

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

**MORFOLOGIA, MORFOMETRIA E INTEGRIDADE DA
CROMATINA DE ESPERMATOZOIDES EPIDIDIMÁRIOS DE
GATOS**

Izabella Pazzoto Alves

Médica Veterinária

2017

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

**MORFOLOGIA, MORFOMETRIA E INTEGRIDADE DA
CROMATINA DE ESPERMATOZOIDES EPIDIDIMÁRIOS DE
GATOS**

Izabella Pazzoto Alves

Orientadora: Prof^a Adjunto Marion Burkhardt De Koivisto

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Campus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Medicina Veterinária – Reprodução Animal

2017

Alves, Izabella Pazzoto
A474m Morfologia, morfomeria e integridade da cromatina de
espermatozoides epididimários de gatos / Izabella Pazzoto Alves. --
Jaboticabal, 2017
xi, 31 p. : il. ; 29 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista,
Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2017
Orientador: Marion Burkhardt de Koivisto
Banca examinadora: Maricy Apparicio Ferreira, Janaína Torres
Carreira
Bibliografia

1. Felinos. 2. Condensação da cromatina. 3. Azul de toluidina. 4.
Laranja de acridina. I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências
Agrárias e Veterinárias.

CDU 619:612.6:636.8

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



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Jaboticabal



CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: MORFOLOGIA, MORFOMETRIA E INTEGRIDADE DA CROMATINA DE ESPERMATOZOÍDEOS EPIDIDIMÁRIOS DE GATOS

AUTORA: IZABELLA PAZZOTO ALVES

ORIENTADORA: MARION BURKHARDT DE KOIVISTO

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

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

Profa. Dra. **MARICY APARECIDO FERREIRA**
Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal / FCAV / UNESP - Jaboticabal

Profa. Dra. **JANAINA TORRES CARREIRA**
Médica Veterinária Autônoma / São José do Rio Preto/SP

Jaboticabal, 21 de fevereiro de 2017

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

Izabella Pazzoto Alves – nascida em Birigui, São Paulo, Brasil, no dia 16 do mês de janeiro de 1990. Concluiu o ensino médio no Colégio Unicolégio em Araçatuba-SP, em dezembro de 2007. Ingressou no curso de Graduação em Medicina Veterinária na Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Estadual Paulista – FMV Unesp, na cidade de Araçatuba, em março de 2008. Concluiu o curso superior em Medicina Veterinária em dezembro de 2012. Ingressou no curso de pós-graduação, nível de Mestrado em março de 2015, sob orientação da Professora Adjunta Marion Burkhardt de Koivisto, no Programa de Medicina Veterinária, Área de Concentração em Reprodução Animal, na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias Câmpus de Jaboticabal da Universidade Estadual Paulista – FCAV Unesp.

“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser, mas Graças a Deus, não sou o que era antes”.

Marthin Luther King

À minha família, em especial aos meus pais Osni e Marise e ao meu esposo Alex,
por todo o apoio, incentivo e compreensão. Amo vocês!

AGRADECIMENTOS

A **Deus** por conduzir toda minha trajetória, proporcionando força e coragem.

À Professora **Marion Burkhardt de Koivisto**, por me abrir as portas do mundo acadêmico e me acolher no momento em que mais precisei.

Aos meus pais, **Osni Alves** e **Marise Pazzoto**, pelo amor e apoio ao longo desta jornada.

Ao meu esposo, **Alexander Rossato Senna**, por todo amor, incentivo e compreensão. Você foi essencial para que eu chegasse até aqui!

Aos professores, **Carlos Antônio Bomfim**, **Sueli Bomfim**, **Paulo Patto** e **Guilherme Nogueira**, seja com ajuda durante a realização do experimento ou até mesmo com palavras de carinho e afeto.

Ao professor **Bruno Augusto Nassif Travençolo**, pela importante ajuda na informática deste trabalho, sempre disposto a tirar dúvidas rapidamente.

Aos amigos que permaneceram comigo ou que conheci ao longo desta jornada, **Fernando**, **Dayane**, **Carlos**, **Patrícia**, **Beatrice**, **Juliane**, pela amizade, força e companheirismo no decorrer do percurso. Em especial ao meu grande amigo **Thiago Grassi**, por todo apoio e incentivo durante todo esse processo; nada disso seria possível se você não me mostrasse a cada dia o quanto eu sou capaz. Obrigada pela força!

À **Janáina Torres Carreira**, desde o início muito presente e ajudando, desde a escolha do tema até a realização do experimento. Obrigada!

À **Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – FCAV Unesp de Jaboticabal** pela oportunidade da realização do Mestrado e à **Faculdade de Medicina Veterinária – FMV Unesp de Araçatuba** pela disponibilidade de local, pessoal e todo o material.

Aos funcionários da FMV, **Marta**, **Sônia**, **Clédio** e **Antônio**, sempre presentes e dispostos a me ajudar, mesmo durante os períodos de greve.

À **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)** pela concessão de Bolsa durante todo o mestrado.

