

**CARLOS EURICO DOS SANTOS FERNANDES**

**Perfil eletroforético, características estruturais e fertilidade *in vitro*  
do sêmen de touros Nelore submetidos à degeneração testicular por  
insulação**

**TESE DE DOUTORADO**

**Botucatu**

**2005**

**CARLOS EURICO DOS SANTOS FERNANDES**

**Perfil eletroforético, características estruturais e  
fertilidade *in vitro* do sêmen de touros Nelore submetidos à  
degeneração testicular por insulação**

**Tese apresentada à Faculdade de  
Medicina Veterinária e Zootecnia,  
Universidade Estadual Paulista “Júlio  
de Mesquita Filho”, Campus de  
Botucatu, para obtenção do título de  
Doutor em Medicina Veterinária.**

**Orientador: Dr Antônio Emídio Dias Feliciano da Silva**

**Co-orientador: Dra. Margot Alves Nunes Dode**

**Botucatu**

**2005**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO  
DA INFORMAÇÃO DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU – UNESP  
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: SELMA MARIA DE JESUS

Fernandes, Carlos Eurico dos Santos.

Perfil eletroforético, características estruturais e fertilidade *in vitro* do  
sêmen de touros Nelores submetidos à degeneração testicular por insulação /  
Carlos Eurico dos Santos Fernandes. – 2005.

Tese (doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina  
Veterinária e Zootecnia, Botucatu, 2005.

Orientador: Antônio Emídio Dias Feliciano da Silva

Co-orientador: Margot Alves Nunes Dode

Assunto CAPES: 50504002

1. Bovino – Reprodução 2. Bovino – Fecundação 3. Bovino - Sêmen

CDD 636.208982

Palavras-chave: Bovino; Eletroforese; Fertilidade *in vitro*; Patologia; Sêmen

**Aldinha,**

**todos esses momentos  
longe da nossa gente  
só podiam ser diferentes  
quando aos olhos do tempo  
escuto as coisas da alma e  
elas me dizem sempre  
que quando tu estás junto  
a saudade é mais amena  
e o coração mais resistente,  
se não fosse junto contigo  
não seria de qualquer jeito.**

## **Agradecimentos**

Ao professor e orientador Dr. Antônio Emídio Dias Feliciano da Silva, por oportunizar essa importante etapa, pela compreensão, amizade e experiência na condução deste estudo;

Aos técnicos e funcionários da Embrapa Gado de Corte, em especial, aos pesquisadores Dr. Luiz Otávio Campos da Silva e Dra. Cacilda Borges do Valle, pela oportunidade e apoio no início deste trabalho;

Aos colegas Cláudio Roberto Madruga Jr., Rodrigo Guedes e ao Marco Antônio (Marcão) pela inestimável ajuda nas colheitas e preparação do material experimental;

A Fabiana (Fa) pela ajuda, amizade e paciência com as eletroforeses;

A Daniela (Dani) pela imensurável ajuda, disposição, amizade e dedicação durante as fivs;

A Dra. Margot Dode pela amizade, co-orientação e oportunidades abertas na Embrapa Gado de Corte e no Cenargen;

A Dra. Marina Unanian pelas observações e auxílio no material laboratorial;

A Bel Martins (da Babi) pela paciência e acolhida;

Aos professores da Reprodução de Botucatu pela parceria, aprendizado e oportunidades criadas;

Aos professores da Reprodução de Jaboticabal pelo convívio e troca de experiências;

Aos colegas de sala pelas tardes de boas discussões;

Ao amigo Érikles, pelo ânimo e parceria nas intermináveis viagens;

As secretárias da pós-graduação pela ajuda e compreensão;

A minha Santinha da Medalha Milagrosa por estar junto em todos os momentos, principalmente naqueles mais difíceis.

*fazer ciência nesse país tem um pouco de Titãs:  
“...a melhor forma de olhar no escuro é com as mãos,  
as idéias estão no chão, você tropeça e acha a solução...”*

## Resumo

FERNANDES, C. E. **Perfil eletroforético, características estruturais e fertilidade *in vitro* do sêmen de touros Nelore submetidos à degeneração testicular por insulação.** 2005. 95 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista – UNESP, Botucatu, 2005.

O presente estudo objetivou identificar o perfil eletroforético seminal, as características do espermograma e fertilidade *in vitro*, do sêmen de touros proveniente dos períodos pré e pós-indução do processo degenerativo testicular por insulação. Para isso, foram selecionados quatro animais da raça Nelore, com idade entre trinta e trinta e seis meses. Amostras de sêmen foram colhidas três dias antes (P0) da indução do processo degenerativo e, sete (P7), quatorze (P14) e vinte e um (P21) após a retirada do insulto testicular com cinco dias de duração. Para a análise dos dados foram considerados três experimentos: 1) efeito dos períodos experimentais (P0, P7, P14 e P21) sobre o espermograma e perfil eletroforético do plasma seminal e membrana plasmática dos espermatozóides; 2) efeito dos períodos experimentais e seleção espermática por gradiente de Percoll sobre as características seminais e 3) fertilidade *in vitro* e associação com características seminais oriundas do período pré e pós-insulto testicular. No experimento 1, os espermogramas foram avaliados por métodos convencionais, coloração de Fuelgen para estimativa do percentual de fragmentação nuclear (FN) e, perfil eletroforético do plasma seminal e espermatozóides por SDS-PAGE a 12,5%. Os resultados mostraram que as taxas da motilidade e dos espermatozóides morfológicamente normais foram menores ( $p < 0,05$ ) a partir do P14. A taxa dos defeitos FN nos P14 ( $33,2 \pm 3,42$ ) e P21 ( $28,8 \pm 3,63$ ) foi maior àquela dos defeitos de cabeça (CAB),  $9,5 \pm 0,90$  e  $17,4 \pm 2,31$ , respectivamente. No plasma seminal, o perfil eletroforético revelou proteínas de 10 a 35 kDa, em todos os períodos experimentais, porém, houve variações entre indivíduos e períodos quanto a presença das proteínas de 50, 85 e 105 kDa. Nos espermatozóides, apenas um reprodutor apresentou aparente perda de proteínas na faixa de 25 a 60 kDa, após a indução da

degeneração testicular. Ao contrário, também se observou o aparecimento de algumas proteínas acima de 35 kDa, no P14 e P21, em todos os touros. Os resultados do experimento 2 mostraram diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre períodos e seleção por gradiente de Percoll, especialmente para a motilidade, espermatozoides morfológicamente normais e integridade acrossomal. Após seleção por Percoll, a taxa de CAB (27,0%) e FN (30,0%) foi maior no P21. No experimento 3, a frequência geral de clivados foi menor apenas no P21 (32,0%) em relação aos demais períodos (60,0%, 58,0% e 56,0%, P0, P7 e P14, respectivamente). Porém, a taxa geral de blastocistos foi inferior no P7 (14,0%), P14 (15,0%) e P21 (9,0%), em relação a P0 (23,0%). Das características seminais, FN explicou a maior variação nas frequências de clivados e blastocistos ( $R^2=0,16$  e  $0,27$ ), respectivamente. Esses resultados mostram que, houve distúrbios na funcionalidade testicular frente ao estresse térmico por insulação, confirmada pelas variações do perfil eletroforético do plasma seminal e membrana plasmática dos espermatozoides. As alterações morfológicas, provocadas por agressão térmica testicular, especialmente as funcionais, associadas à cromatina espermática, afetaram a fecundação e o desenvolvimento embrionário. Portanto, é imprescindível a utilização de métodos para determinação das alterações estruturais e moleculares, para auxiliar na predição do potencial de fecundação de reprodutores envolvidos em programas de reprodução assistida, principalmente, na transferência e fertilização *in vitro* de embriões.

*Palavras-chave:* bovino; fecundação; patologia, proteínas; sêmen.

## Abstract

FERNANDES, C. E. **Electrophoretic profile, structural characteristics and in vitro fertilization of the semen of Nelore bulls with testicular degeneration by insulation.** 2005. 95 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista – UNESP, Botucatu, 2005.

The study was conducted to evaluate the seminal gel electrophoresis profile, spermogramme characteristics and in vitro fertility rate, of semen obtained before and after induction of the testicular degenerative process by scrotal insulation. Four Nelore bulls, between thirty and thirty-six months of age, were subjected to a five days scrotal insult. Semen samples were collected three days (P0) before scrotal insulation and seven (P7), fourteen (P14) and twenty-one (P21) days after the removal of the testicular insult. Three experiments were considered for data analysis: 1) effect of the experimental periods (P0, P7, P14 and P21) on the spermogramme and seminal plasma and plasmatic membrane of spermatozoa gel electrophoresis profile; 2) effect of the experimental periods and sperm selection by Percoll gradient on the seminal characteristics; and 3) in vitro fertility rate and association with seminal characteristics from periods before and after testicular insult. In the experiment 1, the spermogrammes were evaluated by conventional methods beside in the Fuelgen stain for nuclear fragmentation (NF) and proteins profile by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE, 12,5%). The motility and normal spermatozoa decrease ( $p < 0,05$ ) from P14 to P21 post insult. NF of P14 ( $33,2 \pm 3,42$ ) and P21 ( $28,8 \pm 3,63$ ) were higher then the head's defects (HD),  $9,5 \pm 0,90$  and  $17,4 \pm 2,31$ , respectively. In the seminal plasma, the gel electrophoresis profile revealed proteins between 10 and 35 kDa in all the experimental periods. However, the presence of 50, 85 and 105 kDa proteins variated among bulls and periods. In the spermatozoa only one bull presented, after testicular insulation, an apparent loss of proteins between 25 and 60 kDa. In contrast, there was emergence of proteins, over 35 kDa, at P14 and P21, in all the

bulls. There were differences ( $p < 0,05$ ) between periods and selection by Percoll gradient, especially for the motility, normal sperms and acrosome integrity, in the experiment 2. After Percoll gradient selection the HD (27,0%) and NF (30,0%) were higher on P21. On the experiment 3, the cleavage rate was lower on P21 (32,0%) in relation to the P0 (60,0%), P7 (58,0%) and P14 (56,0%). Similar results were found on blastocysts rate that was lower at P7 (14,0%), P14 (15,0%) and P21 (9,0%) in relation to P0 (23,0%). A more detrimental effect on cleavage and blastocyst rate was when semen samples presented functional abnormality induced by testicular insulation, especially NF, resulting in a association rate of  $R^2=0,16$  and  $0,27$  for cleavage and blastocyst, respectively. It is concluded that the answer of the testicular functionality in consequence of thermal stress is expressed initially for variations in the plasma seminal and spermatozoids electrophoresis profile and morphologic abnormalities. The functional sperm abnormalities, through the thermal testicular stress, especially associated to the sperm chromatin, influenced the embryo development (cleavage through blastocyst formation). Therefore, methods to elucidate the structure and molecular alterations, could aid in the prediction of the fecundation potential of bulls submitted in assisted reproduction programs, such as the embryo transfer and in vitro fertilization. .

Key words: bovine; fertilization, pathology, proteins; semen.

## Lista de ilustrações

- Figura 1:** Representação esquemática da formação dos períodos experimentais em touros Nelore submetidos à degeneração testicular antes (P0) e após (P7, P14 e P21 dias) retirada do insulto testicular ..... 43
- Figura 2:** Representação de diferentes padrões de fragmentação nuclear observado no sêmen a fresco de touros Nelore submetidos à degeneração testicular por insulação, corados pelo método de *Fuelgen*. As setas indicam: a, presença de crateras nucleares; b, presença de vacúolos nucleares (*pouch*); c e d, fragmentação total da cromatina nuclear. Microscopia de contraste de fase 1000x)..... 55
- Figura 3:** Representação de diferentes padrões de alterações morfológicas na cabeça espermática em touros Nelore submetidos à degeneração testicular por insulação. Letra a, defeito de forma e contorno anormal; b, delgado na base; c, delgado; d, forma anormal com grânulo apical; e, delgado na base com peça intermediária enrolada. Microscopia de contraste de fase (1000x)..... 56
- Figura 4:** Eletroforése em poliacrilamida (SDS-PAGE) a 12,5 % de concentração no gel de separação, em sistema descontínuo alcalino de proteínas do plasma seminal e dendrogramas resultantes da análise de similaridade (UPGMA, SAHN *clustering*) em touros da raça Nelore, submetidos a degeneração testicular por insulação, antes (A) e após 7 (B), 14 (C) e 21 dias (D). PM, peso molecular (kilodaltons). Números em baixo das corridas referem-se a identificação dos touros..... 58
- Figura 5:** Eltroforese em poliacrilamida (SDS-PAGE) à 12,5 % de concentração no gel de separação, em sistema descontínuo alcalino de proteínas dos espermatozóides e dendrogramas resultantes da análise de similaridade (UPGMA, SAHN *clustering*) em touros da raça Nelore, submetidos à degeneração testicular por insulação, antes (A) e após 7 (B), 14 (C) e 21 dias (D). PM, peso molecular (kilodaltons). Números em baixo das corridas referem-se a identificação dos touros..... 59

**Figura 6:** Coeficientes de similaridade do perfil eletroforético do plasma seminal (■) e espermatozoides (□) entre touros Nelore antes (P0) e após (P7, P14 e P21 dias) à indução da degeneração testicular por insulação..... 60

**Figura 7:** Espermatozoides corados pelo método *trypan blue giemsa* após descongelação para avaliação da integridade acrossomal; a, morto com acrossomo íntegro; b, vivo com acrossomo íntegro e c, vivo com reação acrossomal. Microscopia de campo claro (1000x)..... 61

**Figura 8:** Efeito principal e interação entre períodos, antes (P0) e após retirada do insulto testicular (P7, P14, P21 dias) e seleção espermática em gradiente de Percoll (pré =□ e pós =■) sobre a motilidade, vigor, espermatozoides morfologicamente normais e integridade acrossomal no sêmen de touros da raça Nelore, submetidos a degeneração testicular por insulação. Letras distintas entre colunas representam efeito ( $p < 0,05$ , Duncan) de período; \* representa o efeito da seleção espermática pelo gradiente de Percoll dentro do período..... 62

**Figura 9:** Efeito principal e interação entre períodos, antes (P0) e após a retirada do insulto testicular (P7, P14, P21 dias) e seleção espermática em gradiente de Percoll (□ = pré e ■ = pós seleção) sobre diferentes defeitos morfológicos em touros da raça Nelore submetidos a degeneração testicular por insulação. Letras distintas entre colunas representa efeito efeito ( $p < 0,05$ , Duncan) de período; \* representa efeito da seleção espermática pelo gradiente de Percoll dentro do período..... 63

**Figura 10:** Percentuais de clivados e blastocistos com sêmen congelado nos períodos experimentais antes (P0) e após (P7, P14 e P21 dias) à retirada da insulação testicular de touros da raça Nelore. Letras distintas entre colunas representam diferença significativa ( $\chi^2$ ,  $p < 0,05$ )..... 64

**Figura 11:** Percentuais de clivados (■) e blastocistos (□) de acordo com o período experimental por touro submetido à degeneração testicular antes (0), 7,14, e 21 dias após a retirada do insulto.\*amostra não considerada. Letras distintas entre colunas representam diferença significativa ( $\chi^2$ ,  $p < 0,05$ )..... 65

**Figura 12:** Efeito dos períodos experimentais, antes (P0) e após retirada do insulto testicular (P7, P14 e P21 dias) sobre espermatozóides normais (■), com integridade acrossomal (■), defeitos de cabeça (□) e fragmentação nuclear (□) obtidos após seleção espermática por gradiente de Percoll, em cada touro Nelore submetido a degeneração testicular por insulação. Letras distintas entre colunas representam diferença significativa ( $p < 0,05$ ). \* amostra não considerada.....

67

**Figura 13:** Frequência de clivados e blastocistos (□) em função do percentual de fragmentação nuclear (■) estimado pelo método de *Fuelgen*, no sêmen de touros da raça Nelore, antes (P0), 7 (P7), 14 (P14) e 21 dias (P21) após indução da degeneração testicular por insulação.....

68

## Lista de tabelas

<b>Tabela 1:</b> Médias ajustadas ( $\pm$ erro padrão) para o efeito dos períodos antes (P0) e após (P7, P14 e P21 dias) indução da degeneração testicular por insulação em touros da raça Nelore.....	54
<b>Tabela 2:</b> Total de bandas protéicas analisadas em densitometria ótica para composição do perfil eletroforético (SDS-PAGE 12,5%) unidimensional para o plasma seminal e espermatozóides, por touro e em nos períodos experimentais antes (P0) e após (P7, P14 e P21) à indução da degeneração testicular por insulação.....	57
<b>Tabela 3:</b> Correlação parcial <sup>1</sup> entre coeficientes de similaridade <sup>2</sup> do plasma seminal e espermatozóides com características seminais em touros da raça Nelore, submetidos à degeneração testicular por insulação.....	61
<b>Tabela 4:</b> Coeficiente de correlação ( $r^*$ ) entre características seminais e frequências de clivados e blastocistos, obtidos por fertilização <i>in vitro</i> após seleção espermática por gradiente de Percoll em touros Nelore submetidos à degeneração testicular por insulação.....	66
<b>Tabela 5:</b> Análise da regressão múltipla seqüencial* entre características seminais e frequências de clivados e blastocistos obtidos por fertilização <i>in vitro</i> após seleção espermática por gradiente de Percoll em touros da raça Nelore submetidos à degeneração testicular por insulação.....	68

## SUMÁRIO

Lista de figuras	
Lista de tabelas	
Resumo	
Abstract	
1. Introdução.....	17
2. Objetivos.....	20
3. Revisão de literatura.....	21
3.1. Característica secretora do aparelho reprodutivo e proteínas seminais.....	18
3.2. Espermatogênese e organização da cromatina espermática.....	24
3.3. Degeneração testicular por insulação e anormalidades morfológicas seminais...	27
3.4. Avaliação da qualidade seminal e relação com a fertilidade.....	29
3.4.1. Morfologia espermática.....	30
3.4.2. Membrana plasmática, integridade acrossomal e coloração supravital.....	33
3.4.3. Alterações de núcleo, cromatina espermática e identificação pela coloração de Fuelgen.....	35
3.5. Efeito paterno sobre a fertilização e desenvolvimento embrionário.....	38
4. Material e Métodos.....	42
4.1. Animais.....	42
4.2. Indução da degeneração testicular e períodos experimentais.....	42
4.3. Experimento 1: características seminais e perfil eletroforético do plasma seminal e espermatozóides antes e após indução da degeneração testicular por insulação.....	43
4.3.1. Colheita do sêmen, análise do espermograma e fragmentação nuclear.....	43
4.3.2. Perfil eletroforético seminal.....	44
4.3.3. Análise estatística.....	46
4.4. Experimento 2. efeito da seleção espermática por gradiente de Percoll sobre as características seminais antes e após indução da degeneração testicular por insulação.....	47
4.4.1. Congelamento do sêmen e análise da integridade acrossomal.....	48

4.4.2. Análise estatística.....	49
4.5. Experimento 3: avaliação da fecundação <i>in vitro</i> e associação com características seminais antes e após indução da degeneração testicular por insulação.....	50
4.5.1. Colheita e maturação de ovócitos <i>in vitro</i> .....	51
4.5.2. Fecundação <i>in vitro</i> e cultivo embrionário.....	51
4.5.3. Análise estatística.....	52
5. Resultados.....	53
5.1. Experimento 1: características seminais e perfil eletroforético do plasma seminal e espermatozóides antes e após indução da degeneração testicular por insulação.....	53
5.1.1. Características seminais.....	53
5.1.2. Perfil eletroforético seminal.....	54
5.2. Experimento 2: efeito da seleção espermática por gradiente de Percoll sobre as características seminais antes e após indução da degeneração testicular por insulação.....	60
5.3. Experimento 3: avaliação da fecundação <i>in vitro</i> e associação com características seminais antes e após indução da degeneração testicular por insulação.....	64
6. Discussão.....	69
6.1. Características seminais e perfil eletroforético do plasma seminal e espermatozóides antes e após indução da degeneração testicular por insulação.....	69
6.2. Efeito da seleção espermática por gradiente de Percoll sobre as características seminais antes e após indução da degeneração testicular por insulação.....	74
6.3. Avaliação da fecundação <i>in vitro</i> e associação com características seminais antes e após indução da degeneração testicular por insulação.....	77
7. Conclusão.....	81
8. Referências.....	82
Anexos	

## 1. Introdução

As biotécnicas da reprodução têm possibilitado um verdadeiro avanço qualitativo na produção bovina, em especial, por facilitar a seleção e multiplicação de animais geneticamente superiores e possibilitar maior diversidade genética entre as populações. Neste contexto, a avaliação prévia do potencial fecundante de uma amostra de sêmen é fundamental para o sucesso de um programa de reprodução assistida, inseminação artificial, transferência de embriões e na produção *in vitro* de embriões.

A determinação dos aspectos qualitativos do sêmen se constitui num processo crítico na tomada de decisões para a seleção de reprodutores. Isso tem permitido um verdadeiro progresso, especialmente nas últimas décadas, na adaptação de testes laboratoriais mais específicos com o objetivo de elucidar a funcionalidade espermática, a partir da relação entre certas características estruturais e capacidade fecundante. Contudo, os critérios descritos para este fim foram descritos a mais de 50 anos e ainda são usados como parâmetros para estabelecer diferenças entre indivíduos e amostras do mesmo indivíduo (Hammerstedt, 1996).

Em um estudo clássico, Gledhill (1966) descreveu originalmente que em touros subfêrteis, a heterogeneidade da população espermática associava-se a defeitos na composição e organização nuclear. Esta concepção foi posteriormente validada por Ballachey et al. (1987), em um grande número de animais. Mais recentemente, Saacke et al. (1998) e Thundathil et al. (1998), demonstraram o efeito de espermatozoides com defeitos de cabeça e de vacúolos nucleares sobre a fertilidade *in vitro*. Tais alterações, originam-se durante a espermiogênese e expressam modificações na estrutura do ácido desoxirribonucléico (DNA) e nem sempre são observadas pelos testes convencionais (Evenson et al., 1999). Embora estes defeitos possam ser de caráter hereditário, distúrbios na termo-regulação testicular são mais frequentes e estão associados à prevalência dessas alterações no espermiograma (Setchel, 1998). Desta forma, a indução do processo degenerativo testicular de forma experimental, tem sido usada para estabelecer as alterações morfológicas decorrentes do epitélio seminífero (Austin et al., 1961; Ross & Entwistle, 1979; Friedman et al., 1991).

Em touros *Bos indicus*, o efeito do processo degenerativo induzido é semelhante ao produzido pelo estresse térmico ambiental, geralmente é de caráter transitório e difere do descrito em touros *Bos taurus* (Fonseca et al., 1995; Brito et al., 2003a). Diferenças anatômicas nas ramificações e espessura da vasculatura arterial, conferem gradientes positivos na termo-regulação, o que resulta em maior eficiência na perda de calor, tanto no parênquima testicular quanto nas túnicas escrotais (Brito et al., 2004). Embora esses aspectos sejam cruciais para a manutenção da espermatogênese, a variabilidade na qualidade seminal, devido ao estresse térmico, está presente e ainda se constitui em uma importante causa de redução na fertilidade e descarte por baixa aptidão reprodutiva (Vale-Filho et al., 1986).

Cardoso & Godinho (1983) descreveram que a duração média dos ciclos do epitélio seminífero e o período total da espermatogênese, nos zebuínos, são semelhantes aos dos taurinos. Assim, nesses touros, espera-se um período em torno de 56 dias para a espermatogênese e, possivelmente, entre 8 e 11 dias de trânsito epididimal para que os espermatozóides tornem-se maduros (Amann & Hammerstedt, 1993). Durante este período, mudanças em diferentes seguimentos do ambiente luminal, reguladas pela função secretora e endocítica das células epiteliais, favorecem o estabelecimento da atividade metabólica e integridade da membrana plasmática dos espermatozóides (Herms et al., 1994). Isto pressupõe que alterações na qualidade seminal, a partir dos processos degenerativos testiculares, incidam não apenas na morfologia, mas também no conteúdo protéico do plasma seminal e nos próprios espermatozóides. Com essa perspectiva, a caracterização protéica em eletroforese de gel de poliacrilamida, na presença de dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE), tem sido descrita para estudar o perfil protéico no plasma seminal (Kulkarni et al. 1996), secreção epididimal (Gatti et al. 2004) e na fração espermática em indivíduos com e sem alterações na espermiogênese (Wolfe et al. 1993). No entanto, a comparação entre perfis, por métodos quantitativos e de similaridade, não tem sido investigada em zebuínos e sua aplicação pode auxiliar no estudo dos efeitos do estresse térmico sobre a função testicular e alteração nos padrões qualitativos do sêmen.

A execução de estudos para determinar os perfis eletroforéticos do plasma seminal, dos espermatozóides e as alterações das características seminais, em função

da perda da regulação térmica testicular, permite somar conhecimentos sobre os mecanismos envolvidos na fecundação populações espermáticas heterogêneas, a fim de facilitar a perspectiva e a estimativa da fertilidade em programas de reprodução assistida.

## 2. Objetivos

Comparar as características seminais e o perfil eletroforético do plasma seminal e espermatozóides de touros Nelores, antes e em diferentes períodos após indução da degeneração testicular por insulação;

Estabelecer o efeito da seleção espermática por gradiente de Percoll, dos períodos antes e após a indução do processo degenerativo testicular e a interação entre ambos, sobre diferentes características seminais;

Determinar o efeito dos períodos antes e após indução da degeneração testicular sobre a fertilidade *in vitro* e estimar sua variação em função das características seminais.

### 3. Revisão de literatura

#### 3.1. Característica secretora do aparelho reprodutivo e proteínas seminais

A fração líquida do sêmen é uma mistura envolvendo secreções provenientes do epitélio seminífero, epidídimos, ductos deferentes, ampolas, próstata, vesículas seminais, glândula bulbouretral e, em algumas espécies, glândulas uretrais (Amann & Schanbacher, 1983). Dos principais componentes bioquímicos, as proteínas são os mais importantes. São encontradas no plasma seminal ou adsorvidas em diferentes regiões do espermatozóide e, são responsáveis por funções específicas como integridade estrutural da membrana plasmática, organização da matriz perinuclear, inibição da capacitação espermática e reação acrossomal, sinalizações trans-membrana e habilidade fecundante (King et al., 1994; Foltz, 1995; Oko & Maravei, 1995; Visconti et al., 2002; Fouchécourt et al., 2002; Métayer et al., 2002).

O ambiente que circunda o espermatozóide é caracterizado por mudanças contínuas e progressivas na composição e concentração protéica, desde o fluido testicular até a secreção do epitélio das vesículas seminais. O papel primordial desta atividade secretora é possibilitar um ambiente favorável para a maturação e manutenção da estrutura do espermatozóide, incluindo a organização molecular de suas membranas. Isso é possível, a partir da exposição das células espermáticas a proteínas, secretadas em diferentes segmentos do aparelho reprodutivo, especialmente no epitélio seminífero, a partir das células de Sertoli, cabeça, corpo e cauda do epidídimio e, finalmente, pelas glândulas vesiculares (Herms et al., 1994).

Na fase inicial da espermatogênese, a transcrição protéica está voltada para a síntese das proteínas que compõem a cromatina nuclear. Porém, à medida que o núcleo das espermatídes vai se alongando e a cromatina tornando-se mais condensada, regiões específicas da própria cromatina, responsáveis pela ativação gênica de várias proteínas (*DNase-I hypersensitive regions –DHRs*) vão desaparecendo, e a atividade transcricional protéica cessa. Esta atividade é retomada, quando a cromatina descondensa, após penetração espermática no ooplasma (McPherson & Longo, 1992). Por outro lado, proteínas como a lactato desidrogenase X (LDH X), sorbitol

dehidrogenase e izoenzima fosfodiesterase, são secretadas no fluido testicular e, foram as primeiras a serem correlacionadas a importantes processos metabólicos, como a síntese de adenosina tri-fostato e motilidade espermática (Tash, 1976; Gavella et al., 1982).

No decorrer do trânsito epididimal, grande parte das proteínas secretadas para o lúmen aderem-se à membrana espermática e são responsáveis por várias modificações na estrutura das membranas, conferindo um caráter “protetor” à função celular (Dacheux et al., 2003). No entanto, a identificação e função específica dessas proteínas são complexas e ainda não são totalmente conhecidas. No cachaço, garanhão e rato foram identificadas 125, 117 e 87 proteínas respectivamente (Syntin et al., 1996; Fouchécourt et al., 2000; Turner et al., 2000). Porém, na maioria dos mamíferos, apenas 10 proteínas correspondem entre 80 e 90% do total secretado no epidídimo. No touro, as principais proteínas são a HE1/CTP (*human epididimal protein 1/cholesterol transfert protein*), Clusterin, PGDS (*prostaglandin-D-isomerase precursor*), Mannosidase, Hexosaminidase e Galactosidase (Gatti et al., 2004). A maior parte da degradação e reabsorção protéica ocorre no segmento proximal da cabeça do epidídimo e ainda depende da expressão de proteínas sintetizadas pelas células de Sertoli (Dacheux et al., 2003). Contudo, no ejaculado bovino, mais de 20 proteínas com peso molecular entre 14 e 92 kilodaltons (KDa) têm sido caracterizadas (Kulkarni et al., 1989; Wolfe et al., 1993; Kulkarni et al. 1996). Isso pressupõe que, muitas proteínas presentes no sêmen, são incorporadas a partir da secreção das glândulas vesiculares e, portanto, associadas àquelas provenientes do epidídimo.

