

Fertilidade e suscetibilidade à criopreservação espermática: avanços e desafios

Fertility and susceptibility to sperm cryopreservation: advances and challenges

Roberta Ferreira Leite^{1*}, João Diego de Agostini Losano², Marcilio Nichi¹

¹Departamento de Reprodução Animal, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, Av. Prof. Dr. Orlando Marques de Paiva, n. 87, Cidade Universitária, São Paulo, SP CEP 05508-270, Brasil

²Department of Animal Sciences, University of Florida, 2250 Shealy Dr, Gainesville, Florida 32608

Resumo

Estudos sobre a fisiologia espermática demonstram que padrões de fertilidade e funcionalidade espermática pós-criopreservação possuem relação importante com a eficiência do metabolismo energético destas células, bem como com a sua capacidade de manter a homeostase oxidativa. Os conhecimentos sobre a relação entre perfil fisiológico de espermatozoides e fertilidade foram e, ainda estão sendo, aprimorados, com o uso de análises de perfis moleculares, com destaque para a metabolômica. As análises moleculares permitiram a identificação de classes de metabólitos importantes na fisiologia espermática, bem como de potenciais biomarcadores de fertilidade, inclusive em bovinos. No entanto, ainda não há disponível uma avaliação isolada capaz de estimar o padrão de fertilidade de amostras seminais. Há vários desafios a serem superados para a validação de biomarcadores de fertilidade, principalmente considerando-se as diferenças entre perfis metabólicos de raças distintas de touros e a heterogeneidade dos ejaculados. A superação destes desafios pode ser iniciada com um maior aproveitamento dos resultados já obtidos e futuros, com a aplicação de análises mais avançadas e com eficácia em elevado número de dados. Para tal, podem ser utilizados modelos estatísticos de inteligência artificial, cuja aplicação pode aumentar a acurácia das observações obtidas, bem como aproximá-las da aplicação pelo setor de produção animal.

Palavras-chave: espermatozoide, perfil funcional, metabólitos, biomarcadores

Abstract

Studies on sperm physiology demonstrate that fertility outcomes and sperm post-cryopreservation have an important relation with sperm energy metabolism efficiency and ability to maintain oxidative homeostasis. Knowledge on sperm physiology has been enhanced, continually, with the application of molecular profiling analysis, focusing on metabolomics. Molecular analysis allowed the identification of important classes of metabolites in sperm physiology, as well as potential fertility biomarkers, including in bovine. Despite all developments, there is still no isolated assessment available capable of estimating fertility on sperm samples. There are several challenges to be overcome for the validation of fertility biomarkers, especially considering the metabolic profiles differences between bull breeds and the ejaculate heterogeneity. Overcoming these challenges could start with the application of more advanced and effective data analysis from research database already obtained, as well as future ones. To this end, statistical models of artificial intelligence can be used, whose application can increase the accuracy of the observations obtained, as well as bringing them closer to the application by the animal production sector.

Keywords: sperm, functional profile, metabolites, biomarkers

Introdução

Fertilidade e viabilidade espermática pós-criopreservação, fundamentais e com alto impacto econômico na produção animal, possuem relação direta com a integridade e função de todas as estruturas que compõem a célula espermática (Holt, 2000; Layek, et al., 2016; Celeghini, et al., 2017). Vale notar que espermatozoides são células altamente compartimentalizadas, possuem citoplasma reduzido, são transcricionalmente quiescentes e, conseqüentemente, têm uma capacidade antioxidante limitada (Amaral, et al., 2013; Agarwal, et al., 2014). Ao mesmo tempo, possuem alta demanda de energia e dependem de fontes adequadas da mesma para percorrerem e superarem barreiras encontradas ao longo do trato reprodutivo feminino, processos de capacitação, reação acrossomal e fecundação do oócito (Aitken, 2006; Aitken, 2017; Craig, et al., 2019). O seu metabolismo energético envolve uma série de reações de oxi-

*Correspondência: bobbieleite@gmail.com

Recebido: 26 de abril de 2023

Aceito: 18 de maio de 2023

redução, com a inevitável e fisiologicamente importante produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), fazendo com que a sua viabilidade e potencial fecundante dependam não apenas de um metabolismo energético eficiente, mas também da sua capacidade em manter a homeostase oxidativa (Nichi, et al., 2006; Sabés-Alsina, et al., 2019).

Metabolismo energético e homeostase oxidativa

Desde os primeiros estudos sobre a fisiologia espermática em mamíferos, muitos avanços foram alcançados quanto à importância dos processos envolvidos no metabolismo energético de espermatozoides, sobre a produção e papel das EROs em sua fisiologia, bem como sobre os efeitos da criopreservação em ambos (De Lamirande, et al., 1997; Armstrong, et al., 1999; Bailey, et al., 2003; Büyükleblebici, et al., 2014). Pelo fato da criopreservação ser um processo sequencial com diferentes condições de temperatura, osmolaridade e inevitável estresse celular, mesmo o espermatozoide bovino, considerado um dos mais resistentes à criopreservação, apresenta perda parcial da funcionalidade espermática em partidas pós-descongelamento. Tal perda ocorre, principalmente devido às disfunções no metabolismo energético e acúmulo de agentes pró-oxidativos, afetando desta forma o seu potencial fecundante (Watson, 2000; Bailey, et al., 2003; Petrunkina, 2007; Agarwal, et al., 2014; Layek, et al., 2016).