Agradeço a todos, que mesmo sem saber, tornaram este sonho possível.

MUITO OBRIGADA!

SUMÁRIO

CERTIFICADO – CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais	vii
LISTA DE ABREVIATURAS	viii
RESUMO.....	x
ABSTRACT	xi
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1. Espermatogênese	3
2.3. Maturação espermiática	4
2.4. Avaliação da Integridade da Cromatina.....	5
3. HIPÓTESE	7
4. OBJETIVOS	7
4.1 Objetivos Gerais.....	7
4.2. Objetivos Específicos	7
5. MATERIAL E MÉTODOS	8
5.1. Seleção dos Animais.....	8
5.2. Coleta das amostras.....	8
5.3. Azul de Toluidina	10
5.4. Laranja de Acridina.....	12
5.5. Morfologia espermiática	13
5.6. Delineamento Experimental	13
5.7. Análise Estatística	14
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	15
7. CONCLUSÃO.....	22
REFERÊNCIAS.....	23
APÊNDICES.....	30
APÊNDICE – 1. TÉCNICA CIRÚRGICA - ORQUIECTOMIA	31
APÊNDICE – 2. PROTOCOLO ANESTÉSICO	31



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 "**Morfologia, morfometria e compactação da cromatina de espermatozoides epididimários de felinos domésticos**", Processo FOA nº 2015-00754, 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 05 de Agosto de 2015.

VALIDADE DESTE CERTIFICADO: 02 de Março de 2017.

DATA DA SUBMISSÃO DO RELATÓRIO FINAL: até 02 de Abril de 2017.

CERTIFICATE

We certify that the study entitled "**Morphology, morphometry and chromatin compaction epididymal sperm of domestic cats**", Protocol FOA nº 2015-00754, 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 August 05, 2015.

VALIDITY OF THIS CERTIFICATE: March 02, 2017.

DATE OF SUBMISSION OF THE FINAL REPORT: April 02, 2017.


Prof. Dra. Maria Gisela Laranjeira
Coordenadora da CEUA
CEUA Coordinator

LISTA DE ABREVIATURAS

%	Porcentagem
±	Mais ou menos
*	Asterisco
®	Marca registrada
μL	Microlitros
μm	Micrometros
<	Menor
>	Maior
°C	Graus centígrados
AT	Azul de Toluidina
CEUA	Comissão de ética no uso de animais
CMA3	Cromomicina A3
DIC	Differential interference contrast
DNA	Ácido desoxiribonucleico
DNP	Desoxiribonuclear-proteico
EDTA	Ethylenediamine tetraacetic acid
FOA	Faculdade de Odontologia de Araçatuba
ICSI	Injeção Intracitoplasmática de Espermatozoide
g	Força gravitacional
GCD	Gota Citoplasmática Distal
GCP	Gota Citoplasmática Proximal
GOPC	Golgi-associated PDZ-and coiled-coil motif-containing protein
Kg	Quilograma
LA	Laranja de Acridina
M	Molar
min	Minutos
mL	Mililitros
ng	Nanogramas
nm	Nanômetros
p	Probabilidade de significância

pH	Potencial Hidrogeniônico
PBS	Phosphate buffer solution
PC	Computador pessoal
r	Correlação de Spearman
SCD	Sperm Chromatin Dispersion
SCSA	Sperm Chromatin Structure Assay
TRA	Tecnologias de reprodução assistida
Unesp	Universidade Estadual Paulista

MORFOLOGIA, MORFOMETRIA E INTEGRIDADE DA CROMATINA DE ESPERMATOZOIDES EPIDIDIMÁRIOS DE GATOS

RESUMO – A avaliação de espermatozoides em tecnologias de reprodução assistida raramente analisa a integridade do DNA, crucial para o desenvolvimento embrionário. A técnica do azul de toluidina permite identificar alterações da cromatina com avaliação concomitante da morfometria espermática. O método foi descrito em diversas espécies, mas ao conhecimento dos autores, ainda não foi relatado em gatos. O objetivo deste estudo foi verificar a aplicabilidade da técnica de coloração de azul de toluidina em avaliar as anormalidades de DNA de espermatozoides epididimários (cabeça, corpo e cauda) de gatos. Investigar ainda se houve correlação entre as variáveis: condensação do DNA, morfologia e morfometria da cabeça espermática. Para este propósito, os índices de alteração de DNA obtidos pela técnica de azul de toluidina e laranja de acridina foram comparados, observando correlação de 65,38% ($p < 0,001$). A estabilidade da cromatina aumentou significativamente da região da cabeça (92,06%) do epidídimo para a cauda (97,94%, $p = 0,0023$), mas não houve diferença entre as regiões do corpo e da cauda, demonstrando que os espermatozoides provenientes destas regiões já possuem maturidade reprodutiva. Não houve correlação entre a anormalidade do DNA e a morfologia espermática como nas demais espécies, mas sim com a morfometria. Observou-se diminuição significativa do tamanho da cabeça do espermatozoide durante a passagem pelas três regiões epididimárias ($p < 0,0001$). A porcentagem de espermatozoides com cromatina descondensada diminuiu significativamente da região da cabeça até a cauda do epidídimo (26,36%, 15,69%, 3,38%, respectivamente, $p < 0,0001$). Assim, concluímos que existe correlação entre área da cabeça do espermatozoide felino e condensação da cromatina.

