



**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA ANIMAL**

**DNA LIVRE DE CÉLULA NO PLASMA SEMINAL DE TOUROS NELORE:
POSSÍVEL MARCADOR PARA QUALIDADE E CONGELABILIDADE DO SÊMEN**

Natalia Ernandes Capobianco

**BRASÍLIA, DF
2022**

Natalia Ernandes Capobianco

**DNA LIVRE DE CÉLULA NO PLASMA SEMINAL DE TOUROS
NELORE: POSSÍVEL MARCADOR PARA QUALIDADE E
CONGELABILIDADE DO SÊMEN**

Dissertação submetida ao programa de Pós-Graduação em Biologia Animal do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília, como requisito para obtenção do título de Mestre em Biologia Animal.

Orientadora: Margot Alves Nunes Dode

BRASÍLIA, DF

2022

Natalia Ernandes Capobianco

**DNA LIVRE DE CÉLULA NO PLASMA SEMINAL DE TOUROS
NELORE: POSSÍVEL MARCADOR PARA QUALIDADE E
CONGELABILIDADE DO SÊMEN**

Dissertação submetida ao programa de Pós-Graduação em Biologia Animal do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília, como requisito para obtenção do título de Mestre em Biologia Animal.

Banca examinadora:

Profa. Dra. Margot Alves Nunes Dode (Orientadora Embrapa/UnB)

Prof. Dr. Maurício Machaim Franco (Membro externo Embrapa/UFU)

Prof. Dr. José Felipe Warmling Sprícigo (Membro externo/UFG)

Suplente: Dra. Ligiane de Oliveira Leme (membro externo/UFES)

BRASÍLIA, DF

2022

Dedicatória.

À Liz.

AGRADECIMENTOS

À Deus, primeiramente, pela minha vida.

Aos meus pais, Marcos e Isabel, pelo amor e apoio em todos os momentos.

Ao Rafael, pelo companheirismo, conselhos, parceria de noites em claro e por não ter me deixado desistir.

À Dra. Margot Alves Nunes Dode, pela orientação.

A todos os colegas que passaram pelo Laboratório de Reprodução Animal durante esses anos, especialmente aos que convivi por mais tempo e me ajudaram diretamente ou indiretamente com a realização deste trabalho, Nayara, Ligiane, Luna, Isabela, Felipe, Gabriela, agradeço pelos bons momentos compartilhados.

À Luna e Dr. Maurício, um agradecimento especial pelo suporte com a biologia molecular.

À Bruna Mion, pela colaboração com as análises estatísticas do trabalho.

Aos funcionários da Embrapa e pesquisadores do LRA.

À Universidade de Brasília pelo curso de pós-graduação, em especial, à Prof^a Monica Garcia, pela disponibilidade e apoio dentro e fora da pós.

À CAPES e Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia pelo apoio financeiro.

SUMÁRIO

RESUMO.....	VIII
ABSTRACT.....	X
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	XII
LISTA DE TABELAS	XIV
LISTA DE FIGURAS.....	XVI
LISTA DE ANEXOS.....	XVIII
CAPÍTULO 1	1
1. INTRODUÇÃO GERAL.....	2
1.1. OBJETIVOS	4
1.1.1. Objetivo geral	4
1.1.2. Objetivos específicos.....	4
1.2. HIPÓTESE	4
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	5
2.1. Célula espermática	5
2.2. Plasma seminal.....	7
2.3. Avaliações espermáticas	9
2.4. Efeito da criopreservação na célula espermática	12
2.5. Efeito do touro na produção de embriões <i>in vitro</i>	14
2.6. <i>Cell-free</i> DNA.....	16
2.7. O papel da mitocôndria e o DNA mitocondrial	17
3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	19
CAPÍTULO 2	31
1. RESUMO.....	32
2. ABSTRACT.....	34
3. INTRODUÇÃO	36
4. MATERIAL E MÉTODOS	38
4.1. Animais.....	38
4.2. Coleta de sêmen, separação do plasma seminal e criopreservação.....	38
4.3. Avaliações espermáticas	38
4.4. Extração e quantificação de DNA livre de células (cfDNA) total no plasma seminal e quantificação de número de cópias de cfmtDNA por PCR em tempo real (qPCR).....	41
4.5. Produção <i>in vitro</i> de embriões	43
4.6. Coloração diferencial de embriões.....	44

4.7. Análise estatística	45
4.8. Delineamento experimental.....	45
4.8.1. EXPERIMENTO 1– Relação entre a quantidade de cfDNA presente no plasma seminal e a congelabilidade do sêmen de touros Nelore.....	46
4.8.2. EXPERIMENTO 2 – Relação entre a presença de cfDNA no plasma seminal com a capacidade do sêmen de touros Nelore de produzir embriões <i>in vitro</i>	46
5. RESULTADOS	47
6. DISCUSSÃO.....	61
7. CONCLUSÃO.....	66
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	67
ANEXOS.....	73
1. <i>Setup</i> para avaliação de espermatozoides bovinos – Hamilton-Thorne IVOS 12.3	73
2. Protocolo de sondas para avaliação espermática por citometria de fluxo	74

RESUMO

A criopreservação de sêmen é uma técnica amplamente utilizada na produção animal. Apesar de bem estabelecida em algumas espécies, a resposta à criopreservação e a capacidade do sêmen criopreservado de produzir embriões *in vitro* varia de indivíduo para indivíduo. Assim, buscando a identificação de um marcador que possa indicar a congelabilidade e fertilidade *in vitro* de uma amostra, antes do congelamento, este estudo avaliou a quantidade de DNA livre de células e o número de cópias de cfmtDNA no plasma seminal de touros Nelore. O sêmen de nove touros foi coletado por eletroejaculação, metade do ejaculado foi utilizado para avaliação do sêmen fresco e obtenção do plasma seminal para quantificação de cfDNA, a outra metade foi criopreservada. A avaliação de movimento espermático pelo CASA (IVOS 12.3/Hamilton-Thorne, EUA) e da integridade e estabilidade da membrana plasmática, integridade acrossomal, apoptose e potencial mitocondrial, por citometria de fluxo (AMNIS FlowSight - Amnis Corp., EUA) foram realizados no sêmen fresco e sêmen congelado às 0, 3, 6 e 12h após o descongelamento. O sêmen criopreservado também foi utilizado para a produção de embriões *in vitro*. A quantificação de cfDNA foi realizada no plasma seminal por espectrofotometria e o número relativo de cópias do cfmtDNA foi quantificado por qPCR. A concentração de cfDNA presente no plasma seminal variou de 15,23 ng/μL à 519,71 ng/μL. A mediana foi calculada (58,95 ng/μL) e dois grupos foram definidos de acordo com a concentração de cfDNA: Baixo-cfDNA (<58,95 ng/μL; n=5) e Alto-cfDNA (>58,95 ng/μL; n=4). O número de cópias de cfmtDNA foi semelhante ($P>0,05$) entre os grupos. No sêmen fresco, a porcentagem de células com estabilidade de membrana foi maior ($P<0,05$) no grupo Baixo-cfDNA (84,24%±7,07) comparado ao grupo Alto-cfDNA (52,72%±7,9) e, ao longo de 12 horas pós- descongelamento, não houve diferenças para todos os parâmetros avaliados entre os grupos. A taxa de clivagem e de blastocistos em D7 foi maior para o grupo Alto-cfDNA (60,74% ± 3,38 e 24,95% ± 2,56, respectivamente), do que para o grupo Baixo-cfDNA (41,21% ± 3,23 e 6,42% ± 1,14). O grupo Alto-cfDNA também produziu embriões com maior número de células. O número relativo de cópias de cfmtDNA variou entre 0,97 cópias a 24,38 cópias e, semelhante ao realizado com os dados de cfDNA, os touros foram divididos em dois grupos (Baixo-cfmtDNA e Alto-cfmtDNA), a partir da mediana (5,35 cópias). A porcentagem de espermatozoides em necrose foi maior ($p<0,05$) no grupo Alto-cfmtDNA do que o Baixo-cfmtDNA, tanto no sêmen fresco (40,6% ± 6,4 vs 17% ± 5,8

p=0,03), quanto no criopreservado (31,5±4,1 vs 19,7%±3,6 p=0,04). No sêmen fresco, VAP (109 µm/s ± 3,87) e VSL (91,5 µm/s ± 4,8) foram maiores no grupo Baixo-cfmtDNA). Para a porcentagem de espermatozoides em necrose foi detectada uma interação entre grupo e tempo (P<0,01), sendo que a porcentagem de espermatozoides em necrose que era superior no grupo Alto-cfmtDNA as 0 horas foi diminuindo ao longo do tempo, enquanto no grupo Baixo-cfmtDNA foi aumentado. Já a quantidade e qualidade de embriões produzidos foi semelhante para ambos os grupos. A concentração de cfDNA e o número relativo de cópias de cfmtDNA no plasma seminal não são capazes de predizer a congelabilidade do sêmen, mas animais com maior quantidade de cfDNA são capazes de produzir *in vitro* mais embriões e de melhor qualidade.

Palavras-chave: espermatozoide; criopreservação; cfmtDNA; produção *in vitro* de embriões.

ABSTRACT

Sperm cryopreservation is a widely used technique in animal production. Although it is well established in some species, the response to cryopreservation and the ability of cryopreserved semen to produce embryos varies depending on individual. Thus, trying to identify a marker that can indicate the freezeability and in vitro fertility of a sample, prior to freezing, the present study evaluated the amount of cell-free DNA and cfmtDNA copy number in the seminal plasma of Nellore bulls. Semen from nine bulls was collected by electroejaculation, half of the ejaculate was used to fresh semen evaluation and to obtain seminal plasma for cfDNA quantification, the other half was cryopreserved. Evaluation of sperm movement by CASA (IVOS 12.3/Hamilton-Thorne, USA) and of plasma membrane integrity and stability, acrosomal integrity, apoptosis, and mitochondrial potential by flow cytometry (AMNIS FlowSight - Amnis Corp., USA) were performed on fresh semen and frozen/thawed semen at 0, 3, 6 and 12h after thawing. Cryopreserved semen was also used for in vitro embryo production. Quantification of cfDNA was performed by spectrophotometry and the cfmtDNA copy number was quantified by qPCR. The concentration of cfDNA present in seminal plasma ranged from 15.23 ng/ μ L to 519.71 ng/ μ L. The median was calculated (58.95) and two groups were defined according to cfDNA concentration: Low-cfDNA (<58.95 ng/ μ L; n=5) and High-cfDNA (>58.95 ng/ μ L; n=4). The cfmtDNA copy number was similar ($P>0.05$) between groups. In fresh semen, the percentage of cells with membrane stability was higher ($P<0.05$) in the Low-cfDNA group (84.24% \pm 7.07) compared to the High-cfDNA group (52.72% \pm 7.9) and, over 12 hours post-thawing, there were no differences for all parameters evaluated between groups. Cleavage and D7 blastocyst rates were higher for the High-cfDNA group (60.74% \pm 3.38 and 24.95% \pm 2.56, respectively) than for the Low-cfDNA group (41.21% \pm 3.23 and 6.42% \pm 1.14). The High-cfDNA group also produced embryos with high number of cells. The relative cfmtDNA copy number ranged from 0.97 copies to 24.38 copies and, similar to the cfDNA data, the bulls were divided into two groups (Low-cfmtDNA and High-cfmtDNA), from the median (5.35 copies). The percentage of necrotic spermatozoa was higher in the High-cfmtDNA group in both fresh and thawed semen (40.6% \pm 6.4 vs 17% \pm 5.8 $p=0.03$, in fresh semen), (31.5 \pm 4.1 vs 19.7% \pm 3.6 $p=0.04$, in thawed semen). In fresh semen, VAP (109 μ m/s \pm 3.87) and VSL (91.5 μ m/s \pm 4.8) were higher in the Low-cfmtDNA group. For the percentage of sperm in necrosis, an interaction between group

and time was detected ($P < 0.01$), being the percentage of sperm in necrosis that was higher in the Alto-cfDNA group at 0 hours decreased over time, while in the Low-cfDNA group increased. Conversely, the embryo production and quality were similar for both groups. The concentration of cfDNA and the relative number of copies of cfDNA in seminal plasma are not able to predict the freezeability of semen, but animals with a greater amount of cfDNA are able to produce more embryos of better quality in vitro.

Keywords: sperm; cryopreservation; cfDNA, in vitro embryo production

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ALH - Amplitude de deslocamento lateral da cabeça
AN - Anexina V
ANOVA – Análise de variância
BCF - Frequência de batimento flagelar
BL - Blastocisto
BSP - Proteínas plasmáticas seminais bovinas
Bx - Blastocisto expandido
Ca²⁺ - íon cálcio
CASA - Análise computadorizada do movimento espermático
CCOs - Complexos de cumulus-ovócitos
cfDNA – *cell-free* DNA
cfRNA – *cell-free* RNA
cfmtDNA – *cell-free* DNA mitocondrial
CGP – Células germinativas primordiais
CTC - Hidrocloro de clortetraciclina
DNA – Ácido desoxirribonucleico
DNA - Ácido Desoxirribonucleico
ERO - Espécies reativas de oxigênio
FASLG - Fas-ligante
FDA - Diacetato de fluoresceína
FITC - Isotiocianato de fluoresceína
FIV – Fecundação *in vitro*
FSH – Hormônio folículo-estimulante
gDNA – DNA genômico
Hz - Hertz
IA - Inseminação artificial
IP - Iodeto de propídeo
Kb - kilobase
LIN - Linearidade
M540 -Merocianina 540
MCI - Massa celular interna
MG - *MitoTracker Green*

mtDNA - DNA mitocondrial

ng – Nanograma

NGF - Fator de crescimento nervoso

PBS – Solução tampão fosfato salina

PCR – Reação em cadeia da polimerase

PE - Ficoeritrina

PIV - Produção *in vitro* de embriões

PNA - *Arachis hypogaea (peanut) lectin*

PSA - *Pisum sativum lectin*

PVP - Polivinilpirrolidona

qPCR - PCR quantitativo em tempo real

SFB – Soro fetal bovino

SOF - Fluido de oviduto sintético

STR- Retilinearidade

TALP – meio de Tyrode suplementado com albumina, lactato e piruvato

TE - Trofotoderma

UBE2D3 - Ubiquitina E2D3

UV - Ultravioleta

VAP - Velocidade média da trajetória

VCL - Velocidade curvilínea

VSL - Velocidade linear progressiva

YP1 -Yo-Pro1

μL - microlitro

μm – micrômetro

μM - micromolar

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Identificação de genes, sequência de <i>primers</i> , tamanho do amplicons em pb e número de acesso no “GenBank” .	43
Tabela 2. Estatística descritiva das variáveis analisadas no sêmen fresco de nove touros da raça Nelore.	47
Tabela 3. Comparação de características das células espermáticas presentes no sêmen fresco e criopreservado de nove touros da raça Nelore (média \pm erro padrão).	48
Tabela 4 . Características das células espermáticas presentes no sêmen fresco de touros da raça Nelore com baixa e alta concentração de cell-free DNA (cfDNA) no plasma seminal (média \pm erro padrão).	49
Tabela 5. Características das células espermáticas avaliadas no momento do descongelamento do sêmen de touros da raça Nelore com baixa e alta concentração de cell-free DNA (cfDNA) no plasma seminal (média \pm erro padrão).	50
Tabela 6. Características das células espermáticas avaliadas no sêmen fresco de touros da raça Nelore com baixo e alto número relativo de cópias de cell-free DNA mitocondrial (cfmtDNA) no plasma seminal (média \pm erro padrão).	55
Tabela 7. Características das células espermáticas avaliadas no sêmen criopreservado de touros da raça Nelore com baixo e alto número relativo de cópias de cell-free DNA mitocondrial (cfmtDNA) no plasma seminal (média \pm erro padrão).	55
Tabela 8. Produção de embriões in vitro bovinos utilizando de nove touros da raça Nelore classificados de acordo com a quantidade de cell-free DNA (cfDNA) e o número relativo de cópias de cell-free DNA mitocondrial (cfmtDNA) no plasma seminal.	59
Tabela 9. Taxa de clivagem e produção de blastocistos em D6 e D7 de desenvolvimento dos grupos de baixa e alta concentração de cfDNA no plasma seminal (média \pm erro padrão).	60

Tabela 10. Avaliação do número de células embrionárias de blastocistos em D7 de desenvolvimento dos grupos de alta e baixa concentração de cfDNA (média \pm erro padrão). 60

Tabela 11. Taxa de clivagem e produção de blastocistos em D6 e D7 de desenvolvimento dos grupos de baixo e alto número de cópias de cell-free mtDNA (cfmtDNA) no plasma seminal (média \pm erro padrão) 61

Tabela 12. Avaliação do número de células embrionárias de blastocistos em D7 de desenvolvimento dos grupos de alto e baixo número de cópias de cfmtDNA (média \pm erro padrão). 61

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Representação da análise de citometria de fluxo em gráfico de dispersão e histograma. A) avaliação de integridade acrossomal pela coloração com FITC-PNA e Iodeto de Propídeo. B) avaliação de estabilidade de membrana plasmática pela coloração com Merocianina540 e YoPro1. C) avaliação da integridade de membrana e apoptose pela coloração com AlexaFluor488+AnexinaV e Iodeto de Propídeo. D) avaliação de potencial mitocondrial pela coloração com MitoTracker Green. Fonte: Arquivo Embrapa, por Natalia Capobianco 41
- Figura 2.** Blastocisto expandido corado pela técnica de coloração diferencial. À esquerda, células do trofotoderma coradas pelo IP, à direita todas as células do embrião coradas pelo Hoechst 33342. Fonte: Arquivo Embrapa, por Natalia Capobianco..... 44
- Figura 3.** Quantificação de cfDNA no plasma seminal de nove touros da raça Nelore (1-9)..... 49
- Figura 4.** Motilidade total (A), motilidade progressiva (B) e, porcentagem de espermatozoides com membrana plasmática íntegra (C), viáveis com membrana estável (D); e com potencial mitocondrial (E) as 0h, 3h, 6h, 12h pós-descongelamento nos grupos Alto-cfDNA e Baixo-cfDNA.^{A,B,C,D} Letras diferentes na mesma linha indicam diferença significativa entre diferentes momentos, por ANOVA - PROC GLIMMIX ($p < 0,05$). 52
- Figura 5.** Parâmetros de movimento espermático avaliados pelo sistema CASA: (A) velocidade média da trajetória- VAP; (B) velocidade curvilínea – VCL; (C) velocidade linear progressiva – VSL; (D) amplitude do movimento lateral da cabeça – ALH; (E) frequência de batimento flagelar-BCF; (F) retilinearidade – STR e (G) linearidade – LIN, avaliados ao longo do tempo (0h, 3h, 6h, 12h), nos grupos Alto-cfDNA e Baixo-cfDNA. ^{A,B,C,D} Letras diferentes na mesma linha indicam diferença significativa entre diferentes momentos, por ANOVA - PROC GLIMMIX ($p < 0,05$)..... 53
- Figura 6.** Número relativo de cópias de cell-free DNA mitocondrial (cfmtDNA), em relação ao DNA nuclear quantificado por q-PCR no plasma seminal de nove touros da raça Nelore (1-9). 54

Figura 7. Motilidade total (A), motilidade progressiva (B), porcentagem de espermatozoides com membrana plasmática íntegra (C), viáveis com membrana estável (D); porcentagem de espermatozoides com potencial mitocondrial (E), e vivos com acrossoma íntegro (F), as 0h, 3h, 6h, 12h pós-descongelamento nos grupos Alto-cfmtDNA e Baixo-cfmtDNA. ^{A,B,C,D}Letras diferentes na mesma linha indicam diferença significativa entre diferentes momentos, por ANOVA - PROC GLIMMIX ($p < 0,05$). .. 57

Figura 8. Parâmetros de movimento espermático avaliados pelo sistema CASA: (A) velocidade média da trajetória- VAP;(B) velocidade curvilínea – VCL; (C) frequência de batimento flagelar - BCF; (D) amplitude do movimento lateral da cabeça – ALH; (E) retilinearidade – STR e (F) linearidade – LIN, avaliados ao longo do tempo (0h, 3h, 6h, 12h), nos grupos Alto-cfmtDNA e Baixo-cfmtDNA. ^{A,B,C,D}Letras diferentes na mesma linha indicam diferença significativa entre diferentes momentos, por ANOVA - PROC GLIMMIX ($p < 0,05$). 58

Figura 9. Porcentagem de espermatozoides em necrose, avaliado ao longo do tempo (0h, 3h, 6h, 12h), nos grupos Alto-cfmtDNA e Baixo-cfmtDNA. ^{A,B} Letras diferentes na mesma linha indicam diferença significativa na interação entre grupo e tempo, por ANOVA - PROC GLIMMIX ($p < 0,05$). 59

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1 - <i>Setup</i> para avaliação de espermatozoides bovinos.....	73
Anexo 2 - Protocolo de sondas para avaliação espermática por citometria de fluxo – Hamilton-Thorne IVOS 12.3.....	74

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO, OBJETIVOS E REVISÃO DE LITERATURA

1. INTRODUÇÃO GERAL

Criopreservação de sêmen é uma biotécnica de grande importância utilizada na produção animal e na reprodução humana, além de ser essencial em qualquer programa de preservação de recursos genéticos. Na reprodução humana pode ser utilizada para preservar a fertilidade, em caso de vasectomia ou pela ocorrência de alguma condição patológica que, eventualmente, possa afetar negativamente na fertilidade, ou mesmo gerar esterilidade, como o câncer. Além disso, banco de sêmen criopreservado é um recurso importante para ajudar casais cujo homem é estéril, casais homoafetivos femininos ou mulheres que desejam ter um filho por produção independente (DEGL'INNOCENTI et al., 2013).

Com relação à reprodução animal, a criopreservação de sêmen permite maior disseminação do material genético de animais de elevado potencial produtivo, a comercialização nacional e internacional de germoplasma, bem como o armazenamento de material genético de animais que não possam, temporariamente ou permanentemente, ser utilizados. Essa técnica, portanto, tem um impacto no melhoramento animal por permitir a intensificação do uso da inseminação artificial (IA) e de outras técnicas a ela associadas, tais como produção de embriões *in vivo* e *in vitro*. A importância comercial da criopreservação de sêmen pode ser observada pelo número de doses de sêmen comercializadas no Brasil em 2021, que segundo levantamento realizado pela Associação Brasileira de Inseminação Artificial, foi 61% maior do que no ano anterior (ASBIA, 2021).

A criopreservação de sêmen está sendo utilizada desde o seu desenvolvimento, na década de 40 (POLGE et al., 1949), atingindo patamares satisfatórios de congelabilidade e fertilidade em algumas espécies. Entretanto, o congelamento do sêmen também pode acarretar alterações na qualidade do material, tais como danos físicos ou funcionais no espermatozoide, com diminuição da fertilidade se comparado ao sêmen fresco (HOLT, 2000). Portanto, mesmo utilizando amostras de sêmen com características morfológicas similares previamente à criopreservação, a resposta dos indivíduos, refletida pela qualidade espermática e de fertilidade pós criopreservação, é muito variável. Desta forma, diferentes autores classificam os indivíduos como sendo produtores de sêmen de alta ou baixa congelabilidade de acordo com a resposta a criopreservação (HOLT, 2000). Essa resposta está, na maioria dos casos, relacionada às características estruturais,

principalmente da membrana, o que é geneticamente determinado, fazendo com que os indivíduos tenham maior ou menor predisposição à sobrevivência ao estresse da criopreservação (WATSON, 2000).

Assim, a identificação de um marcador de fácil obtenção, que possa indicar se uma amostra de sêmen é de alta ou baixa congelabilidade, previamente ao congelamento, poderia evitar a perda econômica causada pelo custo da realização do congelamento e pelo uso de sêmen com baixa fertilidade nos rebanhos. Diversos estudos têm sido realizados visando identificar esses marcados utilizando, isolados ou em associação, vários parâmetros de avaliação como exemplo, a motilidade, integridade e atividade mitocondrial dos espermatozoides (KORDAN et al., 2013, MORRELL et al., 2018). A identificação de proteínas presentes no plasma seminal também tem sido uma fonte de busca de um marcador, já que diferem entre animais com fenótipos diferentes de congelabilidade (GOMES et al., 2020). Entretanto, até o presente nenhum parâmetro ou conjunto de parâmetros que possam prever com confiabilidade a fertilidade foram identificados.

Nos últimos anos, vários estudos têm mostrado que a presença de cfDNA no plasma seminal está correlacionado a parâmetros de fertilidade em homens (CHOU et al., 2004; LI et al., 2009). Além disso, COSTA et al. (2017) associaram os níveis de cfDNA a baixa viabilidade espermática, como alterações em sua motilidade e alterações de morfologia, indicando possível aplicação do cfDNA no diagnóstico de infertilidade. Esses resultados trazem uma nova alternativa para a busca de marcadores não invasivos para congelabilidade e fertilidade de machos. Portanto, o presente objetivou avaliar se o cfDNA (quantificação de cfDNA total e número de cópias de DNA mitocondrial) presente no plasma seminal de touros Nelore pode estar relacionado à qualidade seminal, sua tolerância a criopreservação e sua capacidade de produzir embriões *in vitro*.