Em 1987, Manjunath & Sairam purificaram e caracterizaram três proteínas no plasma seminal de bovinos, BSP-A<sub>1</sub>, BSP-A<sub>2</sub> e BSP-A<sub>3</sub> (*bovine seminal plasma protein*), porém, suas funções associadas ao espermatozóide só foram reconhecidas mais tarde, juntamente com uma quarta proteína chamada BSP30-kDa (Manjunath et al., 1993). As BSPs A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub> e A<sub>3</sub> apresentam peso molecular que varia entre 15 e 15,6 KDa, enquanto a BSP 30-kDa varia entre 28 e 30 KDa, localizam-se na região acrossomal, pós-acrossomal e na peça intermediária (Manjunath et al., 1993). O plasma seminal dos bovinos pode conter altas concentrações de BSPs, geralmente entre 20 e 40 mg/ml ou 65% do total de proteínas. Essas proteínas têm a propriedade

de se ligarem a uma apolipoproteína (apoA-1), que por sua vez está associada a lipoproteínas de alta densidade (*high density lipoprotein*, HDL), calmodulina e heparina (Manjunath et al., 1989). Além disso, as BSPs ligam-se aos fosfolípidios das membranas plasmáticas dos espermatozóides e participam ativamente do processo de capacitação espermática. Com base na correlação, entre a presença dessas proteínas no plasma seminal e fertilidade *in vivo* e *in vitro*, Bellin et al. (1994) e Manjunath et al., (1993b) propuseram que após a ejaculação, as BSPs cobririam a superfície da cabeça do espermatozóide, através dos fosfolípidios da membrana, prevenindo o processo de capacitação e reação acrossomal prematura (decapacitação). Em seguida, os espermatozóides “decapacitados” estariam aptos a atravessar o aparelho reprodutivo da fêmea, onde se ligariam as HDLs, particularmente secretadas no oviduto (Manjunath & Thérien, 2002). Finalmente, as BSPs e as HDLs possibilitariam a ruptura das cadeias de fosfolípidios da membrana plasmática (entre esses o colesterol), resultando na alteração de sua permeabilidade ao cálcio, ativação da via quinase protéica, síntese de fosfolipases A<sub>2</sub> resultando na fosforilação da tirosina quinase. Esse processo permite a fusão entre as membranas plasmáticas (exocitose acrossomal), preparando o espermatozóide para penetrar no oolema (Breitbart & Spugin, 1997; Flesh & Gadella, 2000).

A identificação do perfil protéico, é crucial para o entendimento do mecanismo espermatozóide-ovócito e das perspectivas de fertilização, assumindo as diferentes anormalidades morfológicas, freqüentemente encontradas no ejaculado bovino. Com o objetivo de estudar a dinâmica do perfil eletroforético e associá-lo às alterações no espermograma, Wolfe et al. (1993) verificaram variações na síntese e secreção de proteínas, tanto no plasma seminal quanto nos espermatozóides de touros submetidos à degeneração testicular. Foram encontrados polipeptídeos, com peso molecular entre 50 e 180 KDa, na fração espermática, em contraste às amostras de pré-insulação. Em dois touros, uma proteína de 83 KDa foi encontrada, após retorno à normalidade do quadro seminal. No plasma seminal, houve maior heterogeneidade entre proteínas com mais de 30 KDa. Os autores concluíram que o dano no parênquima testicular causado pelo estresse térmico, pode alterar o perfil eletroforético, juntamente com o quadro morfológico espermático. Isto implica que

alterações na qualidade seminal, a partir dos processos degenerativos testiculares, incidem não apenas na morfologia, mas também nas condições bioquímicas, associadas ao transporte e armazenamento espermáticos. Outras proteínas, poderiam estar envolvidas neste processo, porém, a relação entre estresse térmico, síntese protéica e função reprodutiva ainda não são totalmente compreendidas. Proteínas com peso variando de 8 a 90 kDa constituem a família das proteínas do estresse (*heat shock proteins*) envolvidas, entre outras, na manutenção da função nuclear (termo-tolerância) e regulação da fosforilação protéica (Samali et al., 1999; Rockett et al., 2001).

### **3.2. Espermatogênese e organização da cromatina espermática**

Espermatogênese é o processo que envolve a transformação das espermatogônias até espermatozóides. Três fases caracterizam esta transformação, a espermatocitogênese, onde ocorre a multiplicação mitótica das espermatogônias A<sub>1</sub>, resultando em células mais diferenciadas, denominadas A<sub>2</sub>, A<sub>3</sub>, In, B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub>. Posteriormente, as espermatogônias do tipo B<sub>2</sub>, transformam-se em espermatócitos primários e secundários, sofrendo duas divisões meióticas consecutivas. Destas divisões, resulta a formação de células haplóides, chamadas de espermátides. A terceira fase, conhecida por espermiogênese, caracteriza-se pela transformação das espermátides em espermatozóides, e compreende aproximadamente 14 etapas distintas (Clermont, 1972). No touro, as fases de espermatocitogênese, meiose e espermiogênese, duram em média 21, 23 e 17 dias, respectivamente, totalizando 61 dias (Amann, 1970).

Duas técnicas, desenvolvidas em meados da década de 50, revolucionaram os estudos da espermatogênese. Clermont & Leblon (1955), notaram que o uso do ácido periódico de Schiff permitia descrever as mudanças morfológicas na região acrossomal das espermátides em desenvolvimento. Assim, eles foram capazes de verificar o número de estágios durante a espermatogênese, o que serviu futuramente, como base para a definição de 12 associações celulares, dentro do epitélio germinativo testicular do touro (Berndtson & Desjardins, 1975). A segunda técnica, envolveu a

marcação do DNA com substância radioativa, especialmente nos espermátocitos jovens. Isso permitiu determinar a duração da espermatogênese e, ser avaliada a característica da divisão espermatogonial (Koefoed-Johnsen, 1958, apud Amann & Schanbacher, 1983).

Embora todas as fases sejam importantes para a formação da célula espermática, a espermiogênese tem sido a mais estudada. Isso se deve, principalmente, pela necessidade de conhecimentos sobre o reordenamento das organelas, migração mitocondrial, organização e compactação da cromatina nuclear. As espermátides caracterizam-se por núcleo esférico coberto por citoplasma, com destaque para o complexo de Golgi, mitocôndrias e centríolo. Pequenos corpúsculos, referenciados por grânulos pró-acrossômicos, fundem-se para formar um simples grânulo maior, o qual se torna estritamente aderido à superfície nuclear (Fawcett, 1970). Posteriormente, este grânulo expande-se ao longo do núcleo, dando origem ao sistema acrossomal, cuja função primordial é a secreção de material glicoprotéico. Enquanto o sistema acrossomal migra para um pólo do núcleo, os centríolos, intimamente ligados à membrana nuclear, migram em direção oposta e darão origem ao flagelo ou cauda espermática. Em seguida, o núcleo roda e o sistema acrossomal se orienta em direção a membrana limitante do túbulo seminífero. Esta reorientação é acompanhada pelo deslocamento do próprio núcleo para a periferia do citoplasma. Após essa importante etapa, a cromatina nuclear começa a condensar e torna-se mais cromofílica. (Fawcett, 1970).

Cromatina é o complexo formado pela interação de proteínas de diferentes classes com o DNA nuclear, nas células eucarióticas. A organização da cromatina dentro do núcleo espermático é complexa e bem diferente das células somáticas. Nas células espermáticas, a cromatina consiste de subunidades repetitivas, ou nucleossomos, junto aos segmentos do DNA, dando uma aparência de “contas de rosário”. Cada nucleossomo consiste de aproximadamente 200 pares de base do DNA, com aproximadamente 11 nm de comprimento e, contendo duas cópias de cada uma das quatro histonas nucleossômicas (H2A, H2B, H3 e H4). Por fim, forma-se um octâmero de histonas nucleossômicas, em volta do qual a hélice do DNA de fita dupla é por duas vezes enrolada. As histonas são proteínas relativamente pequenas, com uma

proporção muito grande de aminoácidos, positivamente carregados (lisina e arginina). A carga positiva auxilia as histonas a se ligarem ao DNA (carga negativa), independentemente da seqüência nucleotídica (Fuentes-Mascorro et al., 2000).

Durante a espermiogênese, a cromatina das espermátides sofre um profundo rearranjo e, o DNA torna-se condensado e com volume bem menor do que o das células precursoras. Basicamente, dois processos distintos têm sido identificados. O primeiro, envolve a reconfiguração da matriz nuclear. O núcleo das espermátides muda da forma esférica para alongada, única para cada espécie. O segundo, envolve a substituição gradativa das histonas em protaminas, proteínas ricas em resíduos de cisteína e arginina. Nos espermatozóides maduros de bovinos são encontradas apenas protaminas do tipo 1, as quais formam duas pontes disulfídicas (S-S) intramoleculares e três intermoleculares (Balhorn, 1982; Mazrimas et al., 1986). Além disso, a protamina 1 representa entre 97 e 99% das proteínas que compõe a cromatina espermática, possuem um peso molecular de 6627 g/mol e contém 7 moléculas de *súlfur* (Bench et al., 1995).

Embora a presença das protaminas esteja intimamente associada aos mecanismos de descompactação nuclear pós-fertilização, sua função exata no núcleo espermática vem sendo estudada. O seu papel na compactação da cromatina foi descrito, inicialmente, por Bedford & Calvin (1974). Estes autores relacionaram essa característica, à necessidade do espermatozóide de se transportar ao longo do aparelho reprodutivo da fêmea e de penetrar o ovócito. Porém, estudos mais recentes, mostram que a estabilidade fornecida pelas protaminas forma subunidades conhecidas como *toroids*, cuja função primordial é permitir a ligação à matriz nuclear, por meio de segmentos específicos do DNA, denominados *Sperm Nuclear Matrix Attachment Regions* ou *SMARs* (Hud et al., 1993; Allen et al., 1995; Kramer & Krawetz, 1996). Estes segmentos possuem um ou mais domínios, em cada volta do DNA e, compactam o núcleo 60% a mais em comparação ao das células somáticas. Além da função de compactação, as protaminas ainda estão envolvidas na prevenção de possíveis falhas (*nick*) no DNA, conferindo maior proteção ao genoma masculino (Matsuda et al., 1985; Kierszenbaum, 2001).

### 3.3. Degeneração testicular por insulação e anormalidades morfológicas seminais

A dinâmica das transformações celulares, ao longo da espermiogênese, pode sofrer o efeito da regulação endócrina (Hall, 1994), da termoregulação testicular e temperatura ambiental (Kastelic et al., 1997). Outros fatores contribuem para distúrbios na espermiogênese, como o nível sérico de corticóides (Barth & Bowman, 1994), ruptura da barreira hemato-testicular, lesões no parênquima testicular (Van Camp, 1997) e, alterações genéticas (Steffen, 1997), resultando em alterações estruturais do espermatozóide.

Para o estudo das alterações espermáticas em bovinos, o aumento artificial da temperatura testicular por insulação, ou seja, a perda da capacidade regulatória da temperatura testicular por envolvimento escrotal (insulação), tem sido o mais documentado (Langerlof, 1934; Ross & Entwistle, 1979; Vogler et al., 1993; Kastelic et al., 1995). Neste modelo, o escroto é mantido, durante um período variável de 48 a 168 horas, com temperatura superior à corporal, 4 a 6°C acima do padrão fisiológico do parênquima testicular. Como conseqüência, há um rápido aumento do metabolismo aeróbico, o qual não pode ser suprido devido à limitação do fluxo sangüíneo. O resultado dessa combinação de fatores leva a hipóxia tecidual, produção de radicais livres e deterioração da qualidade seminal (Setchel, 1998). Embora esse mecanismo seja descrito para bovinos em geral, touros *Bos taurus indicus* diferem quanto às características anatômicas e de termoregulação testicular. Nesses animais, o escroto e a subtúnica testicular facilitam o gradiente de temperatura (troca positiva), em contraste com touros *Bos taurus taurus*, cujo gradiente é negativo. Além disso, a espessura da artéria testicular é significativamente inferior em diferentes regiões do parênquima testicular, em relação aos *Bos taurus taurus*, facilitando a troca ou perda de calor gerado pelo aumento do fluxo sangüíneo e metabolismo celular (Brito et al., 2004). Assim, é possível que tais características confirmem um aspecto diferenciado na resposta seminal frente ao choque térmico testicular.

Alterações na morfologia são as mais importantes observadas em touros submetidos à degeneração testicular por insulação, embora modificações na motilidade e concentração espermática também ocorram. As alterações morfológicas decorrem

das linhagens celulares afetadas ao longo da espermatogênese. Espermátocitos secundários e espermátides são particularmente mais sensíveis, enquanto as espermatogônias são mais resistentes (Setchel, 1998). Assim, após indução da degeneração testicular por insulação, as manifestações na qualidade seminal variam em intervalos, conforme os estágios de desenvolvimento e maturação das células germinativas, no momento do insulto, e em função de sua proximidade com a espermição e transporte epididimal (Barth & Oko, 1989). Portanto, a intensidade e as diferenças esperadas na qualidade seminal, estão na dependência do tempo de exposição ao insulto testicular e da fase espermatogênica, durante o processo. Ross & Entwistle (1979), usando dois grupos de touros, com 10 e 20 horas de insulação, verificaram além das alterações morfológicas entre 3 e 9 semanas após, modificações nos padrões qualitativos de espermatogônias do tipo B, espermátocitos (prófase) e espermátides com núcleo alongado. Fonseca & Chow (1995) induziram o processo degenerativo em touros zebuínos, por 7 dias, e verificaram profundas alterações morfológicas, decréscimo na concentração e motilidade espermática, entre 7 e 63 dias. Os defeitos de gota citoplasmática proximal e anormalidades de cauda, foram mais prevalentes em torno do décimo quinto dia, seguidos dos defeitos de acrossomo (grânulo acrossomal). Espermatozóides subdesenvolvidos e com defeitos de cabeça apareceram mais tardiamente, aos 30 dias. Em contraste, Vogler et al. (1993), induzindo a degeneração por 48 horas, não verificaram diferenças significativas na motilidade, concentração e alguns defeitos morfológicos, até 9 dias após o início do insulto testicular. Porém, os defeitos de cabeça, do tipo piriforme, vacúolos nucleares (*pouch formation*), acrossomo e peça intermediária (*dag defect*) foram observados aos 18, 21, 27 e 30 dias após o tratamento, respectivamente.

Recentemente, Brito et al. (2003a) descreveram aspectos importantes da indução da degeneração testicular em touros *Bos taurus indicus*. Usando a insulação escrotal em seis touros, durante 96 horas, verificaram que as alterações de núcleo espermático, caracterizadas pela presença de vacúolos nucleares, foi mais proeminente (10 a 20%) entre os dias 18 e 24 após início do processo. Entretanto, três touros apresentaram amplitudes de defeitos entre 5 e 10%, em comparação com os demais que variaram entre 22 e 47%. O aparecimento desses defeitos morfológicos está

associado à sensibilidade das espermátides, nas fases finais da espermiogênese (fases de acrossoma e maturação). No entanto, a elevação dos percentuais, decorrentes do processo degenerativo induzido, demonstra que, o efeito adverso da temperatura testicular afeta as espermátides na fase inicial (fase de capuz) da espermiogênese (Barth & Oko, 1989; Vogler et al., 1993).

### **3.4. Avaliação da qualidade seminal e relação com a fertilidade**

A avaliação da qualidade seminal apresenta como objetivos principais prever o potencial de fertilidade em indivíduos desconhecidos; determinar aqueles de maior fertilidade dentro de um grupo com fertilidade conhecida; e estabelecer características confiáveis, repetitivas e de fácil comparação entre indivíduos, e que tenham boa relação com indicadores de fertilidade (Amann & Hammerstedt, 1993). Neste sentido, muitos métodos laboratoriais têm sido desenvolvidos com a finalidade de identificar aspectos pertinentes à composição estrutural e funcional da célula espermática. Conforme a natureza e especificidade de cada teste, pode-se dividi-los em dois grandes grupos: preditivos, cujo objetivo é estabelecer um parâmetro e confrontá-lo com uma média ou padrão reconhecido na população de fertilidade conhecida e; funcionais, onde o objetivo maior é avaliar a capacidade dos espermatozóides realizarem a fertilização (Amann, 1989; Muller, 2000). No primeiro grupo, incluem-se testes como a concentração, motilidade, morfologia espermática, colorações supravitais, integridade da membrana plasmática, acrossômica e da cromatina espermática, entre outros. O segundo, abrange vários métodos *in vitro*, tais como a fertilização competitiva (heterospermia), ligação ou aderência à zona pelúcida (heteróloga ou homóloga), contagem de espermatozóides acessórios e penetração à zona pelúcida. O ideal e mais eficiente neste grupo é o processo de fertilização, baseando-se nos índices de descondensação da cabeça espermática, formação de pró-núcleo (masculino e feminino), clivagem e desenvolvimento embrionário (Hammerstedt, 1996; De Jonge, 2000; Saacke et al., 2000).

Esses testes são considerados indicadores indiretos da fertilidade, porém, a população espermática heterogênea entre indivíduos e entre ejaculados do mesmo indivíduo, deve ser considerada nos critérios de avaliação seminal. Este fato limita a seleção de uma variável ou de um atributo seminal, que seja representativo da população espermática, como o mais adequado para estimar a qualidade seminal (den Dass, 1992; Amann, 1989). Com base nestas observações, Amann & Hammerstedt (1993) mostraram a importância da análise combinada de vários atributos, no sentido de estabelecer subpopulações distintas e classificá-las como suficientes ou insuficientes em relação à fertilidade. Isto é possível, a partir das análises *in vitro*, que possibilitam o uso de um grande número de ovócitos por amostra. Este método promove uma redução do erro experimental, maior repetibilidade dos resultados e acuidade nas interpretações. Estas análises são representadas por testes de penetração, descondensação da cromatina e formação de pró-núcleos associados ao desenvolvimento embrionário.

Dentre as variáveis seminais identificadas e avaliadas no espermograma, a motilidade e a morfologia espermática, ainda são as mais importantes para a estimativa da fertilidade. Porém, suas correlações com diferentes índices de fertilidade são extremamente variáveis. Para a análise visual da motilidade (estimada em percentual), o nível de correlação pode variar entre 0,15 a 0,83 (Januskauskas et al., 2003) e, para a motilidade estimada pela análise computadorizada, entre 0,82 a 0,98 (Farrel et al., 1998), com a taxa de retorno ao cio (56 dias). Para índices obtidos *in vitro*, as correlações são inferiores, sendo que atributos normalmente importantes, como a motilidade e espermatozóides morfologicamente normais, nem sempre estão associados (Larsson & Rodrigues-Martínez, 2000; Muller, 2000).

### **3.4.1. Morfologia espermática**

Em 1934, Langerlöf descreveu o primeiro sistema de classificação para avaliação da morfologia espermática no touro. As características morfológicas dos defeitos mais prevalentes, foram associadas a mudanças no epitélio seminífero nos animais de baixa fertilidade e concentrava-se nas alterações de forma e tamanho da

cabeça espermática (piriformes, estreitos na base, contornos anormais e subdesenvolvidos). Nos touros estudados, o somatório desses defeitos não ultrapassou 11% (amplitude entre 2 a 18%). Mais tarde, Blom (1950) propôs modificações no sistema criado por Langerlöf (1934) subdividindo os defeitos morfológicos em dois grupos: primários e secundários. Segundo Blom (1950), os defeitos primários originavam-se da espermatogênese, a partir de alterações no epitélio seminífero (cabeça e peça intermediária anormais, cauda fortemente enrolada e implante abaxial); os secundários, (gota proximal e distal, cabeça destacada) resultariam de alterações do trânsito epididimal.

Rao (1971) descreveu a dinâmica de diferentes anormalidades ao longo do aparelho reprodutivo, envolvendo a *rete testis*, ductos eferentes, cabeça, corpo e cauda do epidídimo, ductos deferentes, ampolas e sêmen ejaculado, comparando-as entre touros com diferentes graus de fertilidade. O autor verificou que certas anormalidades espermáticas eram absorvidas ao longo do aparelho genital e estavam associadas a alterações histopatológicas nos testículos e epidídimo. Assim, alguns defeitos morfológicos, previamente admitidos, eram apenas variações fisiológicas, sem relação alguma com fertilidade e passaram a ser descritos como defeitos menores. Os demais: cabeça anormal, peça intermediária anormal e gota citoplasmática proximal, foram considerados defeitos maiores por estarem em altos percentuais nos touros de baixa fertilidade.

No sentido de estabelecer critérios mais representativos e confiáveis na determinação dos parâmetros dos diferentes defeitos morfológicos, a análise de um conjunto específico de variáveis, passou a ser intensamente estudado. Em 1961, Salisbury & VanDemark propuseram uma equação, onde eram considerados os aspectos qualitativos e quantitativos, na avaliação da fertilidade potencial de touros, usados em inseminação artificial. Os autores mostraram que, quando a concentração espermática em cada dose inseminante é controlada ou semelhante entre touros, a variação na morfologia torna-se mais importante e discriminante, quanto à classificação para a fertilidade potencial. Com base nas interações entre diferentes atributos, DeJarnette et al. (1992) estabeleceram uma nova linha classificatória, a partir do impacto de certas anormalidades morfológicas sobre a fertilidade. Tais alterações

foram divididas em compensáveis e não compensáveis. Os autores mostraram, que as deficiências compensáveis poderiam ser minimizadas ou eliminadas, com o aumento do número de espermatozóides na dose inseminante. Ao contrário, as não compensáveis, estariam intimamente relacionadas a subfertilidade mesmo com o aumento na concentração espermática em cada dose. Segundo Amann et al. (1993), diferentes características pertinentes às células espermáticas ocorrem simultaneamente, se expressam variavelmente e podem afetar umas às outras, modificando integralmente ou parcialmente sua estrutura funcional. Essas mudanças estão associadas às condições da espermatogênese e função epididimal, respondendo ao efeito de importantes eventos moleculares, nem sempre observados apenas pelas alterações morfológicas. Isso sugere que, uma amostra de sêmen possui diferentes subpopulações de espermatozóides, muitos dos quais podem apresentar características compatíveis ou não com a fertilidade. Um exemplo deste aspecto, que ilustra o estudo de De Jarnette et al. (1992), é a expressiva variação no número de espermatozóides que atingem a zona pelúcida (espermatozóides acessórios), entre amostras de diferentes touros com alta fertilidade (Nadir et al., 1993). Defeitos “compensáveis” estão associados à dificuldade de acesso ao ovócito, após inseminação, enquanto os não compensáveis estão ligados à qualidade ou competência embrionária, após o processo de fertilização. Porém, espermatozóides com defeitos não compensáveis (vacúolos nucleares, crateras e forma anormal) atingem o sítio fertilizante, em proporções semelhantes aos classificados como normais e, portanto, apresentam probabilidades semelhantes de fertilização (Saacke et al., 1998; Evenson, 1999).

Embora a qualidade seminal tenha significado multifatorial, há uma tendência em aceitar as alterações morfológicas, especialmente de cabeça e acrossomo, como indicadores mais importantes associados à variação da fertilidade (Amann & Hammerstedt, 2002). Neste contexto, diferentes defeitos morfológicos na estrutura das organelas, das membranas espermáticas e acrossomais, do contorno, forma da cabeça espermática e compactação de cromatina, têm sido empregados com o objetivo de identificar diferenças entre amostras e impacto sobre os mecanismos da fertilização (Foote, 2003). A determinação dessas relações tem possibilitado avanços na avaliação seminal, especialmente no que se refere a organização, diferenciação e dinâmica das

membranas. Este mecanismo de alteração estrutural envolve as diferentes regiões do espermatozóide, como a integridade acrossomal, nuclear e, participa dos fenômenos bioquímicos que afetam a função espermática, durante a maturação e passagem epididimal. Estão incluídos também, nesse processo, o mecanismo molecular da capacitação, reação acrossômica e interação espermatozóide - ovócito, que ocorre no aparelho reprodutivo da fêmea (Amann et al., 1993; Sailer et al., 1996; Frits & Gadella, 2000; Guraya, 2000).

### **3.4.2. Membrana plasmática, integridade acrossomal e coloração supravital**

Nas últimas décadas, a membrana plasmática espermática tem sido uma fonte rica de informações relativas aos mecanismos de capacitação e reação acrossomal (De Jonge, 1999). Após o término da espermiogênese, a membrana plasmática torna-se uma estrutura estável, sem que haja a síntese de proteínas, fosfolípidos, colesterol e outros componentes (Eddy & O'Brien, 1994). Sua estrutura geral compreende uma camada dupla de lípidos, composta por fosfolípidos polares hidrofóbicos (região interna) e hidrofílicos (região externa), colesterol, proteínas estruturais e periféricas interligadas à camada lipídica (Flesch & Gadella, 2000). A função primordial é regular a interação com diferentes fatores de adesão, permeabilidade a solutos hidrofílicos, sinalização e fusão com outras membranas (Aitken, 1997; Breitbart & Spungin, 1997).

Há evidências que a organização e composição da membrana plasmática varie entre diferentes regiões da superfície espermática e com domínios funcionais distintos. O maior domínio localiza-se na região anterior (acrossomal) e posterior (pós-acrossomal) da cabeça espermática. Na região acrossomal, a membrana plasmática ainda se divide em três segmentos distintos: 1. marginal, na região apical, 2. principal, no segmento acrossomal e 3. equatorial, na região pós-acrossomal (Bearer & Friend, 1990). Estes domínios, embora sejam estabilizados nas células maduras, sofrem mudanças adicionais, durante o trânsito e armazenamento epididimal. Dentre estas, destacam-se as alterações nas cargas iônicas, ligação à lecitina, redistribuição

molecular intramembranosa, fluidificação de alguns componentes fosfolipídicos, composição lipídica e protéica e ainda, composição de sítios (receptores) para adesão e adsorção protéica (Eddy & O'Brien, 1994; Flesch & Gadella, 2000).

Nas últimas décadas, têm sido reconhecido que a maior característica discriminante, entre espermatozoides vivos e mortos, é a perda da integridade estrutural da membrana plasmática. A integridade da membrana plasmática e, especialmente, da membrana acrossomal, é essencial para que o espermatozoide sustente sua atividade metabólica, sofra capacitação, reação acrossomal e posteriormente, ligue-se e penetre na zona pelúcida (Töpfer-Petensen et al., 2000). Na cauda do epidídimo, a superfície das membranas espermáticas apresenta carga negativa. No entanto, após ejaculação e ao entrar em contato com o ambiente uterino e iniciar o processo de capacitação, as membranas passam a expressar cargas positivas (Veres et al., 1985). Esse perfil, também é observado em células mortas ou vivas, com alterações estruturais na membrana plasmática e acrossomal, normalmente encontradas pós-descongelamento. Nestas condições, há intensa produção de peróxido de hidrogênio, pelo efeito das oxigenases, enzimas neo-sintetizadas envolvidas nos processos lesivos ou tóxicos celulares (Shannon & Curson, 1972; Upreti et al., 1998). A consequência imediata é a peroxidação lipídica, desestruturação dos ácidos graxos polinsaturados, constituintes da membrana plasmática e redução da motilidade e vigor espermático (Taylor 2001).

Baseado nestes fenômenos, testes laboratoriais específicos, para análise das condições estruturais da membrana e estimativa da reação acrossomal, têm sido incluídos no diagnóstico da viabilidade espermática (Rodrigues Martinez et al., 1997; Januskauskas et al., 2003). A integridade da membrana plasmática pode ser avaliada, em microscopia de campo claro, pelo uso de corantes supra-vitais com destaque para *eosin-nigrosin* (Hancock, 1951), *eosin-aneline blue* (Schaffer & Almquist, 1948), *trypan-blue* (Kovás & Foote, 1992). Embora estes corantes sejam conhecidos há muitos anos, o *trypan-blue* vem sendo amplamente usado com resultados promissores (McCann & Chantler, 2000; Tartaglione & Ritta, 2004). A combinação entre o método supra-vital *trypan-blue* e a coloração de *giemsa* (*trypan-blue/giemsa*) possibilita a avaliação da integridade da membrana plasmática e da região acrossomal, além de

alterações morfológicas específicas no acrossomo. Portanto, se constitui num método vantajoso para estimativa da viabilidade do sêmen pós-descongelamento, além de ser de fácil execução e critérios bem definidos quanto à interpretação dos resultados (Didion et al., 1989; Feliciano Silva, 1998; Brito et al., 2003b).

### **3.4.3. Alterações de núcleo, cromatina espermática e identificação pela coloração de Fielgen**

Os primeiros estudos sobre mudanças na organização do núcleo espermático, nos bovinos, foram descritos por Gledhill et al. (1966) e Gledhill (1966). Porém, mais tarde, em 1969, McCosker descreveu, originalmente, a presença de alterações na cromatina, em espermatozoides com vacúolos nucleares (*pouch*), associando-as à infertilidade. A partir do estudo de Evenson et al. (1980), foram estabelecidas as variações no perfil da cromatina espermática nos mamíferos. E por conseguinte, foi introduzido o termo heterogeneidade, para expressar espermatozoides que não apresentavam um caráter normal. Em função da relação entre subfertilidade e baixa qualidade seminal, foi crescente o interesse pela determinação e estimativa da heterogeneidade da cromatina espermática (Gledhill et al., 1970; Ballachey et al., 1987).

Diversos fatores têm sido associados à presença de anormalidades na cromatina espermática, em especial, ao efeito de agentes tóxicos e patogênicos, mutação gênica e cromossomal e, mais freqüentemente, pela perda da termoregulação testicular (Slizinska & Slizinski, 1953; Karabinus et al., 1997; Saakas et al., 1999). As alterações na cromatina originam-se a partir da diferenciação pós-meiótica, especificamente, durante o remodelamento nuclear, e estão intimamente associadas à presença de fendas (*nicks*) no DNA e anormalidades na topoisomerase II (topo II), enzima responsável pela reparação contínua de pequenas alterações no DNA. A inibição dessa enzima, antes de completar a espermiogênese, favorecerá o aparecimento de fragmentação no DNA ou, em parte, da cromatina nuclear (Risley et al., 1986). Além desse aspecto, as falhas na estrutura do DNA, podem ocorrer na

presença de altos níveis de estresse oxidativo e produção de  $H_2O_2$  no ambiente testicular (Twigg et al., 1998). Esses danos podem, ainda, ocorrer por apoptose, processo de modificações bioquímicas e ultra-estruturais nucleares, incluindo a agregação da cromatina e ruptura de proteínas peri-nucleares (Keer, 1992). Esse processo foi investigado por Anzar et al., (2002), que descreveram, em cinco touros de alta fertilidade, a ocorrência de cromatina danificada, entre 15 e 25% no sêmen fresco e cerca de 10% no sêmen congelado. A correlação encontrada, ( $r=-0,90$ ), mostrou a importância da identificação dessas alterações no espermograma, sobretudo em touros a serem usados em fertilização *in vitro*. Erros no processo de protaminação (substituição das histonas pelas protaminas nucleares), ancoragem na cromatina espermática ou falha no próprio DNA, estão associados à diminuição tanto na habilidade fertilizante quanto no subsequente desenvolvimento embrionário (Evenson. 1999). Isso pressupõe que, a necessidade de um alto nível de organização nuclear, durante a espermatogênese, seja fundamental para o processo de descondensação da cabeça espermática e formação do pró-núcleo masculino após a fertilização (Sutovsky & Schatten, 2000).