Palavras-chave: Azul de toluidina, Condensação da cromatina, Felinos, Laranja de acridina

MORPHOLOGY, MORPHOMETRY AND CHROMATIN INTEGRITY OF EPIDIDYMAL SPERM IN THE DOMESTIC CAT

ABSTRACT – Sperm selection in assisted reproductive technologies rarely evaluates the DNA integrity, which is crucial to the embryo's development. The toluidine blue technique allows identification of chromatin alterations, simultaneously with evaluation of sperm morphometry. The method has been described in many species, but to the authors' knowledge, it has yet to be described in cats. The objective of this study was to verify the applicability of the toluidine blue technique in analyzing DNA abnormalities of epididymal sperm (caput, corpus and cauda) in cats and further investigating if there was correlation between the variables: DNA condensation, morphology and morphometry of the sperm head. For this purpose, the DNA alteration indexes obtained by both toluidine blue and acridine orange techniques were compared and a 65.38% ($p < 0.001$) correlation was observed. The chromatin stability increased significantly in the head region of the epididymis (92.06%) in relation to the cauda (97.94%, $p = 0.0023$), however there was no difference between the caput and cauda regions, which demonstrates that sperm coming from these region are already mature. There was no correlation between the DNA abnormality and the sperm morphology as observed in other species, however there was correlation to morphometry. A significant decrease of the sperm head size was observed during the passage of the three epididymal regions ($p < 0.0001$). The percentage of sperm with deficient chromatin condensation decreased significantly from caput region to cauda of the epididymis (26.36%, 15.69%, 3.38%, respectively, $p < 0.0001$). Therefore, the evaluation of sperm head size can predict the quality of chromatin condensation.

Keywords: Toluidine blue, Chromatin condensation, Felines, Acridine orange

1. INTRODUÇÃO

A família *Felidae* é composta por 37 espécies sendo que apenas o gato doméstico (*Felis catus*) não se encontra na lista dos ameaçados de extinção (IUCN, 2015). Com o objetivo de preservar o potencial genético destes animais, diversas tecnologias de reprodução assistida (TRA) têm sido desenvolvidas em gatos domésticos e não domésticos, a partir de espermatozoides provenientes de sêmen fresco ou criopreservado (POPE et al., 1998; GOMEZ et al., 2000; POPE; GÓMEZ; DRESSER, 2006; POPE et al., 2009; POPE et al., 2012). O uso de gametas recuperados do epidídimo ou até mesmo de testículos amplia as possibilidades de obtenção de espermatozoides de um mesmo indivíduo e torna-se alternativa àqueles animais que morrem inesperadamente (BOGLIOLO et al., 2001; COMIZZOLI; WILDT; PUKAZHENTHI, 2006; BUARPUNG et al., 2013).

A avaliação de espermatozoides em TRA baseia-se em motilidade e padrões de morfologia, não dando relevância adequada a integridade do DNA (CELIK-OZENCI et al., 2004). Considerando que a maturação espermática e parte da compactação da cromatina ocorrem durante o trânsito no epidídimo (HINGST; BLOTTNER; FRANZ, 1995), o uso de gametas provenientes de testículos ou de epidídimo torna a análise do status do DNA ainda mais importante. Sabe-se que espermatozoides com anormalidades de cromatina possuem capacidade fecundante, mas que o desenvolvimento embrionário dependerá do grau de alteração do DNA (AHMADI; NG, 1999). Vários métodos têm sido desenvolvidos para avaliar as anormalidades do DNA espermático, como a técnica de TUNEL (terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated nick-end labeling), teste de dispersão da cromatina (Sperm Chromatin Dispersion - SCD), ensaio cometa, técnica da cromomicina A3 (CMA3) e análise da estrutura da cromatina espermática (Sperm Chromatin Structure Assay - SCSA) com coloração de laranja de acridina (LA) por meio de citometria de fluxo (RIBAS-MAYNOU et al., 2013; VERNOCCHI et al., 2014). Técnicas de execução complexa e morosa, exigindo mão-de-obra

qualificada e equipamentos caros, inviabilizando o uso na rotina, sendo mais utilizadas em pesquisa.

O teste de LA, avaliado por microscopia de fluorescência, consiste em técnica simples, metacromática, de fluorescência por excitação, emitindo coloração verde ou vermelho-alaranjada, quando ligada a ácidos nucleicos de cadeia dupla ou simples, respectivamente. A intensidade de fluorescência vermelha alaranjada indica a quantidade de quebra da fita dupla de DNA, ou seja, perda de integridade da cromatina (EVENSON; DARZYNKIEWICZ; MELAMED, 1980).