Alterações causadas nas mitocôndrias, presentes em grande quantidade na peça intermediária dos espermatozoides, afetam não apenas o metabolismo energético, mas também o *status* oxidativo. Estas organelas são o principal sítio de formação de EROs intracelular, com alta concentração de oxigênio e elétrons na matriz mitocondrial que atuam na redução do oxigênio em água, durante a fosforilação oxidativa (Nichi, et al., 2006; Aitken, et al., 2011; Losano, et al., 2018). Em situações de estresse celular em que a estrutura mitocondrial é comprometida, há escape de parte destes elétrons, dando origem ao acúmulo de EROs, como o ânion superóxido ($O_2^{\cdot -}$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o radical hidroxila (OH^{\cdot}), resultando em um desequilíbrio entre a produção destas EROs e a capacidade antioxidante celular e um quadro de estresse oxidativo (Koppers, et al., 2008; Amaral, et al., 2013). Embora essenciais em diversos processos fisiológicos do espermatozoide, como a hiperativação e capacitação espermáticas, reação acrossomal e ligação à zona pelúcida (Aitken, 2017; Aitken, et al., 2020; Gadella, 2008), o acúmulo de EROs tem efeitos deletérios em todas as estruturas espermáticas (Amaral, et al., 2013; Gallon, et al., 2006; O'Connell, et al., 2002; Losano, et al., 2018; Aitken, et al., 2020). Ademais, a disfunção mitocondrial com o consequente estresse oxidativo causa uma toxicidade prejudicial não apenas ao espermatozoide afetado, mas também aos adjacentes (Bailey, et al., 2003; Ortega-Ferrusola, et al., 2008; Aitken, et al., 2013; Gualtieri, et al., 2021).

Avanços em análises moleculares e potenciais biomarcadores

Apesar do aprimoramento do conhecimento sobre a fisiologia espermática, ainda não há disponível uma avaliação isolada capaz de estimar o padrão de fertilidade de amostras seminais. Novos avanços importantes ocorreram com a aplicação de técnicas de avaliação de perfis moleculares de espermatozoides e plasma seminal (Bieniek, et al., 2016; Mehrparavar, et al., 2019; Talluri, et al., 2022). Entre estas, a metabolômica passou a ter destaque pelo fato dos metabólitos serem as últimas reações a alterações biológicas relativas ao ambiente e, portanto, excelentes indicadores do *status* fisiológico celular (Pattí, et al., 2012; Mehrparavar, et al., 2019; D'Occhio, et al., 2019; Selvam, et al., 2020). Os estudos de metabolômica espermática passaram a ressaltar o papel de várias classes de metabólitos identificados em espermatozoides e apontar potenciais biomarcadores de fertilidade, inclusive em bovinos. No entanto, ainda há poucos estudos utilizando análises que permitem a quantificação absoluta de metabólitos (em mM ou ng/mL) entre diferentes padrões de fertilidade e raças, bem como a associação do perfil metabólico com o *status* funcional do espermatozoide (Hamamah, et al., 1993; Moura, et al., 2006; Du Plessis, et al., 2011; Paiva, et al., 2015; Velho, et al., 2018; Shan, et al., 2021). Esta associação, bem como a quantificação, são requisitos importantes para a interpretação dos resultados moleculares observados e para o estabelecimento de valores de referência, principalmente quando o objetivo é identificar biomarcadores. Ademais, é importante a compreensão não apenas do efeito isolado de metabólitos identificados como biomarcadores, mas sim como eles interagem entre si para desempenhar uma função biológica em cascatas bioquímicas (Aitken, 2006; Bieniek, et al., 2016; Engel, et al., 2019; Memili, et al., 2020; Talluri, et al., 2022).

Estudo recente, realizado no Laboratório de Andrologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, por Leite, et al. (2022), demonstrou a importância da associação de técnicas de análise funcionais e metabólicas (Leite, 2022). Com a análise de um total de 152 amostras seminais de touros das raças Angus e Nelore de alta e baixa fertilidade, a partir de histórico conhecido de

IATF, determinado por meio do índice IFert™ (CRV Lagoa, 2018), o estudo, utilizando espectrometria de massas com método *target*, quantificou 150 metabólitos (classes lipídicas, carnitinas, peptídeos, aminoácidos e derivados, ácidos orgânicos, nucleosídeos, nucleotídeos e derivados). Os resultados demonstraram importantes correlações entre perfis funcional e metabólico, não apenas entre os grupos de alta e baixa fertilidade, mas também entre as raças estudadas. A associação de técnicas permitiu uma interpretação mais acurada dos resultados metabólicos, com, por exemplo, disfunções mitocondriais sendo corroboradas pelo menor consumo de substratos importantes na produção de ATP nas amostras de baixa fertilidade, como ácidos pirúvico e láctico (Paiva, et al., 2015; Zhao, et al., 2018; Memili, et al., 2020; Leite, 2022). Ademais, as análises funcionais indicaram origens distintas nas alterações mitocondriais entre os grupos Angus e Nelore de baixa fertilidade, permitindo melhor interpretação da diferença observada entre as duas raças.

