

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP

CAMPUS DE JABOTICABAL

**CARACTERÍSTICAS DE CONDENSAÇÃO DA CROMATINA E
MORFOMETRIA ESPERMÁTICA DE TOUROS DA RAÇA GIR**

Patricia Ramos Heggendorn Oliveira

Médica Veterinária

2019

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
CAMPUS DE JABOTICABAL**

**CARACTERÍSTICAS DE CONDENSAÇÃO DA CROMATINA E
MORFOMETRIA ESPERMÁTICA DE TOUROS DA RAÇA GIR**

Patricia Ramos Heggendorn Oliveira

Orientadora: Profa. Dra. Associada Marion Burkhardt de Koivisto

Coorientadora: Profa. Dra. Janaina Torres Carreira

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, área de Reprodução Animal

2019

O48c

Oliveira, Patricia Ramos Heggendorn

Características de condensação da cromatina e morfometria
espermática de touros da raça Gir / Patricia Ramos Heggendorn
Oliveira. -- Jaboticabal, 2019

58 p. : il., tabs.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp),
Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal

Orientadora: Marion Burkhardt de Koivisto

Coorientadora: Janaina Torres Carreira

1. Azul de Toluidina. 2. CMA3. 3. Protaminação. 4. Bovinos. 5.
Sêmen. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da Faculdade de
Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Jaboticabal



CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: CARACTERÍSTICAS DE CONDENSAÇÃO DA CROMATINA E MORFOMETRIA ESPERMÁTICA DE TOUROS DA RAÇA GIR

AUTORA: PATRICIA RAMOS HEGGENDORN OLIVEIRA

ORIENTADORA: MARION BURKHARDT DE KOIVISTO

COORDENADORA: JANAINA TORRES CARREIRA

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestre em MEDICINA VETERINÁRIA, área: Reprodução Animal pela Comissão Examinadora:

Marion Koivisto

Profa. Dra. MARION BURKHARDT DE KOIVISTO
Departamento de Clínica, Cirurgia e Reprodução Animal / FMV/UNESP - Araçatuba

Gisele Zoccal Mingoti

Profa. Dra. GISELE ZOCCAL MINGOTI
Departamento de Apoio, Produção e Saúde Animal / FMV/UNESP - Araçatuba

Monique de Albuquerque Laçares

nl Profa. Dra. MONIQUE DE ALBUQUERQUE LAÇARES (Videoconferência)
Departamento de Clínica e Cirurgia-UFMG / Belo Horizonte/MG

Jaboticabal, 12 de julho de 2019

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

Patricia Ramos Heggendorn Oliveira – nascida no Rio de Janeiro-RJ, ao 1º dia do mês de Junho de 1989. Concluiu o ensino médio no GPI, na cidade de Rio de Janeiro-RJ, em Dezembro de 2006. Ingressou no curso de Graduação em Medicina Veterinária, na Universidade Estácio de Sá – UNESA, em Fevereiro de 2007. Concluiu o ensino superior em Medicina Veterinária em Fevereiro de 2012. Ingressou no curso de Pós-graduação em Medicina Veterinária, nível de Mestrado e área de concentração de Reprodução Animal, na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP Campus de Jaboticabal-SP, em Março de 2017, sob orientação da Profa. Associada Marion Burkhardt de Koivisto, com bolsa de mestrado da CAPES.

“The only impossible journey is the one you never begin.”

Anthony Robbins

Aos meus queridos pais Ednilda e Marco,
meus maiores exemplos de caráter e amor.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ter me dado força e determinação para realização deste projeto. Agradeço também a Ele por ter colocado indivíduos incríveis nessa caminhada, os quais estão elencados à seguir:

Aos meus queridos pais e minha irmã, que durante toda minha vida se fizeram presentes, torcendo pelas minhas vitórias e me amparando nas dificuldades. Sem vocês, eu nada seria.

À Profa. Dra. Marion Burkhardt de Koivisto, que depositou em mim um voto de confiança, tornando possível a realização deste sonho.

À Profa. Dra. Janaína Torres Carreira pela coorientação. Sua ajuda foi imprescindível desde a escolha do tema à conclusão desta tese.

Ao Prof. Dr. André Rios, por toda ajuda, paciência e gentileza durante as coletas das amostras que viabilizaram esse projeto.

Ao Instituto René Rachou – Fiocruz Minas, em especial ao Dr. Olindo Assis, Dr. Márcio Sobreira e a Dra. Josiane Quetz, por abrirem as portas do laboratório para mim, e por toda ajuda, ensinamentos e disponibilidade. Levo vocês como exemplos de competência e profissionalismo. Serei eternamente grata por todo o acolhimento que encontrei no GIPB.

Às amigas que a pós me deu: Izabella Pazzoto Alves e Luana Teixeira Rodrigues Rossi. Obrigada por todo o companheirismo, carinho e amizade. A convivência com vocês tornou todo esse processo mais leve e prazeroso. Levarei vocês no meu coração com muito carinho.

À Fridinha, minha fiel companheira, que esteve comigo nos altos e baixos dessa jornada, sempre com sua doçura e amor incondicional.

À Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - UNESP - Câmpus Jaboticabal pela oportunidade de realização do mestrado e à Faculdade de Medicina Veterinária - UNESP - Câmpus Araçatuba pela disponibilidade do laboratório.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001, assim como apoio financeiro da FAPESP - número de processo 2018/01973-6.

A vocês, meu muito obrigada!

SUMÁRIO

Página

RESUMO	iv
ABSTRACT.....	v
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	3
2.1. O espermatozoide e sua estrutura	3
2.2. A cromatina	4
2.3. Relação idade e características seminais	5
2.4. Métodos de avaliação do DNA	7
2.4.1. Azul de Toluidina	7
2.4.2. Cromomicina A3 (CMA3)	9
3. HIPÓTESE	10
4. OBJETIVOS	10
4.1. Objetivo Geral	10
4.2. Objetivos Específicos	10
5. MATERIAIS E MÉTODOS	11
5.1. Seleção dos animais e preparo das amostras	11
5.2. Análise seminal.....	12
5.2.1. Avaliação de parâmetros físicos convencionais	12
5.2.2. Condensação da cromatina e morfometria da cabeça espermática com Azul de Toluidina	13
5.2.3. Protaminação espermática pela Cromomicina A3.....	14
5.3. Avaliação de características reprodutivas	17
5.3.1. Fertilidade	17
5.3.2. Classificação Andrológica por Pontos (CAP)	17
5.3.3. Índice de Classificação de Touros (ICT)	18
5.4. Análises Estatísticas	19
5.4.1. Redes de Correlação	19
6. RESULTADOS	20

6.1. Avaliação das variáveis em função da idade	20
6.1.1. Correlações dos parâmetros analisados em função da idade	22
6.2. Avaliação das variáveis em função do tempo transcorrido entre as quatro coletas mensais (5 meses)	24
6.2.1. Avaliação de deficiência de protamina da cromatina espermática com Cromomicina A3.....	24
6.2.2. Análise dos parâmetros físicos convencionais de qualidade espermática	25
6.2.3. Avaliação da condensação/integridade da cromatina e morfometria da cabeça espermática com Azul de Toluidina	27
6.2.4. Correlação das variáveis em relação ao tempo transcorrido durante as coletas	29
7. DISCUSSÃO	30
8. CONCLUSÕES	35
REFERÊNCIAS	36
APÊNDICE	44
Apêndice A	45



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"



CAMPUS ARAÇATUBA
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA

CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais
CEUA - Ethics Committee on the Use of Animals

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto de Pesquisa intitulado "**Características de condensação da cromatina e morfometria espermática de touros da raça GIR**", Processo FOA nº 00611-2017, sob responsabilidade de Marion Burkhardt de Koivisto apresenta um protocolo experimental de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal e sua execução foi aprovada pela CEUA em 17 de Outubro de 2017.

VALIDADE DESTE CERTIFICADO: 17 de Maio de 2019.

DATA DA SUBMISSÃO DO RELATÓRIO FINAL: até 17 de Junho de 2019.

CERTIFICATE

We certify that the study entitled "**Chromatin condensation characteristics and sperm morphometry in GIR bulls**", Protocol FOA nº 00611-2017, under the supervision of Marion Burkhardt de Koivisto presents an experimental protocol in accordance with the Ethical Principles of Animal Experimentation and its implementation was approved by CEUA on October 17, 2017.

VALIDITY OF THIS CERTIFICATE: May 17, 2019.

DATE OF SUBMISSION OF THE FINAL REPORT: June 17, 2019.

Prof. Ass. Dr. Leonardo Perez Faverani
Coordenador da CEUA
CEUA Coordinator

CARACTERÍSTICAS DE CONDENSAÇÃO DA CROMATINA E MORFOMETRIA ESPERMÁTICA DE TOUROS DA RAÇA GIR

RESUMO- O objetivo deste estudo foi avaliar a qualidade espermática, compactação/integridade e deficiência de protamina da cromatina de espermatozoides, somado às características reprodutivas de acordo com a idade. Procurou-se avaliar a interferência da idade nas variáveis analisadas e a evolução das mesmas ao longo de quatro coletas mensais. Foram selecionados 43 touros de elite *Bos taurus indicus* da raça Gir com idades iniciais entre 18 e 42 meses e divididos em três grupos: jovens (18,5-24,7 meses de idade, n=15), jovens adultos (25,2-28,6 meses de idade, n=16) e adultos (29,1-42,0 meses de idade, n=12). Nessa primeira avaliação as características reprodutivas foram incluídas (Fertilidade, Classificação Andrológica por Pontos e Índice de Classificação de Touros). Em seguida 38 dos 43 touros foram divididos em 3 grupos (mesmas faixas etárias): jovens (n=12), jovens adultos (n=13) e adultos (n=13). Após descongelamento, as amostras foram submetidas às técnicas de coloração do azul de toluidina, para avaliar concomitantemente condensação/integridade da cromatina e morfometria da cabeça espermática, e coloração pela cromomicina A3 (CMA3), para investigar deficiência de protamina espermática. Animais do grupo jovem apresentaram espermatozoides com maior heterogeneidade da compactação da cromatina (CV) ($2,52 \pm 0,31\%$) que animais do grupo jovem adulto ($1,75 \pm 0,10\%$). Além disso, o grupo jovem apresentou alteração de cromatina em todas as coletas (Dif > 2 e/ou CV > 5%). O grupo jovem adulto apresentou maior índice de fertilidade ($87,27 \pm 2,05$) (exame andrológico, qualidade espermática a fresco e pós-descongelamento, circunferência escrotal e libido) e melhor nota de classificação andrológica por pontos ($83,64 \pm 3,92$) que animais do grupo adulto ($77,60 \pm 2,74$; $76,82 \pm 3,16$, respectivamente) ($P < 0,05$). No teste do CMA3, espermatozoides de touros jovens apresentaram maior deficiência de protamina na primeira e quarta coletas ($C1 = 5.111 \pm 619$; $C4 = 4.3880 \pm 171$; ($P < 0,05$)), possivelmente devido a influência de estresse, tanto do transporte e adaptação a novo manejo quanto estresse térmico. Resultados de morfometria não diferiram ao longo das coletas ($P > 0,05$). Como conclusão, os resultados desse estudo mostram que a idade teve influência quanto as avaliações da cromatina, tendo os animais do grupo jovem apresentado-se imaturos nessas análises. Testes de investigação apresentaram perfil dinâmico de acordo com as diferentes faixas etárias, indicando não existir teste único para avaliar capacidade reprodutiva.

Palavras-chave: Azul de Toluidina, CMA3, Protaminação, Bovinos, Sêmen

CHROMATIN CONDENSATION CHARACTERISTICS AND SPERM MORPHOMETRY IN GIR BULLS

ABSTRACT- The aim of this study was to evaluate sperm quality, condensation/integrity and protamine deficiency of sperm's chromatin packaging, as well as the behavior of reproductive characteristics according to age. For that, two approaches were done: 1st) evaluate how age would interfere in the analyzed variables, 2nd) evaluate how the variables would evolve along four monthly collections. On the 1st approach, 43 elite Gir bulls (*Bos taurus indicus*) with initial ages between 18 and 42 months were divided into three groups: young (18.5-24.7 months, n=15), young adult (25.2-28.6 months, n=16) and adult (29.1-42.0 months, n=12). Results of reproductive characteristics evaluation (Fertility, Andrological Classification by Points and Bull Classification Index) were included in this first approach. For the 2nd approach, 38 of the 43 bulls were divided into three groups (using the same criteria described before): young (n=12), young adult (n=13) and adult (n=13). After thawing, semen samples were evaluated through the toluidine blue method, for chromatin condensation/integrity and sperm head morphometry assessment and chromomycin A3 (CMA3) to analyze protamine deficiency. Animals from the young group presented spermatozoa with higher heterogeneity of chromatin compaction (CV) (2.52 ± 0.31 %) than animals from the young adult group (1.75 ± 0.10 %). Young bulls also presented chromatin alteration in all the four collections ((Dif > 2 and/or CV > 5%). The young adult group showed higher fertility index (andrological examination, fresh and thawed sperm quality, scrotal circumference and libido) (87.27 ± 2.05) and better score at bull soundness evaluation (83.64 ± 3.92) than animals from the adult group (77.60 ± 2.74 ; 76.82 ± 3.16 , respectively) ($P < 0.05$). Young bulls CMA3 results showed higher protamine deficiency in the first and fourth collections (C1= 5.111 ± 619 ; C4= 4.388 ± 171 ; ($P < 0,05$)), possibly due to stress of transportation and adaptation to the new environment as well as heat stress. Results of morphometry and compaction evaluated through the toluidine blue method didn't differ along collections ($P > 0,05$). From our results, it can be concluded that age had an influence in chromatin evaluations, as bulls from the young group showed immaturity in these analyses. Investigative tests presented a dynamic profile according to the different age groups, indicating that there is not a single test for reproductive capacity.

Keywords: Toluidine Blue, CMA3, Protamination, Bovine, Semen

1. INTRODUÇÃO

O crescimento da população mundial gera uma incansável busca por aumentar e aprimorar a produção de carne e leite, visando suprir a demanda do mercado, e assim, movimentando a economia. Rebanhos de outrora não seriam capazes de atender à demanda dos dias atuais. Isso se deve ao intenso desenvolvimento e aplicação de biotecnologias que aprimoraram a capacidade produtiva e reprodutiva de nossos rebanhos. O completo entendimento do gameta masculino, assim como fatores que influenciam sua viabilidade, fazem-se necessários para otimização do emprego de biotecnologias (KAYA et al., 2014).