A coloração do azul de toluidina (AT) é outro método que identifica alterações da cromatina, permitindo avaliação concomitante da morfometria espermática. Espermatozoides com cromatina pouco condensada apresentam maior número de grupos fosfato disponíveis para ligação com o corante catiônico metacromático, corando em azul escuro a violeta. Nos espermatozoides normais, os grupos fosfato são bloqueados pelas protaminas, tendo poucas moléculas para se ligarem ao DNA, corando em azul claro (BELETTI; COSTA, 2003). Como as análises visuais envolvem alto grau de subjetividade, a técnica do AT permite avaliação computadorizada resultando em maior sensibilidade, precisão, velocidade e repetibilidade (BELETTI; COSTA, 2003; BELETTI; MELLO, 2004; CRUZ; BELETTI; TRAVENÇOLO, 2014; BELETTI; COSTA; VIANA, 2005).

Considerando a importância da integridade do genoma paterno para o desenvolvimento embrionário (SELI; SAKKAS, 2005), a análise da condensação do DNA garante o uso de espermatozoides de alta qualidade em TRA. O método foi descrito em outras espécies animais, como coelhos (BELETTI; MELLO, 2004), garanhões (NAVES et al., 2006; SARDOY; CARRETERO; NEILD, 2008), homens (ROCHA et al., 2002; MARCHESI et al., 2010), bovinos (KIPPER et al., 2017), mas ao conhecimento dos autores, ainda não foi relatado em gatos.

O objetivo deste estudo foi verificar a aplicabilidade da técnica de coloração do azul de toluidina em espermatozoides de felinos domésticos avaliando a compactação da cromatina e morfometria da cabeça de espermatozoides provenientes de porções distintas do epidídimo.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Espermatogênese

O espermatozoide, célula altamente diferenciada em estrutura e função, é produto final da espermatogênese, que após sucessivos processos mitóticos, meióticos e pós-meióticos, resulta em célula capaz de transmitir material genético do macho à fêmea. Enquanto as fases de mitose e meiose são cruciais para o desenvolvimento do gameta masculino, é durante a fase pós-meiótica que as espermátides passam pelo processo de metamorfose, incluindo remodelamento da membrana plasmática, perda de grande quantidade de citoplasma, formação da cauda ou aparelho flagelar, desenvolvimento do acrossoma e condensação da cromatina espermática, proporcionando capacidade fecundante aos espermatozoides (EDDY, 2006). Todo esse processo é cíclico e altamente coordenado e organizado de acordo com as variações celulares (BRINSKO, 1999). No gato doméstico o ciclo do túbulo seminífero é caracterizado por oito estágios e dura em média 10,4 dias. Considerando que são necessários aproximadamente 4,5 ciclos, a duração da espermatogênese é de 46,8 dias nos felinos (FRANÇA; GODINHO, 2003).

O espermatozoide de mamíferos é 10 vezes menor quando comparado à célula somática (MILLER et al., 2010) e por isso a organização do seu material genético é única, tornando sua cromatina altamente condensada e compactada (WARD; COFFEY, 1991; SHARMA; AGARWAL, 2011). Antes da meiose, assim como nas células somáticas, a proteína envolvida na estruturação do DNA são as histonas, ricas em lisina (McGHEE et al, 1983). Com o progresso da meiose e nos primeiros estágios da espermiogênese, as histonas são substituídas por proteínas de transição e, posteriormente, por proteínas de carga positiva, denominadas protaminas, ricas em arginina e cisteína, evento denominado protaminação (BALHORN, 2011). Essa nova dinâmica estrutural da cromatina permite que a célula espermática tenha forma hidrodinâmica e pequena, facilitando o transporte no trato

feminino (BALHORN, 2011), além de garantir a integridade do genoma paterno, protegendo a cromatina durante o transporte no trato masculino e feminino (OLIVA, 2006; SHARMA; AGARWAL, 2011).

2.3. Maturação espermática

A maturação espermática inicia na cabeça do epidídimo e segue pelo corpo até a cauda. Morfologicamente, o epidídimo pode ser dividido nas regiões: cabeça, corpo e cauda. Com base na função, Glover e Nicander (1971) subdividiram o epidídimo em segmentos inicial, médio e terminal, tendo os dois primeiros segmentos função de maturação espermática e o último de armazenamento até a ejaculação. Por serem baseados na função, a localização desses segmentos não corresponde à divisão macroscópica de cabeça, corpo e cauda do epidídimo, e varia entre as espécies (SETCHELL, 1991). No gato, os segmentos inicial e médio estão localizados na cabeça do epidídimo e as regiões do corpo e da cauda correspondem ao segmento terminal com função de armazenamento (AXNÉR et al., 1999).

A absorção de fluidos foi descrita na porção proximal da cabeça do epidídimo em várias espécies (SETCHELL, 1991; SENGER, 2003) assim como no gato (AXNÉR, 2006), comprovada pelo aumento na concentração espermática. Espermatozoides começam a adquirir motilidade na porção inicial da cabeça do epidídimo, mas a migração da gota citoplasmática só se inicia quando atingirem a porção distal desta região, como foi descrito em touros, carneiros (BLOM; NICANDER, 1961) e gatos (SRINGAM et al., 2011).