As anormalidades na condensação da cromatina, e a aparente fragmentação do núcleo espermático, podem ser identificadas por técnicas específicas. Essas incluem, desde a avaliação *in situ* por citoquímica, até o uso da citometria de fluxo, a partir da marcação das células lesadas pela acridine orange (corante metacromático). Embora este método venha sendo utilizado, é muito oneroso e, as correlações com a fertilidade são semelhantes, quando comparado a outros métodos, (Evenson et al., 2002; Foote, 2003). A morfologia dessas alterações, que inclui a formação de vesículas ou vacúolos na região equatorial da cabeça espermática (*pouch formation*, *craters defects* e *diadems*), foi, primeiramente, descrita por Bane & Nicander (1965). Segundo Barth & Oko (1989), essas alterações compõem um tipo diferenciado de condensação anormal da cromatina, estão associadas a outros defeitos morfológicos e, originam-se a partir da fase acrossomal (estágios 8 e 9) da espermiogênese.

Diferentes técnicas, podem ser usadas, para estabelecer o nível de fragmentação ou descondensação da cromatina espermática. De acordo com Evenson et al. (2002), há uma relação distinta entre suscetibilidade do DNA à desnaturação e a

presença de fraturas ou quebras na estrutura do DNA. Ambos podem ser estimados, de acordo com testes específicos. No primeiro caso, são usadas provas para identificar a estabilidade ou defeitos mais sutis na integridade da cromatina. Estas provas incluem a *single cell gel electrophoresis assay* (COMET), *terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated nick end labeling* (TUNEL), *in situ nick translation* (NT), *sperm chromatin structure assay* (SCSA) e *acridine orange test* (AOT). No caso de condensação anormal da cromatina, as provas são específicas, permitindo visualizar as fragmentações nucleares com as colorações de *Fuelgen*, *aniline blue*, *toluidine blue* e *chromomycin-A<sub>3</sub>* (Dadoune et al., 1998; Barth & Oko, 1989; Franken et al., 1999; Beletti et al., 2004). Destes métodos, a coloração de *Fuelgen*, além de ser a mais antiga, é muito usada em bovinos (Feulgen & Rossenbeck, 1924; Barth & Oko, 1989). Por esta técnica, os espermatozóides são submetidos à hidrólise ácida, cuja função é destacar as bases purinas das riboses, expondo os grupos aldeídos presentes no DNA. Nos locais onde há ruptura ou descondensação da cromatina, os grupamentos aldeídos livres reagem com a fucsina básica (pararosanilina) e tornam-se avermelhados ou magenta (Kasten, 1960; Chieco & Derenzini, 1999). Em microscopia de contraste de fase, estes locais ficam de cor esbranquiçada, formando halos claros, semelhantes a vesículas, que se distribuem em várias regiões da cabeça (*clumps*) e representam lesões na cromatina. Nas células íntegras, todo o núcleo fica escuro, com padrão homogêneo, e sem a presença de fragmentos (Gledhill, 1970). A presença de rupturas ou fragmentação no núcleo espermático, é inversamente correlacionada ( $r=-0,64$ ,  $p<0,01$ ) com o comprimento da onda  $\alpha_t$  (curtose), medida pela citometria de fluxo, em espermatozóides com alterações no DNA. Isso indica que quanto maior a dispersão na leitura do citômetro (menor curtose), maior será a proporção de núcleos fragmentados ou descondensados, pelo método de Fuelgen (Dobrinsk & Barth, 1993).

A prevalência de fragmentação e vacuolinização nuclear nos espermatozóides bovinos geralmente é baixa, mas, em casos de degeneração testicular, pode variar de 20 a 100% (Barth & Oko, 1989; Sprecher & Coe, 1996). No entanto, a sua relação com a taxa de fertilização e desenvolvimento embrionário é variável. Em um touro, com mais de 80% de defeitos nucleares do tipo *pouch*, com características de fragmentação, identificados pela coloração de Fuelgen, Miller et al. (1982)

encontraram apenas 5% de gestação em 42 fêmeas cobertas naturalmente, 8% de 180 inseminadas e 15% em 73 submetidas à transferência de embriões. Pilip et al. (1996), verificaram que o percentual de ovócitos fertilizados *in vitro*, com o sêmen de um touro com aproximadamente 80% de vacúolos nucleares, foi  $19,7 \pm 7,0\%$ , significativamente inferior ao touro controle,  $67,6 \pm 4,5\%$ . Além disso, houve maior prevalência de anormalidades na descondensação nuclear ( $32,3 \pm 2,2 \times 1,8 \pm 1,5$ ) e, menor número de espermatozóides aderidos à zona pelúcida ( $92,0 \pm 81,3 \times 141,4 \pm 84,8$ ), respectivamente. Ao contrário, Thundathil et al. (1998) não encontraram diferenças, entre um touro com 60% de vacúolos nucleares em relação ao controle (0%), na taxa de clivagem ( $72,1 \times 76,0\%$ ), mórula ( $29,8 \times 34,8\%$ ) e blastocistos ( $7,2 \times 8,4\%$ ), respectivamente. Recentemente, Walters et al. (2004) e Walters et al. (2005a) induziram alterações na espermiogênese por insulação escrotal e, embora tenham encontrado elevação nos percentuais de vacúolos nucleares e apicais na cabeça espermática acima de 30%, não observaram redução na fertilidade. Dos touros que responderam ao estresse térmico, (entre 50 e 60% de *pouch formation*), não houve efeito sobre as taxas de clivagem aos 15 ( $79,1$  a  $82,8\%$ ) e 21 ( $66,3$  a  $80,4\%$ ) dias pós-insulto escrotal e, sobre as de blastocistos ( $20,0$  a  $22,3\%$  e  $13,5$  a  $21,6\%$ ) para os mesmos períodos, respectivamente. Além disso, há diferenças importantes quanto aos indicadores de morte celular programada em embriões, oriundos de touros com elevação nessas alterações morfológicas (Walters et al., 2005b). Muitos aspectos da relação entre gametas, especialmente da constituição estrutural do núcleo espermático, durante a fertilização e desenvolvimento embrionário, ainda não são totalmente conhecidos. Isto mostra também, a necessidade de aprofundar os estudos, na determinação de parâmetros e no estabelecimento de novos critérios para serem utilizados na rotina da avaliação seminal.

### **3.5. Efeito paterno sobre a fertilização e desenvolvimento embrionário**

A função primordial dos espermatozóides, durante a fertilização, é de contribuir com um conjunto de cromossomos haplóides e ativar o ovócito, iniciando uma seqüência de eventos bioquímicos, necessários ao desenvolvimento embrionário

(Yanagimachi, 1994; Memli & First, 1999). Ovócitos bovinos, aptos à fertilização, permanecem em metáfase da segunda divisão meiótica. Porém, a sinalização bioquímica para a ativação ovocitária, caracterizada pelo início da síntese de DNA e, sincronização no desenvolvimento dos pró-núcleos, inicia após a penetração do espermatozóide no ooplasma (McLay & Clarke, 2003; Sutovsky et al. 2003).

Imediatamente, após a penetração espermática, as proteínas da teca perinuclear que formam o envelope nuclear, são dissolvidas no ooplasma, por ação de fatores citoplasmáticos e das microvilosidades do ovócito (Sutovsky et al., 1997). Em seguida, o núcleo espermático sofre descondensação da cromatina e, posteriormente, forma o pró-núcleo masculino (Mújica et al., 2003). Neste momento, as protaminas nucleares são progressivamente substituídas pelas histonas, possivelmente pela redução das pontes disulfídicas, por ação da glutathione derivada do ooplasma (Sutovsky & Schatten, 1997). Após o término da substituição, as histonas organizam-se nos nucleossomos e a cromatina espermática torna-se descondensada, dentro do pró-núcleo. Assim, ao redor do núcleo, um novo envelope nuclear é reconstruído (Latham, 1999). Nos bovinos, o desenvolvimento do pró-núcleo masculino inicia 4 horas após inseminação (fertilização *in vitro*), sendo, a fase S (síntese do DNA), iniciada após 8 e 10 horas (Laurincik et al., 1998). O início dessa fase é crítico para as subseqüentes divisões mitóticas, expressão gênica dos fatores de crescimento e diferenciação celular (Memili & First, 1999).

O efeito paterno inicial está diretamente associado à capacidade de descondensação do núcleo espermático e distribuição dos microtúbulos. Estes últimos, têm a função primordial de atrair e direcionar o fuso mitótico, junto ao pró-núcleo feminino, previamente à formação da primeira célula (Navara et al., 1995). Diferenças no perfil, dessas duas características, implicam no retardo do desenvolvimento, tanto do pró-núcleo masculino quanto na formação do zigoto (primeira célula). Estas diferenças, tem sido sugeridas, como responsáveis por alterações no processo de fertilização (Plachot & Crozet, 1992; Navara et al., 1994). Para estabelecer as causas dessas alterações, Saacke et al. (1994) avaliaram as características fecundantes *in vitro*, em touros com alta e baixa taxa de não retorno em inseminação artificial. Aqueles que apresentaram menor taxa de não retorno, ( $66,0 \pm 1,0\%$ ), tiveram percentuais de

penetração ( $11,0 \pm 2,0$ ) e clivagem ( $20,0 \pm 2,0\%$ ) inferiores aos de maior taxa de não retorno ( $78,0 \pm 1,0\%$ ),  $23,0 \pm 4,0\%$  e  $33,0 \pm 2,0$ , respectivamente. Um aspecto importante, observado por esses autores, foi que nos touros de menor fertilidade, a formação do pró-núcleo foi prolongada em 1 hora e em 7 horas, a clivagem de 2, 4 e 8 células, em comparação aos touros de maior fertilidade. Essas diferenças, estão na dependência da primeira replicação do DNA (fase S do ciclo celular), já que, touros com baixa fertilidade, apresentam percentuais inferiores de zigotos na fase S, entre 10 e 14 horas após fertilização (Eid et al., 1994). Naqueles de alta fertilidade, 80% dos zigotos estão nesta fase, 12 horas após fertilização. Dentre as possíveis causas desses distúrbios, Eid et al. (1994) atribuíram às alterações no DNA ou na compactação da cromatina espermática, a partir de falhas nas protaminas nucleares. Com base nestes resultados, Comizzoli et al. (2000) confirmaram os resultados de Eid et al. (1994). No entanto, verificaram que a primeira replicação do DNA nuclear é totalmente dependente do efeito paterno e, a duração desta fase, é inferior em touros de baixa fertilidade (6,2 horas), em comparação aos de alta fertilidade (10,4 horas). Isso se deve, ao prolongamento na fase G1 do ciclo celular, (15,6 horas para os de baixa fertilidade x 13,4 horas para os de alta fertilidade), ocasionando um retardo na transcrição do genoma paterno, durante a fase S. Como resultado, há menor ritmo mitótico e redução na frequência de blastocistos, 7 dias após inseminação. Este efeito também foi demonstrado por Ward et al. (2001), que estudaram 6 touros com taxa de não retorno variando entre 57 e 78%. Essa diferença, na fertilidade, foi atribuída ao retardo no início da clivagem. Touros que iniciaram a clivagem antes de 30 horas pós-inseminação, resultaram em maiores percentuais de blastocistos nos dias 6, 7 e 8. Assim, é possível supor que, quanto mais rápida for a clivagem, melhores serão os percentuais de blastocistos. No entanto, os fatores paternos que controlam as primeiras divisões mitóticas, ainda não são totalmente compreendidos. Recentemente, Comizzoli et al. (2003) verificaram que o metabolismo da glicose afeta a formação do pró-núcleo masculino e é distinto entre touros com variações na fertilidade. A atividade glicolítica foi significativamente superior nos ovócitos fertilizados por touros de alta fertilidade. Isto mostra que quanto maior o nível metabólico, mais precoce foi a replicação do DNA. Portanto, esse efeito paterno “epigenético” estaria intimamente associado à

subseqüente transcrição gênica e regulação da ativação do genoma embrionário. Falhas na expressão dos genes, responsáveis pelo metabolismo da glicose, podem bloquear a síntese do DNA e resultar em modificações na cronologia das divisões celulares, perda da estrutura da cromatina e morte embrionária (Latham, 1999; Matwee et al., 2000; Kanka, 2003; Wrenzycki et al., 2004).

## **4. Material e Métodos**

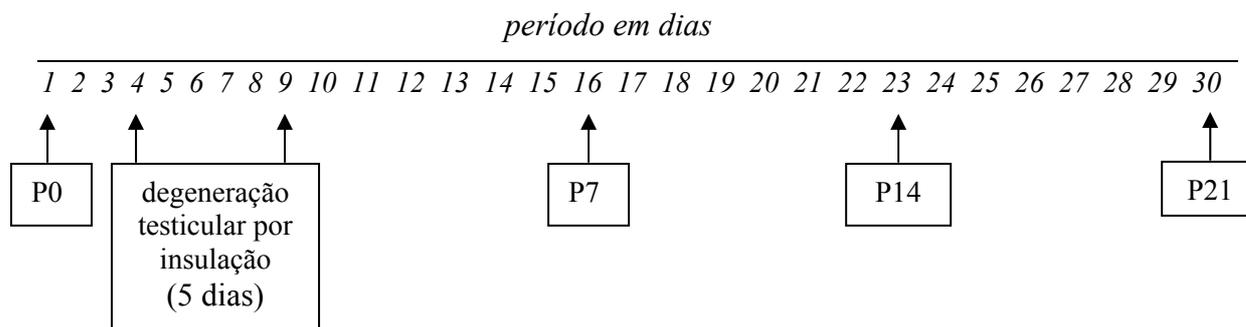
### **4.1. Animais**

Quatro touros da raça Nelore, puros por origem, com idade variando entre 30 e 36 meses, com peso entre 500 e 550 kg, pertencentes ao Centro Nacional de Pesquisa de Gado de Corte, EMBRAPA, localizado em Campo Grande, MS (20°26'34"S e 54°38'47"O), foram selecionados a partir de características clínicas e seminais. Todos os animais eram livres de doenças infecto-contagiosas e sorologicamente negativos para brucelose (prova rápida em placa, *card test*) e não reagentes para tuberculose bovina (prova intradérmica caudal). Os animais apresentaram sêmen com aspecto leitoso e/ou cremoso, motilidade acima de 80%, vigor entre 4 e 5, concentração não inferior a  $500 \times 10^6$  de espermatozóides por mL e no mínimo 90% de espermatozóides morfolologicamente normais, em três ejaculados obtidos por eletro-ejaculação com intervalo de 2 dias na semana anterior ao início do experimento.

### **4.2. Indução da degeneração testicular e períodos experimentais**

O processo degenerativo testicular foi induzido por envolvimento (insulação) do escroto com uma bolsa de feltro com aproximadamente dois milímetros de espessura, revestida por tecido de nylon. As bolsas foram ajustadas e fixadas com fita adesiva na região dos cordões espermáticos, de maneira que o escroto ficasse totalmente coberto. As mesmas permaneceram por um período de 5 dias, sendo que os animais foram observados três vezes ao dia durante esse período.

Foram considerados 4 períodos experimentais em que amostras de sêmen de todos os animais foram colhidas. Para o período 0 (P0) ou controle, as amostras foram colhidas três dias antes da indução da degeneração testicular (colocação da bolsa). Após a retirada das bolsas, as colheitas foram realizadas 7, 14 e 21 dias a partir desta data e constituíram os períodos P7, P14 e P21, respectivamente (figura 1).



**Figura 1.** Representação esquemática da formação dos períodos experimentais em touros submetidos à degeneração testicular antes (P0) e após (P7, P14 e P21 dias) retirada do insulto testicular.

### **4.3. Experimento 1: características seminais e perfil eletroforético do plasma seminal e espermatozóides antes e após indução da degeneração testicular por insulação**

O objetivo deste experimento foi determinar o efeito dos períodos experimentais antes e depois da indução do processo degenerativo testicular sobre as características seminais, estabelecer o perfil eletroforético do plasma seminal e espermatozóides, e estimar a correlação entre os perfis eletroforéticos e características seminais. As amostras foram obtidas a partir de um ejaculado de cada touro em cada período experimental e foram processadas imediatamente após a colheita do sêmen.

#### **4.3.1. Colheita do sêmen, análise das características seminais e fragmentação nuclear**

Para colheita do sêmen, os touros foram mantidos em tronco de contenção onde se procedeu a tricotomia e limpeza da região externa do prepúcio. Após estímulo por eletro-ejaculação, amostras de sêmen foram avaliadas para estimativa da motilidade total (com intervalo de 10 pontos percentuais em lâmina/lamínula), vigor (entre 1 e 5) e concentração espermática ( $\times 10^6/\text{mL}$ ) em hematocítmetro. Para morfologia espermática, as amostras foram diluídas e mantidas em frascos com

formol-salino tamponado 1% (Hancock, 1957). As estimativas dos percentuais de espermatozóides normais e de defeitos para cada touro/período foram realizadas em microscopia de contraste de fase (preparações úmidas) em aumento de 1000x, contando-se 200 espermatozóides. Para esta análise, considerou-se as seguintes anormalidades: cabeça (formas subdesenvolvidas, piriforme, delgada, delgada na base, contornos anormais), acrossomo (presença de crateras, granulomas, dobrado, achatado, destacado e vesiculoso), peça intermediária (fraturada, engrossada, enrolada e hipoplásica), gota citoplasmática proximal, cauda (dobrada, enrolada e retroaxial), e cabeça isolada normal, segundo Barth & Oko (1989).

Além dessas características seminais foi também realizada a análise da fragmentação nuclear, estimada pela coloração de Fielgen, conforme Miller et al. (1982) e Barth & Oko (1989) com modificações. Esfregaços das amostras foram fixados em formol-salina tamponada a 10% por 1 hora e em seguida mergulhados em solução 5N de HCl por 30 minutos. Após, as lâminas permaneceram em solução de ácido periódico 0,5% por 10 minutos e lavadas em água destilada (5 min.), secas em temperatura ambiente e mantidas em solução de Schiff por 1 hora. Após esse processo, as lâminas foram lavadas em água destilada por 5 minutos, secas e avaliadas. Considerou-se fragmentado, os núcleos espermáticos que apresentava halos ou vacúolos visíveis, uniformes ou não, geralmente descoloridos, células com coloração rarefeita (fantasmas), células com a presença de vesículas (*pouch formation*) e células com características granulares (*clumpy*) (figura 2). O percentual de fragmentação foi estimado em 500 espermatozóides avaliados em microscopia de contraste de fase sob imersão (1000x).

#### **4.3.2. Perfil eletroforético seminal**

A análise da eletroforese foi realizada em amostras do plasma seminal e espermatozóides. Após a colheita, 4 mL de sêmen foi centrifugado a 15.000 g/30 min a 10 °C. Em seguida, 1,0 mL do sobrenadante (plasma seminal) foi separado e preservado a -80 °C. O *pellet* restante (espermatozóides) no tubo foi resuspenso e microcentrifugado três vezes em salina tamponada (PBS, pH 7,4) e também

preservado a  $-80^{\circ}\text{C}$  (Wolfe et al., 1993). Previamente ao procedimento da corrida eletroforética, as amostras foram dosadas quanto à concentração de proteína total. Esta dosagem foi realizada pelo ensaio do ácido bicinconínico (BCA), sensibilidade 10 a 1200  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , utilizando-se dois reagentes: A e B, conforme Bollag et al. (1996), Anexo II. Ambos reagentes foram misturados na proporção de 50 partes do reagente A e 1 do reagente B. Após, 45  $\mu\text{L}$  de água destilada e 5  $\mu\text{L}$  de amostra foram adicionados em 1 mL da mistura. Os tubos de ensaio contendo esta mistura foram mantidos a  $37^{\circ}\text{C}$  por 30 minutos. Em seguida, procedeu-se a leitura de cada amostra, realizada por espectrofotometria, no comprimento de onda de 562 nm. Para o cálculo da proteína total foi utilizada a albumina bovina (BSA) como padrão.

As proteínas foram separadas em SDS-PAGE (*sodium dodecylsulphate – polyacrylamide gel eletrophoresis*) a 12,5%, em mini cubas verticais (*Hoefler MiniVE Vertical Eletrophoresis System – Amersham Biosciences*). Após a preparação dos géis de separação (30% de acrilamida e 0,8% de bis-acrilamida em 6,3 mL; 1,5M de TRIS-HCl, em pH 8,8 e 0,4% de SDS em 3,75 mL de água ultra-pura; persulfato de amônia 10% em 100  $\mu\text{L}$ ; TEMED 15  $\mu\text{L}$  em 4,83 mL de água ultra-pura), as amostras foram dissociadas pelo aquecimento a  $100^{\circ}\text{C}$  durante 10 minutos na presença de 200  $\mu\text{L}$  de tampão da amostra 5 x (TRIS-HCl 60 mM, pH 6,8, glicerol 50%, SDS 2%, 2-mercaptoetanol 23 mM, 0,1% bromofenol azul em água ultrapura), na proporção de 1 de tampão para 4 de amostra e homogeneizadas no agitador de tubos (*Multimixer, Biomixer, modelo MVS-1, Brasil*).

Após o preparo das amostras, seguiu-se o preparo do gel de empilhamento a 5% (30% de acrilamida e 0,8% de bis-acrilamida em 0,67 mL de água ultrapura, TRIS-HCl 0,5 M, pH 6,8, 0,4% SDS em 1,0 mL de água ultrapura, acrescidos de 2,3 mL de água ultrapura, persulfato de amônia 10%, 30  $\mu\text{L}$  e TEMED 5  $\mu\text{L}$  com volume final de 4,0 mL), e colocados sobre os géis de separação já polimerizados, após a absorção da água com um papel de filtro. Um molde de polietileno em forma de pente foi acomodado sobre o gel de empilhamento de modo a formar canaletas para permitir a aplicação das amostras. Após a polimerização do gel de empilhamento, o molde foi retirado e os suportes contendo as placas foram colocados na cuba de corrida. O

tampão de corrida (TRIS 25 mM, glicina 192 mM, SDS 0,1% em água ultrapura), já diluído na proporção de 1 de tampão para 4 de água, foi adicionado às cubas.

A quantidade total de proteína aplicada em cada canaleta foi de 40 µg em 10 µL, sendo que uma das canaletas foi preenchida com marcador de alto peso molecular (*Full Range Rainbow, Recombinant Protein Molecular Weight Markers, 10 a 250 kDa, Amersham Biosciences*). A eletroforese foi conduzida a uma miliamperagem constante de 25 mA e voltagem máxima de 250 V, num período máximo de 2:30 h. A cuba foi ligada a uma fonte elétrica bipolar. Após a corrida, os géis foram retirados das placas de vidro e colocados em recipientes plásticos onde foram corados com *coomassie* azul de brilhante R-250 (1,0 g de *coomassie* azul de brilhante R-250, 450 mL de metanol, 100 mL de água ultrapura e 450 mL de ácido acético glacial) aquecido em torno de 50°C em microondas por 30 minutos e uma hora para os géis de separação, sob agitação (*Rotary Shaker, Biomixer, modelo MOS-1, Brasil*). Em seguida, os géis foram descorados por duas vezes durante 15 minutos em solução descorante (100 mL de metanol, 100 mL de ácido acético glacial e 800 mL de água ultrapura) aquecida a 50°C por 30 segundos no microondas, sob agitação. Uma nova descoloração foi realizada em água destilada, por 20 minutos, no microondas potência 70 W e por 10 minutos potência 100 W. Após, os géis foram armazenados em vasilhas plásticas, em água destilada contendo 5% de glicerol, numa temperatura de 4°C.

As imagens dos géis foram digitalizadas (VDS, Amersham Biosciences) e um *software* analisador de imagens (Image Master, Amersham Biosciences), do Dept. de Física e Biofísica, IB, UNESP, Botucatu, SP, foi utilizado para estimar a presença e peso molecular de cada banda em cada amostra no gel.

### 4.3.3. Análise estatística

Previamente aos procedimentos estatísticos as características seminais foram avaliadas quanto a homogeneidade e heterogeneidade da variância (teste de Cochran e teste de Bartlett). Aquelas que não preencheram tais pré-requisitos foram submetidas à transformação angular pela equação:  $ASEN[RAIZ(\text{variável}/100)]$ ,

segundo Ribeiro Jr (2001) e Sampaio (1998). O efeito do período sobre as características seminais foi estimado pela análise de variância modelo inteiramente casualizado, com teste de Duncan ( $p < 0,05$ ) para comparação de médias.

Para comparação do perfil eletroforético do plasma seminal e espermatozóides entre touros dentro de cada período, empregou-se análise de agrupamento pelo método UPGMA (*Unweighted Pair-Group Method Using Arithmetic Averages*), modelo SHAN *Clustering* (*Seqüencial Agglomerative, Hierarquic, Nonoverlapping*), a partir do intervalo de ocorrência 0 (ausência de banda protéica) e 1 (presença de banda protéica) em cada amostra. Em seguida, foram calculados os coeficientes de similaridade (método *Simple Matching*) para cada período e expressos em dendrogramas (Everitt, 1993).

Os coeficientes de similaridade obtidos para o plasma seminal e espermatozóides em cada período experimental foram correlacionados às características seminais pelo método não paramétrico de *Spearman* (ajustado para o total de bandas em cada amostra), para  $p < 0,05$ , segundo Rao (1952) e Ribeiro Jr. (2001).

#### **4.4. Experimento 2: efeito da seleção espermática por gradiente de Percoll sobre as características seminais antes e após indução da degeneração testicular por insulação**

Após a colheita do ejaculado e processamento das amostras para análise do espermograma e perfil eletroforético, o restante do sêmen foi congelado para posteriormente ser submetido à fertilização *in vitro*. Este experimento teve como objetivo determinar o efeito dos períodos experimentais e da seleção espermática imposta pelo gradiente de Percoll sobre a motilidade, vigor, morfologia espermática, fragmentação nuclear e avaliação da integridade acrossomal.

#### 4.4.1. Congelação do sêmen e análise da integridade acrossomal

No laboratório, os ejaculados permaneceram a 37°C por, no máximo 10 minutos, enquanto estimava-se a concentração espermática (hemocítômetro) na diluição 1/200 em solução de formol-salino tamponado 1% (Hancock, 1957). Em seguida, as amostras foram diluídas em solução de congelação a base de TRIS concentrado contendo: hidroximetilaminometano, 12,11g, ácido cítrico 6,8 g, frutose 2,5 g, lactose 2,5 g, gamicina (1:10.000), glicerol (33,0 ml) e água bi-destilada, (68 ml, pH corrigido para 6.8). Essa solução permanecia estocada a -20°C. Previamente a colheita dos ejaculados, a solução de TRIS concentrado era descongelada e adicionava-se água bi-destilada (30 ml) e gema de ovo (10 ml), segundo Simmet (1972). O volume de diluente foi adicionado em função do volume seminal e concentração espermática, de modo que as doses tivessem  $50 \times 10^6$  espermatozoides por palheta (0,5 mL). Após a diluição, as amostras foram mantidas por, no mínimo, 4 h em câmara fria (4 °C) e posteriormente, envasadas em palhetas de 0,5 mL, seladas e identificadas pelo número do touro, data do congelamento e período experimental. Após o envasamento, as amostras foram mantidas em vapor de nitrogênio por 15 minutos e, imediatamente, mergulhadas no nitrogênio líquido onde permaneceram estocadas. A descongelação foi feita a 37°C por 40 segundos.

A análise das características seminais pós-descongelamento e pós-gradiente de Percoll foi semelhante à do sêmen fresco, com exceção da concentração espermática, ou seja, avaliou-se a motilidade, vigor, morfologia, fragmentação nuclear e, incluiu-se ainda, a análise da integridade acrossomal. Esta característica foi estimada de acordo com Feliciano Silva (1998). Vinte microlitros de sêmen foram misturados em 20 µL de *tryplan blue* (0,25% em NaCl a 0,81% e pH 6,9 a 7,2) em microtubos e incubados por 15 minutos a 37°C. Após, as amostras eram estendidas em lâmina, secas em temperatura ambiente por 10 minutos e fixadas em metanol por 15 minutos. Em seguida, após retirar e secar em temperatura ambiente, as lâminas foram mergulhadas em solução corante de *giemsa*, que era filtrada e preparada diariamente (10 a 15 gotas/mL de tampão fosfato) durante 12 a 20 horas. Após, as lâminas foram retiradas

da solução corante, lavadas em água destilada e secas em temperatura ambiente. As avaliações foram feitas em microscópio de campo claro, sob imersão, onde foram contados 200 espermatozóides para os percentuais de: a) células vivas com acrossomo íntegro, b) células vivas com reação acrossomal, c) células mortas com acrossomo íntegro e d) células mortas reação acrossomal. A avaliação da integridade acrossomal foi realizada nas amostras após o descongelamento e após passagem em gradiente de Percoll. Para fins de análise utilizou-se os percentuais de célula vivas e com acrossomo íntegro. A figura 3 exemplifica três categorias de espermatozóides classificados pelo método do *tryplan blue-giensa*.

