

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL

**Avaliação da integridade do acrossoma, membrana
citoplasmática, potencial mitocondrial, cromatina e produção
de embriões *in vitro* de sêmen bovino com altos índices de
gota citoplasmática proximal.**

Janaina Torres Carreira

Orientadora: Prof^a. Ass. Dr^a. Marion Burkhardt de Koivisto

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Medicina Veterinária (Reprodução animal).

JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL

Fevereiro de 2008

Carreira, Janaina Torres
C314a Avaliação da integridade do acrossoma, membrana citoplasmática, cromatina, potencial mitocondrial e produção de embriões *in vitro* de sêmen bovino com altos índices de gota citoplasmática proximal/ Janaina Torres Carreira. – – Jaboticabal, 2008
xiii, 56 f. : il. ; 28 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2008
Orientador: Marion Burkhardt de Koivisto
Banca examinadora: Gisele Zoccal Mingoti, Sony Dimas Bicudo
Bibliografia

1. Bovinos. 2. Gota citoplasmática proximal. 3. FIV. I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 619:636.2

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação – Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - UNESP, Câmpus de Jaboticabal.

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

JANAINA TORRES CARREIRA - nascida em Sorocaba – SP, ao dia 3 do mês de Setembro de 1977; concluiu o ensino médio na EEPSSG José Vilagelin Neto, na cidade de Campinas – SP, em dezembro de 1996. Ingressou no curso de Graduação em Medicina Veterinária na Faculdade de Odontologia de Araçatuba - Curso de Medicina Veterinária da Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho” – UNESP, Araçatuba, em março de 2001. Concluiu o curso superior em Medicina Veterinária em dezembro de 2005. Durante a graduação realizou três estágios de iniciação científica sob orientação da Prof^a. Ass. Dr^a. Marion Burkhardt de Koivisto, junto à disciplina de obstetrícia veterinária, perfazendo um total de 337 horas. Ingressou no curso de pós-graduação, nível de Mestrado, sob orientação da Prof^a. Ass Dr^a. Marion Burkhardt de Koivisto, no Programa de Medicina Veterinária, Área de Concentração em Reprodução Animal, na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias Câmpus de Jaboticabal da Universidade Estadual Paulista – UNESP, em março de 2006, com bolsa de mestrado do CNPq. Foi professora voluntária da disciplina de Obstetrícia Veterinária do curso de Medicina Veterinária da Faculdade de Odontologia de Araçatuba da Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho” – UNESP, Araçatuba.

Mira na estrela e assopra.
Arnaldo Antunes

(Retirado do poema visual Mira na estrela, livro Palavra Desordem, ed. Iluminuras,
2002)

DEDICO

Ao meu filho **Caio**,
que cresce longe de mim,
e enfrentamos, ainda não sei como,
essa saudade que sempre esteve presente.

Aos meus pais **Clélio e Leila**,
pela educação, paciência,
investimento e principalmente,
por permitirem que eu continuasse buscando
as coisas que acredito,
sem este apoio seria impossível.

A minha avó **Julieta**,
que também ajuda tanto
pra que eu possa evoluir.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha orientadora **Profa. Dra. Marion Burkhardt de Koivisto** por toda dedicação, paciência, confiança, convivência e amizade em todos estes anos. Por me ensinar a ter fé, força de vontade e buscar melhorar sempre. E principalmente por despertar e alimentar em mim a imensa paixão e satisfação em adquirir e transmitir conhecimento.

À **Profa. Dra. Gisele Zoccal Mingoti**, que desde o segundo ano de graduação nos inspirava nas aulas fisiologia e que mais tarde, neste trabalho, foi responsável por me ensinar os primeiros passos na FIV e me por ter ajudado nas colorações fluorescentes.

À **Profa. Dra. Sílvia Helena Venturoli Perri** por ser tão compreensiva e estar sempre disposta a ajudar, mesmo quando os prazos eram curtos para análise dos resultados.

À **Profa. Dra. Luzia Helena Queiroz e Profa. Dra. Tereza Cristina Cardoso da Silva**, pela disponibilização da sala de microscopia de fluorescência do laboratório de virologia.

À **Dra. Lucia Helena Rodrigues**, por estar sempre disposta a nos ajudar durante todo o trabalho.

Ao **Dr. Francisco Fazzano**, pela grande ajuda com a coloração de laranja de acridina.

Ao **Prof. Dr. César Roberto Esper e Prof. Dr. Paulo Henrique Franceschini**, pela atenção dispensada no exame de qualificação, correções e sugestões.

Ao **Prof. Dr. Wilter Ricardo Russiano Vicente**, pela ajuda e sugestões.

Ao **Prof. Dr. Rubens Paes de Arruda**, pelo esclarecimento e demonstração do uso da associação de sondas fluorescentes.

À **Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - UNESP – Câmpus de Jaboticabal** pela oportunidade da realização do Mestrado e à **Faculdade de Medicina Vetrinária – UNESP – Câmpus de Araçatuba** pelo acolhimento sempre tão positivo.

Ao **Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)** pela concessão da Bolsa de Estudos.

À **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)** pelo Apoio financeiro deste projeto.

À **Érika Labat**, muito querida e ao **João**, companheiros de pesquisa, pelo trabalho, experiências, conversas, e muitas alegrias que vivemos juntos.

Às minhas amigas amadas, **Mayra**, por ser uma surpresa tão boa, que me ajudou, me deu apoio e amizade, e **Carol**, pela paciência nos meus dias de estresse, mas principalmente pela amizade e companheirismo nestes tantos anos que vivemos, que muitas vezes sobrevivemos juntas, mas principalmente pela momentos de alegria que tivemos.

À minha querida amiga **Márcia** , que mesmo apesar da distancia me incentivou, e é um exemplo de dedicação à pesquisa.

Ao meu amigo **Edson**, que no último ano do mestrado me deu sempre força pra continuar.

Ao **José Ruben**, que sempre esteve disposto a ajudar e ao frigorífico **Marfrig** que possibilitaram a coleta de ovários para o trabalho.

Às minhas queridas amigas de Jaboticabal, **Longa, Nholá, Castanha, Norréia, Aline** e ao **João** pelo amor, amizade apoio e abrigo.

Aos **amigos e amigas da pós** e da **graduação** de Araçatuba e Jaboticabal pelo companheirismo e alegria.

A **todas as pessoas** que colaboraram ou torceram por este projeto, meu sincero agradecimento.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE FIGURAS.....	ix
LISTA DE TABELAS.....	x
ANEXOS.....	xii
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xiii
RESUMO.....	xvi
ABSTRACT.....	xvii
I. INTRODUÇÃO	1
II. REVISÃO DE LITERATURA.....	3
2.1. Morfologia Espermática – Gota Citoplasmática Proximal (GCP).....	3
2.2. Integridade de Membrana Plasmática.....	5
2.3. Integridade do Acrossoma.....	6
2.4. Potencial Mitocondrial.....	7
2.5. Integridade da Cromatina.....	9
2.6. Fertilização <i>in vitro</i> (FIV).....	11
III. OBJETIVOS GERAIS.....	12
3.1. Objetivos específicos.....	12
IV. HIPÓTESE	13
V. MATERIAL E MÉTODO.....	13
5.1. Seleção dos animais e colheita das amostras.....	13
5.2. Experimento I.....	14
5.2.1. Motilidade e Vigor.....	14
5.2.2. Concentração.....	14
5.2.3. Morfologia Espermática.....	15
5.2.4. Teste de Termo Resistência lento (TTL).....	15
5.2.5. Avaliação da integridade de membranas.....	15
5.2.6. Avaliação da integridade da cromatina.....	17
5.3. Experimento II.....	17
5.3.1. Obtenção e seleção dos oócitos.....	18

5.3.2. Maturação dos oócitos.....	18
5.3.3. Fecundação <i>in vitro</i>	18
5.3.4. Cultivo de Desenvolvimento.....	19
VI. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	20
VII. RESULTADOS.....	20
7.1 Experimento I.....	20
7.1.1. Morfologia espermática.....	20
7.1.2 Concentração, Motilidade, Vigor e PIA.....	22
7.1.3 Avaliação da integridade de membranas	23
7.1.4 Integridade da cromatina.....	29
7.2 Experimento II.....	30
VIII.DISSCUSSÃO.....	33
IX. CONCLUSÃO.....	38
X. IMPLICAÇÕES.....	39
XI. DESAFIOS FUTUROS.....	39
XII. REFERÊNCIAS.....	40
XIII. ANEXOS.....	55

LISTA DE FIGURAS

Página

- Figura 1.** Representação esquemática dos padrões de coloração obtidos pela associação de sondas fluorescentes FITC-PSA (aglutinina de *Pisum sativum* conjugada com isotiocionato de fluoresceína), PI (iodeto de propídio) e JC-1 (iodeto de 5, 5', 6, 6' - tetracloro - 1, 1, 3, 3' - tetraetilbenzimidazolilcarbocianina).....16
- Figura 2.** Grupo Gota – Espermatozóides bovinos com índices elevados de GCP, microscopia de contraste de interferência diferencial de fase (DIC). A) Espermatozóides com morfologia normal. B) Espermatozóides com gota citoplasmática proximal. (câmara úmida, aumento 1000x).....22
- Figura 3.** Grupo com patologia (Gota). A) Espermatozóides com acrossoma lesado, membrana citoplasmática íntegra e sem potencial mitocondrial B) Espermatozóide com acrossoma lesado, membrana citoplasmática lesada e sem potencial mitocondrial. (FITC-PSA, JC-1, PI, aumento 1000x).....27
- Figura 4.** Grupo com patologia (Gota), espermatozóide com gota citoplasmática proximal. Acrossoma lesado, membrana citoplasmática lesada e sem potencial mitocondrial. (FITC-PSA, JC-1, PI, aumento 1000x).....28
- Figura 5.** Grupo controle (Controle). A) Espermatozóide com acrossoma íntegro, membrana íntegra e com potencial mitocondrial. B) Espermatozóide com acrossoma lesado, membrana íntegra e com potencial mitocondrial. C) Espermatozóide com acrossoma íntegro, membrana lesada e sem potencial mitocondrial. (FITC-PSA, JC-1, PI, aumento 1000x).....28

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1 - Valores médios (\bar{x}) e desvio padrão (S) das variáveis morfológicas estudadas após descongelamento para os grupos Controle (índices normais de morfologia espermática) e Gota (com elevados índices de GCP).....	21
Tabela 2 – Valores médios (\bar{x}) e desvio padrão (S) das variáveis físicas (concentração, motilidade 0h, vigor 0h no momento da descongelamento, motilidade 3h, vigor 3h após TTL e porcentagem de acrossomas intactos - PIA) estudadas de touros <i>Bos indicus</i> com índices de GCP dentro da normalidade (Controle) e de touros <i>Bos indicus</i> apresentando elevados índices de gota citoplasmática proximal (Gota).	23
Tabela 3 – Média (\bar{x}), desvio padrão (S) e coeficiente de variação (CV), para os grupos Controle e Gota, corados pela associação de sondas fluorescentes após os métodos de preparação do sêmen pela diluição sem centrifugação e pela lavagem com centrifugação.....	24
Tabela 4 – Valores médios (\bar{x}) e desvio padrão (S) dos padrões de coloração fluorescentes obtidos pela associação de sondas - FITC-PSA (aglutinina de <i>Pisum sativum</i> conjugada com isotiocianato de fluoresceína), PI (iodeto de propídio) e JC-1(iodeto de 5, 5', 6, 6' – tetracloro - 1, 1, 3, 3' - tetraetilbenzimidazolilcarbocianina), após descongelamento e lavagem para os grupos Controle (índice normal de morfologia espermática) e Gota (alto índice de GCP).....	25
Tabela 5 – Valores médios (\bar{x}) e desvio padrão (S) da integridade da membrana citoplasmática, integridade do acrossoma e presença de potencial mitocondrial, obtidos pela associação de sondas - FITC-PSA (aglutinina de <i>Pisum sativum</i> conjugada com isotiocianato de fluoresceína), PI (iodeto de propídio) e JC-1(iodeto de 5,5',6,6'-tetracloro-1,1,3,3'-tetraetilbenzimidazolilcarbocianina), após descongelamento e lavagem para os grupos Controle (índice normal de morfologia espermática) e Gota (elevados índices de GCP).....	26
Tabela 6 – Média (\bar{x}) e desvio padrão (S) da porcentagem de DNA lesado, para os grupos Controle (índice normal de morfologia espermática) e Gota (índices elevados de GCP).....	29

- Tabela 7 – Correlação entre os valores de DNA lesado e GCP para os grupos Controle (índice normal de morfologia espermática) e Gota (elevados índices de GCP).....29**
- Tabela 8 - Valores das variáveis morfológicas dos touros selecionados para FIV provenientes dos grupos Controle (índices de gota citoplasmática dentro da normalidade) e Gota(alto índice de gota citoplasmática proximal)...30**
- Tabela 9 – Médias e desvio padrão (S) da clivagem, formação de blastocistos (BL) no D8 do cultivo embrionário e taxas de eclosão por número total de oócitos (Ecl/OO), por número de blastocistos no D8 (Ecl/BL) e pela taxa de clivagem (Ecl/Cli), para todos os touros avaliados.....32**
- Tabela 10 – Médias e desvio padrão (S) da clivagem, formação de blastocistos no D8 do cultivo embrionário e taxas de eclosão por número total de oócitos, por número de blastocistos no D8 e pela taxa de clivagem, para os grupos controle (Controle) e patologia (Gota).....32**

Lista de Anexos**Página**

- Anexo 1 – Porcentagem média (\bar{x}) e desvio padrão (S) dos defeitos maiores avaliados após descongelação para os grupos Controle (índices normais de morfologia espermática) e Gota (com elevados índices de GCP).....55**
- Anexo 2 – Porcentagem média (\bar{x}) e desvio padrão (S) dos defeitos menores avaliados após descongelação para os grupos Controle (índices normais de morfologia espermática) e Gota (com elevados índices de GCP).....56**

LISTA DE ABREVIATURAS

AO= “Acridine Orange” – Laranja de Acridina

ATP= Adenosina trifosfato

BL= Blastocisto

BSA= Albumina sérica bovina

Ca⁺⁺= Íon cálcio

CO₂ = Dióxido de carbono

COC= Complexo *cummulus*-oócito

CV= Coeficiente de variação

DIC= Contraste por interferência diferencial

DNA= Ácido desoxiribonucléico

FITC= Isoticianato de fluoresceína

FITC-PSA= Aglutinina de *Pisum sativum* conjugada a isoticianato de fluoresceína

FIV= Fecundação *in vitro*

FSH= Hormônio folículo estimulante

g= força gravitacional

GCP= Gota citoplasmática proximal

GCD= Gota citoplasmática distal

h= Hora

hCG= Gonadotrofina coriônica humana

HEPES= N-(2-Hydroxyethyl) piperazine-N'- (2-ethanesulfonic acid);
4(2Hydroxyethyl)piperazine- 1-ethanesulfonic acid

hpi= Horas após inseminação

IA= Inseminação artificial

IIC= Acrossoma íntegro, membrana plasmática íntegra, com potencial mitocondrial

IIS= Acrossoma íntegro, membrana plasmática íntegra, sem potencial mitocondrial

ILC= Acrossoma íntegro, membrana plasmática lesada, com potencial mitocondrial

ILS= Acrossoma íntegro, membrana plasmática lesada, sem potencial mitocondrial

JC-1= Iodeto de 5,5',6,6'-tetracloro-1,1,3,3'-tetraetilbenzimidazolilcarbocianina

KCl= Cloreto de potássio

LIC= Acrossoma lesado, membrana plasmática íntegra, com potencial mitocondrial

LIS= Acrossoma lesado, membrana plasmática íntegra, sem potencial mitocondrial

LLC= Acrossoma lesado, membrana plasmática lesada, com potencial mitocondrial

LLS= Acrossoma lesado, membrana plasmática lesada, sem potencial mitocondrial

M= Molar

mL= Mililitros

mg= Miligramas

mm= Milímetros

mM= Milimolar

mV= Milivolt

nm= Nanômetros

P1= Protamina tipo 1

P2= Protamina tipo 2

PHE= Penicilamina, hipotaurina e epinefrina

PI= Iodeto de propídio

PIA= Porcentagem de acrossomas intactos

PSA= Aglutinina de *Pisum sativum*

S= Desvio padrão

SAS= "Statistical Analyses System"

SFB= Soro fetal bovino

TALP= "Tyrode's albumin lactate and pyruvate"

TCM-199= "Tissue culture medium 199"

TTL= Teste de termo-resistência lento

β= Beta

°C= Graus centígrados

ΔΨ= Potencial de membrana

μm= Micrometros

μL= Microlitros

μg= Microgramas

± = Mais ou menos

< = Menor

> = Maior

%= Porcentagem

*****= Asterisco

Avaliação da integridade do acrossoma, membrana citoplasmática, cromatina, potencial mitocondrial e produção de embriões *in vitro* de sêmen bovino com altos índices de gota citoplasmática proximal.