Sabe-se que o complexo processo de fertilização pode ser afetado por alterações espermáticas, estando assim a qualidade seminal diretamente ligada ao sucesso de programas reprodutivos (OLIVEIRA et al., 2012). Dentre as variáveis capazes de interferir na qualidade seminal estão: fatores ambientais (D'OCCHIO et al., 2013; PANMEI et al., 2015), diferenças genéticas (KOIVISTO et al., 2009), frequência de ejaculação (KHALIFA et al., 2008; PANMEI et al., 2015), deficiência na protamina espermática, danos ao DNA espermático, padrões anormais de metilação que podem ser agravados por estresse térmico (FORTES et al., 2014) e idade dos animais (PANMEI et al., 2015; KIPPER et al., 2017). O momento da espermatogênese em que ocorre interferência desses fatores pode determinar diferentes tipos de dano ao gameta em formação (BELETTI; MELLO, 2004).

A espermatogênese, que resulta na formação do gameta masculino, é composta por mecanismos de diferenciação altamente controlados, fazendo com que após sucessivas mitose e meioses, uma célula passe da condição de diplóide para haplóide e adquira capacidade fecundante (KLAUS et al., 2016). É na fase final desse processo, conhecida como espermiogênese, que ocorre compactação nuclear e formação da cabeça do espermatozoide. Alterações nesses processos estão relacionadas à infertilidade (OSTERMEIER et al., 2001a; SAKKAS et al., 2002; AOKI et al., 2006; ZINI; SAN GABRIEL; ZHANG, 2007; ALEEM et al., 2008; FORTES et al., 2014).

Machos da espécie bovina costumam atingir a puberdade entre 9-12 meses de idade (RAWLINGS et al., 2008), ressaltando que a puberdade ocorre mais

precocemente em touros *B. taurus taurus* (por volta de 8-10 meses de idade) (LUNSTRA; FORD; ECHTERNKAMP, 1978) que em touros *B. taurus indicus* (17-19 meses) (MARTINS et al., 2011), mesmo quando criados sob as mesmas condições (CHACÓN, 2014). Também deve ser levado em consideração que existem variações na idade à puberdade inclusive dentre animais da mesma raça (BRITO, 2014). Indivíduos da raça Gir considerados precoces para reprodução podem atingir maturidade sexual entre 16 e 19 meses (MARTINS et al., 2011), sendo indicado o início da seleção genética antes dos 18 meses (FOLHADELLA et al., 2006).

Análises seminais de rotina podem estimar a fertilidade de determinado touro, porém, não são totalmente confiáveis (PANMEI et al., 2015). Dentre estas, destaca-se a avaliação de motilidade, técnica de simples execução e aplicabilidade, que não necessita de equipamentos sofisticados (LOVE, 2005; SHIVAHRE et al., 2015). Porém, algumas variáveis que levam à infertilidade independem de motilidade (LOVE, 2005). Para otimizar a avaliação, sugere-se a associação de técnicas rotineiras a métodos capazes de qualificar o espermatozoide quanto a características funcionais e moleculares. A estimativa de integridade da cromatina nuclear deve ser incluída nesse processo (OLIVEIRA et al., 2012; CARREIRA et al., 2015), uma vez que essa avaliação se mostrou método indicativo de fertilidade de touros (DOGAN et al., 2015). Espermatozoides com alterações em parâmetros como motilidade e morfologia podem não ser capazes de percorrer o trajeto no trato reprodutor feminino. Caso o gameta masculino consiga chegar ao encontro do oócito, a qualidade de seu DNA será fundamental para fecundação e desenvolvimento embrionário (SIMON et al., 2011).

Atualmente, uma das principais ferramentas utilizadas para melhoramento genético em rebanhos bovinos é o Teste de Progênie. A busca por aumentar a acurácia e funcionalidade do teste faz com que a pressão na seleção dos animais participantes seja cada vez maior. Sendo assim, foi criada a etapa de Pré Seleção de Touros para o Teste de Progênie, na qual critérios de características seminais (congelabilidade, motilidade, morfologia espermática, etc) e características funcionais do animal (temperamento, libido e características de conformação) vem sendo estabelecidos para que apenas jovens reprodutores de genética comprovada e alta fertilidade sejam submetidos ao teste final (EMBRAPA, 2017).

Neste estudo o objetivo foi avaliar a compactação/integridade e deficiência de protamina (qualidade do empacotamento) da cromatina, assim como sua influência na morfometria da cabeça espermática em colheitas realizadas ao longo de cinco meses em um mesmo animal. Estas análises foram associadas a parâmetros físicos de qualidade espermática e idade do touro, e comparados a dados obtidos da classificação dos touros de elite submetidos à pré seleção para teste de progênie. Desta forma pretendeu-se esclarecer se (i) a idade interfere nos parâmetros avaliados e (ii) como os parâmetros em questão evoluem dentro de cada grupo de idade ao longo de quatro coletas seriadas. Correlações desta natureza ainda são pouco relatadas na espécie bovina e merecem maior abordagem, visando elucidar fatores ainda não esclarecidos relacionados à qualidade seminal.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. O espermatozoide e sua estrutura

O espermatozoide é composto por duas partes principais: cabeça e cauda ou flagelo. A cabeça contém núcleo, portador do DNA paterno, acrossoma, estruturas do citoesqueleto e pequena quantidade de citoplasma. O tamanho, formato e comprimento da cabeça apresentam variações espécie-específicas (EDDY, 1994).

O núcleo do espermatozoide maduro ocupa a maior parte da cabeça, e contém DNA altamente compactado devido à presença de proteínas específicas, as protaminas. Sobreposto à região apical da cabeça está o acrossoma. Essa estrutura contém hialuronidase e acrosina, enzimas que desempenham importante função no processo de fertilização, possibilitando a penetração no oócito (KAYA et al., 2014).

A cauda consiste em quatro segmentos: pescoço, peça intermediária, peça principal e peça terminal. Tanto a cabeça quanto a cauda estão envoltas pela mesma membrana celular (KAYA et al., 2014). Na peça intermediária estão presentes mitocôndrias, que geram energia na forma de adenosina trifosfato (ATP), garantindo motilidade flagelar (HAFEZ; HAFEZ, 2000).

2.2. A CROMATINA

A espermatogênese é o processo que irá garantir a produção de um gameta capaz de transportar o genoma paterno de forma intacta até encontro com o oócito (SUTOVSKY; MANANDHAR, 2006). Essas células altamente especializadas irão assegurar a transmissão da informação genética dos indivíduos, e assim, a manutenção da vida (RATHKE et al., 2014).

Na fase de diferenciação, durante a espermiogênese, a espermátide arredondada haplóide passa por transformações tais como remodelamento da membrana plasmática, perda de grande quantidade de citoplasma, formação da cauda ou aparelho flagelar, desenvolvimento do acrossoma e condensação da cromatina espermática (EDDY, 1994). Essas modificações permitem aquisição de motilidade progressiva durante a maturação no epidídimo e potencial fertilizante após interação com fluidos e fatores inerentes ao trato reprodutor feminino (SUTOVSKY; MANANDHAR, 2006).

O núcleo é o maior componente da cabeça espermática. Para que essa estrutura caiba dentro de uma célula que é aproximadamente 10 vezes menor que uma célula somática, ela precisa estar altamente compactada (KAYA et al., 2014). O que garante esta compactação, ainda na fase de diferenciação, são processos de transcrição e transição de histonas para protaminas (KLAUS et al., 2016). Já foi descrito que em touros, protaminação em níveis abaixo do ideal torna o DNA instável e sua integridade comprometida, levando a reduzida capacidade fertilizante (FORTES et al., 2014). O mesmo foi observado no homem (AOKI et al., 2006) e em ratos, onde animais com defeitos na protaminação, além de apresentarem fertilidade reduzida, foram mais susceptíveis a danos oxidativos e mutagênicos (ALEEM et al., 2008).

O processo de compactação da cromatina ocorre primeiramente pela substituição de histonas (H1, H2A, H2B, H3 e H4) por proteínas de transição (TP1, TP2), e por fim, protaminas (KAYA et al., 2014). Protaminas são proteínas positivamente carregadas que condensam a cromatina formando estruturas denominadas toróides, cada um contendo aproximadamente 50 kb de DNA (SHAMAN; WARD, 2006). O DNA condensado pelas protaminas encontra-se

indivisível e inativo para transcrição (KAYA et al., 2014).

A hipercondensação do DNA, além de conferir formato hidrodinâmico à cabeça do espermatozoide, faz com que o genoma paterno fique protegido. No entanto, mesmo com alto grau de condensação, pequena parcela de histonas permanece retida na fita de DNA para participar no controle epigenético da expressão gênica, garantindo o desenvolvimento embrionário (MILLER; BRINKWORTH; ILES, 2010). A presença dessas histonas cria áreas de instabilidade na cromatina, deixando o DNA susceptível a danos (SHAMAN; WARD, 2006).

O remodelamento nuclear decorrente da protaminação confere novo formato à cabeça do espermatozoide, sendo assim, formatos de cabeça alterados podem estar diretamente relacionados à condensação da cromatina e estabilidade da mesma (SAKKAS et al., 2002; OSTERMEIER et al., 2001a). Posto isto, para comportar um DNA pouco compactado, o núcleo precisará ser maior, assim como o tamanho da cabeça desse espermatozoide, uma vez que esta é basicamente composta pelo núcleo (BELETTI; MELLO, 2004; EVENSON, 1980). O processo final de compactação ocorre no epidídimo, local onde defeitos espermáticos secundários costumam ocorrer e podem acarretar alterações cromatínicas. Porém, alterações que ocorrem no epidídimo podem ser de menor impacto, e não interferir na morfologia, e em alguns casos mesmo diante de alteração na cromatina, a morfologia pode se encontrar inalterada (BELETTI; MELLO, 2004).

A compreensão de alterações morfológicas torna-se relevante uma vez que esse parâmetro possui influência no potencial espermático em fecundar o oócito. Sabe-se que espermatozoides com graves alterações morfológicas na cabeça possuem reduzida fertilidade (SAACKE et al., 1998; IRANPOUR et al., 2000), e que touros altamente férteis são associados a formatos de cabeça alongado e cônico (OSTERMEIER et al., 2001a).

2.3. RELAÇÃO IDADE E CARACTERÍSTICAS SEMINAIS

A puberdade é caracterizada como sendo o momento a partir do qual o animal é capaz de liberar gametas e manifestar sequências de comportamento sexual completo. Esse processo é acompanhado pelo aumento gradativo das

concentrações séricas de testosterona, inicialmente com níveis basais, até atingir concentrações compatíveis com a idade adulta e capacidade de manutenção da gametogênese (HAFEZ; HAFEZ, 2000).

Bovinos atingem a puberdade em torno dos 12 meses de idade, podendo alguns fatores como ambiente físico, raça, nutrição, crescimento pós desmame etc., influenciar a idade à puberdade. Dentre todos os fatores, a nutrição é destacada por possuir maior influência para o início da fase púbera (HAFEZ; HAFEZ, 2000). O desenvolvimento testicular de touros é lento até aproximadamente 25 semanas de idade, quando adquire ritmo acelerado até que o animal atinja a puberdade. Essa fase final do desenvolvimento gonadal consiste em notáveis aumentos no diâmetro e comprimento dos túbulos seminíferos, dramática proliferação e diferenciação das células germinativas, com presença de espermatozoides maduros entre 32 e 40 semanas de idade (RAWLINGS et al., 2008).

Alguns parâmetros de qualidade espermática apresentam melhora com o avançar da idade, como diminuição de defeitos maiores e aumento da motilidade (MARTINS et al., 2011). Logo, o potencial reprodutivo aumenta conforme amadurecimento sexual (FOLHADELLA et al., 2006).

A idade também possui influência quanto à compactação da cromatina. O primeiro estudo do teste “Sperm Chromatin Structure Assay” (SCSA) visando avaliar a relação de fatores genômicos e integridade do DNA em humanos, concluiu que a idade é o fator que possui maior influência na integridade da cromatina (EVENSON, 2011). Em touros, essa relação ainda é pouco avaliada. Estudo recente indicou que animais jovens possuem menores níveis de protaminação e conseqüente frouxidão na cromatina, o que levou a maior dimensão de cabeça nessa faixa etária, quando comparados a adultos e senis (KIPPER et al., 2017). Tais dados destacam a importância de avaliações mais complexas em animais jovens para seleção destes como doadores de sêmen.

2.4. MÉTODOS DE AVALIAÇÃO DO DNA

Os métodos de avaliação do DNA podem ser divididos em três princípios: i) Detecção específica de extremidades de DNA livre ('nicks') por incorporação enzimática de nucleótidos marcados (TUNEL). ii) Detecção de fragmentos de DNA por eletroforese de célula única incorporada em gel após lise prolongada de todas as proteínas nucleares que se ligam ao DNA (Teste de Cometa). iii) Detecção de fluorescência, através do uso de anticorpos ou corantes que possuem atração por sítios específicos no DNA [Laranja de Acridina, AO]. Uma questão relevante na escolha do método de avaliação é quanto o próprio protocolo de preparo da amostra pode induzir dano ao DNA (BARRATT et al., 2010).

Dentre as técnicas disponíveis, destaca-se o teste da análise da estrutura da cromatina espermática (SCSA), que associa citometria de fluxo à coloração do laranja de acridina. Criado há 30 anos (EVENSON; DARZYNKIEWICZ; MELAMED, 1980) ainda é um dos métodos mais utilizados para avaliação da cromatina espermática (EVENSON, 2011).

Métodos indiretos são populares para avaliação do status da cromatina por serem sensíveis e de fácil aplicabilidade (ERENPREISS et al., 2006). Baseiam-se no uso de corantes nucleares que se ligam aos grupos fosfato livres nas quebras de fita e indicam a interação do DNA com proteínas. Dentre esses métodos, conhecidos como citoquímicos, estão cromomicina A3 (CMA3) e azul de toluidina (TSAREV; ERENPREISS, 2011). Alguns fatores que influenciam a capacidade de coloração da cromatina por corantes iônicos são: 1) estrutura secundária do DNA, 2) regularidade e densidade da compactação da cromatina e 3) ligação do DNA às proteínas da cromatina (ERENPREISS et al., 2006).

2.4.1. AZUL DE TOLUIDINA

Mello (1982) desenvolveu essa técnica visando estabelecer correlações entre metacromasia induzida por hidrólise ácida e infertilidade. Para isso, avaliou amostragens de touros com diferentes níveis de fertilidade que possuíam ou não alterações no formato de suas cabeças.

A técnica se baseia na hidrólise ácida com HCL 4N, seguida de metacromasia induzida pelo corante do azul de toluidina. O azul de toluidina é um corante catiônico, de pH 4,0, que leva à alteração de coloração pela ressonância de elétrons entre suas moléculas (MELLO, 1982). Ao se ligar a grupos fosfatos livres no DNA, que se encontram mais acessíveis em casos onde a protaminação ocorreu de forma ineficiente (ERENPREISS et al., 2006), resulta em diferentes níveis de coloração, podendo variar de azul claro a roxo-violeta. Quanto maior for a descompactação da cromatina, maior será a quantidade de ligações a grupos fosfato e mais intensa será a coloração encontrada (TSAREV; ERENPREISS, 2011).