Neste estudo, uma observação importante foi que o grupo Angus de baixa fertilidade apresentou maior porcentagem de espermatozoides com potencial de membrana mitocondrial (PMM) baixo associado à alta atividade mitocondrial, bem como correlação positiva entre atividade mitocondrial e baixo PMM, um quadro que indica a presença de um mecanismo compensatório para tentar restabelecer o PMM (Losano, et al., 2017; Losano, et al., 2018; Leite, et al., 2022). Esse mecanismo resulta em uma maior produção e acúmulo de EROs, o que foi observado no grupo Angus de baixa fertilidade, mas não no respectivo grupo da raça Nelore (Caldeira da Silva, et al., 2008; Koppers, et al., 2008; Leite, et al., 2022). Isto posto, os resultados demonstraram diferenças importantes quanto ao aproveitamento de metabólitos com ação em mecanismos antioxidantes. Embora os dois grupos de baixa fertilidade tenham apresentado maior concentração de glutatona (GSH), e de sua forma oxidada (GSSG), metabólitos considerados excelentes identificadores de *status* oxidativo (Meseguer, et al., 2007; Shah, et al., 2017; Nadri, et al., 2020; Salman, et al., 2021), houve diferença entre as raças na concentração de outras moléculas que atuam em mecanismos antioxidantes, como, por exemplo, ácido glutâmico, cisteína, glicina, alanina, glutamina, metionina, dimetilglicina, ácido pantotênico e onze tipos distintos de carnitinas (Çoyan, et al., 2010; Dong, et al., 2016; Zhao, et al., 2018; Abdulkareem, et al., 2020; Leite, 2022). Em contrapartida, as amostras dos grupos de alta fertilidade apresentaram maior porcentagem de células com metabolismo energético eficiente (maior atividade mitocondrial associada a um alto PMM), acompanhado de homeostase oxidativa (Leite, et al., 2022) e, por conseguinte, um maior consumo de ácidos pirúvico e láctico, maior produção de ácido cítrico, maior aproveitamento de antioxidantes e maior concentração de ácido γ -aminobutírico (GABA), molécula considerada um importante biomarcador de viabilidade celular (Paiva, et al., 2015; Menezes, et al., 2019; Leite, 2022).

Desafios para a validação de biomarcadores

Estudos como o supracitado, no qual foram identificados 66 potenciais biomarcadores de fertilidade para as raças Angus e Nelore, avançam continuamente na busca de painéis de moléculas que possam apontar padrões de maior viabilidade pós-criopreservação e de fertilidade em touros (Moura, et al., 2006; Peddinti, et al., 2008; Bieniek, et al., 2016; Zou, et al., 2017; Velho, et al., 2018; Zhao, et al., 2018; Talluri, et al., 2022). No entanto, os desafios estão presentes não na identificação, mas sim na validação de biomarcadores de fertilidade em diferentes raças. Superar estes desafios depende de forma significativa do agrupamento de coleções maiores de dados obtidos em pesquisas e da aplicação de análises mais profundas nos mesmos com o uso de algoritmos com modelos estatísticos mais elaborados (Wang, et al., 2019; Curchoe, 2019; Keller, et al., 2022).

Há que se destacar ainda, a necessidade de avanços nas análises moleculares com a quantificação de concentração de metabólitos. Esta quantificação permite considerar, de forma mais eficiente, o impacto da variância observada quanto aos índices de fertilidade de amostras de um mesmo grupo, alta ou baixa fertilidade, bem como entre raças (Zhao, et al., 2018; Talluri, et al., 2022). O uso de métodos de estatística descritiva, como histogramas de distribuição de frequência, é suficiente para demonstrar a importância da aplicação de análises com modelos estatísticos mais avançados para considerar estas variâncias na validação de biomarcadores. Esta observação pode ser ilustrada com o uso de um dos potenciais biomarcadores identificados no estudo de Leite et al. (2022), a palmitoil-L-carnitina, um metabólito com papel importante no metabolismo energético, por facilitar o processo de β -oxidação, e ação antioxidante, pela sua capacidade de sequestrar de EROs (Aliabadi, et al., 2012; Yang, et al., 2020; Nazari, et al., 2021). Este metabólito apresentou elevada acurácia, sensibilidade e especificidade na identificação e separação de amostras de alta e baixa fertilidade nas raças Angus e Nelore (Figura 1A). No entanto, análises mais acuradas para a validação da palmitoil-L-carnitina, ou de qualquer outro potencial biomarcador, permitem considerar valores de concentração mais abundantes do metabólito em amostras de alta e baixa fertilidade,

relacionando-os com diferentes índices, as diferenças entre raças, (Angus de alta fertilidade: 16-18 ng/mL; Angus de baixa fertilidade: 6 ng/mL; Nelore de alta fertilidade: 20- 24 ng/mL; Nelore de baixa fertilidade: 16-18 ng/mL), além de valores extremos e a sobreposição destes entre os grupos estudados (Figura 1B).