RESUMO - O objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos da gota citoplasmática proximal (GCP) no sêmen de bovinos quanto à integridade do DNA, das membranas citoplasmática, acrossomal, no potencial mitocondrial e verificar a taxa de produção de embriões *in vitro*. Três amostras descongeladas de cinco (Controle: espermiograma normal), e oito touros *Bos indicus* (Gota: $GCP \geq 15\%$) foram avaliadas. Foram realizados os seguintes testes: motilidade e vigor pós-descongelação, concentração, morfologia espermática, teste de termo-resistência lento (TTL), integridade da membrana acrossomal, plasmática e potencial mitocondrial utilizando sondas fluorescentes (PI, FITC-PSA e JC-1) e integridade da cromatina pelo método de coloração com laranja de acridina. Dois touros com índices elevados de GCP e três animais controle foram selecionados para fertilização *in vitro* (FIV). As análises estatísticas foram efetuadas empregando-se o programa Statistical Analysis System. O nível de significância foi de 5%. Os resultados obtidos demonstraram que altos índices de GCP não afetaram a motilidade e o vigor, antes e após o TTL, assim como não interferiram na porcentagem de acrossomas intactos. Os resultados destas avaliações mostraram que a alta incidência de GCP afetou a integridade da membrana acrossomal e plasmática bem como a presença de potencial mitocondrial. No entanto, a alta incidência de GCP não promoveu aumento na porcentagem de injúrias à cromatina após descongelação, mas os resultados sugerem que podem ser mais sensíveis à desnaturação quando incubados por três horas. No experimento II, os índices de produção de embriões *in vitro* podem ter sido afetados pela interação da alteração morfológica e o efeito individual do touro.

Palavras chave: Acrossoma, Bovinos, DNA, FIV, Gota citoplasmática proximal, membrana plasmática, potencial mitocondrial.

Evaluation of the integrity of the acrosome, cytoplasmic membrane, chromatin, mitochondrial function and in vitro embryo production of bovine semen with high levels of proximal cytoplasmic droplets.

SUMMARY - The objective of this study was to evaluate the effects of the proximal cytoplasmic droplets (PCD) in bovine semen, on the integrity of DNA, cytoplasmic membrane, acrosome, mitochondrial function and the rate of *in vitro* embryo production. Three batches of five (control group G1: normal sperm parameters) and eight *Bos indicus* bulls (G2: PCD $\geq 15\%$) were analysed. The following tests were carried out: post thaw motility and, vigor, concentration, sperm morphology, slow thermo-resistance (TRT), membrane integrity, acrosome status, mitochondrial function through fluorescent probes (FITC-PSA, PI and JC-1) and integrity of chromatin was accessed by acridine orange stain. Two bulls with high rates of PCD and three animals (control group) were selected for *in vitro* fertilization (IVF). Statistical analyses were performed using the Statistical Analysis System. The significance level was 5%. The results showed that high rates of PCD did not affect motility and vigor, before and after the TRT, and did not affect the percentage of intact acrosome. The results showed that the high incidence of PCD affected membrane integrity, acrosome status and mitochondrial function when compared to the G1 group due. However, the high incidence of PCD did not affect the percentage of chromatin injury after thawing, but results suggest that spermatozoa may be more susceptible to damage when incubated for three hours. In experiment II the embryo production rate may have been affected by the interaction of the morphology traits and the bull effect.

Keywords: Acrosome, bovine, DNA, IVF, Proximal cytoplasmic droplet, plasma membrane, mitochondrial function.

I. INTRODUÇÃO

O setor agropecuário hoje é de grande importância para o equilíbrio da balança comercial do Brasil. O rebanho bovino brasileiro em 2006 era de 205.886.244 cabeças (IBGE, 2008). No ano de 2007 foram comercializadas, entre nacionais e importadas, um total de 7.496.324 doses de sêmen, que significa um crescimento de 354,67% no número de doses comercializadas de 1988 a 2007 (ASBIA, 2008). Esses números associados à importância do Brasil como produtor e exportador de carne bovina, indicam que pesquisas buscando melhorias da qualidade do sêmen de bovinos, são de extrema importância. É necessária maior eficiência na produtividade e um dos meios consiste na melhoria da base genética dos rebanhos (GONZALEZ, 2004).

O objetivo da indústria é identificar touros geneticamente superiores e maximizar o número de seus descendentes por meio da utilização do sêmen destes animais na inseminação artificial (IA), acelerando o ganho genético. Assim, a fertilidade destes touros é de extrema importância para alcançar este propósito (HALLAP, 2005). O reprodutor bovino, como parte imprescindível à cadeia de produção animal, deve apresentar eficiente potencial de fertilidade *in vitro* e *in vivo*, ou seja, capacidade de fecundação. Em particular, o potencial reprodutivo *in vitro* é cada vez mais utilizado para garantir a rápida transmissão de características produtivas desejáveis (SILVA et al., 2003).

Pesquisas iniciadas na década de 20 mostraram que uma grande porcentagem de machos bovinos eram impróprios ou falhos na reprodução. Estas pesquisas concluíram ainda, que os touros não satisfatórios apresentavam lesões patológicas que poderiam ser reveladas pelo exame clínico, pelo exame do ejaculado ou ambos, o que tornava as conclusões mais seguras. No Brasil, a preocupação com a necessidade de avaliar a capacidade sexual de bovinos levados às exposições data da metade do século XX (FONSECA et al., 1992).

Para prever a capacidade fecundante de uma amostra de sêmen existem diversos testes laboratoriais, porém, nenhum teste individual é capaz de prever este potencial com segurança, mas sim o conjunto deles (GRAHAM, 2001).

Alguns destes testes foram utilizados por Phillips et al. (2003), comparando duas medidas de fertilidade a campo: a taxa de concepção e a taxa de não retorno ao cio;

estes autores avaliaram as características pós-descongelamento de sêmen bovino por meio da motilidade, concentração, morfologia e integridade de membrana após duas horas de incubação, e concluíram que estes parâmetros poderiam ser utilizados para prever a fertilidade de touros australianos leiteiros a campo.

A utilização de diversos métodos simultâneos para acessar a fertilidade de um touro ou de um ejaculado é a maneira mais segura de assegurar a veracidade dos resultados obtidos (PHILLIPS et al., 2004). Portanto, apenas as análises de sêmen convencionais podem não representar adequadamente a diversa quantidade de propriedades biológicas que uma célula tão especializada pode expressar (BENCHAIB et al., 2003).

Na última década observou-se um grande avanço no conhecimento dos mecanismos bioquímicos e moleculares que determinam a produção de um espermatozoide funcionalmente competente; graças a estes novos conhecimentos foi possível o desenvolvimento de ferramentas de avaliação do sêmen que contribuem com os métodos já utilizados anteriormente (AITKEN, 2006). A atual pesquisa está concentrada em identificar testes que avaliem o maior número possível de características do sêmen, mas que também sejam de fácil execução e viáveis economicamente. Nesse sentido a utilização de sondas fluorescentes está sendo considerada uma promessa para prever a fertilidade (COLENBRANDER et al., 2003). No presente estudo as sondas fluorescentes foram utilizadas para avaliar a integridade das membranas plasmática e acrossomal e função mitocondrial dos espermatozoides, permitindo analisar por exemplo, a ocorrência de crio-injúrias (CELEGHINI et al., 2005a),

Para assegurar a fertilização do oócito, a célula espermática deve apresentar uma associação de características, tais como membrana citoplasmática íntegra, responsável pela homeostase celular, acrossoma íntegro, crucial para fertilização do oócito, e alto potencial de membrana mitocondrial, responsável pela produção de adenosina trifosfato (ATP), indispensável para o batimento flagelar e motilidade espermática (CELEGHINI et al., 2004). A integridade da cromatina é outro fator importante, uma vez que imperfeições na cromatina são incompatíveis com a fertilidade (BENCHAIB et al., 2003).

Existem evidências de que os fatores associados à baixa qualidade espermática podem resultar em embriões de baixa qualidade, ou falha do embrião ao induzir o reconhecimento materno da gestação (WALTERS et al., 2004). Problemas na interação espermatozóide oócito são a maior causa de baixas taxas de fertilização *in vitro* em humanos, e parecem estar mais associados a defeitos do espermatozóide do que dos oócitos (WALTERS et al., 2005). Liu e Baker (2002) descreveram que a proporção de espermatozóides que se ligaram à zona pelúcida com morfologia normal e anormal está fortemente relacionada às taxas de fertilização *in vitro*.

Com base na literatura pode-se notar que estabelecer parâmetros diversos de avaliação da qualidade espermática, pode ser extremamente importante para garantir um prognóstico mais fiel da fertilidade.

Este trabalho buscou avaliar por meio de diferentes técnicas laboratoriais, as implicações da gota citoplasmática proximal sobre a qualidade espermática procurando relacionar estes resultados com a capacidade de produção *in vitro* de embriões bovinos.

II – REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Morfologia Espermática – Gota Citoplasmática Proximal (GCP)

Em 1677, o cientista Van Leeuwenhoek observou pela primeira vez o espermatozóide e o chamou de “animacula”. Desde então a avaliação morfológica do sêmen tem sido descrita, correlacionando-a com a infertilidade e subfertilidade do macho (PESCH & BERGMANN, 2006).

Diferenças entre tipos de anormalidades espermáticas e o seu impacto na fertilidade já foram reconhecidas por diversos autores. Estas diferenças podem ser baseadas em como uma anormalidade específica afeta a reprodução. Determinadas alterações podem ser compensadas se um número suficiente de espermatozóides normais e vivos estiver presente para otimizar o contato com o oócito e sustentar o processo de fertilização. Assim, alterações que podem causar problemas posteriores, como falha no desenvolvimento embrionário, seriam classificadas como não-

compensáveis, pois a fertilidade deste macho não pode ser compensada pelo aumento da dose inseminante (SAACKE et al., 2000).

A gota citoplasmática proximal é considerada um defeito maior de acordo com a classificação de Blom (1973), e consiste na falha da expulsão do excesso de resíduo citoplasmático resultando na retenção de uma massa na peça intermediária (FISCHER et al., 2003). Esta massa com forma esférica e diâmetro de 2 a 3µm, envolve o pescoço e a região proximal da peça intermediária. Na microscopia de contraste de fase a matriz da gota aparece como um acúmulo de material granular escuro e a peça intermediária pode ser visto através da gota. Observações realizadas com auxílio da microscopia eletrônica demonstraram que as organelas presentes parecem ser derivadas da degeneração do complexo de Golgi, retículo endoplasmático e ainda resquícios da membrana nuclear (BLOM & NICANDER, 1961; BARTH & OKO, 1989).

No processo de maturação espermática que se inicia no testículo e termina na região da cauda do epidídimo, a gota citoplasmática migra de sua posição proximal para o final da peça intermediária do flagelo espermático (CORTADELLAS & DUFORT, 1994).

Teoricamente todos os espermatozóides possuem gota citoplasmática proximal, na cabeça do epidídimo. Durante o processo de maturação, a gota migra da porção proximal do pescoço para a porção distal da peça intermediária, anterior ao *annulus*, onde se desprende devido a uma ruptura na membrana citoplasmática. Grande parte da migração ocorre na porção média da cabeça do epidídimo, havendo ainda migração durante o trânsito no corpo epididimário (BARTH & OKO, 1989). Ainda quanto a sua aparência na microscopia contraste de fase, pesquisas mais recentes descrevem dois tipos de gota citoplasmática, as gotas “leves” e gotas “pesadas” (COOPER et al., 2004; COOPER, 2005; KAWAI et al., 2006).

Altas porcentagens de gota citoplasmática proximal podem ser encontradas no sêmen de touros jovens que ainda não atingiram a puberdade, porém, em touros maduros a porcentagem de espermatozóides com GCP não deve ultrapassar os limites de morfologia espermática normal. A presença de altos índices de espermatozóides com GCP em touros maduros é considerada um sinal de anormalidade na

espermiogênese ou na função epididimária (AMMAN et al., 2000; CHACÓN, 2001; THUNDATHIL, 2001).

O estudo de Thundathil (2001) revelou que espermatozóides com gota citoplasmática proximal falharam durante os testes de “swim-up” e na penetração em zona pelúcida, provavelmente devido à alterações de motilidade ou inadequação estrutural e/ou funcional do espermatozóide. Taxas reduzidas de fertilização, clivagem e desenvolvimento embrionário, sugerem que inclusive os espermatozóides morfológicamente normais presentes no sêmen, com alto índice de gota citoplasmática proximal, também seriam funcionalmente afetados. Neste mesmo trabalho três touros com índices elevados de gota citoplasmática proximal, mostraram recuperação inferior após “swim-up”, falharam no teste de ligação com a zona pelúcida e quando utilizados na FIV, não houve desenvolvimento após a clivagem. Deste modo, sêmen com altas porcentagens de GCP apresenta uma motilidade pós-descongelção baixa e fertilidade reduzida (NOTHLING et al., 1997).

Peña et al. (2007) testaram a capacidade *in vitro* de sêmen canino com taxa superior a 80% de gota citoplasmática proximal e concluíram que houve redução na habilidade de capacitação.

Ainda, García-Macías et al. (2007) avaliaram a integridade da cromatina, morfologia espermática, integridade do acrossoma dentre outros parâmetros e concluíram que a porcentagem de gota citoplasmática proximal, porcentagem de DNA fragmentado e porcentagem de acrossoma intacto em regressão múltipla apresentaram um valor adequado para predizer a fertilidade de uma amostra de sêmen.

2.2. Integridade de Membrana Plasmática

A membrana plasmática envolve completamente o espermatozóide (PESCH & BERGMANN, 2006). A avaliação das membranas espermáticas é um indicador importante do sucesso da criopreservação, uma vez que são extremamente sensíveis às crio-injúrias. As inúmeras funções da membrana citoplasmática estão relacionadas ao metabolismo celular e manutenção da motilidade, capacitação, reação acrossomal, interações entre o espermatozóide e epitélio do trato genital da fêmea e interação com oócito (PEÑA et al., 2005).

A integridade da membrana plasmática garante a manutenção da homeostase celular, atuando como barreira entre os meios interno e externo (AMMAN & PICKET, 1987). Em condições de estresse provocado pela criopreservação, as membranas podem sofrer rearranjos, formando pontos vulneráveis e, com isso, induzir a excessiva permeabilidade ou mesmo rompimento da membrana (AMANN & GRAHAM, 1993). Na membrana espermática, esse estresse está relacionado à fase de transição dos lipídeos, a qual altera o estado funcional da membrana (HOLT et al., 1992).

O iodeto de propídio (PI), corante fluorescente que se liga especificamente ao DNA, não atravessa a membrana plasmática íntegra, corando o núcleo de células com membrana plasmática lesada em vermelho (GARNER et al., 1986; GARNER et al., 1988; GRAHAM et al., 1990; COELHO et al., 1995; CELEGHINI et al., 2004; CELEGHINI et al., 2005a; CELEGHINI et al., 2005b). Este corante vem se destacando em pesquisas pela sua facilidade de preparação e aplicação da técnica, estabilidade e eficiência para avaliar a membrana plasmática, seja isoladamente ou em associação a outras sondas (ARRUDA et al., 2007).

Outras sondas fluorescentes com especificidade com ácido desoxirribonucléico (DNA) também têm sido usadas para determinar a integridade da membrana plasmática, tais como Hoechst 3358 (H258), Hoechst 33342 (H342) e SYBR- 14 (COELHO et al., 1995; CELEGHINI et al., 2007a).

2.3. Integridade do Acrossoma

O acrossoma é essencial para o funcionamento da célula espermática. A reação acrossomal deve ocorrer no momento da fertilização, assim a porcentagem de células com acrossoma íntegro e capazes de realizar a reação acrossomal no devido momento representam uma característica importante do sêmen (KAWAKAMI et al., 1993). No processo de capacitação ocorre perda de proteínas, incluindo fatores de estabilização acrossomal e perda de colesterol da superfície, tornando a membrana mais fluida, facilitando a reação acrossomal. As alterações no influxo de bicarbonato alteram a arquitetura da membrana e promovem a movimentação de hiperativação. Nota-se que o espermatozóide é uma célula extremamente especializada, pois deve interagir

diferentemente com diversos meios, realizar alterações de membrana, de acordo com a fase do processo de fertilização (Den DAAS, 1992).

