; PAPA, F. **Componentes do plasma seminal e sua influência sobre a criopreservação e fertilidade de espermatozóides equinos.** Veterinária e Zootecnia, v. 19, n. 2, p. 169-180, 2012.

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

HARTMAN, A. M. **Deficient and Excess Minerals in Forage in the United States.** US Department of Agriculture. Yearbook Of Agriculture, p. 1027-1043, 1939.

HE, L.; HANNON, G. **MicroRNAs: small RNAs with a big role in gene regulation.** Nature Reviews Genetics, v. 5, n. 7, p. 522-531, 2004.

Helmar, M. **Nevada Agricultural Outlook-** Technical Report Uced 2015/16-18- University Center for Economic Development, Department of Economics, University of Nevada, Reno, 2016.

IRVINE, D. et al. **DNA Integrity in Human Spermatozoa: Relationships With Semen Quality.** Journal of Andrology, v. 21, n. 1, p. 33-44, 2000.

JIANG, G. et al. **Differential Expression of Long Noncoding RNAs between Sperm Samples from Diabetic and Non-Diabetic Mice.** PLOS ONE, v. 11, n. 4, p. e0154028, 2016.

JONES, R.; MANN, T. **Damage to ram spermatozoa by peroxidation of endogenous phospholipids.** *Reproduction*, v. 50, n. 2, p. 261-268, 1977.

KOPPERS, A. et al. **Significance of Mitochondrial Reactive Oxygen Species in the Generation of Oxidative Stress in Spermatozoa.** *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, v. 93, n. 8, p. 3199-3207, 2008.

KUMARESAN, A. et al. **Sperm viability, reactive oxygen species, and DNA fragmentation index combined can discriminate between above- and below-average fertility bulls.** *Journal of Dairy Science*, v. 100, n. 7, p. 5824-5836, 2017.

LANÇONI, R. et al. **Validation of the CellRox Deep Red® fluorescent probe to oxidative stress assessment in equine spermatozoa.** *Animal Reproduction*, v. 14, n. 2, p. 437-441, 2017.

LEWIS, S.; AITKEN, R. **DNA damage to spermatozoa has impacts on fertilization and pregnancy.** *Cell and Tissue Research*, v. 322, n. 1, p. 33-41, 2005.

LOPES, S. et al. **Reactive oxygen species: potential cause for DNA fragmentation in human spermatozoa.** *Human Reproduction*, v. 13, n. 4, p. 896-900, 1998.

MAIA, M.; BICUDO, S. **Radicais livres, antioxidantes e função espermática em mamíferos: uma revisão.** *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v. 33, n. 4, p. 183-193, 2009.

MCMANUS, M.; SHARP, P. **Gene silencing in mammals by small interfering RNAs**. Nature Reviews Genetics, v. 3, n. 10, p. 737-747, 2002.

MOJICA-VILLEGAS, M. et al. **Protective Effect of Resveratrol on Biomarkers of Oxidative Stress Induced by Iron/Ascorbate in Mouse Spermatozoa**. Nutrients, v. 6, n. 2, p. 489-503, 2014.

MORGAN, C.; BALE, T. **Early Prenatal Stress Epigenetically Programs Dymasculinization in Second-Generation Offspring via the Paternal Lineage**. Journal of Neuroscience, v. 31, n. 33, p. 11748-11755, 2011.

MULLER, H. R.; PRADO, K. B. **Epigenética: Um Novo Campo da Genética**. RUBS, Curitiba, v. 1, n. 3, p. 61-69, set./dez, 2008.

NEVADA DEPARTMENT OF AGRICULTURE. **An Economic Analysis of the Food and Agriculture Sector in Nevada**. Agriculture Sector in Nevada, 2017.

OLIVEIRA, P. et al. **O Papel do Espermatozoide na Transmissão à Descendência do Risco para Diabetes Mellitus**. Revista Portuguesa de Diabetes, v. 4, n. 12, p. 149-158, 2017.

PALANI, A. **Effect of serum antioxidant levels on sperm function in infertile male**. Middle East Fertility Society Journal, v. 23, n. 1, p. 19-22, 2018.

PARRISH, J. **Bovine in vitro fertilization: In vitro oocyte maturation and sperm capacitation with heparin**. Theriogenology, v. 81, n. 1, p. 67-73, 2014.