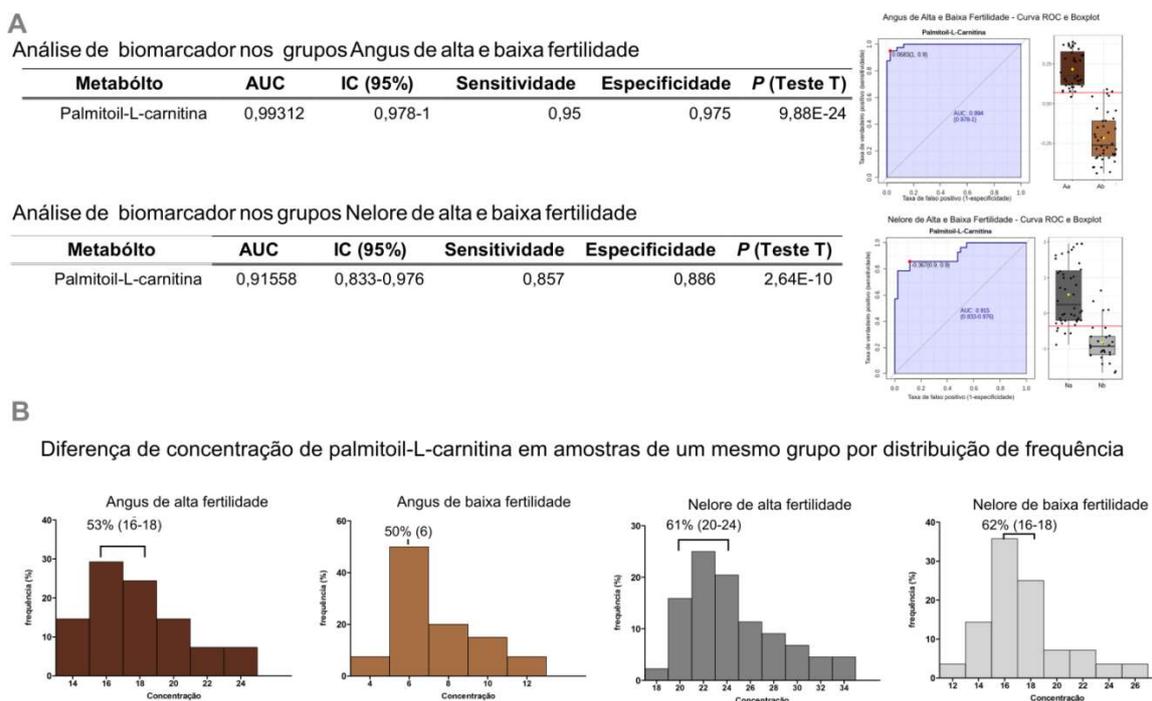


Figura 1. Potencial biomarcador, Palmitoil-L-carnitina, com análise univariada de curva ROC e *boxplot* e distribuição de frequência de concentrações entre os grupos de alta e baixa fertilidade das raças Angus e Nelore

Em **A**: tabelas com colunas com valor de AUC (área sob a curva ROC, acurácia), intervalo de confiança, sensibilidade, especificidade e P de teste-T (em notação científica) com análise pelo algoritmo SVM (*support vector machines* - máquina de vetores de suporte), e gráficos de análise de curva ROC e *boxplot* ilustrando separação de amostras do metabólito palmitoil-L-carnitina. Em **B**: histogramas de frequência de distribuição de concentração de palmitoil-L-carnitina em amostras dos grupos das raças Angus e Nelore, de alta e baixa fertilidade, com destaque para a maior abundância de frequência de concentração do metabólito.

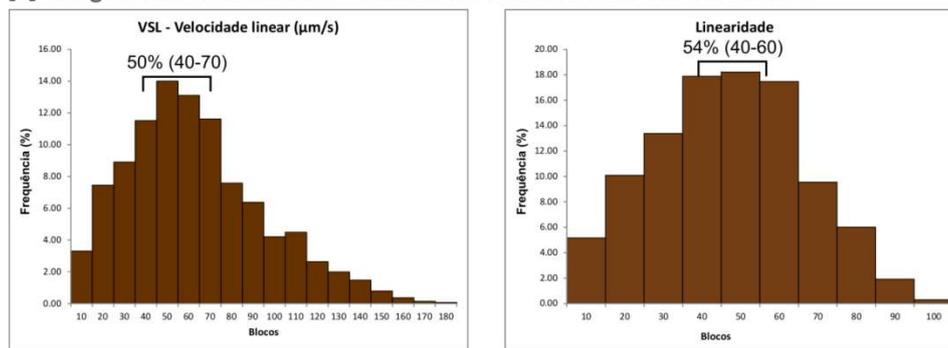
Fonte: Leite (2022)

Heterogeneidade de ejaculados

Outro ponto a ser considerado para novos avanços nas pesquisas sobre fisiologia espermática, identificação, análise e validação de biomarcadores relacionados à criopreservação e fertilidade, é o fato de que ejaculados são heterogêneos. Subpopulações espermáticas ocorrem pelas diferenças na produção individual de espermatozoides, sua origem, bem como pela diferença na idade e *status* de maturação dos mesmos quando se misturam no epidídimo e, subsequentemente, no ejaculado (Kathiravan, et al., 2011; Martínez-Pastor, 2021). Como as subpopulações espermáticas coexistem numa partida de sêmen, a avaliação da diversidade fisiológica dos grupos de espermatozoides, apesar de ser um desafio, pode ser um caminho para se detectar características espermáticas que culminem em maior fertilidade. O estudo de subpopulações ainda é considerado limitado, com espaço e necessidade de pesquisas, com número mais elevado de células e amostras, para esclarecer o impacto e efeitos fisiológicos das subpopulações espermáticas no processo de criopreservação, efeitos da criocapacitação e fertilidade. Estes objetivos podem ser alcançados, por exemplo, pelo uso de dados de parâmetros cinéticos individuais de espermatozoides, utilizando-se de forma detalhada as análises realizadas no CASA (análise computadorizada da cinética espermática) para se estabelecer a relação destes com perfis funcionais, moleculares e índices de fertilidade (Amann, et al., 2014; Yániz, et al., 2018; Valverde, et al., 2019; Martínez-Pastor, 2021). Estudos com análises avançadas de subpopulações podem, além de contribuir para a validação e maior acurácia de potenciais biomarcadores de fertilidade, proporcionar uma fundamentação fisiológica importante para os diferentes parâmetros de cinética gerados nos sistemas CASA. A importância de se observar variações e possíveis relações entre parâmetros cinéticos e perfil fisiológico de uma partida