A integridade do acrossoma espermático é importante, uma vez que ele inicia a reação físico-química do processo de fertilização (BARTH & OKO, 1989).

Vários estudos relatam uma correlação positiva entre a porcentagem de acrossomas intactos e a fertilidade (SAACKE & WHITE, 1972; CORREA et al., 1997).

A aglutinina de *Pisum sativum* (PSA), possui especificidade a glicoproteínas na membrana acrossomal e quando conjugada ao isotiocianato de fluoresceína (FITC) marca o acrossomo lesado em verde amarelado (GRAHAM et al., 1990; CELEGHINI et al., 2004; CELEGHINI et al., 2005a; CELEGHINI et al., 2005b; AITKEN, 2006).

Farlin et al., (1992) avaliaram a precisão e linearidade da sonda FITC-PSA e verificaram um aumento da porcentagem dos espermatozóides marcados com PSA coincidente com o aumento da porcentagem de espermatozóides com acrossomo danificado.

2.4. Potencial Mitocondrial

O conhecimento atual do papel das mitocôndrias nas alterações patológicas tem se expandido rapidamente. As disfunções desta organela são responsáveis por uma grande variedade de problemas, os órgãos ou células envolvidas nestas síndromes são aqueles que demandam grande quantidade de energia respiratória. Alterações no funcionamento da mitocôndria podem ser um fator relacionado à infertilidade. Ela é chave para a manutenção energética da motilidade espermática, um dos maiores determinantes da fertilidade do macho (RUIZ-PESINI et al., 1998).

A energia necessária para motilidade espermática é promovida pelas mitocôndrias localizadas na peça intermediária (GRAVANCE et al., 2000). Estas produzem energia em forma de adenosina trifosfato (ATP) que é quebrada em moléculas de adenosina trifosfatase, liberando a energia necessária para a movimentação da cauda (BARTH & OKO, 1989).

Assim, qualquer mudança na função mitocondrial pode ser refletida na alteração da motilidade espermática (GRAVANCE et al., 2000). A motilidade é o critério mais comum de avaliação da qualidade espermática, pois mede indiretamente a atividade

metabólica e apesar de ser um método simples, dependente da experiência do avaliador.

O espermatozóide apresenta movimento flagelar na presença de energia derivada da produção de ATP. Medidas diretas da função mitocondrial podem ser alternativas úteis para uma avaliação mais precisa da qualidade espermática. Existem aproximadamente 100 mitocôndrias na peça intermediária. Sondas fluorescentes, como a Rhodamina 123, MitoTracker Green, MitoTracker Red, MitoTracker Orange, Mitotracker Deep Red e JC-1, podem ser utilizadas para visualização destas organelas. Porém, apesar dos inúmeros protocolos disponíveis para a utilização destes fluoróforos, muitos problemas são descritos associados a estas técnicas, tais como baixa sensibilidade e interação com o diluidor (HALLAP, 2005).

A energia liberada durante as reações de oxidação na cadeia respiratória mitocondrial é armazenada como um gradiente eletroquímico que consiste de um potencial elétrico trans-membrana ($\Delta \psi$), negativo dentro de cerca de 180-200 mV, e de um gradiente de próton de uma unidade. Esta energia é capaz de conduzir a síntese de ATP para ser utilizada como combustível nos processos celulares. Cátions lipofílicos membrana-permeáveis, denominados de sondas, acumulam-se em células vivas, organelas e lipossomos exibindo um potencial de membrana negativo e têm sido utilizados para decifrar os mecanismos de regulação e controle da transdução energética. Estas sondas incluem aquelas que apresentam atividade óptica e fluorescente após acumulação em sistemas energizados, sondas radio-coradas e sondas não coradas utilizadas com eletrodos específicos (COSSARIZZA, 2007).

A sonda de iodeto de 5, 5', 6, 6' - tetracloro - 1, 1, 3, 3' - tetraetilbenzimidazolilcarbocianina (JC-1) tem sido utilizada para coloração diferencial de mitocôndrias com alto ou baixo potencial de membrana (GRAVANCE et al., 2000). A sonda separa duas populações por código de cor, mostrando mitocôndrias com alto potencial de membrana em vermelho e marcando em verde as com baixo potencial (GARNER et al., 1999; CELEGHINI et al., 2005a; CELEGHINI et al., 2005b).

O uso da sonda JC-1 é mais vantajosa do que as Rodaminas e Carbocianinas, pois é capaz de se ligar seletivamente à mitocôndria e as mudanças de coloração são reversíveis, do verde ao alaranjado de acordo com o aumento do potencial de

membrana acima de valores de 80 a 100mV. Esta propriedade é reversível devido à formação de agregados na membrana polarizada que causam a mudança da emissão de luz de 530nm (emissão das formas monoméricas de JC-1) para 590nm (emissão dos J-agregados), quando excitados a 490nm. Assim, quando a coloração passa de verde para laranja a membrana mitocondrial está mais polarizada (COSSARIZZA et al.,1993; GRAVANCE et al., 2000; COSSARIZZA, 2007). Troiano et al., (1998) observaram correlação significativa entre potencial mitocondrial e motilidade, assim como entre potencial mitocondrial e degeneração da cromatina.

2.5. Integridade da Cromatina

A formação do espermatozóide consiste em um processo único envolvendo uma série de mudanças meióticas e mitóticas das espermatogônias. A substituição das histonas com transcrição de proteínas e adição final de protaminas leva a uma cromatina organizada e acondicionada de maneira singular. O DNA espermático, que ocupa quase o volume total do núcleo, é organizado de forma específica mantendo a cromatina no núcleo compacta e estável. Para alcançar este estado de condensação único, o DNA espermático se organiza de maneira diferente das células somáticas; esta organização garante que o DNA paterno seja transportado e permite a fusão dos genomas favorecendo o desenvolvimento embrionário e a correta expressão da informação genética (ERENPREISS et al., 2006).

Nos mamíferos, o núcleo espermático contém mais de 95% de protaminas. No homem este número se reduz a 85% e como este componente é essencial para a condensação ideal da cromatina, a presença de 15% de histonas no homem determina uma cromatina mais suscetível a descondensação. Ainda, o espermatozóide humano possui dois subtipos de protaminas (P1 e P2), enquanto outras espécies, como os bovinos, possuem apenas o tipo P1. A P2 é deficiente em resíduos de cisteína, gerando uma condensação menos eficiente e conseqüentemente uma organização de cromatina mais instável em humanos (MCLAY & CLARK, 2003).

O estresse ambiental, mutações e anormalidades genéticas podem perturbar estes eventos bioquímicos altamente refinados que ocorrem durante a espermatogênese, levando à imperfeições na cromatina, que seriam incompatíveis com

a fertilidade. As anormalidades na cromatina espermática podem ocorrer em qualquer fase: no processo de condensação e armazenamento do DNA na espermiogênese, como resultado de danos causados por radicais livres, ou ainda em consequência de apoptose (BENCHAIB et al., 2003).

A integridade do DNA de espermatozóides de mamíferos é de importância vital para a contribuição paterna de um descendente normal (SHIBAHARA et al., 2003), uma vez que danos de DNA podem resultar em morte celular e na indução de mutações que podem ser transportadas para a próxima geração ou resultar em infertilidade do macho. Assim, a integridade do DNA se tornou importante como indicador da saúde do espermatozóide (HUGHES et al., 1999).

Estudos *in vitro* e *in vivo* têm mostrado que homens com alta porcentagem de espermatozóides com desnaturação de DNA (mais de 30 a 40 %) têm baixas porcentagens de fecundação (FISCHER et al., 2003).

Uma suscetibilidade aumentada à desnaturação demonstra heterogeneidade da estrutura da cromatina e tem sido relacionada a distúrbios na espermatogênese, morfologia anormal (CARREIRA et al., 2006), concentração e motilidade espermática (BENCHAIB et al., 2003), danos ao desenvolvimento embrionário e consequente fertilidade reduzida (HALLAP, 2005). Os espermatozóides afetados possuem a capacidade de fertilizar oócitos, mas o consequente desenvolvimento embrionário se relaciona ao grau de alteração do DNA (AHMADI & SOON-CHYE, 1999).

Apesar do núcleo ser considerado um compartimento estável e menos afetado pelos processos de congelamento e descongelamento do que as membranas, este componente na célula espermática também pode ser afetado negativamente pela criopreservação (WATSON, 1995).

Høst et al. (2000) descreveram uma porcentagem baixa de oócitos fertilizados *in vitro* (FIV) quando os espermatozóides apresentaram danos elevados da cromatina. Os resultados obtidos por Walters et al. (2005) ainda indicam que espermatozóides morfológicamente normais em meio a altos índices de espermatozóides alterados podem apresentar danos na cromatina acarretando em baixas taxas de fertilidade *in vitro*. O dano da cromatina apenas afetaria o desenvolvimento embrionário depois de

iniciada a expressão gênica do embrião que em bovinos ocorre nos estádios de quatro a oito células (FATEHI et al., 2006).

O interesse na integridade genômica do gameta masculino se intensificou graças ao aumento do uso de técnicas como a injeção intra-citoplásmica de espermatozóide; nesse método o processo de seleção natural *in vivo* e na FIV, não existe gerando uma maior preocupação quanto a transmissão de doenças ou malformações genéticas (LEWIS & AITKEN, 2005; ERENPREISS et al., 2006 e FATEHI et al., 2006).

Os distúrbios na integridade da cromatina são caracterizados pela presença de fratura na banda simples ou dupla da molécula de DNA que leva à formação de segmentos desnaturados (RYBAR et al., 2004).

A microscopia de óptica comum não permite a detecção da condensação anormal da cromatina por meio de técnicas rotineiras como a análise de esfregaços corados ou não corados (BARTH & OKO, 1989). No entanto, técnicas como a coloração de Feulgen, citometria de fluxo e a coloração de laranja de acridina (AO) entre outras, podem ser utilizadas para avaliar a condensação anormal da cromatina em espermatozoides. DOBRINSKI et al. (1994) verificaram que estas três técnicas citadas apresentaram resultados significativamente semelhantes, sendo então válidos para a avaliação dos danos de DNA em espermatozoides.

O teste de laranja de acridina (AO) consiste em um teste simples e que elimina a necessidade de equipamentos caros (AGARWAL et al., 2003). É uma sonda fluorescente que emite a coloração vermelho alaranjada em espermatozoides com DNA desnaturado e verde, naqueles com DNA íntegro (EVENSON et al., 1980; EVENSON, 1980; TEJADA et al., 1984 e EVENSON et al., 1999).

2.6. Fertilização *in vitro* (FIV)

A avaliação da fertilidade é essencial para a inseminação artificial (IA), podendo ser realizada com testes a campo ou em laboratório, por meio da FIV. O uso da IA consiste no método mais preciso, porém, quando comparado a FIV, se revela mais demorada e onerosa (HALLAP, 2005).

A FIV consiste em uma excelente ferramenta de pesquisa para investigar as características de espermatozoides com morfologia anormal quanto à fecundação e

desenvolvimento embrionário. A produção de embriões *in vitro* permite repetidas e diretas observações das interações espermatozóide-oócito (THUNDATHIL, 2001).

O processamento do sêmen representa etapa importante nas tecnologias de reprodução assistida *in vitro* e *in vivo* (BRANDEIS & MANUEL, 1993). Na fertilização *in vitro* o diluidor deve ser removido da amostra de sêmen a ser utilizada, existindo uma variedade de métodos de separação seletivos e não seletivos. O método de lavagem não seletivo produz um sedimento que contém espermatozoides vivos, mortos e alterados, no entanto, a concentração da amostra é bem superior aos outros métodos. Já os métodos seletivos, tais como o gradiente de densidade de Percoll, o “swim up”, métodos de colunas e outros, selecionam os espermatozoides móveis (BRANDEIS & MANUEL, 1993; QUERO et al., 1997; SRISOMBUT et al., 1998; MORSHEDI et al., 2003 e HALLAP, 2005). A escolha do método depende do objetivo da FIV. O método não seletivo é indicado quando as características originais da amostra devem ser mantidas. Porém, para melhorar a qualidade do sêmen, deve-se optar pelos métodos seletivos (HALLAP, 2005).

III. OBJETIVOS GERAIS

Buscou-se colaborar para a compreensão dos diversos fatores que afetam a qualidade do espermatozóide, assim como a produção de embriões. Os objetivos gerais do presente trabalho foram avaliar os efeitos da presença de elevadas porcentagens de espermatozoides com gota citoplasmática proximal nos parâmetros de avaliação qualitativa e quantitativa do sêmen bovino assim como avaliar a capacidade de produção de embriões *in vitro* destas amostras.

3.1. Objetivos específicos

Os objetivos específicos do presente trabalho foram:

-Avaliar o sêmen de bovinos com altos índices e predominância da patologia gota citoplasmática proximal quanto a motilidade progressiva, vigor, teste de termo resistência, concentração e morfologia espermática.

-Avaliar o sêmen de bovinos com altos índices e predominância da patologia gota citoplasmática proximal quanto à integridade de membrana acrossomal, citoplasmática, potencial mitocondrial e integridade da cromatina.

-Verificar as taxas de clivagem e desenvolvimento embrionário *in vitro* do sêmen com altos índices e predominância da patologia gota citoplasmática proximal.

IV. HIPÓTESE

A utilização de parâmetros diversos de avaliação deve produzir resultados mais fidedignos quanto a fertilidade de uma amostra de sêmen. A presença de altos índices de gota citoplasmática proximal no sêmen bovino prejudicaria diretamente ou indiretamente os parâmetros de qualidade espermática e a produção de embriões *in vitro*.

V. MATERIAL E MÉTODO

Os procedimentos *in vitro* foram realizados no Laboratório de Reprodução Animal do Departamento de Clínica, Cirurgia e Reprodução Animal da UNESP - campus Araçatuba. Os procedimentos de colheita e industrialização do sêmen foram realizados em central de inseminação artificial.

5.1. Seleção dos animais e colheita das amostras

Realizou-se estudo experimental casualizado, onde cinco touros *Bos indicus* mantidos em regime semi-extensivo de central de inseminação artificial, que apresentaram valores de espermiograma dentro da normalidade, foram colhidos duas vezes por semana pelo método da vagina artificial completando três colheitas por animal e seus ejaculados congelados de acordo com os padrões pré-estabelecidos da central de inseminação artificial.

Paralelamente oito touros *Bos indicus* com índices elevados de gota citoplasmática proximal foram selecionados para a congelação de sêmen. O sêmen industrializado em palhetas de 250µL, foi acondicionado em raques e estocado em nitrogênio líquido para posterior avaliação.

Nenhum animal apresentou alteração no exame físico do aparelho reprodutor, eram adultos e faziam parte da rotina de coleta da central.

5.2. Experimento I

De cada animal foram descongeladas quatro palhetas por partida (volume total de 1mL), a 35°C por 30 segundos e transferidas para tubos de hemólise com tampa de látex mantidos em banho-maria a 37°C.

Imediatamente após descongelação avaliou-se motilidade progressiva e retilínea (%), vigor (0-5), concentração (espermatozóides/mL), morfologia espermática, e foi realizado o teste de termo-resistência lento (TTL).

Para avaliação da membrana acrossomal, citoplasmática e mitocondrial foi utilizada a associação de sondas fluorescentes PI, FITC-PSA, JC-1, e para avaliação da integridade da cromatina, a coloração com laranja de acridina. As avaliações de motilidade, vigor, porcentagem de acrossoma intacto (PIA) e a integridade do DNA foram repetidas após o TTL.

5.2.1. Motilidade e Vigor

A motilidade e o vigor foram avaliados imediatamente após a descongelação. Uma gota de sêmen foi colocada entre lâmina e lamínula pré-aquecidas a 37°C, e observada em microscópio de contraste de fase (200x). A motilidade foi determinada pela estimativa visual da porcentagem de células em movimento e também pela redução do campo pelo diafragma e contagem de 100 células com movimento progressivo retilíneo e células imóveis. O vigor foi avaliado de acordo com a velocidade do movimento progressivo dos espermatozóides, e classificado de 0 a 5, sendo 0 o mais lento e 5 o mais rápido (FONSECA et al., 1992).

5.2.2. Concentração

Realizou-se contagem das células em câmara de Neubauer à microscopia de contraste de fase (400x), diluindo-se 20µL de sêmen em 1mL de solução formol-salina (FONSECA et al., 1992).