1.1. OBJETIVOS

1.1.1. Objetivo geral

Avaliar se a presença de cfDNA e número de cópias de DNA mitocondrial no plasma seminal de bovinos Nelore podem ser utilizados como marcadores para a qualidade do sêmen, sua tolerância à criopreservação e sua capacidade de produzir embriões *in vitro*.

1.1.2. Objetivos específicos

- Determinar a quantidade de cfDNA e o número de cópias de cfmtDNA presentes no plasma seminal de bovinos Nelore;
- Avaliar as características seminais em diferentes momentos após congelamento/descongelamento;
- Avaliar se a quantidade de cfDNA está relacionada com a qualidade seminal antes e depois do congelamento;
- Avaliar se a quantidade de cfDNA no plasma seminal está relacionada com a capacidade do sêmen de produzir embriões *in vitro*.

1.2. HIPÓTESE

A quantidade de DNA livre no plasma seminal de bovinos Nelore está relacionada a qualidade seminal, criotolerância e capacidade de produzir embriões *in vitro*.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Célula espermática

Espermatozoides ou gametas masculinos são produzidos nos testículos através de um processo chamado de espermatogênese, tendo as primeiras células liberadas na puberdade, embora os eventos relacionados à espermatogênese iniciem-se durante a vida fetal. As células que dão origem aos espermatozoides, chamadas células germinativas primordiais (CGPs), são encontradas na parede do saco vitelínico e, migram para o local em que irão formar as gônadas. A espermatogênese é um longo processo que envolve uma série de divisões mitóticas das espermatogônias, duas divisões meióticas dos espermatócitos, remodelação morfológica extensa das espermátides haploides e a liberação de espermatozoides diferenciados na luz dos túbulos seminíferos (HAFEZ e HAFEZ, 2004).

Durante a formação do testículo as células germinativas primordiais migram para a crista genital, quando a migração se completa essas células ocupam posição no centro dos cordões sexuais, que formarão os túbulos seminíferos. Nesse momento, tais células dividem-se por mitose ocupando os cordões sexuais e passam a ser chamadas de gonócitos, os quais não se dividem e permanecem inativos até pouco antes da puberdade. Os gonócitos são circundados pelas células de sustentação e uma membrana basal proeminente (BRITO, 2014).

A espermatocitogênese se refere a essa primeira fase da espermatogênese e envolve as espermatogônias, que são células germinativas diploides, originárias dos gonócitos, e que se dividem mitoticamente. Antes da puberdade, os gonócitos sofrem modificações para formar as espermatogônias e após a divisão mitótica das espermatogônias tipo B2 é gerado o espermatócito primário que, imediatamente, inicia a meiose, após a síntese ativa de DNA. A partir da primeira divisão meiótica originam-se dois espermatócitos secundários haploides, que contém metade do número de cromossomos, e entram na segunda divisão meiótica produzindo rapidamente quatro espermátides arredondadas haploides (STAUB e JOHNSON, 2018).

As espermátides sofrem uma série de modificações morfológicas progressivas, transformando-se em espermátides alongadas, com cabeça e cauda e que serão liberadas na luz dos túbulos seminíferos, processo chamado de espermiogênese. Durante esse processo ocorrem a formação do acrossomo, a condensação da cromatina, a reorganização das mitocôndrias e a eliminação de grande parte do

citoplasma. Finalmente, no processo de espermição, quando acontece a liberação da espermátide em forma de espermatozoide na luz dos túbulos seminíferos, grande porção de citoplasma da célula é eliminada formando o corpo residual, que é fagocitado e digerido pelas células de Sertoli. A região do pescoço da espermátide é ligada a esse excesso de citoplasma, permanecendo como uma gota citoplasmática na região da peça intermediária quando o espermatozoide é liberado do testículo (FLESCHE e GADELLA, 2000).

Os espermatozoides possuem dois componentes principais, a cabeça e a cauda. A cabeça do espermatozoide possui formato arredondado e achatado, é envolta pela membrana plasmática e abriga, na sua parte anterior, o acrossomo e o núcleo. O acrossomo é delimitado pelas membranas acrossomais interna e externa e é composto por enzimas essenciais para a fecundação, como a hialuronidase e acrosina, responsáveis pelas reações de digestão necessárias para a penetração do espermatozoide na zona pelúcida do ovócito, denominada reação acrossomal (BOERKE et al., 2008).

O núcleo é envolto pelo envelope nuclear e contém a cromatina altamente condensada. O processo de condensação da cromatina ocorre com a substituição de proteínas histonas por protaminas, tornando-a altamente condensada e com maior estabilidade. Quanto maior o grau de condensação, ou seja, menor quantidade de histonas restantes na cromatina, maior proteção contra fragmentação do DNA. A porcentagem de proteínas histonas substituídas difere entre as espécies, e falhas neste processo estão relacionadas com diminuição a fertilidade (BALHORN, 2007; MILLER et al., 2010).

A cauda, também denominada flagelo, do espermatozoide é formada pelo colo e pelas peças intermediária, principal e terminal, sendo o colo a região que se liga a cabeça. É composta por um axonema central, onde encontram-se nove pares de microtúbulos que se organizam ao redor de dois microtúbulos centrais (BARTH e OKO, 1989). Na região da peça intermediária o axonema é envolvido pelas mitocôndrias, responsáveis pela produção de energia para o batimento flagelar.

A membrana plasmática envolve toda a célula e sua função se torna mais específica de acordo com a região do espermatozoide que recobre. É composta por uma bicamada lipídica, associada a proteínas, colesterol, glicoproteínas e glicolipídios, organizados como um mosaico fluido. A composição lipídica da membrana é o que determina sua permeabilidade, estabilidade e fluidez, sendo assim,

crucial a manutenção de sua estrutura para a viabilidade da célula (ALBERTS et al., 1994; FLESCHE e GADELLA, 2000).

Após o processo de espermiogênese, os espermatozoides necessitam passar por dois processos indispensáveis para o sucesso da fecundação, a maturação no epidídimo e capacitação após a ejaculação. Durante a maturação no epidídimo é que ocorre a protaminação da cromatina e as células adquirem motilidade progressiva. Ao chegarem ao trato reprodutivo da fêmea, um reservatório de espermatozoides é formado na tuba uterina, de onde se soltam gradativamente quando ocorre a ovulação. A liberação dos espermatozoides do reservatório acontece à medida que vão sofrendo as alterações fisiológicas como, efluxo de colesterol da membrana, aumento de íons Ca^{2+} intracelular e hipermotilidade das células, que caracterizam a capacitação espermática (MORTIMER et al., 1998; JUYENA e STELLETTA, 2012). Os espermatozoides capacitados então, podem se ligar as glicoproteínas da zona pelúcida do ovócito (ZP3), cuja ligação induz a reação do acrossomo, que se refere a fusão da membrana acrossomal externa e a membrana plasmática, permitindo a liberação do conteúdo acrossomal e a exposição de outro receptor. O espermatozoide, nesse momento pode se ligar a outra glicoproteína do ovócito (ZP2) e com o auxílio das enzimas liberadas e a hipermotilidade, consegue passar pela zona pelúcida e concluir a penetração (HAFEZ e HAFEZ, 2004). Após a penetração no ovócito, a célula espermática passa pelo processo de descondensação da cromatina, agora substituindo as protaminas por proteínas histonas, em seguida uma nova membrana é formada, originando o pró-núcleo no citoplasma do ovócito (MCLAY e CLARKE, 2003). Desta maneira, a capacidade de fecundação do espermatozoide é inteiramente dependente da integridade do material genético bem como de toda a estrutura da célula espermática.

2.2. Plasma seminal

O plasma seminal é produzido principalmente pelas vesículas seminais, próstata e glândulas bulbouretrais e contém secreções vindas dos testículos e epidídimo (HAFEZ e HAFEZ, 2004). Sua principal função do plasma seminal é servir de veículo, fonte de nutrição e proteção para os espermatozoides, mantendo-os viáveis no trato reprodutivo da fêmea (JUYENA e STELLETTA, 2012). Para isto, possui uma complexa composição, tendo como principais constituintes alguns açúcares, especialmente a frutose, lipídios, proteínas, íons, metabólitos, *cell-free*

DNA, RNA e microRNAs (SAMANTA et al., 2018), que varia entre espécies e entre indivíduos da mesma espécie (KILLIAN et al., 1993). Em estudo recente, 1445 proteínas foram identificadas em amostras de touros holandeses (GOMES et al., 2020), das quais 338 estavam diferencialmente expressas em touros de alta a baixa congelabilidade.

Dentre as proteínas presentes no plasma seminal, estão as proteínas plasmáticas seminais bovinas (BSPs). Estas proteínas se ligam ao espermatozoide no momento da ejaculação, e são responsáveis pela ligação à heparina, que por sua vez induz a capacitação espermática (PARRISH, 2014). Tais proteínas possuem efeito positivo na fertilidade, no entanto, o contato prolongado do espermatozoide com essas proteínas no plasma seminal durante a criopreservação demonstra-se prejudicial (LUSIGNAN et al., 2011; PLANTE et al., 2016; DRUART et al., 2019). Alguns trabalhos sugerem que as proteínas presentes no plasma seminal de bovinos e suínos tenham efeito pós-fecundação, na clivagem e desenvolvimento inicial do embrião (MEMILI et al., 2020).

Dada a importância dessas proteínas para a fertilidade, vários trabalhos em bovinos têm sido realizados visando identificar proteínas com potencial de serem marcadores para a qualidade, a fertilidade e congelabilidade do sêmen, utilizando a proteômica (KWON et al., 2015; REGO et al., 2016; DIETRICH et al., 2018). Moura et al. (2006) identificaram altos níveis de proteínas espermadesinas Z13 em touros com baixa fertilidade, e altos níveis de osteopontina e fosfolipase A2 em touros com alta fertilidade. Além disso, Rego et al. (2016) observaram a osteopontina-K, precursor de DNASE γ e DNASE1L3 mais abundante em touros com sêmen de alta congelabilidade. Um estudo recente também observou uma correlação positiva de osteopontina e negativa da lipase com a fertilidade de touros (WILLFORSS et al., 2021). Estudos em outras espécies também são relatados, sendo que em suínos a fibronectina 1 presente no plasma seminal foi identificada como potencial marcador para boa congelabilidade do sêmen (VILAGRAN et al., 2015) e a atividade da enzima β -N-Acetil Hexosaminidase como indicador de criotolerância (WY SOCKI et al., 2015).

Ugur e colaboradores (2020), avaliando o perfil de aminoácidos presente no plasma seminal de touros com alta ou baixa congelabilidade encontraram a fenilalanina mais abundante no grupo de touros com boa congelabilidade, indicando este aminoácido como possível marcador. Através da análise de metabólitos

presentes no plasma seminal de touros, Velho e colaboradores (2018) encontraram mais frutose e menos ácido 2-oxoglutárico em touros de alta fertilidade.

Estes estudos demonstram a influência da composição do plasma seminal na fertilidade e criotolerância do sêmen, e assim, a necessidade de se avaliar outros componentes para tentar identificar marcadores para qualidade seminal, pois até o presente não se tem um marcador que seja confiável e de fácil utilização.

2.3. Avaliações espermáticas

As análises espermáticas rotineiras incluem a avaliação subjetiva da motilidade, morfologia e concentração de espermatozoides na amostra. Entretanto, para que o espermatozoide seja capaz de alcançar o ovócito e concluir a fecundação, seja no trato reprodutivo da fêmea ou na produção *in vitro* de embriões (PIV), é necessário que outros processos, tais como a capacitação espermática, reação acrossomal e descondensação da cabeça ocorram. Portanto, mesmo apresentando parâmetros normais de motilidade e morfologia, o espermatozoide pode apresentar alterações estruturais que afetam sua capacidade de fecundar, que avaliações de rotina não são capazes de detectar. Portanto, outras técnicas devem ser usadas, em associação com avaliações rotineiras, na tentativa de estabelecer uma correlação com a qualidade seminal e fertilidade (SELLEM et al., 2015; GLIOZZI et al., 2017).

Em busca de uma avaliação mais objetiva da proporção de espermatozoides móveis em uma amostra, diferentes sistemas de avaliação automatizada da motilidade têm sido desenvolvidos. Entre eles, o sistema de análises computadorizada do movimento espermático (CASA), que avalia com objetividade e maior acurácia a cinética de movimento espermático. Este sistema é capaz de avaliar não somente a porcentagem de células móveis, mas também a cinética de movimento da célula, assim diferenciando os padrões de motilidade entre amostras (MATOS et al., 2008). No sistema CASA, um *software* baseado nas imagens de um microscópio ótico detecta o movimento das células através de algoritmos que conectam centroides à cabeça dos espermatozoides, e assim identifica a porcentagem de espermatozoides móveis e com motilidade progressiva, mede a velocidade, o trajeto da célula, sua linearidade e a frequência de batimentos do flagelo (BOE-HANSEN et al., 2019; YESTE et al., 2018).

Essas variáveis de cinética espermática têm sido estudadas pela maioria dos autores. Ibanescu e colaboradores (2020) identificaram que uma população de

espermatozoides com movimento rápido não linear na amostra está relacionada com melhor qualidade seminal e fertilidade do touro, avaliando o sêmen antes do congelamento. Outro estudo, avaliando touros de alta e baixa fertilidade, observou maiores valores de amplitude lateral da cabeça (ALH) e velocidade linear progressiva (VSL), e menores valores de linearidade (LIN) em amostras de touros com maior fertilidade (SHOJAEI et al., 2012).

Além das avaliações de motilidade, é importante avaliara integridade da célula, essencial para sua funcionalidade, como a integridade das membranas plasmática e acrossomal, a estabilidade da membrana plasmática, apoptose e atividade mitocondrial.

A integridade da membrana plasmática pode ser avaliada com a utilização de corantes que podem ser permeáveis à célula integra ou lesada. São exemplos: a eosina, um corante supravital incapaz de penetrar a membrana intacta, como também o diacetato de fluoresceína (FDA), um corante anfipático que penetra nas células viáveis e é desacilado por esterases, tornando-se fluorescente e incapaz de sair das células intactas (SILVA e GADELLA, 2006). Essa análise também pode ser realizada utilizando sondas fluorescentes que se ligam a partes específicas da célula. Entre elas pode-se citar o Iodeto de propídeo (IP), um corante fluorescente que somente penetra na célula com a membrana lesada e se liga ao DNA e o SYBR-14, utilizado para marcação de células integras (KUMAR et al., 2017; BUCHER et al., 2019). No caso de uso de sondas fluorescentes para avaliação de características, além da microscopia de epifluorescência, pode-se utilizar a citometria de fluxo. Esse é o método mais indicado, pois a sua utilização permite uma análise rápida e objetiva de milhares de células, além da avaliação de diversos parâmetros em uma única amostra (GILLAN et al., 2005). A integridade da membrana é uma das características mais utilizadas, e vários autores relatam o seu uso para avaliar qualidade de uma amostra de sêmen. De fato, na literatura, a integridade de membrana foi utilizada para comparar a qualidade seminal de espermatozoides ejaculados e do epidídimo, através do Iodeto de propídeo (CUNHA et al., 2019). Utilizando os corantes SYBR-14 e IP, Shojaei e colaboradores (2012) observaram maior viabilidade espermática em touros de alta fertilidade. Além disso, Morrell e colaboradores (2017) observaram correlação entre a integridade da membrana plasmática e a linearidade dos espermatozoides com a fertilidade de touros ($r=0,4$ e $r=0,37$, respectivamente).

Outra avaliação que pode ser realizada nas células espermáticas é a de estabilidade da membrana plasmática. Durante o processo de capacitação espermática ocorre a reorganização da membrana, com desordem lipídica, que gera sua desestabilização o que indica que o espermatozoide tem habilidade de sofrer esse processo, que é essencial para a sua ligação à zona pelúcida do ovócito (FLESH e GADELLA, 2000). Para esta avaliação, pode ser utilizado o corante Merocianina 540, que detecta alterações dos fosfolipídios da membrana ligando-se a fosfatidilcolina; ainda pode ser utilizado em uma sonda combinada com o corante Yo-Pro1 para identificar células viáveis, não capacitadas (HALLAP et al., 2006). Uma avaliação mais acurada para a capacitação espermática é através de um quelante de Ca^{2+} , o hidrocloreto de clortetraciclina (CTC), visualizado em microscopia de epifluorescência (ASLAM et al., 2018). Apesar da avaliação da desordem lipídica da membrana ser apenas um indicativo que o espermatozoide está em processo de capacitação, Merocianina pode ser utilizada na citometria de fluxo, o que não é possível com o CTC (MARTINEZ-PASTOR et al., 2010). Apesar de controversa, a estabilidade da membrana avaliada pelo merocianina tem sido utilizada como indicativo de capacitação em diversos estudos em bovinos (BERGQVIST et al., 2007; CARVALHO et al., 2018), cães (STECKLER et al., 2015) e suínos (VADNAIS e ALTHOUSE, 2011).

A integridade acrossomal é um parâmetro extremamente importante para a função espermática, pois espermatozoides com o acrossomo lesado não poderão mais fecundar e morrerão muito rapidamente. Para avaliação da integridade do acrossomo, é comumente utilizada uma lectina, *Pisum sativum* (PSA) ou *Arachis hypogaea* (peanut -PNA), conjugadas a uma sonda fluorescente (isotiocianato de fluoresceína (FITC) ou ficoeritrina (PE). Essas lectinas possuem afinidade pelas glicoproteínas da membrana externa do acrossomo, apresentando coloração quando houver dano ou reação acrossomal (CELEGHINI et al., 2007; CUNHA et al., 2015). Estudo prévio acerca da fertilidade de touros, ao avaliar integridade acrossomal através de FITC-PNA não encontrou diferença significativa de integridade de acrossomo em amostras de alta ou baixa fertilidade, indicando que, apesar de seu bom funcionamento ser essencial para a fecundação, as alterações na funcionalidade da membrana e seu efeito na fertilidade ainda não são bem compreendidas (KUTCHY et al., 2019).

O processo de apoptose também pode ser avaliado no espermatozoide. No início desse processo ocorrem modificações na célula. Uma das alterações que

ocorrem na membrana plasmática é a externalização de fosfatidilserina, que normalmente encontra-se na face interna da membrana. Este processo pode ser identificado através da ligação da proteína não-fluorescente Anexina V à fosfatidilserina, conjugada a um fluorocromo. É possível fazer associações dos corantes para avaliações simultâneas em cada célula (CELEGHINI et al., 2007; BUCHER et al., 2019). A associação do IP numa sonda com Anexina nos permite identificar as células que sofreram a morte celular programada ou as que morreram devido a um dano não fisiológico (necrose), e a partir destas avaliações é possível identificar os danos possivelmente ocasionados pelo congelamento. Um estudo de Anzar et al. (2002) utilizando a sonda Anexina V + IP sugere que a criopreservação pode induzir a translocação da fosfatidilserina, no entanto, a presença de células apoptóticas no sêmen fresco pode estar relacionado a baixa fertilidade em touros.

A motilidade espermática é dependente da atividade mitocondrial da célula, assim pode-se avaliar pelo uso de sondas fluorescentes o potencial mitocondrial do espermatozoide. O Mitotracker Green e o JC-1 são os corantes comumente utilizados para esta finalidade. O Mitotracker Green é um corante que se torna fluorescente quando acumulado no ambiente lipídico da mitocôndria, indicando presença de potencial mitocondrial (CELEGHINI et al., 2007). O corante JC-1 é capaz de diferenciar alto e baixo potencial mitocondrial, fluorescendo de cores diferentes dependendo da sua concentração na mitocôndria; emite fluorescência verde quando há baixo potencial mitocondrial, pois, se apresenta em monômeros na mitocôndria, e laranja, formando agregados, quando há alto potencial mitocondrial (CUNHA et al., 2015). Umezu et al. (2020), avaliando aglutinação de espermatozoides bovinos, avaliaram o potencial mitocondrial através do JC-1, relacionando com a motilidade espermática, onde espermatozoides aglutinados apresentaram motilidade aumentada e alto potencial mitocondrial.

2.4. Efeito da criopreservação na célula espermática

O congelamento do sêmen é a melhor maneira para conservação deste material a longo prazo, permitindo amplamente seu uso. Entretanto, durante o processo de criopreservação, a célula passa por estresse térmico, osmótico e oxidativo (KUMAR et al., 2019), além da formação de cristais de gelo (GRÖTTER et al., 2019), podendo gerar danos aos espermatozoides.

Em 1972, Kumar e colaboradores sugeriram que os danos causados pela criopreservação se devem a dois fatores, à formação de gelo e a desidratação celular, processos que estão relacionados a velocidade do congelamento, sendo que os principais danos na célula espermática se refletem na redução da motilidade, diminuição da atividade mitocondrial e alterações na membrana plasmática (HOLT et al., 2000).

A capacidade de o espermatozoide sobreviver e ser funcional após a criopreservação é variável entre as espécies e indivíduos. A composição lipídica da membrana plasmática do espermatozoide está relacionada com sua tolerância ao congelamento, devido a mudança do estado fluido para um estado mais rígido em temperaturas menores, e aqueles que possuem maior quantidade de ácidos graxos poliinsaturados e mais colesterol na membrana parecem ser mais resistentes ao choque térmico (LEMMA, A., 2011). De fato, comparando as espécies, espermatozoides humanos possuem maior resistência a baixa temperatura do congelamento, assim como a configuração da membrana de galos confere mais resistência, enquanto espermatozoides equinos e bovinos são mais sensíveis ao choque térmico e ao estresse oxidativo causado pela criopreservação (MOCE et al., 2010; LEMMA, 2011). Além da estrutura da membrana, outros fatores estão envolvidos com as diferenças de congelabilidade, como fatores ambientais (estação, dieta) e diferenças genéticas (YESTE et al., 2016).

As fases do congelamento do sêmen envolvem a sua diluição em meio crioprotetor, curva de resfriamento e o congelamento. Um resfriamento rápido impede que a desidratação da célula ocorra de maneira adequada, possibilitando a formação de cristais de gelo, enquanto o resfriamento lento pode levar a desidratação excessiva, causando danos devido a solução hipertônica no interior da célula (WATSON, 2000). Avaliando as etapas do congelamento de sêmen de touros, Yoon et al. (2015) identificaram redução na motilidade e da atividade mitocondrial na etapa de adição de crioprotetor, após o resfriamento da amostra; aumento da reação acrossomal na etapa de resfriamento, e ainda; consideraram a etapa de congelamento/descongelamento a mais crítica devido ao estresse osmótico envolvido, levando a alterações na permeabilidade, além de danos nos fosfolipídios da membrana pela excessiva produção de espécies reativas de oxigênio (EROs).

O estresse oxidativo no espermatozoide possui papel importante na sua capacitação, no entanto, um desequilíbrio entre a produção de EROs e os mecanismos biológicos para neutralizá-la levam a danos na célula. O processo de criopreservação aumenta o estresse oxidativo nos espermatozoides (KUMAR et al., 2019), então, a inclusão de aditivos como, por exemplo, antioxidantes no meio de congelamento são estratégias para aumentar a viabilidade do sêmen pós descongelamento (YESTE et al., 2016). A adição de nano partículas de oxido de zinco ao meio de congelamento já foi relatada como estratégia para preservar a integridade da cromatina e a funcionalidade de espermatozoides humanos (ISAAC et al., 2017). Em estudo recente, foi observado que a adição de melatonina ao diluente do sêmen conferiu um efeito protetor à membrana plasmática e acrossomal dos espermatozoides pós descongelamento (CHAITHRASHREE et al., 2020). Portanto, melhoria nos protocolos de congelamento são de grande importância na tentativa de minimizar os danos.

2.5. Efeito do touro na produção de embriões *in vitro*

Além da inseminação artificial (IA), uma outra biotecnia reprodutiva que tem se destacado nos últimos anos é produção *in vitro* de embriões (PIV). Essa técnica começou a ser utilizada comercialmente no início dos anos 2000 e desde então, o seu uso tem crescido exponencialmente, inclusive superando toda a produção *in vivo* de embriões do país (VIANA et al., 2018). O significado desse crescimento se torna evidente quando se faz uma comparação entre a produção de embriões no Brasil em relação ao cenário mundial, isso porque o país assumiu uma posição de destaque no uso da tecnologia tornando-se uma referência mundial na técnica (VIANA et al., 2018). Entretanto, apesar de todo o avanço, a eficiência da técnica tem permanecido relativamente estável nos últimos 10 anos, com taxa de produção de embriões em torno de 35% (LACERDA et al., 2020; LEME et al., 2020; MENDONÇA-SOARES et al., 2022).

Vários fatores podem ser responsáveis pelos índices obtidos e ainda precisam ser resolvidos para que a tecnologia tenha uma implementação mais ampla. Dentre esses fatores pode-se citar a reduzida qualidade dos ovócitos após a maturação *in vitro* (DIÓGENES et al., 2017), reduzida fertilidade do sêmen sexado (CARVALHO et al., 2018), menor criotolerância dos embriões produzidos, além da menor taxa de gestação e maior perda até o nascimento quando comparado com embriões

produzidos *in vivo* (FERRÉ et al., 2020). Outro limitante no uso comercial da PIV é a grande variação individual entre touros quanto à capacidade de produzir embriões, sendo que alguns animais apresentam baixa ou nenhuma produção, mesmo apresentando resultados satisfatórios na IA.