Após a descongelação, o sêmen foi depositado sobre gradiente de Percoll consistindo de 2 mL de Percoll 45 e 2 mL de Percoll 90%, previamente preparado e incubado a 39 °C à 5% de CO<sub>2</sub> em ar por, no mínimo 1h (Parrish et al., 1995). Em seguida, os frascos foram centrifugados a 700 g por 20 minutos a 30 °C. Após, retirava-se o sobrenadante permanecendo apenas o *pellet* que era ressuspendido com 2 mL de TALP-sp e centrifugado a 700 g por 5 minutos a 30°C, sendo então ressuspendido com meio de fecundação. Neste momento, uma amostra de sêmen diluído em solução de fecundação era retirada para avaliação das características seminais pós-gradiente de Percoll, sendo que o restante era usado para fertilização *in vitro*.

#### 4.4.2. Análise estatística

As análises deste experimento basearam-se em três repetições (palhetas) por touro e período, antes e após passagem pelo gradiente de Percoll. Conforme os procedimentos descritos no experimento 1, as variáveis seminais que não apresentaram homogeneidade e heterogeneidade da variância (teste de Cochran e teste de Bartlett) foram transformadas (ASEN[RAIZ(variável/100)]), conforme Ribeiro Jr (2001) e Sampaio (1998).

A análise consistiu na estimativa do efeito do período (P0, P7, P14 e P21 dias) da seleção espermática por gradiente de Percoll (antes e após seleção) e interação entre ambos, sobre as características seminais. Devido a baixa prevalência de defeitos

morfológicos dentro de cada categoria estabelecida, esta análise considerou apenas o total de defeitos em cada uma delas, ou seja, defeitos de cabeça, peça intermediária, gota citoplasmática proximal, cauda, cabeça isolada normal, fragmentação nuclear e integridade acrossomal. Para isso, empregou-se um modelo inteiramente casualizado, com teste de Duncan ( $p < 0,05$ ) para comparação de médias, como segue:

$$Y_{ijk} = m + P_i + S_j + (PS)_{ij} + e_{ij}$$

Onde:

$Y_{ijk}$  = observação referente ao nível  $i$  do período ( $i=1,2,..P$ ) no nível  $j$  da seleção ( $j=1,2, S$ ) na repetição  $k$  ( $k=1, 2, \dots r$ );

$m$  = constante inerente a todas observações;

$P_i$  = efeito principal do nível do período para  $i$  repetições;

$S_j$  = efeito principal do nível da seleção espermática pelo gradiente de Percoll para  $j$  repetições;

$(PS)_{ij}$  = efeito da interação do nível  $i$  do período com o nível  $j$  da seleção espermática pelo gradiente de Percoll para  $ij$  repetições.

$e_{ij}$  = erro experimental associado à observação  $Y_{ij}$ .

#### **4.5. Experimento 3: Avaliação da fecundação *in vitro* e associação com características seminais antes e após indução da degeneração testicular por insulação**

Após passagem pelo gradiente de Percoll, as amostras foram submetidas à fertilização *in vitro*. Assim, o objetivo deste experimento foi de comparar os percentuais de clivados e blastocistos obtidos para cada touro nos respectivos períodos experimentais e estimar a associação entre esses índices com as características seminais.

#### 4.5.1. Colheita e maturação de ovócitos *in vitro*

Ovários de vacas mestiças foram colhidos em abatedouro na região de Brasília, DF (15°30'-16°03'S e 47°25'- 48°12'O) no mês de agosto de 2003. Logo após o abate os ovários foram acondicionados em frasco com solução salina 0,9 % suplementada com estreptomicina (50 µg/mL) e penicilina (100 UI/mL) a 36°C. No laboratório, os complexos *cumullus oophorus* (CCO) foram aspirados de folículos de 2 a 8 mm com auxílio de um escalpe (18 G), acoplado em um tubo cônico de 15 mL, ligados em um sistema de vácuo com pressão regulada para 15-20 mL de solução/minuto. Após a sedimentação, o *pellet* foi retirado e colocado em uma placa de 100 x 20 mm contendo meio de bancada (TCM 199 sais de Hank's) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB), penicilina (100 UI/mL) e estreptomicina (50 µg/mL). Os CCO foram procurados com auxílio de um estériomicroscópio. Apenas os que apresentavam citoplasma homogêneo com três ou mais camadas de células do *cumullus* foram selecionados. Entre o início da aspiração e o início da maturação estabeleceu-se um tempo máximo de 50 minutos.

Para a maturação ovocitária, os CCO selecionados foram lavados e transferidos para uma placa contendo 2 mL de meio de maturação cobertos com 2 mL de óleo de parafina e incubados por 22 horas a 39°C a 5% de CO<sub>2</sub> em ar. O meio de maturação consistia de TCM 199 sais de Earl's suplementado com 10% de SFB, 24 UI/mL de hormônio luteinizante (LH), 10 µg/mL de hormônio folículo estimulante (FSH), 1 µg/mL de L-glutamina, 100 UI/mL de penicilina e 50 µg/mL de estreptomicina.

#### 4.5.2. Fecundação *in vitro* e cultivo embrionário

Após a maturação, os ovócitos foram separados em grupos de 25 a 30, lavados e transferidos para gotas de 200 µl contendo meio de fecundação (TALP), conforme Parrish et al., (1995), suplementados com 2 mM de penicilina, 1 mM de hipotaurina, 250 mM de epinefrina e 10 µg/mL de heparina. O sêmen descongelado foi submetido a passagem por gradiente de Percoll conforme procedimentos descritos no

experimento 2. Após a análise das características seminais pós-gradiente de Percoll, estimava-se a concentração espermática de forma que cada gota fertilizante recebesse  $1 \times 10^6$  de espermatozóides por gota de fecundação. Ovócitos e espermatozóides foram co-incubados por 22 horas em estufa a 39°C a 5% de CO<sub>2</sub> em ar, sendo o dia da fecundação considerado o dia 0 (D0). Após a co-incubação, os possíveis zigotos foram retirados da gota de fecundação, lavados em meio de cultivo (SOFaaci) e distribuídos nas placas de cultivo.

Para o cultivo *in vitro* foi utilizado o meio fluido sintético do oviduto (SOF) conforme Holm et al. (1999), suplementado com aminoácidos essenciais e não essenciais (0,34 mM de sodium tri citrato, 2,77 mM myo-inositol e 5 % de SFB – SOFaaci). As placas de cultivo foram preparadas no dia anterior de sua utilização. Para fins de análise, os embriões foram avaliados em D2 (dois dias), para as frequências de clivagem (presença de divisão celular), e em D7 (dia 7) para as de blastocistos (estruturas viáveis do tipo inicial, expandido e eclodido), considerando o dia 0 como o dia da fecundação.

#### 4.5.3. Análise estatística

Nesta análise considerou-se três repetições por touro em cada período experimental (90 a 105 ovócitos/touro/período). As frequências de clivagem e blastocistos foram comparadas entre períodos e entre touros através do método do Qui-quadrado ( $\chi^2$ ) corrigido para o teste de Yates, segundo Beiguelman (1996), com base no total de ovócitos. As características seminais foram correlacionadas pelo método de Pearson, ( $p < 0,05$ ) com as frequências de clivagem e blastocistos. Essa análise foi usada para uma prévia seleção das características a serem incluídas no modelo de regressão múltipla seqüencial (*stepwise*) para explicar a variação nas frequências de clivagem e blastocistos, segundo Ribeiro Jr. (2001). As que apresentaram correlação significativa, foram analisadas entre períodos experimentais (efeito de período, P0, P7, P14 e P21) em cada touro, pela análise de variância, modelo completamente ao acaso ( $p < 0,05$ ). Para todas as análises dos experimentos, utilizou-se os pacotes estatísticos SAEG 10.0 (Ribeiro Jr, 2000) e Statistix, 4.0 (Siegel, 1992).

## 5. Resultados

### 5.1 Experimento 1: características seminais e perfil eletroforético do plasma seminal e espermatozóides antes e após indução da degeneração testicular por insulação

#### 5.1.1 Características seminais

Na tabela 1 está descrito o efeito dos períodos experimentais antes (P0) e após (P7, P14 e P21 dias) a retirada do insulto testicular sobre diferentes características seminais. A concentração espermática foi semelhante no P0 e P21, não apresentando um padrão comumente esperado. Os percentuais observados para motilidade e espermatozóides morfológicamente normais foram inferiores ( $p < 0,05$ ) a partir do P14.

Para os defeitos morfológicos, o efeito dos períodos experimentais foi mais marcante a partir do período 14 e 21. Dos defeitos considerados, os de cabeça e fragmentação nuclear apresentaram a maior magnitude, seguidos pelos defeitos de acrossomo. Nesta análise destacam-se os percentuais encontrados para os defeitos de fragmentação nuclear para o período 14 ( $33,2 \pm 3,42$ ) e 21 ( $28,8 \pm 3,63$ ) que contrastam com os defeitos de cabeça ( $9,5 \pm 0,90$  e  $17,4 \pm 2,31$ ) para os respectivos períodos. Além disso, os defeitos de cauda são superiores apenas no período 14 ( $16,0 \pm 2,48$ ) e não há efeito dos períodos sobre os percentuais de cabeça isolada normal.

Na figura 2 estão representados os padrões que foram considerados para a determinação da fragmentação nuclear mediante coloração pelo método de *Fuelgen*. As alterações nucleares variaram desde a presença de crateras na região central ou na região equatorial da cabeça espermática (a), presença de vesículas nucleares do tipo *pouch* (b) até fragmentação completa do núcleo espermático mais proeminente na região pré-equatorial (c) ou em toda a cabeça espermática (b). Em seguida, na figura 3, estão demonstradas as alterações mais freqüentes na cabeça espermática que serviram de base para determinação deste defeito.

**Tabela 1:** Médias ajustadas ( $\pm$ erro padrão) para o efeito dos períodos antes (P0) e após (P7, P14 e P21 dias) indução da degeneração testicular por insulação em touros da raça Nelore.

Característica seminal	Períodos experimentais			
	P0	P7	P14	P21
Concentração ( $\times 10^6$ /ml)	497,8 $\pm$ 69,8 <sup>a</sup>	710,4 $\pm$ 5,5 <sup>ab</sup>	1.068,5 $\pm$ 48,5 <sup>b</sup>	502,9 $\pm$ 77,4 <sup>a</sup>
Motilidade (%)	77,5 $\pm$ 4,02 <sup>a</sup>	75,0 $\pm$ 3,31 <sup>a</sup>	50,0 $\pm$ 3,91 <sup>b</sup>	51,0 $\pm$ 3,43 <sup>b</sup>
Vigor (0-5)	4,5 $\pm$ 0,28 <sup>a</sup>	3,5 $\pm$ 0,06 <sup>b</sup>	2,9 $\pm$ 0,17 <sup>bc</sup>	3,2 $\pm$ 0,10 <sup>c</sup>
Morfologia (%)				
Normais	79,7 $\pm$ 4,74 <sup>a</sup>	74,9 $\pm$ 3,08 <sup>a</sup>	37,5 $\pm$ 3,37 <sup>b</sup>	25,4 $\pm$ 6,47 <sup>c</sup>
Fragmentação nuclear <sup>1</sup>	6,2 $\pm$ 3,47 <sup>a</sup>	5,8 $\pm$ 3,40 <sup>a</sup>	33,2 $\pm$ 3,42 <sup>b</sup>	28,8 $\pm$ 3,63 <sup>b</sup>
Def. de cabeça	5,0 $\pm$ 1,23 <sup>a</sup>	5,7 $\pm$ 1,09 <sup>a</sup>	9,5 $\pm$ 0,90 <sup>b</sup>	17,4 $\pm$ 2,31 <sup>c</sup>
Def. de acrossomo	3,0 $\pm$ 0,29 <sup>a</sup>	3,2 $\pm$ 0,23 <sup>a</sup>	1,5 $\pm$ 0,73 <sup>b</sup>	8,4 $\pm$ 1,25 <sup>c</sup>
Def. de peça intermediária	0,1 $\pm$ 0,21 <sup>a</sup>	0,3 $\pm$ 0,25 <sup>a</sup>	0,2 $\pm$ 0,19 <sup>a</sup>	3,0 $\pm$ 0,65 <sup>b</sup>
Gota citoplasmática proximal	0,1 $\pm$ 0,21 <sup>a</sup>	0,3 $\pm$ 0,25 <sup>a</sup>	0,2 $\pm$ 0,19 <sup>a</sup>	3,0 $\pm$ 0,65 <sup>b</sup>
Cabeça isolada normal	3,0 $\pm$ 0,59 <sup>a</sup>	6,3 $\pm$ 0,34 <sup>a</sup>	2,5 $\pm$ 0,71 <sup>a</sup>	8,6 $\pm$ 1,02 <sup>a</sup>
Def. de cauda	2,9 $\pm$ 1,10 <sup>a</sup>	3,5 $\pm$ 0,95 <sup>a</sup>	15,4 $\pm$ 2,48 <sup>b</sup>	5,4 $\pm$ 0,41 <sup>a</sup>

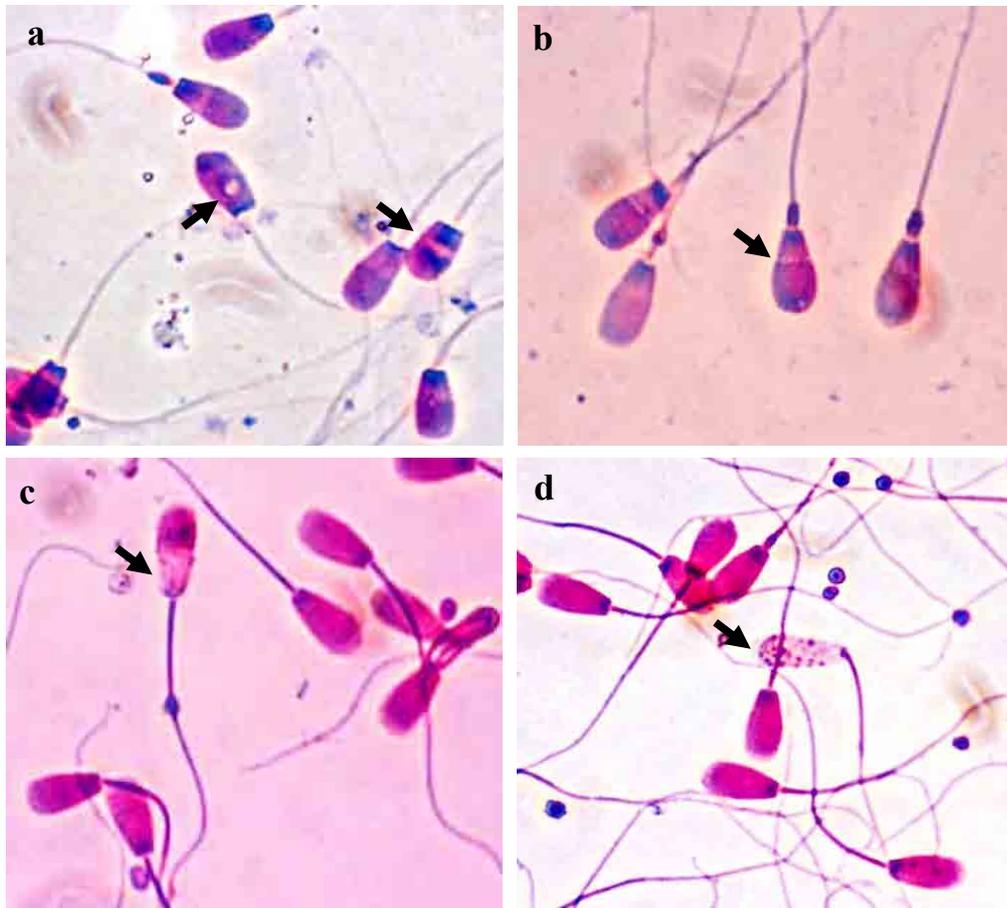
<sup>abc</sup> letras distintas entre colunas representam diferença significativa ( $p < 0,05$ ); <sup>1</sup>, estimado pelo método de *Fuelgen*.

### 5.1.2 Perfil eletroforético seminal

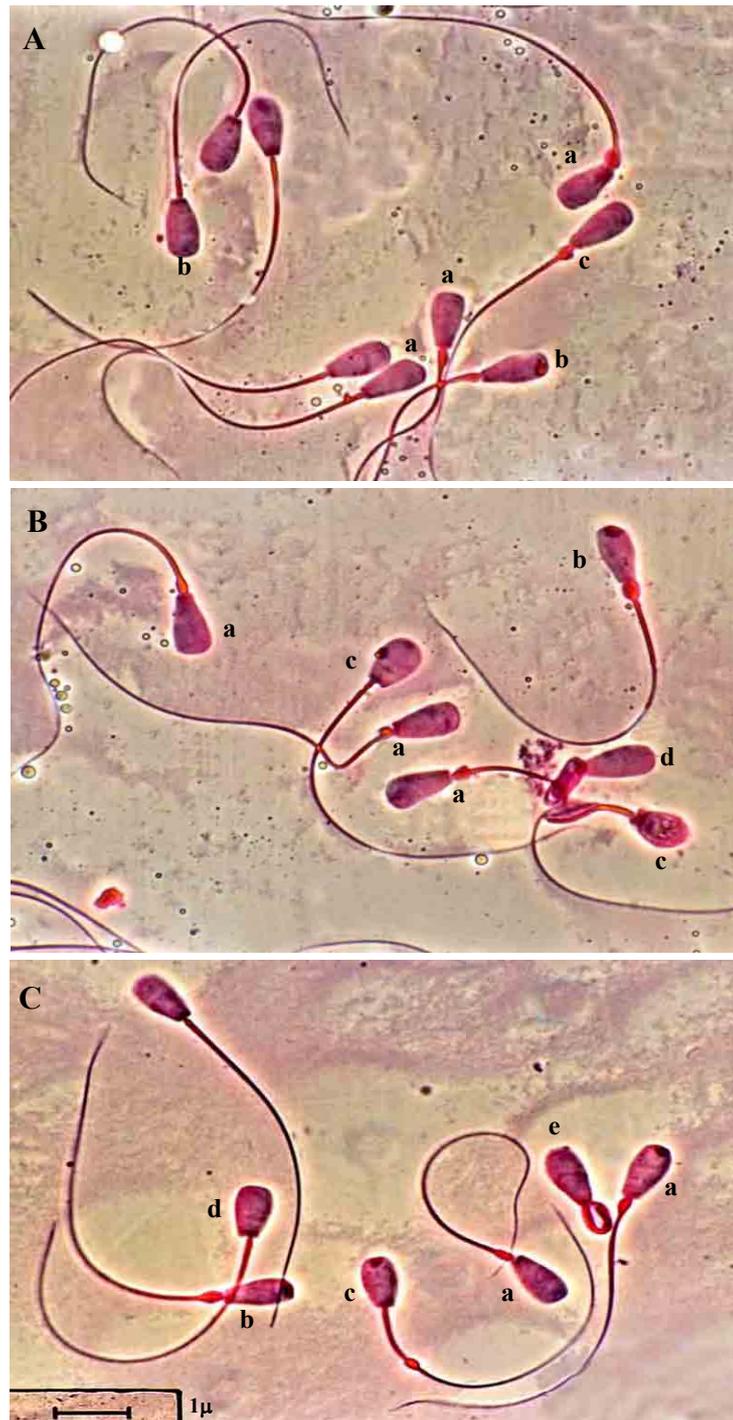
A metodologia adotada para análise do perfil eletroforético seminal permitiu a determinação e comparação entre indivíduos e entre períodos experimentais. Os métodos de agrupamento, resultantes desta análise, oferecem algumas vantagens, destacando a não exigência de pressuposição inicial quanto a distribuição de probabilidades dos dados e ser de fácil interpretação (Everitt, 1974). Os subsídios gerados pela estimativa dos coeficientes de similaridade, baseiam-se no intervalo de ocorrência de cada banda protéica observada na leitura digital, o que permite observações de caráter qualitativo e quantitativo.

O total de bandas protéicas observadas de acordo com o período e touro para o plasma seminal e espermatozóides está descrito na tabela 2, respectivamente. No plasma seminal, foram identificadas diferenças no número de bandas entre os reprodutores 27 e 32, sendo as mais relevantes no período 7, em que foram observadas 21 e 32 bandas. Enquanto que, no período 21, o reprodutor 32 apresentou o maior número de bandas ( $n=30$ ) em relação aos demais. Nos espermatozóides, o período 21

foi o mais marcante em relação à variação no número de bandas protéicas entre touros. O touro 32 apresentou o menor número ( $n=21$ ).



**Figura 2.** Representação de diferentes padrões de fragmentação nuclear observado no sêmen à fresco de touros Nelore submetidos à degeneração testicular por insulação, corados pelo método de *Feulgen*. As setas indicam: a, presença de crateras nucleares; b, presença de vacúolos nucleares (*pouch*); c e d, fragmentação total da cromatina nuclear. Microscopia de contraste de fase (1000x).



**Figura 3.** Representação de diferentes tipos de defeitos morfológicos no sêmen de touros Nelore submetidos à degeneração testicular por insulação. A, defeitos de cabeça do tipo contorno anormal (a), cratera na região apical (b) e estreito na base (c). B, estreito na base com defeito de peça intermediária (a), contorno anormal com grânulo apical e gota citoplasmática proximal (b), forma anormal (c), delgado com *dag defect* (d). C, acrossomo com grânulo apical (a), contorno anormal com grânulo apical (b), forma anormal com grânulo (c) e sem grânulo apical (d), estreito na base com *dag defect* (e). Microscopia de contraste de fase (1000x).

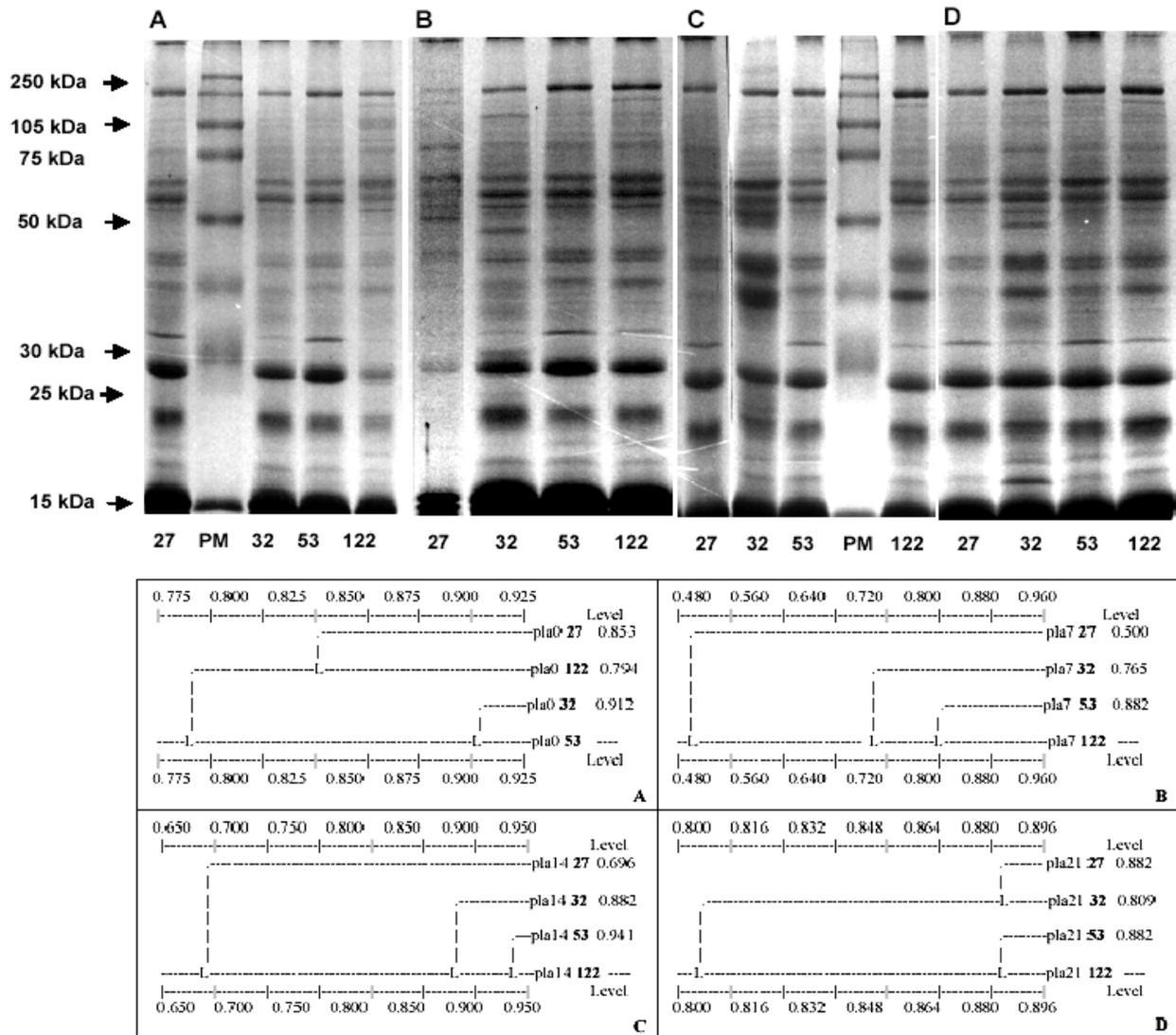
**Tabela 2:** Total de bandas protéicas analisadas em densitometria ótica para composição do perfil eletroforético (SDS-PAGE 12,5%) unidimensional para o plasma seminal e espermatozóides, por touro e em nos períodos experimentais antes (P0) e após (P7, P14 e P21) à indução da degeneração testicular por insulação.

	Touro	Períodos experimentais			
		P0	P7	P14	P21
Plasma seminal	27	29	21	24	25
	32	26	32	25	30
	53	25	25	27	27
	122	28	26	27	26
Espermatozóides	27	29	27	27	27
	32	27	28	28	21
	53	25	27	29	25
	122	28	28	31	27

Os resultados dos perfis eletroforéticos decorrentes das matrizes de similaridade entre touros e dentro de cada período expressos em dendrogramas estão descritos na figura 4, para o plasma seminal, e figura 5, para os espermatozóides. Na figura 6, ambos os perfis são comparados destacando-se os coeficientes de similaridade entre períodos experimentais (P0, P7, P14 e P21).

As proteínas e ou polipeptídeos do plasma seminal, de pesos moleculares entre 10 a 35 kDa, foram identificadas em todos os períodos, P0, P7, P14 e P21 e em todos os reprodutores (figura 4). Enquanto que, proteínas de 50 kDa, se manifestaram apenas nos reprodutores 27 e 32 e nos períodos P7 e P21 após o insulto da insulação. Os reprodutores 53 e 122 apresentaram no plasma seminal e nos períodos P0, P7 e P21, proteínas de peso molecular de 85 kDa. Essa proteína também foi identificada no reprodutor 27, porém somente nos períodos P0 e P14. Nos reprodutores 27 e 122 foi identificada proteína de peso molecular 105 kDa no P0, não ocorrendo, porém, nos períodos após a insulação. A proteína de peso molecular 150 kDa foi encontrada no plasma seminal do reprodutor 122 em todos os períodos, no entanto, nos reprodutores 32 e 53 essa proteína apareceu somente no P21 após o término da insulação. No plasma seminal os coeficientes de similaridade entre períodos variaram entre 0,88 a 0,94, porém, entre indivíduos, a variação dos coeficientes foi mais marcante. O touro 27, apresentou o menor grau de similaridade em relação aos demais no período 7 e 14

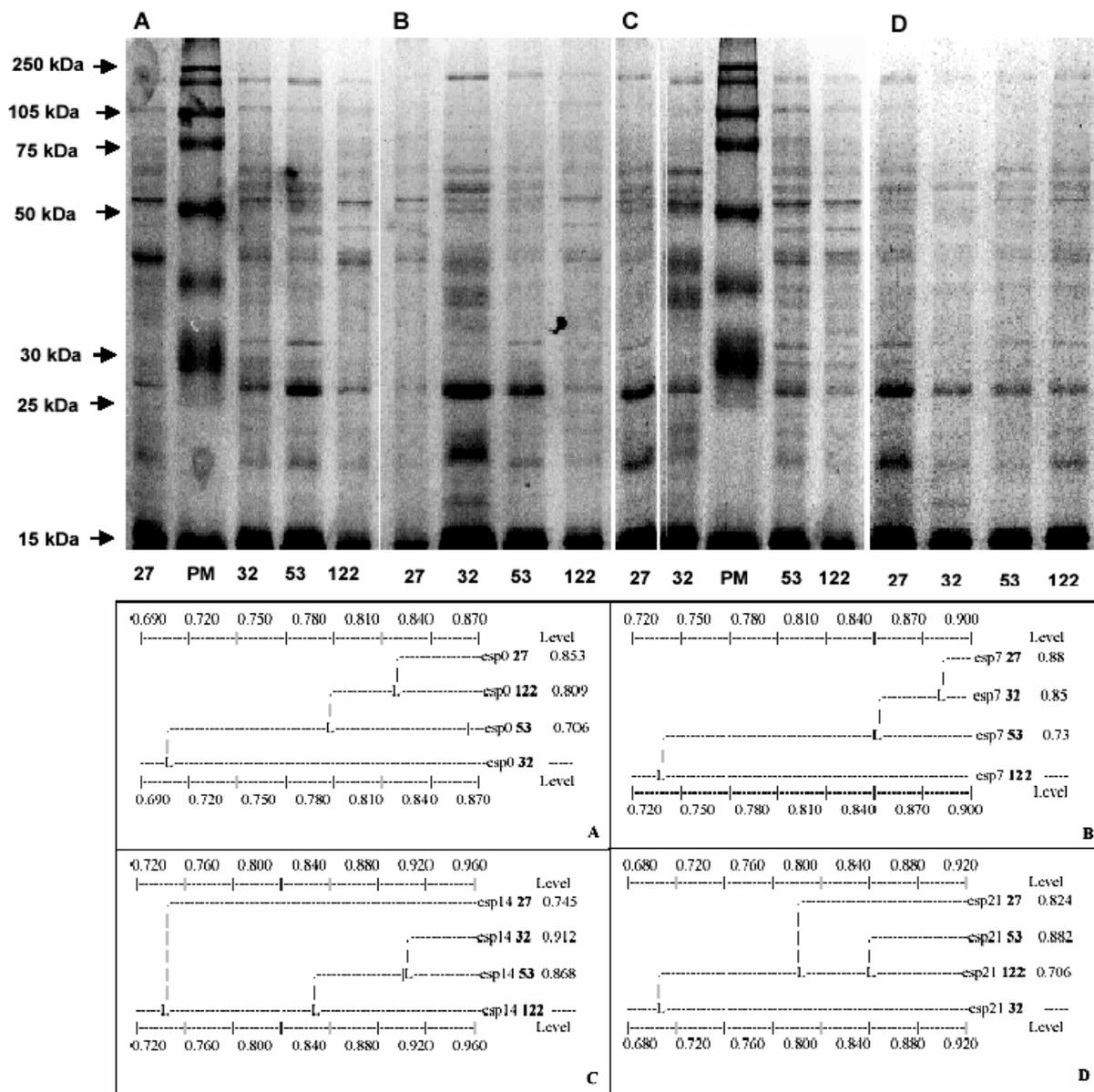
(figura 4, B e C, respectivamente). No período 21 (figura 4, D) observou-se a formação de duas classes distintas de agrupamento. Os touros 27 e 32 formaram uma classe e os demais, 53 e 122, outra. Ambas com coeficientes de similaridade de 0,88.