5.2.3. Morfologia espermática

Para a contagem das anormalidades espermáticas foi utilizada a técnica de câmara úmida, onde uma gota de sêmen diluído em solução de KCl (MITCHELL, J.R.- comunicação pessoal) foi depositada entre lâmina e lamínula. Foram contadas 200 células em microscopia de interferência diferencial de fase - DIC (1000x). O número de anormalidades morfológicas foi expresso em porcentagem de acordo com a classificação de BLOM (1973).

5.2.4. Teste de termo resistência lento (TTL)

As amostras acondicionadas em tubos de hemólise e vedadas com rolhas de latex foram mantidas em banho Maria à 37°C por 3 horas. Após este período reavaliou-se a motilidade, o vigor e contou-se a porcentagem de acrossomas intactos - PIA (HERMAN et al., 1996).

5.2.5. Avaliação da integridade de membranas

A integridade das membranas plasmática, acrossomal e mitocondrial foram avaliadas de acordo com protocolo descrito por Arruda & Celleghini (2003) e modificado neste trabalho. Utilizou-se a associação das sondas iodeto de propídio (PI, Sigma, 28707-5), aglutinina de *Pisum sativum* conjugada com isotiocionato de fluoresceína (FITC-PSA, Sigma L-0770) e JC-1 (Molecular Probes, T-3168).

No sêmen pós-descongelamento optou-se por testar dois protocolos de coloração, com e sem centrifugação com o objetivo de retirar o meio diluidor (GONÇALVES, 2006).

No protocolo sem centrifugação, uma alíquota do sêmen foi diluída em meio TALP-sêmen Ca⁺⁺FREE para o volume final de 150µL e concentração de 25x10⁶ espermatozoides/mL. Desta solução 30µL foram transferidos para microtubo e adicionados 2µL de PI (0,2mg/mL), 1,6µL de JC-1 (0,5mg/mL) e 10 µL de FITC-PSA (100µg/mL). Em seguida as amostras foram incubadas (37°C) por oito minutos. Após a incubação, utilizou-se uma gota (10µL) para preparação úmida, entre lâmina e lamínula (pré-aquecidas a 37°C). A leitura foi realizada imediatamente sob microscopia de epifluorescência (microscópio Olympus BX61 - Japão) em filtro com excitação de 460-570nm e emissão de 460-610nm. Foram contadas 200 células e classificadas de

acordo com a fluorescência emitida por cada sonda utilizada (PI, FITC-PSA e JC-1) que resultaram em oito categorias de células, descritas na figura 1. No protocolo com centrifugação, o sêmen foi lavado com meio TALP-sêmen Ca^{++} FREE. A palheta descongelada foi transferida para 500 μL da solução de lavagem e centrifugada por 5 minutos a 94 x g. Desprezado o sobrenadante, o sedimento foi ressuspensionado em 250 μL da mesma solução e novamente centrifugado e ressuspensionado. Avaliou-se a concentração e o ajuste da diluição para 25×10^6 espermatozoides/mL em 150 μL foi realizado. O procedimento de coloração e leitura das lâminas foi idêntico ao descrito acima.

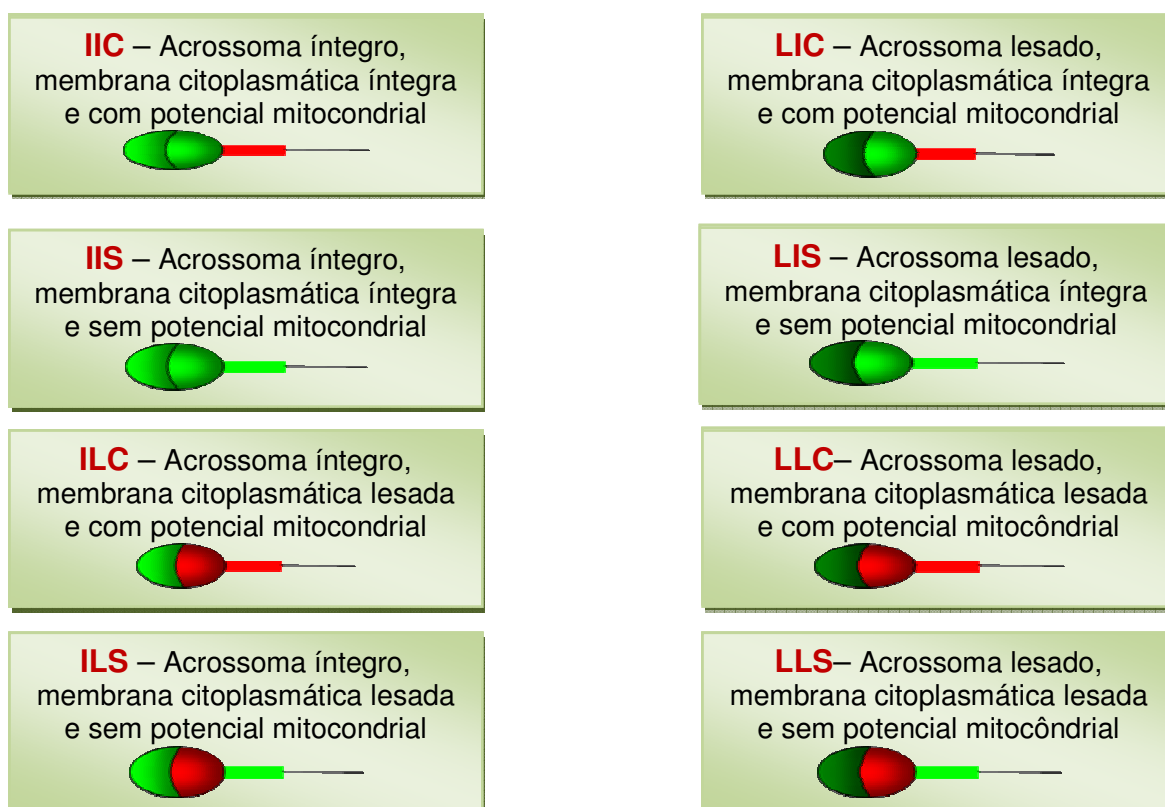


Figura 1. Representação esquemática dos oito padrões de coloração produzidos pela associação de sondas fluorescentes - FITC-PSA (aglutinina de *Pisum sativum* conjugada com isotiocianato de fluoresceína), PI (iodeto de propídio) e JC-1 (iodeto de 5, 5', 6, 6' - tetracloro - 1, 1, 3, 3' - tetraetilbenzimidazolilcarbocianina).

5.2.6. Integridade da cromatina

A análise da estrutura da cromatina foi realizada pela técnica descrita por Evenson et al. (1980); Tejada et al. (1984) e modificada por Unanian, (2000), utilizando o corante fluorescente laranja de acridina, um corante metacromático de DNA que permite a detecção da fragmentação do DNA por código de cor. Uma amostra (100µL) de sêmen foi adicionado a microtubos contendo 100µL de água destilada e centrifugado a 1509 x g por 5 minutos. O sobrenadante foi desprezado, o sedimento ressuspendido em 200µL de água destilada, repetindo a centrifugação. Novamente o sobrenadante é desprezado e o sedimento ressuspendido em 100µL de água destilada.

Em seguida uma amostra de 30µL foi retirada do sedimento formado, para o preparo de pelo menos dois esfregaços que foram deixados secar à temperatura ambiente durante 60 minutos. Os esfregaços foram imersos em Solução de Carnoy (3 partes de metanol para 1 parte de ácido acético) para a fixação por 12 horas. As lâminas foram secas à temperatura ambiente e posteriormente cobertas com 3mL da solução de acridina laranja (10mL da solução de solução de acridina laranja 1µg/mL + 40mL de solução de ácido cítrico 0,1M + 2,5mL de solução de fosfato dissódico 0,3M; pH 2-3), de modo a permanecerem coradas por 5 minutos em ambiente escuro. Os esfregaços foram lavados cuidadosamente em água destilada e antes de secar foram cobertas por lamínulas (24 x 40mm). As lâminas foram examinadas em microscópio de epifluorescência (microscópio Olympus BX61 - Japão) em filtro com excitação de 460-570nm e emissão de 460-610nm. Para cada esfregaço foram contadas 200 células e classificadas de acordo com Tejada et al. (1984), sendo que as células que emitiram fluorescência verde foram consideradas normais, ou seja, com cromatina íntegra, enquanto, as células que emitiram fluorescência vermelha, laranja, amarela distribuídas de forma regular ou irregular no interior da cabeça foram considerados anormais, indicando desnaturação total ou parcial da cromatina.

5.3. EXPERIMENTO II

Para a realização do segundo experimento foi utilizada a técnica de fertilização *in vitro* (FIV), com sete repetições.

5.3.1. Obtenção e seleção dos oócitos

Os ovários de bovinos abatidos nos frigoríficos da região de Araçatuba - SP foram retirados das carcaças, aproximadamente 20 minutos após o abate, mantidos em solução salina estéril a 30-35°C e transportados para o laboratório em garrafas térmicas, não excedendo o limite de 6 horas desde o abate até o início das aspirações. As punções foliculares foram realizadas manualmente, por meio de agulha de calibre 18-G, adaptada a seringa de 10 mL, ambas descartáveis. Todo o material aspirado, transferido para tubos plásticos de 50 mL, foi decantado por 15 minutos para seleção dos oócitos.

O sedimento foi transferido para placas de poliestireno de 60 mm de diâmetro e avaliado em microscópio estereoscópico. Os oócitos com *cumulus* compacto, possuindo pelo menos quatro camadas de células e de aparência saudável (citoplasma de granulação homogênea) foram selecionados para o cultivo de maturação.

5.3.2. Maturação dos oócitos

Os complexos *cumulus*-oócito (COCs) selecionados foram lavados duas vezes em meio de lavagem H-199 (constituído por meio TCM-199, suplementado com 0,2 mM de Piruvato, 20 mM de HEPES, 5 mM de Bicarbonato de sódio, 250 mg de Sulfato de amicacina/mL) e uma vez em meio de maturação B-199 (constituído por meio TCM-199 suplementado com 0,2 mM de Piruvato, 25 mM de Bicarbonato de Sódio, 250 mg de Sulfato de amicacina/mL, 1 µg de 17-β Estradiol/mL, 0,5 µg de FSH/mL, 100 UI de hCG/mL e 10% de SFB). Foram transferidas entre 15 a 20 estruturas/microgota de 100 µl. Os oócitos foram maturados durante 24 horas em estufa a 38,5°C, 100% de umidade e atmosfera de 5% de CO₂ em ar.

5.3.3. Fecundação *in vitro*

Após o cultivo de maturação, os COCs foram submetidos à fecundação *in vitro*. Foram selecionados dois touros com índices diferentes de gota citoplasmática proximal, porém ambos com quantidade acima do limite de normalidade (Gota). O primeiro com 28,5% de GCP (P1) e o segundo com 40,5% desta patologia (P2), a quantidade de outros defeitos maiores e menores foi inferior a 20%. O grupo controle constituiu-se de

três touros com morfologia espermática dentro da normalidade e porcentagem de GCP igual a zero (C1, C2 e C3 – Controle). As palhetas foram descongeladas a 35°C por 30 segundos.

O preparo do sêmen para a FIV foi realizado pelo método de lavagem, buscando com a escolha deste procedimento não reduzir a porcentagem da alteração patológica em questão (GCP) nas amostras, o que poderia ocorrer com uso de métodos como Percoll ou “swim up”.

Após a lavagem, 30µL do sedimento de cada palheta foi recuperado e depositado em um microtubo com 30µL de meio TALP-FIV, sendo feita avaliação de suas características (motilidade e concentração espermática). A concentração foi ajustada para 25×10^6 espermatozoides vivos por mL, sendo adicionados 4 µL desta diluição para cada gota de fecundação (concentração final de 100×10^3 espermatozoides por gota de meio). Após a maturação, os oócitos de cada grupo foram lavados no meio de fecundação (TALP-FIV) suplementado com 10µg/mL de heparina, 160µL de PHE e 0,6% BSA, sendo então transferidos para as microgotas de fecundação (20 oócitos/microgota). A fecundação foi realizada a 38,5°C, por 24 horas em estufa contendo 5% CO₂ em ar atmosférico e 99% de umidade.

5.3.4. Cultivo de desenvolvimento

Os zigotos, após terem sido lavados duas vezes em meio TALP e, uma vez no meio mSOF, foram transferidos para as micro-gotas do cultivo de desenvolvimento *in vitro* (CIV). O cultivo de desenvolvimento embrionário foi realizado em micro-gotas de 100 µL de meio mSOF suplementado com 0,5% de BSA e 2,5% SFB. O cultivo foi conduzido em estufa à temperatura de 38,5°C, contendo 5% de CO₂ em ar atmosférico e 99% de umidade, durante sete dias. A cada 48 horas, 50% do meio de cultivo foram renovados. A avaliação do desenvolvimento embrionário foi realizada às 40 horas pós-inseminação - hpi (clivagem), 168 hpi (formação de blastocistos) e 192 hpi (blastocistos eclodidos e em processo de eclosão).

VI. ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística constituiu-se de Teste t, para comparar os grupos Controle e Gota, quanto à concentração, motilidade, vigor, PIA, porcentagem de GCP, de defeitos maiores totais, defeitos menores totais, total geral de anormalidades espermáticas, ao padrão de coloração obtido com a associação de sondas fluorescentes, quanto à integridade do acrossoma, da membrana plasmática e o potencial mitocondrial; utilizou-se análise de variância e teste de Tukey comparando os grupos Controle e Gota quanto à porcentagem de DNA íntegro, taxas de clivagem, formação de blastocisto e eclosão na FIV e análise de correlação entre a porcentagem de cromatina íntegra e a porcentagem de GCP para os dois grupos antes e após o TTL. Para a análise estatística os dados das porcentagens foram transformados em $\arcsen \sqrt{\%}$. O nível de significância adotado foi de 5% (ZAR, 1999).

As análises estatísticas foram efetuadas empregando-se o programa Statistical Analysis System (SAS, 1999).

VII. RESULTADOS

7.1. EXPERIMENTO I

7.1.1. Morfologia espermática

A análise da morfologia espermática (defeitos maiores e menores) foi realizada em todas as amostras após descongelação. As porcentagens médias e o desvio padrão das alterações morfológicas avaliadas, subdivididas em defeitos maiores e menores estão descritas nos anexos 1 e 2, respectivamente.

Comparou-se a predominância do defeito de gota citoplasmática proximal (Figura 2), objeto de estudo, entre os grupos, bem como a porcentagem de defeitos maiores totais, defeitos menores totais e defeitos totais geral. Os resultados estão dispostos na tabela 1.

Com relação à presença de gota citoplasmática proximal, defeitos maiores e defeitos totais, o grupo Controle diferiu significativamente do grupo Gota, sendo sempre superior neste último, no entanto a porcentagem média de defeitos menores nos dois grupos não foi estatisticamente diferente ($P < 0,05$).

Observou-se que a porcentagem de GCP para o Controle apresentou valores esperadamente inferiores, variando de 0 a 1,5%, sendo que no grupo Gota foram de 12 a 54,5%, assim como de defeitos maiores, que para o Controle foi de 2 a 14% e para o Gota de 17 a 66,5%. Os valores de defeitos menores para o grupo Controle estiveram entre 1 e 9% e para Gota entre 2,5 e 24%. Os defeitos maiores variaram de 4 a 20% e 27,5 a 80% para Controle e Gota, respectivamente.

Tabela 1 – Valores médios (\bar{x}) e desvio padrão (S) das variáveis morfológicas estudadas após descongelação para os grupos Controle (índices normais de morfologia espermática) e Gota (com elevados índices de GCP).

Variáveis morfológicas do ejaculado	Grupo ($\bar{x} \pm S$)		P ^(a)
	Controle (n = 5)	Gota (n = 8)	
GCP	0,51 ± 0,34	24,35 ± 10,34	< 0,0001
Total Maior (%)	4,95 ± 3,03	38,90 ± 8,62	< 0,0001
Total Menor (%)	5,38 ± 2,04	9,48 ± 4,73	0,0867
Total Geral (%)	10,33 ± 3,74	48,38 ± 11,75	< 0,0001

(a) P<0,05 pelo teste t



Figura 2. Grupo Gota – Espermatozoides bovinos com índices elevados de GCP, microscopia de contraste de interferência diferencial de fase (DIC). A) Espermatozoides com morfologia normal. B) Espermatozoides com gota citoplasmática proximal. (câmara úmida, aumento 1000x)

7.1.2. Concentração, motilidade, vigor e PIA

As médias da concentração, motilidade (0h) e o vigor no momento da descongelação (0h), bem como a motilidade (3h), vigor (3h) e a porcentagem de acrossomas intactos (PIA) após três horas de incubação foram analisadas no grupo Controle e no grupo Gota. No grupo Controle a concentração variou de 22,00 a 38,60 $\times 10^6$ espermatozoides/mL, a motilidade de 30 a 55% quando avaliada imediatamente após a descongelação e de 20 a 50% após o TTL. Quando avaliado o vigor, os valores variaram de 4 a 4,5 após descongelação e de 1 a 4 pós-TTL. A porcentagem de PIA foi de 44 a 64%, nesse grupo. Considerando o grupo GOTA os valores para concentração variaram de 21,42 a 44 $\times 10^6$ espermatozoides/mL, a motilidade (0h) de 0 a 65%, após o TTL de 0 a 40%, o vigor após descongelação variou de 0 a 5 e após 3 horas de incubação de 0 a 4. A porcentagem de acrossomas intactos foi de 0 a 73%. Os valores médios das variáveis físicas estão dispostos na tabela 2, não houve diferença significativa entre os grupos Controle e Gota ($P < 0,05$).