A diferença de produção de embriões *in vitro* está descrita na literatura, onde Leme e colaboradores (2019) relataram que o touro afetou não só a produção de embriões, mas também a resposta desses embriões a criopreservação. O efeito individual do touro na produção e na cinética de desenvolvimento embrionário já foi evidenciado por outros autores (WARD et al., 2002; ALOMAR et al., 2007; AKYOL et al., 2014). Entretanto, há ainda observações divergentes e não está claro qual o efeito paterno no desenvolvimento do embrião (ALOMAR et al., 2007; ALMEIDA et al., 2021). Estudos acerca de mecanismos moleculares buscam mostrar tal efeito.

Foi demonstrado que os padrões de metilação do DNA espermático está relacionado com a fertilidade, em estudo onde sete genes envolvidos com o desenvolvimento inicial do embrião foram identificados dentro de dez regiões diferentemente metiladas (STIAVNICKA et al., 2022). Em outro estudo, foram observados, em embriões de 2 a 4 células, 472 RNAs originados exclusivamente do espermatozoide, demonstrando sua contribuição para o embrião após a fecundação (GROSS et al., 2019).

Almeida e colaboradores (2021) obtiveram resultados em relação a cinética de clivagem e características de blastocistos semelhantes em touros de alta e baixa fertilidade *in vitro*; no entanto, encontraram níveis de transcritos relacionados ao estresse oxidativo e apoptose diferentes, que sugerem efeito prejudicial de touros de baixa fertilidade na viabilidade dos embriões.

Existe uma diferença entre os touros na cinética de penetração, assim como no término do primeiro ciclo celular e primeira clivagem após a fecundação. Essa cinética está relacionada com a qualidade dos embriões, pois aqueles que clivam mais rápido possuem melhor chance de se desenvolverem até o estágio de blastocisto e são de melhor qualidade. Portanto, o momento da clivagem e a capacidade dos embriões de se desenvolverem podem estar relacionados a fatores intrínsecos da célula espermática que não são aparentes ou detectado nos exames rotineiros (FAIR e LONERGAN, 2018).

Vários estudos têm sido feitos na tentativa de correlacionar testes de avaliação de sêmen congelado com a fertilidade *in vitro* de touros sendo que, até o presente os

resultados são inconclusivos (HOLDEN et al., 2017; GLIOZZI et al., 2017; CASTRO et al., 2018).

2.6. Cell-free DNA

O cfDNA consiste em fragmentos, principalmente de dupla-fita de DNA, circulantes em diversos fluidos corporais, caracterizados pelo pequeno tamanho (menor que 200bp), baixo peso molecular e baixa concentração, e inclui DNA nuclear e mitocondrial. A origem deste material genético livre ainda não está completamente esclarecida; sabe-se que é liberado por células apoptóticas e necróticas, mas também é liberado ativamente por células vivas normais, o que sugere a possibilidade deste DNA atuar como uma molécula sinalizadora para comunicação entre células (SURAJ et al., 2017).

A avaliação de cfDNA tem sido utilizada no diagnóstico pré-natal desde a descoberta da presença de DNA fetal circulante no plasma materno, em 1997 (LO et al., 1997), e no diagnóstico de diversas doenças, especialmente o câncer (SCHWARZENBACH et al., 2011). Pacientes com diversos tipos de câncer apresentam maior quantidade de cfDNA no plasma sanguíneo ou soro, e o DNA tumoral também pode ser encontrado circulante (SALVI et al., 2016; RANUCCI, 2019).

Dentro da reprodução assistida, Xu et al (2016) utilizaram o DNA livre no meio de cultivo de embriões para avaliar a ploidia do embrião pré-implantação, e o uso desse material pode ser uma opção para substituir a biopsia embrionária, com a vantagem de não ser invasivo (HUANG et al. 2019). Com o propósito de prever a qualidade embrionária, Scalici et al. (2014) avaliaram cfDNA de amostras de líquido folicular e observaram menores níveis de cfDNA no líquido de folículos correspondentes a embriões de melhor qualidade. Altas concentrações de cfDNA no líquido folicular também foi relacionado com baixa competência ovocitária em suínos (ICHIKAWA et al., 2019).

Através do cfDNA presente no plasma seminal, um estudo avaliou o perfil de metilação de promotores de genes expressos nos testículos e específicos do epidídimo, indicando como potencial biomarcador epigenético para diagnóstico de infertilidade ou tumores de testículo e epidídimo (WU et al., 2013). Ponti e colaboradores (2019), estabeleceram um método para avaliação de tamanho de fragmentos e distribuição de cfDNA e sugeriram sua utilização para o diagnóstico não invasivo de câncer de próstata.

Correlacionando o cfDNA encontrado no plasma seminal com parâmetros de qualidade seminal, Chou et al. (2004) encontraram correlação positiva entre a quantidade de cfDNA de baixo peso molecular e motilidade progressiva rápida, velocidade curvilínea, morfologia e índice de capacitação normais. Por outro lado, Li et al. (2009) observaram maior concentração de cfDNA em amostras de pacientes azoospermicos, assim como Di Pizio et al. (2020) relacionaram maior quantidade de cfDNA a pior qualidade do sêmen. Além disso, a concentração de cfDNA no plasma seminal foi sugerida como marcador para estresse oxidativo, uma vez que um experimento induzindo o estresse apresentou aumento nos níveis de cfDNA e diminuição da viabilidade dos espermatozoides (revisado por QASEMI et al., 2021).

Diversos estudos encontrados na literatura foram realizados em humanos, no entanto, em bovinos apesar de haver um estudo que avalia a associação de RNA livre no plasma seminal com parâmetros de qualidade seminal e criotolerância (SHILPA et al., 2017), não existe nenhum relato cujo foco seja a presença de cfDNA no plasma seminal.

2.7. O papel da mitocôndria e o DNA mitocondrial

As mitocôndrias espermáticas possuem características diferentes das mitocôndrias de células somáticas, para assegurar a funcionalidade dos espermatozoides. Altos níveis de energia, produzidos principalmente pelas mitocôndrias, são fundamentais para a motilidade espermática de hiperativação, capacitação, reação acrossomal e fecundação. Além da produção de energia, as mitocôndrias também estão relacionadas a apoptose, pois liberam fatores que induzem de apoptose.

O DNA mitocondrial é uma molécula circular de dupla fita e, em mamíferos, tamanho de 16 kb. Possui 37 genes que codificam 13 peptídeos, os quais são componentes da cadeia transportadora de elétrons, além de 2 RNAs ribossômicos e 22 RNAs transportadores (BENKHALIFA et al., 2014; MORAES et al., 2018).

O espermatozoide de mamíferos, em geral, possui de 22 a 75 mitocôndrias na peça intermediária, sendo que ocorre eliminação de DNA mitocondrial durante a maturação espermática, e o número de cópias de mtDNA presente no espermatozoide é relativamente pequeno (10 a 100) quando comparado a ovócitos (mais de 100000) (TIAN et al., 2014).

A análise do número de cópias de mtDNA livre de células já foi relatado em diferentes fluídos. Resultados demonstram um número elevado de cópias de mtDNA no espermatozoide de homens com baixa qualidade seminal quando comparados ao sêmen dentro dos parâmetros normais (MAY-PANLOUP et al., 2003; SONG e LEWIS, 2008; TIAN et al., 2014). O número de cópias de DNA mitocondrial também já foi relatado como possível marcador para competência embrionária, evidenciando número aumentado de cópias em embriões aneuplóides ou euplóides com falha de implantação (revisado por KIM e SELI, 2019)

. Em bovinos, o número de cópias de cfmtDNA no leite e no soro de vacas com mastite foi maior do que nas saudáveis, sugerindo que esse parâmetro pode ser marcador para o estresse oxidativo e lesão do epitélio mamário devido ao processo inflamatório da mastite (LEISHANGTHEM et al., 2018).

Em suínos, foi relatado menores concentrações de cfmtDNA no meio de cultura ovócitos competentes, relacionado com a habilidade de maturação *in vitro* (MUNAKATA et al., 2018).

Em humanos, foi avaliado a quantidade de cfmtDNA no líquido folicular de mulheres que estavam em tratamento para reprodução assistida, onde encontraram correlação negativa entre quantidade de cfmtDNA e produção de blastocisto, e correlação positiva com a idade materna (LIU et al., 2019). Quanto a avaliação de cfmtDNA no plasma seminal, um estudo publicado recentemente em humanos, encontrou menor número de cópias de cfmtDNA no plasma de homens que apresentaram motilidade espermática diminuída, acompanhado ou não de baixa concentração e apresentou correlação negativa com a produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) (CHEN et al., 2018). Esses resultados sugerem que o cfmtDNA pode ser uma alternativa na busca de marcadores para a qualidade do sêmen.

Portanto, a avaliação do conteúdo de cfmtDNA livre no plasma seminal poderia, juntamente com o cfDNA total, ser mais informativo e representar um marcador potencialmente mais acurado.

3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AKYOL, N.; KIZIL, S.; SATILMIŞ, M.; KARAŞAHİN, T. Investigation of Bull Effect on in vitro Embryo Production. Kafkas Universitesi Veteriner Fakultesi Dergisi. 20. 10.9775/kvfd.2013.10582, 2014.

ALBERTS, B.; BRAY, D.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. Molecular biology of the cell. 3, 1600. New York: Garland, 1994.

ALMEIDA, T.B.; MINGOTI, R.D.; CASTRO, L.S. et al. Paternal effect does not affect in vitro embryo morphokinetics but modulates molecular profile, Theriogenology, Volume 178, Pages 30-39, 2022

ALOMAR, M.; TASIAUX, H.; REMACLE, S.; GEORGE, F.; PAUL, D.; DONNAY, I. Kinetics of fertilization and development, and sex ratio of bovine embryos produced using the semen of different bulls, Animal Reproduction Science, Volume 107, Issues 1–2, 008, Pages 48-61, 2007.

ANZAR, M.; HE, L.; BUHR, M.M.; KROETSCH, T.K.; PAULS, K.P. Sperm apoptosis in fresh and cryopreserved bull semen detected by flow cytometry and its relationship with fertility. Biol Reprod, v.66, p.354-360, 2002.

ASLAM M.K.M.; SHARMA, V.K.; PANDEY, S. et al. Identification of biomarker candidates for fertility in spermatozoa of crossbred bulls through comparative proteomics. Theriogenology, Oct 1;119:43-51, 2018.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL; CEPEA – ESALQ/USP. Index ASBIA 2021 Mídia. 43p, 2022.

BALHORN, R. The protamine family of sperm nuclear proteins. Genome biology, v. 8, n. 9, p.227, 2007.

BARTH, A. D.; OKO, R. J. Abnormal morphology of bovine spermatozoa. Iowa: Iowa State University: Ed. Ames, 285, 1989

BENKHALIFA, M.; FERREIRA, Y.J.; CHAHINE, H.; LOUANJLI, N.; MIRON, P.; MERVIEL, P.; COPIN, H. Mitochondria: participation to infertility as source of energy

and cause of senescence. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. 55:60-4, 2014.

BERGQVIST, A.S.; BALLESTER, J.; JOHANNISSON, A.; LUNDEHEIM, N.; RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, H. Heparin and dermatan sulphate induced capacitation of frozen-thawed bull spermatozoa measured by merocyanine-540. *Zygote*. 15(3):225-32, 2007

BOE-HANSEN, G.B.; SATAKE, N. An update on boar semen assessments by flow cytometry and CASA. *Theriogenology*, Oct 1;137:93-103, 2019.

BOERKE, A.; TSAI, P.S.; GARCIA-GIL, N.; BREWIS, I.A.; GADELLA, B.M. Capacitation-dependent reorganization of microdomains in the apical sperm head plasma membrane: functional relationship with zona binding and the zona-induced acrosome reaction. *Theriogenology*. 70(8):1188-96, 2008.

BRITO, L.F. Endocrine Control of Testicular Development and Initiation of Spermatogenesis in Bulls. In *Bovine Reproduction*, R.M. Hopper (Ed.), 2014.

BUCHER, K.; MALAMA, E.; SIUDA, M.; JANETT, F.; BOLLWEIN, H. Multicolor flow cytometric analysis of cryopreserved bovine sperm: A tool for the evaluation of bull fertility. *Journal of Dairy Science*. 102(12):11652-11669, 2019.

CARVALHO, J.O.; SARTORI, R.; RODELLO, L.; MOURÃO, G.B.; BICUDO, S.D.; DODE, M.A.N. Flow cytometry sex sorting affects bull sperm longevity and compromises their capacity to bind to oviductal cells, *Livestock Science*, Volume 207, 2018.

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

CELEGHINI, E. C.; DE ARRUDA, R. P.; DE ANDRADE, A. F.; NASCIMENTO, J.; RAPHAEL, C. F. Practical techniques for bovine sperm simultaneous fluorometric assessment of plasma, acrosomal and mitochondrial membranes. *Reproduction in Domestic Animals*. 42, 5: 479-88, 2007.

CHAITHRASHREE, A.R.; INGOLE, S.D.; DIGHE, V.D. et al. Effect of melatonin on bovine sperm characteristics and ultrastructure changes following cryopreservation. *Vet Med Sci.* 2020; 6: 177– 186, 2020

CHEN, Y.; LIAO, T.; ZHU, L.; LIN, X.; WU, R.; JIN, L. Seminal plasma cell-free mitochondrial DNA copy number is associated with human semen quality. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology.* 231:164-168, 2018.

CHOU, J.S.; JACOBSON, J.D.; PATTON, W.C.; KING, A.; CHAN, P.J. Modified isocratic capillary electrophoresis detection of cell-free DNA in semen. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics.* 21(11):397-400, 2004.

COSTA, F.; BARBISAN, F.; ASSMANN, C.E.; ARAÚJO, N.K.F.; DE OLIVEIRA, A.R.; SIGNORI, J.P.; ROGALSKI, F.; BONADIMAN, B.; FERNANDES, M.S.; DA CRUZ, I.B.M. Seminal cell-free DNA levels measured by PicoGreen fluorochrome are associated with sperm fertility criteria. *Zygote.* 25(2):111-119, 2017.

CUNHA, A.; CARVALHO, J.; DODE, M. Techniques for sperm evaluation using fluorescent probes. *Semina: Ciências Agrárias.* 36:4365-4376, 2015.

CUNHA, A.T.M.; CARVALHO, J.O.; KUSSANO, N.R.; MARTINS, C.F.; MOURÃO, G.B.; DODE, M.A.N. Bovine epididymal spermatozoa: Resistance to cryopreservation and binding ability to oviductal cells. *Cryobiology.* 73(3), 348–355, 2019.

DEGL'INNOCENTI S.; FILIMBERTI, E.; MAGINI, A.; KRAUSZ C. et al. Semen cryopreservation for men banking for oligospermia, cancers, and other pathologies: prediction of post-thaw outcome using basal semen quality. *Fertil Steril.*100(6):1555-63.e1-3, 2013.

DIÓGENES, M. N.; GUIMARÃES, A.; LEME, L. O.; FRANCO, M. M.; DODE, M. Effect of prematuration and maturation with fibroblast growth factor 10 (FGF10) on in vitro development of bovine oocytes. *Theriogenology,* 102, 190–19, 2017.

DI PIZIO, P.; CELTON, N.; MENOUD, P.A. et al. Seminal cell-free DNA and sperm characteristic's: An added biomarker for male infertility investigation. *Andrologia;* 53: e13822, 2021.

DIETRICH, M. A.; CIERESZKO, A. Proteomic characterization of fresh spermatozoa and supernatant after cryopreservation in relation to freezability of carp (*Cyprinus carpio* L) semen. *PLOS ONE*. 13(3): e0192972, 2018.

DRUART, X; RICKARD, J. P.; TSIKIS, G; de GRAAF, S.P. Seminal plasma proteins as markers of sperm fertility. *Theriogenology*, 05.034, 2019.

FAIR, S.; LONERGAN, P. Review: Understanding the causes of variation in reproductive wastage among bulls. Volume 12, Supplement s1 (Theory to Practice - International Bull Fertility Conference 27–30 May 2018, Westport, Ireland). s53-s62, 2018.

FERRÉ, B.; KJELLAND, M.E.; STROBECH, L.B.; HYTTEL, P.; MERMILLO, P.; ROSS, P.J. Review: Recent advances in bovine in vitro embryo production: reproductive biotechnology history and methods. *Animal* Volume 14, Issue 5, Pages 991-1004, 2020

FLESCH, F.M.; GADELLA, B.M. Dynamics of the mammalian sperm plasma membrane in the process of fertilization. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1469(3):197-235, 2000.

GILLAN, L.; EVANS, G.; MAXWELL, W.M. Flow cytometric evaluation of sperm parameters in relation to fertility potential. *Theriogenology*. 15;63(2):445-5, 2005

GLIOZZI, T.M.; TURRI, F.; MANES, S.; CASSINELLI, C.; PIZZI, F. The combination of kinetic and flow cytometric semen parameters as a tool to predict fertility in cryopreserved bull semen. *Animal*. 11(11):1975-1982, 2017.

GOMES, F. P.; PARK, R.; VIANA, A. G.; FERNANDEZ-COSTA, C.; TOPPER, E.; KAYA, A.; MEMILI, E.; YATES, J. R.; MOURA, A. A. Protein signatures of seminal plasma from bulls with contrasting frozen-thawed sperm viability. *Scientific reports*, 10(1), 14661, 2020.

GROSS, N.; STRILLACCI, M.G.; PEÑAGARICANO, F.; KHATIB, H. Characterization and functional roles of paternal RNAs in 2-4 cell bovine embryos. *Scientific reports*, 9(1), 20347, 2019.

GRÖTTER, L.G.; CATTANEO, L.; MARINI, P.E.; KJELLAND, M.E.; FERRÉ, L.B. Recent advances in bovine sperm cryopreservation techniques with a focus on sperm post-thaw quality optimization. *Reproduction in Domestic Animals*. 54(4):655-665, 2019.

HAFEZ, E.S.E.; HAFEZ, B. *Reprodução animal*. 7ed. São Paulo: Manole, 2004.

HALLAP, T.; NAGY, S.; JAAKMA, U.; JOHANNISSON, A.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Usefulness of a triple fluorochrome combination Merocyanine 540/Yo-Pro 1/Hoechst 33342 in assessing membrane stability of viable frozen-thawed spermatozoa from Estonian Holstein AI bulls. *Theriogenology*. 65, 6:1122-1136, 2006.

HOLDEN, S.A.; FERNANDEZ-FUERTES, B. MURPHY, C.; WHELAN, H.; O'GORMAN, A.; BRENNAN, L.; BUTLER, S.T.; LONERGAN, P.; FAIR, S. Relationship between in vitro sperm functional assessments, seminal plasma composition, and field fertility after AI with either non-sorted or sex-sorted bull semen. *Theriogenology*. 1, 87:221-228, 2017.

HOLT, W.V. Basic aspects of frozen storage of semen. *Animal Reproduction Science*. 18,62(1-3):3-22, 2000.

HUANG, LEI & BOGALE, BERHAN & TANG, YAQIONG & LU, SIJIA & XIE, XIAOLIANG & RACOWSKY, CATHERINE. (2019). Noninvasive preimplantation genetic testing for aneuploidy in spent medium may be more reliable than trophoctoderm biopsy. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 116. 201907472. 10.1073/pnas.1907472116.

IBANESCU, I.; SIUDA, M.; BOLLWEIN, H. Motile sperm subpopulations in bull semen using different clustering approaches – Associations with flow cytometric sperm characteristics and fertility, *Animal Reproduction Science*, Volume 215, 106329, 2020.

ICHIKAWA K, SHIBAHARA H, SHIRASUNA K, KUWAYAMA T, IWATA H. Cell-free DNA content in follicular fluid: A marker for the developmental ability of porcine oocytes. *Reprod Med Biol*. 2019 Dec 21;19(1):95-103.

ISAAC, A.V.; KUMARI, S.; NAIR, R.; URS, D.R.; SALIAN, S.R. et al. Supplementing zinc oxide nanoparticles to cryopreservation medium minimizes the freeze-thaw-

induced damage to spermatozoa. *Biochem Biophys Res Commun.* 16;494(3-4):656-662, 2017

JUYENA, N. S.; STELLETTA, C. Seminal plasma: An essential attribute to spermatozoa. *Journal of Andrology.* 33, 4: 536–551, 2012.

KILLIAN, G.J.; CHAPMAN, D.A.; ROGOWSKI, L.A. Fertility-associated proteins in Holstein bull seminal plasma. *Biology of Reproduction.* 49:1202–1207, 1993.

KIM, J.; SELI, E. Mitochondria as a biomarker for IVF outcome. *Reproduction.* 157(6): R235-R242, 2019.

KORDAN, W.; FRASER, L.; WYSOCKI, P.; STRZEZEK, R.; LECEWICZ, M.; MOGIELNICKA-BRZOZOWSKA, M.; DZIEKOŃSKA, A.; SOLIWODA, D.; KOZIOROWSKA-GILUN, M. Semen quality assessments and their significance in reproductive technology. *Polish journal of veterinary sciences,* 16(4), 823–833, 2013.

KUMAR P.; SRIVASTAVA N.; PANDE M.; PRASAD J.K.; SIROHI, A.S. Evaluating Sperm Cell Viability and Membrane Integrity. *Protocols in Semen Biology (Comparing Assays).* Springer, Singapore. 57-71, 2017.

KUMAR, A.; PRASAD, J. K.; SRIVASTAVA, N.; GHOSH, S. K. Strategies to Minimize Various Stress-Related Freeze–Thaw Damages During Conventional Cryopreservation of Mammalian Spermatozoa. *Biopreservation and Biobanking.* 17(6), 603-612, 2019.

KUTCHY, N. A.; MENEZES, E.; UGUR, M. R.; UL HUSNA, A.; ELDEBAKY, H.; EVANS, H. C.; BEATY, E. et al. Sperm cellular and nuclear dynamics associated with bull fertility. *Animal reproduction science,* 211, 106203, 2019.

KWON, W.S.; OH, S.A.; KIM, Y.J; RAHMAN, M. S.; PARK, Y.J.; PANG, M.G. Proteomic approaches for profiling negative fertility markers in inferior boar spermatozoa. *Scientific Reports.* 5(1), 2015.

LACERDA, I.P.; DODE, M.A.N.; LIMA, M.M.S; GUERRA, B.F.; COSTA, E.S.; MOREIRA, G.R; CARVALHO, J.O. Cattle breed affects in vitro embryo production in a large-scale commercial program on dairy farms. *Livestock Science* Volume 240, 2020.

LEISHANGTHEM, G.D.; SINGH, N.K.; SINGH, N.D.; FILIA, G.; SINGH, A. Cell-free mitochondrial DNA in serum and milk associated with bovine mastitis: a pilot study. *Veterinary Research Communications*. 42(4):275-282, 2018.

LEME, L.O.; CARVALHO, J.O.; FRANCO, M.M; DODE, M.A.N. Effect of sex on cryotolerance of bovine embryos produced in vitro. *Theriogenology* Volume 141, Pages 219-227, 2020.

LEMMA, A. Effect of Cryopreservation on Sperm Quality and Fertility. In (Ed.), *Artificial Insemination in Farm Animals*, 2011.

LI, H.G.; HUANG, S.Y.; ZHOU, H.; LIAO, A.H.; XIONG, C.L. Quick recovery and characterization of cell-free DNA in seminal plasma of normozoospermia and azoospermia: implications for non-invasive genetic utilities. *Asian Journal of Andrology*. 11(6):703-9, 2009.

LIU, Y.; SHEN, Q.; ZHAO, X.; ZOU, M.; SHAO, S.; LI, J.; REN, X.; ZHANG, L. Cell-free mitochondrial DNA in human follicular fluid: a promising biomarker of blastocyst developmental potential in women undergoing assisted reproductive technology. *Reproductive Biology and Endocrinology*. 10,17(1):54, 2019.

LO, Y.M.; CORBETTA, N.; CHAMBERLAIN, P.F.; RAI, V.; SARGENT, I.L.; REDMA, C.W.; WAINSCOAT, J.S. Presence of fetal DNA in maternal plasma and serum. *Lancet*. 16,350(9076):485-7, 1997.

LUSIGNAN, M. F.; BERGERON, A.; LAFLEUR, M.; MANJUNATH, P. The major proteins of bovine seminal plasma interact with caseins and whey proteins of milk extender. *Biology of reproduction*, 85(3), 457–464, 2011.

MARTÍNEZ-PASTOR, F.; MATA-CAMPUZANO, M.; ALVAREZ-RODRÍGUEZ, M.; ALVAREZ, M.; ANEL, L.; DE PAZ, P. Probes and techniques for sperm evaluation by flow cytometry. *Reprod Domest Anim*. 45:67–78, 2010

MATOS, D.L.; ARAÚJO, A.A.; ROBERTO, I.G.; TONIOLLI, R. Análise computadorizada de espermatozoides: revisão de literatura. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*. 32 (4): 225-232, 2008.