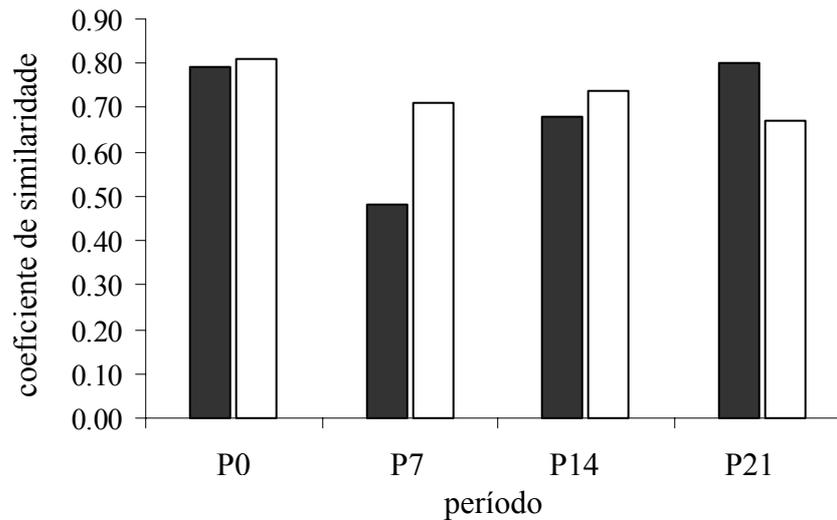
**Figura 4:** Eletroforése em poliacrilamida (SDS-PAGE) a 12,5 % de concentração no gel de separação, em sistema descontínuo alcalino de proteínas do plasma seminal e dendrogramas resultantes da análise de similaridade (UPGMA, SAHN *clustering*) em touros da raça Nelore, submetidos a degeneração testicular por insulação, antes (A) e após 7 (B), 14 (C) e 21 dias (D). PM, peso molecular (kilodalttons). Números em baixo das corridas referem-se à identificação dos touros.

Nos espermatozóides (figura 5) foi observado, em todos os reprodutores, o desaparecimento de proteínas após a insulação, variando, porém, quanto aos pesos moleculares e períodos experimentais. No reprodutor 27 houve aparente

desaparecimento das proteínas de pesos moleculares entre 25 a 60 kDa no P7, enquanto nos reprodutores 32, 53 e 122 o desaparecimento ocorreu no P21. Foi identificado ainda, proteínas de pesos moleculares acima de 35 kDa, principalmente nos períodos P14 e P21, que não ocorreram no período controle, isto é, antes do processo de insulação. O aparecimento destas novas proteínas foi observado em todos os animais.



**Figura 5:** Eletroforese em poliacrilamida (SDS-PAGE) à 12,5 % de concentração no gel de separação, em sistema descontínuo alcalino de proteínas dos espermatozoides e dendrogramas resultantes da análise de similaridade (UPGMA, SAHN *clustering*) em touros da raça Nelore, submetidos à degeneração testicular por insulação, antes (A) e após 7 (B), 14 (C) e 21 dias (D). PM, peso molecular (kilodaltons). Números em baixo das corridas referem-se a identificação dos touros.



**Figura 6.** Coeficientes de similaridade do perfil eletroforético do plasma seminal (■) e espermatozoides (□) entre touros Nelore antes (P0) e após (P7, P14 e P21 dias) a indução da degeneração testicular por insulação.

A análise da correlação entre coeficientes de similaridade e características seminais está descrita na tabela 3. Essa análise revelou que grande parte das características seminais acompanhou a variação dos coeficientes de similaridade tanto para o plasma seminal quanto para os espermatozoides. Das correlações encontradas, espermatozoides normais, com defeitos de cabeça, e de fragmentação nuclear foram os que apresentaram maior correlação. Os defeitos de cauda e cabeça isolada normal não se correlacionaram com coeficientes de similaridade.

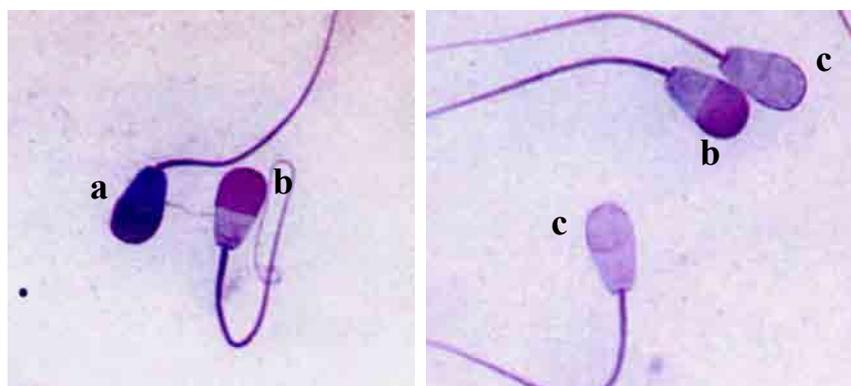
## **5.2. Experimento 2: efeito da seleção espermática por gradiente de Percoll sobre as características seminais antes e após indução da degeneração testicular por insulação**

Neste experimento verificou-se os efeitos principais e interação entre períodos experimentais (P0, P7, P14 e P21) e seleção por gradiente de Percoll (antes e depois) sobre as características seminais. Na figura 7 estão representadas três categorias de espermatozoides mais comumente encontrados pelo método de *trypan blue giemsa*. Os espermatozoides indicados pela letra b representam aqueles com integridade acrossomal

**Tabela 3.** Correlação parcial<sup>1</sup> entre coeficientes de similaridade<sup>2</sup> do plasma seminal e espermatozóides com características seminais em touros da raça Nelore submetidos à degeneração testicular por insulação.

Característica seminal	Plasma seminal	Espermatozóides
Concentração (x10 <sup>6</sup> /ml)	ns	ns
Motilidade (%)	ns	ns
Vigor (0-5)	0,25*	0,26*
Morfologia (%)		
Normais (%)	0,78**	0,73**
Defeito de cabeça	-0,55**	-0,52**
Fragmentação nuclear <sup>a</sup>	-0,58**	-0,53**
Defeitos de acrossomo	-0,48**	-0,39**
Defeitos de peça intermediária	-0,35**	-0,25*
Gota citoplasmática proximal	-0,43**	-0,27**
Defeitos de cauda	ns	ns
Cabeça isolada normal	ns	ns

<sup>1</sup>análise ajustada pelo número total de bandas por amostra; <sup>2</sup>análise pelo método *UPGMA*, *SAHN clustering*; ns = não significativo; \*p<0,05; \*\*p<0,01; <sup>a</sup>estimado pelo método de *Fuelgen*.

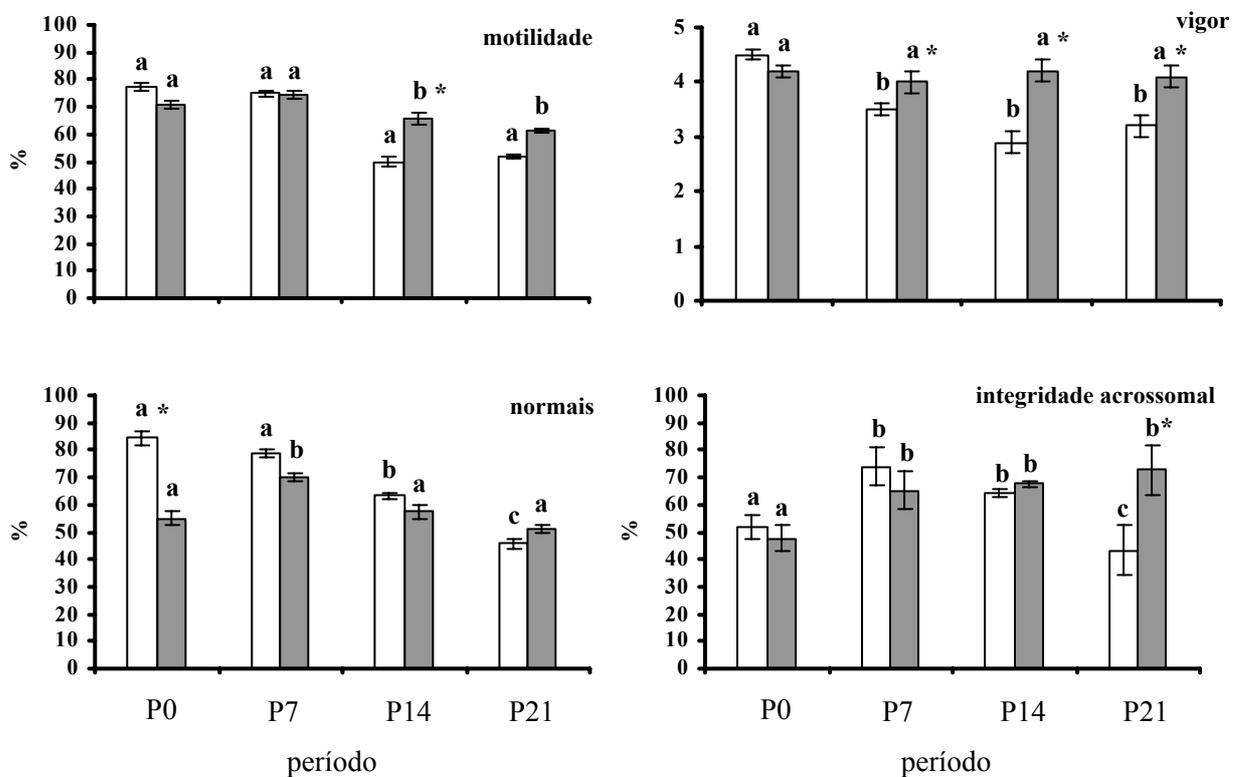


**Figura 7.** Espermatozóides corados pelo método *trypan blue giemsa* após descongelação para avaliação da integridade acrossomal; a, morto com acrossomo íntegro; b, vivo com acrossomo íntegro e c, vivo com reação acrossomal. Microscopia de campo claro (1000x).

Na figura 8, estão descritos os resultados para motilidade, vigor, espermatozóides morfologicamente normais e integridade acrossomal pós-descongelamento e pós-seleção por gradiente de Percoll. A motilidade foi inferior

( $p < 0,05$ ) no P14 e P21 somente nas amostras pós-gradiente de Percoll. Para o vigor, houve interação ( $p < 0,05$ ) entre períodos (P7, P14 e P21) e gradiente de Percoll.

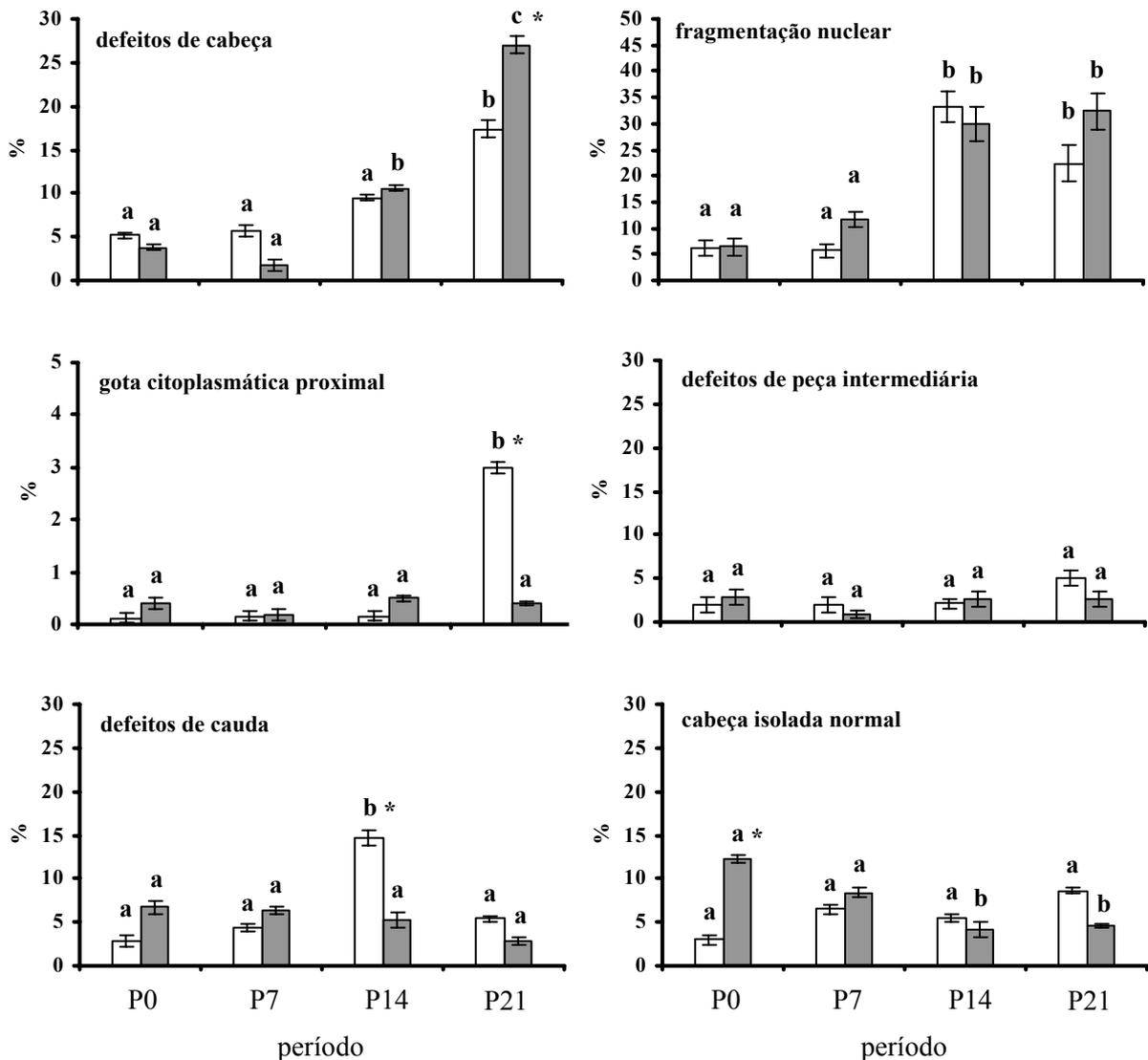
O efeito dos períodos experimentais foi significativo ( $p < 0,05$ ) sobre os espermatozoides morfologicamente normais, especialmente no P14 e P21, porém, pós-gradiente, houve efeito apenas no P7. A integridade acrossomal foi superior ( $p < 0,05$ ) no P7 e P14 mas inferior no P21, pré-gradiente. Nos períodos P7, P14 e P21 os percentuais foram superiores ( $p < 0,05$ ) pós-gradiente.



**Figura 8:** Efeito principal e interação entre períodos, antes (P0) e após retirada do insulto testicular (P7, P14, P21 dias) e seleção espermática em gradiente de Percoll (pré = □ e pós = ■) sobre a motilidade, vigor, espermatozoides normais e integridade acrossomal no sêmen de touros da raça Nelore, submetidos a degeneração testicular por insulação. Letras distintas entre colunas representam efeito ( $p < 0,05$ ) de período; \* representa o efeito da seleção espermática pelo gradiente de Percoll dentro do período.  $\pm$  erro padrão da média

Os defeitos morfológicos de acordo com os períodos experimentais e seleção por gradiente de Percoll estão descritos na figura 9. Defeitos de cabeça e fragmentação nuclear mostram a mesma tendência, ou seja, foram superiores ( $p < 0,05$ ) nos períodos 14 e 21 pré e pós-gradiente. O efeito do gradiente foi significativo

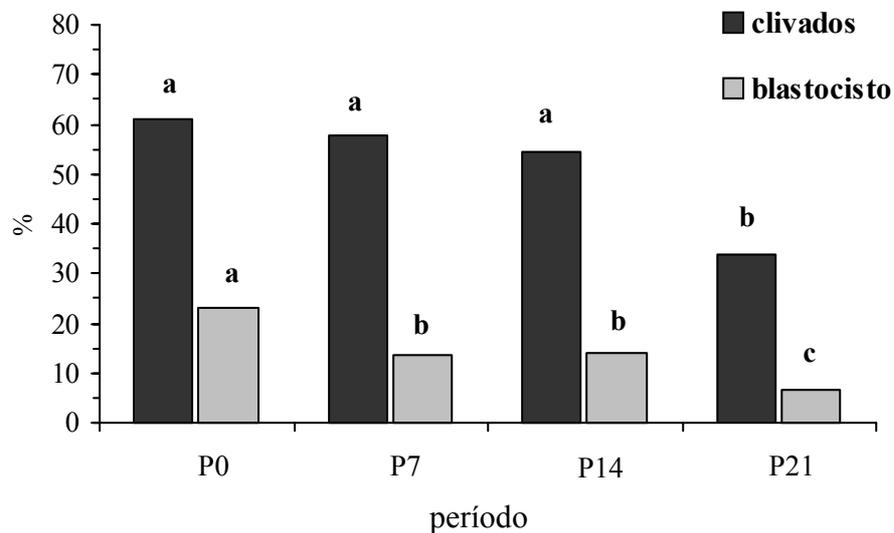
( $p < 0,05$ ) para o percentual de defeitos de cabeça apenas no período 21. Dos demais defeitos, houve destaque para os percentuais de gota citoplasmática proximal que foram superiores ( $p < 0,05$ ) pré-gradiente no P21 e defeitos de cauda no P14. Os percentuais de cabeça isolada normal foram menores nos períodos P14 e P21 pós-gradiente.



**Figura 9:** Efeito principal e interação entre períodos, antes (P0) e após retirada do insulto testicular (P7, P14, P21 dias) e seleção espermática em gradiente de Percoll ( $\square$  = pré e  $\blacksquare$  = pós seleção) sobre diferentes defeitos morfológicos em touros da raça Nelore submetidos a degeneração testicular por insulação. Letras distintas entre colunas representa efeito ( $p < 0,05$ ) de período; \* representa efeito da seleção espermática pelo gradiente de Percoll dentro do período.  $\pm$  erro padrão da média.

### 5.3. Experimento 3: efeito dos períodos experimentais sobre a fertilidade *in vitro* e associação com características seminais de touros submetidos à degeneração testicular por insulação

As freqüências de clivados e de blastocistos após fertilização *in vitro* estão descritas na figura 10 e 11. A análise considerando todos os touros (figura 10) revelou que a freqüência de clivados foi semelhante para P0, P7 e P14 e variou ( $p < 0,05$ ) apenas no P21. Entretanto, observou-se diminuição ( $p < 0,05$ ) nas freqüências de blastocistos no P7, P14 em relação a P0 e P21 em relação a P7 e P14.



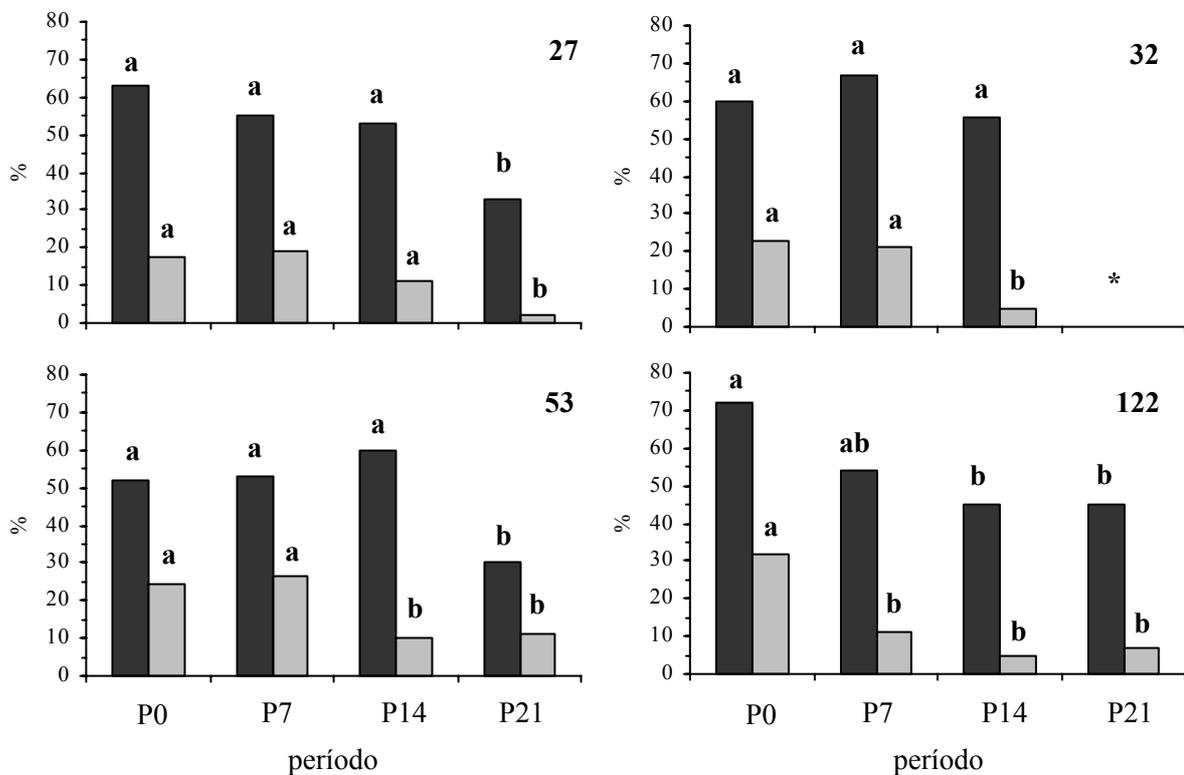
**Figura 10:** Percentuais de clivados e blastocistos com sêmen congelado nos períodos experimentais antes (P0) e após (P7, P14 e P21 dias) à retirada da insulação testicular de touros da raça Nelore. Letras distintas entre colunas representam diferença significativa ( $\chi^2$ ,  $p < 0,05$ ).

Devido a baixa qualidade seminal (< 10% de motilidade e vigor 1) após a colheita, não foi possível a congelação e a inclusão das amostras do touro 32 no período 21. Para os demais, os perfis para ambas freqüências foram distintos (figura 11). As freqüências de clivados foram inferiores ( $p < 0,05$ ), apenas no período 21 (P21), para os touros 27 e 53. No entanto, o touro 122 não sofreu efeito dos períodos experimentais. As freqüências de embriões blastocistos foram inferiores ( $p < 0,05$ ) nos períodos 14 (P14) e 21 (P21), para touros 27 e 122, em relação ao período 0, porém,

não para o touro 53, cujas frequências foram semelhantes em todos os períodos experimentais.

A análise da correlação entre características seminais com a frequência de clivados e blastocistos está descrita na tabela 4. Das características estudadas, apenas a fragmentação nuclear, espermatozoides normais, defeitos de cabeça e integridade acrossomal correlacionaram-se significativamente com a fertilidade *in vitro*. O efeito dos períodos experimentais (P0, P7, P14 e P21) sobre essas variáveis, para cada touro, após seleção espermática por gradiente de Percoll, está descrito na figura 12.

Com base na análise da regressão múltipla sequencial (tabela 5), que considerou as características seminais, previamente selecionadas pela análise da correlação, apenas os percentuais de fragmentação nuclear explicaram a variação nos índices de clivados ( $R^2=0,16$ ,  $p<0,0319$ ) e de blastocistos ( $R^2=0,27$ ,  $p<0,0044$ ). As demais características seminais não foram significativas.



**Figura 11.** Frequências de embriões clivados (■) e blastocistos (□) de acordo com o período experimental por touro submetido à degeneração testicular antes (0), 7, 14 e 21 dias após a retirada do insulto. \*amostra não considerada. Letras distintas entre colunas representam diferença significativa ( $\chi^2$ ,  $p<0,05$ ).

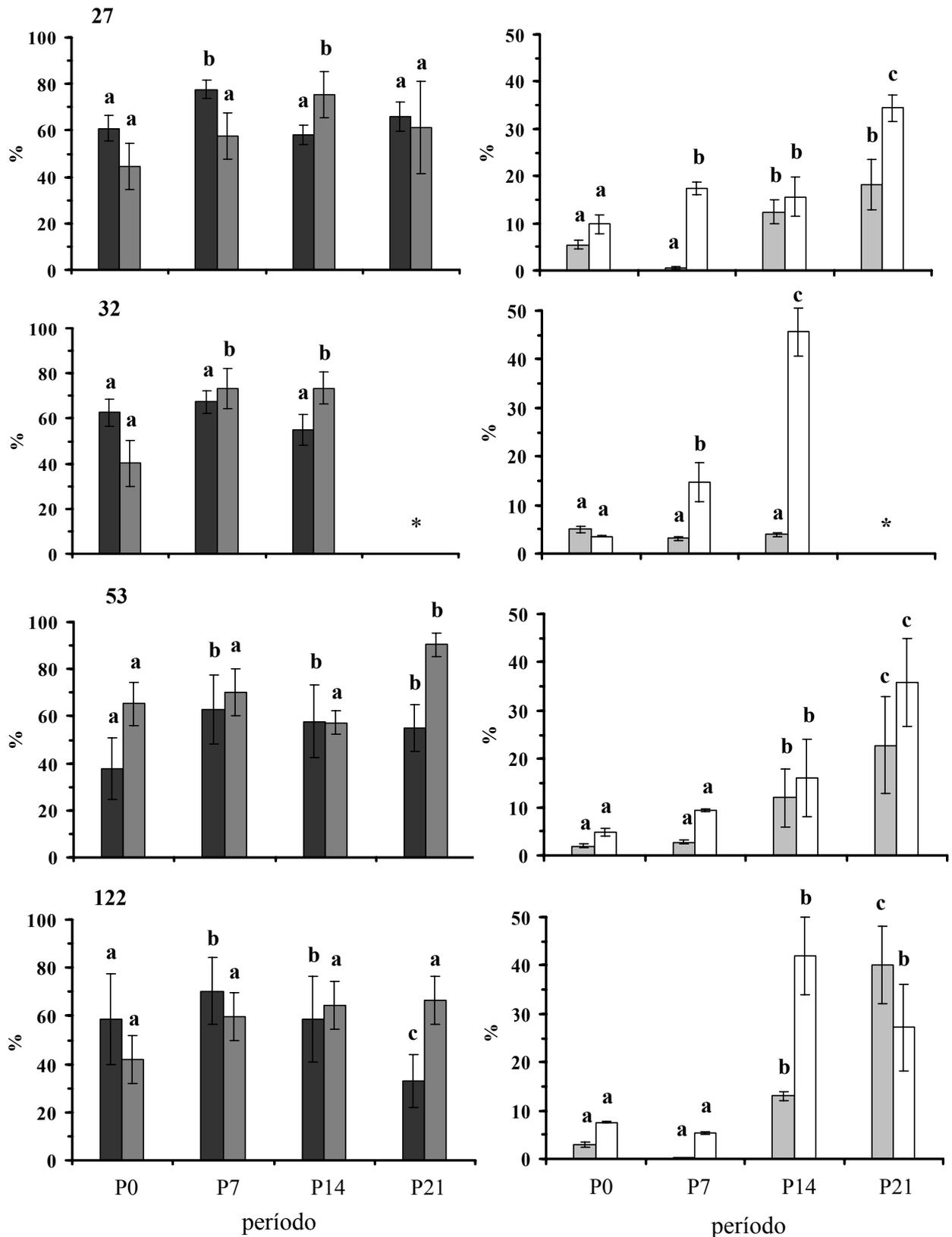
A relação entre as frequências de clivados e blastocistos em função dos percentuais de fragmentação nuclear, com base na análise de regressão múltipla seqüencial, está representada na figura 13. Para ambas variáveis dependentes, há notadamente um declínio na resposta, especialmente a partir da amostra 25 que passa a expressar o efeito dos períodos 14 e 21, caracterizados por aumento da fragmentação de núcleos espermáticos.

As frequências de estruturas clivadas contrastaram com as de blastocistos. Em todas as amostras obteve-se um índice de clivados mesmo quando os percentuais de fragmentação nuclear foram elevados. No entanto, para as frequências de blastocistos, os índices foram inferiores a 5% nas amostras 28 e 29 e foram nulos (0%) nas amostras 27, 35, 36, 37, 38, 41, 42 e 44, onde os percentuais de fragmentação nuclear atingiram valores acima de 15%.