Tabela 2 – Valores médios (\bar{x}) e desvio padrão (S) das variáveis físicas (concentração, motilidade 0h, vigor 0h no momento da descongelação, motilidade 3h, vigor 3h após TTL e porcentagem de acrossomas intactos - PIA) estudadas de touros *Bos indicus* com índices de GCP dentro da normalidade (Controle) e de touros *Bos indicus* apresentando elevados índices de gota citoplasmática proximal (Gota).

Variáveis físicas	Grupo ($\bar{x} \pm S$)		P ^(a)
	Controle (n = 5)	Gota (n = 8)	
Concentração (10 ⁶ sptz/ml)	29,18 ± 3,30	31,23 ± 6,29	0,5180
Motilidade 0h (%)	45,42 ± 4,58	40,31 ± 16,83	0,4395
Vigor 0h (0-5)	4,47 ± 0,08	4,03 ± 1,36	0,3926
Motilidade 3h (%)	35,08 ± 21,96	25,26 ± 12,09	0,0564
Vigor 3h (0-5)	3,78 ± 0,44	3,05 ± 1,37	0,1954
PIA (%)	54,65 ± 5,68	42,86 ± 17,03	0,1679

(a) P<0,05 pelo teste t

7.1.3. Avaliação da integridade de membranas

Visando obter uma leitura mais confiável das amostras com as sondas fluorescentes empregadas no experimento, optou-se por testar duas metodologias para diminuir o efeito da interação do diluente adicionado ao sêmen para congelamento.

Ao longo do experimento os resultados obtidos com as amostras não centrifugadas não apresentavam repetibilidade, assim optou-se por avaliar o coeficiente de variação das médias obtidas em cada tratamento. O coeficiente de variação obtido para integridade do acrossoma, da membrana citoplasmática e potencial mitocondrial, foi superior quando as amostras eram coradas sem a retirada do meio diluidor por centrifugação e resuspensão em meio TALP-sêmen. Os resultados obtidos seguem na tabela 3. A interação das sondas fluorescentes com as partículas do meio diluidor dificultou a leitura das lâminas e sobretudo a visualização da peça intermediária nos espermatozoides móveis. A retirada do diluente de sêmen facilitou a observação e contagem das células.

Tabela 3 – Média (\bar{x}), desvio padrão (S) e coeficiente de variação (CV), para os grupos Controle e Gota, corados pela associação de sondas fluorescentes após os métodos de preparação do sêmen pela diluição sem centrifugação e pela lavagem com centrifugação.

Grupo	Método	Acrossoma lesado (%)		Membrana lesada (%)		Sem potencial mitocondrial (%)	
		$\bar{x} \pm S$	CV	$\bar{x} \pm S$	CV	$\bar{x} \pm S$	CV
Controle n=5	Centrifugado	61,57 ± 3,27	5,3	62,17 ± 3,45	5,5	58,43 ± 3,79	6,5
	Diluído	39,67 ± 8,23	20,7	60,37 ± 9,59	15,9	92,97 ± 4,39	4,7
Gota n=8	Centrifugado	68,42 ± 8,76	12,8	78,71 ± 6,09	7,7	76,83 ± 3,99	5,2
	Diluído	39,67 ± 17,90	45,1	67,29±10,87	16,1	87,75 ± 9,65	11,0

A avaliação das amostras dos touros selecionados do presente trabalho foi realizada pelo método de centrifugação para retirada do meio diluidor do sêmen previamente à coloração pela associação das sondas fluorescentes FITC-PSA, PI e JC-1 (Figuras 3,4 e 5). Os resultados obtidos encontram-se nas tabelas 4 e 5.

Dos oito padrões gerados a partir da coloração simultânea das membranas, houve diferença significativa para cinco padrões, entre os grupos controle e patologia ($P < 0,05$). O Controle apresentou maior porcentagem de espermatozoides com membrana íntegra, acrossoma íntegro e com alto potencial mitocondrial (IIC) do que o grupo Gota. Também mostrou maior porcentagem de células com membrana e acrossoma íntegros, sem potencial mitocondrial (IIS) e membrana e acrossoma lesados, mas com potencial mitocondrial (LLC). Quanto aos padrões acrossoma íntegro, membrana lesada, sem potencial mitocondrial (ILS) e membrana e acrossoma lesados, sem potencial mitocondrial (LLS) o grupo Controle obteve médias inferiores as do grupo Gota. Os demais padrões (ILC, LIC e LIS) não apresentaram diferença significativa ($P < 0,05$) e ainda mostraram menor incidência nas amostras observadas.

Tabela 4 – Valores médios (\bar{x}) e desvio padrão (S) dos padrões de coloração fluorescentes obtidos pela associação de sondas - FITC-PSA (aglutinina de *Pisum sativum* conjugada com isotiocionato de fluoresceína), PI (iodeto de propídio) e JC-1(iodeto de 5, 5', 6, 6' – tetracloro - 1, 1, 3, 3' - tetraetilbenzimidazolilcarbocianina), após descongelação e lavagem para os grupos Controle (índice normal de morfologia espermática) e Gota (alto índice de GCP).

Padrão (%)	Grupo ($\bar{x} \pm S$)		P ^(a)
	Controle (n = 5)	Gota (n = 8)	
IIC	28,95 ± 2,78	17,61 ± 4,82	0,0009
IIS	6,72 ± 2,79	2,04 ± 2,40	0,0061
ILC	0,44 ± 0,49	0,36 ± 0,70	0,5980
ILS	2,38 ± 1,67	9,68 ± 4,15	0,0024
LIC	1,99 ± 2,74	1,44 ± 2,65	0,8033
LIS	0,50 ± 1,12	0,35 ± 1,00	0,7770
LLC	10,52 ± 3,50	3,81 ± 3,67	0,0166
LLS	48,18 ± 6,61	64,66 ± 7,03	0,0017

^(a) P<0,05 pelo teste t

Para facilitar a interpretação das leituras obtidas, os padrões foram agrupados quanto à integridade de acrossoma, da membrana e potencial mitocondrial. O grupo Gota, foi significativamente superior ao grupo Controle quanto à porcentagem de membranas plasmáticas e acrossomais lesados, assim como para a porcentagem de células que apresentaram baixo potencial mitocondrial (P<0,05). Resultados são apresentados na tabela 5.

Tabela 5 – Valores médios (\bar{x}) e desvio padrão (S) da integridade da membrana citoplasmática, integridade do acrossoma e presença de potencial mitocondrial, obtidos pela associação de sondas - FITC-PSA (aglutinina de *Pisum sativum* conjugada com isotiocionato de fluoresceína), PI (iodeto de propídio) e JC-1 (iodeto de 5,5',6,6'-tetracloro-1,1,3,3'-tetraetilbenzimidazolilcarbocianina), após descongelamento e lavagem para os grupos Controle (índice normal de morfologia espermática) e Gota (elevados índices de GCP).

Variável	Grupo ($\bar{x} \pm S$)		P ^(a)
	Controle (n = 5)	Gota (n = 8)	
Acrossoma lesado	61,52 ± 3,17	70,26 ± 7,84	0,0388
Membrana lesada	61,84 ± 3,18	78,51 ± 5,31	< 0,0001
Sem potencial mitocondrial	58,10 ± 3,78	76,73 ± 5,44	< 0,0001

^(a) P<0,05 pelo teste t

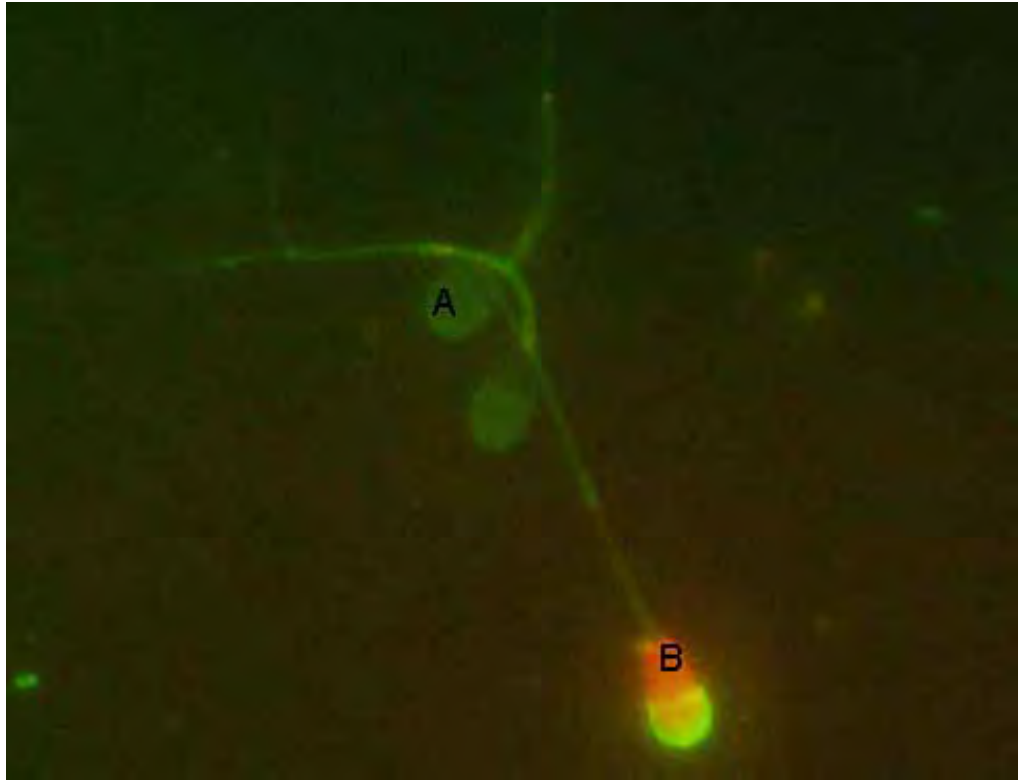


Figura 3. Grupo com patologia (Gota). A) Espermatozoides com acrossoma lesado, membrana citoplasmática íntegra e sem potencial mitocondrial B) Espermatozóide com acrossoma lesado, membrana citoplasmática lesada e sem potencial mitocondrial. (FITC-PSA, JC-1, PI, aumento 1000x).

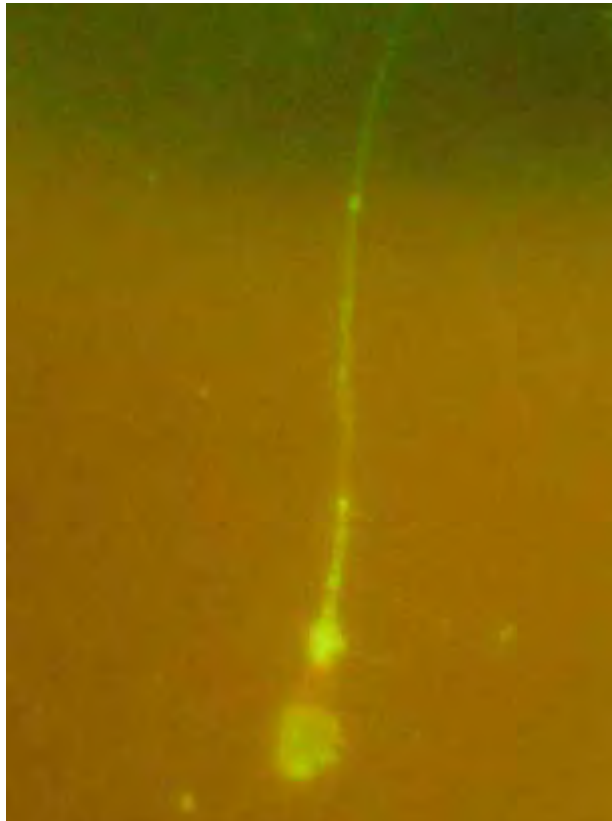


Figura 4. Grupo com patologia (Gota), espermatozóide com gota citoplasmática proximal. Acrossoma lesado, membrana citoplasmática lesada e sem potencial mitocondrial. (FITC-PSA, JC-1, PI, aumento 1000x).

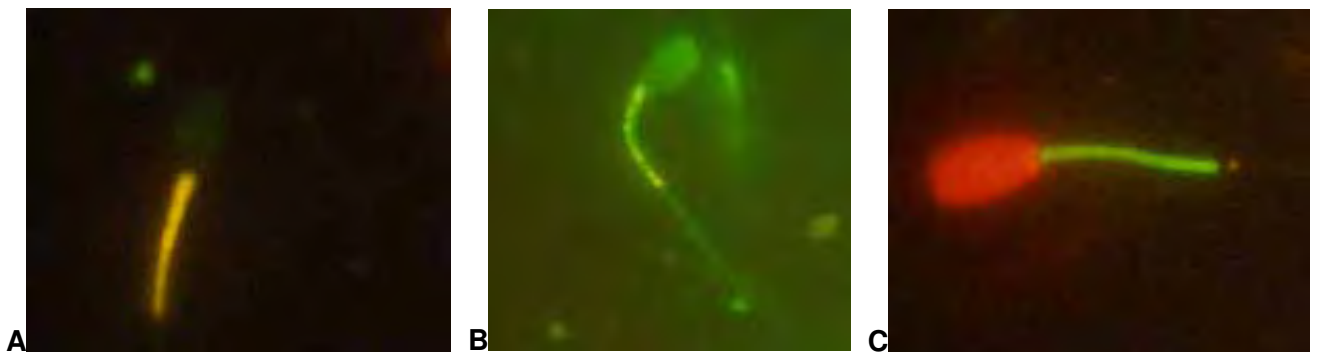


Figura 5. Grupo controle (Controle). A) Espermatozóide com acrossoma íntegro, membrana íntegra e com potencial mitocondrial. B) Espermatozóide com acrossoma lesado, membrana íntegra e com potencial mitocondrial. C) Espermatozóide com acrossoma íntegro, membrana lesada e sem potencial mitocondrial. (FITC-PSA, JC-1, PI, aumento 1000x).

7.1.4. Integridade da cromatina

Os grupos Controle e Gota não apresentaram diferença significativa quanto à porcentagem de DNA lesado ($P > 0,05$) conforme mostra a Tabela 6. Entretanto, o grupo Gota apresentou uma forte correlação positiva entre a porcentagem de DNA lesado e a presença de GCP após o TTL (Tabela 7).

Tabela 6 - Média (\bar{x}) e desvio padrão (S) da porcentagem de DNA lesado, para os grupos Controle (índice normal de morfologia espermática) e Gota (índices elevados de GCP).

DNA lesado (%)	Grupo ($\bar{x} \pm S$)	
	Controle(n = 5)	Gota (n = 8)
0 h	0,50 \pm 0,26	0,71 \pm 0,42
3 h	0,99 \pm 0,43	1,43 \pm 1,32

Médias seguidas de letras diferentes não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p > 0,05$).

Tabela 7 – Correlação entre os valores de DNA lesado e GCP para os grupos Controle (índice normal de morfologia espermática) e Gota (elevados índices de GCP).

Variável	Controle		Gota	
	Correlação	P	Correlação	P
DNA lesado 0 h x GCP	-0,7606	0,1354	0,5496	0,1582
DNA lesado 3 h x GCP	-0,0050	0,9936	0,8397	0,0091

7.2. EXPERIMENTO II

Os resultados das avaliações morfológicas dos touros selecionados para a FIV, provenientes dos grupos com padrões morfológicos dentro da normalidade e dos touros com altos índices de GCP são apresentados na tabela 8. Os três touros (C1, C2 e C3) que fazem parte do grupo controle não apresentaram gota citoplasmática proximal na amostra avaliada (GCP= 0%). Do grupo Gota foram selecionados dois touros, P1 e P2, que apresentaram, 28,5% e 40,5% de GCP, respectivamente e porcentagem de outros defeitos $\leq 20\%$.