Técnicas de avaliação de padrões seminais que se baseiam em análise visual são subjetivas, susceptíveis a falhas e de baixa repetibilidade, visto que os laudos podem variar de acordo com o avaliador. Avaliações automatizadas reduzem erros e possibilitam análises concomitantes, otimizando resultados (CAMPOS et al., 2013).

Programas computacionais são capazes de fornecer informações para avaliação morfométrica da cabeça do espermatozoide, gerando dados de parâmetros primários, (comprimento, largura, área e perímetro), e parâmetros derivados (descritores Fourier com amplitude de 0 a 2: F0, F1 e F2) (OSTERMEIER et al., 2001b; BELETTI; COSTA, 2003), que fornecem resultados aproximados do formato da cabeça a partir de fórmulas matemáticas (YÁNIZ; SOLER; SANTOLARIA, 2015).

Análises harmônicas de Fourier (descritores Fourier) produzem coeficientes numéricos para cada cabeça avaliada (THURSTON et al., 2001), e são gerados a partir de coordenadas do perímetro de cada núcleo espermático. A amplitude harmônica 0 verifica o tamanho geral espermático, F1 a cabeça anterior, F2 o comprimento, descrevendo a forma do núcleo espermático (PARRISH et al., 2012).

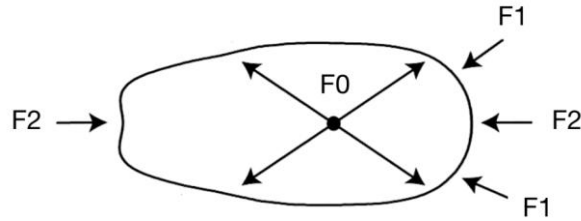


Figura 1. Representação da cabeça espermática de acordo com a amplitude harmônica 0 – 2. A amplitude harmônica F0 afeta o tamanho geral espermático, F1 a cabeça anterior, F2 o comprimento (adaptado de PARRISH et al., 2012).

2.4.2. CROMOMICINA A3 (CMA3)

Como revisado acima, durante a espermiogênese, a espermatíde sofre diversas modificações e eventos bioquímicos que irão resultar no espermatozoide maduro (DADOUNE, 2003). Dentre esses processos está a substituição de histonas por protaminas, que vai garantir que o DNA seja compactado. Proporções heterogêneas na composição proteica de histona e protamina em espermatozoides de uma amostra seminal podem indicar infertilidade do indivíduo (ZINI; SAN GABRIEL; ZHANG, 2007).

O CMA3 é um fluorocromo que se liga especificamente a sequências citosina-guanina no DNA e compete pelos mesmos sítios de ligação que a protamina (ERENPREISS et al., 2006). Sendo considerado método de fácil aplicabilidade e alta confiabilidade, por apresentar boa sensibilidade e especificidade (LOLIS et al., 1996; SHIVAHRE et al., 2015).

A coloração resultante do emprego desta técnica está relacionada à deficiência de protaminação da amostra, indicando a qualidade do empacotamento da cromatina. Quanto menor ou menos intensa for a coloração positiva para CMA3, melhor a qualidade espermática, pois o DNA estará bem compactado e protegido contra danos (BIANCHI et al., 1993; LOLIS et al., 1996; BARRATT, 2010).

Esta técnica fornece informações que se relacionam com algumas variáveis como: alterações morfológicas (incluindo anormalidades de cabeça), motilidade, fertilidade *in vitro* (IRANPOUR et al., 2000), e mais recentemente, idade (KIPPER et al., 2017).

3. HIPÓTESE

Espermatozoides de touros de diferentes faixas etárias apresentam níveis variáveis de compactação e qualidade do empacotamento da cromatina, mostrando aumento destes com o avançar da idade.

Características positivas de qualidade espermática se correlacionam com bom desempenho em Pré Seleção de Touros para Teste de Progênie.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo Geral

Avaliar compactação, qualidade do empacotamento da cromatina e morfometria da cabeça espermática em touros *Bos taurus indicus* da raça Gir de alto valor genético, classificados em grupos de acordo com a idade avaliados em quatro momentos.

4.2. Objetivos Específicos

- Analisar a condensação/ integridade da cromatina e morfometria da cabeça dos espermatozoides pela técnica do Azul de Toluidina;
- Investigar a deficiência de protamina (qualidade do empacotamento) da cromatina espermática pela substituição de histonas por protaminas com CMA3;

Relacionar:

- As variáveis analisadas de acordo com a idade dos touros;
- Características da cromatina (condensação/integridade e deficiência de protamina) ao longo das colheitas de um mesmo animal;

- Características da cromatina com parâmetros físicos convencionais de análise seminal;
- CMA3 e Azul de Toluidina com o Índices de Classificação de Touros (ICT); Classificação Andrológica por Pontos (CAP) e Teste de Fertilidade

5. MATERIAIS E MÉTODOS

5.1. Seleção dos animais e preparo das amostras

Para o presente estudo foram utilizados 43 touros *Bos taurus indicus* da raça Gir, com idades iniciais entre 18 e 42 meses, oriundos de rebanhos de associados da Associação Brasileira de Criadores de Gir leiteiro (ABCGIL). Os animais foram mantidos em propriedade localizada em Uberaba, MG (altitude de 780 m; 19° e 44' de latitude Sul e 47° e 57' de longitude Oeste de Greenwich) para participarem da Pré Seleção de Touros para o Teste de Progênie. As avaliações ocorreram durante cinco meses (dezembro de 2016 a abril de 2017), e o período médio de adaptação dos animais ao novo ambiente e lote antes do início das avaliações foi de 28 dias. As médias de temperatura na região durante o período experimental foram de 25,5°C (dezembro); 24,8°C (janeiro); 26,3°C (fevereiro); 25,3°C (março) e 24,7°C (abril) (EPAMIG, 2018).

As áreas de pastejo eram formadas por capim *Panicum sp.* e manejadas em sistema intensivo de pastejo com lotação rotacionada. Todos os animais receberam o mesmo manejo alimentar, com oferta de 4% de matéria seca/100kg peso vivo durante o período experimental. A oferta de suplementação mineral foi *ad libitum* no cocho saleiro, enquanto a suplementação concentrada teve consumo controlado para garantir escore corporal adequado à prova.

Os animais foram submetidos a quatro coletas de sêmen (intervalo médio de 35 dias entre coletas) por eletroejaculação para obtenção das amostras. Para avaliações relativas ao DNA, alíquotas de 0,25 mL de cada amostra do sêmen fresco foram envasadas sem adição de crioprotetor, visto que esse processo não interfere na integridade da cromatina em diferentes espécies (BOE HANSEN et al., 2005; EVENSON; JOST, 2000; FORTES et al., 2014; WATERHOUSE et al., 2010),

e armazenadas em nitrogênio líquido a -196°C para posterior análise. As avaliações espermáticas relativas à análise do DNA foram realizadas nas dependências da Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba – UNESP e no Instituto René Rachou - Fiocruz Minas. Amostras relativas às avaliações de parâmetros seminais convencionais foram realizadas por empresa credenciada a ASBIA (Associação Brasileira de Inseminação Artificial). Para avaliação da interferência da idade nos parâmetros avaliados, foram utilizados ejaculados obtidos de 43 animais na primeira coleta, os quais foram divididos em três grupos de acordo com suas idades: jovem (18,5-24,7 meses de idade, n=15), jovem adulto (25,2-28,6 meses de idade, n=16) e adulto (29,1-42,0 meses de idade, n=12). Os resultados da avaliação das características reprodutivas (Fertilidade, Classificação Andrológica por Pontos e Índice de Classificação de Touros) foram incluídos nessa primeira abordagem.

Para avaliar a evolução dos parâmetros ao longo das quatro coletas, foram utilizados 38 animais, utilizando os mesmos critérios dos grupos descritos acima: jovem (n=12), jovem adulto (n=13) e adulto (n=13).

5.2. Análise Seminal

5.2.1. Avaliação de parâmetros físicos convencionais

Imediatamente após coleta, os ejaculados foram avaliados quanto à motilidade espermática (Mot; %). Uma gota de sêmen foi colocada em lâmina coberta por lamínula pré-aquecida a 37°C e observada em microscópio equipado com contraste de fase (aumento 400x). A motilidade foi determinada pela estimativa visual da porcentagem de células em movimento (CBRA, 2013). A avaliação morfológica dos espermatozoides (Defeitos Maiores - DM; %, Defeitos Menores - Dm; %, Defeitos Totais - DT; % e Defeitos de Cabeça Totais - DcT; %) foi realizada em um segundo momento a partir do descongelamento de uma palheta de sêmen. Uma alíquota de sêmen de cada ejaculado era adicionada em *ependorff* contendo 1,0 mL de solução de KCl (13,05g KCl, 14,7g NaCl, 500mL água destilada), em quantidade suficiente para turvar a amostra. As análises morfológicas foram realizadas por meio de preparação úmida, onde foram contados 200

espermatozoides com auxílio de microscopia de interferência diferencial de fase (Olympus BX61, aumento 1000x) e as anormalidades morfológicas expressas em porcentagem (BLOM, 1973). O cálculo da concentração ($\times 10^6$ espermatozóides/mL) foi realizado após descongelamento das amostras de sêmen, onde 20 μ L de sêmen foram diluídos em 1mL de solução de formol-salina e analisados em câmara de Neubauer com microscopia de contraste de fase (CBRA, 2013).

5.2.2. Condensação e integridade da cromatina e morfometria da cabeça espermática com Azul de Toluidina

Para avaliação da morfometria da cabeça do espermatozoide e condensação/integridade da cromatina foi utilizado o corante azul de toluidina, segundo o protocolo estabelecido por Beletti e Costa (2003). O protocolo para leitura em microscopia segue sucintamente descrito a seguir.

A amostra descongelada foi diluída em PBS de acordo com sua concentração, de forma a não ocorrer sobreposição de células no preparo dos esfregaços. Os esfregaços foram fixados em solução de etanol e ácido acético (3:1) por 1 minuto e em seguida etanol 70% por 3 minutos. Os esfregaços foram secos ao ar e hidrolisados por 25 minutos em ácido clorídrico 4 N, lavados em água destilada e secos à temperatura ambiente. A seguir, adicionava-se uma gota (10 μ L) de azul de toluidina (Merck KGaA, Darmstadt, Alemanha) a 0,025% em tampão McIlvaine (citrato de sódio-fosfato), pH 4, cobria-se com lamínula e deixava corar por 3 minutos (BELETTI; COSTA, 2003).

Após a coloração, foram captadas fotos de no mínimo 100 cabeças de espermatozoides por lâmina em microscópio óptico Olympus BX61 em aumento de 1000x, acoplado a câmera DP71 (Olympus, Tokyo, Japan) conectado a computador pessoal. Utilizando-se algoritmos desenvolvidos em ambiente de programação matemática Scilab (Scilab, INRIA – Institut National de recherche en informatique et automatique, Rocquencourt, França), as cabeças espermáticas foram identificadas nas fotos, suas colorações convertidas em escala de cinza, e cada cabeça transformada em uma imagem individual, processo este denominado de segmentação. Algoritmos desenvolvidos nesse ambiente ainda possibilitam avaliação da cabeça espermática

em relação a: área, comprimento, largura, perímetro, descritores Fourier com amplitude de 0 a 2 (F0, F1 e F2), coeficiente de variação do grau de cinza (CV) e diferença do grau de cinza (Dif) (BELETTI et al., 2005, BELETTI; COSTA, 2003; OSTERMEIER et al., 2001b).

Para a avaliação da cromatina (CV e Dif), foram obtidas as médias dos valores de pixel que compunham cada uma das cabeças segmentadas. O valor referência (padrão) de coloração normal foi calculado por meio de seleção automática das seis cabeças com maior e menor intensidade de coloração em cada esfregaço, e considerada a média dos valores de pixel destas cabeças (BELETTI; COSTA, 2003). Em seguida, determinou-se para cada imagem a diferença percentual do valor médio dos pixels que compõem a cabeça analisada em relação ao valor médio de pixels das cabeças padrão (Dif, %), indicando descompactação. Visando aumentar a sensibilidade da análise, foi calculado também o coeficiente de variação do grau de cinza (CV, %), que indica heterogeneidade na coloração da cromatina. Dessa forma, cabeças com regiões intensamente coradas intercaladas por regiões pouco coradas, que resultariam em menor média de diferença do grau de cinza, podem ser adequadamente avaliadas.

Para eliminar variáveis como espessura da lâmina, volume de líquido seminal e ajustes microscópicos, determinou-se que cabeças espermáticas com diferença percentual (Dif) maior que 2,0% e/ou coeficiente de variação do grau de cinza (CV) maior que 5,0% apresentam anormalidades na cromatina. Cabeças que se encontram dentro dessa classificação, mediante observação visual poderiam ser classificadas como positivas devido a maior intensidade de coloração (BELETTI; COSTA; GUARDIEIRO, 2005).

5.2.3. Deficiência de protamina na cromatina espermática pela Cromomicina A3 (CMA3)

Para avaliar o conteúdo de protaminas no DNA espermático, foi utilizado o corante cromomicina A3 (CMA3) (Sigma, St. Louis, MO, E.U.A), que compete pelos mesmos sítios de ligação de protaminas, fluorescendo quando ligado ao DNA (IRANPOUR et al., 2000; DE IULIIS et al., 2009). Os resultados obtidos pela

utilização desta técnica permitem avaliar se a substituição de histonas por protaminas foi uniforme.

O protocolo de coloração por CMA3 para análise pelo método da citometria de fluxo foi modificado para um ensaio misto utilizando tubos (etapas iniciais) e microplacas (96 poços, fundo em U; para etapa final de coloração) a partir dos ensaios inicialmente descritos por Simões et al. (2009) e Tavalae et al. (2010).

Para cada amostra foram realizados dois tratamentos: (1) chamado aqui de FP, para avaliar o índice de protaminação, onde a amostra passava por fixação (Carnoy), seguida de permeabilização da membrana plasmática (PBS+Triton X-100 0,1%), com o intuito de promover apenas o enfraquecimento das ligações dissulfídicas entre protaminas e facilitar o acesso do CMA3 a cromatina, e o tratamento correspondente ao controle positivo (2), denominado DTT (Apêndice A), no qual a amostra foi fixada, permeabilizada e tratada com ditiotreitol (DTT) para remoção de protaminas (SIMÕES et al., 2009). A descrição do tratamento para avaliar o índice de protaminação segue descrita a seguir.