MAY-PANLOUP, P.; CHRÉTIEN, M.F.; SAVAGNER, F.; VASSEUR, C.; JEAN, M.; MALTHIÈRY, Y.; REYNIER, P. Increased sperm mitochondrial DNA content in male infertility. *Human Reproduction*.18(3):550-6, 2003.

MCLAY, D.W.; CLARKE, H.J. Remodelling the paternal chromatin at fertilization in mammals. *Reproduction*; 125:625–33, 2003.

MEMILI E, MOURA AA, KAYA A. Metabolomes of sperm and seminal plasma associated with bull fertility. *Anim Reprod Sci.*; 220:106355, 2020.

MENDONÇA-SOARES, A.S.; GUIMARÃES, A.L.S.; FIDELIS, A.A.G.; FRANCO, M.M.; DODE, M.A.N. The use of insulin-transferrin-selenium (ITS), and folic acid on individual in vitro embryo culture systems in cattle., *Theriogenology* Volume 184, Pages 153-161, 2022.

MILLER, D.; BRINKWORTH, M.; ILES, D. Paternal DNA packaging in spermatozoa: more than the sum of its parts? DNA, histones, protamines and epigenetics, *REPRODUCTION*, 139(2), 287-301, 2010.

MOCÉ, E.; BLANCH, E.; TOMÁS, C.; GRAHAM, J.K. Use of cholesterol in sperm cryopreservation: present moment and perspectives to future. *Reprod Domest Anim.*;45 Suppl 2:57-66, 2010.

MORAES, C.R.; MEYERS, S. The Sperm Mitochondrion: Organelle of Many Functions, *Animal Reproduction Science*. 194:71-80, 2018.

MORRELL, J. M.; VALEANU, A. S.; LUNDEHEIM, N.; JOHANNISSON, A. Sperm quality in frozen beef and dairy bull semen. *Acta veterinaria Scandinavica*, 60(1), 41, 2018.

MORTIMER, S. T.; SWAN, A. M.; MORTIMER, D. M. Effect of seminal plasma on capacitation and hyperactivation in human spermatozoa. *Human reproduction*, v. 13, n. 8, p. 2139-2146, 1998

MOURA, A.A.; KOC, H.; CHAPMAN, D.A.; KILLIAN, G.J. Identification of proteins in the accessory sex gland fluid associated with fertility indexes of dairy bulls: a proteomic approach. *Journal of Andrology*. 27(2):201-211, 2006.

MUNAKATA, Y.; SHIRASUNA, K.; KUWAYAMA, T.; IWATA, H.J. Cell-free DNA in medium is associated with the maturation ability of in vitro cultured oocytes. *Reprod Dev*; 12;65(2):171-175, 2019.

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

PLANTE, G.; PRUD'HOMME, B.; FAN, J. et al. Evolution and function of mammalian binder of sperm proteins. *Cell Tissue Res* 363, 105–127, 2016.

POLGE, C.; SMITH, A. U.; PARKES, A. S. Revival of Spermatozoa after Vitrification and Dehydration at Low Temperatures. *Nature*. 164(4172): 666–666, 1949.

PONTI, G.; MACCAFERRI, M.; MANFREDINI, M.; MICALI, S.; TORRICELLI, F.; MILANDRI, R. et al. Quick assessment of cell-free DNA in seminal fluid and fragment size for early non-invasive prostate cancer diagnosis. *Clinica Chimica Acta*. 497:76-80, 2019.

QASEMI, M.; MAHDIAN, R.; AMIDI, F. Cell-free DNA discoveries in human reproductive medicine: providing a new tool for biomarker and genetic assays in ART. *J Assist Reprod Genet.*;38(2):277-288, 2021.

RANUCCI, R. Cell-Free DNA: Applications in Different Diseases. *Methods in molecular biology* (Clifton, N.J.), 1909, 3–12, 2019.

REGO, J. P. A.; MARTINS, J. M.; WOLF, C. A.; VAN TILBURG, M.; MORENO, F.; MONTEIRO-MOREIRA, A. C.; MOREIRA, R. A.; SANTOS, D. O.; MOURA, A. A. Proteomic analysis of seminal plasma and sperm cells and their associations with semen freezability in Guzerat bulls¹. *Journal of Animal Science*. 94(12): 5308–5320, 2016.

SALVI, S.; GURIOLI, G.; DE GIORGI, U.; CONTEDEUCA, V.; TEDALDI, G.; CALISTRI, D.; CASADIO, V. Cell-free DNA as a diagnostic marker for cancer: current insights. *OncoTargets and Therapy*. 9:6549-6559, 2016.

SAMANTA, L.; PARIDA, R.; DIAS, T.R.; AGARWAL, A. The enigmatic seminal plasma: a proteomics insight from ejaculation to fertilization. *Reproductive Biology and Endocrinology*. 28,16(1):41, 2018.

SCALICI, E.; TRAVER, S.; MOLINARI, N.; MULLET, T.; MONFORTE, M.; VINTEJOUX, E.; HAMAMAH, S. Cell-free DNA in human follicular fluid as a biomarker of embryo quality. *Hum Reprod.*;29(12):2661-9, 2014.

SCHWARZENBACH, H.; HOON, D.S.; PANTEL, K. Cell-free nucleic acids as biomarkers in cancer patients. *Nature Reviews Cancer.*11(6):426-37, 2011.

SELLEM, E.; BROEKHUIJSE, M.L.; CHEVRIER, L.; CAMUGLI, S.; SCHMITT, E.; SCHIBLER, L.; KOENEN, E.P. Use of combinations of in vitro quality assessments to predict fertility of bovine semen. *Theriogenology.* 84(9):1447-1454.e5, 2015.

SHILPA, M.; SELVARAJU, S.; GIRISHKUMAR, V.; PARTHIPAN, S.; BINSILA, K.B.; ARANGASAMY, A.; RAVINDRA, J.P. Novel insights into the role of cell-free seminal mRNAs on semen quality and cryotolerance of spermatozoa in bulls (*Bos taurus*). *Reproduction, Fertility and Development.* 29(12):2446-2456, 2017

SHOJAEI, H.; KROETSCH, T.; WILDE, R.; BLONDIN, P.; KASTELIC, J.P., THUNDATHIL, J.C. Moribund sperm in frozen-thawed semen, and sperm motion end points post-thaw and post-swim-up, are related to fertility in Holstein AI bulls. *Theriogenology.* 15;77(5):940-51, 2012.

SILVA, P.F.; GADELLA, B.M. Detection of damage in mammalian sperm cells. *Theriogenology.*15;65(5):958-78,2006.

SONG, G.J.; LEWIS, V. Mitochondrial DNA integrity and copy number in sperm from infertile men. *Fertility and Sterility.* 90(6):2238-44, 2008.

STAUB, C.; JOHNSON, L. Review: Spermatogenesis in the bull. *Animal.* Jun;12(s1): s27-s35. 2018

STECKLER, D.; STOUT, T.A.; DURANDT, C.; NÖTHLING, J.O. Validation of merocyanine 540 staining as a technique for assessing capacitation-related membrane destabilization of fresh dog sperm. *Theriogenology.* 83(9):1451-60, 2015.

STIAVNICKA, M.; CHAULOT-TALMON, A.; PERRIER, J. P.; HOSEK, P.; KENNY, D. A.; LONERGAN, P. et al. Sperm DNA methylation patterns at discrete CpGs and genes

involved in embryonic development are related to bull fertility. *BMC Genomics* 23 (1), 379. doi:10.1186/s12864-022-08614-5, 2022.

SURAJ, S.; DHAR, C.; SRIVASTAVA, S. Circulating nucleic acids: An analysis of their occurrence in malignancies. *Biomedical reports*. 6(1): 8–14, 2017.

TIAN, M.; BAO, H.; MARTIN, F.L.; ZHANG, J.; LIU, L.; HUANG, Q.; SHEN, H. Association of DNA methylation and mitochondrial DNA copy number with human semen quality. *Biology of Reproduction*. 91(4):101, 2014.

UGUR, M.R.; DINH, T.; HITIT, M.; KAYA, A.; TOPPER, E.; DIDION, B.; MEMILI, E. Amino Acids of Seminal Plasma Associated with Freezability of Bull Sperm. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. 7:347, 2020.

UMEZU, K.; KURATA, S.; TAKAMORI, H.; NUMABE, T.; HIRADATE, Y.; HARA, K.; TANEMURA, K. Characteristics and Possible Role of Bovine Sperm Head-to-Head Agglutination. *Cells*, 9;9(8):1865, 2020

VADNAIS, M.L.; ALTHOUSE, G.C. Characterization of capacitation, cryoinjury, and the role of seminal plasma in porcine sperm. *Theriogenology*. 76(8):1508-16, 2011.

VELHO, A.L.C.; MENEZES, E.; DINH, T.; KAYA, A.; TOPPER, E.; MOURA, A.A. et al. Metabolomic markers of fertility in bull seminal plasma. *PLoS ONE* 13(4): e0195279, 2018.

VIANA, J.H.M. 2017 Statistics of embryo production and transfer in domestic farm animals: Is it a turning point? In 2017 more in vitro-produced than in vivo-derived embryos were transferred worldwide. *Embryo Transfer Newsl*, v.36(4), p.8-25, 2018

VILAGRAN, I.; YESTE, M.; SANCHO, S.; CASTILLO, J.; OLIVA, R.; BONET, S. Comparative analysis of boar seminal plasma proteome from different freezability ejaculates and identification of Fibronectin 1 as sperm freezability marker. *Andrology*. 3(2):345-56, 2015.

WARD, F.; ENRIGHT, B.; RIZOS, D.; BOLAND, M.; LONERGAN, P. Optimization of in vitro bovine embryo production: effect of duration of maturation, length of gamete co-incubation, sperm concentration and sire. *Theriogenology*. v.57, p.2105-2117, 2002.

WATSON, P.F. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Animal Reproduction Science*. 2,60-61:481-92, 2000.

WILLFORSS, J et al. Stable bull fertility protein markers in seminal plasma, *Journal of Proteomics*, V236,104135, 2021.

WU, C.; DING, X.; LI, H. et al. Genome-wide promoter methylation profile of human testis and epididymis: identified from cell-free seminal DNA. *BMC Genomics*. 14: 288, 2013.

WYSOCKI, P.; ORZOŁEK, A.; STRZEŻEK, J.; KOZIOROWSKA-GILUN, M.; ZASIADCZYK, Ł.; KORDAN, W. The activity of N-acetyl- β -hexosaminidase in boar seminal plasma is linked with semen quality and its suitability for cryopreservation. *Theriogenology*. 15,83(7):1194-202, 2015.

XU, J.; FANG, R.; CHEN, L.; CHEN, D. et al. Noninvasive chromosome screening of human embryos by genome sequencing of embryo culture medium for in vitro fertilization. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2016.

YESTE, M. Sperm cryopreservation update: Cryodamage, markers, and factors affecting the sperm freezability in pigs. *Theriogenology*. 1,85(1):47-64, 2016.

YESTE, M.; BONET, S.; RODRÍGUEZ-GIL, J.E.; RIVERA DEL ÁLAMO, M.M. Evaluation of sperm motility with CASA-Mot: which factors may influence our measurements? *Reprod Fertil Dev*. Jun;30(6):789-798, 2018.

YOON, S.J.; KWON, W.S.; RAHMAN, M.S.; LEE, J.S.; PANG, M.G. A novel approach to identifying physical markers of cryo-damage in bull spermatozoa. *PLOS ONE*. 4,10(5): e0126232, 2015.

CAPÍTULO 2

**DNA LIVRE DE CÉLULA NO PLASMA SEMINAL DE TOUROS
NELORE: POSSÍVEL MARCADOR PARA QUALIDADE E
CONGELABILIDADE DO SÊMEN**

1. RESUMO

A criopreservação de sêmen é uma técnica amplamente utilizada na produção animal. Apesar de bem estabelecida em algumas espécies, a resposta à criopreservação e a capacidade do sêmen criopreservado de produzir embriões *in vitro* varia de indivíduo para indivíduo. Assim, buscando a identificação de um marcador que possa indicar a congelabilidade e fertilidade *in vitro* de uma amostra, antes do congelamento, este estudo avaliou a quantidade de DNA livre de células e o número de cópias de cfmtDNA no plasma seminal de touros Nelore. O sêmen de nove touros foi coletado por eletroejaculação, metade do ejaculado foi utilizado para avaliação do sêmen fresco e obtenção do plasma seminal para quantificação de cfDNA, a outra metade foi criopreservada. A avaliação de movimento espermático pelo CASA (IVOS 12.3/Hamilton-Thorne, EUA) e da integridade e estabilidade da membrana plasmática, integridade acrossomal, apoptose e potencial mitocondrial, por citometria de fluxo (AMNIS FlowSight - Amnis Corp., EUA) foram realizados no sêmen fresco e sêmen congelado às 0, 3, 6 e 12h após o descongelamento. O sêmen criopreservado também foi utilizado para a produção de embriões *in vitro*. A quantificação de cfDNA foi realizada no plasma seminal por espectrofotometria e o número relativo de cópias do cfmtDNA foi quantificado por qPCR. A concentração de cfDNA presente no plasma seminal variou de 15,23 ng/μL à 519,71 ng/μL. A mediana foi calculada (58,95 ng/μL) e dois grupos foram definidos de acordo com a concentração de cfDNA: Baixo-cfDNA (<58,95 ng/μL; n=5) e Alto-cfDNA (>58,95 ng/μL; n=4). O número de cópias de cfmtDNA foi semelhante ($P>0,05$) entre os grupos. No sêmen fresco, a porcentagem de células com estabilidade de membrana foi maior ($P<0,05$) no grupo Baixo-cfDNA (84,24%±7,07) comparado ao grupo Alto-cfDNA (52,72%±7,9) e, ao longo de 12 horas pós- descongelamento, não houve diferenças para todos os parâmetros avaliados entre os grupos. A taxa de clivagem e de blastocistos em D7 foi maior para o grupo Alto-cfDNA (60,74% ± 3,38 e 24,95% ± 2,56, respectivamente), do que para o grupo Baixo-cfDNA (41,21% ± 3,23 e 6,42% ± 1,14). O grupo Alto-cfDNA também produziu embriões com maior número de células. O número relativo de cópias de cfmtDNA variou entre 0,97 cópias a 24,38 cópias e, semelhante ao realizado com os dados de cfDNA, os touros foram divididos em dois grupos (Baixo-cfmtDNA e Alto-cfmtDNA), a partir da mediana (5,35 cópias). A porcentagem de espermatozoides em necrose foi maior ($p<0,05$) no grupo Alto-cfmtDNA do que o Baixo-cfmtDNA, tanto no sêmen fresco (40,6% ± 6,4 vs 17% ± 5,8 $p=0,03$) quanto no criopreservado (31,5±4,1 vs

19,7%±3,6 p=0,04). No sêmen fresco, VAP (109 µm/s ± 3,87) e VSL (91,5 µm/s ± 4,8) foram maiores no grupo Baixo-cfmtDNA. Para a porcentagem de espermatozoides em necrose foi detectada uma interação entre grupo e tempo (P<0,01), sendo que a porcentagem de espermatozoides em necrose que era superior no grupo Alto-cfmtDNA as 0 horas foi diminuindo ao longo do tempo, enquanto no grupo Baixo-cfmtDNA foi aumentado. Já a quantidade e qualidade de embriões produzidos foi semelhante para ambos os grupos. A concentração de cfDNA e o número relativo de cópias de cfmtDNA no plasma seminal não são capazes de predizer a congelabilidade do sêmen, mas animais com maior quantidade de cfDNA são capazes de produzir *in vitro* mais embriões e de melhor qualidade.

Palavras-chave: espermatozoide; criopreservação; cfmtDNA; produção *in vitro* de embriões.

2. ABSTRACT

Sperm cryopreservation is a widely used technique in animal production. Although it is well established in some species, the response to cryopreservation and the ability of cryopreserved semen to produce embryos varies depending on individual. Thus, trying to identify a marker that can indicate the freezeability and in vitro fertility of a sample, prior to freezing, the present study evaluated the amount of cell-free DNA and cfmtDNA copy number in the seminal plasma of Nellore bulls. Semen from nine bulls was collected by electroejaculation, half of the ejaculate was used to fresh semen evaluation and to obtain seminal plasma for cfDNA quantification, the other half was cryopreserved. Evaluation of sperm movement by CASA (IVOS 12.3/Hamilton-Thorne, USA) and of plasma membrane integrity and stability, acrosomal integrity, apoptosis, and mitochondrial potential by flow cytometry (AMNIS FlowSight - Amnis Corp., USA) were performed on fresh semen and frozen/thawed semen at 0, 3, 6 and 12h after thawing. Cryopreserved semen was also used for in vitro embryo production. Quantification of cfDNA was performed by spectrophotometry and the cfmtDNA copy number was quantified by qPCR. The concentration of cfDNA present in seminal plasma ranged from 15.23 ng/ μ L to 519.71 ng/ μ L. The median was calculated (58.95) and two groups were defined according to cfDNA concentration: Low-cfDNA (<58.95 ng/ μ L; n=5) and High-cfDNA (>58.95 ng/ μ L; n=4). The cfmtDNA copy number was similar ($P>0.05$) between groups. In fresh semen, the percentage of cells with membrane stability was higher ($P<0.05$) in the Low-cfDNA group (84.24% \pm 7.07) compared to the High-cfDNA group (52.72% \pm 7.9) and, over 12 hours post-thawing, there were no differences for all parameters evaluated between groups. Cleavage and D7 blastocyst rates were higher for the High-cfDNA group (60.74% \pm 3.38 and 24.95% \pm 2.56, respectively) than for the Low-cfDNA group (41.21% \pm 3.23 and 6.42% \pm 1.14). The High-cfDNA group also produced embryos with high number of cells. The relative cfmtDNA copy number ranged from 0.97 copies to 24.38 copies and, similar to the cfDNA data, the bulls were divided into two groups (Low-cfmtDNA and High-cfmtDNA), from the median (5.35 copies). The percentage of necrotic spermatozoa was higher in the High-cfmtDNA group in both fresh and thawed semen (40.6% \pm 6.4 vs 17% \pm 5.8 $p=0.03$, in fresh semen), (31.5 \pm 4.1 vs 19.7% \pm 3.6 $p=0.04$, in thawed semen). In fresh semen, VAP (109 μ m/s \pm 3.87) and VSL (91.5 μ m/s \pm 4.8) were higher in the Low-cfmtDNA group. For the percentage of sperm in necrosis, an interaction between group and time was detected ($P<0.01$), being the percentage of sperm in necrosis that was

higher in the Alto-cfDNA group at 0 hours decreased over time, while in the Low-cfDNA group increased. Conversely, the embryo production and quality were similar for both groups. The concentration of cfDNA and the relative number of copies of cfDNA in seminal plasma are not able to predict the freezeability of semen, but animals with a greater amount of cfDNA are able to produce more embryos of better quality in vitro.

Keywords: sperm; cryopreservation; cfDNA; in vitro embryo production.

3. INTRODUÇÃO

A criopreservação de sêmen é uma biotecnologia que permite a maior disseminação do material genético, a comercialização nacional e internacional de germoplasma, bem como o armazenamento de material genético de animais que não possam, temporariamente ou permanentemente, ser utilizados. Essa técnica, portanto, tem um impacto no melhoramento animal por permitir a intensificação do uso da inseminação artificial (IA) e de outras técnicas a ela associadas, tais como produção de embriões *in vivo* e *in vitro*. Entretanto, o congelamento do sêmen também pode acarretar alterações tais como danos físicos ou funcionais no espermatozoide, com diminuição da fertilidade se comparado ao sêmen fresco (HOLT, 2000)

As avaliações espermáticas utilizadas rotineiramente não são capazes de prever a qualidade seminal e a fertilidade *in vivo* e *in vitro* (FAIR e LONERGAN, 2018; GLIOZZI et al, 2017). Além disso, sabe-se que há uma influência do touro na produção *in vitro* de embriões com grande variação individual no desenvolvimento embrionário (LEME et al., 2020). Desta maneira, a identificação de um marcador de fácil utilização para a congelabilidade e produção de embriões *in vitro*, previamente ao congelamento, traria grandes benefícios a indústria de sêmen. Isso porque permitiria selecionar melhor os doadores/sêmen e indicar o uso de outras terapias para superar a baixa crioresistência antes do sêmen ser congelado. Além disso, poderia direcionar o uso do sêmen de determinados reprodutores para ser utilizado em grande escala para a produção de embriões *in vitro*.

Neste sentido, estudos tem mostrado que a presença de DNA livre de células (cfDNA) pode ser utilizada como ferramenta de detecção de algumas doenças em humanos, tais como o câncer (SWARUP e RAJESWARI, 2007), doenças autoimunes (GALEAZZI et al., 2003), cardiovasculares (POLINA et al., 2020) e infecções parasitárias (WEERAKOON e MCMANUS, 2016). O cfDNA consiste em fragmentos, principalmente de dupla-fita de DNA, circulantes em diversos fluidos corporais, caracterizados pelo pequeno tamanho (menor que 200bp), baixo peso molecular e baixa concentração, e inclui DNA nuclear e mitocondrial. Esses fragmentos de material genético são liberados por células apoptóticas e necróticas, mas também por células vivas normais (STROUN et al., 2001; LI et al., 2009), o que sugere a possibilidade deste DNA atuar como uma molécula sinalizadora para comunicação entre células (SURAJ et al., 2017). O cfDNA pode ser encontrado em diversos fluidos

biológicos, como o plasma sanguíneo, saliva (DING et al., 2019), urina (REN et al., 2020), incluindo o plasma seminal (MBAYE et al., 2019).

Nos últimos anos, estudos tem mostrado que a presença de cfDNA no plasma seminal está correlacionado a parâmetros de fertilidade em homens (CHOU et al., 2004; LI et al., 2009). Além disso, COSTA et al. (2017) associaram os níveis de cfDNA a baixa viabilidade espermática, como alterações em sua motilidade e alterações de morfologia, indicando possível aplicação do cfDNA no diagnóstico de infertilidade. Esses resultados trazem uma nova alternativa para a busca de marcadores não invasivos para congelabilidade e fertilidade de machos.

Além do cfDNA nuclear, o DNA *cell-free* mitocondrial (cfmtDNA) também é detectado em vários fluidos corporais (KOHLENER et al., 2009; ELLINGER et al., 2009; LIU et al., 2019) e tem características únicas quando comparado ao cfDNA nuclear, tais como menor tamanho e múltiplo número de cópias. Os níveis de cfmtDNA no plasma ou soro parece estar associado a presença de câncer (YU et al., 2012) e seus níveis no líquido folicular com a qualidade e potencial de desenvolvimento dos ovócitos (LIU et al., 2019). No que se refere ao gameta masculino, recentemente foi relatado em humanos que existe uma relação entre a qualidade seminal e o número de cópias de cfmtDNA sugerindo que esse parâmetro também pode ser considerado um possível marcador para estudos e diagnósticos da infertilidade masculina (CHEN et al., 2018). Apesar de vários estudos avaliando o cfDNA no sêmen de humanos terem sido publicados, em bovinos eles são ainda limitados. Um único relato encontrado na literatura, avaliou o material genético livre no plasma seminal de touros, demonstrou a presença de mRNA e correlacionou a expressão de diversos genes [por exemplo, Fas-ligante (FASLG), fator de crescimento nervoso (NGF), caspase-3, enzima conjugadora de ubiquitina E2D3 (UBE2D3)] com parâmetros de qualidade seminal. Esse estudo sugeriu que o cfRNA pode ser uma ferramenta para prever a fertilidade e a susceptibilidade a criopreservação (SHILPA et al., 2017). Entretanto, estudos em bovinos que avaliem a relação de cfDNA e *cell-free* mtDNA com a congelabilidade e fertilidade do sêmen são inexistentes. Desta forma, baseado nesses achados levantou-se a hipótese de que o cfDNA no plasma seminal de bovino (DNA total e número de cópias de cfmtDNA) está associado à qualidade espermática, à resposta a criopreservação e à capacidade de fecundar e produzir embriões *in vitro*.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Animais

Foram utilizados nove touros meios-irmãos da raça Nelore, com idades entre 70 e 72 meses e criados sob as mesmas condições. Todos os procedimentos com os animais foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (Protocolo 005/2020)

4.2. Coleta de sêmen, separação do plasma seminal e criopreservação.

O sêmen foi coletado pelo método de eletroejaculação. Após a coleta, o ejaculado foi fracionado em duas partes, sendo uma destinada ao congelamento de 50 doses de sêmen e análise do sêmen fresco e o restante utilizado para obtenção do plasma seminal. O plasma seminal foi separado dos espermatozoides e outros tipos celulares por duas centrifugações consecutivas, a 4°C. A primeira centrifugação a 400 G por 10 min, para evitar lise celular, e a segunda a 16000 G por 5 minutos (adaptado de Ponti et al., 2018) para separação total das células. Após as centrifugações, alíquotas de 0,5 mL de plasma foram congeladas a -80 °C para posterior extração de DNA.