Tabela 8 – Valores das variáveis morfológicas dos touros selecionados para FIV provenientes dos grupos Controle (índices de gota citoplasmática dentro da normalidade) e Gota (altos índices de gota citoplasmática proximal).

Touro	Grupo	GCP (%)	Total Maior (%)	Total Menor (%)	Total Geral (%)
C1	Controle	0,0	2,0	2,0	4,0
C2	Controle	0,0	3,5	4,5	8,0
C3	Controle	0,0	2,0	8,5	10,5
P1	Gota	28,5	42,5	6,0	48,5
P2	Gota	40,5	53,0	4,5	57,5

Os resultados obtidos na FIV estão dispostos na tabela 9. Não foi observada diferença significativa entre as taxas de clivagem, formação de blastocistos no dia 8 (D8). A porcentagem blastocistos eclodidos em relação ao número de oócitos fertilizados não foi significativamente diferente para os touros C1 e P1, no entanto, diferiram de C2, C3 e P2. A porcentagem de blastocistos eclodidos provenientes de oócitos fertilizados com P2 foi significativamente menor do que aqueles fertilizados com C1, C2, C3 e P1 ($P>0,05$).

Quando avaliada a porcentagem de blastocistos eclodidos sobre a quantidade de blastocistos no D8, a amostra do touro C1 superou os touros C2, C3, P1 e P2 significativamente ($P>0,05$). Os valores de C2 e P2 foram inferiores aos demais, não deferindo entre si, entretanto diferindo dos demais touros ($P>0,05$). Os touros C3 e P1 apresentaram taxas de clivagem semelhantes estatisticamente, porém foram superiores a C2 e P2 e inferiores a C1.

As taxas de blastocistos eclodidos produzidos a partir dos touros C1, C3 e P1, em relação à taxa de oócitos clivados, não diferiram, porém foram significativamente maiores do que C2 e P2, que por sua vez também não diferiram estatisticamente.

Na tabela 10 encontram-se os dados que correspondem aos resultados da FIV, agrupando os touros em Controle, touros com morfologia espermática dentro da normalidade (C1, C2 e C3) e Gota, animais com altos índices de GCP (P1 e P2). Apesar dos valores para o grupo controle serem discretamente superiores àqueles observados no grupo fertilizado com sêmen com altos índices de GCP, não houve diferença significativa quanto a nenhuma das variáveis avaliadas.

Tabela 9 – Médias e desvio padrão (S) da clivagem, formação de blastocistos (BL) no D8 do cultivo embrionário e taxas de eclosão por número total de oócitos (Ecl/OO), por número de blastocistos no D8 (Ecl/BL) e pela taxa de clivagem (Ecl/Cli), para todos os touros avaliados.

Touro	Variável (média ± S)					
	Nº de oócitos	CLIVAGEM	BL 192H (D8)	ECLOSÃO (Ecl/OO)	ECLOSÃO (Ecl/BL)	ECLOSÃO (Ecl/Cli)
C1	201	71,53 ± 13,81	37,43 ± 15,18	13,69 ± 7,73 a	35,83 ± 19,90 a	17,98 ± 9,65 a
C2	138	57,00 ± 18,18	19,83 ± 8,15	2,96 ± 3,82 ab	6,92 ± 9,44 b	2,53 ± 3,63 b
C3	219	59,34 ± 13,52	39,48 ± 16,05	8,36 ± 6,79 ab	23,41 ± 10,86 ab	16,50 ± 7,91 a
P1	210	72,03 ± 17,31	39,62 ± 11,28	12,15 ± 10,13 a	24,19 ± 14,54 ab	16,05 ± 11,13 a
P2	295	50,24 ± 21,87	21,29 ± 10,84	1,77 ± 2,65 b	6,31 ± 4,55 b	2,68 ± 3,45 b

Médias seguidas de letras diferentes diferem entre si pelo teste de Tukey (p> 0,05)

Tabela 10 - Médias e desvio padrão(S) da clivagem, formação de blastocistos no D8 do cultivo embrionário e taxas de eclosão por número total de oócitos, por numero de blastocistos no D8 e pela taxa de clivagem, para os grupos controle (Controle) e patologia (Gota).

Grupo	Variável (média ± S)					
	Nº de oócitos	CLIVAGEM	BL 192H (D8)	ECLOSÃO (Ecl/OO)	ECLOSÃO (Ecl/BL)	ECLOSÃO (Ecl/Cli)
Controle	558	63,59 ± 15,40	33,42 ± 15,69	9,05 ± 7,59	23,98 ± 18,37	13,37 ± 10,01
Gota	505	60,30 ± 22,18	29,75 ± 14,22	6,56 ± 8,68	14,57 ± 14,83	8,85 ± 10,28

Médias seguidas de letras diferentes diferem entre si pelo teste de Tukey (p> 0,05)

VIII. DISCUSSÃO

O objetivo do presente estudo foi avaliar o efeito de índices elevados de gota citoplasmática proximal nas análises convencionais do sêmen congelado e observar a sua influência quando realizada a FIV.

No grupo Gota, devido ao delineamento experimental, houve predominância significativa da alteração gota citoplasmática proximal. A distribuição dos outros defeitos foi uniforme para as amostras e nunca superior ao defeito em estudo (GCP).

Diferenças estatísticas quanto às variáveis físicas não foram evidenciadas, uma vez que os valores da concentração, motilidade e vigor antes e após o teste de termo resistência lento, assim como a porcentagem de acrossomas intactos mostraram-se muito semelhantes nos dois grupos. Estes achados diferem daqueles obtidos por outros pesquisadores (BLOM, 1973; NOTHLING et al., 1997; ZINI et al., 1998), onde elevados índices de gota citoplasmática proximal resultaram em motilidade reduzida. Mesmo índices baixos de GCP (5 a 10%) demonstraram relação com a redução da motilidade (BLOM, 1973). Em humanos, Zini et al (1998) observaram uma correlação negativa entre a porcentagem de gota citoplasmática proximal e a motilidade progressiva. No entanto, avaliando sêmen canino com 80% de gota citoplasmática proximal, Peña et al (2007) relatam uma motilidade de 80 a 85%, inclusive superior ao grupo controle. A porcentagem de acrossomas íntegros avaliados após três horas de incubação revelaria injúrias latentes (HERMAN et al., 1996). No presente estudo não houve diferença significativa entre a porcentagem de acrossomas íntegros de espermatozóides normais e espermatozóides com gota citoplasmática proximal corroborando com estudo semelhante (THUNDATHIL et al., 2001).

Para a avaliação da integridade das membranas e potencial mitocondrial foram testados dois protocolos, o descrito por Arruda (2003) e o utilizado para este trabalho, com centrifugação das amostras, este protocolo foi baseado no experimento conduzido por Gonçalves, 2006, no qual o sêmen avaliado era proveniente das microgotas de fertilização e conseqüentemente previamente centrifugado. Adotou-se a centrifugação prévia das amostras para retirada do meio diluente. Ao comparar as duas técnicas, uma maior nitidez nas leituras pôde ser constatada, provavelmente devido à redução da interação dos corantes com partículas do meio diluente. Esses achados corroboram

com trabalhos recentes que também sugerem a remoção das partículas da gema de ovo para uma avaliação mais acurada da integridade espermática pós-criopreservação. (NAGY et al., 2003; HALLAP, 2005). A técnica adaptada originou resultados com maior repetibilidade quando comparada aos obtidos apenas com a diluição das amostras. Porém, observou-se nas amostras centrifugadas uma porcentagem maior de acrossomas lesados e espermatozóides com baixo potencial mitocondrial tanto no grupo controle como no grupo com patologia. O efeito da centrifugação, como a duração e a força na análise do sêmen já foram pesquisadas em diversas espécies (PICKETT et al., 1975; SHEKARRIZ et al., 1995; RIJSSELAERE et al., 2002). O tempo de centrifugação foi mais prejudicial ao sêmen humano quando comparado à força de centrifugação (SHEKARRIZ et al., 1995; KATKOV & MAZUR, 1998). Já vários fatores concomitantes como a temperatura, diluente, volume, tempo e força da centrifugação seriam responsáveis pelos danos causados em sêmen eqüino (DELL'AQUA, 2000). No presente estudo a centrifugação prévia causou alterações estruturais nos dois grupos, mas proporcionou uma maior clareza na leitura, incrementando a utilização da técnica de associação de sondas fluorescentes (FITC-PSA, PI e JC-1). Os resultados obtidos por esta técnica corresponderam às expectativas do presente estudo, quando os oito padrões produzidos foram avaliados.

O grupo Controle apresentou maior porcentagem de espermatozóides com acrossoma íntegro, membrana íntegra e alto potencial mitocondrial (IIC), acrossoma íntegro, membrana íntegra e sem potencial mitocondrial (IIS) e acrossoma lesado, membrana lesada e com potencial mitocondrial (LLC), sugerindo que o grupo controle possuía maior número de espermatozóides com características positivas quando comparado ao grupo com patologia. O grupo Gota apresentou maior porcentagem de espermatozóides com acrossoma íntegro, membrana lesada e sem potencial mitocondrial (ILS) e espermatozóides com todas as características indesejáveis como acrossoma lesado, membrana lesada e sem potencial mitocondrial.

Quando os indicadores funcionais do espermatozóide foram agrupados em integridade da membrana, do acrossoma e potencial mitocondrial, o grupo com alteração patológica (Gota) apresentou valores inferiores ao grupo Controle nos três parâmetros estudados. Os efeitos deletérios da criopreservação sobre as membranas e

potencial mitocondrial do espermatozóide têm sido motivo de numerosas pesquisas (WATSON, 1995; CORREA et al., 1997; NAGY et al., 2002; O' CONNELL et al., 2002; ARRUDA & CELEGHINI, 2003; GONZALEZ, 2004; CELEGHINI et al., 2005a), no entanto, há poucos relatos indicando uma maior susceptibilidade destas estruturas em sêmen com altos índices de uma alteração morfológica específica. Espermatozóides morfológicamente anormais parecem ser mais susceptíveis a danos causados pelo estresse oxidativo. A produção excessiva de espécies oxigênio reativas (ROS) por espermatozóides contendo GCP, podem induzir dano oxidativo (SAID et al., 2005), que causa disfunções na célula espermática por meio de diversos mecanismos, como a peroxidação de lipídeos da membrana plasmática, ocasionando a perda da fluidez e da capacidade de regular a concentração intracelular de íons, da motilidade e do metabolismo (AITKEN & KRAUSZ, 2001 e GUERRA et al., 2004). De acordo com estas observações, os índices mais elevados de acrossoma lesado, membrana plasmática lesada e baixo potencial mitocondrial podem estar relacionados a lesões do tipo oxidativas causadas pelo excesso de produção de ROS do grupo com elevados índices de GCP.

A avaliação da integridade da cromatina analisada antes e após o teste de termo-resistência lento não mostrou diferença significativa. Semelhante a outros estudos a porcentagem de DNA lesado foi bastante reduzida (JANUSKAUSKAS et al., 2003; HALLAP, 2005). No entanto, Bochenek et al. (2001) encontraram uma variação de 2,1 a 23,8% de células com DNA desnaturado em bovinos e estudos em espermatozóides humanos demonstraram taxas ainda mais elevadas, em torno de 30 a 40% (FISCHER et al., 2003). Essa diferença pode ser explicada pela estrutura do espermatozóide bovino, onde a cromatina possui apenas protaminas do tipo P1 resultando em uma condensação mais eficiente, e conseqüentemente menos suscetível às injúrias quando comparada, por exemplo, com a espécie humana (MCLAY & CLARK, 2003).

O grupo GOTA, com altos índices de GCP, apresentou forte correlação positiva entre a porcentagem de DNA lesado após o teste de termo-resistência lento e a quantidade de GCP. Segundo Evenson (1980) o DNA de células com alterações morfológicas é menos resistente à desnaturação térmica. Em humanos, amostras de

sêmen com alterações morfológicas incubadas por três horas, apresentaram maior porcentagem de danos na estrutura da cromatina do que amostras controle, assim como, quando incubadas com agentes oxidantes, se mostraram mais sensíveis à degeneração do DNA (SAID et al, 2003).

Na segunda fase deste trabalho (experimento II), o sêmen de dois bovinos com elevadas porcentagens de GCP e três touros com parâmetros espermáticos dentro da normalidade foram testados para produção de embriões *in vitro*.

Estudos realizados anteriormente (AMANN, 2000; THUNDATHIL, 2001; NICHI et al., 2007) demonstraram que sêmen bovino contendo altas porcentagens de GCP falhou em diversos testes realizados para predizer a capacidade fecundante destas amostras. Segundo Thundathil et al. (2001) três touros contendo índices elevados de GCP foram inferiores ao controle no teste de ligação com a zona pelúcida, não promoveram fertilização e nem desenvolvimento embrionário. Porém, no teste de penetração da zona pelúcida obtiveram resultado semelhante ao do grupo controle, justificado pelo autor pela presença de espermatozóides com morfologia normal no ejaculado, que supostamente seriam capazes de penetrar a zona pelúcida, mas incapazes de fertilizar os oócitos e sustentar o desenvolvimento embrionário, pois teriam sido afetados pela alta produção de ROS dos espermatozóides com GCP coexistente na amostra.

Amann et al. (2000) avaliaram touros jovens com altas e baixas porcentagens de GCP e observaram que as taxas de clivagem dos dois grupos foram diferentes. Sendo o grupo com baixa porcentagem de GCP, aquele com maior porcentagem de clivagem, porém a porcentagem de embriões clivados que se desenvolveram para o estágio de mórula e blastocisto foram semelhantes para os dois grupos. Neste estudo os autores obtiveram amostras com 40 a 50% de GCP produzindo taxas de clivagem em torno de 26 a 46%, divergentes dos outros animais deste grupo, este fato foi justificado, assim como no trabalho de Thundathil et al. (2001) pela presença de espermatozóides com morfologia normal na amostra, e pela suposição de que nestas amostras a redução de espermatozóides viáveis para fecundação na gota não seria tão deletéria quanto em outras. Fato que possivelmente não se repetiria em sistemas de inseminação artificial, onde provavelmente em certas amostras a concentração teria que ser aumentada.

Segundo este grupo a habilidade de se ligar à zona pelúcida pode estar associada à severidade do defeito. Espermatozóides com morfologia anormal podem ligar-se e penetrar na zona pelúcida, todavia promovem uma baixa taxa de fertilização, devido a defeitos que ocorrem após este processo, como a não fusão do espermatozóide com o oolema, a descondensação nuclear ou a não-formação do pró-núcleo masculino.

Estudos com espermatozóides de ratos descrevem dois tipos de gota citoplasmática, gotas “leves” e gotas “pesadas”, de acordo com sua aparência à microscopia de contraste de fase. Somente a presença de altos índices de gotas do tipo “pesadas” prejudicaria as taxas de formação de embriões com duas células (KAWAI et al., 2006). Achado que se assemelha à discussão de outros pesquisadores (COOPER et al., 2004; COOPER, 2005) que sugerem a existência de dois tipos de GCP em humanos, sendo que apenas a retenção de “gotas verdadeiras” traria alterações na fertilidade. Todavia, gotas encontradas em animais domésticos seriam classificadas como “gotas verdadeiras”, provenientes da retenção de material citoplasmático.

No presente trabalho os resultados obtidos nas taxas de clivagem, formação de blastocisto e eclosão, não diferiram entre os grupos controle e patologia, porém estes resultados não podem ser avaliados desconsiderando o desempenho individual dos touros testados nesta fase.

Quando avaliados individualmente, pode-se observar que não houve diferença entre as taxas de clivagem e formação de blastocisto entre os cinco touros. Porém, quando se observam as taxas de eclosão, os resultados são bastante variados. Os touros C1, C3 e P1 apresentam um comportamento semelhante, assim como os touros C2 e P2. Considerando que os resultados obtidos por C1, C3 e P2 corroboram com os descritos pela literatura, pode-se sugerir que o comportamento discrepante dos touros P1 e C2, pode ser efeito da resposta individual dos touros ao processo de FIV. No entanto, avaliando-se os resultados da produção individual de embriões, desde as taxas de clivagem até a eclosão, percebe-se que todos os animais se comportaram de forma inesperada, produzindo taxas semelhantes de clivagem e formação de blastocistos, divergindo dos estudos realizados por outros autores (AMMAN et al., 2000; THUNDATHIL, 2001; THUNDATHIL et al., 2001). Pode-se sugerir então, que a porcentagem de espermatozóides aparentemente viáveis nas amostras foi suficiente

para a fertilização e para sustentar o desenvolvimento embrionário até antes da eclosão, ou ainda mais, que o efeito individual existente entre reprodutores foi o fator que mais interferiu nestes resultados.