Tratamento FP: 25 µL da amostra foram fixados em 7,5mL de Carnoy livre de cloroformio (3 partes de metanol e 1 parte de ácido acético) adicionados em vortex velocidade 4, incubados por 10 minutos em temperatura ambiente e centrifugados a 3.074g por 15min/ 4^oC. Após desprezar o sobrenadante, a amostra foi lavada com 2mL de PBS 1X, e o pellet ressuspendido em 0,6mL de PBS + Triton 0,1%, onde incubava por 15min/37^oC. A amostra permeabilizada foi centrifugada a 3.074g por 15 minutos/4^oC, o sobrenadante desprezado e seu conteúdo ressuspendido em 90 µl de PBS 1X. Dessa amostra, transferia-se 30µl para microplacas com fundo em U, onde incubavam por 60 minutos a temperatura ambiente abrigadas de luz com a solução de coloração de CMA3 (0,0125mg/mL) em tampão Mc Ilvaine's (17 mM ácido cítrico, 164 mM Na₂HPO₄ e 10mM MgCl₂·6H₂O; pH 7.0). Após período de incubação, as amostras foram lavadas (2.562g por 10min/4^oC) com 150µl de PBS (1x). O conteúdo celular foi ressuspendido em 200µL de PBS e transferido para tubos de citometria.

As amostras contendo a suspensão celular foram submetidas ao procedimento de aquisição de dados em citômetro de fluxo. A aquisição dos dados (10.000 eventos) foi realizada com laser de excitação de 405nm e emissão de 605nm em

citômetro de fluxo - *BD LSR Fortessa* (BD Bioscience, San Diego, CA, USA), utilizando o *software* do *CellQuest™* e a análise dos resultados foi realizada no *software FlowJo™*. A Figura 2 ilustra a sequência de procedimentos para a análise da protaminação espermática através da marcação com CMA3, empregando o *software FlowJo™*. A análise consistiu na seleção da população celular de interesse baseada em aspectos morfométricos, realizada através de gráficos de distribuição pontual de área da granulosidade (SSC-A) *versus* altura da granulosidade (SSC-H) (Figura 2A). Após a seleção da região de interesse (R1), foram construídos gráficos de área do tamanho (FSC-A) *versus* área da granulosidade (SSC-A) (Figura 2B). Após a seleção da região de interesse (R2), foi construído histograma com número de espermatozoides *versus* Qdot 605-A (CMA3) (Figura 2C) onde foi obtida a média geométrica da intensidade de marcação do CMA3.

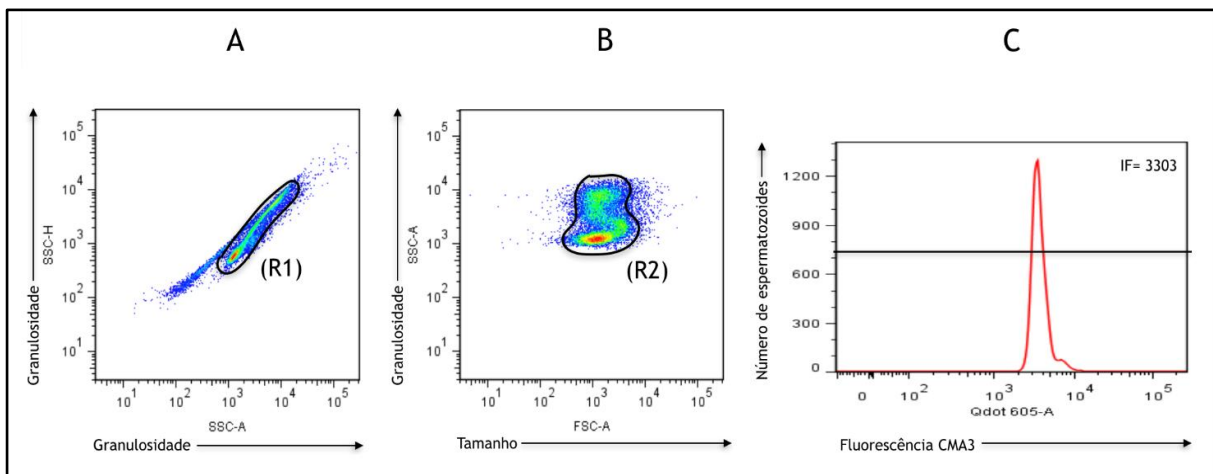


Figura 2. Ilustração de procedimentos para análise do índice de protaminação da cromatina espermática através da marcação com CMA3. A) Perfil da distribuição celular considerando área da granulosidade (SSC-A) *versus* altura da granulosidade (SSC-H) para seleção da população de interesse (R1). B) Perfil da distribuição celular considerando tamanho (FSC-A) *versus* granulosidade (SSC-A) para seleção da população de interesse (R2). C) Histograma unidimensional de fluorescência do CMA3 avaliada em Qdot 605-A e quantificação da intensidade de fluorescência (IF) do CMA3 na população de espermatozoides.

5.3. Avaliação de características reprodutivas dos touros

As avaliações a seguir fizeram parte da Prova de Pré Seleção de touros para Teste de Progênie. O objetivo dessas avaliações foi identificar em jovens reprodutores Gir leiteiro características desejáveis quanto a reprodução e funcionalidade, garantindo a vaga dos melhores animais no Teste de Progênie.

5.3.1. Fertilidade

O touro tem maior impacto na eficiência reprodutiva de um rebanho, pois deve atender um maior número de fêmeas. Neste sentido, torna-se imprescindível eliminar riscos de subfertilidade ou infertilidade junto aos touros melhoradores. Dentro de fertilidade foram avaliados: aspectos clínicos, qualidade espermática a fresco e descongelada, mensuração de perímetro escrotal e libido. Teste de congelabilidade e avaliação da libido receberam destaque especial na avaliação. (EMBRAPA, 2017).

A avaliação da libido se baseou no comportamento sexual de touros diante de fêmeas em cio. Para isso, cada touro foi colocado em curral de 400 m² durante vinte minutos com dez fêmeas, estando pelo menos quatro no cio, e seu desempenho classificado de questionável (0-1) a excelente (5-6).

5.3.2. Classificação Andrológica por Pontos (CAP)

A avaliação do potencial reprodutivo foi baseada na classificação andrológica por pontos de acordo com Vale Filho, 1997. Nessa classificação, os animais são avaliados e pontuados levando-se em consideração a circunferência escrotal relacionada à idade, morfologia (defeitos maiores e defeitos totais) e à motilidade espermática (de massa, 0-5; individual, %). Animais com CAP maior que 70 pontos foram considerados aptos.

	Excelente	Bom	Regular	Fraco
Motilidade espermática				
De massa (0-5)	Vigor 5	Vigor 4-5	Vigor 4	Vigor 3 (0-3)
Individual (%)	Acima 70%	60-70%	50-60%	Abaixo 50%
Total de pontos	20	12	10	3
Morfologia espermática				
Defeitos maiores	Abaixo 10%	10-19%	20-29%	Acima 29%
Total de defeitos	Abaixo 25%	26-39%	40-59%	Acima 59%
Total de pontos	40	25	10	3
Circunferência escrotal				
Idade (Meses)				
18-23	Acima 30 cm	26-30 cm	Abaixo 26 cm	Abaixo 26 cm
24-29	Acima 34 cm	30-34 cm	Abaixo 30 cm	Abaixo 30 cm
30-41	Acima 36 cm	31-36 cm	Abaixo 31 cm	Abaixo 31 cm
42-60	Acima 38 cm	32-38 cm	Abaixo 32 cm	Abaixo 32 cm
>60	Acima 39 cm	34-39 cm	Abaixo 34 cm	Abaixo 34 cm
Total de pontos	40	24	10	10

Fonte: VALE FILHO (1997).

Figura 3. Critérios utilizados para a avaliação de CAP de acordo com Vale Filho (1997).

5.3.3. Índice de Classificação de Touros (ICT)

Com o aumento da pressão de seleção dos jovens reprodutores e escolha dos touros que entrarão no teste de progênie, utiliza-se a metodologia de um índice de classificação (ICT), onde são atribuídos pesos específicos para cada característica avaliada, culminando em um resultado final que permite a classificação destes animais (Figura 4). A característica "Fertilidade" do touro é fator limitante para o ICT, sendo classificados somente touros que alcançaram CAP superior a 70 pontos e sêmen aprovado para congelabilidade (EMBRAPA, 2017).

$$ICT = \frac{(F*20)/16,66 + (L*7) + (T*10) + (TF*15) + (E*15) + (A*15) + (U*10) + (P*8)}{6}$$

6

Figura 4. Fórmula de medidas que compõem a nota do índice de classificação de touros (ICT). Fertilidade (F), Libido (L), Temperamento (T) e Características Funcionais (Tipo Funcional (TF), Estrutura (E), Aprumos (A), Conjunto Umbigo-Bainha-Prepúcio (U) e Pigmentação (P)). O asterisco representa a multiplicação da medida pelo seu peso na fórmula em porcentagem (EMBRAPA, 2017).

5.4. Análises estatísticas

As análises estatísticas foram realizadas por meio do software Graph Pad Prism 5.0™ (San Diego, California). Para avaliar as diferenças entre variáveis de morfometria e compactação do DNA analisadas pelo Azul de Toluidina, variáveis do índice de protaminação pelo CMA3, parâmetros físicos convencionais de avaliação seminal e características reprodutivas, os dados foram testados quanto suas normalidades. Dados que apresentaram distribuição normal foram submetidos a análise de variância (ANOVA) com medidas repetidas e suas médias comparadas pelo teste de Tukey. Os resultados que não apresentaram distribuição normal foram submetidos ao teste não paramétrica de Friedman. Para a análise de correlação dos dados utilizou-se o coeficiente de correlação de Spearman. Se durante a análise exploratória dos dados alguma relação foi identificada, realizou-se regressão linear para determinar o valor da significância da correlação da variável em questão em relação ao tempo transcorrido durante as coletas. Os resultados obtidos foram considerados estatisticamente significativos quando $P < 0,05$.

5.4.1. Redes de correlação

Após cálculo do coeficiente de correlação de Spearman, os dados foram filtrados no Software Microsoft Office Excel™, sendo selecionados apenas os valores estatisticamente significativos, os quais foram transferidos para uma matriz de correlação construída neste mesmo programa. Esta matriz, além de calcular a intensidade da correlação e caracterizá-la como positiva ou negativa, também cria tabelas para leitura no programa Cytoscape™, onde as redes de correlação foram geradas e tratadas. A análise das redes de correlação permite avaliar os dados de forma conjunta, integrando resultados de diversas análises para a geração de redes de intercâmbio de dados. Isto significa que, apesar da subjetividade inerente a este tipo de análise, as redes possibilitam visão geral da interação entre resultados de diferentes abordagens. Nessa avaliação foram correlacionados dados de

morfometria e compactação do DNA, deficiência de protamina, parâmetros físicos convencionais de qualidade espermática e características reprodutivas.

6. RESULTADOS

6.1. Avaliação das variáveis em função da idade

Foi avaliada influência da idade sobre os parâmetros de avaliação do DNA espermático como morfometria e compactação/integridade da cromatina (azul de toluidina) e deficiência de protamina (CMA3), assim como parâmetros físicos e convencionais de avaliação seminal e características reprodutivas dos touros.

As variáveis: área, perímetro, largura, comprimento, F0, F1, F2, DIF (diferença do grau de cinza), FP (amostra fixada e permeabilizada para CMA3: índice de protaminação), motilidade, defeitos maiores, defeitos menores, defeitos totais, defeitos de cabeça totais e índice de classificação de touros não apresentaram diferença significativa ($P > 0,05$) entre os grupos de idade.

As variáveis que apresentaram diferença significativa ($P < 0,05$) entre os grupos de idade foram: heterogeneidade na compactação de cromatina (CV), Fertilidade e CAP (Classificação Andrológica por Pontos).

Animais do grupo jovem apresentaram maior valor percentual para a variável de coeficiente de variação do grau de cinza (CV) que animais do grupo jovem adulto, indicando que espermatozoides desse grupo tiveram a cromatina compactada de forma mais heterogênea. A avaliação conjunta dos valores de Dif e CV indica alteração de cromatina ($Dif > 2$ e/ou $CV > 5$) apenas no grupo jovem. O grupo jovem adulto por sua vez, apresentou melhores notas de Fertilidade e CAP que animais do grupo adulto (Tabela 1).

Tabela 1. Perfil encontrado na avaliação das variáveis em função da idade (primeira coleta) quanto a morfometria, compactação/integridade e deficiência de protamina do DNA espermático, parâmetros seminais convencionais e características reprodutivas de touros *Bos taurus indicus* da raça Gir (n=43) nos grupos: jovem (n=15), jovem adulto (n=16) e adulto (n=12).

VARIÁVEIS [#]	GRUPOS (Idade, meses)			
	JOVEM (18,5-24,7)	JOVEM ADULTO (25,2-28,6)	ADULTO (29,1-42,0)	
Azul de Toluidina	Área (mm ²)	80,04±2,41	76,56±1,40	78,30±2,46
	Perímetro (mm)	632,60±7,96	620,50±5,66	633,80±8,02
	Largura (mm)	124,40±2,64	121,30±1,49	122,70±2,28
	Comprimento (mm)	238,70±2,53	234,90±2,13	239,60±4,58
	F0	1.201,00±29,84	1.177,00±25,03	1.220,00±29,34
	F1	125,30±7,31	121,20±8,26	135,90±8,82
	F2	112,60±5,28	104,30±3,38	105,30±4,37
	CV (%)	2,52±0,31 ^a	1,75±0,10 ^b	2,04±0,25 ^{ab}
DIF (%)	2,54±0,30	1,90±0,09	1,92±0,14	
CMA3	FP	4.686,00±488,10	4.281,00±305,50	4.624,00±544,00
Análise Seminal Convencional	Motilidade (%)	59,33±5,02	65,00±4,56	61,67±6,84
	DM (%)	3,83±0,77	4,53±1,15	2,83±0,66
	Dm (%)	6,03±1,32	6,71±2,17	7,04±3,06
	DT (%)	9,87±1,69	11,25±2,73	9,96±2,90
	DcT (%)	1,53±0,55	1,93±0,61	1,04±0,43
	Concentração	278,80±40,93	540,50±150,50	534,20±170,70
Características Reprodutivas	Fertilidade	82,20±2,56 ^{ab}	87,27±2,05 ^a	77,60±2,74 ^b
	ICT	72,22±2,09	75,83±3,23	72,17±3,44
	CAP	81,71±1,76 ^{ab}	83,64±3,92 ^a	76,82±3,16 ^b

[#]Dados estão expressos em média ± erro padrão da média. ^{a,b} Letras diferentes na mesma linha diferem estatisticamente pelos testes de Tukey e Friedman (P<0,05). CV (coeficiente de variação do grau de cinza), Dif (diferença do grau de cinza), F0-F2 (Descritores Fourier de Amplitude Harmônica), FP (índice de protaminação), DM (Defeitos Maiores), Dm (Defeitos Menores), DT (Defeitos Totais), DcT (Defeitos de Cabeça Totais), Concentração (x10⁶ espermatozoides/mL), Fertilidade (0-100), ICT (Índice de Classificação de Touros, 0-100), CAP (Classificação Andrológica por Pontos, 16-100).