Durante o trânsito epididimário ocorre diminuição das porcentagens de cabeças espermáticas anormais (SRINGAM et al., 2011), defeitos acrossomais e anormalidades da peça intermediária (AXNÉR; LINDE-FORSBERG; EINARSSON, 1999), sugerindo a participação do epidídimo na remoção de espermatozoides anormais. A fagocitose de espermatozoides por células epiteliais ou macrófagos pode ser uma explicação para a remoção seletiva de espermatozoides (SETCHELL,

1991; AXNÉR, 2006; SRINGAM et al., 2011). Outro mecanismo para a remoção de gametas anormais poderia ser pelo mecanismo de ubiquitinação. A ubiquitina é secretada pelo epitélio do epidídimo e se liga a espermatozoides defeituosos tornando-os mais sensíveis à autólise ou fagocitose pelas células epididimárias (SUTOVSKY et al., 2001; SUTOVSKY; NEUBER; SCHATTEN, 2002).

O espermatozoide possui características morfológicas únicas que são importantes para a sua funcionalidade (KAYA et al, 2014). Embora cada espécie possua particularidades, principalmente quanto ao formato e ao tamanho, as principais estruturas morfométricas são similares (SULLIVAN, 1978). Modificações estruturais do espermatozoide são descritas em todas as espécies, e na maioria delas, a correlação com fertilidade foi documentada (KAYA et al, 2014). Já em felinos, esta associação ainda não está bem consolidada (HOWARD et al., 1990; AXNÉR; STRÖM; LINDE-FORSBERG, 1997; AXNÉR; FORSBERG, 2007). Felídeos apresentam, frequentemente, baixa porcentagem de espermatozoides normais, em média apenas 44% (AXNÉR; STRÖM; LINDE-FORSBERG, 1997; AXNÉR; STRÖM-HOLST; LINDE-FORSBERG, 1998; AXNÉR; FORSBERG, 2007), sem associação com fertilidade comprovada (SELI; SAKKAS, 2005; AXNÉR; FORSBERG, 2007).

A condensação da cromatina do espermatozoide só irá ser completada durante a passagem pelo epidídimo. O núcleo torna-se cada vez mais compactado devido à substituição das histonas pelas protaminas (HINGST; BLOTTNER; FRANZ, 1995; BALHORN, 2011; SRINGAM et al., 2011). A interação dos grupos fosfato das fitas do DNA com as protaminas só será estabilizada devido à formação de pontes dissulfídicas que ocorre no epidídimo (BIANCHI; MANICARDI; URNER, 1996).

2.4. Avaliação da Integridade da Cromatina

O método mais utilizado para identificar alterações na estabilidade da cromatina é a análise da estrutura da cromatina espermática baseado na avaliação por citometria de fluxo pela coloração de laranja de acridina (OSTERMEIER et al.,

2001). Já o teste de LA, avaliado por microscopia de fluorescência, consiste em técnica simples eliminando a necessidade de equipamentos caros. Seu efeito de metacromasia emite fluorescência por excitação, corando de verde ou vermelho-alaranjado, quando ligada a ácidos nucleicos de cadeia dupla ou simples, respectivamente (EVENSON; DARZYNKIEWICZ; MELAMED, 1980).

O AT, outro método utilizado para identificar alterações da cromatina, permite avaliação concomitante da morfometria espermática (BELETTI; COSTA, 2003; BELETTI; MELLO, 2004, BELETTI; COSTA; GUARDIEIRO, 2005). Utiliza corante catiônico com fenômeno de metacromasia, ou seja, ocorre alteração de cor induzida pela ressonância de elétrons entre as moléculas do corante (MELLO, 1982). Nos espermatozoides com a cromatina pouco condensada, o complexo desoxiribonuclear-proteico (DNP) estará alterado, havendo maior número de grupos fosfato disponíveis para a ligação com o corante, que possui pH 4,0, corando em azul escuro a violeta. Espermatozoides normais, nos quais os grupos fosfato estão bloqueados pelas protaminas, permitem que somente poucas moléculas do corante se liguem ao DNA, corando-se em azul claro (MELLO, 1982). Este método permite avaliação computadorizada promovendo maior sensibilidade, precisão, velocidade e repetibilidade em contraste com análises de rotina que envolvem elevado grau de subjetividade (BELETTI; COSTA, 2003; BELETTI; MELLO, 2004, BELETTI; COSTA; VIANA, 2005).

Imagens obtidas de esfregaços corados com azul de toluidina são processadas e avaliadas por software desenvolvido em linguagem MATLAB e executado no programa OCTAVE. Este software identifica e segmenta cabeças espermáticas presentes na imagem e libera o valor da área total da cabeça em pixels. Quando detecta espermatozoides com anormalidades da cromatina, o programa delimita área e região alterada, identificada pela coloração mais intensa (BELETTI; MELLO, 2004, BELETTI; COSTA; VIANA, 2005; CRUZ, BELETTI e TRAVENÇOLO, 2014).