Da outra fração do ejaculado, uma alíquota foi diluída em solução de ringer-lactato e utilizada para avaliações de qualidade seminal do sêmen fresco. O restante do volume foi congelado. Para a congelação, o sêmen foi diluído em meio Triladyl (Minitube, Tiefenbach, Germany), com adição de gema de ovo (preparado com uma parte do diluidor, uma parte de gema de ovo e três partes de água ultrapura), e envasado em palhetas de 0,25 mL, a uma concentração de 25×10^6 espermatozoides/mL. As palhetas foram refrigeradas a 4°C por 4 horas, em seguida, foram colocadas em vapor de nitrogênio líquido por 20 minutos e imersas no nitrogênio líquido, sendo então armazenadas em botijões (CUNHA et al., 2016). Para avaliação das amostras criopreservadas as palhetas foram descongeladas em banho-maria a 37 °C por 30 segundos.

4.3. Avaliações espermáticas

O sêmen foi avaliado quanto a concentração pela câmara de Neubauer, e quanto as características de movimento pelo sistema de análise computadorizada

(CASA) IVOS 12.3 (Hamilton-Thorne Bioscience®, Beverly, MA, EUA) com setup previamente configurado de acordo com o manual do fabricante para análise de espermatozoides bovinos (Anexo 1). Para a análise no CASA, 8 µL de sêmen foram colocados na lâmina de leitura (Makler, Santa Ana, CA, USA) aquecida. No mínimo cinco campos foram selecionados manualmente para a leitura e análise. Os parâmetros mensurados foram motilidade total e progressiva, velocidade curvilínea (VCL), velocidade média da trajetória (VAP), velocidade linear progressiva (VSL), amplitude de deslocamento lateral da cabeça (ALH), frequência de batimento flagelar (BCF), retilinearidade (STR) e linearidade (LIN). A análise da morfologia espermática foi também realizada, em microscopia de contraste de fase, com preparação úmida e contagem de 200 células por lâmina conforme as recomendações do Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA, 2013).

A avaliação dos parâmetros funcionais foi realizada em citômetro de fluxo AMNIS FlowSight (Amnis Corp., Seattle, WA) utilizando *software* de aquisição INSPIRE V6.1., pelo uso da associação de corantes fluorescentes. Para cada avaliação foi utilizado 25 µL da sonda fluorescente e 5 µL de sêmen, os quais foram incubados ao abrigo da luz por 15 minutos antes da avaliação (Anexo 2). Para a integridade de membrana plasmática e apoptose foi utilizado o kit Dead Cell Apoptosis (AlexaFluor® 488 anexin V, Molecular Probes Inc., Eugene, OR, EUA), contendo Anexina-V conjugada ao corante AlexaFluor 488 e Iodeto de propídeo (IP), de acordo com as recomendações do fabricante. Foram considerados espermatozoides com membrana íntegra aqueles não corados pelo IP nem marcados pela Anexina (AN-IP); necróticos os positivos para IP (IP+) e considerados em início de apoptose os positivos para Anexina (Figura 1C). Para a integridade do acrossomo foi utilizada uma conjugação da sonda fluorescente isotiocianato de fluoresceína (FITC) com lectina de amendoim (peanut agglutinin – PNA, Molecular Probe®, Eugene, Oregon, EUA) 1mg/mL, associado ao Iodeto de Propídeo 0,5mg/mL, considerando espermatozoides vivos sem reação acrossomal aqueles negativos para o PNA e para o IP (PNA-IP-) (Figura 1A). Foram também avaliados o potencial mitocondrial com o corante MitoTracker Green (Molecular Probes, Eugene, OR, EUA) na concentração 1mM/mL, e a estabilidade da membrana com o uso do corante Merocianina 540 (Molecular Probes, Eugene, OR, EUA) 1mM/mL, associado ao Yo-Pro 1 (Molecular Probes, Eugene, OR, EUA) 25µM/mL. As células com potencial mitocondrial estavam coradas (MG+) (Figura 1D). Foram considerados com membrana estável os espermatozoides

negativos para Merocianina, independente se positivos ou negativos para o Yo-Pro1 (M540-YP1+ e M540-YP1-), enquanto os espermatozoides negativos para ambos os corantes foram considerados viáveis com membrana estável (M540-YP1-) (Figura 1B).

Para todos os parâmetros foram adquiridos 10.000 eventos, utilizando um *template* previamente estabelecido para aquisição de espermatozoides bovinos. Os dados foram analisados pelo *software* de análise IDEAS.

Previamente às análises do sêmen congelado, foi feito um pool de duas palhetas do sêmen e esse foi lavado em Percoll 45% com a finalidade de retirar o crioprotetor da amostra (PONS-REJRAJI et al, 2009). Para isso, todo o volume do sêmen foi depositado sobre a camada de Percoll e centrifugado por 15min a 700g, em seguida o *pellet* formado foi ressuspenso em meio TALP e centrifugado a 500g por 5 min. Os espermatozoides foram ressuspenso em meio TALP a uma concentração aproximada de 25×10^6 de espermatozoides/mL e analisados. Para avaliação do sêmen até 12 horas após o descongelamento, a amostra foi separada em tubos com alíquotas para cada horário de avaliação, que permaneceram incubadas a 38,5°C em estufa, em meio TALP.

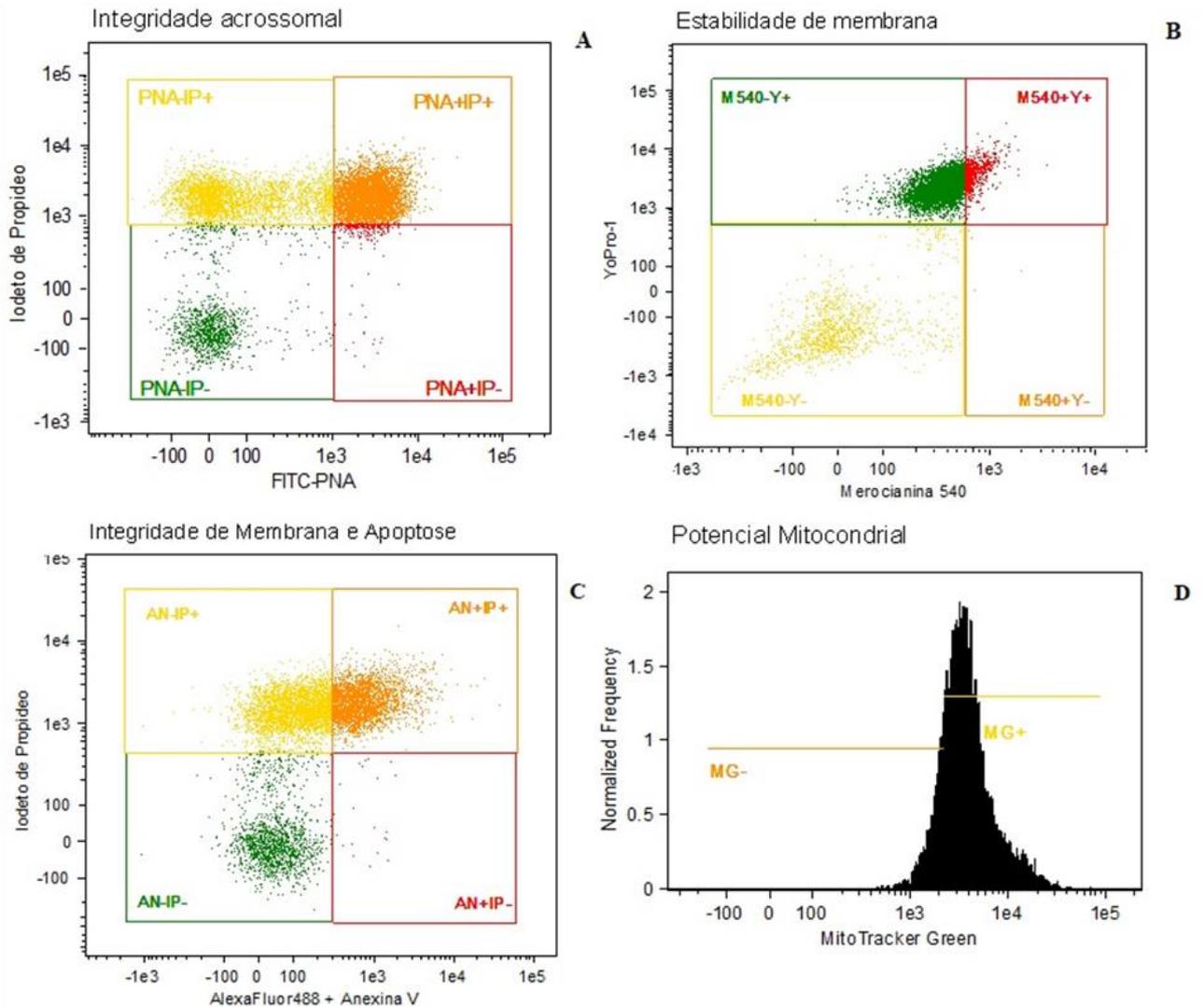


Figura 1. Representação da análise de citometria de fluxo em gráfico de dispersão e histograma. A) avaliação de integridade acrossomal pela coloração com FITC-PNA e Iodoto de Propídeo. B) avaliação de estabilidade de membrana plasmática pela coloração com Merocianina540 e YoPro1. C) avaliação da integridade de membrana e apoptose pela coloração com AlexaFluor488+AnexinaV e Iodoto de Propídeo. D) avaliação de potencial mitocondrial pela coloração com MitoTracker Green. Fonte: Arquivo Embrapa, por Natalia Capobianco

4.4. Extração e quantificação de DNA livre de células (cfDNA) total no plasma seminal e quantificação de número de cópias de cfmtDNA por PCR em tempo real (qPCR).

O cfDNA foi isolado a partir do kit Quick-cfDNA/cfRNA™ Serum & Plasma (Zymo Research, Irvine, CA, EUA) de acordo com as recomendações do fabricante. Foram realizadas três extrações para cada touro, a partir de um volume de 1mL de plasma seminal por extração. Após cada extração, foi realizada a quantificação de

DNA total presente no plasma seminal pelo espectrofotômetro NanoDrop (Thermo Fisher Scientific, Waltham/MA, EUA) e utilizada a média dos valores encontrados. Para a quantificação relativa do número de cópias de DNA mitocondrial foram utilizados os genes GAPDH (constitutivo) e o gene mitocondrial MTND1, com estabelecimento de uma curva padrão. Dois conjuntos de *primers* foram desenhados para o gene MTND1 e um para o GAPDH (Tabela 1).

Para o gene GAPDH foi realizada PCR em tempo real, em volume final de 25µL contendo 0,2µM de cada *primer* (*forward* e *reverse*), 12,5 µL de GoTaq Mix e 1µL de DNA genômico, com o protocolo de um ciclo a 95°C por 2 min, 40 ciclos de 5s a 95 °C, 1 min a 60 °C.

Para o gene MTND1 foi realizada PCR em um volume total de 20 µL contendo 1 × Taqbuffer, 1,5 mM MgCl₂, 0,8 mM dNTPs, 1 U Platinum™ Taq polimerase (Invitrogen, CA, EUA), 0,5 µM de cada *primer* (*forward* e *reverse*) ND1 OUT e 2 µL de DNA genômico de sangue. As etapas de amplificação foram a desnaturação a 95 °C por 4 min, 38 ciclos a 95 °C por 30s, 54 °C por 49s e 72 °C por 1 min, com extensão final a 72 °C por 15 min. Após a PCR, os amplicons foram purificados em gel de agarose, usando o Wizard SV Gel and PCR Clean-up System (Promega Corporation, Madison, WI, USA) de acordo com as instruções do fabricante. Os amplicons purificados foram clonados no vetor TOPO TA Cloning (sistema pCR®2.1-TOPO®vector, Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) e transferidos para células DH5α, usando um protocolo de choque térmico. O DNA do plasmídeo foi isolado utilizando Pureyield™ Plasmid Miniprep System (Promega Corporation, Madison, WI, EUA), e os clones individuais sequenciados em sequenciador automático ABI3100. Após o sequenciamento foi confirmado 100% de identidade do inserto clonado com a sequência depositada no "GenBank" do gene MTND1 (número de acesso AF492351.1) O DNA plasmidial foi quantificado por espectrofotômetro e diluído em série para geração da curva padrão para a quantificação relativa do número de cópias de cfmtDNA.

O número de cópias de DNA foi quantificado por qPCR usando GoTaq® DNA Polimerase (Promega, Madison, Wisconsin, EUA) em sistema de PCR em tempo real ABI 7500 HT Fast (Applied Biosystems), com o protocolo de um ciclo a 95°C por 2 min, 40 ciclos de 5s a 95 °C e 1 min a 60 °C. Cada reação de qPCR inclui 0,2 uM de cada *primer* (*forward* e *reverse*) para o gene GAPDH e 0,1 uM de cada *primer* ND1 INNER para o gene MTND1, 12,5 µL de GoTaq Mix e 3µL de cfDNA na concentração

de 15ng/uL no volume final. A especificidade dos ensaios de qPCR foi observada devido à presença de um único pico nas curvas de *melting*.

Tabela 1. Identificação de genes, sequência de primers, tamanho do amplicons em pb e número de acesso no “GenBank”.

Gene	Sequência do primer	Tamanho amplicon (pb)	Número de acesso “GenBank”
ND1 OUT	F: 5'GGCCGTAGCATTCTTACGTT 3' R: 5'GAGGATAGGGTATTGGTAGGGGA 3'	239	AF492351.1
ND1 INNER	F: 5' CGAAAAGGTCCAAATGTCGT 3' R: 5' CTGAAGATGTAGCGGGTCGT 3'	103	AF492351.1
GAPDH	F: 5' ACCATCCCATCAACTCAACAG 3' R: 5' CCACAGAGTGAAAGGCTCATAG 3'	87	NM_001034034

4.5. Produção *in vitro* de embriões

Ovários de vacas mestiças (*Bos indicus* x *Bos taurus*) foram coletados em abatedouro logo após o abate dos animais e transportados para o laboratório a 35 °C. Folículos de 3 a 8 mm foram aspirados e os complexos de cumulus-ovócitos (CCOs) contendo citoplasma homogêneo e mais de três camadas compactas de células do cumulus selecionados. Após a seleção, os ovócitos foram maturados em meio de maturação, composto por TCM -199 (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB), 0,01 UI/mL de FSH 0,1 mg/mL de L-glutamina, cisteamina 0,1µM/mL e antibiótico (amicacina, 0,075mg/mL), durante um período de 22 a 24h em estufa com temperatura a 38,5 °C e 5% de CO₂.

Após a maturação, os ovócitos foram transferidos para gotas de meio FIV, consistindo em meio TALP (PARRISH et al., 1995) suplementado com penicilamina (2mM), hipotaurina (1mM), epinefrina (250mM) e heparina (10µg/mL). Em seguida os CCOs foram co-incubados com espermatozoides de cada touro, selecionados por gradiente de densidade de Percoll na concentração 1×10⁶/mL, por 18h.

Após as 18h de co-cultivo, os possíveis zigotos foram transferidos para meio de fluido de oviduto sintético (SOF) suplementado com 2.77mM de myo-inositol e 5% de SFB (HOLM, 1988) e, então cultivadas à 38,5 °C em estufa com 5% de CO₂, por

sete dias, sendo avaliadas as taxas de clivagem em D2 e taxa de blastocisto nos dias D6 e D7. Foram realizadas três réplicas por touro; sendo que a cada réplica foram utilizados sêmen de três touros de forma randomizada, juntamente com o touro controle do laboratório. De e forma que todos os touros foram testados pelo menos uma vez com os demais touros.

4.6. Coloração diferencial de embriões

Os blastocistos expandidos (Bx) em D7 de cultivo foram utilizados para coloração diferencial entre as células de trofotoderma (TE) e a massa celular interna (MCI) para avaliação da qualidade embrionária, conforme descrito por Kawamoto et al. (2019). As células foram coradas com Hoechst 33342 e iodeto de propídeo. Os embriões foram retirados do cultivo, lavados três vezes em PBS com polivinilpirrolidona (PVP 0,1%) e incubados em 500 µL de solução de IP (PBS/PVP com 0,3% de Triton 100X e 100µg/mL de IP) por 30 segundos. Em seguida, os blastocistos foram lavados três vezes em PBS/PVP e incubados por 15 minutos em 500µL solução de paraformaldeído 4% com Hoechst 33342 (5mg/mL). Após incubação, foram lavados novamente três vezes em PBS/PVP e colocados em lâmina e lamínula para contagem das células em microscópio de epifluorescência (Carl ZEISS Axioplan-2, LLC, Estados Unidos) com excitação UV de 460nm para Hoechst e 560nm para iodeto de propídeo. O número total de células contadas corresponde às células coradas em azul, enquanto as células que aparecem em vermelho foram consideradas TE. Foram consideradas células da MCI aquelas coradas apenas em azul. Embriões com 20-40% de MCI em relação ao número total de células são considerados de boa qualidade (ZULLO et al., 2015).

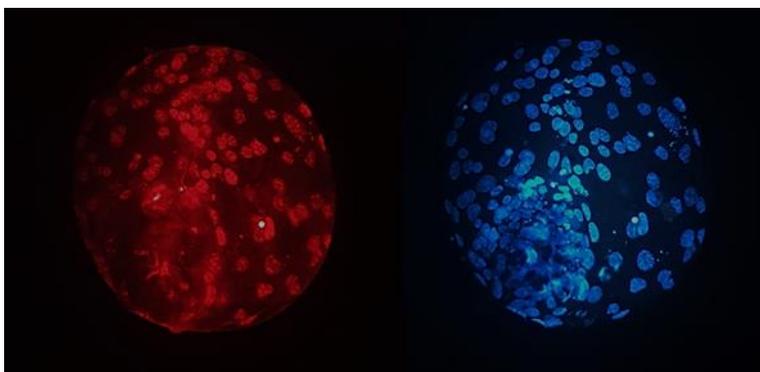


Figura 2. Blastocisto expandido corado pela técnica de coloração diferencial. À esquerda, células do trofotoderma coradas pelo IP, à direita todas as células do embrião coradas pelo Hoechst 33342.

Fonte: Arquivo Embrapa, por Natalia Capobianco

4.7. Análise estatística

Dados de estatística descritiva foram gerados usando o PROC UNIVARIATE do SAS (SAS on Demand, SAS Institute Inc., Cary, NC).

Para os parâmetros avaliados no sêmen fresco e contagem de células, os dados foram avaliados por ANOVA, usando o PROC GLIMMIX do SAS. Modelo estatístico inclui o efeito de grupo (*cell-free* DNA ou de DNA mitocondrial). Para cada grupo, modelos separados foram avaliados. Para os parâmetros avaliados no sêmen descongelado a diferentes momentos após o descongelamento, os dados foram avaliados como medidas repetidas por ANOVA, usando o PROC GLIMMIX do SAS. Modelo estatístico incluiu o efeito fixo de grupo, tempo, e interação entre grupo e tempo; e o efeito aleatório de animal aninhado em réplica. O valor do parâmetro na avaliação do sêmen fresco foi adicionado como um covariável no modelo. As estruturas de covariável autorregressiva 1, simetria composta, Toeplitz, e não estruturada foram testadas e aquela que resultou no menor critério de informação bayesiano foi selecionada. Para cada modelo, os resíduos foram testados para normalidade e homogeneidade de variância. Dados foram log transformados quando as premissas do modelo não foram atendidas.

Para a proporção de ovócitos clivados, proporção de embriões em D6 e D7, e proporção de células na massa celular interna do embrião, os dados foram avaliados por regressão logística, usando PROC GLIMMIX no SAS. Os dados foram considerados como distribuição binomial. Modelo estatístico incluiu o efeito fixo de grupo, e o efeito aleatório de réplica. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando $P < 0,05$.

4.8. Delineamento experimental

Esse projeto teve por objetivo verificar a possibilidade de usar o cfDNA presente no plasma seminal como marcador para resistência a criopreservação e fertilidade *in vitro* de touros Nelore. O sêmen de nove touros previamente selecionados foi coletado, parte do ejaculado foi utilizado para a obtenção do plasma seminal e outra parte utilizada para criopreservação de 50 doses de sêmen. Foram realizados dois experimentos, o primeiro com o objetivo relacionar a presença de cfDNA no plasma seminal com a congelabilidade do sêmen. E, o segundo visando relacionar a presença de cfDNA com a capacidade das amostras de sêmen de produzir embriões *in vitro*.

4.8.1. EXPERIMENTO 1– Relação entre a quantidade de cfDNA presente no plasma seminal e a congelabilidade do sêmen de touros Nelore

Logo após a coleta, o ejaculado de cada animal foi separado em duas porções. A primeira foi utilizada para a obtenção de plasma seminal, que após duas centrifugações para a eliminação de todas as células, foi estocada a -80°C até a análise. Da outra metade foi retirada uma alíquota para a avaliação do sêmen fresco e, o restante foi criopreservado e estocado a -196°C . As amostras foram avaliadas quanto a motilidade e parâmetro cinéticos (CASA), concentração, morfologia, integridade e estabilidade da membrana plasmática, integridade acrossomal, apoptose e potencial mitocondrial.

Para avaliação da congelabilidade, uma amostra de cada animal foi descongelada e incubada a $38,5^{\circ}\text{C}$ em meio TALP até 12 horas pós-descongelamento. As avaliações de motilidade e cinética dos espermatozoides, integridade e estabilidade da membrana plasmática, integridade acrossomal, apoptose e potencial mitocondrial foram realizadas às 0h, 3h, 6h e 12 horas pós-descongelamento.

O plasma seminal armazenado foi descongelado e utilizado para a quantificação de cfDNA total e número relativo de cópias de cfDNA mitocondrial (cfmtDNA), em relação ao DNA nuclear. A partir do resultado da quantificação de cfDNA presente no plasma, os touros foram divididos em dois grupos, de baixa e alta concentração de cfDNA, de acordo com a mediana calculada. O mesmo procedimento foi realizado para separar os touros em grupos de alto e baixo número de cópias de cfmtDNA no plasma seminal.

4.8.2. EXPERIMENTO 2 – Relação entre a presença de cfDNA no plasma seminal com a capacidade do sêmen de touros Nelore de produzir embriões *in vitro*.

Para avaliar a capacidade de produzir embriões, amostras de sêmen de cada animal foram utilizadas individualmente para a fecundação *in vitro*. Foram realizadas 3 réplicas de cada animal, alternando 3 touros utilizados simultaneamente em uma mesma placa de FIV, a cada réplica. Após a fecundação, os possíveis zigotos foram cultivados até o D7 de desenvolvimento. Foram avaliadas a taxa de clivagem (D2), taxa de blastocisto (D6 e D7) e velocidade de desenvolvimento dos embriões, além

da qualidade dos embriões através da coloração diferencial. Esses parâmetros foram comparados entre os grupos de baixa e alta concentração de cfDNA e entre os grupos de alto e baixo número de cópias de cfmtDNA, determinados no experimento 1.

5. RESULTADOS

EXPERIMENTO 1 - Relação entre a quantidade de cfDNA presente no plasma seminal e a congelabilidade do sêmen de touros Nelore

Inicialmente, foi realizada uma análise descritiva dos parâmetros avaliados no sêmen fresco, a qual é apresentada na tabela 2.

Tabela 2. Estatística descritiva das variáveis analisadas no sêmen fresco de nove touros da raça Nelore.

Variável	Média \pm desvio padrão	Mediana	Max.	Min.
cfDNA (ng/ μ L)	142,81 \pm 167,14	58,95	519,71	15,23
cfmtDNA (n ^o cópias)	8,59 \pm 7,17	5,35	24,38	0,97
Concentração (x10 ⁶)	912,22 \pm 405,89	860	1740	420
Def. maiores (%)	6,5 \pm 5,68	4,5	21	3
Def. menores (%)	7,5 \pm 3,37	6,5	13	3
Membrana plasmática íntegra (%)	64,96 \pm 16,69	69,10	84,9	38,6
Início de apoptose (%)	1,08 \pm 2,75	0,02	8,35	0
Necrose (%)	27,48 \pm 17,34	25,52	61,48	0,98
Vivos com acrossomal íntegro (%)	66,75 \pm 17,81	74,40	86,62	40,10
Membrana estável (%)	70,23 \pm 22,24	78,10	99,30	28,97
Viáveis com membrana estável (%)	57,87 \pm 26,30	72,2	84,6	5,57
Potencial mitocondrial (%)	99,91 \pm 0,13	99,90	100,0	99,6
Motilidade total (%)	81,89 \pm 24,43	87,00	98,0	29,0
Motilidade progressiva (%)	62,00 \pm 20,11	68,00	81,0	20,0
VAP (μ m/s)	101,94 \pm 11,61	97,50	118,70	87,2
VSL (μ m/s)	82,74 \pm 14,37	87,20	99,50	61,80
VCL (μ m/s)	174,37 \pm 22,52	176,60	219,30	144,80
ALH (μ m)	6,72 \pm 2,01	6,10	9,3	3,8
BCF (Hz)	35,91 \pm 9,33	39,80	48,9	23,9
STR (%)	78,89 \pm 7,8	83,00	90,0	68,0

LIN (%)	49,33 ± 12,47	55.00	66.00	33.00
---------	---------------	-------	-------	-------

VAP = velocidade média da trajetória; VCL= velocidade curvilínea; VSL= velocidade linear progressiva; ALH= amplitude de deslocamento lateral da cabeça; BCF = frequência de batimento flagelar; STR= retilinearidade; LIN= linearidade.