6.1.1. Correlações dos parâmetros analisados em função da idade

Sob visão panorâmica das redes de correlações geradas (Figura 5) foi possível observar que o padrão e intensidade das correlações variam bastante de acordo com o grupo de animais. O grupo jovem promoveu a formação de rede mais complexa e com maior número de correlações entre variáveis do azul de toluidina e parâmetros físicos convencionais de qualidade espermática, correlações essas em sua maior parte positivas de intensidade moderada. No grupo de animais jovens adultos, a análise de deficiência de protamina da cromatina espermática passa a se correlacionar com os parâmetros físicos convencionais de qualidade espermática e com as características reprodutivas. O grupo de animais adultos, apresentou maior envolvimento de correlações positivas fortes entre parâmetros físicos convencionais de qualidade espermática e características reprodutivas.

Todas as faixas etárias apresentaram correlação positiva do grau de heterogeneidade com variáveis morfométricas como área ($r = 0,53$), perímetro ($r = 0,49$), largura ($r = 0,51$), comprimento ($r = 0,52$) da cabeça espermática e descritor Fourier de amplitude harmônica F2 ($r = 0,50$) e Dif ($r = 0,73$). No grupo adultos, a avaliação de deficiência de protamina correlacionou-se negativamente com classificação andrológica por pontos ($r = -0,74$).

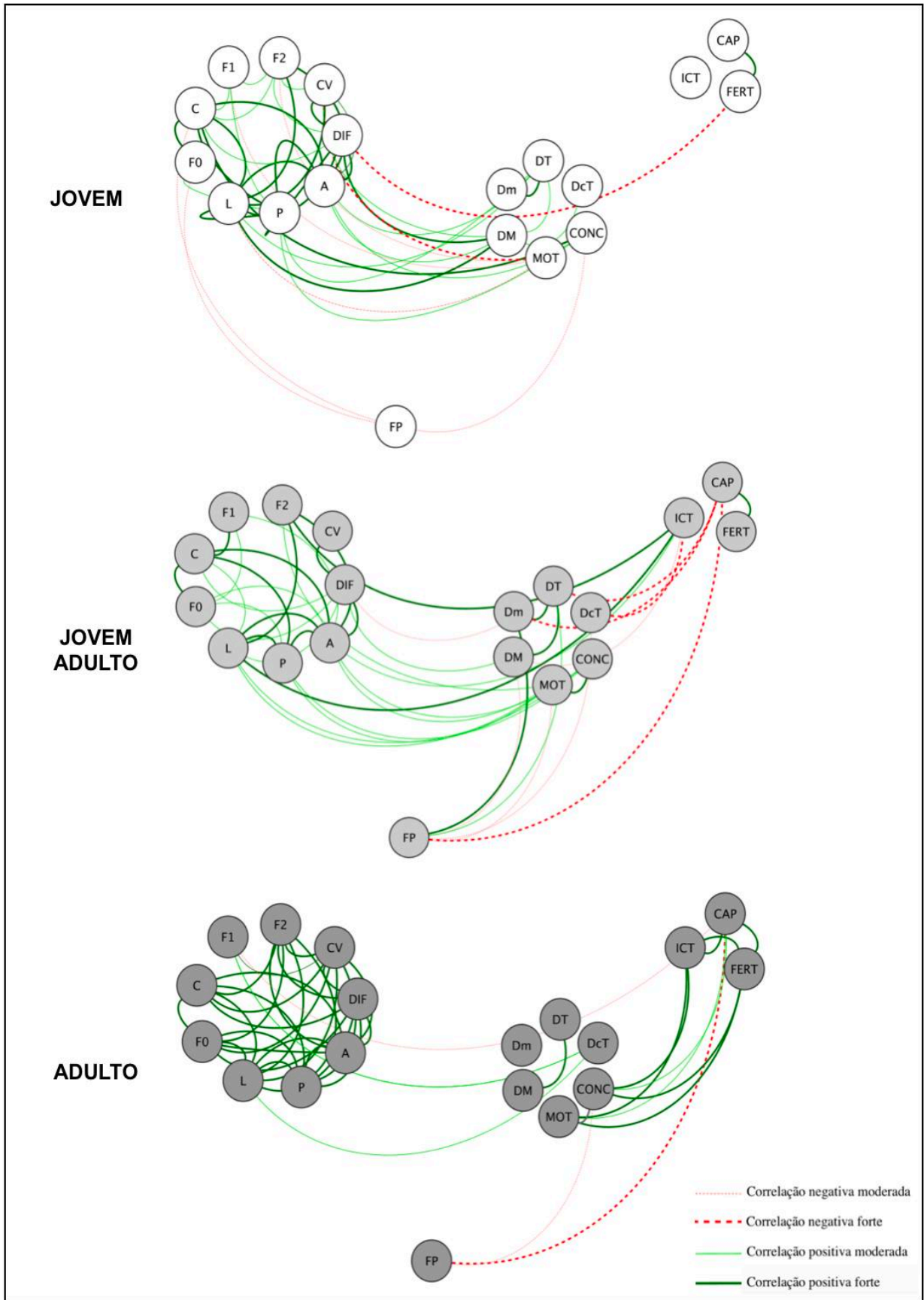


Figura 5. Rede de correlações dos parâmetros avaliados em função da idade na primeira coleta. Grupo Jovem (n=15), grupo Jovem Adulto (n=16) e grupo Adulto (n=12). Para análise comparativa observacional foram construídos conjuntos de variáveis, sendo eles: 1- Compactação/Integridade do DNA e Morfometria espermática (A (Área), P (Perímetro), L (Largura), C (Comprimento), CV (Coeficiente de variação do grau de cinza), DIF (Diferença do grau de cinza), 2 – Deficiência de protamina (Índice de protaminação-FP), 3- Parâmetros físicos convencionais de qualidade espermática (MOT (Motilidade), DM (Defeitos Maiores), Dm (Defeitos Menores), DT (Defeitos Totais), DcT (Defeitos de Cabeça Totais), CONC (Concentração)) e 4- Características reprodutivas (ICT (Índice de Classificação de Touros), CAP (Classificação Andrológica por Pontos) e Fertilidade (Fert)). Correlações foram consideradas moderadas quando $0.36 > r < 0.67$ e fortes quando $r > 0.68$. Correlações fracas não estão representadas na figura.

6.2. Avaliação das variáveis em função do tempo transcorrido entre as quatro coletas mensais (5 meses)

6.2.1. Avaliação de deficiência de protamina da cromatina espermática com Cromomicina A3

Espermatozoides do grupo jovem apresentaram maior intensidade de fluorescência, logo, maior deficiência de protamina (pior qualidade do empacotamento da cromatina) na primeira e quarta coletas ($P < 0,05$) (Tabela 2).

Tabela 2. Perfil de ligação de Cromomicina A3 (CMA3) em espermatozoides de touros *Bos taurus indicus* da Raça Gir em quatro coletas mensais (C1 a C4). Jovem (n=12), Jovem Adulto (n=13) e Adulto (n=13).

VARIÁVEIS [#]		Coletas Mensais			
		C1	C2	C3	C4
JOVEM (18,5-24,7)	FP	5.111±619 ^a	3.844±196 ^{bc}	3.529±141 ^c	4.388±171 ^{ab}
JOVEM ADULTO (25,6-28,6)	FP	4.429±364	4.530±547	4.157±264	4.356±271
ADULTO (29,1-42,0)	FP	4.490±634	7.598±2.318	3.719±159	4.522±305

#Dados estão expressos em média ± erro padrão da média da intensidade de fluorescência de marcação com CMA3. Valores obtidos em citômetro de fluxo FORTESSA (exc:405nm;em:605nm). ^{a,b} Letras diferentes na mesma linha diferem estatisticamente pelo teste de Tukey (P<0,05). FP (Índice de Protaminação).

6.2.2. Análise dos parâmetros físicos convencionais de qualidade espermática

A avaliação morfológica indicou que em touros jovens a porcentagem de Defeitos Maiores foi menor na segunda coleta em relação a primeira. No grupo jovem adulto, a porcentagem de Defeitos Menores sofreu redução entre a primeira e terceira coletas. Em relação aos Defeitos Totais, a primeira coleta do grupo jovem apresentou a maior porcentagem de defeitos, enquanto que no grupo jovem adulto a porcentagem oscilou, reduzindo significativamente da primeira para segunda coleta, voltando a aumentar na terceira. Apenas o grupo adulto apresentou diferença para Defeitos de Cabeça Totais, tendo o percentual aumentado da terceira para quarta coleta. Motilidade e concentração não apresentaram diferença significativa entre coletas em nenhum dos grupos (Tabela 3).

Tabela 3. Parâmetros físicos convencionais de qualidade do sêmen de touros *Bos taurus indicus* da Raça Gir (n= 38) em Quatro Coletas Mensais (C1 a C4). Jovem (n=12), Jovem Adulto (n=13) e Adulto (n=13).

VARIÁVEIS #		Coletas Mensais			
		C1	C2	C3	C4
JOVEM (18,5-24,7)	Motilidade (%)	63,33±7,45	66,67±2,36	66,67±2,89	76,67±3,33
	DM (%)	3,89±0,82 ^a	0,78±0,50 ^b	1,39±0,31 ^{ab}	3,11±1,01 ^{ab}
	Dm (%)	5,72±1,41	2,17±0,55	2,78±0,58	1,78±0,64
	DT (%)	9,67±2,00 ^a	3,00±0,70 ^b	4,17±0,55 ^b	4,89±1,27 ^b
	DcT (%)	1,39±0,62	0,00±0	0,17±0,17	2,06±0,96
	Concentração	269,80±50,3	413,70±113,10	468,80±139,80	238,20±36,44
JOVEM ADULTO (25,6-28,6)	Motilidade (%)	64,55±6,38	55,45±5,78	59,09±7,44	62,73±7,64
	DM (%)	4,21±1,51	0,87±0,25	1,54±0,46	4,25±1,48
	Dm (%)	7,17±2,85 ^a	1,42±0,29 ^b	5,58±1,85 ^a	3,50±0,84 ^{ab}
	DT (%)	11,42±3,60 ^a	2,29±0,44 ^b	7,12±1,74 ^a	7,75±2,20 ^{ab}
	DcT (%)	1,37±0,52	0,08±0,08	0,12±0,09	1,37±0,51
	Concentração	599,50±181,40	729,20±169,20	740,90±128,50	329,40±75,25
ADULTO (29,1-42,0)	Motilidade (%)	64,55±5,62	57,27±6,75	66,36±2,79	63,64±5,76
	DM (%)	2,36±0,60	2,27±1,21	1,45±0,67	2,91±0,69
	Dm (%)	7,59±3,38	4,41±2,32	3,41±0,72	2,14±0,61
	DT (%)	10,05±3,27	6,68±3,51	4,95±0,88	5,04±1,02
	DcT (%)	1,19±0,43 ^{ab}	0,15±0,10 ^{ab}	0,00±0 ^b	2,55±0,71 ^a
	Concentração	494,40±162	346,00±65,93	417,50±105,60	437,80±75,34

#Dados estão expressos em média ± erro padrão. ^{a,b,c} Letras diferentes na mesma linha diferem estatisticamente pelos testes de Tukey e Friedman (P<0,05). DM (Defeitos Maiores), Dm (Defeitos Menores), DT (Defeitos Totais), DcT (Defeitos de Cabeça Totais), Concentração (x10⁶ espermatozoides/mL).

6.2.3. Avaliação da condensação/integridade da cromatina e morfometria da cabeça espermática com Azul de Toluidina

Os resultados da técnica do azul de toluidina para avaliar condensação/integridade da cromatina e morfometria da cabeça espermática não apresentaram diferença ($P < 0,05$) ao longo das coletas, em nenhum grupo de idade. Entretanto, a avaliação conjunta dos valores de Dif e CV ($\text{Dif} > 2$ e/ou $\text{CV} > 5\%$) indica que apenas o grupo jovem apresentou alteração na compactação da cromatina, tendo esta ocorrido em todas as coletas (Tabela 4).

Tabela 4. Dados de morfometria e características de compactação/integridade da cromatina avaliados pelo método Azul de Toluidina em espermatozoides de touros *Bos taurus indicus* da Raça Gir (n=38) em Quatro Coletas Mensais (C1 a C4). Jovem (n=12), Jovem Adulto (n=13) e Adulto (n=13).

VARIÁVEIS [#]		Coletas Mensais			
		C1	C2	C3	C4
JOVEM (18,5-24,7)	Área (mm ²)	79,98±2,22	82,27±3,21	83,12±3,30	85,19±2,61
	Perímetro (mm)	631,70±7,51	638,70±11,21	640,20±12,05	648,10±8,77
	Largura (mm)	124,50±2,23	128,00±3,06	128,50±3,11	130,40±2,53
	Comprimento (mm)	238,10±2,28	239,10±3,61	239,60±4,01	242,50±3,08
	F0	1.190,00±28,12	1.192,00±31,12	1.193,00±39,36	1.210,00±30,67
	F1	124,80±5,39	129,30±7,03	132,10±8,67	131,70±5,39
	F2	113,60±5,31	116,70±6,74	123,00±6,81	121,20±5,33
	CV (%)	2,46±0,33	2,40±0,36	2,58±0,50	2,90±0,53
	DIF (%)	2,38±0,25	2,87±0,51	3,15±0,59	3,09±0,58
JOVEM ADULTO (25,6-28,6)	Área (mm ²)	76,75±1,51	78,74±2,30	79,36±2,68	80,64±2,23
	Perímetro (mm)	577,20±43,18	624,40±7,77	629,60±7,84	630,30±7,74
	Largura (mm)	121,60±1,55	124,20±2,61	125,40±2,96	126,60±2,59
	Comprimento (mm)	234,60±2,04	234,80±2,55	236,00±2,52	235,90±2,63
	F0	1.172,00±23,10	1.145,00±27,62	1.154±26,39	1.150,00±29,58
	F1	120,60±9,53	120,50±7,96	120,10±7,28	120,40±8,18
	F2	106,40±3,83	110,90±5,83	113,20±7,16	114,40±5,21
	CV (%)	1,78±0,12	1,80±0,12	2,57±0,46	2,41±0,65
	DIF (%)	1,94±0,11	1,94±0,18	1,91±0,20	1,83±0,13
ADULTO (29,1-42,0)	Área (mm ²)	78,93±2,43	74,26±1,88	78,66±2,26	79,10±2,59
	Perímetro (mm)	636,60±7,85	614,40±8,37	622,40±5,98	631,00±9,16
	Largura (mm)	123,30±2,18	119,90±1,87	123,80±2,40	124,80±2,34
	Comprimento (mm)	240,60±4,31	232,40±2,91	234,80±2,04	236,80±3,04
	F0	1.227,00±27,86	1.155,00±28,95	1.149,00±20,75	1.185,00±29,52
	F1	137,00±8,18	125,80±9,31	122,00±4,54	137,30±9,04
	F2	106,50±4,21	101,10±3,31	113,50±4,47	113,10±4,83
	CV (%)	2,36±0,39	2,04±0,22	1,86±0,17	1,84±0,17
	DIF (%)	1,93±0,14	1,89±0,09	2,00±0,26	1,96±0,21

Dados estão expressos em média ± erro padrão da média. Não houve diferença significativa ao longo das coletas pelos testes de Tukey e Friedman (P<0,05). F0-F2 (Descritores Fourier de Amplitude Harmônica), CV (coeficiente de variação do grau de cinza), Dif (diferença do grau de cinza).