Outros autores relatam o efeito do touro na motilidade (MILLER & HUNTER, 1984 e DAVIS & FOOTE, 1987), na capacitação *in vitro* (LAMBERT & SIRARD, 1984) e nas taxas de FIV (PARRISH et al., 1986). As diferenças existentes entre touros são manifestadas, tanto na capacidade fecundante como na competência de desenvolvimento, mesmo quando algumas variáveis (concentração espermática e de heparina) são padronizadas (COELHO et al., 1998). Os efeitos da morfologia espermática na fertilização e desenvolvimento embrionário podem ser somados às características individuais dos touros influenciando a resposta à capacitação *in vitro*, taxa de fertilização e conseqüente desenvolvimento embrionário (WALTERS et al., 2005) como também podem indicar a capacidade de fecundação *in vivo* (WATANABE et al., 1999; WATANABE et a., 2000). Desta forma os achados na literatura e deste trabalho ressaltam a importância do componente genético de cada indivíduo para os procedimentos de FIV.

IX. CONCLUSÃO

Com base nos resultados obtidos nos experimentos I e II, pode-se concluir que:

- A utilização simultânea de diversos métodos de avaliação espermática é capaz de demonstrar diversos aspectos relacionados à qualidade do sêmen.
- A presença de altos índices de gota citoplasmática proximal não afeta a motilidade e o vigor, tanto antes quanto após o teste de termo resistência.
- A presença de altos índices de gota citoplasmática proximal não interfere na porcentagem de acrossomas intactos após o teste de termo resistência lento.
- Altos índices de GCP afetam negativamente a integridade da membrana acrossomal e plasmática bem como a presença de potencial mitocondrial após a descongelação.
- A alta incidência de GCP não promove aumento na porcentagem de injúrias à cromatina após descongelação.

- A cromatina de espermatozóides em amostras com altos índices de GCP é mais sensível à desnaturação quando incubadas por três horas (teste de termo-resistência lento).
- Os índices de produção de embriões *in vitro* podem ser afetados pela interação da morfologia alterada e o efeito individual do touro.

X. IMPLICAÇÕES

Os resultados discutidos neste trabalho indicam a importância da adoção de parâmetros amplos de avaliação espermática. Estas análises devem ser rotineiras, traçando aspectos diversos da fertilidade de uma amostra ou ainda, de um touro, a partir da coleção de dados *in vitro* e possivelmente *in vivo*.

XI. DESAFIOS FUTUROS

- Motilidade pode não estar alterada, mas pode haver prejuízo na qualidade do movimento que seriam detectadas com outros testes, como CASA.
- Avaliar a produção de ROS de amostras de sêmen com altos índices de GCP.
- Verificar se a porcentagens de espermatozóides morfologicamente normais em uma amostra é suficiente para garantir a fertilização, detectar quais os espermatozóides predominantemente fertilizam os oócitos *in vitro*.
- Comparar os resultados da fertilização *in vitro* com resultados *in vivo* por meio da inseminação artificial favorecendo a seleção natural dos espermatozóides alterados realizada no trato genital da fêmea.

XII. REFERÊNCIAS

AGARWAL, A.; SAID, T.; Role of sperm chromatin abnormalities and DNA damage in male infertility. **Human Reproduction Update**. v.9(4), p.331-345, 2003.

AHMADI, A.; SOON-CHYE N. Fertilizing ability of DNA-damaged spermatozoa. **The Journal of Experimental Zoology**. v.284(6), p.696-704, 1999.

AITKEN, R.J. Sperm function tests and fertility. **International Journal of Andrology**. v.29, p.69-75, 2006.

AITKEN, R.J.; KRAUSZ, C. Oxidative stress, DNA damage and the Y chromosome. **Reproduction**. v.122, p.497-506, 2001.

AMMAN, R.P.; PICKETT, B.W. Principles of cryopreservation and a review of cryopreservation of stallion spermatozoa. **Equine Veterinary Science**. v.7, p.143-173, 1987.

AMANN, R.P., GRAHAM, J.K. **Spermatozoal function**. In: McKINNON, A. O., VOSS, J.L. **Equine Reproduction**. 1ª. ed. Philadelphia: Lea & Febinger, 1993, Cap. 80, p.715-746.

AMANN, R.P., SEIDEL G.E., MORTIMER R.G. Fertilizing potential in vitro of semen from young beef bulls containing a high or low percentage of sperm with a proximal droplet. **Theriogenology**, v.54, p.1499-1515, 2000.

ARRUDA, R. P. CELEGHINI, E. C. C. Validação de técnica para avaliação simultânea das membranas plasmática, acrossomal e mitocondrial de espermatozoides bovinos. **Acta Scientiae Veterinariae**. v.31, p.230-231, 2003.

ARRUDA, R.P.; ANDRADE, A.F.C.; PERES, K.R.; RAPHAEL, C.F.; CELEGHINI, E.C.C. Biotécnicas aplicadas à avaliação do potencial de fertilidade do sêmen eqüino. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**. v.31(1), p.8-16, 2007.

ASBIA (Associação Brasileira de Inseminação Artificial). Disponível em www.asbia.org.br acesso em: 08 de março de 2008.

BARTH, A.D.; OKO, R.J.; **Abnormal morphology of bovine spermatozoa**. Estados Unidos: Iowa University Press.1989. 285p.

BAYYARI, G.R.; COOK, J.R.; HARRIS Jr, G.C.; MACY, L.B.; SLAVICK, M.F.; SKEELES, J.K. Research note: The evaluation of chicken spermatozoa using a fluorescent staining in a 96-well format. **Poultry Science**, v. 69, p. 1602-1605, 1990.

BENCHAIB, M.; BRAUN, V.; LORNAGE, J.; HADJ, S.; SALLE, B.; LEJEUNE, H.; GUERIN, J.F. Sperm DNA fragmentation decreases pregnancy rate in an assisted reproductive technique. **Human Reproduction**. v.18(5), p.1023-1028, 2003.

BLOM, G.; NICANDER, L. On the ultrastructure and development of the protoplasmic droplet of spermatozoa. **Cell and Tissue Research**. v.55, p.833-844, 1961.

BLOM, E. Ultrastructure of some characteristic sperm defects and a proposal for a new classification of the bull spermogram. **Nordisk Veterinaer Medicin**. v.25, p.383-391, 1973.

BRANDEIS, V.T; MANUEL, M.T. Effects of four methods of sperm preparation on the motile concentration, morphology, and acrossome status of recovered sperm from normal semen samples. **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**. v.10(6), p.409-416, 1993.

BOCHENEK, M.; SMORAG, Z.; PILCH, J. Sperm chromatin structure assay of bull qualified for artificial insemination. **Theriogenology**, v.56, p.557-567, 2001

CARREIRA, J.T.; KOIVISTO, M.B.; MINGOTI, G.Z.; PERRI, S.H.V. Correlation between DNA integrity and high levels of proximal cytoplasmic droplets in bovine spermatozoa. In: International Symposium on Animal Biology of Reproduction, 2006, Belo Horizonte. **Animal Reproduction**. v.3, p.242, 2006.

CELEGHINI, E.C.C.; ARRUDA, R.P.; ANDRADE, A.F.C.; RAPHAEL, C.F.; NASCIMENTO, J. Simultaneous evaluation of the plasmatic, acrossomal and mitochondrial membranes in equine spermatozoa. In: XV International Congress on Animal Reproduction, 2004, Porto Seguro. **XV International Congress on Animal Reproduction**. p.511, 2004.

CELEGHINI, E.C.C.; ANDRADE, A.F.C.; NASCIMENTO, J.; RAPHAEL, C.F.; BIANCONI, L.L.; RODRIGUES, P.H.M.; ARRUDA, R.P. Efeitos da criopreservação e do diluidor sobre o sêmen bovino quanto às membranas plasmática, acrossomal e função mitocondrial. In: Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Tecnologia de Embriões, 2005, Angra dos Reis. **Acta Scientiae Veterinariae**. v.33 (supl.1), p. 327-327, 2005a.

CELEGHINI, E.C.C.; NASCIMENTO, J.; RAPHAEL, C.F.; SOUZA, L.W.O.; ARRUDA, R.P. Uso de CMXROS e JC-1 na avaliação da função mitocondrial, associadas a sondas fluorescentes para avaliação da membrana plasmática e acrossomal em espermatozóides bovinos. In: Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Tecnologia de Embriões, 2005, Angra dos Reis. **Acta Scientiae Veterinariae**. v.33 (supl.1), p.321-321, 2005b.

CELEGHINI, E.C.C.; ARRUDA, R.P.; ANDRADE, A.F.C.; NASCIMENTO, J.; RAPHAEL, C.F. Practical Techniques for Bovine Sperm Simultaneous Fluorimetric Assessment of Plasma, Acrossomal and Mitochondrial Membranes. **Reproduction in Domestic Animals**. v.42, p.479-488, 2007a.

CELEGHINI, E.C.C. ; ARRUDA, R.P.; ANDRADE, A.F.C.; NASCIMENTO, J.; RAPHAEL, C.F.; RODRIGUES, P.H.M. Effects that bovine sperm cryopreservation using two different extenders has on sperm membranes and chromatin. **Animal Reproduction Science**. 2007b. Article in press.

CHACÓN, J. Assessment of sperm morphology in zebu bulls, under field conditions in the conditions in the tropics. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 36 (2), p.91-99, 2001.

COELHO, L.A.; ESPER, C.E. ; GARCIA, J.M. Avaliação da Integridade da Membrana Plasmática dos Espermatozóides de Bovinos, através de Corantes Fluorescentes e sua Relação com a Motilidade Progressiva. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte-MG, v.19, p. 173-180, 1995.

COELHO, L.A.; ESPER, C.R.; GARCIA, J.M.; VANTINI, R.; SILVA FILHO, I.R.; ALMEIDA Jr, I.L. Avaliação das condições de maturação oocitária e do efeito do reprodutor na produção in vitro de embriões bovinos. **Brazilian Journal of Veterinary Research on Animal Science**. v. 35, p. 120-122, 1998.

COLENBRANDER, B.; GADELLA, B.M.; STOUT, T.A. The predictive value of semen analysis in the evaluation of stallion fertility. **Reproduction in Domestic Animals**. v.38, p.305-311, 2003.

COOPER, T.G. Cytoplasmic droplets: the good, the bad or just confusing? **Human Reproduction**. v.20, p. 9–11, 2005.

COOPER, T.G.; CHING-HEI YEUNG, C.H.; FETIC, S.; SOBHANI, A.; NIESCHLAG, E. Cytoplasmic droplets are normal structures of human sperm but are not well preserved by routine procedures for assessing sperm morphology. **Human Reproduction**. v. 19, p. 2283–2288, 2004.

CORREA, J.R.; PACE, M.M.; ZAVOS, P.M. Relationships among frozen-thawed sperm characteristics assessed via the routine semen analysis, sperm functional tests and fertility of bulls in an artificial insemination program. **Theriogenology**. v.48. p.721-731, 1997.

CORTADELLAS, N; DUFORT, M. Fate and composition of cytoplasmic droplet of hamster epididymal spermatozoa. **Journal of Morphology**. v.221, p.199-210, 1994.

COSSARIZZA, A.; BACCARANI-CONTRI, M.; KALASHNIKOVA, G.; FRANCESCHI, C. A new method for the cytofluorimetric analysis of mitochondrial membrane potential using the J-aggregate forming lipophilic cation 5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazolcarbocyanine iodide (JC-1). **Biochemistry Biophysic Research Communications**, v.197, p.40-45, 1993.

COSSARIZZA, A. **Measure of mitochondrial membrane potential ($\Delta\Psi$) with fluorescent probe JC-1**. CD-ROM Series, vol. 3, Purdue University Cytometry Laboratories Website.

<http://www.cyto.purdue.edu/cdroms/flow/vol3/16/data/page13.htm> (acesso em 14 de junho de 2007)

DAVIS, A. P.; FOOTE, R. H. Relationship of Sire Fertility to Acrosome-Reacted and Motile Spermatozoa After Treatment with Liposomes. **Journal of Dairy Science**. v. 70, p. 850-857, 1987.

DELL'AQUA Jr., J. A. **Efeito da centrifugação, tipos de envase e temperatura de descongelação sobre os parâmetros espermáticos e índices de fertilidade relacionados com o local de deposição e concentração da dose inseminante do sêmen congelado eqüino**. Dissertação de Mestrado – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu. 2000. 81p.

Den DAAS, N. Laboratory assessment of semen characteristics. **Animal Reproduction Science**, v.28. p.87-94. 1992.

DOBRINSKI, I., HUGHES H.P., BARTH A.D. Flow cytometric and microscopic evaluation and effect on fertility of abnormal chromatin condensation in bovine sperm nuclei. **Journal of Reproduction and Fertility**. v.101, p.531-538, 1994.

ERENPREISS, J.; SPANO, M.; EREMPREISA, J.; BUNGUM, M.; GIWEREMAN, A. Sperm chromatin structure and male fertility: biological and clinical aspects. **Asian Journal of Andrology**. v.8(1), p.11-29, 2006.

EVENSON, D.P.; DARZYNKEIWICZ, Z.; MELAMED, M.K. Relation of mammalian sperm chromatin heterogeneity to fertility. **Science**. v.210, p.1131-1133. 1980.

EVENSON, D.P.; DARZYNKIEWICZ, Z.; MELAMED, M.R.; Relation of mammalian sperm chromatin heterogeneity to fertility. **Science**, v.210, p.1131-33, 1980.

EVENSON, D.P.; JOST L.K.; MARSHALL D.; ZINAMAN, M.J.; CLEGG, E.; PURVIS, K.; ANGELIS, P.; CLAUSSEN, O.P. Utility of sperm chromatin structure assay as a diagnostic and prognostic tool in human fertility. **Human Reproduction**. v.14, p.1039-1049, 1999.

FARLIN, M.E.; JASKO, D.J.; GRAHAM, J.K.; SQUIRES, E.L. Assessment of Pisum sativum agglutinin in identifying acrosomal damage in stallion spermatozoa. **Molecular Reproduction Devices**. v.32, p.23-27, 1992.

FATEHI, A.N.; BEVERS, M.M.; SCHOEVEERS, E.; ROELEN, B.A.; COLENBRANDER, B.; GADELLA, B.M. DNA damage in bovine sperm does not block fertilization and early embryonic development but induces apoptosis after the first cleavages. **Journal of Andrology**. v.27, p.176-188, 2006.

FETIC, S.; YEUNG, C.H.; SONNTAG, B.; NIESCHLAG, E.; COOPER, T.G. Relationship of cytoplasmic droplet to motility, migration in mucus, and volume regulation in Human Spermatozoa. **Journal of Andrology**. v. 22, p. 294-302, 2006.

FISCHER, M.A.; WILLIS, J.; ZINI, A. Human sperm DNA integrity: correlation with cytoplasmic droplets. **Urology**. v.6, p.207-211, 2003.

FONSECA, V.O.; VALE FILHO, V.R.; MIES FILHO, A.; ABREU, J.J. **Procedimentos para exame andrológico e avaliação de sêmen animal**. Colégio Brasileiro de Reprodução Animal. Belo Horizonte - MG.1992. 79p.

GARCÍA-MACÍAS, V.; PAZ, P.; MARTINEZ-PASTOR, F.; ÁLVAREZ, M.; GOMES-ALVES, S.; BERNARDO, J.; ANEL, E.; ANEL, L. DNA fragmentation assessment by flow cytometry and Sperm-Bos-Halomax (bright-field microscopy and fluorescence microscopy) in bull sperm. **International Journal of Andrology**. v.30, p.88–98, 2007.

GARNER, D.L.; PINKEL, D.P.; JOHNSON, L.A.; PACE, M.M. Assessment of spermatozoal function using dual fluorescent staining and flow cytometric analyses. **Biology of Reproduction**, v. 34, p. 127-138, 1986.

GARNER, D.L.; JOHNSON, L. A.; ALLEN, C.H. Fluorimetric evaluation of criopreserved bovine spermatozoa extended in egg yolk and milk. **Theriogenology**, v.30, p.369-378, 1988.

GRAHAM, J.K.; KUNZE, E.; HAMMERSTEDT, R.H. Analysis of sperm cell viability, acrosomal integrity, and mitochondrial function using flow cytometry. **Biology of Reproduction**, v. 43, p. 55-64, 1990.

GONÇALVES, F. S. **Efeitos de antioxidantes adicionados ao meio de fecundação *in vitro* sobre a capacitação espermática e desenvolvimento embrionário em bovinos**. Dissertação de mestrado– Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal. 2006. 140p.