As mesmas avaliações foram realizadas para todos os animais após o descongelamento. A comparação entre o sêmen fresco e após o descongelamento mostrou que a criopreservação afetou ($p < 0,05$) várias das características de qualidade seminal avaliadas, tais como, parâmetros de movimento e status de acromossoma e integridade de membrana plasmática (Tabela 3).

Tabela 3. Comparação de características das células espermáticas presentes no sêmen fresco e criopreservado de nove touros da raça Nelore (média ± erro padrão).

Característica das células espermáticas	Fresco	Descongelado 0h	P
Membrana plasmática íntegra (%)	64,96 ± 4,56	25,93 ± 2,63	<0,0001
Início de apoptose (%)	1,08 ± 0,49	0,44 ± 0,28	0,35
Necrose (%)	27,48 ± 5,60	24,95 ± 3,23	0,70
Vivos com acrossomo íntegro (%)	66,75 ± 3,49	13,81 ± 2,01	<0,0001
Membrana estável (%)	70,23 ± 5,68	86,90 ± 3,28	0,02
Viáveis com membrana estável (%)	57,87 ± 5,13	16,31 ± 2,96	<0,0001
Potencial mitocondrial (%)	99,91 ± 5,21	88,31 ± 3,01	0,06
Motilidade total (%)	81,89 ± 5,52	27,81 ± 3,19	<0,0001
Motilidade progressiva (%)	62,00 ± 4,54	18,44 ± 2,62	<0,0001
VAP (µm/s)	101,94 ± 4,20	93,78 ± 2,42	0,10
VSL (µm/s)	82,74 ± 4,51	76,14 ± 2,60	0,21
VCL (µm/s)	174,38 ± 7,36	172,91 ± 4,25	0,86
ALH (µm)	6,72 ± 0,42	7,80 ± 0,24	0,04
BCF (Hz)	35,91 ± 1,82	34,34 ± 1,04	0,46
STR (%)	78,89 ± 1,93	79,48 ± 1,12	0,86
LIN (%)	49,33 ± 2,54	45,67 ± 1,47	0,22

VAP = velocidade média da trajetória; VCL= velocidade curvilínea; VSL= velocidade linear progressiva; ALH= amplitude de deslocamento lateral da cabeça; BCF = frequência de batimento flagelar; STR= retilinearidade; LIN= linearidade.

Para avaliar a relação entre a quantidade de cfDNA e a congelabilidade do sêmen e produção de embriões *in vitro* foi realizada a quantificação de cfDNA presente no plasma seminal (Figura 3). A concentração de cfDNA variou de 15,23 ng/µL à 519,71 ng/µL e a partir destes valores a mediana foi calculada (58,95 ng/µL). Dois

grupos de animais foram definidos de acordo com a mediana, sendo os touros com concentração de cfDNA abaixo da mediana incluídos no grupo de baixa concentração de cfDNA [$<58,95$ ng/ μ L (n=5) *Baixo-cfDNA*] e os touros com concentração acima da mediana incluídos no grupo de alta concentração de cfDNA [$>58,95$ ng/ μ L (n=4) *Alto-cfDNA*].

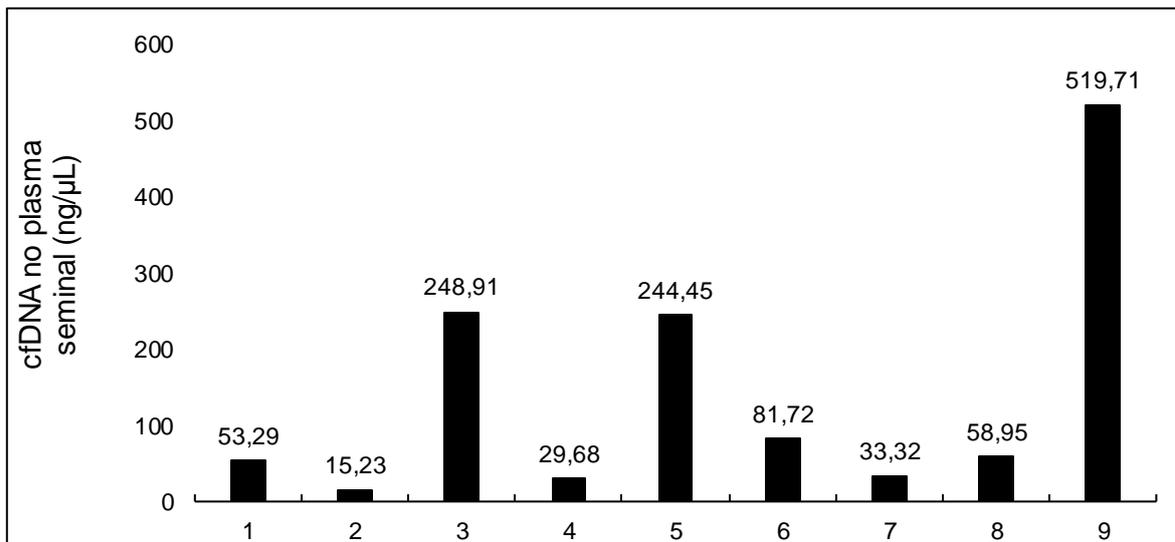


Figura 3. Quantificação de cfDNA no plasma seminal de nove touros da raça Nelore (1-9).

No sêmen fresco, o grupo de baixa concentração de cfDNA apresentou maior porcentagem de espermatozoides com estabilidade de membrana plasmática ($84,24\% \pm 7,07$) do que o grupo de alta concentração de cfDNA ($52,72\% \pm 7,90$) ($P=0,02$). Também foi detectada diferença entre os grupos na BCF, que foi superior no grupo de baixa concentração do que no de alta ($p<0,05$). Para os demais parâmetros seminais avaliados não houve diferença entre os grupos, assim como não foi observada diferença no número de cópias de cfmtDNA entre os grupos de cfDNA (Tabela 4).

Tabela 4 . Características das células espermáticas presentes no sêmen fresco de touros da raça Nelore com baixa e alta concentração de cell-free DNA (cfDNA) no plasma seminal (média \pm erro padrão).

Variável	<i>Baixo-cfDNA</i>	<i>Alto-cfDNA</i>	Valor de P
cfDNA (ng/ μ L)	$38,09 \pm 53,49$	$273,70 \pm 59,80$	0,02
cfmtDNA (nº cópias)	$9,14 \pm 3,42$	$7,91 \pm 3,82$	0,82
Membrana plasmática íntegra (%)	$70,16 \pm 7,41$	$58,45 \pm 8,29$	0,33

Início de apoptose (%)	1,71 ± 1,27	0,31 ± 1,42	0,96
Necrose (%)	21,57 ± 7,59	34,86 ± 8,48	0,28
Vivos com acrossomo integro (%)	70,58 ± 8,23	61,96 ± 9,20	0,51
Membrana estável (%)	84,24 ± 7,07	52,72 ± 7,90	0,02
Viáveis com membrana estável (%)	68,36 ± 11,08	44,77 ± 12,39	0,20
Potencial mitocondrial (%)	99,88 ± 0,06	99,95 ± 0,06	0,45
Motilidade total (%)	88,80 ± 9,46	73,25 ± 10,58	0,31
Motilidade progressiva (%)	72,20 ± 7,68	49,25 ± 8,58	0,09
VAP (µm/s)	105,66 ± 5,13	97,30 ± 5,74	0,31
VSL (µm/s)	88,22 ± 6,13	75,90 ± 6,85	0,22
VCL (µm/s)	170,06 ± 10,48	179,78 ± 11,72	0,56
ALH (µm)	5,80 ± 0,80	7,87 ± 0,90	0,13
BCF (Hz)	41,08 ± 3,36	29,45 ± 3,76	0,05
STR (%)	82,80 ± 3,01	76,25 ± 3,37	0,19
LIN (%)	54,80 ± 5,09	42,50 ± 5,69	0,15

VAP = velocidade média da trajetória; VCL= velocidade curvilínea; VSL= velocidade linear progressiva; ALH= amplitude de deslocamento lateral da cabeça; BCF = frequência de batimento flagelar; STR= retilinearidade; LIN= linearidade.

Quando as características seminais avaliadas imediatamente após o descongelamento do sêmen foram comparadas entre os entre animais de alta e baixa concentração de cfDNA nenhuma diferença foi observada (Tabela 5).

Tabela 5. Características das células espermáticas avaliadas no momento do descongelamento do sêmen de touros da raça Nelore com baixa e alta concentração de cell-free DNA (cfDNA) no plasma seminal (média ± erro padrão).

Características das células espermáticas	Baixo-cfDNA	Alto-cfDNA	Valor de P
Membrana plasmática íntegra (%)	20,21 ± 2,93	29,20 ± 3,25	0,19
Início de apoptose (%)	0,48 ± 0,16	0,39 ± 0,18	0,73
Necrose (%)	25,01 ± 3,69	24,87 ± 4,15	0,98
Vivos com acrossomo íntegro (%)	12,19 ± 1,63	15,83 ± 1,83	0,15
Membrana estável (%)	79,41 ± 5,37	96,26 ± 6,20	0,08
Viáveis com membrana estável (%)	15,53 ± 2,09	17,27 ± 2,36	0,60
Potencial mitocondrial (%)	88,37 ± 9,05	88,23 ± 10,15	0,99
Motilidade total (%)	28,76 ± 2,55	26,63 ± 2,87	0,59
Motilidade progressiva (%)	20,05 ± 2,10	16,44 ± 2,39	0,30
VAP (µm/s)	97,60 ± 5,08	89,00 ± 5,71	0,28

VSL ($\mu\text{m/s}$)	$82,16 \pm 5,44$	$68,61 \pm 6,13$	0,12
VCL ($\mu\text{m/s}$)	$171,77 \pm 5,77$	$174,33 \pm 6,47$	0,77
ALH (μm)	$7,75 \pm 0,41$	$7,85 \pm 0,46$	0,87
BCF (Hz)	$34,25 \pm 1,54$	$34,45 \pm 1,75$	0,94
STR (%)	$81,87 \pm 2,03$	$76,50 \pm 2,29$	0,09
LIN (%)	$48,16 \pm 2,76$	$42,55 \pm 3,12$	0,20

VAP = velocidade média da trajetória; VCL= velocidade curvilínea; VSL= velocidade linear progressiva; ALH= amplitude de deslocamento lateral da cabeça; BCF = frequência de batimento flagelar; STR= retilinearidade; LIN= linearidade.

Para avaliar se o cfDNA está relacionado à congelabilidade do sêmen, as características seminais foram avaliadas em diferentes momentos por até 12 horas pós descongelamento e, foram comparadas entre os grupos de alta e baixa concentração de cfDNA. Todos os parâmetros de qualidade seminal, quando avaliados ao longo do tempo de incubação, foram semelhantes ($p > 0,05$) entre os grupos de baixa e alta concentração de cfDNA. Os parâmetros de motilidade, integridade e estabilidade de membrana plasmática, potencial mitocondrial (Figura 4), assim como os parâmetros de movimento dos espermatozoides mostraram apenas efeito do tempo de incubação (Figura 5). Já a apoptose, necrose e porcentagem de espermatozoides vivos com acrossomo íntegro, foi similar entre os grupos.

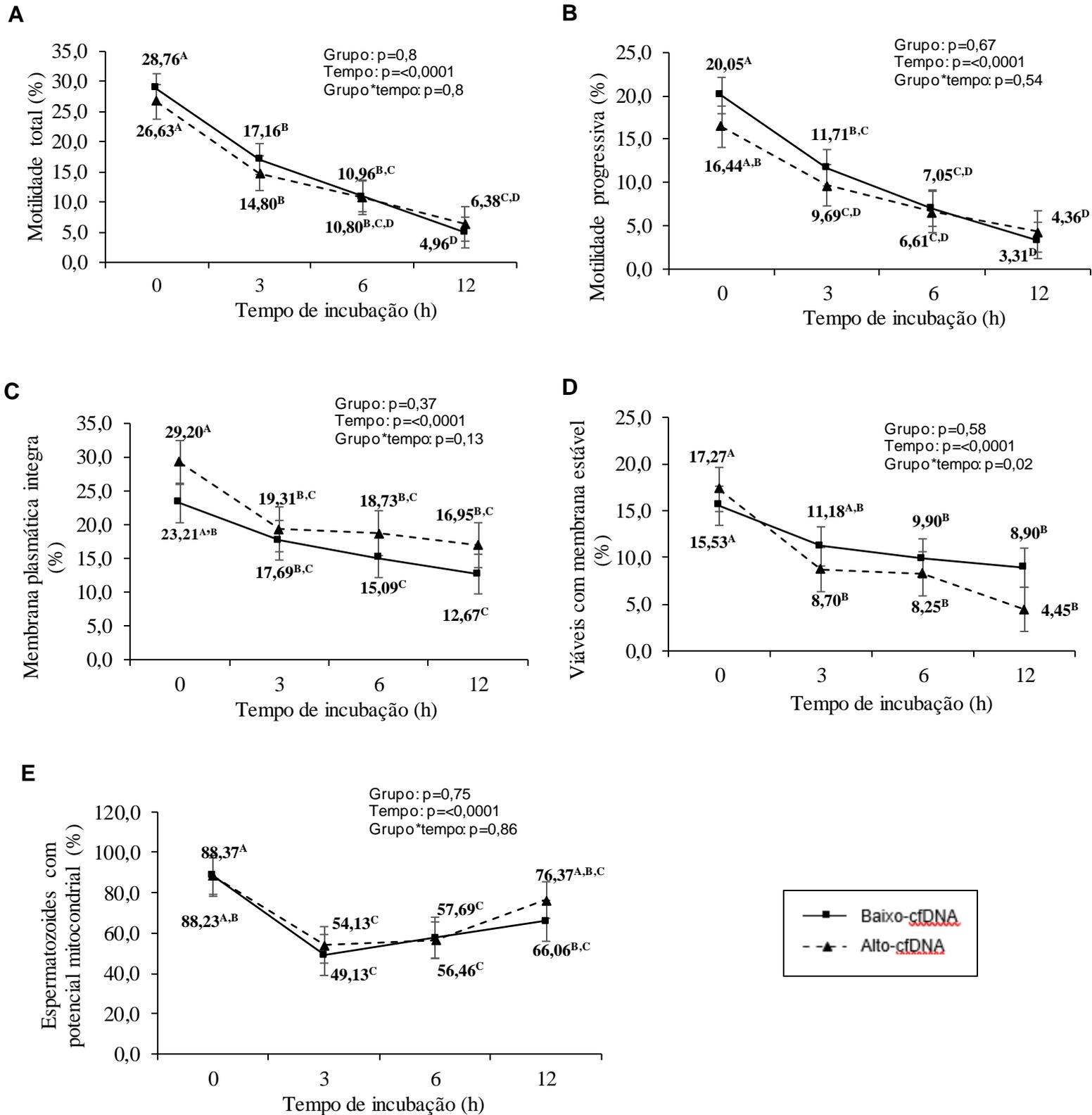


Figura 4. Motilidade total (A), motilidade progressiva (B) e, porcentagem de espermatozoides com membrana plasmática íntegra (C), viáveis com membrana estável (D); e com potencial mitocondrial (E) as 0h, 3h, 6h, 12h pós-descongelamento nos grupos Alto-cfDNA e Baixo-cfDNA. ^{A,B,C,D} Letras diferentes na mesma linha indicam diferença significativa entre diferentes momentos, por ANOVA - PROC GLIMMIX ($p<0,05$).

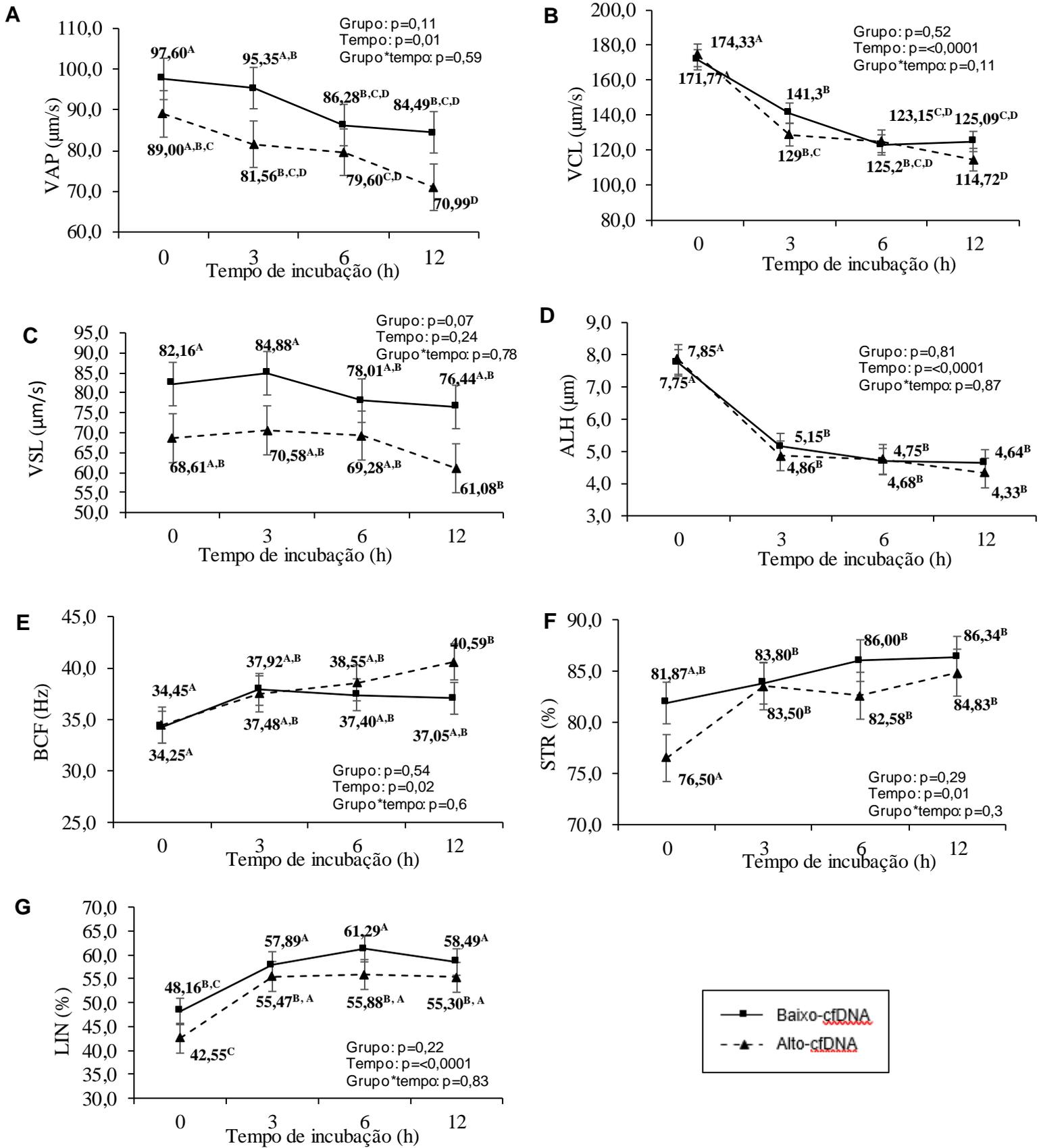


Figura 5. Parâmetros de movimento espermático avaliados pelo sistema CASA: (A) velocidade média da trajetória - VAP; (B) velocidade curvilínea - VCL; (C) velocidade linear progressiva - VSL; (D) amplitude do movimento lateral da cabeça - ALH; (E) frequência de batimento flagelar-BCF; (F) retilinearidade - STR e (G) linearidade - LIN, avaliados ao longo do tempo (0h, 3h, 6h, 12h), nos grupos Alto-cfDNA e Baixo-cfDNA. A,B,C,D Letras diferentes na mesma linha indicam diferença significativa entre diferentes momentos, por ANOVA - PROC GLIMMIX ($p<0,05$)

As mesmas análises foram realizadas considerando o *cell-free* mtDNA. Esse foi determinado pelo número de cópias de cfmtDNA relativo ao DNA genômico, calculado pela razão da quantificação dos genes MTND1/GAPDH, por qPCR. Essa quantificação foi realizada para cada animal e o número relativo de cópias de cfmtDNA variou entre 0,97 e 24,37 cópias, sendo a mediana de 5,35 cópias (Figura 6).

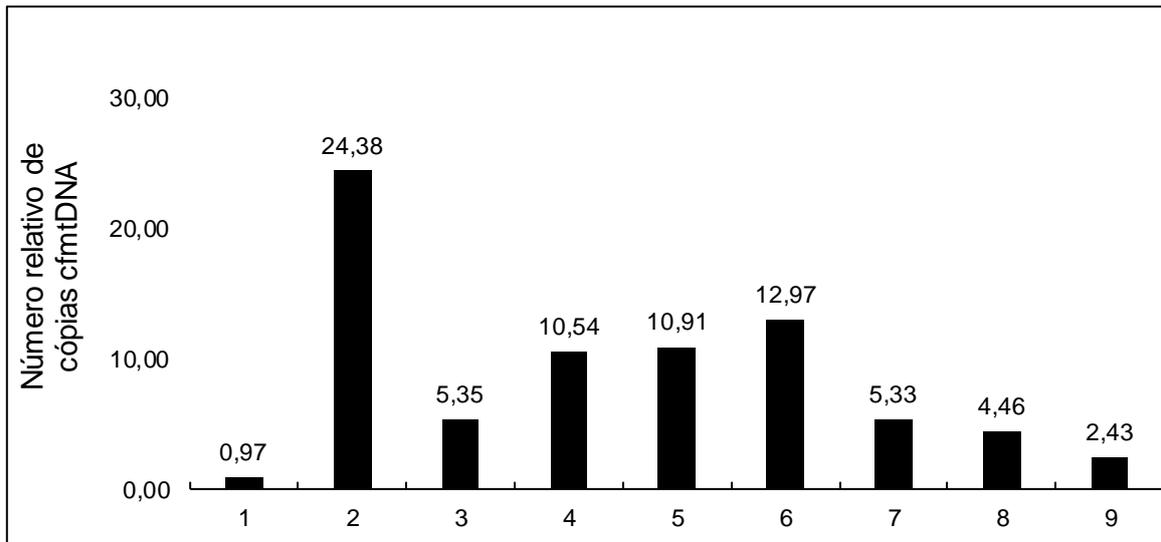


Figura 6. Número relativo de cópias de *cell-free* DNA mitocondrial (cfmtDNA), em relação ao DNA nuclear quantificado por q-PCR no plasma seminal de nove touros da raça Nelore (1-9).

Semelhante às análises realizadas para cfDNA, para o DNA mitocondrial presente no plasma foi determinada a mediana e, a partir desse valor, os touros foram separados em grupos, de Baixo-cfDNA [$<5,35$ cópias ($n=5$)] e Alto-cfDNA [$>5,35$ cópias ($n=4$)]. No sêmen fresco, a porcentagem de espermatozoides em necrose foi maior no grupo Alto-cfDNA ($p=0,03$), e os parâmetros de velocidade VAP e VSL foram maiores no grupo Baixo-cfDNA ($p=0,03$), resultados estes apresentados na tabela 6.

Tabela 6. Características das células espermáticas avaliadas no sêmen fresco de touros da raça Nelore com baixo e alto número relativo de cópias de cell-free DNA mitocondrial (cfmtDNA) no plasma seminal (média \pm erro padrão).

Características espermáticas	Baixo-cfmtDNA	Alto-cfmtDNA	P
cfmtDNA (nº cópias)	3,7 \pm 2,0	14,7 \pm 2,3	< 0,01
cfDNA (ng/ μ L)	182,8 \pm 18,9	92,8 \pm 21,1	0,46
Membrana plasmática íntegra (%)	71,7 \pm 7,0	56,6 \pm 7,8	0,19
Início de apoptose (%)	0,28 \pm 0,7	0,35 \pm 1,3	0,96
Necrose (%)	17,0 \pm 5,8	40,6 \pm 6,4	0,03
Vivos com acrossomo íntegro (%)	71,2 \pm 8,1	61,2 \pm 9,1	0,44
Membrana estável (%)	67,8 \pm 10,5	73,3 \pm 11,8	0,74
Viáveis com membrana estável (%)	55,7 \pm 12,5	60,7 \pm 14,0	0,80
Potencial mitocondrial (%)	100,0 \pm 0,06	99,9 \pm 0,07	0,48
Motilidade total (%)	80,2 \pm 10,2	84,0 \pm 11,4	0,81
Motilidade progressiva (%)	68,8 \pm 9,4	57,3 \pm 10,5	0,56
VAP (μ m/s)	109,0 \pm 3,8	93,1 \pm 4,3	0,03
VSL (μ m/s)	91,5 \pm 4,8	71,9 \pm 5,3	0,03
VCL (μ m/s)	169,6 \pm 10,4	180,4 \pm 11,6	0,51
ALH (μ m)	5,8 \pm 0,8	7,9 \pm 0,9	0,14
BCF (Hz)	40,7 \pm 3,6	29,9 \pm 4,0	0,08
STR (%)	82,6 \pm 3,1	76,5 \pm 3,4	0,23
LIN (%)	55,2 \pm 5,0	42,0 \pm 5,5	0,12

VAP = velocidade média da trajetória; VCL= velocidade curvilínea; VSL= velocidade linear progressiva; ALH= amplitude de deslocamento lateral da cabeça; BCF = frequência de batimento flagelar; STR= retilinearidade; LIN= linearidade.