**Tabela 4.** Coeficiente de correlação ( $r^*$ ) entre características seminais e frequências de clivados e blastocistos, obtidos por fertilização *in vitro* após seleção espermática por gradiente de *Percoll* em touros Nelore submetidos à degeneração testicular por insulação

Característica seminal	Clivados	Blastocisto
Motilidade (%)	ns	ns
Vigor (0-5)	ns	ns
Morfologia (%)		
Normais	ns	0,26
Fragmentação nuclear <sup>1</sup>	-0,38	-0,52
Defeitos de cabeça	-0,36	-0,27
Integridade acrossomal <sup>2</sup>	0,33	0,27
Defeitos de peça intermediária	ns	ns
Gota citoplasmática proximal	ns	ns
Cabeça isolada normal	ns	ns
Defeitos de cauda	ns	ns

\* Pearson,  $p < 0,05$ ; <sup>1</sup>estimada pelo método de *Fuelgen*; <sup>2</sup>estimada pelo método do *tryplan blue giemsa*.

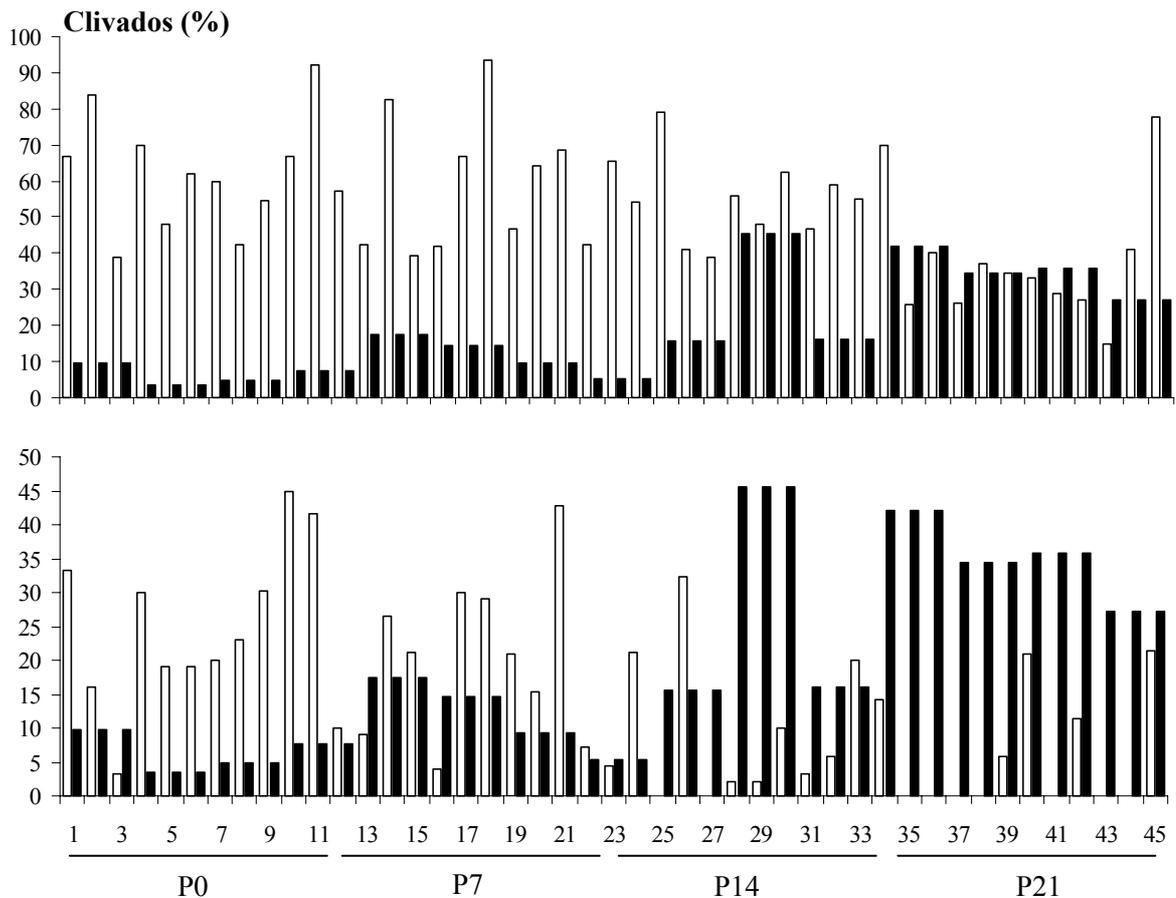


**Figura 12.** Efeito dos períodos experimentais, antes (P0) e após retirada do insulto testicular (P7, P14 e P21 dias) sobre espermatozoides normais (■), com integridade acrossomal (▒), defeitos de cabeça (◻) e fragmentação nuclear (□) obtidos após seleção espermática por gradiente de Percoll, em cada touro Nelore submetido a degeneração testicular por insulação. Letras distintas entre colunas representam diferença significativa ( $p < 0,05$ ). \* amostra não considerada.  $\pm$  erro padrão da média.

**Tabela 5.** Análise da regressão múltipla seqüencial\* entre características seminais e freqüências de clivados e blastocistos obtidos por fertilização *in vitro* após seleção espermática por gradiente de Percoll em touros da raça Nelore submetidos à degeneração testicular por insulação.

Freqüências	Característica seminal	Coefficiente	R <sup>2</sup>	Desvio	β	P
clivados	defeitos de cabeça	0,0546	0,13	0,0761	-0,1113	0,2386
	fragmentação nuclear	-0,1447	0,16	0,0760	-0,3334	0,0319
	integridade acrossomal	-0,0362	0,14	0,0762	-0,0854	0,3148
blastocistos	integridade acrossoma	0,0146	0,23	0,1542	-0,0149	0,4623
	normais	0,1066	0,29	0,0133	0,0120	0,2151
	defeitos de cabeça	-0,0111	0,30	0,0175	-0,0103	0,2644
	fragmentação nuclear	-0,0432	0,27	0,0157	-0,0455	0,0044

modelo geral: clivados, R<sup>2</sup>=0,20; blastocistos, R<sup>2</sup>=0,32. \*estimativa a partir das características seminais com correlação significativa (Pearson, p<0,05)



**Figura 13.** Freqüência de clivados e blastocistos (□) em função do percentual de fragmentação nuclear (■) estimado pelo método de *Fuelgen*, no sêmen de touros da raça Nelore, antes (P0), 7 (P7), 14 (P14) e 21 dias (P21) após indução da degeneração testicular por insulação.

## **6. Discussão**

No estudo proposto, observou-se a relação entre características do espermograma, perfil eletroforético seminal e fertilidade *in vitro* de touros submetidos à degeneração testicular por insulação. Embora a indução desse processo seja um método clássico para o estudo das variações do quadro seminal, suas relações com os demais aspectos abordados têm sido pouco investigadas. De modo geral, a resposta frente à degeneração por insulação testicular é bem conhecida quanto às características espermáticas e evolução das alterações morfológicas durante diferentes etapas da espermiogênese, o que suporta a hipótese de que este modelo pode ser usado para o estudo de alterações específicas e seus efeitos sobre a fertilidade (Vogler et al. 1993).

### **6.1. Características seminais e perfil eletroforético do plasma seminal e espermatozóides antes e após indução da degeneração testicular por insulação**

Os percentuais de defeitos morfológicos, decorrentes da insulação escrotal, foram semelhantes aos reportados para touros *Bos indicus* em outros experimentos (Fonseca & Chow, 1995; Brito et al., 2003a). Entretanto, o delineamento empregado em nosso estudo, favoreceu a obtenção de amostras em períodos distintos após indução da degeneração, concentrando defeitos específicos, reconhecidamente de maior relevância na variação da fertilidade. Dos períodos adotados para as análises, o P7 (sete dias após a retirada da insulação) não apresentou alterações significativas no quadro seminal, possivelmente por representar populações de espermatozóides armazenados no epidídimo ou em outros segmentos do trânsito extra-gonadal (Amann & Schanbacher, 1983). Nos períodos subsequentes, P14 e P21, as alterações foram significativas, especialmente para defeitos de cabeça e fragmentação nuclear (tabela 1, figura 2 e 3). A elevação da prevalência desses defeitos nesses períodos indica alterações na organização estrutural das espermátides, especificamente na fase acrossomal e de Golgi durante a espermiogênese (Barth & Oko, 1989). Ainda, a forma e contorno da cabeça espermática estão diretamente associados à estrutura da cromatina nuclear, sugerindo que, as espermátides componham a categoria de células

do epitélio seminífero de maior sensibilidade, frente ao estresse térmico testicular (Ballachey et al., 1988; Sailer et al., 1996; Setchel, 1998; Boissonneault, 2002).

Em linhas gerais, a dinâmica encontrada para as variações na morfologia espermática era esperada. No entanto, o percentual de fragmentação nuclear foi proporcionalmente superior no P14 e P21, em relação aos defeitos de cabeça. Este resultado pode indicar que, modificações na estrutura e integridade nuclear podem estar presentes antes do aparecimento de alterações na forma da cabeça espermática, conforme observações de Karabinus et al. (1997). Segundo esses autores, variações na condensação da cromatina, devido a maior sensibilidade nas pontes dissulfídicas, podem ser encontradas entre 3 e 9 dias após indução da degeneração testicular por insulação, ainda no ambiente epididimal. Isto sugere que, a elevação na prevalência desses defeitos pode ser esperada em espermatozoides afetados previamente ao armazenamento e trânsito epididimais, aqui caracterizados pelos períodos P14 e P21. Outro aspecto implícito, refere-se a um provável retardo no aparecimento de alterações morfológicas na cabeça espermática, mais prevalente, à partir do vigésimo oitavo dia após insulação em touros *Bos indicus* (Fonseca & Chow, 1995; Brito et al., 2003a) e, portanto, não evidenciado neste estudo.

O método adotado para análise dos perfis eletroforéticos seminais permitiu comparar os indivíduos e os períodos experimentais do ponto de vista quantitativo, isto é, em função do número de bandas protéicas observadas. Enquanto o plasma seminal envolve o somatório dos fluidos provenientes do ambiente testicular, epididimal e glândulas anexas, os espermatozoides representam o perfil protéico de distintos componentes estruturais, incluindo o localizado na teca peri-nuclear ou na própria cromatina espermática e membranas plasmáticas.

Mesmo que o sistema unidimensional para identificação de proteínas não forneça a especificidade de informações geradas no sistema bi-dimensional (Mortari et al., 1998), os perfis encontrados, com base no número de bandas protéicas, estão, em parte, de acordo aos reportados em outros estudos (Wolfe et al., 1993; Kulkarni et al., 1996; Marques et al., 2000). Previamente à indução do processo degenerativo, os coeficientes de similaridade mais elevados, sugeriram perfis eletroforéticos semelhantes, entre indivíduos (Chatfield & Collins, 1980). Nos períodos subsequentes

à retirada do insulto testicular, os perfis variaram e a estrutura dos agrupamentos foi diferente entre o plasma seminal e espermatozóides, e, houve diferenças entre indivíduos. Isto sugere que houve resposta individual, ou seja, cada touro reagiu ao insulto de forma diferente, quer pelo aumento ou diminuição do número de proteínas, tanto seminais quanto das membranas dos espermatozóides. Quanto ao aumento do número de proteínas, esse ocorreu, provavelmente, pela quebra de proteínas de cadeias longas em decorrência da agressão ou, mesmo, pelo aparecimento de novas proteínas, supostamente de efeito protetor. Essas alterações, principalmente no conteúdo protéico dos espermatozóides, já foram constatadas sob estresse térmico no processo de congelamento que, no entanto, provoca a diminuição na quantidade de proteínas e mesmo o desligamento daquelas que comprometem a ligação do espermatozóide à zona pelúcida, impedindo a fecundação (Olero et al., 1997; Watson, 2000).

No plasma seminal, o maior número de proteínas (bandas protéicas) ocorreram entre os pesos moleculares de 30 e 75 kDa, inferior ao observado por Wolfe et al. (1993), nesta mesma faixa, em touros submetidos à insulação escrotal por vinte dias. Já em relação aos espermatozóides, os agrupamentos foram semelhantes aos do plasma seminal, apenas nos períodos 7 e 21 (figura 4, B e D). Isso sugere que, boa parte do perfil eletroforético do plasma seminal, manteve-se constante ao longo do processo degenerativo. Portanto, o período de insulação, em nosso estudo, não foi suficiente para provocar danos à estrutura protéica do plasma seminal, embora os touros fossem insulados por cinco dias, que segundo estudos de Ross & Entwistle, (1979) e Wildeus & Entwistle, (1983) deveria ser suficiente para provocar alterações no espermiograma. Por conseguinte, a minimização das alterações protéicas e mesmo funcionais dos espermatozóides, que na sua maioria são de caráter reversível, poderiam ter ocorrido em função do padrão racial dos touros, geralmente com boa adaptação ao calor e maior resistência ao estresse térmico testicular (Brito et al. 2004). Esta consideração, quanto ao efeito da raça, pode ser constatada em função da identificação das proteínas de pesos moleculares entre 10 a 35 kDa, que ocorreram no plasma seminal em todos os touros e períodos experimentais. Nestas circunstâncias, ficou evidente que estas proteínas de baixo peso molecular, isto é peptídeos, não podem ter sido oriundos da quebra de proteínas de alto peso molecular, pois não

sofreram alterações estruturais pós insulação escrotal. No entanto, as proteínas encontradas no plasma seminal, poderiam ter sido desligadas da membrana plasmática do espermatozóide, por causa do estresse térmico. Este fato pode ter contribuído para a baixa taxa de fecundação *in vitro*, onde proteínas de peso molecular entre 10 a 30 kDa fazem parte da funcionalidade espermática e do processo de fecundação (Miller & Ax 1990; Killian et al., 1993; Bellin et al., 1998).

Aparentemente, o insulto testicular afetou mais as estruturas protéicas de alto peso molecular, isto é acima de 75 kDa, fato esperado em função da estrutura menos estável. No entanto, a alteração dos perfis protéicos pós insulação apresentou forte variação individual. Assim sendo, a ocorrência ou não das proteínas variou entre touros em função dos períodos experimentais, o que leva a supor que dentro da mesma raça existem indivíduos mais ou menos resistentes ao estresse térmico. As proteínas de 50 kDa, se manifestaram apenas nos reprodutores 27 e 32 e nos períodos P7 e P21 após o insulto por insulação, fato este que pode representar quebra de proteínas como resposta individual ao estresse térmico. A proteína de peso molecular 105 kDa, identificada no período P0, desapareceu após o insulto térmico, podendo significar instabilidade estrutural, provavelmente, levando ao aparecimento de novas proteínas ou mesmo a simples desintegração e desaparecimento da mesma. Entretanto, para identificar a relação dos peptídeos ou das proteínas de alto peso molecular encontradas no plasma seminal dos touros em todos os períodos experimentais com a existência de animais mais ou menos resistentes ao estresse térmico testicular, seria necessário repetir o estudo com maior número de indivíduos.

Dos touros estudados, o número 27 apresentou redução nos coeficientes de similaridade no período 7 (sete dias após o término da insulação) e no período 14 (figura 4, B e C), indicando variações mais acentuadas no perfil protéico em relação aos demais. Este efeito individual pode ser esperado, à medida que a resposta frente ao estresse térmico modifica os padrões secretórios, histológicos e, sobretudo, bioquímicos testiculares e epididimais (Setchell, 1998). Assim, certos indivíduos podem responder mais intensamente aos estímulos térmicos resultando em perfis protéicos diferenciados. Por outro lado, há indícios de que a elevação da temperatura testicular induza um quadro inflamatório, com variações na resposta imune e regulação

da espermatogênese pelas células de Sertoli e de Leydig, com alteração nos padrões de termo-tolerância e expressão gênica (Hedger, 2002; Hales, 2002). Como resultado, uma ampla variedade de moléculas podem ser neo-sintetizadas, liberadas para a luz tubular e incorporadas aos fluídos seminais (Whitley et al., 1999; Potts et al., 1999; Fini et al., 2002). Nessas condições, diferenças no perfil eletroforético podem indicar, além dos efeitos individuais, o tempo de exposição e o grau do dano tecidual frente ao estresse térmico. Este aspecto ficou mais evidente nos espermatozóides, nos quais as análises revelaram maior diversidade protéica (menor similaridade) entre touros, sem a predominância de perfis mais definidos como verificado no plasma seminal (bandas entre 30 e 75 kDa). A estrutura dos agrupamentos nesta fração evidencia as diferenças individuais, especialmente com base na estimativa dos coeficientes de similaridade no P14 e P21 (figura 5, C e D), nos quais os efeitos sobre a espermiogênese foram mais proeminentes. O conteúdo protéico da membrana plasmática dos espermatozóides, em todos os reprodutores, sofreu alteração após a insulação, alteração essa que atingiu todas as proteínas inclusive os peptídeos. Esta situação, de certa forma esperada em função da vulnerabilidade dos espermatozóides, foi observada em todos os touros, principalmente no que diz respeito ao aparecimento de novas proteínas. Neste caso especial, isto é, da membrana plasmática, é possível que as novas proteínas fossem oriundas, pelo menos em parte, da ruptura de proteínas de alto peso molecular. Como determinadas proteínas apareceram somente nos P14 e P21, pode ser que estas façam parte de um grupo de proteínas relacionadas à regeneração das estruturas espermáticas, principalmente por terem ocorrido em todos os animais. Esses resultados foram semelhantes aos encontrados por Wolfe et al. (1993), na fração espermática, que observaram polipeptídeos com peso molecular entre 50 e 180 kDa. Nesta faixa de peso molecular, foi identificada a proteína de 85 kDa, muito próxima a aquela descrita por Wolfe et al. (1993), especificamente o polipeptídeo de 83 kDa, encontrado pelos autores em dois indivíduos que retornaram ao quadro espermático normal.

A identificação de proteínas em diferentes etapas após o estresse térmico testicular pode ser importante para o estudo deste processo degenerativo, no touro. Neste sentido, as variações nos coeficientes de similaridade e espermograma em função do estresse térmico testicular indicam que há arranjos semelhantes entre perfis

eletroforéticos ou presença de proteínas e qualidade seminal. Estes resultados mostram a diversidade protéica observada tanto no plasma seminal quanto nos espermatozóides, entre indivíduos e períodos experimentais, o que está de acordo com a resposta esperada no espermograma durante um quadro degenerativo testicular. Isto pode ser um indicativo de que, as proteínas tanto do plasma seminal como aquelas ligadas aos espermatozóides, poderiam caracterizar um processo bioquímico degenerativo testicular ocasionado pelo estresse térmico ou mesmo a adaptabilidade testicular e, portanto, refletindo a eficiência reprodutiva do touro.

## **6.2. Efeito da seleção espermática por gradiente de Percoll sobre as características seminais antes e após indução da degeneração testicular por insulação**

Outro aspecto avaliado neste estudo refere-se ao emprego do Percoll como método de seleção espermática para a produção *in vitro* de embriões e sua interação com as variações no quadro morfológico seminal. Os resultados encontrados estão de acordo com os de Brandeis & Manuel, (1993), Parrish et al. (1995) e Rodrigues-Martinez et al. (1997) em relação as características cinéticas, porém, diferem para as características morfológicas.

Os efeitos do gradiente de Percoll, período experimental e interação entre ambos, foram significativos para diferentes características seminais (figura 8 e 9), indicando a importância deste método na separação de amostras com subpopulações heterogêneas ou possibilidades de variações na prevalência de defeitos morfológicos. Os resultados deste experimento mostraram que o efeito do gradiente de Percoll foi mais importante do que o efeito dos períodos experimentais após indução do processo degenerativo para o vigor, nos períodos P7, P14 e P21 e motilidade, no período P14. Isto é possível devido a presença de partículas siliconadas coloidais, cobertas por polivinilpirrolidona, que permitem a seleção de espermatozóides de acordo com sua densidade, estágio de maturação e integridade (Oshio, 1998; Pertoft, 2000). Espermatozóides mortos, imóveis ou com alterações na membrana plasmática apresentam carga positiva e se ligam facilmente à polivinilpirrolidona (carga

negativa), ficando retidos durante o processo de incubação (1h/39°C) e centrifugação (Anzar & Graham, 1996). Além disso, o seu efeito não é tóxico, o que permite resultados semelhantes quando comparado a outros métodos (Dode et al., 2002; Mendes Jr. et al., 2003).

Dentre as variáveis seminais, a motilidade, o vigor e a integridade acrossomal, têm sido usadas, mais freqüentemente, para estimar a viabilidade de amostra pós-descongelamento ou ainda após diferentes métodos de seleção para fertilização *in vitro*. Entretanto, estes aspectos têm sido relacionados às características da integridade acrossomal da população selecionada (Rodrigues-Martinez et al., 1997; McCann & Chantler, 2000). Acrossomos íntegros contém enzimas hidrolíticas necessárias para a penetração ovocitária e estão intimamente associados à fertilização (Feliciano Silva, 1998). A integridade acrossômica também é importante por conservar as glicoproteínas ligadas à membrana plasmática dos espermatozóides, proteínas estas que potencializam a capacitação e reação acrossomica, eventos que devem preceder a fusão e penetração na zona pelúcida, no mecanismo de fecundação *in vivo* e *in vitro* (Rodrigues Martinez et al., 1998; Bellin et al., 1998; Nauc et al., 1999). Quando lesada, facilita a penetração de certos corantes que permitem a identificação e mensuração da proporção de espermatozóides afetados. Neste sentido, o método de coloração baseado no *trypan blue-giemsa* favorece uma estimativa confiável da proporção de espermatozóides vivos e com acrossomo estruturalmente íntegro, além de ser de fácil aplicabilidade e possuir critérios bem definidos quanto a identificação visual (figura 7). Este método tem sido efetivo para estudos da função acrossomal e suas relações com a capacidade fertilizante do sêmen bovino (Tartaglione & Ritta, 2004).

O efeito do gradiente de Percoll sobre a integridade acrossomal foi mais marcante no período 21, sugerindo que mesmo em amostras seminais com decréscimo na qualidade pós-descongelamento (pré-seleção espermática), houve seleção de subpopulações viáveis e, portanto, passíveis de fertilização. Durante a congelação e descongelação, enzimas proteolíticas e proteínas são liberadas da região acrossomal lesada e afetam os demais componentes da membrana plasmáticas. Além disso, alterações na membrana também ocorrem devido a lavagens ou diluições que podem

remover proteínas, mudando sua composição e afetando o processo de reação acrossômica e ligação espermatozóide-ovócito (Hamerstedt et al. 1990; Watson, 2000). Ainda, a peroxidação lipídica leva a perda de ácidos graxos polinsaturados que resulta na redução da capacidade energética e motilidade espermática (Alvarez & Storey, 1990; Schöneck et al., 1996). Desta forma, os percentuais de acrossomos íntegros encontrados pós-seleção por gradiente de Percoll indicam que este método é efetivo para retenção de espermatozoides com motilidade e vigor reduzidos e com alterações na membrana acrossomal. Estas observações estão de acordo com as de Rodrigues-Martinez et al. (1997), Somfai et al. (2002) e Trentalance & Beorlegui (2002), embora estes autores tenham estudado estes aspectos em amostras homogêneas, em termos de motilidade e morfologia, onde estes efeitos nem sempre são evidentes.

Os resultados encontrados para as características morfológicas estudadas mostraram que para os defeitos de cabeça e fragmentação nuclear o gradiente de Percoll não teve efeito significativo nos períodos P0, P7 e P14 (figura 9). Nesses períodos, os percentuais encontrados, embora tenham sido elevados no P14, foram mais homogêneos e confirmam resultados de outros estudos (McCann & Chantler, 2000; Trentalance & Beorlegui 2002). Porém, no P21, esses defeitos foram mais prevalentes, sugerindo que ambos podem ser potencialmente selecionados independentemente de outros importantes atributos seminais, como motilidade e integridade acrossomal. Desta forma, uma importante parcela de espermatozoides com essas alterações apresentaram condições satisfatórias quanto a motilidade, vigor, e integridade das membranas acrossomais e, portanto, estão aptos à fertilização (Pilip et al. 1996; Walters et al., 2004a).

### **6.3. Avaliação da fecundação *in vitro* e associação com características seminais antes e após indução da degeneração testicular por insulação**

Dos métodos usados para avaliação da fertilidade, a fertilização *in vitro* tem sido descrita como uma ferramenta importante à medida que permite análises diretas

da capacidade dos espermatozóides de realizarem diferentes etapas associadas ao processo de fertilização e desenvolvimento embrionário, tais como habilidade em sofrer reação acrossomal, penetrar a zona pelúcida, descondensar o núcleo, promover a singamia e divisão celular (Yanaghimachi, 1994). Sua utilização como método comparativo e preditivo para a fertilidade entre touros ainda é questionada, no entanto, do ponto de vista da avaliação dos atributos seminais é um teste válido, já que propicia ambiente experimental controlado, homogêneo e de alta repetibilidade (Muller, 2000; Amann & Hammerstedt, 2002).

Das características seminais estudadas, a integridade acrossomal, os defeitos de cabeça e fragmentação nuclear foram os mais importantes quanto à correlação com o percentual de clivados e blastocistos (tabela 4). Porém, as correlações encontradas foram de baixa à moderada magnitude indicando que outros fatores podem estar envolvidos neste processo e expressam dificuldades na identificação de características que representem a totalidade de atributos necessários à fertilização (Amann & Hammerstedt, 1993). A resposta individual entre os touros estudados foi marcante para os defeitos de cabeça e fragmentação nuclear (figura 12) como resultado da sensibilidade do parênquima testicular frente ao estresse térmico. A interação desses atributos seminais indica uma análise multifatorial para determinação de características que sejam mais expressivas quanto à viabilidade espermática e sua relação com as variações na fertilidade. Estes aspectos foram discutidos por Januskauskas et al. (2001 e 2003) e são mais evidentes quando observados em touros submetidos à inseminação artificial. Porém, as condições impostas no sistema *in vitro* de produção, especialmente quando o número de espermatozóides é semelhante em todos os indivíduos, a integridade da cromatina espermática passa a ser mais relevante (Eid et al., 1994; Comizzoli et al., 2000). Assim, no sentido de se obter um ajuste fidedigno com base no conjunto das características seminais, em função da variação dos índices de clivados e blastocistos, empregou-se a análise sequencial que possibilita o estudo da inclusão de variáveis preditivas na composição de um modelo geral de regressão múltipla. Variáveis preditivas que não sejam significativas são retiradas da análise e um novo modelo é recalculado (Belguelman, 1996). Os resultados mostraram que no conjunto das características avaliadas, a fragmentação nuclear foi a mais

expressiva (tabela 5). Em outras palavras, essa característica foi a que melhor explicou a variação dos percentuais tanto de clivados ( $R^2=-0,16$ ,  $p<0,0319$ ) quanto de blastocistos ( $R^2=-0,27$ ,  $0,0044$ , figura 7) em relação às demais. A elevação do nível de fragmentação nuclear reflete mudanças na compactação da cromatina, quebras na estrutura do DNA nuclear, modificações estruturais na região perinuclear e, possivelmente, estejam envolvidas com apoptose durante a espermatogênese (Sailer et al., 1996; Print & Loveland, 2000; Anzar et al., 2002; Boissonneault, 2002; Mújica et al., 2003; Dadoune, 2003). Embora a coloração de *Fuelgen* não seja específica para caracterizar alterações nucleares apoptóticas, o padrão observado de fragmentação nuclear (figura 2) encontrado, supõe que este processo esteja envolvido em resposta à elevação da temperatura testicular. Nestas situações, há profundas modificações na tradução do RNA mensageiro para as histonas e protaminas do tipo 1 e 2 (Setchel, 1998), além da formação de vesículas perinucleares devido a ruptura e exposição do material nuclear para posterior fagocitose (Print & Loveland, 2000; Nagata, 2000). Contudo, outros atributos avaliados que compõem a viabilidade espermática tais como defeitos em regiões específicas e organização das membranas espermáticas, incluindo a acrossomal, podem estar implícitos nos espermatozoides classificados com fragmentação nuclear e, portanto, associados à subfertilidade (Beletti et al. 2004). Esse aspecto foi recentemente observado por Walters et al. (2004) em touros com altos percentuais de espermatozoides do tipo piriforme, com vacúolos nucleares e apicais após indução da degeneração testicular por insulação.

Embora os defeitos de cabeça e fragmentação nuclear tenham sido superiores nos períodos P14 e P21 (figura 9), os percentuais de clivados decresceram apenas no P21 (figura 10). Contudo, a análise individual (figura 11) mostrou que com exceção do touro 122, os demais apresentaram índices superiores a 50% no P14, indicando que esta variável não expressou as diferenças encontradas no espermograma e que há possibilidade de frequências razoáveis de clivagem em touros com percentuais elevados de defeitos de cabeça e núcleo fragmentado. Isso sugere que os mecanismos responsáveis pela remodelação nuclear e subsequente formação do pró-núcleo masculino estariam preservados pelo menos nas primeiras divisões celulares (Navara et al., 1994; Sutovsky & Schatten, 2000). Segundo Ward et al.