6.2.4. Correlação das variáveis em relação ao tempo transcorrido durante as coletas

Algumas variáveis referentes à morfometria (Azul de Toluidina), mostraram ser influenciadas significativamente pelo fator tempo ($P < 0,05$), tendo estas apresentado padrão crescente ao longo das quatro coletas. Tal achado indica que o tempo transcorrido entre a primeira e quarta coleta foi determinante para a forma como determinadas variáveis se comportaram. No grupo jovem tais variáveis foram: área, perímetro e largura, e no grupo jovem adulto: área, descritor Fourier F2 e largura. Variáveis morfométricas do grupo Adulto não apresentaram influência ($P > 0,05$) (Figura 4).

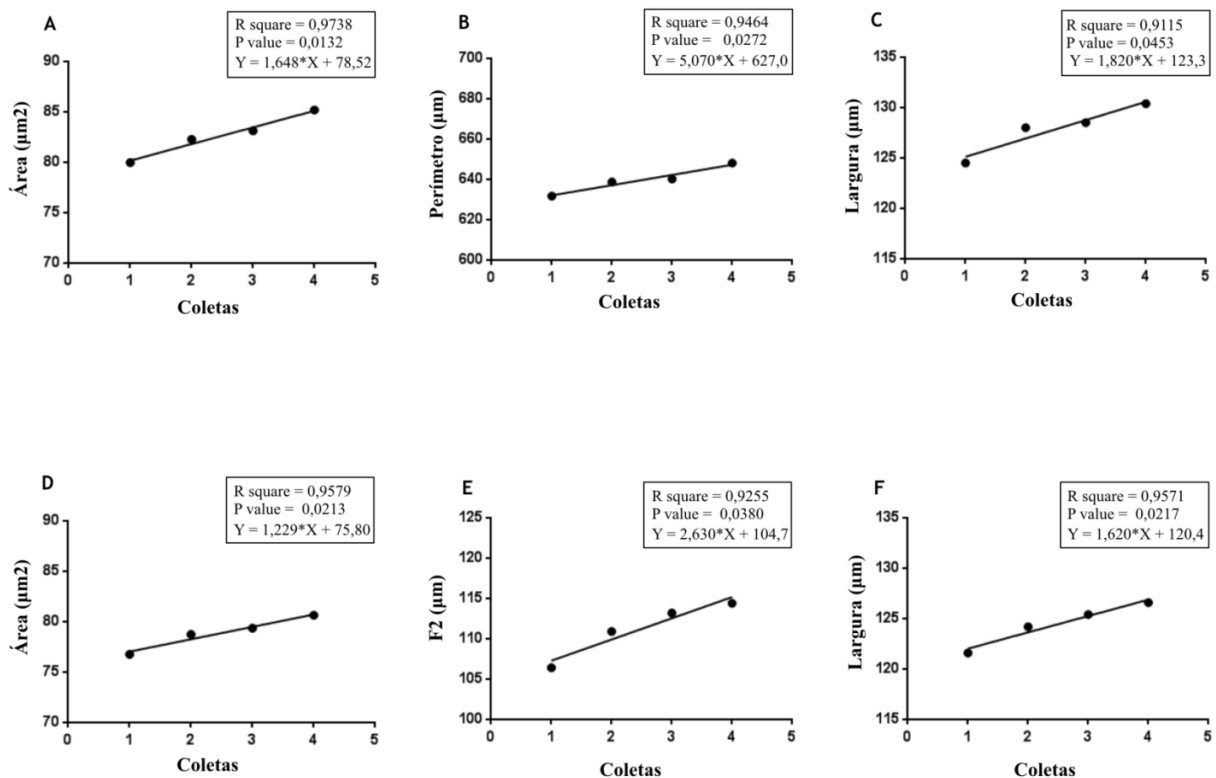


Figura 6. Correlação linear entre variáveis e as quatro coletas mensais (C1 a C4) avaliada em touros *Bos taurus indicus* da Raça Gir (n= 38). Jovem (n=12) e Jovem Adulto (n=13). Os gráficos A, B e C correspondem as variáveis do grupo jovem: área, perímetro e largura. Os gráficos D, E e F são referentes ao grupo jovem adulto: área, largura e descritor Fourier F2.

7. DISCUSSÃO

Neste estudo foram utilizados animais *Bos taurus indicus* da raça Gir de alto mérito genético, com idade entre 18 e 42 meses, estando parte deles compreendidos em faixa etária (18-24 meses) que já foi descrita como início de pós puberdade para touros mestiços de clima tropical (FORTES et al., 2012). Dentro desse contexto, parte dos animais aqui avaliados ainda está passando por amadurecimento sexual, não tendo atingido plenitude de seu potencial reprodutivo. A literatura indica que a progressão da idade possui relação direta com características como qualidade espermática (MARTINS et al., 2011) e integridade da cromatina (EVENSON et al., 2011). Desta forma, hipotetizamos que touros mais velhos da nossa amostragem apresentariam maior amadurecimento tanto nas avaliações de características seminais convencionais, quanto em características relacionadas à compactação/integridade, qualidade do empacotamento da cromatina e morfometria espermática.

Dentre as avaliações das variáveis em função da idade realizadas no presente estudo, diferenças significativas foram encontradas para o coeficiente de variação do grau de cinza (CV) pela coloração com Azul de Toluidina, características reprodutivas de Fertilidade e Classificação Andrológica por Pontos (CAP).

De acordo com classificação estabelecida por Beletti, Costa e Guardieiro (2005), amostras que apresentam diferença do grau de cinza (Dif) > 2.0 e/ou CV > 5.0, possuem alteração na compactação e integridade da cromatina espermática. Neste experimento foi possível observar que os touros jovens (18,5 - 24,7 meses) apresentaram menor capacidade de compactar cromatina (CV= 2,52±0,31; Dif= 2,54±0,30), ou seja, foram imaturos para essa característica, diferente de touros dos grupos jovem adulto (CV= 1,75±0,10; Dif=1,90±0,09) e adulto (CV= 2,04±0,25; Dif= 1,92±0,14), que por sua vez, mostraram-se maduros.

Diferente de estudo realizado em galos (RODRIGUES; ROCHA; BELETTI, 2009), encontramos correlações entre CV e variáveis morfométricas, como área, perímetro, largura, comprimento e amplitude harmônica F2 em todos os grupos de idade. Isto indica que, embora não se tenha evidenciado diferenças significativas na avaliação morfométrica, que a compactação da cromatina influenciou tanto no

formato do núcleo, quanto na cabeça espermática como um todo, conforme descrito por diversos autores (KIPPER et al., 2017; BELETTI; COSTA; GUARDIEIRO, 2005; OSTERMEIER et al., 2001a). Além disso, todas as faixas etárias deste experimento apresentaram forte correlação entre a variável de heterogeneidade (CV) e a variável indicativa de descompactação (Dif), revelando que nesta amostragem, anormalidades na condensação da cromatina foram na maior parte heterogêneas. Anormalidades de condensação sem consequências no tamanho da cabeça são justificadas pela ocorrência de pequenas alterações de protaminas ou proteínas estruturais, que podem levar a imperfeições na ligação protaminas-DNA. Mesmo protaminas normais podem se ligar de forma inadequada, o que facilita a ligação do corante aos grupos fosfatos do DNA (BIANCHI et al., 1996). A ocorrência desse tipo de anormalidade ressalta a necessidade de associação de avaliações relativas à cromatina com avaliações morfométricas (BELETTI; COSTA; GUARDIEIRO, 2005).

A pontuação para CAP no presente estudo (jovem = 81,71; jovem adulto = 83,64; adulto = 76,82) apresenta-se inferior aos resultados de Lopes et al. (2016) para touros *Bos taurus indicus* com idades entre 21 e 27 meses (91,29). Este autor justificou seus resultados superiores pelo fato de seus animais serem descendentes de rebanhos submetidos a forte pressão de seleção para características reprodutivas, o que favoreceu o descarte de animais com baixa e reduzida capacidade. Assim como na CAP, todos os grupos se mostraram aptos para Fertilidade (jovem = $82,20 \pm 2,56$; jovem adulto = $87,27 \pm 2,05$; adulto = $77,60 \pm 2,74$). No entanto, os resultados destes parâmetros foram contrários aos esperados, tendo o grupo adulto apresentado a pontuação mais baixa, não sendo possível observar melhora na capacidade reprodutiva da amostragem dentro do período experimental.

A classificação andrológica por pontos é amplamente empregada na seleção de animais por ser considerada boa preditora de capacidade reprodutiva (LOPES et al., 2016; BARTH, 2018). Existem variações metodológicas para classificação de touros *Bos taurus taurus* (CHENOWETH, 1980) e *Bos taurus indicus* (FONSECA; SANTOS; MALINSKY, 1997), porém, a medida de circunferência escrotal é fator sempre destacado devido a sua correlação direta com fertilidade (BARTH, 2018; LOPES et al., 2016; MENON et al., 2011). Fortes et al. (2014) correlacionaram positivamente circunferência escrotal e índice de protaminação, de forma que maior

circunferência escrotal se associa a maior conteúdo de protamina. Apesar dos resultados aqui encontrados na avaliação do índice de protaminação (CMA3) não terem diferido entre os grupos de idade, eles apresentaram forte correlação negativa com CAP no grupo adulto. A interpretação desses achados indica que nessa faixa etária (29,1-42,0 meses) possivelmente a avaliação por CMA3 pode ser método preditor de classificação dos animais quanto ao seu potencial de fertilidade.

O confinamento dos animais na fazenda experimental começou em média 28 dias antes da primeira coleta. Para isso, os touros foram transportados de suas propriedades de origem, divididos em lotes, além de passar por adaptação às novas condições de manejo. Estudos mostram que transporte e adaptação a novo ambiente são fatores desencadeadores de estresse em touros jovens, e que estão associados a aumento de cortisol (MACKENZIE et al., 1997; GUPTA et al., 2007; SPORER et al., 2007; RAZZUOLI et al., 2016; STRADAIOLI et al., 2017). Glicocorticoides possuem ação a nível de pituitária e testículo, suprimindo a secreção de testosterona. Privação de andrógenos levam a morte celular programada no epitélio seminífero, e ocasionam danos ao DNA espermático (EL-FAKAHANY; SAKKAS, 2011). No presente estudo, apenas o grupo jovem demonstrou oscilação dos resultados na intensidade de fluorescência do CMA3 ao longo das coletas. Acreditamos que o valor do CMA3 da primeira coleta (5.111 ± 619) pode ser resultado do estresse vivido por esses animais no período que precedeu o início das coletas.

Sabe-se que estresse térmico é um dos principais fatores capazes de interferir na espermatogênese, e conseqüentemente na qualidade seminal (BARTH E BOWMAN, 1994). Falta de protaminação na cromatina espermática já foi relatada como um dos resultados mais pertinentes do estresse térmico, afetando principalmente células espermáticas que estão passando por estágio meiótico e remodelação durante a espermiogênese (RAHMAN et al., 2011). A quarta e última coleta ocorreu 56 dias após o mês de fevereiro, que apresentou a maior temperatura (máxima de $31,5^{\circ}\text{C}$) de todo o período experimental. Ou seja, células espermáticas que estavam em início de fase meiótica durante o mês de fevereiro foram coletadas na quarta coleta, onde ocorreu aumento da intensidade de fluorescência em relação ao mês anterior. Touros *Bos taurus taurus* tendem a sofrer mais danos em relação à

qualidade espermática quando submetidos a estresse térmico, do que animais *Bos taurus indicus* (KOIVISTO et al., 2009), porém, touros Nelore apresentaram reduzida qualidade seminal após serem submetidos a insulação testicular, tendo sido observada maior incidência de defeitos de cabeça, assim como vacúolos e anormalidade de cromatina (FERNANDES et al., 2008).

Muitos autores já avaliaram a qualidade do empacotamento da cromatina em função da idade em bovinos (FORTES et al., 2012; FORTES et al., 2014; CARREIRA et al., 2017; KIPPER et al., 2017; BOE-HANSEN, 2018), humanos (KUMARESAN, 2017), ratos (ZUBKOVA; WADE; ROBAIRE, 2005) e até mesmo em galos (RODRIGUES; ROCHA; BELETTI, 2009) entretanto, os resultados muitas vezes são inconsistentes. Como exemplo, o estudo realizado por Fortes et al. (2012), que avaliou fragmentação da cromatina de touros em idade pós puberal nas faixas de 13, 18 e 24 meses de idade, através dos testes "Sperm Chromatin Structure Assay" (SCSA) e "Sperm-bos-halomax" (SBH). Os níveis de fragmentação da cromatina não sofreram redução com o avançar da idade como era esperado. Por outro lado, Carreira et al. (2016) relataram redução na deficiência de protaminação com a progressão da idade, posto que animais do grupo jovens (1.8 a 2 anos de idade) tiveram menores índices de protaminação que animais adultos (3,5-7 anos de idade) e senis (8-14,3 anos de idade), mostrando que apesar de considerados sexualmente maduros, esses animais podem apresentar incompetência quanto a integridade nuclear. Embora os estudos avaliem características diferentes (fragmentação x qualidade do empacotamento), tais atributos estão relacionados, visto que menor protaminação leva a maior susceptibilidade para quebra de fita do DNA.