GONZALEZ, R.A.F. **Efeito da criopreservação utilizando diferentes técnicas de congelação e crioprotetores sobre parâmetros espermáticos e integridade de membranas do espermatozóide bovino.** Tese de doutorado. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - Universidade de São Paulo. Pirassununga. 2004. 94p.

GRAHAM, J.K. Assessment of sperm quality. **AAEP Proceedings.** v.47, p.302-304, 2001.

GRAVANCE, C.V.; GARNER, D.L.; BAUMBER, J.; BALL, B.A. Assessment of equine sperm mitochondrial function using JC-1. **Theriogenology.** v. 53, p. 1691-1703, 2000.

GUERRA, M.M.P.; EVANS, G.; MAXWELL, W.M.C. Papel de oxidantes e anti-oxidantes na andrologia. **Revista Brasileira de Reprodução Animal.** v. 28(4), p.187-195, 2004.

HALLAP, T. **Assessment of sperm attributes of frozen-thawed AI doses from Swedish and Estonian dairy bulls sires.** Tese de doutorado (Divison of comparative Reproduction, Obstetrics and Udder Health) – Department of Clinical Sciences - Swedish University of Agricultural Sciences. Uppsala. 2005. 34p.

HERMAN H.A, MITCHELL J.R, DOAK G.A. 1996. **The artificial insemination and embryo transfer of dairy and beef cattle.** 8^a ed., USA:Interstate Publishers, Inc.pp.382

HOLT, W.V., HEAD, M.F., NORTH, R.D. Freeze-induced membrane damage in ram spermatozoa is manifested after thawing: observations with experimental cryomicroscopy. **Biology of Reproduction.** v.46, p.1086-1094, 1992.

HØST, E.; LINDENBERG, S.; SMIDT-JENSEN, S. The role of DNA strand breaks in human spermatozoa used for IVF and ICSI. **Acta Obstetrica et Gynecologica Scandinavica.** v.79, p.559-563, 2000.

HUGHES, C. M., McKELVEY-MARTIN, V. J., LEWIS, S.E.M. Human sperm DNA integrity assessed by Comet and LISA assays. **Mutagenesis,** v.4, p.71-75, 1999.

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Disponível em www.ibge.gov.br. Acesso em 11 de março de 2008.

JANUSKAUSKAS, A.; JOHANNSSON, A.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Subtle membrane changes in cryopreserved bull semen in relation with sperm viability, chromatin structure, and field fertility. **Theriogenology**. v.55, p.947-961, 2001.

KATKOV, I.I.; MAZUR, P. Influence of Centrifugation Regimes on Motility, Yield, and Cell Associations of Mouse Spermatozoa. **Journal of Andrology**. v.19, p.134-145. 1998.

KAWAI, Y.; HATA, T.; SUZUKI, O.; MATSUDA, J. Relationship between sperm morphology and *in vitro* fertilization ability in Mice. **Journal of Reproduction and Development**. v. 52, p. 561-568, 2006.

KAWAKAMI, E.; VANDEVOORT, C.A.; MAHI-BROWN, C.A.; OVERSTREET, J.W. Induction of acrosome reactions of canine sperm by homologous zona pellucida. **Biology of Reproduction**. v. 48, p.841-845, 1993.

LAMBERT, R.D.; SIRARD, M.A. Factors influencing *in vitro* capacitation of ejaculated rabbit spermatozoa. **Theriogenology**. v. 21, p.245. 1994.

LEWIS, S.E.M.; AITKEN, R.J. DNA damage to spermatozoa has impact on fertilization and pregnancy. **Cell Tissue Research**. v.322, p.33-41, 2005.

LIU, D.Y.; BAKER, H.W.G. Evaluation and assessment of semen for IVF/ICSI. **Asian Journal of Andrology**. v.4, p.281-285, 2002.

MCLAY, D.W.; CLARKE, H.J. Remodeling the paternal chromatin at fertilization in mammals. **Reproduction**. v.125, p. 625–633, 2003.

MILLER, D.J.; HUNTER, A.G. Effect of osmolarity and glycosaminoglycans on motility, capacitation, acrosome reaction and in vitro fertilizability of bovine ejaculated sperm. **Journal of dairy sciences**. V. 69, p. 2915-2924, 1986.

MORSHEDI, M.; DURAN, H.E.; TAYLOR, S.; OEHNINGER, S. Efficacy and pregnancy outcome of two methods of semen preparation for intrauterine insemination: a prospective randomized study. **Fertility and Sterility**. v.79, p.1625-1632, 2003.

NAGY, S.; JANSEN, J.; TOPPER, E.K.; GADELLA, B.M. A Triple-Stain Flow Cytometric Method to Assess Plasma- and Acrosome-Membrane Integrity of Cryopreserved Bovine Sperm Immediately after Thawing in Presence of Egg-Yolk Particles. **Biology of Reproduction**. v. 68, p.1828–1835, 2003.

NICHI, M. ; GOOVAERTS, I.G.F.; CORTADA, C.N.M.; BARNABE, V.H.; DE CLERCQ, J B.P.; BOLS, P.E.J. Roles of lipid peroxidation and cytoplasmic droplets on in vitro fertilization capacity of sperm collected from bovine epididymides stored at 4 and 34 °C. **Theriogenology**. v. 67, p. 334-340, 2007.

NOTHLING, J.O.; GERSTENBERG, C.; VOLKMANN, D.H. Semen quality after thawing: correlation with fertility and fresh semen quality in dogs. **Journal of Reproduction and Fertility**. v.51(suppl.), p.109-116,1997.

O'CONNELL, M.; MCCLURE, M.; LEWIS, S.E.M. The effects of cryopreservation on sperm morphology, motility and mitochondrial function. **Human Reproduction**. v.17, p. 704-779, 2002.

PARRISH, J.J.; PARRISH, J.L.; FIRST, N.L. Bovine in vitro insemination with thawed semen. **Theriogenology**. v.25, p. 591-600, 1986.

PEÑA, A.I.; BARRIO, M.; BECERRA, J.J.; QUINTELA, L.A.; HERRADÓN, P.G. Infertility in a Dog due to Proximal Cytoplasmic Droplets in the Ejaculate: Investigation of the Significance for Sperm Functionality *In Vitro*. **Reproduction of Domestic Animals**. v.42, p.471-478,2007.

PEÑA, F.J.; SARAIVA, F.; JOHANNISSON, A.; WALGREN, M.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. A new and simple method to evaluate early membrane changes in frozen-thawed boar spermatozoa. **International Journal of Andrology**. v.28, p.107-114, 2005.

PESCH, S.; BERGMANN, M. Structure of mammalian spermatozoa in respect to viability, fertility and cryopreservation. **Micron**. v.37, p.597-612, 2006.

PICKETT, B.W.; SULLIVAN, J.J.; BYERS, W.W.; REMMENGA, E.E. Effect of centrifugation and seminal plasma on motility and fertility of stallion and bull spermatozoa. **Fertility and Sterility**. v.26, p. 167-174, 1975.

PHILLIPS, N.J.; MCGOWAN, M.R.; JOHNSTON, S.D.; MAYER, D.G. Relationship between thirty post-thaw spermatozoal characteristics and the field fertility of 11 high-use Australian dairy AI sires. **Animal Reproduction Science**. v.81, p.47-61, 2003.

PHILLIPS, N.J.; EVANS, G.; MCGOWAN, M.R. Measures used to assess frozen thawed semen in Australian livestock semen processing centres. **Australian Veterinary Journal**. v.82, p.309-310, 2004.

QUERO, J.M.O.; MILLÁN, M.M.; MERLIN, M.P.; MARISCAL, M.A.O.; FRANGANILLO, A.R. Efecto del metodo de seleccion de esperma congelado de bovino sobre los indices de fecundacion y division *in vitro*. **Archivos de Zootécnia**. v.46, p.153-158, 1997.

RIJSSELAERE, T.; VAN SOOM, A.; MAES, D.; DE KRUIF, A. Effect of centrifugation on in vitro survival of fresh diluted canine spermatozoa. **Theriogenology**. V.57, p. 1669-1681, 2002.

RUIZ-PESINI, E.; DIEZ, C.; LAPEÑA, C.; PEREZ-MARTOS, A.; MONTOYA, J.; ALVAREZ, E.; ARENAS, J.; LOPEZ-PEREZ, M.J. Correlation of sperm motility with mitochondrial enzymatic activities. **Clinical Chemistry**. v.44, p.1616-1620, 1998.

RYBAR, R., FALDIKOVA, L., FALDYNA, M., MACHATKOVA, M., RUBES, J. Bull and boar sperm DNA integrity evaluated by sperm chromatin structure assay in the Czech Republic. **Veterinářská Medicina**, v.49, p.1-8, 2004.

SAACKE, R.G.; WHITE, J.M. Semen quality tests and their relationship to fertility. In: **Proceedings of the Fourth Technical Conference on Animal Reproduction**. NAAB, p.22-27, 1972.

SAACKE, R.G.; DALTON, J.C.; NADIR, S.; NEBEL, R.L.; BAME, J.H. Relationship of seminal traits and insemination time to fertilization rate and embryo quality. **Animal Reproduction Science**. v.60–61, p.663–677, 2000.

SAID, T.M.; AGARWAL, A.; SHARMA, R.K. Impact of sperm morphology on DNA damage caused by oxidative stress induced by nicotinamide adenine dinucleotide phosphate. **Fertility and Sterility**. v. 83, p. 95-103, 2005.

SAS Institute Inc., SAS OnlineDoc®, Version 8, Cary, NC: SAS Institut Inc., 1999.

SHEKARRIZ, M.; DE WIRE, D.M.; THOMAS, A.J.; AGARWAL, A. A method of human semen centrifugation to minimize the iatrogenic sperm injuries caused by reactive oxygen species. **European Urology**. v.28,p.31-35, 1995.

SHIBAHARA, H.; ONAGAWA, T.; AYUSTAWATI, JORSARAEI, S.; HIRANO, Y.; SUZUKI, T.; TAKAMIZAWA, S.; SUZUKI, M. Clinical significance of the Acridine Orange test performed as a routine examination: comparison with the CASA estimates and strict criteria. **International Journal of Andrology**. v.26(4), p.236–241, 2003.

SILVA, A.E.D.F.; DIAS, A .L.; UNANIAN, M. M.;FREITAS, A .F; BLOCH JUNIOR, C. R. Conteúdo de peptídeos e avaliação morfofisiológica dos espermatozóides do epidídimo e ejaculado de bovinos.**Revista Brasileira de Zootecnia**. v.32, n.6, p.1890-1900, 2003 (Supl. 2).

SRISOMBUT, C.; MORSHEDI, M.; LIN, M.H.; NASSAR, A.; OEHNINGER, S. Comparison of various methods of processing human cryopreserved-thawed semen semen samples. **Human Reproduction**. v.13(8), p. 2151-2157, 1998.

TEJADA, R.I.; MITCHELL, J.C.; NORMAN, A.; MARIK, J. J.; FRIEDMAN, S. A test for the practical evaluation of male fertility by acridine orange (AO) fluorescence. **Fertility and Sterility**. v.42, p.87-91,1984.

THUNDATHIL, J.C. **In vitro fertilizing characteristics of bovine sperm with abnormal morphology**. Tese de PhD. Department of Large Animal Clinical Sciences, University of Saskatchewan. Saskatoon-Saskatchewan, Canada, 2001.p.95.

THUNDATHIL, J.; PALASZ, A.T.; BARTH, A.D.; MAPLETOFT, R.J. The use of in vitro fertilization techniques to investigate the fertilizing ability of bovine sperm with proximal cytoplasmic droplets. **Journal of Animal Reproduction Science**. v. 65, p. 181–192, 2001.

TROIANO, L.; GRANATA, A.M.; COSSARIZA, A.; KALASHNIKOVA, G.; BIANCHI, R.; PINI, G.; TROPEA, F.; CARANI, C.; FRANCESCHI, C. Mitochondrial membrane potential and DNA stainability in Human sperm cells: A flow cytometry analysis with implications for male infertility. **Experimental Cell Research**. v.241, p.384-393, 1998.

UNANIAN, M.M. **Integridade da cromatina: método complementar para avaliação da qualidade do sêmen bovino**. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2000. 21p. (Documentos, 56).

VOGLER, C.J.; SAACKE, R.G.; BAME, J.H.; DWARNETTE, J.M.; MCGILLIARD, Y.L. Effects of scrotal insulation on viability characteristics of cryopreserved bovine semen. **Journal of Dairy Science**. v.4. p.3827-3835.1991.

WALTERS, A.H.; EYESTONE, W.E.; SAACKE, R.G.; PEARSON, R.E.; GWAZDAUSKAS, F.C. Sperm morphology and preparation method affect bovine embryonic development. **Journal of Andrology**. v.25(4), p.554-563, 2004.

WALTERS, A.H.; EYESTONE, W.E.; SAACKE, R.G.; PEARSON, R.E.; GWAZDAUSKAS, F.C. Bovine embryo development after IVF with spermatozoa having abnormal morphology. **Theriogenology**. v.63, p.1925–1937, 2005.

WALDEYER, W. Bau und Entwicklung der Samenfäden. **Anatomischer Anzeiger**. v. 2, p.345–368, 1887.

WATANABE, Y. F.; OLIVEIRA FILHO, E. B.. Efeito de reprodutores, distribuídos em três grupos genéticos, na produção in vitro de embriões bovinos. **Ars. Veterinaria**, v. 16, n. 1, p. 22-27, 2000.

WATANABE, Y. F.; WATANABE, M. R.; VILA, R. A.; GALERANI, M. A. V.; LÔBO, R. B.. A fecundação in vitro na seleção de reprodutores. . In: II SIMPÓSIO NACIONAL DE MELHORAMENTO ANIMAL, 1998, Uberaba. **Anais**. p. 321-323. 1999.

WATSON, P.F., Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function. **Reproduction and Fertility Devices**. v.7, p.871–891, 1995.

ZAR, J.H. **Biostatistical analysis**. 4. ed. New Jersey: Prentice-Hall, 1999. 930p.

ZINI, A.; O'BRYAN, M.K.; ISRAEL, L.; SCHLEGEL, P.N. Human sperm NADH and NADPH diaphorase cytochemistry: correlation with sperm motility. **Urology**. v.51(3), p. 464-468, 1998.

XIII. ANEXOS

Anexo 1 – Porcentagem média (\bar{x}) e desvio padrão (DP) dos defeitos maiores avaliados após descongelamento para os grupos Controle (índices normais de morfologia espermática) e Gota (com elevados índices de GCP).

Variáveis morfológicas do ejaculado (Defeitos Maiores)	Grupo ($\bar{x} \pm DP$)	
	Controle (n = 5)	Gota (n = 8)
Acrossoma	0,88 \pm 0,87	3,42 \pm 2,21
GCP	0,53 \pm 0,56	24,64 \pm 11,28
Formas Subdesenvolvidas	0,06 \pm 0,25	0,06 \pm 0,17
Cauda enrolada na cabeça	0,31 \pm 0,75	0,86 \pm 1,63
Cabeça isolada patológica	0,25 \pm 0,37	0,96 \pm 1,09
Cabeça estreita na base	0,09 \pm 0,27	1,28 \pm 1,34
Cabeça piriforme	0,06 \pm 0,25	0,20 \pm 0,41
Cabeça pequena anormal	0,00 \pm 0,00	0,28 \pm 0,68
Cabeça contorno anormal	0,13 \pm 0,29	0,98 \pm 1,12
“Pouch formation”	0,13 \pm 0,39	0,80 \pm 1,12
Formas duplas	0,22 \pm 0,36	0,14 \pm 0,34
Defeitos de membrana celular	0,41 \pm 0,42	0,30 \pm 0,52
Peça Intermediária	1,06 \pm 1,15	2,30 \pm 1,44
Cauda fortemente enrolada	1,00 \pm 1,22	2,26 \pm 1,61

Anexo 2 – Porcentagem média (\bar{x}) e desvio padrão (DP) dos defeitos menores avaliados após descongelação para os grupos Controle (índices normais de morfologia espermática) e Gota (com elevados índices de GCP).

Variáveis morfológicas do ejaculado (Defeitos Menores)	Grupo ($\bar{x} \pm DP$)	
	Controle (n = 5)	Gota (n = 8)
Cabeça pequena normal, delgada	0,88±3,50	0,10±0,50
Cabeça isolada normal	1,91±2,26	3,70±5,67
Cauda dobrada ou enrolada	0,69±0,66	1,00±1,21
Inserção da peça intermediária	1,31±1,00	1,28±1,78
GCD	0,63±0,65	0,56±0,92
Cauda dobrada com gota citoplasmática	0,94±1,46	2,84±3,40