Após o descongelamento (Tabela 7), a porcentagem de espermatozoides em necrose foi o único parâmetro que diferiu entre os grupos, sendo maior no grupo Alto-cfmtDNA ($p=0,04$).

Tabela 7. Características das células espermáticas avaliadas no sêmen criopreservado de touros da raça Nelore com baixo e alto número relativo de cópias de cell-free DNA mitocondrial (cfmtDNA) no plasma seminal (média \pm erro padrão).

Características das células espermáticas	Baixo-cfmtDNA	Alto-cfmtDNA	P
Membrana plasmática íntegra (%)	25,8 \pm 3,2	26,1 \pm 3,6	0,96
Início de apoptose (%)	0,2 \pm 0,2	0,7 \pm 0,2	0,12

Necrose (%)	19,7 ± 3,6	31,5 ± 4,1	0,04
Vivos com acrossomo integro(%)	13,8 ± 1,8	13,8 ± 2,0	0,99
Membrana estável (%)	85,3 ± 3,6	88,9 ± 4,0	0,51
Viáveis com membrana estável (%)	17,9 ± 2,6	14,3 ± 2,9	0,36
Potencial mitocondrial (%)	84,5 ± 2,8	93,1 ± 3,2	0,06
Motilidade total (%)	28,2 ± 4,0	27,3 ± 4,4	0,89
Motilidade progressiva (%)	18,6 ± 2,9	18,3 ± 3,3	0,94
VAP (µm/s)	90,7 ± 3,4	97,6 ± 3,8	0,19
VSL (µm/s)	74,1 ± 3,6	78,7 ± 4,0	0,40
VCL (µm/s)	165,9 ± 5,6	181,6 ± 6,3	0,08
ALH (µm)	7,6 ± 0,2	7,9 ± 0,3	0,36
BCF (Hz)	34,3 ± 0,9	34,4 ± 1,0	0,89
STR (%)	79,5 ± 1,4	79,5 ± 1,6	0,99
LIN (%)	45,7 ± 1,4	45,7 ± 1,6	0,99

VAP = velocidade média da trajetória; VCL= velocidade curvilínea; VSL= velocidade linear progressiva; ALH= amplitude de deslocamento lateral da cabeça; BCF = frequência de batimento flagelar; STR= retilinearidade; LIN= linearidade.

Os parâmetros seminais, avaliados em até 12 horas após o descongelamento também foram comparados entre os grupos de Alto-cfmtDNA e Baixo-cfmtDNA. A motilidade total e progressiva, integridade da membrana plasmática, potencial mitocondrial, espermatozoides viáveis com membrana estável e acrossomo integro foram semelhantes entre os grupos, e diferiram ao longo do tempo, assim como os parâmetros cinéticos (Figuras 7 e 8).

Para a porcentagem de espermatozoides em necrose foi detectada uma interação entre grupo e tempo ($P < 0,01$), sendo que, a porcentagem de espermatozoides em necrose no grupo Alto-cfmtDNA foi diminuindo ao longo do tempo, enquanto no grupo Baixo-cfmtDNA foi aumentando. semelhante e se manteve ao longo do tempo, conforme apresentado na figura 9.

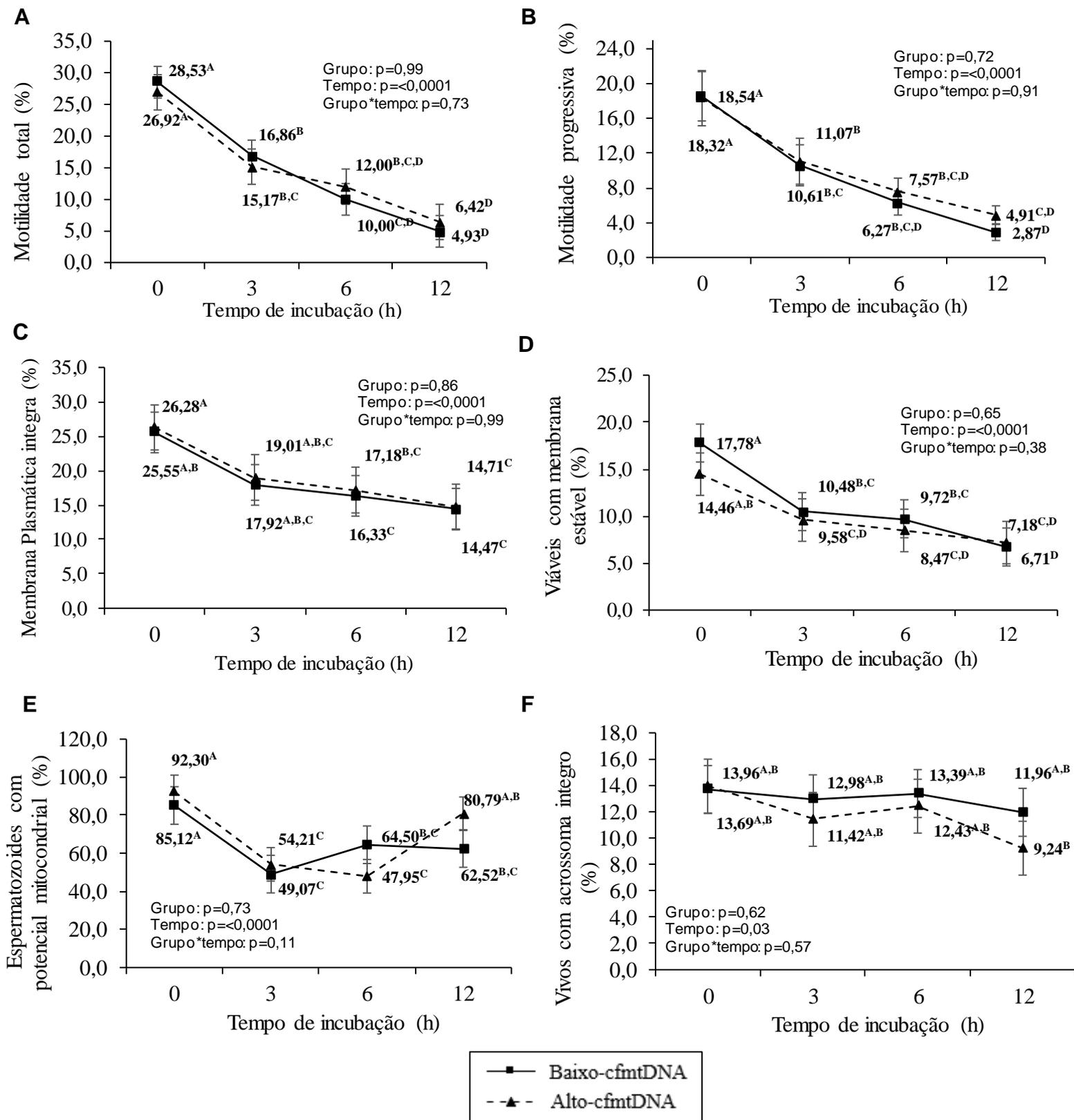


Figura 7. Motilidade total (A), motilidade progressiva (B), porcentagem de espermatozoides com membrana plasmática íntegra (C), viáveis com membrana estável (D); porcentagem de espermatozoides com potencial mitocondrial (E), e vivos com acrosoma íntegro (F), as 0h, 3h, 6h, 12h pós-descongelamento nos grupos Alto-cfmtDNA e Baixo-cfmtDNA. ^{A,B,C,D} Letras diferentes na mesma linha indicam diferença significativa entre diferentes momentos, por ANOVA - PROC GLIMMIX ($p<0,05$).

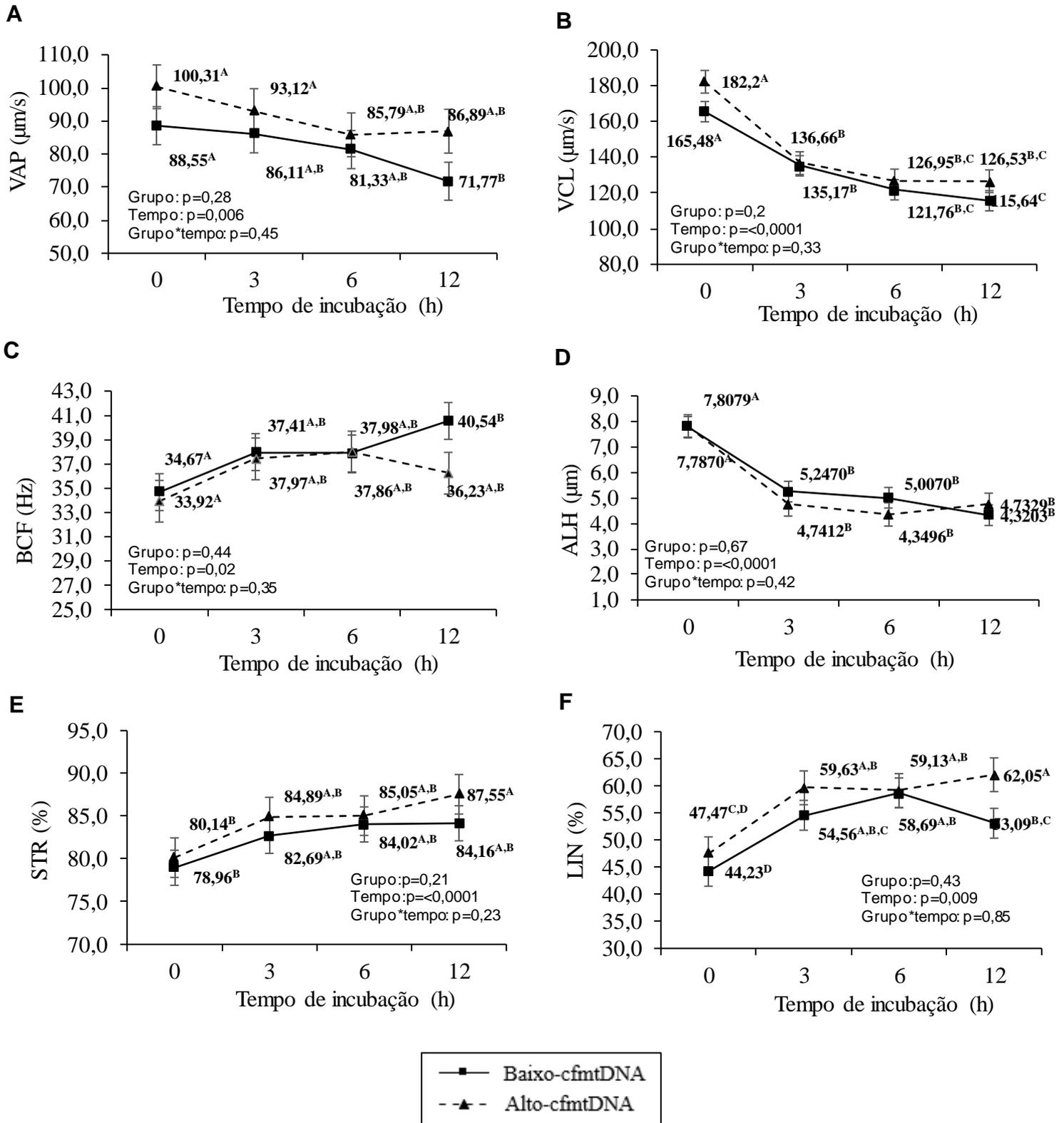


Figura 8. Parâmetros de movimento espermático avaliados pelo sistema CASA: (A) velocidade média da trajetória - VAP; (B) velocidade curvilínea - VCL; (C) frequência de batimento flagelar - BCF; (D) amplitude do movimento lateral da cabeça - ALH; (E) retilinearidade - STR e (F) linearidade - LIN, avaliados ao longo do tempo (0h, 3h, 6h, 12h), nos grupos Alto-cfimtDNA e Baixo-cfimtDNA. ^{A,B,C,D} Letras diferentes na mesma linha indicam diferença significativa entre diferentes momentos, por ANOVA - PROC GLIMMIX ($p<0,05$).

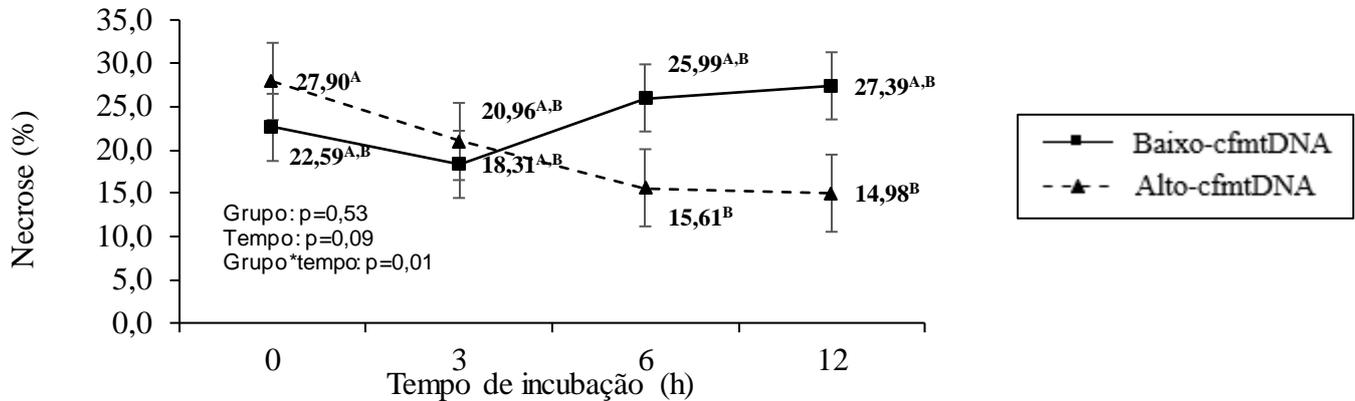


Figura 9. Porcentagem de espermatozoides em necrose, avaliado ao longo do tempo (0h, 3h, 6h, 12h), nos grupos Alto-cfmtDNA e Baixo-cfmtDNA. ^{A,B} Letras diferentes na mesma linha indicam diferença significativa na interação entre grupo e tempo, por ANOVA - PROC GLIMMIX ($p < 0,05$).

EXPERIMENTO 2 – Relação entre a quantidade de cfDNA presente no plasma seminal e a capacidade do sêmen de touros Nelore de produzir embriões *in vitro*

A produção de embriões *in vitro* dos nove touros foi realizada individualmente e os resultados são apresentados na Tabela 8. A média de blastocistos produzidos em D7 pelo touro controle do laboratório, em nove réplicas, foi de 38%, variando entre 31% e 46%.

Tabela 8. Produção de embriões *in vitro* bovinos utilizando de nove touros da raça Nelore classificados de acordo com a quantidade de cell-free DNA (cfDNA) e o número relativo de cópias de cell-free DNA mitocondrial (cfmtDNA) no plasma seminal.

Touros	cfDNA		cfmtDNA		N Ovócitos	Produção de embriões		
	ng/μl	Grupo	Nº cópias	Grupo		Clivagem D2 N (%)	Blastocistos D6 N (%)	Blastocistos D7 N (%)
Controle					314	247 (79)	28 (9)	119 (38)
1	53,29	Alto	0,97	Baixo	101	46 (46)	2 (2)	7 (7) ^{a,c}
2	15,23	Baixo	24,38	Alto	121	71 (59)	0 (0)	11 (9) ^{a,c}
3	248,91	Alto	5,35	Baixo	129	45 (35)	2 (2)	14 (11) ^a
4	29,68	Baixo	10,54	Alto	94	38 (40)	5 (5)	12 (13) ^a
5	244,45	Alto	10,91	Alto	89	62 (70)	4 (4)	23 (26) ^b
6	81,72	Alto	12,97	Alto	109	70 (64)	15 (14)	32 (29) ^b
7	33,32	Baixo	5,33	Baixo	120	50 (42)	0 (0)	5 (4) ^{c,d}
8	58,95	Baixo	4,46	Baixo	123	39 (32)	1 (0,8)	2 (2) ^d
9	519,71	Alto	2,43	Baixo	145	98 (68)	10 (7)	46 (32) ^b

^{a,b,c,d} Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa pelo teste do qui-quadrado ($p < 0,05$).

Para avaliar a relação entre cfDNA e a produção de embriões *in vitro*, os grupos de baixa e alta concentração de cfDNA foram comparados quanto as taxas de clivagem e de blastocistos em D6 e D7 de desenvolvimento. Foram observadas diferenças entre os dois grupos nos três parâmetros avaliados, tendo o grupo de alta concentração de cfDNA maiores taxas de clivagem e produção de embriões em D6 e D7 (Tabela 9).

Tabela 9. Taxa de clivagem e produção de blastocistos em D6 e D7 de desenvolvimento dos grupos de baixa e alta concentração de cfDNA no plasma seminal (média ± erro padrão).

Variável	Grupo		Valor de P
	Baixo-cfDNA	Alto-cfDNA	
N ovócitos	559	472	
Clivagem D2 (%)	41,21 ± 3,23	60,74 ± 3,38	<0,01
Blastocisto D6 (%)	1,45 ± 0,52	6,49 ± 1,31	<0,01
Blastocisto D7 (%)	6,42 ± 1,14	24,95 ± 2,56	<0,01

Dados analisados por regressão logística, usando PROC GLIMMIX no SAS.

A qualidade dos embriões, avaliada pela porcentagem de células da massa celular interna em relação ao número de células do embrião não apresentaram diferença entre os grupos, indicando boa qualidade embrionária para ambos (Tabela 10). Entretanto, o número total de células e número de células da MCI dos embriões do grupo de alta concentração de cfDNA foi maior.

Tabela 10. Avaliação do número de células embrionárias de blastocistos em D7 de desenvolvimento dos grupos de alta e baixa concentração de cfDNA (média ± erro padrão).

Variável	Grupo		Valor de P
	Baixo-cfDNA	Alto-cfDNA	
N embriões	19	40	
MCI (n)	45,00 ± 3,45	53,45 ± 2,38	0,05
TE	72,95 ± 4,55	81,45 ± 3,14	0,13
Total	117,95 ± 7,01	134,90 ± 4,83	0,05
MCI (%)	38,15 ± 1,03	39,62 ± 0,67	0,24

MCI=massa celular interna; TE= trofocodermia.

Quando comparados os grupos de Baixo-cfDNA e Alto-cfDNA, a taxa de embriões clivados em D2 foi maior ($p=0,05$) no grupo de alto-cfDNA, no entanto, a

taxa de blastocistos em D6 e D7 foram semelhantes para ambos os grupos (Tabela 11).

Tabela 11. Taxa de clivagem e produção de blastocistos em D6 e D7 de desenvolvimento dos grupos de baixo e alto número de cópias de cell-free mtDNA (cfmtDNA) no plasma seminal (média ± erro padrão)

Variável	Grupo		Valor de P
	Baixo-cfmtDNA	Alto-cfmtDNA	
N ovócitos	618	413	
Clivagem (%)	44,97 ± 4,40	58,32 ± 5,21	0,05
Blastocisto D6 (%)	2,42 ± 1,11	5,81 ± 2,07	0,14
Blastocisto D7(%)	11,97 ± 2,77	18,89 ± 4,09	0,16

Dados analisados por regressão logística, usando PROC GLIMMIX no SAS.

Em relação a qualidade embrionária, avaliada pelo número de células dos embriões, ambos os grupos produziram embriões considerados de boa qualidade, com 39,24% de MCI para o grupo de Baixo-cfmtDNA e 39,15% de MCI para Alto-cfmtDNA, e foram semelhantes quanto ao número de células do embrião (MCI, TE e total), conforme apresentado na tabela 12.

Tabela 12. Avaliação do número de células embrionárias de blastocistos em D7 de desenvolvimento dos grupos de alto e baixo número de cópias de cfmtDNA (média ± erro padrão).

Variável	Grupo		Valor de P
	Baixo-cfmtDNA	Alto-cfmtDNA	
N embriões	23	36	
MCI (n)	52,12 ± 3,16	49,77 ± 2,62	0,57
TE	80,71 ± 4,12	77,34 ± 3,41	0,53
Total	132,83 ± 6,42	127,11 ± 5,31	0,49
MCI (%)	39,24 ± 1,35	39,15 ± 1,14	0,96

MCI=massa celular interna; TE= trofotoderma.

6. DISCUSSÃO

Considerando que a extensão dos danos causados pela criopreservação nas células espermáticas depende do indivíduo, a identificação de um marcador que possa indicar se uma amostra de sêmen é de alta ou baixa congelabilidade, previamente ao congelamento, seria de grande valia. Portanto, este projeto objetivou avaliar se a quantidade de cfDNA e o número de cópias de cfmtDNA no plasma seminal de bovinos poderia estar relacionado à qualidade do sêmen, sua

criotolerância e sua capacidade de fecundar e produzir embriões *in vitro*, podendo assim ser utilizado como marcador para a qualidade seminal.

Inicialmente, o sêmen fresco e congelado de todos os animais foi avaliado para diversos parâmetro de qualidade. Os resultados mostraram que a criopreservação afetou a motilidade total e progressiva, estabilidade de membrana plasmática, integridade da membrana plasmática e acrossomal. Essas alterações já eram esperadas e, estão de acordo com os efeitos da criopreservação sobre as células espermáticas, amplamente descritos na literatura. O estresse causado pelo choque térmico do congelamento leva a diminuição do metabolismo com perda irreversível da motilidade, alterações na permeabilidade da membrana, reação acrossomal precoce levando a perda da viabilidade celular (WATSON, 2000; LEMMA 2011; RIOS et al. 2018; UPADHYAY et al., 2021).

A quantificação de cfDNA no plasma seminal dos nove reprodutores mostrou valores que variaram de 15,23 ng/μL a 519,71 ng/μL, indicando haver uma grande variação entre os indivíduos. Resultados semelhantes foram relatados por Ponti et al, (2018) que encontraram valores discrepantes quando avaliaram o plasma seminal de homens saudáveis (52,9 ng/μL a 62,5 ng/μL) e de pacientes com câncer de próstata (508 ng/μL a 4800 ng/μL). Esses dados sugerem que a quantidade de cfDNA no plasma pode estar associado a algum tipo de patologia. De fato, estudos em humanos tem relatado uma associação entre a quantidade de cfDNA e anormalidades espermáticas (COSTA et al., 2017; DI PIZIO et al., 2020; MBAYE et al., 2021). Portanto, para avaliar a possível relação entre o cfDNA e as características seminais em bovinos, os animais foram agrupados de acordo com a concentração e, distribuídos em dois grupos de alta ou baixa cfDNA.

A comparação das características do sêmen fresco entre os dois grupos (alta e baixa concentração) mostrou que a única variável que diferiu entre eles foi a porcentagem de células com membrana estável, que foi maior no grupo de baixa concentração de cfDNA. A desestabilização da membrana está relacionada com o início do processo de capacitação, e a ocorrência do processo de capacitação precoce levaria a morte do espermatozoide, conseqüentemente, a perda da sua capacidade de fecundação. Sendo assim, a maior estabilidade de membrana no grupo de baixa concentração poderia indicar melhor qualidade seminal, como já descrito na literatura (HALLAP et al .2006; PRIETO-MARTÍNEZ et al., 2014). Em contrapartida, quando o sêmen é utilizado na FIV, o tempo necessário até a fecundação é menor do que *in*

vivo, considerando que o espermatozoide não precisa passar pelo trato reprodutivo da fêmea e não depende da ovulação, portanto, é possível que a desestabilização da membrana tenha mais impacto na IA do que na FIV. Entretanto, seria importante que outros parâmetros também apresentassem diferença para que se pudesse afirmar que a concentração de cfDNA tem alguma implicação na qualidade do sêmen fresco. Para estudar a relação do cfDNA com a resposta a criopreservação, todas as avaliações foram realizadas em diferentes momentos após o descongelamento. Não foram observadas diferenças para nenhuma das características espermáticas logo após o descongelamento (0 horas), sugerindo que a quantidade de cfDNA não está relacionada à maneira que a célula espermática responde ao estresse da criopreservação. Entretanto, para melhor avaliar o comportamento do sêmen quanto a crioresistência, os mesmos parâmetros seminais foram avaliados ao longo de 12 horas após o descongelamento. Semelhante a 0h, nenhuma diferença entre os grupos de alta e baixa concentração de cfDNA foi observada. As diferenças encontradas demonstraram apenas efeito do tempo na qualidade espermática. Esse efeito pode ser observado pois os principais parâmetros avaliados, como motilidade total e progressiva, integridade e estabilidade de membrana, apresentaram diminuição significativa nas primeiras 3 horas após o descongelamento. Essa queda na qualidade foi semelhante entre os dois grupos e está de acordo com outros estudos que relatam declínio nos parâmetros de motilidade progressiva e integridade da membrana plasmática 2 horas (MUIÑO et al., 2008) e 3 horas pós-descongelamento (CUNHA et al., 2019). É importante ressaltar que as alterações ao longo do tempo foram semelhantes para ambos os grupos, tornando a concentração de cfDNA do plasma seminal inviável para ser utilizada como marcador de criotolerância dos espermatozoides bovinos.