de sêmen pode ser, novamente, ilustrada com o uso de histogramas (Figura 2).

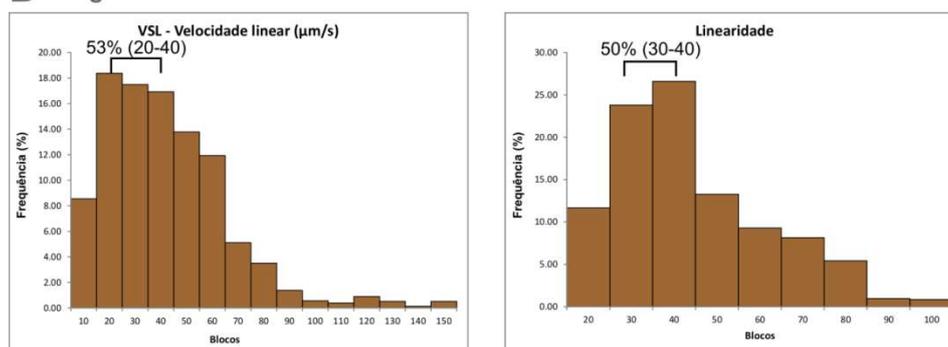
A Angus de alta fertilidade - análise de amostra com 110 mil células



Atividade Mit. Alta	Índ.de Atividade Mitocondrial	PMM Alto	EROs	Ácido Pirúvico	Ácido Láctico	Ácido Cítrico	Ácido γ-aminobutírico
67%	77,75%	55,7%	6,63%	101,7	15440,6	2545,9	53,5

Glutaciona	Glutaciona Oxidada	Acetilcarnitina	L-Carnitina	Palmitoil L-Carnitina	Estearoil L-Carnitina
71,6	0,26	1918,9	2578,2	20,7	8,8

B Angus de baixa fertilidade - análise de amostra com 110 mil células



Atividade Mit. Alta	Índ.de Atividade Mitocondrial	PMM Alto	EROs	Ácido Pirúvico	Ácido Láctico	Ácido Cítrico	Ácido γ-aminobutírico
60%	68%	35,9%	48,6%	151,6	18719,7	1228,5	14,4

Glutaciona	Glutaciona Oxidada	Acetilcarnitina	L-Carnitina	Palmitoil L-Carnitina	Estearoil L-Carnitina
121,8	0,82	2557,3	863,7	10,1	12,5

Figura 2. Frequência de distribuição de duas variáveis cinéticas, dados funcionais e metabólicos em partidas únicas de touros dos grupos Angus de alta e baixa fertilidade

Histogramas de frequência de distribuição (%) de valores dos parâmetros cinéticos velocidade linear e linearidade pela análise de dados individuais (sistema *trace it*) de 110 mil células de uma mesma partida pelo sistema *CASA Computer-Assisted Sperm Analysis*; Hamilton-Thorne®, Ivos II, IMV Technologies, L'Aigle, França), e seleção de dados funcionais e metabólicos (concentração em ng/mL) para ilustrar diferenças em padrão cinético e possível relação com perfis funcional (atividade mitocondrial, potencial de membrana mitocondrialm presença de EROs), metabólico (quantificação em ng/mL de metabólitos selecionados relacionados ao metabolismo energético e *status oxidativo*) e padrão de fertilidade (alta e baixa). Em A: análise de uma partida de Angus de alta fertilidade; Em B: análise de uma partida de Angus de baixa fertilidade.

Fonte: Leite (2022)

As análises do exemplo da Figura 2, foram realizadas com a avaliação cinética individual de espermatozoides (método *trace-it* do CASA), em um número elevado de células (110 mil) em uma única partida de alta fertilidade e outra de baixa fertilidade, da raça Angus. Os histogramas apresentam variações importantes em dois parâmetros cinéticos, com diferenças claras na abundância de frequência de valores entre os grupos, dados que, com o uso de modelos estatísticos, podem ser relacionados com os perfis funcionais e metabólicos de cada amostra. O estabelecimento de relações entre cinética e fisiologia em partidas de sêmen podem gerar avanços no uso de análises de cinética espermática realizadas em centrais de sêmen, bem como contribuir para a validação e aplicação mais acurada de biomarcadores de fertilidade (Ferraz, et al., 2014; Ibanescu, et al., 2020; Hidalgo, et al., 2021).