3. HIPÓTESE

- Há correlação entre anormalidades de cabeça e defeitos da cromatina na espécie felina;
- Ocorre maior compactação do DNA espermático durante o trânsito epididimário em felinos, diminuindo o tamanho da cabeça do espermatozoide;
- A coloração com azul de toluidina é eficaz na avaliação da condensação do DNA espermático felino.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivos Gerais

Verificar a aplicabilidade da técnica de coloração de azul de toluidina em avaliar as anormalidades de DNA de espermatozoides epididimários de gatos.

4.2. Objetivos Específicos

- Avaliar a morfologia espermática nas três porções do epidídimo;
- Investigar a morfometria espermática e a condensação da cromatina nas diferentes porções do epidídimo pela técnica do azul de toluidina;
- Verificar se há correlação entre a técnica do Azul de Toluidina e Laranja de Acridina;
- Observar se há correlação entre morfologia, morfometria e condensação da cromatina espermática.

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1. Seleção dos Animais

Foram selecionados 30 gatos machos sem raça definida, com idade entre sete e 36 meses, que se apresentavam hípidos ao exame físico geral. Todos os animais possuíam os dois testículos na bolsa testicular, simétricos, com consistência fibroelástica, pênis com presença de espículas e dosagem de testosterona acima de 0,1ng/mL, caracterizando animais púberes (ARONSON; COOPER, 1967; APPARICIO; VICENTE, 2015).

Os animais foram provenientes do setor de Obstetrícia Veterinária, do Departamento de Clínica, Cirurgia e Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária, câmpus de Araçatuba – Unesp e todos os procedimentos e análises foram feitos nas dependências desta instituição. Os procedimentos desta pesquisa foram aprovados pela comissão de ética no uso de animais (CEUA) - da Unesp - Câmpus de Araçatuba, protocolo Processo FOA, nº 2015-00754.

5.2. Coleta das amostras

Os animais foram submetidos a jejum hídrico (2 horas) e alimentar (12 horas) e sob anestesia geral (APÊNDICE 1 – Protocolo Anestésico) uma amostra de sangue (1mL) foi colhida por punção venosa jugular imediatamente antes do início do procedimento de orquiectomia (APÊNDICE 2 – Técnica Cirúrgica). A amostra foi acondicionada em eppendorf de 2 mL contendo 10 µL de EDTA, centrifugada (1609,92 g por 10min - Excelsa Baby I 206 FANEM®) e o plasma obtido colocado em eppendorf de 2mL e mantido a -20°C para posterior dosagem da testosterona sérica pelo ensaio da quimiluminescência (Immulite® 1000 Siemens).

Após realização do procedimento cirúrgico, os testículos e epidídimos foram imersos em PBS (Laborclin®) a 37°C e transportados até o laboratório em no máximo duas horas. As porções dos epidídimos (cabeça, corpo e cauda) foram identificadas macroscopicamente (KUNKITTI et al., 2015) pela mesma pessoa e separadas por meio de ligaduras com fio de nylon (TECHNOFIO®). Para remoção do sangue foi realizada lavagem externa com PBS a 37°C. Ato contínuo cada porção foi dissecada livre de vasos sanguíneos visíveis, fatiada transversalmente em pequenos fragmentos e acondicionada separadamente em tubos eppendorf de 2 mL contendo 200 μ L de PBS a 37°C, permitindo dissipação dos espermatozoides para a solução. As amostras dos epidídimos (direito e esquerdo) do mesmo animal foram agrupadas em *pool*. (Figura 1)

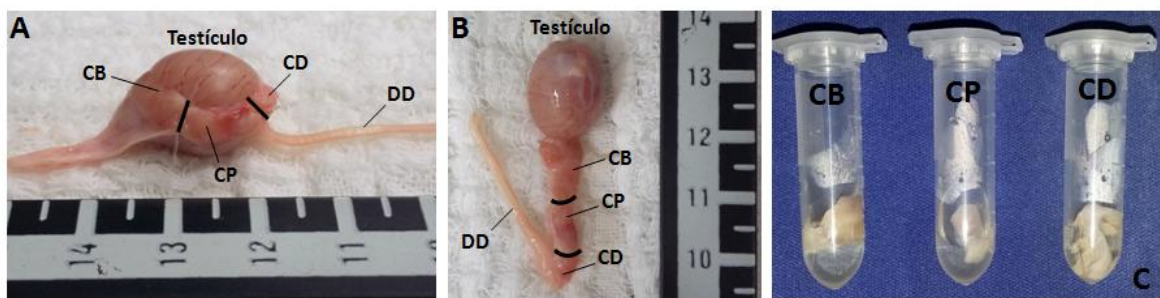


Figura 1. (A) Identificação macroscópica das porções epididimárias: cabeça (CB), corpo (CP) e cauda (CD) e do ducto deferente (DD). (B) Dissecção do epidídimo e separação das porções por ligaduras. (C) Acondicionamento dos fragmentos de cada porção em tubos eppendorf. (ARQUIVO PESSOAL). Laboratório de Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária, Unesp, Campus de Araçatuba, SP, 2017.