Tais divergências são frutos de diferenças entre animais e métodos de coleta seminal (BOE HANSEN; FORTES; SATAKE, 2018) metodologia de análise empregada, critérios de interpretação de morfologia, equipamentos disponíveis para análise, assim como a sensibilidade destes (BIANCHI, 1996). Ainda, inconsistência dos relatos mostram que o processo de compactação ainda não é totalmente elucidado na faixa etária que compreende o período pós púbere até maturidade sexual. O resultado aqui apresentado de que apenas touros jovens apresentaram imaturidade em relação ao conteúdo de protamina (CMA3) e

compactação/integridade (Azul de Toluidina) do DNA, ressalta ainda mais a necessidade do entendimento desse processo nessa faixa etária.

Ainda que variáveis morfométricas não tenham diferido ao longo das coletas nem entre os grupos de idade, suas médias apresentaram padrão crescente com o passar do tempo nos grupos jovem e jovem adulto, de forma que a cada coleta medidas como área e largura da cabeça do espermatozoide aumentaram. Esse tipo de análise ao longo do tempo é, ao nosso conhecimento, pouco explorado. Galos (RODRIGUES; ROCHA; BELETTI, 2009), touros (KIPPER et al., 2017) e porcos (KONDRACKI; BONASZEWSKA; MIELNICKA, 2005) já tiveram tais parâmetros avaliados de acordo com a idade, sendo que destas espécies, apenas suínos mais velhos apresentaram maior área da cabeça em relação a animais jovens. O padrão crescente para dimensão da cabeça aqui encontrado em animais de 18,5 - 28,6 meses de idade sugere que apesar de terem atingido maturidade sexual (MARTINS et al., 2011), características morfométricas ainda se encontravam instáveis e em desenvolvimento.

Nossos achados não mostraram diferença na porcentagem de defeitos morfológicos entre idades, diferente de outros estudos (FORTES et al., 2012; KIPPER et al., 2017). Todavia, foi possível observar que os grupos jovem e jovem adulto apresentaram maior variação ao longo das coletas nas médias para morfologia, indicando mais uma vez que os animais estavam estabelecendo capacidade de organização para determinadas características de qualidade seminal. Apesar do padrão encontrado, todos os grupos apresentaram baixo percentual de defeitos, por serem animais de genética altamente selecionados, mantidos em boas condições de manejo.

A rede de correlações elaborada para avaliar a dinâmica entre os testes realizados de acordo com os grupos de idade claramente ilustra que alguns testes correlacionaram-se mais com outros dependendo da faixa etária. Por exemplo, as variáveis do azul de toluidina e parâmetros físicos convencionais de qualidade espermática correlacionaram-se de forma mais ativa no grupo jovens, enquanto no grupo adulto, as correlações se concentraram mais entre parâmetros físicos convencionais de qualidade espermática e características reprodutivas, configurando outro padrão de rede. Desta forma, resultados de testes para investigação de

qualidade seminal e potencial reprodutivo sofrem influência do nível de maturidade sexual em que os indivíduos se encontram.

Neste estudo a idade influenciou a forma como algumas variáveis se expressaram. Variáveis relacionadas à avaliação da cromatina mostram que animais jovens apresentaram alteração de compactação e integridade da cromatina, e foram susceptíveis a influência de fatores externos para estabilidade do conteúdo de protamina. O padrão oscilatório observado ao longo das coletas, principalmente nos grupos jovens e jovens adultos, evidencia a necessidade de maior esclarecimento sobre o momento no qual realmente será possível prever o potencial reprodutivo de touros nestas faixas etárias.

8. CONCLUSÕES

No presente trabalho a idade teve influência quanto à compactação e integridade da cromatina, assim como na deficiência de protamina do DNA. Apesar da constante busca por testes capazes de prever capacidade reprodutiva, a rede de correlações indica não existir teste específico com esse potencial. Dado que no grupo jovem, parâmetros físicos convencionais de qualidade espermática correlacionaram-se de forma mais ativa com o teste do Azul de Toluidina, enquanto no grupo adulto as correlações se concentraram mais entre parâmetros físicos convencionais de qualidade espermática e características reprodutivas. Resultados das nossas investigações expressaram evidente perfil dinâmico de acordo com as diferentes fases da vida de um touro.

REFERÊNCIAS

- ALEEM, M.; PADWAL, V.; CHOUDHARI, J.; BALASINOR, N.; GILL-SHARMA, M. K. Sperm protamine levels as indicators of fertilizing potential in sexually mature male rats. **Andrologia**, v. 40, n. 1, p. 29-37, 2008.
- AOKI, V. W.; LIU, L.; JONES, K. P.; HATASAKA, H. H.; GIBSON, M.; PETERSON, C. M.; CARRELL, D. T. Sperm protamine 1/protamine 2 ratios are related to in vitro fertilization pregnancy rates and predictive of fertilization ability. **Fertility and Sterility**, v. 86, n. 5, p. 1408-1415, 2006.
- BARRATT, C. L. R.; AITKEN, R. J.; BJÖRNDAHL, L.; CARRELL, D. T.; BOER, P.; KVIST, U.; LEWIS, S. E. M.; PERREAULT, S. D.; PERRY, M. J.; RAMOS, L.; ROBAIRE, B.; WARD, S.; ZINI, A. Sperm DNA: organization, protection and vulnerability: from basic science to clinical applications—a position report. **Human Reproduction**, v. 25, n. 4, p. 824-838, 2010.
- BARTH, A. D. Review: The use of bull breeding soundness evaluation to identify subfertile and infertile bulls. **Animal**, v. 12, n. 1, p. 158-164, 2018.
- BARTH, A. D.; BOWMAN, P. A. The sequential appearance of sperm abnormalities after scrotal insulation or dexamethasone treatment in bulls. **Canadian Veterinary Journal**, v. 34, p. 93-102, 1994.
- BARTH, A. D.; WALDNER, C. L. Factors affecting breeding soundness classification of beef bulls examined at the Western College of Veterinary Medicine. **Canadian Veterinary Journal**, v. 43, p. 274-284, 2002.
- BELETTI, M. E.; COSTA, L. F. A systematic approach to multi-species sperm morphometrical characterization. **Analytical & Quantitative Cytology & Histology**, v. 25, n. 2, p. 97-107, 2003.
- BELETTI, M. E.; COSTA, L. F.; GUARDIEIRO, M. M. Morphometric features and chromatin condensation abnormalities evaluated by toluidine blue staining in bull spermatozoa. **Brazilian Journal of Morphological Science**, v. 22, n. 2, p. 85-90, 2005.
- BELETTI, M. E.; MELLO, M. L. S. Comparison between the toluidine blue stain and the Feulgen reaction for evaluation of rabbit sperm chromatin condensation and their relationship with sperm morphology. **Theriogenology**, v. 62, n. 3, p. 398-402, 2004.
- BERNDTSON, W. E. Sperm Production and its Harvest. In: CHENOWETH, P. J.; LORTON, S. P. **Animal Andrology: Theories and Applications**. 1. ed. UK: CAB International, 2014. cap. 2, p. 16.
- BIANCHI, P. G.; MANICARDI, G. C.; URNER, F.; CAMPANA, A.; SAKKAS, D. Chromatin packaging and morphology in ejaculated human spermatozoa: evidence of hidden anomalies in normal spermatozoa. **Molecular Human Reproduction**, v. 2, n. 3, p. 139-144, 1996.

BIANCHI, P. G.; MANICARDI, G. C.; BIZZARO, D.; BIANCHI, U.; SAKKAS, D. Effect of deoxyribonucleic acid protamination on fluorochrome staining and in situ nick-translation of murine and human mature spermatozoa. **Biology of Reproduction**, v. 49, n. 5, p. 1083-1088, 1993.

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.

BOE-HANSEN, G.B.; ERSBØLL, A.K.; GREVE, T.; CHRISTENSEN, P. Increasing storage time of extended boar semen reduces sperm DNA integrity. **Theriogenology**, v. 63, p. 2006-2019, 2005.

BOE-HANSEN, G. B.; FORTES, M. R. S.; SATAKE, N. Morphological defects, sperm DNA integrity, and protamination of bovine spermatozoa. **Andrology**, v. 6, p. 627-633, 2018.

BRITO, L. F. C. Applied Andrology in Cattle (*Bos taurus*). In: CHENOWETH, P. J.; LORTON, S. P. **Animal Andrology: Theories and Applications**. 1. ed. UK: CAB International, 2014. cap 12, p. 308.

BUCKHAM SPORER, K. R.; BURTON, J. L.; EARLEY, B.; CROWE, M. A. Transportation stress in young bulls alters expression of neutrophil genes important for the regulation of apoptosis, tissue remodeling, margination, and anti-bacterial function. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 118, p. 19-29, 2007.

CAMPOS, M. N. C.; JACOMINI, J. O.; SAMPAIO, G. S. L.; PINTO, D. A.; ALVES, B. G.; LEMOS, M. S.; BELETTI, M. E. Chromatin condensation and morphometry of the bovine sperm head after in vitro sperm selection and capacitation. **Journal of Applied Animal Research**, v. 41, n. 1, p. 87-92, 2013.

CARREIRA, J. T.; TREVIZAN, J. T.; KIPPER, B. H.; PERRI, S. H. V.; CARVALHO, I. R.; RODRIGUES, L. H.; SILVA, C.; KOIVISTO, M. B. Impaired protamination and sperm DNA damage in a Nellore bull with high percentages of morphological sperm defects in comparison to normospermic bulls. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 67, n. 2, p. 417-423, 2015.

CARREIRA, J. T.; TREVIZAN, J. T.; CARVALHO, I. R.; KIPPER, B.; RODRIGUES, L. H.; SILVA, C.; PERRI, S. H. V.; DREVET, J. R.; KOIVISTO, M. B. Does sperm quality and DNA integrity differ in cryopreserved semen samples from young, adult, and aged Nellore bulls? **Basic and Clinical Andrology**, v. 27, p. 12-20, 2017.

CHACÓN, J. Applied Andrology in Cattle (*Bos indicus*). In: CHENOWETH, P. J.; LORTON, S. P. **Animal Andrology: Theories and Applications**. 1. ed. UK: CAB International, 2014. cap. 13, p. 354.

Colégio Brasileiro de Reprodução Animal. Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal. 3 ed. Belo Horizonte: CBRA, 2013, 104 p.

CHENOWETH, P. J.; BALL, L. Breeding soundness evaluation in bulls. In: MORROW, D. A. **Current Therapy in Theriogenology**. 2. ed. Philadelphia: W.B. Saunders, 1980. p. 330-339.

DE IULIIS, G. N.; THOMSON, L. K.; MITCHELL, L. A.; FINNIE, J. M.; KOOPERS, A. J.; HEDGES, A.; NIXON, B.; AITKEN, R. J. DNA Damage in Human Spermatozoa is Highly Correlated with the Efficiency of Chromatin Remodeling and the Formation of 8-Hydroxy-2'-Deoxyguanosine, a Marker of Oxidative Stress. **Biology of Reproduction**, v. 81, p. 517-524, 2009.

D'OCCHIO, M. J.; HENGSTBERGER, K. J.; TUTT, D.; HOLROYD, R. G.; FORDYCE, G.; BOE-HANSEN, G. B.; JOHNSTON, S. D. Sperm chromatin in beef bulls in tropical environments. **Theriogenology**, v. 79, n. 6, p. 946-952, 2013.

DADOUNE, J. P. Expression of mammalian spermatozoal nucleoproteins. **Microscopy Research and Technique**, v. 61, n. 1, p. 56-75, 2003.

DOGAN, S.; VARGOVIC, P.; OLIVEIRA, R.; BELSER, L. E.; KAYA, A.; MOURA, A.; SUTOVSKY, P.; PARRISH, J.; TOPPER, E.; MEMILI, E. Sperm protamine-status correlates to the fertility of breeding bulls. **Biology of Reproduction**, v. 92, n. 4, p. 92, 2015.

EDDY, E. M.; O'BRIEN, D. A. The spermatozoon. In: KNOBIL, E.; NEILL, J. D. **The Physiology of Reproduction**. 1. ed. New York: Raven Press, 1994. p.4.

EL-FAKAHANY, H. M.; SAKKAS, D. Abortive Apoptosis and Sperm Chromatin Damage. In: ZINI, A. & AGARWAL, A. **Sperm Chromatin: Biological and Clinical Applications in Male Infertility and Assisted Reproduction**. 1. ed., USA: Springer, 2011. cap. 20, p. 301.

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

EVENSON, D. P. Sperm Chromatin Structure Assay (SCSA®): 30 Years of Experience with the SCSA®. In: ZINI, A. & AGARWAL, A. **Sperm Chromatin: Biological and Clinical Applications in Male Infertility and Assisted Reproduction**. 1. ed., USA: Springer, 2011. cap. 9, p.125-142.

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

EVENSON, D. P.; JOST, L. K. Sperm chromatin structure assay is useful for fertility assessment. **Meth Cell Sci**, v. 22, p. 169-89, 2000.

FERNANDES, C. E.; DODE, M. A. N.; PEREIRA, D.; SILVA, A. E. D. F. Effects of scrotal insulation in Nellore bulls (*Bos taurus indicus*) on seminal quality and its relationship with in vitro fertilizing ability. **Theriogenology**, v. 70, p. 1560-1568, 2008.

FOLHADELLA, I. M.; SÁ, W. F.; FERREIRA, A. M.; CAMRGO, L. S. A.; VIANA, J. H. M.; RAMOS, A. A.; SILVA, M. V. G. B. Características andrológicas de touros da raça Gir. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 58, n. 5, p. 809-815, 2006.

FONSECA, V. O.; SANTOS, N.R.; MALINSKI, P. R. Classificação andrológica de touros zebus (*Bos taurus indicus*) com base no perímetro escrotal e características morfo-físicas do sêmen. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 21, p. 36-39, 1997.

FORTES, M. R. S.; HOLROYD, R. G.; REVERTER, A.; VENUS, B. K, SATAKE, N.; BOE-HANSEN, G. B. The integrity of sperm chromatin in young tropical composite bulls. **Theriogenology**, v. 78, p. 326-333, 2012.

FORTES, M. R. S.; SATAKE, N.; CORBET, D. H.; CORBET, N. J.; BURNS, B. M.; MOORE, S. S.; BOE-HANSEN, G. B. Sperm protamine deficiency correlates with sperm DNA damage in *Bos indicus* bulls. **Andrology**, v. 2, n. 3, p. 370-378, 2014.

GUPTA, S.; EARLEY, B.; CROWE, M. A. Effect of 12-hour transportation on physiological, immunological and haematological parameters in bulls housed at different space allowances. **The Veterinary Journal**, v. 173, p. 605-616, 2007.

HAFEZ, B.; HAFEZ, E. S. E. **Reproduction in Farm Animals**. Lippincott: Williams & Wilkins, 2000. cap. 7, p. 97-110.