Considerações finais

Tendo em vista os avanços obtidos até hoje em pesquisas com sêmen bovino, os quais destacam a relação de um metabolismo energético eficiente e manutenção da homeostase oxidativa com fertilidade, bem como o crescente número de estudos que apresentam possíveis biomarcadores moleculares de fertilidade para touros de diferentes raças, os desafios estão no maior aproveitamento dos resultados já obtidos e futuros. Apesar da contínua geração de dados, com grande parte apresentando resultados relevantes, há necessidade de análises mais avançadas dos dados brutos gerados para aumentar a acurácia das observações e, por conseguinte, aproximá-las da aplicação pelas centrais de sêmen e pelo setor da pecuária em geral. Nesse sentido, a dificuldade no agrupamento dos dados brutos gerados em pesquisas está sendo solucionada, aos poucos, com o uso de repositórios de dados nas universidades, dados estes que, como já ocorre em estudos na medicina humana, são inseridos em banco de dados e analisados. Não obstante, pesquisadores e empresas na área de reprodução animal contam com um grande avanço e disponibilidade de ferramentas de inteligência artificial para a análise de dados. Estas ferramentas, que são, de forma simplificada, modelos estatísticos, podem facilitar análises mais profundas e precisas de um número elevado de informações (Wang, et al., 2019; Floridi, 2019). Análises estas que, por sua vez, têm papel importante para a superação de desafios para a validação de métodos de identificação de padrões de fertilidade em touros de diferentes raças, não apenas de animais em serviço, mas em um longo prazo e de forma ideal, de biomarcadores que identifiquem potenciais de fertilidade antes da puberdade. Desta forma, economiza-se tempo para disseminação de genética superior a campo, bem como gastos com touros que passam por um período relativamente longo nas centrais até que sua fertilidade seja caracterizada.

Agradecimentos

Os autores são gratos ao Departamento de Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, pela difusão do conhecimento utilizado nesta revisão, à CRV Lagoa e Seleon Biotecnologia pelo apoio para o desenvolvimento dos estudos apresentados nesta revisão.

Apoio financeiro

O estudo e dados apresentados nesta revisão foram obtidos com apoio financeiro da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES - código 001) e pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), processo #2019/20114-7.

Referências

- Abdulkareem T. A. [et al.]** Effect of adding amino acids combinations to tris extender for improving post cryopreserved semen characteristics of holstein bulls. *Biochem. Cell. Arch.*, v.20, n.1, p.697-701, 2020.
- Agarwal A, Virk G, Ong C, Du Plessis SS.** Effect of Oxidative Stress on Male Reproduction. *World J Mens Health*, v.32., p.1-17, 2014.
- Aitken RJ, Baker MA.** Causes and consequences of apoptosis in spermatozoa; contributions to infertility and impacts on development. *International Journal of Developmental Biology*, v.57, p.265-272, 2013.
- Aitken RJ, Curry BJ.** Redox regulation of human sperm function: from the physiological control of sperm capacitation to the etiology of infertility and DNA damage in the germ line. *Antioxidants & Redox Signaling*, v.14, n.3, p.367-381, 2011.
- Aitken RJ, Drevet JR.** The Importance of Oxidative Stress in Determining the Functionality of Mammalian Spermatozoa: A Two-Edged Sword. *Antioxidants*, v.9, n.2, p.111-130, 2020.