Após 10 minutos de incubação a 37°C, os segmentos de tecido foram removidos e 50 μ L da amostra de cada porção foram diluídos em formol-salina 4% (1:1) para posterior avaliação das anormalidades espermáticas em câmara úmida. Com o restante do volume foram realizados esfregaços, secos à temperatura ambiente e fixados em solução de etanol (Dinâmica®) e ácido acético (Synth®) 3:1 (Solução de Carnoy), por 1 minuto, e em seguida em etanol 70%, por 3 minutos e secos ao ar (BELETTI; MELLO, 1996). Os esfregaços fixados foram armazenados

em caixas porta-lâminas à temperatura ambiente para posterior avaliação pelas técnicas de coloração com o azul de toluidina e laranja de acridina.

5.3. Azul de Toluidina

A avaliação computadorizada da morfometria da cabeça do espermatozoide e condensação da cromatina foi feita pelo método de esfregaços corados com azul de toluidina, segundo o protocolo estabelecido por Beletti e Costa (2003).

Os esfregaços previamente fixados, conforme descrito no item anterior, foram hidrolisados por 25 minutos em ácido clorídrico (Synth®) 4N, lavados em água destilada e secos à temperatura ambiente. Em seguida, 50 μ L de azul de toluidina (Merck KGaA) a 0,025% em tampão McIlvaine (citrato de sódio-fosfato SIGMA-ALDRICH), pH 4, foram colocados sobre a lâmina, coberta com lamínula e deixada corar por 3 minutos (BELETTI; COSTA, 2003). As imagens dos esfregaços foram obtidas utilizando microscopia de luz (microscópio Olympus BX61) em aumento de 1000X sob óleo de imersão, acoplado a uma câmera DP71 (Olympus) e conectado a microcomputador PC. As imagens digitais foram usadas para identificar e segmentar 100 cabeças de espermatozoides de cada lâmina (Figura 2) para, em seguida, serem processadas por programas desenvolvidos em linguagem MATLAB e executadas no OCTAVE, obtendo assim a área total de cada cabeça, e delimitando área e região com descompactação da cromatina (Figura 3) (CRUZ; BELETTI; TRAVENÇOLO, 2014).

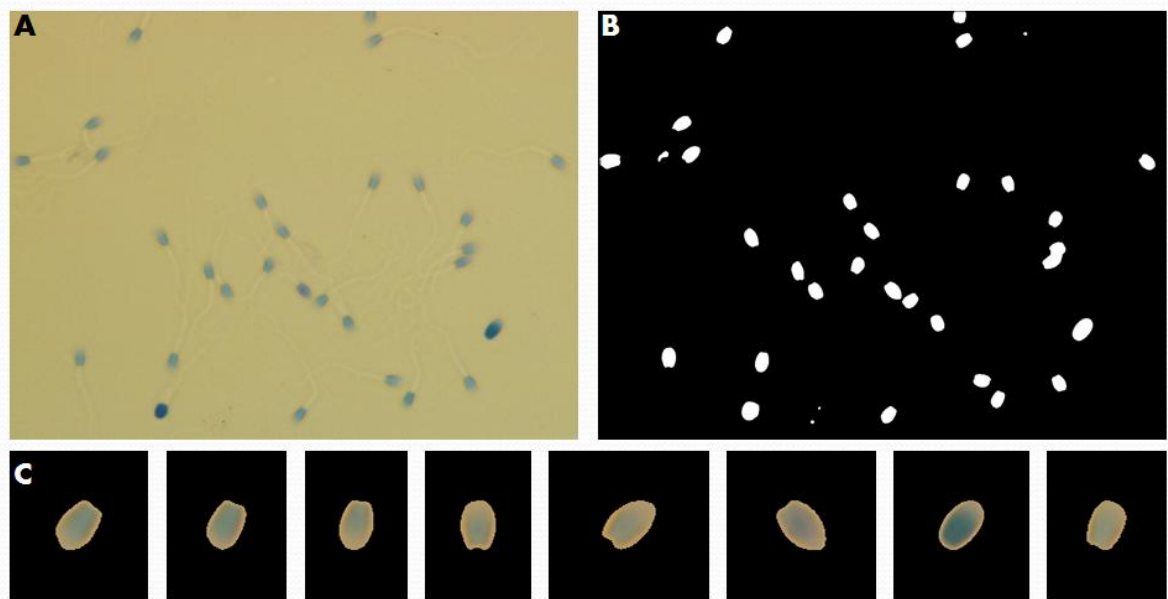


Figura 2: Fotomicrografias de (A) espermatozoides da cauda do epidídimo de gato doméstico corados com azul de toluidina (X1000). (B) Identificação e (C) segmentação das cabeças de espermatozoides pelo programa OCTAVE (ARQUIVO PESSOAL). Laboratório de Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária, Unesp, Campus de Araçatuba, SP, 2017.