(2001) o efeito paterno é mais proeminente a partir de 27 horas pós-inseminação havendo um significativo retardo na cinética das divisões mitóticas em touros com baixa fertilidade. Além disso, nos bovinos, a transcrição embrionária inicia no estágio entre 8 e 16 células. Até esse ponto, o RNAm materno suporta as divisões celulares e possivelmente regule a ontogenia e diferenciação nucleolar (Fléchon & Kopec, 1998). Infelizmente, nesse experimento, não foi possível estimar tais diferenças, optando-se por um índice geral obtido às 48 horas pós-fecundação. Assim, é possível que as variações entre touros e mais especificamente entre períodos não tenham sido tão evidentes em relação a este índice. Por outro lado, as frequências de blastocistos foram mais relevantes quanto aos efeitos individuais e entre períodos experimentais, comprovando o efeito dessas alterações na cromatina espermática sobre o desenvolvimento embrionário. Embora a cinética do desenvolvimento até o estágio de blastocisto não tenha sido anteriormente associada a tipos específicos de defeitos de cabeça e cromatina espermática em bovinos, há indícios que estas alterações mantenham um período prolongado na fase G1 ao longo das subseqüentes divisões celulares (Eid et al., 1994; Comizzoli et al., 2000), afete a transcrição de genes responsáveis pelo desenvolvimento embrionário (Memili & First, 2000) ou ainda, a ativação de genes pró-apoptose (Gjorret et al., 2003), levando à redução da viabilidade embrionária. Similarmente, Kawarsky et al., (1995) e Thundathil et al., (1998 e 1999) evidenciaram que o percentual de blastocistos e posterior perda embrionária foram mais importantes para determinar diferenças entre touros. Os resultados encontrados neste estudo confirmam esses achados uma vez que os efeitos sobre esses índices foram identificados a partir do P7 (figura 10) e demonstram nitidamente o efeito do estresse térmico testicular sobre a espermiogênese e conseqüentemente sobre a fertilidade. Em contraste, Walters et al. (2004b) encontraram índices elevados de clivagem e blastocistos em touros também submetidos à degeneração testicular por insulação, em períodos semelhantes ao considerados neste estudo, e ainda, não descreveram a variação dos índices encontrados (resposta) em função da variação das alterações morfológicas seminais. O efeito individual foi mais marcante. De qualquer forma, os resultados aqui descritos demonstram a necessidade da inclusão de métodos para avaliação da cromatina espermática em touros a serem submetidos à produção *in*

*vitro* de embriões e mostra a limitação do uso da taxa de clivagem observada às 48h pós-fertilização para estimar ou comparar a fertilidade entre indivíduos.

## 7. Conclusão

A funcionalidade testicular estimada pela estrutura morfológica espermática, perfil eletroforético do plasma seminal e espermatozóides, frente ao estresse térmico por insulação, varia em função dos touros e diferentes períodos após indução desse processo.

A análise de agrupamento, que possibilita a comparação de coeficientes de similaridade entre perfis eletroforéticos tanto do plasma seminal quanto dos espermatozóides, é um método vantajoso e, portanto, favorável para a análise da resposta individual e em conjunto, de indivíduos que sofrem um processo degenerativo testicular induzido.

O método de centrifugação em gradiente de Percoll descontínuo (45 e 90%) potencializa a seleção de espermatozóides com defeitos morfológicos de cabeça, anormalidades na cromatina nuclear e integridade acrossomal na população espermática, em diferentes períodos após degeneração testicular induzida.

Das alterações seminais decorrentes do estresse térmico testicular induzido pela insulação, os defeitos de cabeça, de cromatina nuclear e a integridade acrossomal explicam a maior parte da variação da fertilidade *in vitro*, seja pela taxa de embriões clivados ou de blastocistos.

## 8. Referências

Aitken RJ. Molecular mechanisms regulating human sperm function. *Mol Hum Reprod* 1997;3:169-73.

Allen NJ, Bradbury EM, Balhorn R. The natural subcellular structure of the bovine sperm cell. *J Struct Biol* 1995;114:197-208.

Alvarez JG, Storey BT. Evidence for increased lipid peroxidate damage and cost of superoxide dismutase activity as a mode of sublethal cryodamage to human sperm during cryopreservation. *J Androl* 1992;13:232-41.

Amann RP. Sperm production rates. In: Johnson AD, Gomes WR, VanDemark NL, editors. *The testis*. New York: Academic Press; 1970. v.1, p.433-82.

Amann RP. Can the fertility potential of a seminal sample be predicted accurately? *J Androl* 1989;10:89-98.

Amann RP, Hammerstedt RH. In vitro evaluation of sperm quality: an opinion. *J Androl* 1993;14:397-406.

Amann RP, Hammerstedt RH. Detection of differences in fertility. *J Androl* 2002;23:317-25.

Amann RP, Hammerstedt HR, Veeramachaneni RDN. The epididymis and sperm maturation: a perspective. *Reprod Fertil Dev* 1993;5:361-81.

Amann RP, Schanbacher BD. Reproductive physiology of male. *J Anim Sci* 1983;2:380-403.

Anzar M, Graham EF. Role of sperm motility and acrosome integrity in the filtration of bovine semen. *Theriogenology* 1996;45:513-20.

Anzar M, He L, Buhr MM, Kroetsch G, Pauls KP. Sperm apoptosis in fresh and cryopreserved bull semen detected by flow cytometry and its relationship with fertility. *Biol Reprod* 2002;66:354-60.

Austin JW, Hupp EW, Murphee RL. Effect of scrotal insulation on semen of hereford bulls. *J Anim Sci* 1961;20:307-10.

Balhorn R. A model for structure of chromatin in mammalian sperm. *J Cell Biol* 1982;93:298-305.

Ballachey BE, Evenson DP, Saacke RG. The sperm chromatin structure assay relationship with alternate tests of semen quality and heterospermic performance of bulls. *J Androl* 1988; 9:109-15.

Ballachey BE, Hohenboken WD, Evenson, DP. Heterogeneity of sperm nuclear chromatin structure and its relationship to bull fertility. *Biol Reprod* 1987;36:915-25.

Bane A, Nicander L. Electron and light microscopical studies on spermateliosis in a boar with acrosome abnormalities. *J Reprod Fertil* 1965;11:133-8.

Barth AD, Bowman PA. The sequential appearance of sperm abnormalities after scrotal insulation or dexamethasone treatment in bull. *Can Vet J* 1994;34:93-102.

Barth AD, Oko RJ. Abnormal morphology of bovine spermatozoa. Ames: Iowa State University Press; 1989.

Bearer EL, Friend DS. Morphology of mammalian sperm membranes during differentiation, maturation, and capacitation. *J Electron Microsc Technol* 1990;16:281-97.

Beddord JM, Calvin HI. The occurrence and possible functional significance of –s-s- crosslinks in sperm heads, with particular reference to eutherian mammals. *J Exp Zool* 1974; 188:137-55.

Beletti ME, Costa LF, Viana MP. A computational approach to characterization of bovine sperm chromatin alterations. *Biotech Histochem* 2004;79:17- 23.

Beiguelman B. Curso prático de bioestatística. 4nd. ed. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética; 1996.

Bellin E, Ayorso JN, Hawkins HE. Fertility associated antigen on bull sperm indicates fertility potential. *J Anim Sci* 1998;76:2032-9.

Bellin EE, Hawkins HE, Ax RL. Fertility of range beef bulls grouped according to presence or absence of heparin-binding proteins in sperm membranes and seminal fluid. *J Anim Sci* 1994; 72:2441-8.

Bench GS, Balhorn R, Friz AM. Nuclear microscopy of sperm cell elemental structure. *Nucl Instrum Methods Phys Res B* 1995;99:553-6.

Berndtson W, Desjardins C. The cycle of the seminiferous epithelium and spermatogenesis in the bovine testis. *Am J Anat* 1974;140:167-80.

Blom E. Interpretation of spermatic cytology in bulls. *Fertil Steril* 1950;1:233-8.

Bollag DM, Rozycki MD, Edelstein SJ, editors. Gel electrophoresis under denaturing conditions. In: *Protein methods*. New York: Wiley-Liss; 1996. p.107-54.

Boissonneault G. Chromatin remodeling during spermiogenesis: a possible role for the transition proteins in DNA strand break repair. *FEBS Lett* 2002;514:111-4.

Brandeis VT, Manuel MT. Effect of four methods of sperm preparation on the concentration, morphology, and acrosome status of recovered sperm from normal semen samples. *J Assist Reprod Genet* 1993;10:409-16.

Breitbart H, Spungin B. The biochemistry of the acrosome reaction. *Mol Hum Reprod* 1997;3:195-202.

- Brito LFC, Barth AD, Bilodeau-Goeseels S, Panich PL, Kastelic JP. Comparison of methods to evaluate the plasmalemma of bovine sperm and their relationship with in vitro fertilization rate. *Theriogenology* 2003;60:1539-51a.
- Brito LFC, Silva AEDF, Barbosa RT, Unanian MM, Kastelic JP. Effects of scrotal insulation on sperm production, semen quality, and testicular echotexture in *bos indicus* and *bos indicus* x *bos taurus* bulls. *Anim Reprod Sci* 2003;79:1-15b.
- Brito LFC, Silva AEDF, Barbosa RT, Kastelic JP. Testicular thermoregulation in *Bos indicus*, crossbred and *Bos Taurus* bulls: relationship with scrotal, testicular vascular cone and testicular morphology, and effects on semen quality and sperm production. *Theriogenology* 2004;61:511-28.
- Cardoso FM, Godinho HP. Cycle of the seminiferous epithelium and its duration in the zebu, *Bos indicus*. *Anim Reprod Sci* 1983;5:231-45.
- Chatfield C, Collins AJ. Introduction of multivariate analysis. New York: Chapman & Hall; 1980.
- Chieco P, Derenzini M. The Feulgen reaction 75 years on. *Histochem Cell Biol* 1999;111:345-58.
- Clermont Y, Leblon CP. Spermiogenesis of man, monkey, ram and other mammals as show by the "periodic acid-Schiff" technique. *Am J Anat* 1955;96:229-40.
- Clermont Y. Kinetics of spermatogenesis in mammals: seminiferous epithelium cycle and spermatogonial renewal. *Phsys Rev* 1972;198-236.
- Collin S, Bailey JL. Assessment of intracellular calcium levels in cry preserved bovine sperm by flow cytometry. *Theriogenology* 1999;51:341.
- Comizzoli P, Marquant-Le-Guienne B, Heyman Y, Renard JP. Onset of the first s-phase is determined by a paternal effect during the G1-phase in bovine zygotes. *Biol Reprod* 2000;62:1677-84.
- Comizzoli P, Urner F, Sakkas D, Renard JP. Up-regulation of glucose metabolism during male pronucleus formation determines the early onset of the S phase in bovine zygotes. *Biol Reprod* 2003;68:1934-40.
- Dacheux JL, Gatti JL, Dacheux F. Contribution of epididymal secretory proteins for spermatozoa maturation. *Microsc Res Tech* 2003;61:7-17.
- Dadoune JP. Expression of mammalian spermatozoa nucleoproteins. *Microsc Res Tech* 2003;61:56-75.
- Dadoune JP, Mayaux MJ, Ghihard-Moscato ML. Correlation between defects in chromatin condensation of human spermatozoa stained by aniline blue and semen characteristics. *Andrologia* 1998;20:211-7.

- den Daas JHG. Laboratory assessment of semen characteristics. *Anim Reprod Sci* 1992;28:87-94.
- DeJarnette JM, Saacke RG, Bame JH, Vogler CJ. Accessory sperm: their importance to fertility and embryo quality, and attempts to alter their numbers in artificially inseminated cattle. *J Anim Sci* 1992;70:484-91.
- De Jonge CJ. Attributes of fertile spermatozoa-an update. *J Androl* 1999;20:463-73.
- De Lamirade E, Belles-Isles M, Gagnon MC. Characteristics of a seminal plasma inhibitor of sperm motility. *Ann N Y Acad Sci* 1984;438:125-35.
- Didion BA, Dobrinsk, JR, Giles JR, Graves CN. Staining procedures to detect viability and the true acrossome reaction in spermatozoa of various species. *Gamete Res* 1989;22:51-7.
- Dobrinski I, Barth AD. Abnormal chromatin condensation in bovine sperm nuclei. *Rev Bras Reprod Anim* 1993;4:15-23.
- Dode MAN, Rodovalho NC, Ueno VG, Fernandes CE. The effect of sperm preparation and co-incubation time on in vitro fertilization of bos indicus oocytes. *Anim Reprod Sci* 2002;69:15-23.
- Donaghue AM, Johnson LA, Seal US, Armstrong DL, Simmons LG, Tilson RLL, et al. DE. Ability of thowed tiger (*Panthera tigris*) spermatozoa to fertilize conspecific eggs and bind and penetrated domestic cat egg in vitro. *J Reprod Fertil* 1992;96:555-64.
- Eddy EM, O'Brien DA. The spermatozoon. In: Knobil E, Neil JD. *The physiology of reproduction*. 2a ed. New York: Raven Press; 1994. p.29-77.
- Eddy ME, Toshimori K, O'Brien DA. Fibrous sheath of mammalian spermatozoa. *Microsc Res Tech* 2003;61:103-15.
- Eid LN, Lorton SP, Parrish JJ. Paternal influence on S-phase in the first cell cycle of the bovine embryo. *Biol Reprod* 1994;51:1232-7.
- Evenson DP, Darzynkiewicz Z, Melamed MR. Relation of mammalian sperm chromatin heterogeneity to fertility. *Science* 1980;210:1131-3.
- Evenson DP. Loss of livestock breeding efficiency due to unxompensable sperm nuclear defects. *Reprod Fertil Dev* 1999;11:1-15.
- Evenson DP, Larson KL, Jost LK. Sperm chromatin structure assay: its clinical use for detection sperm DNA fragmentation in male infertility and comparisons with other techniques. *J Androl* 2002;23:25-43.
- Everitt B. *Cluster analisys*. London: Heinemann Education Books; 1974.
- Farrel PB, Presicce GA, Brockett CC, Foote RH. Quantification of bull sperm characteristics measured by computer-assisted sperm analysis (casa) and the relationship to fertility. *Theriogenology* 1998;49:871-9.

Fawcett DW. A comparative view of sperm ultrastructure. *Biol Reprod* 1970;2:90-127.

Feliciano Silva AED. Reação acrossomática induzida: método indicador de fertilidade de touros. Brasília: EMBRAPA Recursos Genéticos e Biotecnologia; 1998.

Feulgen R, Rossenbeck H. Mikroskopisch-chemischer Nachweis einer Nukleinsäure von Typus der Thymonukleinsäure und die darauf beruhende selektive Färbung von Zellkernen in mikroskopischen Präparaten. *Physiol Chem* 1924;135:203-48.

Fini C, Talamo F, Cherri S, Coli C, Floridi A, Ferrara L, et al. Biochemical and mass spectrometric characterization of soluble ecto-5'-nucleotidase from bull seminal plasma. *Biochem J* 2002;372:443-51.

Flesh MF, Gadella BM. Dynamics of the mammalian sperm plasma membrane in the process of fertilization. *Biochem Biophys Acta* 2000;1469:197-235.

Fléchon JE, Kopečný V. The nature of the 'nucleolus precursor body' in early preimplantation embryos: a review of fine-structure cytochemical, immunocytochemical and autoradiographic data related to nucleolar function. *Zygote* 1998;6:183-91.

Foltz KR. Sperm-binding proteins. *Int Rev Cytol* 1995;163:249-303.

Fonseca VO, Chow LA. Seminal characteristics of zebu bulls with transitory testicular degeneration. *Arq Bras Vet Zootec* 1995;47:707-16.

Foote RH. Fertility estimation: a review of past experience and future prospects. *Anim Reprod Sci* 2003;75:119-39.

Fouchécourt S, Champigny G, Reinaud P, Dument P, Dacheux JL. Mammalian lipocalin-type prostaglandin d2 synthase in the fluids of the male genital tract: putative biochemical and physiological functions. *Biol Reprod* 2002;66:458-67.

Fouchécourt S, Métayer S, Locatelli A, Dacheux F, Dacheux JL. Stallion epididymal fluid proteome: qualitative and quantitative characterization; secretion and dynamic changes of major proteins. *Biol Reprod* 2000;62:1790-803.

Franken DR, Franken, CJ, de la Guerre H, de Villiers, A. Normal sperm morphology and chromatin packaging: comparison between aniline blue and chromomycin A<sub>3</sub> staining. *Andrologia* 1999;31:361-6.

Friedman R, Scott M, Heath SE, Hughes JP, Daels PF, Tran TQ. The effects of increase testicular temperature on spermatogenesis in the stallion. *J Reprod Fertil* 1991;44:127-34.

Fuentes-Mascorro G, Serrano H, Rosado, A. Sperm chromatin. *Arch Androl* 2000;45:215-25.

Gatti JL, Castella S, Dacheux F, Ecroyd H, Métayer S, Thimon V, et al. Post-testicular sperm environment and fertility. *Anim Reprod Sci* 2004;82-83:321-39.

Gavella M, Cvitkovic P, Skrabalo Z. Seminal plasma isoenzyme LDHX in infertile men. *Andrologia* 1982;14:104-9.

Ghedhill BL. Studies on the DNA content dry mass and optical area of ejaculated spermatozoal heads from bulls with normal and lowered fertility. *Acta Vet Scand* 1966; 7:166-74.

Gledhill BL, Gledhill MP, Rigler Jr R, Ringerstz NR. Changes in deoxyribonucleoprotein during spermiogenesis in the bull. *Exp Cell Res* 1966;41:652-65.

Gledhill BL. Enigma of spermatozoal deoxyribonucleic acid and male infertility: a review. *Am J Vet Res* 1970;31:539-78.

Gjorret JO, Knijn HM, Dieleman SJ, Avery B, Larsson LI, Maddox-Hyttel P. Chronology of apoptosis in bovine embryos produced in vivo and in vitro. *Biol Reprod* 2003;69:1193-200.

Guraya SS. Cellular and molecular biology of capacitation and acrosome reaction in spermatozoa. *Int Rev Cytol* 2000;199:1-64.

Hales DB. Testicular macrophage modulation of leydig cell steroidogenesis. *J Reprod Immunol* 2002;57:3-18.

Hall FP. Testicular steroid synthesis: organization and regulation. In: Knobil, E, Neill, JD, editors. *The physiology of reproduction*. New York: Raven; 1994. p.1335-433.

Hammerstedt RH. Evaluation of sperm quality: identification of the subfertile male and courses of action. *Anim Reprod Sci* 1996;42:77-87.

Hancock JL. A staining technique for the study of temperature shock in semen. *Nature* 1951; 167:323-4.

Hancock JL. The morphology of boar spermatozoa. *J Microsc Soc* 1957;76: 84-97.

Hedger MR. Macrophages and the immune responsiveness of the testis. *J Reprod Immunol* 2002;57:19-34.

Hermo L, Oko R, Morales CR. Secretion and endocytosis in the male reproductive tract: a role in sperm maturation. *Int Rev Cytol* 1994;154:105-89.

Holm P, Booth PJ, Schmidt MH, Greve T, Callesen H. High bovine blastocyst development in a static in vitro production system using SOFaa medium supplemented with sodium citrate and myo-inositol with or without serum-proteins. *Theriogenology* 1999;52:683-700.

Hud, NV, Allen MJ, Downing KH, Lee J, Balhorn R. Identification of the elemental packing unit of dna in mammalian sperm cells by atomic force microscopy. *Biochem Biophys Res Commun* 1993;193:1347-54.

Januskauskas A, Johannisson A, Rodriguez-Martinez H. Assessment of sperm characteristics quality through fluorometry and sperm chromatin structure assay in relation to field fertility of frozen-thawed semen from Swedish AI bulls. *Theriogenology* 2001;55:947-61.

Januskauskas A, Johannisson A, Rodriguez-Martinez, H. Subtle membrane changes in cryopreserved bull semen in relation with sperm viability, chromatin structure, and field fertility. *Theriogenology* 2003;60:743-58.

Kanka J. Gene expression and chromatin structure in the pre-implantation embryo. *Theriogenology* 2003;59:3-19.

Karabinus D, Vogler CJ, Saacke RG, Evenson DP. Chromatin structural changes in sperm after scrotal insulation of holstein bulls. *J Androl* 1997;18:549-55.

Kastelic JP, Cook RB, Couter GH. Contribution of the scrotum, testes and testicular artery to scrotal testicular thermoregulation in bulls at two ambient temperatures. *Anim Reprod Sci* 1997;45:255-61.

Kastelic JP, Couter GH, Cook RB. Scrotal surface, subcutaneous, intratesticular and intraepididymal temperatures in bulls. *Theriogenology* 1995;44:147-52.

Kasten FH. The chemistry of Schiff's reagent. *Int Rev Cytol* 1960;10:1-100.

Kawarsky SJM, Stubbings RB, Basur PK, King WA. Pyriform bovine spermatozoa and fertilization potential. *Can Vet J* 1995;36:434-6.

Kerr JB. Spontaneous degeneration of germ cells in normal rat testis: assessment of cell types and frequency during spermatogenic cycle. *J Reprod Fertil* 1992;95:825-30.

Kierszenbaum AL. Transition nuclear proteins during spermiogenesis: unrepaired dna breaks not allowed. *Mol Reprod Dev* 2001;58:357-8.

Killian GJ, Chapman DA, Rogowski LA. Fertility-associated proteins in Holstein bulls seminal plasma. *Biol Reprod* 1993;49:1202-7.

King RS, Anderson SH, Killian GJ. Effect of bovine oviductal estrus-associated protein on the ability of sperm to capacitate and fertilize oocytes. *J Androl* 1994;15:468-78.

Kovás A, Foote RH. Viability and acrosome staining of bull, boar and rabbit spermatozoa. *Biotech Histochem* 1992;67:119-24.

Kramer JA, Krawetz SA. Nuclear matrix interactions within the sperm genome. *J Biol Chem* 1996; 271:1619-22.

Kulkarni BA. Immunological studies on the origin of seminal plasma proteins of cattle bulls. *Indian J Anim Reprod* 1989;59:357-61.

Kulkarni BA, Fernandes JE, Dhande SG, Hedge UC. Characterization of seminal plasma proteins of the indian buffalo and cattle bulls by sds-polyacrylamide gel electrophoresis. *Buffalo J* 1996;2:147-56.

Langerlof N. Morphological studies on the changes in sperm structure and in the testes of bulls with decreased or abolished fertility. *Acta Pathol Microbiol Scand* 1934;19 245-66.

Latham KE. Mechanisms and control of embryonic genome activation in mammalian embryos. *Int Rev Cytol* 1999;193:71-124.

Larsson B, Rodríguez-Martínez H. Can we use in vitro fertilization tests to predict semen fertility? *Anim Reprod Sci* 2000;60-61:327-36.

Laurincik J, Hyttel P, Baran V, Eckert J, Lucas-Hahn A, Pivko J, et al. A detailed analysis of pronucleus development in bovine zygote in vitro: cell cycle chronology and ultrastructure. *Mol Reprod Dev* 1998;50:192-9.

Linford E, Glover FA, Bishop C, Stewart DL. The relationship between semen evaluation methods and fertility in the bull. *J Reprod Fertil* 1976;47:283-91.

Luke MC, Coffey DS. The male sex accessory tissues, structure, androgen action and physiology. In: Knobil E, Neill JD, editors. *The physiology of reproduction*. New York: Raven; 1994. p.1435-87.

Manjunath P, Chandonnet L, Leblond E, Desnoyers L. Major proteins of bovine seminal vesicles bind to spermatozoa. *Biol Reprod* 1993;49:27-37.

Manjunath P, Marcel YL, Uma J, Seidah NG, Chretien M, Chapdelaine A. Apolipoprotein A-1 binds to a family of bovine seminal plasma proteins. *J Biol Chem* 1989;264:16853-7.

Manjunath P, Sairam MR, Uma J. Purification of four gelatin-binding proteins from bovine seminal plasma by affinity chromatography. *Biol Reprod* 1987;7:231-7.

Manjunath P, Thérien I. Role of seminal plasma phospholipids-binding proteins in sperm membrane lipid modification that occurs during capacitation. *J Reprod Immunol* 2002;53:109-19.

Marques VA, Goulart LR, Feliciano Silva AED. Variations of protein profiles and calcium and phospholipase A<sub>2</sub> concentrations in thawed bovine semen and their relation to acrosome reaction. *Genet Mol Biol* 2000;4:825-9.

Matsuda YT, Tobari I. Studies on chromosome aberrations in the eggs of mice fertilized in vitro after irradiation I: chromosome aberrations induced in sperm after x-irradiation. *Mutat Res* 1985;148:113-7.

Matwee C, Betts DH, King WA. Apoptosis in the early bovine embryo. *Zygote* 2000;8:57-68.

Mazrimas JA, Corzett M, Campos C, Balhorn R. A corrected primary sequences for bull protamine. *Biochem Biophys Acta* 1986;872:11-5.

McCan CT, Chantler E. Properties of sperm separated using Percoll and IxaPrep density gradients. A comparison made using CASA, longevity, morphology and the acrosome reaction. *Int J Androl* 2000;23:205-9.

McCosker PJ. Abnormal spermatozoan chromatin in infertile bulls. *J Reprod Fertil* 1969;18:363-5.

McLay DW, Clarke HJ. Remodelling the paternal chromatin at fertilization in mammals. *Reproduction* 2003;125:625-33.

McPherson SM, Longo FJ. Localization of DNase I-hypersensitive regions during rat spermatogenesis: stage-dependent patterns and unique sensitivity of elongating spermatids. *Mol Reprod Dev* 1992;31:268-79.

Memli E, First NL. Control of gene expression at the onset of bovine embryonic development. *Biol Reprod* 1999;61:1198-207.

Mendez Jr JOB, Burns PD, De La Torre-Sanchez JF, Seidel Jr GE. Effect of heparin on cleavage rates and embryo production with four bovine sperm preparation protocols. *Theriogenology* 2003;60:331-40.

Métayer S, Dacheux JL, Gatti JL. Comparison, characterization, and identification of proteases and protease inhibitors in epididymal fluids of domestic mammals: matrix metalloproteinases are major fluid gelatinases. *Biol Reprod* 2002;66:1219-29.

Miller DJ, Ax RL. Carbohydrates and fertilization in animals. *Mol Reprod Dev* 1990;26:184-98.

Miller DM, Hrudka F, Cates WF, Mapletoft RJ. Infertility in a bull with a nuclear sperm defects: a case report. *Theriogenology* 1982;17:611-21.

Mortari M, Tedeschi G, Negri A, Celiliani F, Gottardi L, Maffeo G, et al. Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis map of bull seminal plasma proteins. *Electrophoresis* 1998;19:797-801.

Mújica A, Navarro-García F, Hernández-González EO, Juárez-Mosqueda ML. Perinuclear theca during spermatozoa maturation leading to fertilization. *Microsc Res Tech* 2003;61:76-87.

Muller CH. Rationale, interpretation, validation, and uses of sperm function tests. *J Androl* 2000;21:10-30.

Nadir S, Saacke RG, Bame JH, Mullins J, Degelos S. Effect of freezing semen and dosage of sperm on number of accessory sperm, fertility and embryo quality in artificial inseminated cattle. *J Anim Sci* 1993;71:199-204.

Nagata S. Apoptotic DNA fragmentation. *Exp Cell Res* 2000;256:12-8.

Nauc V, Lane ME, Manjunath P. Quantification of BSP-Ai/A2 and BSP-30 kDa proteins, and their role in sperm capacitation and storage. *Biol Reprod* 1999;60:102.

Navara C, First N, Schatten, G. Microtubule organization in the cow during fertilization, polyspermy, parthenogenesis and nuclear transfer: the role of the sperm aster. *Dev Biol* 1994;162:9-40.

Navara C, Simerly C, Zoran S, Schatten G. The sperm centrosome during fertilization in mammals: implications for fertility and reproduction. *Reprod Fertil Dev* 1995;7:747-54.

- Olero M, Bescos O, Cebrian-Perez JA. Loss of plasma proteins of bull spermatozoa through the freezing-thawing process. *Theriogenology* 1997;49:547-55.
- Oko R, Maravei D. Protein composition of the perinuclear theca of bull spermatozoa. *Biol Reprod* 1994;50:1000-14.
- Oshio S. Apparent densities of spermatozoa of various mammalian species. *Gamete Res* 1998;20:159-64.
- Parrish JJ, Krogenaes A, Susko-Parrish JL. Effect of bovine sperm separation by either swim-up or percoll methods on success of in vitro fertilization and early embryonic development. *Theriogenology* 1995;44:859-69.
- Pertoft H. Fractionation of cells and subcellular particles with Percoll. *J Biochem Biophys Methods* 2000;44:1-30.
- Pilip R, Del Campo MR, Barth AD, Mapletoft RJ. In vitro fertilizing characteristics of bovine spermatozoa with multiple nuclear vacuoles: a case study. *Theriogenology* 1996;46:1-12.
- Plachot M, Crozet N. Fertilization abnormalities in human in-vitro fertilization. *Hum Reprod* 1992;7:89-94.
- Potts RJ, Jefferies TM, Notarianni LJ. Antioxidant capacity of the epididymis. *Hum Reprod* 1999;14:2513-6.
- Print CG, Loveland KL. Germ cell suicide: new insights into apoptosis during spermatogenesis. *Bioessays* 2000;22:423-30.
- Rao AR. Changes in the morphology of sperm during their passage through the genital tracts in bulls with normal and impaired spermatogenesis. Thesis. Royal Veterinary College of Stockholm. 1971.
- Rao RC. *Advanced statistical methods in biometric research*. New York: John Wiley; 1952.
- Ribeiro Jr JI. *Análises estatísticas no saeg*. Viçosa: UFV; 2001.
- Risley MS, Einheber S, Bumcrot DA. Changes in DNA topology during spermatogenesis. *Chromosoma* 1986;94:217-27.
- Rockett JC, Mapp FL, Garges JB, Luft LC, Mori C, Dix DJ. Effects of hyperthermia on spermatogenesis, apoptosis, gene expression, and fertility in adult male mice. *Biol Reprod* 2001;65:229-39.
- Rodriguez-Martinez H, Larsson B, Pertoft H. Evaluation of sperm damage and techniques for sperm clean-up. *Reprod Fertil Dev* 1997;9:297-308.
- Ross AD, Entwistle KW. The effect of scrotal insulation on spermatozoal morphology and the rate of spermatogenesis and epididymal passage of spermatozoa in the bull. *Theriogenology* 1979;11:111-29.