- Aitken R. J.** Reactive oxygen species as mediators of sperm capacitation and pathological damage *Molecular Reproduction and Development*, v.84, n.10, p.1039-1052, 2017.
- Aitken R.** Sperm function tests and fertility. *International Journal of Andrology*, v.29, p.69-75, 2006.
- Aliabadi E. [et al.]** Effects of L-carnitine and L-acetyl-carnitine on testicular sperm motility and chromatin quality. *Iran J Reprod Med*, v.10, n.2, p.77-82, 2012.
- Amann RP, Waberski D.** Computer-assisted sperm analysis (CASA): capabilities and potential developments. *Theriogenology*, v.81, n.1, p.5-17, 2014.
- Amaral A. [et al.]** Mitochondria functionality and sperm quality. *Reproduction*, v.146, p.R163-R174, 2013.
- Armstrong JS. [et al.]** Characterization of reactive oxygen species induced effects on human spermatozoa movement and energy metabolism. *Free Radical Biology and Medicine*, v.26, p.869-880, 1999.
- Bailey JL, Morrie A, Cormier N.** Semen cryopreservation: success and persistent in farm species. *Canadian Journal of Animal Science*, v.83, p.393-401, 2003.
- Bieniek JM, Drabovich AP, Lo KC.** Seminal biomarkers for the evaluation of male infertility. *Asian J Androl*, v.18, n.3, p.426-433, 2016.
- Büyükleblebici S. [et al.]** Cryopreservation of bull sperm: Effects of extender supplemented with different cryoprotectants and antioxidants on sperm motility, antioxidant capacity and fertility results *Animal Reproduction Science*, v.150, p.77-83, 2014.
- Caldeira da Silva CC. [et al.]** Mild mitochondrial uncoupling in mice affects energy metabolism, redox balance and longevity. *Aging Cell*, v.7, p.552-560, 2008.
- Celeghini ECC [et al.]** Impact of semen quality on field fertility in cattle. *Rev. Bras. Reprod. Anim.*, v.41, n.1, p.40-45, 2017.
- Çoyan K. [et al.]** Influence of methionine and dithioerythritol on sperm motility, lipid peroxidation and antioxidant capacities during liquid storage of ram semen. *Research in Veterinary Science*, v.89, p.426-431, 2010.
- Craig LB. [et al.]** Decreased very long chain polyunsaturated fatty acids in sperm correlates with sperm quantity and quality. *J. Assist. Reprod. Genet.*, v.36, p.1379-1385, 2019.
- CRV Lagoa** Conheça o IFERT™ - Índice de fertilidade na IATF [Relatório]. - 2018.
- Curchoe CL, Bormann CL.** Artificial intelligence and machine learning for human reproduction and embryology. *Assist Reprod Genet*, v.36, p.591-600, 2019.
- D’Occhio MJ, Baruselli PS, Campanile G.** Metabolic health, the metabolome and reproduction in female cattle: a review. *Italian Journal of Animal Science*, v.18, n.1, p.858-867, 2019.
- De Lamirande E. [et al.]** Reactive oxygen species and sperm physiology. *Reviews of Reproduction*, v.2, p.48-54, 1997.
- Dong H. [et al.]** Effect of dietary supplementation with amino acids on boar sperm quality and fertility. *Animal Reproduction Science*, v.172, p.182-189, 2016.
- Du Plessis SS. [et al.]** Proteomics: a subcellular look at spermatozoa [Artigo] // *Reproductive Biology and Endocrinology*, v.9, n.36, 2011.
- Engel KM. [et al.]** Metabolomic profiling reveals correlations between spermogram parameters and the metabolites present in human spermatozoa and seminal plasma. *Plos One*, v.14, n.2, p. e0211679, 2019.
- Ferraz M. [et al.]** Evaluation of sperm subpopulation structure in relation to in vitro sperm-oocyte interaction of frozen-thawed semen from Holstein bulls [Artigo] // *Theriogenology*. - 2014, v.81, p.1067-1072.
- Floridi L.** What the Near Future of Artificial Intelligence Could Be [Artigo] // *Philos. Technol*, 2019, v.32, p.1-15.
- Gadella BM.** Sperm membrane physiology and relevance for fertilization. *Animal Reproduction Science*, v.107, n.3, p.229-236, 2008.
- Gallon F. [et al.]** The functionality of mitochondria differentiates human spermatozoa with high and low fertilizing capability. *Fertility and Sterility*, v.86, p.1526-1530, 2006.
- Gaucher C. [et al.]** Glutathione: Antioxidant Properties Dedicated to Nanotechnologies. *Antioxidants*, v.7, n.5, p.62, 2018.
- Gualtieri R. [et al.]** Mitochondrial Dysfunction and Oxidative Stress Caused by Cryopreservation in Reproductive Cells. *Antioxidants*, v.10, n.3, p.337-361, 2021.
- Hamamah S. [et al.]** 1H nuclear magnetic resonance studies of seminal plasma from fertile and infertile men. *Journal of Reproduction and Fertility*, v.97, p.51-55, 1993.
- Hidalgo M. M. T. [et al.]** Sperm subpopulations influence the pregnancy rates in cattle. *Reprod Domest Anim*, v.56, n.8, p.1117-1127, 2021.
- Holt W.V.** Fundamental aspects of sperm cryobiology: The importance of species and individual