PEÑA, F.; MARTIN, M. P.; ORTEGA F., C. **Flow Cytometry Probes to Evaluate Stallion Spermatozoa.** Journal of Equine Veterinary Science, v. 43, p. S23-S28, 2016.

PEÑA, F.; ORTEGA F., C.; MARTÍN, M. P. **New flow cytometry approaches in equine andrology.** Theriogenology, v. 86, n. 1, p. 366-372, 2016.

PLAZA DAVILA, M. 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, p. e0138777, 2015.

POOLE, S.; GROSS, G.; POTTS, R. **Selenium geochemical relationships of some northern Nevada soils.** Great Basin Naturalist: Vol. 54 : No. 4 , Article 5, 1994.

POSTON, L. et al. **Role of oxidative stress and antioxidant supplementation in pregnancy disorders.** The American Journal of Clinical Nutrition, v. 94, n. suppl_6, p. 1980S-1985S, 2011.

SALEH, R. et al. **Negative effects of increased sperm DNA damage in relation to seminal oxidative stress in men with idiopathic and male factor infertility.** Fertility and Sterility, v. 79, p. 1597-1605, 2003.

SELI, E. et al. **Extent of nuclear DNA damage in ejaculated spermatozoa impacts on blastocyst development after in vitro fertilization.** Fertility and Sterility, v. 82, n. 2, p. 378-383, 2004.

SHARMA, U. et al. **Biogenesis and function of tRNA fragments during sperm maturation and fertilization in mammals.** Science, v. 351, n. 6271, p. 391-396, 2015.

SHARMA, R.; SAID, T.; AGARWAL, A. **Sperm DNA damage and its clinical relevance in assessing reproductive outcome.** Cleveland: Center for Advanced Research in Human Reproduction, Infertility, and Sexual Function, Glickman Urological Institute, The Cleveland Clinic Foundation, 2004.

SHEN, H.; ONG, C. **Detection of oxidative DNA damage in human sperm and its association with sperm function and male infertility.** Free Radical Biology and Medicine, v. 28, n. 4, p. 529-536, 2000.

SHRILATHA, B.; MURALIDHARA. **Early oxidative stress in testis and epididymal sperm in streptozotocin-induced diabetic mice: Its progression and genotoxic consequences.** Reproductive Toxicology, v. 23, n. 4, p. 578-587, 2007.

SIKKA, S. Andrology Lab Corner*: **Role of Oxidative Stress and Antioxidants in Andrology and Assisted Reproductive Technology.** Journal of Andrology, v. 25, n. 1, p. 5-18, 2004.

SILVA, C. B.. et al. **Flow Cytometric Chromosomal Sex Sorting of Stallion Spermatozoa Induces Oxidative Stress on Mitochondria and Genomic DNA.** Reproduction in Domestic Animals, v. 51, n. 1, p. 18-25, 2016.

SIMÕES, R. et al. **Influence of bovine sperm DNA fragmentation and oxidative stress on early embryo in vitro development outcome.** REPRODUCTION, v. 146, n. 5, p. 433-441, 2013.

SINHA, A.; GUPTA, S. **Lipid Peroxidation and its Impact on Infertility.** Womens Health Gynecol, v. 4, n. 1, p. 1-10, 2018.

STOWE, H. et al. **The Bull Sperm MicroRNAome and the Effect of Fescue Toxicosis on Sperm MicroRNA Expression.** PLoS ONE, v. 9, n. 12, p. e113163, 2014.

TAYLOR, R.E.; FIELD, T.G. **Achieving cow/calf profitability through low-cost production.** Range Beef Cow Symposium, p. 199, 1995.

THUNDATHIL, J.C.; DANCE, A.L.; KASTELIC, J.P. **Fertility management of bulls to improve beef cattle productivity.** Theriogenology, Jul 1 v.86(1), p. 397-405, 2016.

WALCZAK–JEDRZEJOWSKA, R.; WOLSKI, J.; SLOWIKOWSKA–HILCZER, J. **The role of oxidative stress and antioxidants in male fertility.** Central European Journal of Urology, v. 65, p. 60-67, 2013.

YOUNG, I.; WOODSIDE, J. **Antioxidants in health and disease.** Journal of Clinical Pathology, v. 54, n. 3, p. 176-186, 2001.