- Saacke RG, Nadir S, Nebel RL. Relationship of semen quality to sperm transport, fertilization, and embryo quality in ruminantes. *Theriogenology* 1994;41:45-50.
- Saacke RG, Dejarnette JM, Bame JH, Karabinus DS, Whitman S. Can spermatozoa with abnormal heads gain access to the ovum in artificially inseminated super-and single-ovulating cattle? *Theriogenology* 1998;51:117-28.
- Saacke RG, Dalton JC, Nadir RL, Nebel JH, Bame JH. Relationship of seminal traits and insemination time to fertilization rate and embryo quality. *Anim Reprod Sci* 2000;60:663-77.
- Saakas D, Mariethoz E, Manicardi G, Bizzaro D, Bianchi PG, Bianchi U. Origin of DNA damage in ejaculated human spermatozoa. *Rev Reprod* 1999;4:31-7.
- Sailer BL, Jost LK, Evenson DP. Bull sperm head morphometry related to abnormal chromatin structure and fertility. *Cytometry* 1996;24:167-73.
- Salisbury GW, Van Demark NL, Lodge JR. *Physiology of reproduction and artificial insemination of cattle*. 2nd. ed. San Francisco: Freeman and Company; 1978.
- Samali A, Holmberg CI, Sistonen L, Orrenius S. Thermotolerance and cell death are distinct cellular responses to stress: dependence on heat shock proteins. *Febs Lett* 1999;461:306-10.
- Sampaio IBM. *Estatística aplicada à experimentação animal*. Belo Horizonte: Fundação de Ensino e Pesquisa em Medicina Veterinária e Zootecnia; 1998.
- Schaffer HE, Almquist JO. Vital staining of bovine spermatozoa with an eosin-aniline blue staining mixture. *J Dairy Sci* 1948;31:677-782.
- Schöneck C, Braun J, Einspanier R. Sperm viability is influenced in vitro by the bovine seminal protein asfp: effect on motility, mitochondrial activity and lipid peroxidation. *Theriogenology* 1996;45:633-42.
- Setchell BP. Heat and the testis. *J Reprod Fertil* 1998;114:179-94.
- Shannon P, Curson B. Toxic effect and action of dead sperm on diluted semen. *J Dairy Sci* 1972;55:615-20.
- Siegel J. *Statistix version 4.0: user's manual*. Analytical software. St. Paul; 1992.
- Simmet L. Konservierung von bullensperma bei minitüb. In: VII International Congress of Reproduction and Artificial Insemination; 1972; Munchen. Munchen; 1972. p.1357-61.
- Slizinska H, Slizinski BM. Cytological studies of sterile bulls with sperm head abnormality. *J Agric Sci* 1953;43:253-5.
- Somfai T, Bodó S, Nagy S, Papp AB, Iváncsis J, Baranyai B, et al. Effect of swin up and percoll treatment on viability and acrosome integrity of frozen-thawed bull spermatozoa. *Reprod Domestic Anim* 2002;37:285-90.
- Sprecher DJ, Coe PH. Defferences in bull spermograms using eosin-negrosin stais, fuelgen stain, and phase contrast microscopy methods. *Theriogenology* 1996;45:757-64.

Steffen D. Genetic causes of bull infertility. *Vet Clin North Am Food Anim Pract* 1997;13:243-53.

Sutovsky P, Manandhar G, Wu A, Oko R. Interactions of sperm perinuclear theca with the oocyte: implication for oocyte activation, anti-polyspermy defense, and assisted reproduction. *Microsc Res Tech* 2003;61:362-78.

Sutovsky P, Oko R, Hewitson LC, Tengowski MW, Schatten G. Involvement of oocyte microvilli and microfilaments in the removal of the sperm's perinuclear theca: a prerequisite for the success of mammalian fertilization. *Mol Biol Cell* 1997;8:106.

Sutovsky P, Schatten G. Paternal contributions to the mammalian zygote: fertilization after sperm-egg fusion. *Int Rev Cytol* 2000;195:1-65.

Syntin P, Dacheux F, Druart X, Gatti JL, Okamura N, Dacheux JL. Characterization and identification of proteins secreted in the various regions of the adult boar epididymis. *Biol Reprod* 1996;55:956-74.

Tartaglione CM, Ritta MN. Prognostic value of spermatological parameters as predictors of in vitro fertility of frozen-thawed bull semen. *Theriogenology* 2004;62:1245-52.

Tash JS. Investigations on adenosine 3', 5'-monophosphate phosphodiesterase in ram semen and initial characterization of a sperm-specific isoenzyme. *J Reprod Fertil* 1976;47:63-72.

Taylor CT. Antioxidants and reactive oxygen species in human fertility. *Environ Toxicol Pharmacol* 2001;10:189-98.

Thundathil J, Palasz AT, Barth AD, Mapletoft RJ. An investigation of the fertilizing characteristics of pyriform-shaped bovine spermatozoa. *Anim Reprod Sci* 1999;57:35-50.

Thundathil J, Palasz AT, Barth AD, Mapletoft RJ. Fertilization characteristics and in vitro embryo production with bovine sperm containing multiple nuclear vacuoles. *Mol Reprod Dev* 1998;50:328-33.

Töpfer-Petensen E, Petrounkina AM, Ekhlasi-Hundrieser M. Oocyte-sperm interactions. *Anim Reprod Sci* 2000;60-1:653-62.

Trentalance GM, Beorlegui NB. Sperm evaluation in cryopreserved bovine semen recovered by two selection methods. *Andrologia* 2002;34:397-403.

Turner TT, Riley TA, Vagnetti M, Flickinger CJ, Caldwell JA, Hunt DF. Postvasectomy alterations in protein synthesis and secretion in the rat caput epididymis are not repaired after vasovasostomy. *J Androl* 2000;21:276-90.

Twigg J, Fulton N, Gomez E, Irvine DS, Aitken RJ. Analysis of the impact of intracellular reactive oxygen species generation on the structural and functional integrity of human spermatozoa: lipid peroxidation, DNA fragmentation and effectiveness of antioxidants. *Hum Reprod* 1998;13:1429-36.

- Upreti GC, Jensen K, Munday R, Duganzich, DM, Vishwanath, R, Smith, JF. Studies on aromatic amino acid oxidase activity in ram spermatozoa: role of pyruvate as an antioxidant. *Anim Reprod Sci* 1998;51:275-87.
- Vale-Filho VR, Pinheiro LEL, Basur PK. Reproduction in zebu cattle. In: Morrow DA, editor. *Current therapy in theriogenology*. Toronto:WB Sanders Company; 1986. p.437-442.
- Van Camp SD. Common causes of infertility in the bull. *Vet Clin Nort Am Food Anim Pract* 1997;13:203-30.
- Veres I, Michelman HW, Mattler L, Schmaljohann R, Czuppon AB. Changes of the surface charges of mammalian spermatozoal membrane following acrosome reaction. *Am J Reprod Immunol Microbiol* 1985;7:88-90.
- Visconti PE, Westbrook VA, Chertihin O, Demarco I, Sleight S, Diekman AB. Novel signaling pathways involved in sperm acquisition of fertilizing capacity. *J Reprod Immunol* 2003;53:133-50.
- Vogler CJ, Bame J, Dejarnette JM, McGilliard ML, Saacke RG. Effects of elevated testicular temperature on morphology characteristics of ejaculated spermatozoa in the bovine. *Theriogenology* 1993;40:1207-19.
- Yanagimachi, R. Mammalian fertilization. In: Knobil E, Neill JD, editors. *The physiology of reproduction*. New York: Raven; 1994. p.189-317.
- Walters AH, Eyestone WE, Saacke RG, Pearson RE, Gwazdauskas FC. Sperm morphology and preparation method affect bovine embryonic development. *J Androl* 2004;25:554-63.
- Walters AH, Eyestone WE, Saacke RG, Pearson RE, Gwazdauskas FC. Bovine embryo development after IVF with spermatozoa having abnormal morphology. *Theriogenology* 2005a;63:1925-37.
- Walters AH, Eyestone WE, Saacke RG, Pearson RE, Gwazdauskas FC. The incidence of apoptosis after IVF with morphologically abnormal bovine spermatozoa . *Theriogenology*. In press 2005b.
- Ward F, Rizos D, Corridan D, Quin K, Boland M, Lonergan P. Paternal influence on the time of first embryonic cleavage post insemination and the implications for subsequent bovine embryo development in vitro and fertility in vivo. *Mol Reprod Dev* 2001;60:47-55.
- Watson PF. The causes of reduce fertility with cryopreserved semen. *Anim Reprod Sci* 2000; 60-1:481-92.
- Whitley D, Goldberg SP, Jordan WD. Heat shock proteins: a review of the molecular chaperones. *J Vasc Surg* 1999;29:748-51.
- Wildeus S, Entwistle KW. Spermogram and sperm reserves in hybrid *bos indicus* × *bos taurus* bulls after scrotal insulation. *J Reprod Fertil* 1983;69:711-6.

Wolfe DF, Bradley JT, Riddell MG. Characterization of seminal plasma proteins and sperm proteins in ejaculates from normospermic bulls and bulls with thermally-induced testicular degeneration. *Theriogenology* 1993;40:1083-91.

Wrenzycki C, Herrmann D, Lucas-Hahn A, Lemme E, Korsawe K, Niemann H. Gene expression patterns in in vitro-produced and somatic nuclear transfer-derived preimplantation bovine embryos: relationship to the large offspring syndrome? *Anim Reprod Sci* 2004; 82-3:593-603.

## ANEXO I

### SOLUÇÕES USADAS NO CONGELAMENTO DO SÊMEN

#### SOLUÇÃO DE TRIS CONCENTRADO

TRIS (hydroxymethyl) aminomethano p.a.	12,11 g
Ácido cítrico	6,08 g
Frutose (2,5 g) + lactose (2,5 g)	5,00 g
H <sub>2</sub> O D	68,00 mL
Glicerol	32,00 mL
Obs.: pH deve ser de 6,8	

#### SOLUÇÃO DE TRIS PARA DILUIÇÃO E CONGELAÇÃO

Solução de TRIS concentrado	10,00 mL
H <sub>2</sub> O destilada	30,00 mL
Gema de ovo	10,00 mL

**ANEXO II****SOLUÇÕES PARA COMPOSIÇÃO DOS REAGENTES USADOS PARA DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO TOTAL PROTÉICA DAS AMOSTRAS DO PLASMA SEMINAL E ESPERMATOZÓIDES PELO ENSAIO DO ÁCIDO BICINÍNICO (BCA):****REAGENTE A**

BCA	2,00 g
Carbonato de sódio	3,42 g
Tartarato de sódio 2 H <sub>2</sub> O	0,32 g
Hidróxido de sódio	0,80 g
Carbonato ácido de sódio	1,90 g
H <sub>2</sub> O D, pH 11,25 qsp	200 mL

**REAGENTE B**

Sulfito de cobre	0,64 g
H <sub>2</sub> O Destilada	25,00 mL

### ANEXO III

#### PROTOCOLO ADAPTADO DE SCHIFF E COLORAÇÃO PELO MÉTODO DE FUELGEN

- 1) Fazer esfregação de sêmen com formalina 10%
- 2) Mergulhar na solução de HCl 5N por 30'
- 3) Lavar em H<sub>2</sub>O corrente por 5 minutos
- 4) Tratar a lâmina na solução de ácido periódico a 0,5% por 10'
- 5) Banhar em H<sub>2</sub>O destilada e secar bem
- 6) Mergulhar na solução de Schiff por 1 hora.
- 7) Banhar em H<sub>2</sub>O destilada para retirar o excesso
  - Usar lamínula 24 x 50 mm
  - Colocar 2 a 3 gotas de Entelan
  - Passar a lamínula no xilol e fixá-la na lâmina (usar capela).

Preparo das soluções:

Ácido Periódico a 0,5%:

Ác. Periódico.....0,5 g  
 H<sub>2</sub>O destilada.....100 mL

Para 1L , usar 50g de ác. Periódico; guardar em vidro ambar na geladeira;

Água Sulfurosa (para 200 mL):

Bissulfito da sódio 10%.....10 mL  
 H<sub>2</sub>O destilada.....180 mL  
 Ác. Clorídrico.....10 mL

Reativo de Schiff:

Fucsina básica.....0,25 g  
 H<sub>2</sub>O destilada.....50 mL  
 Metabissulfito de potássio..... 0,5 g  
 ou Bissulfito de sódio  
 Ácido Clorídrico .....10 ml

**ANEXO IV**

**BOLSA DE FELTRO REVESTIDA COM NYLON COBRINDO O ESCROTO PARA INDUÇÃO DE DEGENERAÇÃO TESTICULAR POR INSULAÇÃO.**

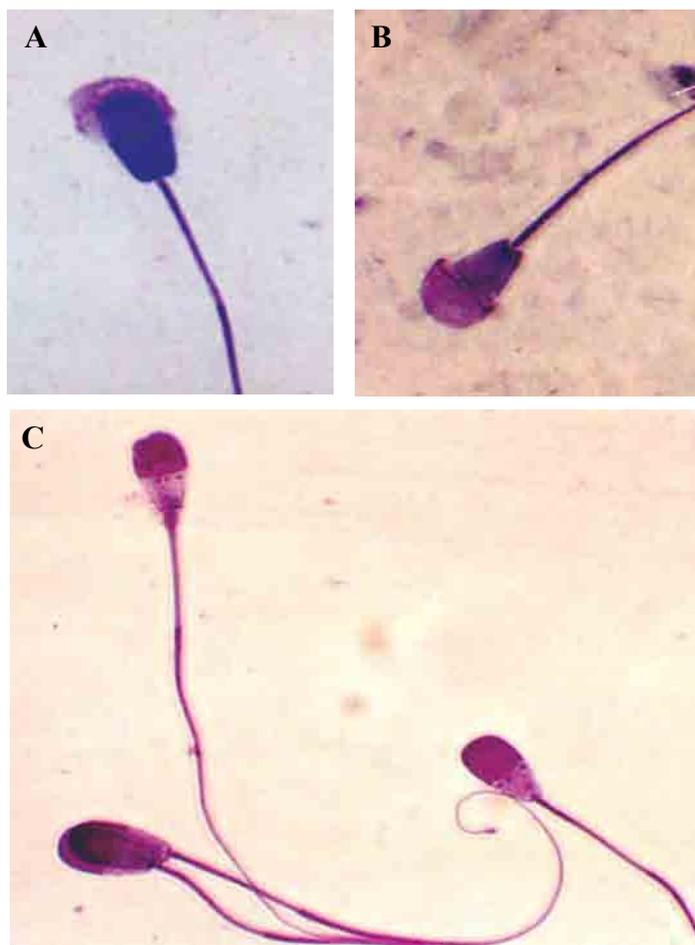


**ANEXO V****PROTOCOLO PARA COLORAÇÃO E AVALIAÇÃO DA INTEGRIDADE ACROSSOMAL (Feliciano Silva, 1998).**

- 1- Misturar 20ul da suspensão de sêmen com 20ul de trypan blue 0,2% em meio TALP e encubar em banho-maria 37 C por 15 minutos.
- 2- Após incubação adiciona-se ao tubo TALP ou solução salina 0,9% até completar 1,5ml.
- 3- Centrifugar a 700g por 6 minutos. Remover o sobrenadante e ressuspender o sedimento com TALP ou solução salina.
- 4- Repetir centrifugação até que a suspensão esteja clara ou azul pálido.
- 5- Ressuspender sedimento final com TALP ou solução salina 0,9%.
- 6- Fazer esfregaços com a suspensão de sêmem.
- 7- Corar por 24 hrs. com giemsa a 0,4% em metanol ou H<sub>2</sub>O destilada (pH6,8).
- 8- Lavar o verso das lâminas com H<sub>2</sub>O destilada.
- 9- Secar ao ar.
- 10- Montar com *permount* (1:1 com xilol) e lamínula.
- 11- Contar 200 sptz para fazer a avaliação.

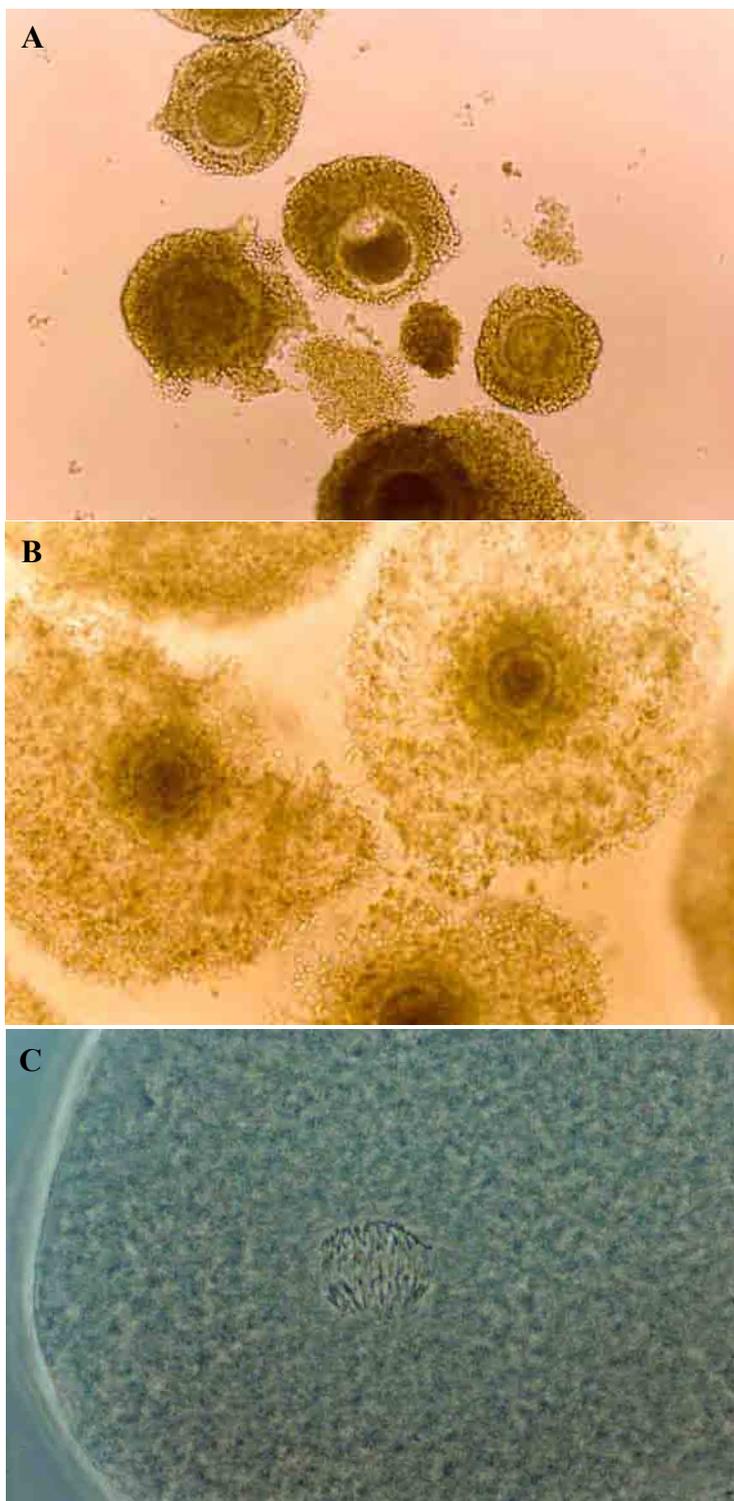
## ANEXO VI

**ESPERMATOZÓIDES DE BOVINOS CORADOS PELO MÉTODO TRYPAN BLUE  
GIEMSA (Feliciano Silva, 1998). A e B, ESPERMATOZÓIDES MORTOS COM  
DEFEITO DE ACROSSOMO E DESTAQUE DA MEMBRANA ACROSSOMAL; C,  
ESPERMATOZÓIDES COM VACÚOLOS NUCLEARES (*POUCH*). MICROSCOPIA  
DE CAMPO CLARO (1000X).**



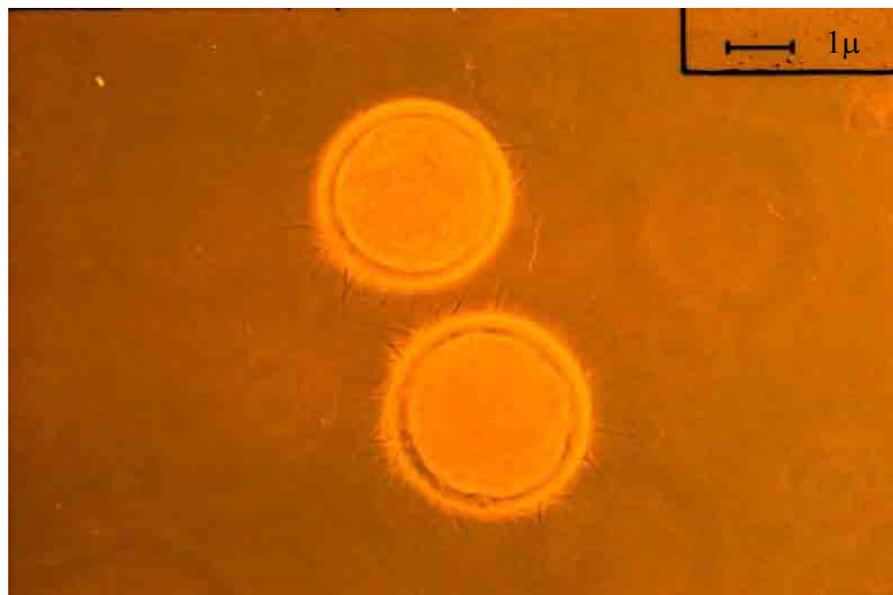
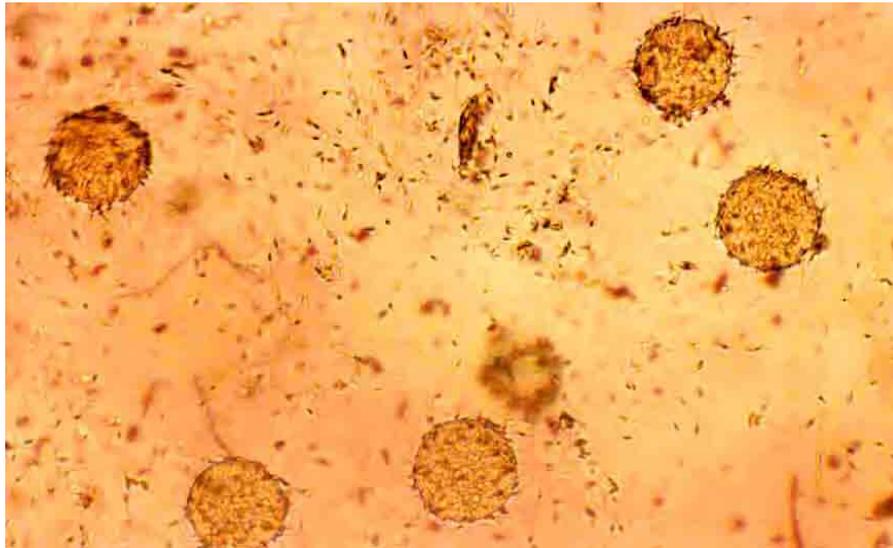
## ANEXO VII

**COMPLEXO CUMULUS OVÓCITO (COC) BOVINO COMPACTO IMATURO (A), EXPANDIDO MATURO (B) EM ESTEREOMICROSCOPIA. C, METÁFASE DA SEGUNDA DIVISÃO MEIÓTICA EM MICROSCOPIA DE CONTRASTE DE FASE (1000X).**



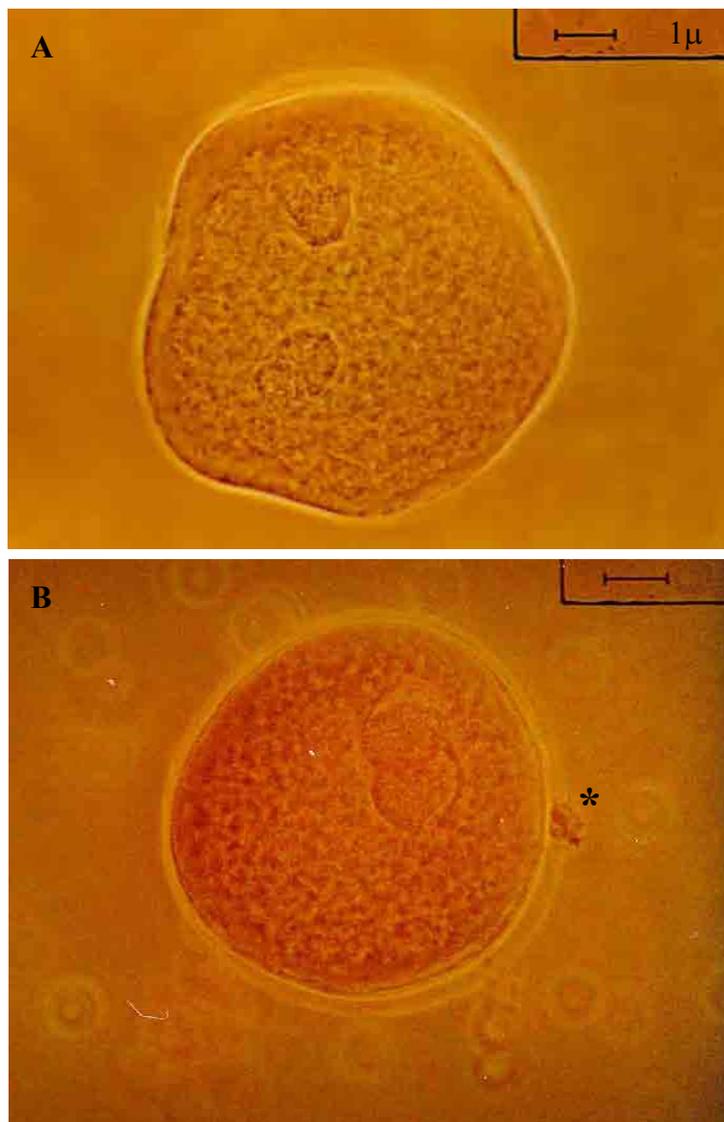
## ANEXO VIII

**OVÓCITOS BOVINOS DESNUDOS, MATURADOS *IN VITRO* E  
ESPERMATOZÓIDES EM PROCESSO DE FECUNDAÇÃO *IN VITRO*. A,  
ESTEREOMICROSCOPIA; B, MICROSCOPIA DE CONTRASTE DE FASE (100X).**



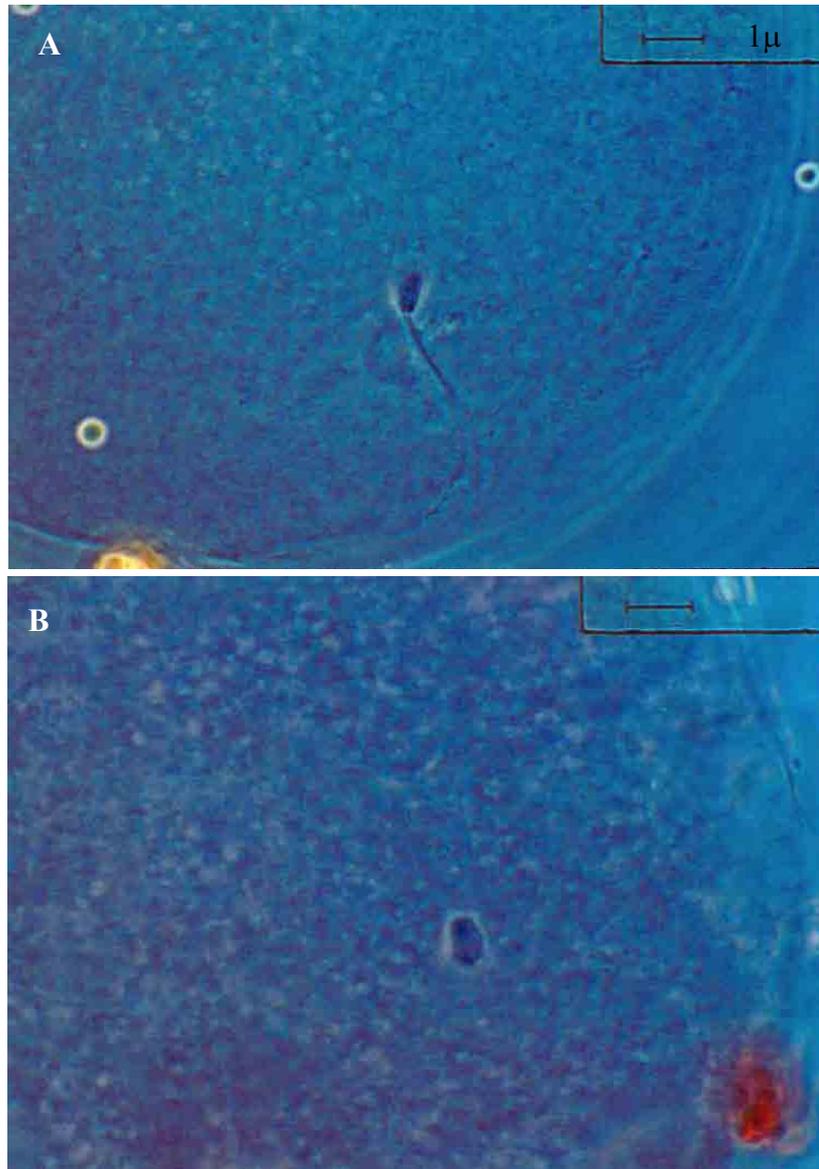
## ANEXO IX

**OVÓCITOS BOVINOS APÓS FECUNDAÇÃO IN VITRO. A, PRÓ-NUCLEO MASCULINO E FEMININO. B, UNIÃO DOS PRÓ-NÚCLEOS. \* SEGUNDO CORPÚSCULO POLAR. MICROSCOPIA DE CONTRASTE DE FASE (400X).**



## ANEXO X

**ESPERMATOZÓIDE BOVINO APÓS PENETRAÇÃO COM INÍCIO DO PROCESSO DE DESCONDENSAÇÃO DA CABEÇA (A) E INÍCIO DA FORMAÇÃO DO PRÓ-NÚCLEO MASCULINO (B). MICROSCOPIA DE CONTRASTE DE FASE (1000X).**



**ANEXO XI****EMBRIÕES FECUNDADOS *IN VITRO* APÓS PRIMEIRAS DIVISÕES MITÓTICAS.  
ESTEREOMICROSCOPIA.**