- differences. *Theriogenology*, v.53, p.47-58, 2000.
- Ibanescu I, Siuda M, Bollwein H.** Motile sperm subpopulations in bull semen using different clustering approaches - Associations with flow cytometric sperm characteristics and fertility. *Anim. Reprod. Sci.*, v.215, p.106329, 2020.
- Kathiravan P. [et al.]** Objective sperm motion analysis to assess dairy bull fertility using computer-aided system – a review. *Reproduction in Domestic Animals*, v.46, p.165-172, 2011.
- Keller A, Kerns K.** Deep learning, artificial intelligence methods to predict boar sperm acrosome health *Animal Reproduction Science*, v.247, p.107110, 2022.
- Koppers AJ. [et al.]** Significance of mitochondrial reactive oxygen species in the generation of oxidative stress in spermatozoa. *J Clin Endocrinol Metab*, v.93, p.3199–3207, 2008.
- Layek SS. [et al.]** Cryopreservation of bull semen: Evolution from egg yolk based to soybean based extenders. *Animal Reproduction Science*, v.172, p.1-9, 2016.
- Leite RF. [et al.]** Sperm function and oxidative status: Effect on fertility in *Bos taurus* and *Bos indicus* bulls when semen is used for fixed-time artificial insemination. *Animal Reproduction Science*, v.237. - p.106922, 2022.
- Leite RF.** Análise lipídômica, metabolômica e dos atributos espermáticos de touros com diferentes taxas de fertilidade e perfis de congelamento de sêmen. Tese de Doutorado - FMVZ/USP. 2022.
- Losano JDA. [et al.]** Effect of mitochondrial uncoupling and glycolysis inhibition on ram sperm functionality. *Reproduction in Domestic Animals*, v.52, n.2, p.289-297, 2017.
- Losano JDA. [et al.]** Spermatic mitochondria: role in oxidative homeostasis, sperm function and possible tools for their assessment. *Zygote*, v.26, n.4, p.251-260, 2018.
- Martínez-Pastor F.** What is the importance of sperm subpopulations? *Animal Reproduction Science*, v.11, p.106844, 2021.
- Mehrparavar B. [et al.]** Metabolomics of Male Infertility: A New Tool for Diagnostic Tests. *J Reprod Infertil*, v.20, n.2, p 64-69, 2019.
- Memili E, Moura AA, Kaya A.** Metabolomes of sperm and seminal plasma associated with bull fertility *Animal Reproduction Science*, v.220, p.106355, 2020.
- Menezes E.B. [et al.]** Uncovering sperm metabolome to discover biomarkers for bull fertility. *BMC Genomics*, v.20, p.714 (1-16), 2019.
- Meseguer M. [et al.]** The human sperm glutathione system: a key role in male fertility and successful cryopreservation. *Drug Metab Lett*, v.1, n.2, p.121-126, 2007.
- Moura AA. [et al.]** Identification of proteins in the accessory sex gland fluid associated with fertility indexes of dairy bulls: a proteomic approach. *J Androl*, v.27, n.2, p.201-211 2006.
- Nadri T. [et al.]** Supplemental Glutathione Improves Post-Thaw Quality of Holstein Bulls Sperm in a Nanomicelle based Extender. *Iranian Journal of Applied Animal Science*, v.10, n.4, p.615-622, 2020.
- Nazari L. [et al.]** Effect of antioxidant supplementation containing L-carnitine on semen parameters: a prospective interventional study. *JBRA Assisted Reproduction*, v.25, n.1, p.76-80, 2021.
- Nichi M. [et al.]** Seasonal variation in semen quality in *Bos indicus* and *Bos taurus* bulls raised under tropical conditions. *Theriogenolgy*, v.66, p.822-828, 2006.
- O'Connell M, McClure N, Lewis SEM.** The effects of cryopreservation on sperm morphology, motility and mitochondrial function. *Hum Reprod*, v.17, p.704-709, 2002.
- Ortega-Ferrusola C. [et al.]** Detection of “apoptosis-like” changes during the cryopreservation process in equine sperm. *Journal of Andrology*, v.29, n.2, p.213-221, 2008.
- Paiva C. [et al.]** Identification of endogenous metabolites in human sperm cells using proton nuclear magnetic resonance (1H-NMR) spectroscopy and gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS). *Andrology*, v.3, p.496–505, 2015.
- Patti GJ, Yanes O, Siuzdak G.** Innovation: metabolomics, the apogee of the omics trilogy. *Nat Rev Mol Cell Biol*, v.13, p.263–269, 2012.
- Peddinti D. [et al.]** Comprehensive proteomic analysis of bovine spermatozoa of varying fertility rates and identification of biomarkers associated with fertility. *BMC Syst Biol*, v.2, n.19, 2008.
- Petrunkina AM.** Fundamental Aspects of Gamete Cryobiology. *J Reproduktionsmed Endokrinol*, v.4, n.2, p.78–91, 2007.
- Sabés-Alsina M. [et al.]** Relationships between climate and sperm quality in dairy bull semen: A retrospective analysis. *Journal of Dairy Science*, v.102, n.6, p.5623-5633, 2019.
- Salman A. [et al.]** Supplementation of the BIOXcell extender with the antioxidants crocin, curcumin and GSH for freezing bull semen. *Research in Veterinary Science*, v.136, p.444-452, 2021.
- Selvam MKP. [et al.]** Proteomics and metabolomics — Current and future perspectives in clinical andrology. *Andrologia*, v.53(2), p.1-18, 2020.

- Shah N. [et al.]** Effect of reduced glutathione supplementation in semen extender on tyrosine phosphorylation and apoptosis like changes in frozen thawed Hariana bull spermatozoa. *Animal Reproduction Science*, v.182, p.111-122, 2017.
- Shan S. [et al.]** Sperm Lipid Markers of Male Fertility in Mammals. *Int. J. Mol. Sci.*, v.22, p.8767, 2021.
- Talluri TR. [et al.]** Integrated multi-omics analyses reveals molecules governing sperm metabolism potentially influence bull fertility. *Scientific Reports*, v.12:10692, 2022.
- Valverde A. [et al.]** Sperm kinematics and morphometric subpopulations analysis with CASA systems: a review. *Rev Biol Trop*, v. 67, n.6, p.1473-1487, 2019.
- Velho ALC. [et al.]** Metabolomic markers of fertility in bull seminal plasma. *Plos One*, v.13, n.4, p. e0195279, 2018.
- Wang R. [et al.]** Artificial intelligence in reproductive medicine. *Reproduction*, v.158, n.4, p R139-R154, 2019.
- Watson PF.** The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Animal Reproduction Science*, v. 60-61, p.481-492, 2000.
- Yang K. [et al.]** Effect of L-carnitine on sperm quality during liquid storage of boar semen. *Asian-Australas J Anim Sci*, v.33, n.11, p.1763–1769, 2020.
- Yániz J. [et al.]** CASA-Mot in mammals: an update. *Reproduction, Fertility and Development*, v.30, n.6, p.799-809, 2018.
- Zhao K. [et al.]** Metabolomic profiling of human spermatozoa in idiopathic asthenozoospermia patients using gas chromatography-mass spectrometry. *BioMed Research International*, v.2018, p.8327506, 2018.
- Zou Y. [et al.]** Acetyl-L-carnitine: an effective antioxidant against cryo-damage on human spermatozoa with asthenospermia. *Huazhong Univ Sci Technol*, v.37, n.6, p.915-921, 2017.
-