IRANPOUR, F. G.; NASR-ESFAHANI, M. H.; VALOJERDI, M. R.; AL-TARAIHI, T. M. T. Chromomycin A3 staining as a useful tool for evaluation of male fertility. **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**, v. 17, n. 1, p. 60-66, 2000.

KAYA, A.; BIRLER, S.; ENWALL, L.; MEMILI, E. Determinants of sperm morphology. In: Chenoweth, P. J.; Lorton, S. P. (Ed.). **Animal Andrology: Theories and Applications**. UK: CAB International, 2014. cap 3, p. 34-47.

KHALIFA, T. A. A.; REKKAS, C. A.; LYMBEROPOULOS, A. G.; SIOGA, A.; DIMITRIADIS, I.; PAPANIKOLAOU, T. H. Factors affecting chromatin stability of bovine spermatozoa. **Animal Reproduction Science**, v.104, n. 2, p. 143-163, 2008.

KIPPER, B. H.; TREVIZAN, J. T.; CARREIRA, J. T.; CARVALHO, I. R.; MINGOTI, G. Z.; BELETTI, M. E.; PERRI, S. H. V.; FRANCISCATO, D. A.; PIERUCCI, J. C.; KOIVISTO, M. B. Sperm morphometry and chromatin condensation in Nelore bulls of different ages and their effects on IVF. **Theriogenology**, v. 87, p. 154-160, 2017.

KLAUS, E. S.; GONZALEZ, N. H.; BERGMANN, M.; BARTKUHN, M.; WEIDNER, W.; KLIESCHI, S.; RATHKE, C. Murine and Human Spermatids Are Characterized by Numerous, Newly Synthesized and Differentially Expressed Transcription Factors and Bromodomain-Containing Proteins. **Biology of Reproduction**, n. 95, v. 1, p. 4, 2016.

- KOIVISTO, M. B.; COSTA, M. T. A.; PERRI, S. H. V., VICENTE, W. R. R. The effect of season on semen characteristics and freezability in *Bos indicus* and *Bos taurus* bulls in the southeastern region of Brazil. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 44, p. 587-592, 2009.
- KONDRACKI, S.; BONASZEWSKA, D.; MIELNICKA, C. The effect of age on the morphometric sperm traits of domestic pigs (*Sus scrofa domestica*). **Cellular & Molecular Biology Letters**, v. 10, p. 3-13, 2005.
- KUMARESAN, A.; JOHANNISSON, A.; NORDQVIST, S.; KÅREHED, K.; ÅKERUD, H.; LINDGREN, K. E.; MORRELL, J. M. Relationship of DNA integrity to HRG C633T SNP and ART outcome in fertile couples. **Reproduction**, v. 153, p. 865-876, 2017.
- LOLIS, D.; GEORGIU, I.; SYRROU, M.; ZIKOPOULOS, K.; KONSTANTELLI, M.; MESSINIS, I. Chromomycin A3-staining as an indicator of protamine deficiency and fertilization. **International Journal of Andrology**, v. 19, n. 1, p. 23-27, 1996.
- LOPES, F. G.; JUNIOR KOETZ, C.; FERREIRA, M. B.; MENEGASSI, S. R. O.; GUIDONI, P. B.; CORREA, L. S. Avaliação da Maturidade Sexual e Classificação Andrológica por Pontos (CAP) de Touros Jovens da Raça Nelore, Criados no Noroeste do Estado do Paraná. **UNICIÊNCIAS**, v. 20, p. 110-114, 2016.
- LOVE, C. C. The sperm chromatin structure assay: a review of clinical applications. **Animal Reproduction Science**, v. 89, n. 1, p. 39-45, 2005.
- LUNSTRA, D.; FORD, J. J.; ECHTERNKAMP, S. E. Puberty in beef bulls: hormone concentrations, growth, testicular development, sperm production and sexual aggressiveness in bulls of different breeds. **Journal of Animal Science**, v. 46, n. 4, p. 1054-1062, 1978.
- MACKENZIE, A. M.; DRENNAN, M.; ROWAN, T. G.; DIXON, J. B.; CARTER, S. D. Effect of transportation and weaning on humoral immune responses of calves. **Research in Veterinary Science**, v. 63, p. 227-230, 1997.
- MARTINS, J. A. M.; SOUZA, F. A.; FERREIRA, M. B. D.; GONÇALVES, P. E. M.; EMERICK, L. L.; DIAS, J. C.; LEITE, T. G.; GRAÇA, D. S.; ANDRADE, V. J.; VALE FILHO, V. R. Desenvolvimento reprodutivo de tourinhos Gir selecionados para produção de leite. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 63, n. 6, p. 1277-1286, 2011.
- MENON, A. G.; BARKEMA, H. W.; WILDE, R.; KASTELIC, J. P.; THUNDATHIL, J. C. Associations between sperm abnormalities, breed, age, and scrotal circumference in beef bulls. **The Canadian Journal of Veterinary Research**, v. 75, p. 241-247, 2011.
- MELLO, M. L. S. Induced metachromasia in bull spermatozoa. **Histochemistry and Cell Biology**, v. 74, n. 3, p. 387-392, 1982.

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

OLIVEIRA, L. Z.; ARRUDA, R. P.; ANDRADE, A. F. C.; CELEGUINI, E. C. C.; SANTOS, R. M.; BELETTI, M. E.; PERES, R. F. G.; OLIVEIRA, C. S. O.; LIMA, V. F. M. H. Assessment of field fertility and several in vitro sperm characteristics following the use of different Angus sires in a timed-AI program with suckled Nelore cows. **Livestock Science**, v.146, p. 38-46, 2012.

OSTERMEIER, G. C.; SARGEANT, G. A.; YANDELL, B. S.; EVENSON, D. P.; PARRISH, J. J. Relationship of bull fertility to sperm nuclear shape. **Journal of Andrology**, v. 22, n. 4, p. 595-603, 2001a.

OSTERMEIER, G. C.; SARGEANT, G. A.; YANDELL, B. S.; PARRISH, J. J. Measurement of bovine sperm nuclear shape using Fourier harmonic amplitudes. **Journal of Andrology**, v. 22, n. 4, p. 584-594, 2001b.

PANMEI, A.; GUPTA, A. K.; SHIVAHRE, P. R.; BHAKAT, M.; UPADHYAY, A. Conventional and fluorescent based semen quality assessment in Karan Fries bulls. **Veterinary World**, v. 8, n. 10, p. 1243-1246, 2015.

PARRISH, J. J.; SCHINDLER, J.; WILLENBURG, K.; ENWALL, L. Quantitative sperm shape analysis: what can this tell us about male fertility. In: **Proceedings of the 24th Technical Conference on Artificial Insemination & Reproduction**. 2013. p. 74-80.

RAHMAN, M. B.; VANDAELE, L.; RIJSSELAERE, T.; MAES, D.; HOOGEWIJS, M.; FRIJTERS, A.; NOORDMAN, J.; GRANADOS, A.; DERNELLE, E.; SHAMSUDDIN, M.; PARRISH, J. J.; VAN SOOM, A. Scrotal insulation and its relationship to abnormal morphology, chromatin protamination and nuclear shape of spermatozoa in Holstein-Friesian and Belgian Blue bulls. **Theriogenology**, v. 76, p. 1246-1257, 2011.

RATHKE, C.; BAARENDS, W. M.; AWE, S.; RENKAWITZ-POHL, R. Chromatin dynamics during spermiogenesis. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Regulatory Mechanisms**, v. 1839, n. 3, p. 155-168, 2014.

RAWLINGS, N.; EVANS, A.C.O.; CHANDOLIA, R.K.; BAGU, E.T. Sexual maturation in the bull. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 43, n. 2, p. 295-301, 2008.

RAZZUOLI, E.; OLZI, E.; CALÀ, P.; CAFAZZO, S.; MAGNANI, D.; VITALI, A.; LACETERA, N.; ARCHETTI, L.; LAZZARA, F.; FERRARI, A.; COSTA, L.; AMADORI, M. Innate immune responses of young bulls to a novel environment. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 172, p. 9-13, 2016.

RODRIGUES, A. C. N.; ROCHA, J. V.; BELETTI, M. E. Análise computacional da compactação da cromatina de espermatozoides de galo. **Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 61, p. 1302-1309, 2009.

SAACKE, R.G.; DeJARNETTE, J.M.; BAME, J.H.; KARABINUS, D.S.; WHITMAN, S.S. Can spermatozoa with abnormal heads gain access to the ovum in artificially inseminated super-and single-ovulating cattle? **Theriogenology**, v. 50, n. 1, p. 117-128, 1998.

SAKKAS, D.; MOFFATT, O.; MANICARDI, G. C.; MARIETHOZ, E.; TAROZZI, N.; BIZZARO, D. Nature of DNA Damage in Ejaculated Human Spermatozoa and the Possible Involvement of Apoptosis 1. **Biology of Reproduction**, v. 66, n. 4, p. 1061-1067, 2002.

SHAMAN, J.; WARD W. S. Sperm chromatin stability and susceptibility to damage in relation to its structure. In: DE JONGE, C. J.; BARRATT, C. L. R. **The Sperm Cell: Production, Maturation, Fertilization, Regeneration**. 1. ed. UK: Cambridge University Press, 2006. cap 2, p. 31-33.

SHIVAHRE, P. R.; GUPTA, A. K.; PANMEI, A.; YADAV, B. R.; BHAKAT, M.; MOHANTY, T. K.; KUMARESAN, A.; KUMAR, V.; DASH, S. K.; SINGH, S. Relationship of conventional and fluorescent microscopic technique to assess in vitro semen quality status of Murrah buffalo males. **Iranian Journal of Veterinary Research**, v. 16, n. 4, p. 363, 2015.

SIMÕES, R.; FEITOSA, W. B.; MENDES, C. M.; MARQUES, M. G.; NICACIO, A. C.; DE BARROS, F. R. O.; VISINTIN, J. A.; ASSUMPÇÃO, M. E. O. A. Use of chromomycin A3 staining in bovine sperm cells for detection of protamine deficiency, **Biotechnic and Histochemistry**, v. 84, p. 73-79, 2009.

SIMON, L.; LUTTON, D.; McMANUS, J.; LEWIS, S. E. M. Sperm DNA damage measured by the alkaline Comet assay as an independent predictor of male infertility and in vitro fertilization success. **Fertility and Sterility**, v. 95, n. 2, p. 652-657, 2011.

Sumário Brasileiro de Touros - Resultado do Teste de Progênie 8ª Prova de Pré-Seleção de Touros. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Juiz de Fora: EMBRAPA, 2017, 86 p.

SUTOVSKY, P.; MANANDHAR, G. Mammalian spermatogenesis and sperm structure: anatomical and compartmental analysis. In: DE JONGE, C. J.; BARRATT, C. L. R. **The Sperm Cell: Production, Maturation, Fertilization, Regeneration**. New York: Cambridge University Press, 2006. cap. 1, p. 13-18.

STRADAIOLI, G.; PERIC, T.; MONTILLO, M.; COMIN, A.; CORAZZIN, M.; VERONESI, M. C.; PRANDI, A. **Italian Journal of Animal Science**, v. 16, p. 631-639, 2017.

TAVALAEE, M.; KIANI, A.; ARBABIAN, M.; DEEMEH, M. R.; ESFAHANI, MOHAMMAD, H. N. Flow Cytometry: A New Approach for Indirect Assessment of Sperm Protamine Deficiency International. **Journal of Fertility and Sterility**, v. 3, p. 177-184, 2010.

THURSTON, L. M.; WATSON, P. F.; MILEHAM, A. J.; HOLT, W. V. Morphologically distinct sperm subpopulations defined by Fourier shape descriptors in fresh ejaculates correlate with variation in boar semen quality following cryopreservation. **Journal of Andrology**, v. 22, n. 3, p. 382-394, 2001.

TSAREV, I.; ERENPREISS, J. Cytochemical Tests for Sperm Chromatin Maturity. In: ZINI, A.; AGARWAL, A. **Sperm Chromatin: Biological and Clinical Applications in Male Infertility and Assisted Reproduction**. 1. ed. USA: Springer, 2011. cap. 12, p.182-184.

WATERHOUSE, K. E.; GJELDNES, A.; TVERDAL, A.; DE ANGELIS, P. M.; FARSTAD, W.; HÅÅRD, M.; KOMMISRUD, E. Alterations of sperm DNA integrity during cryopreservation procedure and *in vitro* incubation of bull semen. **Animal Reproduction Science**, v. 117, p. 34-42, 2010.

YÁNIZ, J. L.; SOLER, C.; SANTOLARIA, P. Computer assisted sperm morphometry in mammals: a review. **Animal Reproduction Science**, v. 156, p. 1-12, 2015.

ZINI, A.; SAN GABRIEL, M.; ZHANG, X. The histone to protamine ratio in human spermatozoa: comparative study of whole and processed semen. **Fertility and Sterility**, v. 87, n. 1, p. 217-219, 2007.

ZUBKOVA, E. V.; WADE, M.; ROBAIRE, B. Changes in spermatozoal chromatin packaging and susceptibility to oxidative challenge during aging. **Fertility and Sterility**, v. 84, n. 2, p. 1191-1198, 2005.

APÊNDICE

Apêndice - A. PROTOCOLO CONTROLE POSITIVO - CMA3

Para o preparo do controle positivo, 25 μ L da amostra foram fixados em 7.5mL de Carnoy livre de cloroformio (3 partes de metanol e 1 parte de ácido acético), incubados por 10 minutos em temperatura ambiente e centrifugados a 3.074g por 15min/ 4^oC. Após desprezar o sobrenadante, a amostra foi lavada com 2mL de PBS 1X, e o pellet ressuspendido em 0,6mL de PBS + Triton 0,1%, onde incubava por 15min/37^oC. A amostra permeabilizada era centrifugada a 3.074g por 15 minutos/4^oC, o sobrenadante desprezado e seu conteúdo ressuspendido em 0.6mL de 1mMNaCl+5mM de ditioneitol (DTT) onde incubava por 1 hora em temperatura ambiente. A amostra tratada com DTT era centrifugada a 3.074g por 15 minutos/4^oC, o sobrenadante desprezado, e o pellet ressuspendido em 90 μ l de PBS 1X. Dessa amostra, transferia-se 30 μ l para microplacas com fundo em U, onde incubavam por 60 minutos a temperatura ambiente abrigadas de luz com a solução de coloração de CMA3 (0,0125mg/mL) em tampão Mc Ilvaine's (17 mM ácido cítrico, 164 mM Na₂HPO₄ e 10mM MgCl₂·6H₂O; pH 7.0). Após período de incubação, as amostras foram lavadas (2.562g por 10min/4^oC) com 150 μ l de PBS (1x). O conteúdo celular foi ressuspendido em 200 μ L de PBS e transferido para tubos de citometria.