Considerando a importância do sistema mitocondrial na saúde reprodutiva de humanos e animais, e os relatos de que a quantidade relativa de cfmtDNA (cfmtDNA/gDNA) no fluído folicular e meio de cultivo está relacionada a qualidade de ovócito e embriões (STIGLIANI et al., 2019; LIU et al., 2019; LIU et al., 2020), essa avaliação também foi realizada no plasma seminal dos reprodutores. Semelhante ao cfDNA, os animais foram agrupados de acordo com o número de cópias de cfmtDNA, que variou entre 0,97 e 24,38 cópias. Este estudo foi o primeiro a quantificar DNA mitocondrial livre em plasma seminal de bovinos. Chen et al. (2018) avaliaram o número de cópias de cfmtDNA no plasma seminal de humanos, e apresentaram média

de 310,3 cópias no grupo de homens com parâmetros seminais normais, enquanto homens inférteis apresentaram número de cópias reduzido (média de 23,1 cópias no grupo de oligoastenozoospermia). A avaliação do sêmen de acordo com os grupos de Alto-cfmtDNA e Baixo-cfmtDNA mostrou que a porcentagem de células necróticas foi maior no grupo de Alto-cfmtDNA, tanto no sêmen fresco, quanto no sêmen descongelado. É possível que esse resultado esteja relacionado com a origem do DNA livre no plasma, já que esse material é liberado por células apoptóticas e necróticas (SURAJ et al., 2017). Por outro lado, no sêmen fresco, os parâmetros de velocidade VAP e VSL foram maiores no grupo de Baixo-cfmtDNA, assim, este grupo apresentou menor necrose e maior velocidade dos espermatozoides, podendo ser um indicativo de melhor qualidade do sêmen fresco. Entretanto, como não existe nenhum estudo em bovinos que quantifique o cfmtDNA no plasma seminal não se tem nenhum parâmetro de comparação o que dificulta a análise do resultado. Com os resultados obtidos neste estudo, entretanto, não se tem evidências suficientes para confirmar que em bovinos a quantidade de *cell-free* mtDNA no plasma seminal em bovinos está relacionado a qualidade do sêmen. Isso porque foram utilizados apenas 9 animais e porque somente a porcentagem de células em necrose foi diferente e, nenhum outro parâmetro de qualidade apresentava-se alterado. Além disso, dados obtidos em humanos são também controversos, sendo que já foi relatado menor número de cópias no plasma seminal relacionado com baixa qualidade do sêmen (Chen et al., 2018) e maior número de cópias de cfmtDNA relacionado com anormalidades no sêmen (Song et al., 2008),

Na avaliação ao longo das 12 horas após o descongelamento, os grupos de Alto-cfmtDNA e Baixo-cfmtDNA foram similares para todos os parâmetros avaliados, com exceção da porcentagem de células em necrose. Essa variável foi diferente entre os grupos nos vários momentos de avaliação, inclusive foi detectada uma interação entre grupo x tempo de incubação, sendo que após as 12 horas houve diminuição de células necróticas no grupo de Alto-cfmtDNA e um aumento no grupo Baixo-cfmtDNA. Esses resultados sugerem que o número de cópias de cfmtDNA pode ter alguma relação com a sobrevivência dos espermatozoides. Uma possibilidade é que o aumento no cfmtDNA pode ser o reflexo de disfunção mitocondrial causada pela necrose e que como em um dos grupos ela já está mais alta desde o início da avaliação a porcentagem tende a diminuir e não aumentar ao longo do tempo.

Outro foco deste estudo era avaliar o quanto o cfDNA presente no plasma poderia indicar quais os reprodutores a serem utilizados na PIV. Para isso, o sêmen criopreservado de todos os reprodutores foi utilizado individualmente para a produção de embriões *in vitro*. Semelhante às avaliações da qualidade seminal, os mesmos grupos foram utilizados para as comparações da produção de embriões. Os touros incluídos no grupo de alta concentração de cfDNA produziram maiores taxas de clivagem em D2 e essa diferença se manteve na produção de blastocistos em D6 e D7. As taxas de blastocisto de ambos os grupos foram baixas em relação às taxas relatadas na literatura, acima de 30% de taxa de blastocistos em D7 (CUNHA et al., 2019; LEME et al., 2020; FIDELIS et al., 2020), contudo esse resultado possivelmente se deve aos touros utilizados, já que as taxas observadas para o touro controle do laboratório foram similares as relatadas na literatura. Tal fato pode ser constatado pela taxa de clivagem que também já foi inferior ao que é relatado por vários autores. É importante salientar que, apesar das taxas menores, a diferença entre a produção dos grupos de alta e baixa concentração de cfDNA é evidente, sugerindo que existem uma relação entre a maior concentração de cfDNA e desenvolvimento embrionário *in vitro*.

Com relação à qualidade dos embriões, foram utilizados a relação de células da massa celular interna (MCI) e trofoblasto e o número total de células como parâmetros. A cinética de desenvolvimento, que indica a velocidade que os embriões se desenvolvem, foi similar entre os grupos já que a porcentagem de embriões que atingiram o estágio de Bx, em D6 e D7, foi semelhante. A avaliação diferencial das células embrionárias mostrou que ambos os grupos apresentaram a relação entre MCI e trofoblasto dentro dos parâmetros considerados normais (KAWAMOTO et al., 2019). Entretanto, o número total de células foi maior no grupo de alta concentração de cfDNA, indicando que os embriões produzidos por esses touros eram também de melhor qualidade. O grupo de alta concentração de cfDNA apresentou uma média de 134,90 células totais no embrião expandido, valor próximo ao encontrado em embriões expandidos produzidos *in vivo* (ULLOA et al., 2015) e *in vitro* (PONTELO et al., 2021). Esses parâmetros têm sido usados por vários autores para avaliar embriões produzidos *in vitro* (ULLOA et al., 2015; GUIMARÃES et al., 2015; MARQUES et al., 2018, FIDELIS et al., 2020) e é considerado um bom indicativo da qualidade embrionária.

O mesmo padrão de desenvolvimento embrionário não foi observado quando os grupos de Alto-cfDNA e Baixo-cfDNA foram comparados. Apesar da taxa de

clivagem ter sido diferente, a produção de blastocisto em D6 e em D7 foi semelhante entre os dois grupos. No que se refere a qualidade dos embriões, o número total e tipo de células foi semelhante entre os dois grupos, entretanto os embriões do grupo Alto-cfDNA apresentaram maior velocidade de desenvolvimento com maior taxa de embriões que atingiram o estágio de Bx no D7.

Desta forma, os resultados da avaliação da produção de embriões mostram claramente que a quantidade de cfDNA e, não a quantidade de cfmtDNA, do plasma seminal está associado, de alguma forma, a capacidade dos espermatozoides de produzir embriões *in vitro* e de influenciar a qualidade desses embriões. O mecanismo que explicaria como uma maior quantidade de cfDNA no plasma seminal poderia estar envolvido na maior capacidade de produzir embriões *in vitro*, é desconhecida e mais estudos são necessários para que possamos avaliar com exatidão os fatores envolvidos. O efeito do touro na clivagem e na taxa de blastocisto tem sido observado por vários autores (Machado et al., 2009; Al Naib et al., 2011; Leme et al., 2020). Entretanto, o fator responsável pela variação individual entre touros ainda não está esclarecido, mas é possível que algum tipo de variação no DNA ou mesmo alguma variação epigenética possa estar envolvida. Portanto, é possível que esses mesmos fatores possam alterar a quantidade de cfDNA no plasma seminal desses animais o que explicaria a sua relação com a produção de embriões.

Em resumo, o grupo de baixa concentração de cfDNA apresentou melhores parâmetros seminais no sêmen fresco, não havendo diferença entre os grupos na resposta a criopreservação ao longo do período pós-descongelamento, enquanto na produção embrionária houve melhor desempenho do grupo de alta concentração de cfDNA. Desta maneira, podemos entender que a melhor qualidade seminal não necessariamente indica melhor produção de embriões *in vitro*. Além disso, o cfDNA não pode ser utilizado como marcador para a resistência a criopreservação, contudo, parece ser um potencial marcador para a capacidade de produzir embriões *in vitro*.

7. CONCLUSÃO

Em conclusão, a concentração de cfDNA e o número de cópias de DNA mitocondrial presentes no plasma seminal não são capazes de prever a congelabilidade do sêmen. Por outro lado, animais saudáveis com maior quantidade de cfDNA total são capazes de produzir *in vitro* mais embriões e de melhor qualidade.

No entanto, novos estudos com animais de outras raças e diferentes parentescos são necessários para validar a concentração de cfDNA como marcador para a produção de embriões.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AL NAIB, A.; HANRAHAN, J. P.; LONERGAN, P.; FAIR, S. In vitro assessment of sperm from bulls of high and low field fertility. *Theriogenology*, 76(1), 161–167, 2011.

CHEN, Y.; LIAO, T.; ZHU, L.; LIN, X.; WU, R.; JIN, L. Seminal plasma cell-free mitochondrial DNA copy number is associated with human semen quality. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*. 231:164-168, 2018.

CHOU, J.S.; JACOBSON, J.D.; PATTON, W.C.; KING, A.; CHAN, P.J. Modified isocratic capillary electrophoresis detection of cell-free DNA in semen. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*. 21(11):397-400, 2004.

COLÉGIO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL. Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal. 3ed. Belo Horizonte: Colégio Brasileiro de Reprodução Animal, 104p, 2013.

COSTA, F.; BARBISAN, F.; ASSMANN, C.E.; ARAÚJO, N.K.F.; DE OLIVEIRA, A.R.; SIGNORI, J.P.; ROGALSKI, F.; BONADIMAN, B.; FERNANDES, M.S.; DA CRUZ, I.B.M. Seminal cell-free DNA levels measured by PicoGreen fluorochrome are associated with sperm fertility criteria. *Zygote*. 25(2):111-119, 2017.

CUNHA, A.T.M.; CARVALHO, J.O.; KUSSANO, N.R.; MARTINS, C.F.; MOURÃO, G.B.; DODE, M.A.N. Bovine epididymal spermatozoa: Resistance to cryopreservation and binding ability to oviductal cells, *Cryobiology*, Volume 73, Issue 3, Pages 348-355, 2016.

CUNHA, A.T.M.; CARVALHO, J.O.; KUSSANO, N.R.; MARTINS, C.F.; MOURÃO, G.B.; DODE, M.A.N. Bovine epididymal spermatozoa: Resistance to cryopreservation and binding ability to oviductal cells. *Cryobiology*. 73(3), 348–355, 2019.

DI PIZIO, P.; CELTON, N.; MENOUD, P.A. et al. Seminal cell-free DNA and sperm characteristic's: An added biomarker for male infertility investigation. *Andrologia*; 53: e13822, 2021.

DING, S.; SONG, X.; GENG, X.; LIU, L.; MA, H.; WANG, X.; WEI, L.; XIE, L.; SONG, X. Saliva-derived cfDNA is applicable for EGFR mutation detection but not for quantitation analysis in non-small cell lung cancer. *Thoracic Cancer*, 10(10), 1973–1983, 2019.

ELLINGER, J.; ALBERS, P.; MULLER, S.C.; VON RUECKER, A.; BASTIAN, P.J. Circulating mitochondrial DNA in the serum of patients with testicular germ cell cancer as a novel noninvasive diagnostic biomarker. *BJU Int.*104(1):48–52, 2009.

FAIR, S.; LONERGAN, P. Review: Understanding the causes of variation in reproductive wastage among bulls. Volume 12, Supplement s1 (Theory to Practice - International Bull Fertility Conference 27–30 May 2018, Westport, Ireland). s53-s62, 2018.

FIDELIS, A. A. G.; FERNANDES, G. O.; KAWAMOTO, T. S.; MELO, F. R.; DODE, M. A. N.35 Ethanol extracts of Cerrado plants in cryotolerance of invitro-produced bovine embryos. *Reproduction Fertility and Development*, v. 32, p. 143, 2020.

GALEAZZI, M.; MOROZZI, G.; PICCINI, M.; CHEN, J.; BELLISAI, F.; FINESCHI, S.; MARCOLONGO, R. Dosage and characterization of circulating DNA: present usage and possible applications in systemic autoimmune disorders. *Autoimmunity Reviews*. 2(1), 50–55, 2003.

GLIOZZI, T.M.; TURRI, F.; MANES, S.; CASSINELLI, C.; PIZZI, F. The combination of kinetic and flow cytometric semen parameters as a tool to predict fertility in cryopreserved bull semen. *Animal*. 11(11):1975-1982, 2017.

GUIMARÃES, A.L.; PEREIRA, S.A.; LEME, L.O.; DODE, M.A.N. Evaluation of the simulated physiological oocyte maturation system for improving bovine in vitro embryo production. *Theriogenology*.1;83(1):52-7, 2015.

HALLAP, T.; NAGY, S.; JAAKMA, U.; JOHANNISSON, A.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Usefulness of a triple fluorochrome combination Merocyanine 540/Yo-Pro

1/Hoechst 33342 in assessing membrane stability of viable frozen-thawed spermatozoa from Estonian Holstein AI bulls. *Theriogenology*. 65, 6:1122-1136, 2006.

HOLM, P. Developmental kinetics of the first cell cycles of bovine *in vitro* produced embryos in relation to their *in vitro* viability and sex. *Theriogenology*. 50, 8: 1285-1299, 1988.

HOLT, W.V. Basic aspects of frozen storage of semen. *Animal Reproduction Science*. 18,62(1-3):3-22, 2000.

KAWAMOTO, T.S.; PONTELO, T. P.; FIGUEIREDO, R. A.; DODE, M. A. N. Coloração diferencial de células para avaliação da qualidade de embriões bovinos – Documento Embrapa, 2019.

KOHLER, C.; RADPOUR, R.; BAREKATI, Z.; ASADOLLAHI, R.; BITZER, J.; WIGHT, E. et al. Levels of plasma circulating cell-free nuclear and mitochondrial DNA as potential biomarkers for breast tumors. *Mol Cancer*.8:105, 2009.

LEME, L.O.; CARVALHO, J.O.; FRANCO, M.M; DODE, M.A.N. Effect of sex on cryotolerance of bovine embryos produced *in vitro*. *Theriogenology* Volume 141, Pages 219-227, 2020.

LEMMA, A. Effect of Cryopreservation on Sperm Quality and Fertility. In (Ed.), *Artificial Insemination in Farm Animals*, 2011.

LI, H.G.; HUANG, S.Y.; ZHOU, H.; LIAO, A.H.; XIONG, C.L. Quick recovery and characterization of cell-free DNA in seminal plasma of normozoospermia and azoospermia: implications for non-invasive genetic utilities. *Asian Journal of Andrology*. 11(6):703-9, 2009.

LIU, Y.; SHEN, Q.; LI, H.; XIANG, W.; ZHANG, L. Cell-free mitochondrial DNA increases granulosa cell apoptosis and reduces aged oocyte blastocyst development in the mouse. *Reprod Toxicol*.98:278-285, 2020.

LIU, Y.; SHEN, Q.; ZHAO, X.; ZOU, M.; SHAO, S.; LI, J.; REN, X.; ZHANG, L. Cell-free mitochondrial DNA in human follicular fluid: a promising biomarker of blastocyst

developmental potential in women undergoing assisted reproductive technology. *Reproductive Biology and Endocrinology*. 10,17(1):54, 2019.

MARQUES, T. C.; DA SILVA SANTOS, E. C.; DIESEL, T. O.; LEME, L. O.; MARTINS, C. F.; DODE, M.; ALVES, B. G.; COSTA, F.; DE OLIVEIRA, E. B.; GAMBARINI, M. L. Melatonin reduces apoptotic cells, SOD2 and HSPB1 and improves the in vitro production and quality of bovine blastocysts. *Reproduction in domestic animals*. 53(1), 226–236, 2018.

MBAYE, M.; KHALFI, B.; LOUANJLI, N.; SAADANI, B.; KAAROUCH, I.; MADKOUR, A.; SOUKRI, A. Seminal Cell-Free DNA Test for the Management of Male Infertility. *Annual Research & Review in Biology*, 30(5): 1-10, 2019.

MBAYE, M. M.; ZEKHNINI, H.; KHALFI, B. E.; LOUANJLI, N.; ZAKARIA, M.; ELMELLOULI, F.; SOUKRI, A. Determination of Free DNA (cfDNA) by RT-qPCR in Individuals in Sperm Alterations. *Annual Research & Review in Biology*, 36(5), 1-6, 2021.

MUIÑO, R.; RIVERA, M.M.; RIGAU, T.; RODRIGUEZ-GIL, J.E.; PEÑA, A.I. Effect of different thawing rates on post-thaw sperm viability, kinematic parameters and motile sperm subpopulations structure of bull semen. *Anim Reprod Sci*. 109(1-4):50-64, 2008.

PARRISH, J.J.; KROGENAES, A.; SUSKO-PARRISH, J.L. Effect of bovine sperm separation by either swim-up or Percoll method on success of in vitro fertilization and early embryonic development. *Theriogenology*. 44: 859-869, 1995.

POLINA, I.A.; ILATOVSKAYA, D.V.; DELEON-PENNELL, K.Y. Cell-free DNA as a diagnostic and prognostic marker for cardiovascular diseases. *Clinica Chimica Acta*. 503:145-150, 2020.

PONS-REJRAJI, H.; BAILEY, J.L.; LECLERC, P. Cryopreservation affects bovine sperm intracellular parameters associated with capacitation and acrosome exocytosis. *Reprod Fertil Dev*;21(4):525-37, 2009

PONTELO, T. P.; FRANCO, M. M.; KAWAMOTO, T. S.; CAIXETA, F. M. C.; LEME, L. O.; KUSSANO, N. R.; ZANGERONIMO, M. G.; DODE, M. A. N. Histone deacetylase inhibitor during in vitro maturation decreases developmental capacity of bovine oocytes. *PLoS One*, v. 16, p. e0247518, 2021.

PONTI, G.; MACCAFERRI, M.; MANDRIOLI, M.; MANFREDINI, M.; MICALI, S.; COTUGNO, M. et al. Seminal Cell-Free DNA Assessment as a Novel Prostate Cancer Biomarker. *Pathol Oncol Res*; 24(4):941-945, 2018.

PONTI, G.; MACCAFERRI, M.; MANFREDINI, M.; MICALI, S.; TORRICELLI, F.; MILANDRI, R. et al. Quick assessment of cell-free DNA in seminal fluid and fragment size for early non-invasive prostate cancer diagnosis. *Clinica Chimica Acta*. 497:76-80, 2019.

PRIETO-MARTÍNEZ, N.; VILAGRAN, I.; MORATÓ, R.; RODRÍGUEZ-GIL, J.E.; YESTE, M.; BONET, S. Aquaporins 7 and 11 in boar spermatozoa: detection, localisation and relationship with sperm quality. *Reprod Fertil Dev*.28(6):663-72, 2014.

REN, S.; REN, X.D.; GUO, L.F.; QU, X.M.; SHANG, M.Y.; DAI, X.T.; HUANG, Q. Urine cell-free DNA as a promising biomarker for early detection of non-small cell lung cancer. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*. 13: e23321, 2020.

RIOS, A.P.; GASCÓN, A.; MARTÍNEZ, J. V.; BALASCH, S.; MOLINA BOTELLA, I. Sperm preparation after freezing improves motile sperm count, motility, and viability in frozen-thawed sperm compared with sperm preparation before freezing-thawing process. *Journal of assisted reproduction and genetics*, 35(2), 237–245, 2018.

SHILPA, M.; SELVARAJU, S.; GIRISHKUMAR, V.; PARTHIPAN, S.; BINSILA, K.B.; ARANGASAMY, A.; RAVINDRA, J.P. Novel insights into the role of cell-free seminal mRNAs on semen quality and cryotolerance of spermatozoa in bulls (*Bos taurus*). *Reproduction, Fertility and Development*. 29(12):2446-2456, 2017

SONG, G.J.; LEWIS, V. Mitochondrial DNA integrity and copy number in sperm from infertile men. *Fertility and Sterility*. 90(6):2238-44, 2008.

STIGLIANI, S.; ORLANDO, G.; MASSAROTTI, C, CASCIANO, I. et al. Non-invasive mitochondrial DNA quantification on Day 3 predicts blastocyst development: a prospective, blinded, multi-centric study. *Mol Hum Reprod*. 1;25(9):527-537, 2019.

STROUN, M.; LYAUTEY, J.; LEDERREY, C.; OLSON-SAND, A.; ANKER, P. About the possible origin and mechanism of circulating DNA apoptosis and active DNA release. *Clinica Chimica Acta*. 313(1-2):139-42, 2001.

SURAJ, S.; DHAR, C.; SRIVASTAVA, S. Circulating nucleic acids: An analysis of their occurrence in malignancies. *Biomedical reports*. 6(1): 8–14, 2017.

SWARUP, V.; RAJESWARI, M.R. Circulating (cell-free) nucleic acids--a promising, non-invasive tool for early detection of several human diseases. *FEBS Letters*. 6,581(5):795-9, 2007.

ULLOA, S.M.; HEINZMANN, J.; HERRMANN, D.; TIMMERMANN, B.; BAULAIN, U.; GROßFELD, R.; DIEDERICH, M.; LUCAS-HAHN, A.; NIEMANN, H. Effects of different oocyte retrieval and in vitro maturation systems on bovine embryo development and quality. *Zygote*.23(3):367-77, 2015

UPADHYAY, V.R.; RAMESH, V.; DEWRY, R.K.; KUMAR, G.; RAVAL, K.; PATOLIYA, P. Implications of cryopreservation on structural and functional attributes of bovine spermatozoa: An overview. *Andrologia*. 53(8): e14154, 2021.

WATSON, P.F. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Animal Reproduction Science*. 2,60-61:481-92, 2000.

WEERAKOON, K.G.; MCMANUS, D.P. Cell-Free DNA as a Diagnostic Tool for Human Parasitic Infections. *Trends in Parasitology*. 32(5):378-391, 2016.

YU, M. Circulating cell-free mitochondrial DNA as a novel cancer biomarker: opportunities and challenges. *Mitochondrial DNA*. 23(5):329–32, 2012.

ZULLO, G.; ALBERO, G.; NEGLIA, G.; DE CANDITIIS, C.; BIFULCO, G.; CAMPANILE, G.; GASPARRINI, B. L-ergothioneine supplementation during culture improves quality of bovine in vitro-produced embryos. *Theriogenology*, v. 85, n. 4, p. 688-697, mar. 2016.

ANEXOS

1. Setup para avaliação de espermatozoides bovinos – Hamilton-Thorne IVOS 12.3

Característica	Ajuste
Tipo de câmara.....	Mackler®
Temperatura.....	37°C
Seleção de campos.....	Manual – 3 a 5
Taxa de aquisição de imagem.....	60 Hz
Imagens por campo.....	30
Contraste mínimo da célula.....	80
Tamanho mínimo da célula.....	5 pixels
Intensidade da célula.....	70
Velocidade de trajeto (VAP).....	50,0 µm/s
Retilinearidade (STR).....	70%
Velocidade de corte VSL para células lentas.....	10 µm/s
Intensidade de iluminação.....	2000-2200
Fotômetro.....	50-55

2. Protocolo de sondas para avaliação espermática por citometria de fluxo

Diluições dos corantes:

Hoechst 33342: 5mg/mL, em DMSO

Solução de Hoechst 33342: 2,5mL de ringer lactato + 1µL Hoechst 33342

FITC-PNA: 1mg/mL, em PBS;

Iodeto de Propídeo: 0,5mg/mL, em água deionizada;

YoPro1: 25µM/mL, em DMSO

Merocianina 540: 1mM/mL, em DMSO

Mitotracker Green: 1mM, em DMSO

Avaliação de integridade acrossomal:

100µL ringer lactato

1,5 µL PNA

1 µL IP

33 µL Solução de Hoechst 33342

Avaliação de estabilidade de membrana:

5mL ringer lactato

1 µL YoPro1

2,6 µL Merocianina 540

1650 µL Solução de Hoechst 33342

Avaliação de potencial mitocondrial:

400µL ringer lactato

200µL solução de Hoechst 33342

1µL Mitotracker Green

Avaliação integridade de membrana e apoptose celular:

335µL solução tampão (Solução 1 do kit - 1x)

165µL solução de Hoechst 33342

25 µL Anexina-AF488

5 µL Iodeto de Propídeo (Solução 2 do kit - 100 µg/mL)