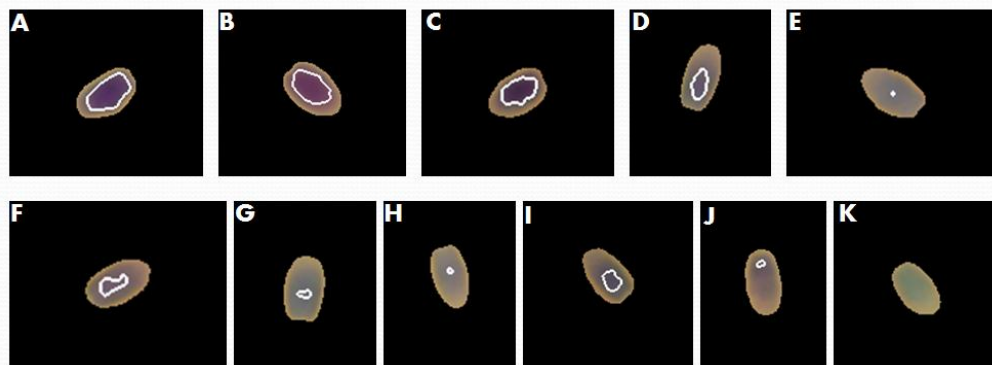


Figura 3: Fotomicrografias representativas de cabeças de espermatozoides provenientes da cabeça (A – E), corpo (F – H) e cauda (I – K) do epidídimo de gatos identificadas por análise computacional (MATLAB), com marcação das áreas com descompactação da cromatina (ARQUIVO PESSOAL). Laboratório de Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária, Unesp, Campus de Araçatuba, SP, 2017.

5.4. Laranja de Acridina

A coloração com Laranja de Acridina foi baseada na técnica proposta por Tejada et al. (1984), que consistiu na preparação de uma solução estoque (0,1g de LA (SIGMA) em 100mL de água destilada) e uma solução corante, preparada adicionando-se 10 mL da solução estoque a 40 mL ácido cítrico 0,1M e 2,5 mL de fosfato dissódico 0,3M. Os esfregaços previamente fixados, conforme descrito no item 5.2 foram cobertos com 3mL da solução corante por 3 minutos, em câmara escura, seguido de lavagem com água destilada corrente e cobertos com lamínula. As lâminas foram examinadas em microscópio de epifluorescência (microscópio Olympus BX61) em filtro de excitação 460-570nm e emissão de 460-610nm e aumento de X1000 sob óleo de imersão. Para cada esfregaço foram contadas 100 células e classificadas de acordo com Tejada et al. (1984), sendo que as células que emitiram fluorescência verde foram consideradas normais, ou seja, com a cromatina íntegra, enquanto, as células que emitiram fluorescência vermelha, laranja, amarela distribuídas de forma regular ou irregular no interior da cabeça foram consideradas anormais, indicando desnaturação total ou parcial da cromatina (Figura 4).

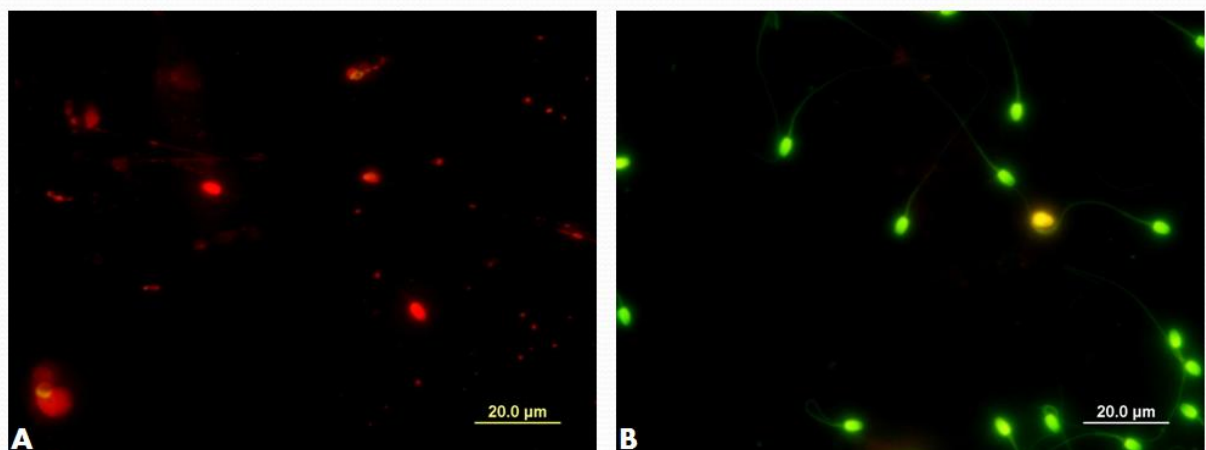


Figura 4: Fotomicrografias de espermatozoides provenientes da cabeça (A) e da cauda (B) do epidídimo de gato doméstico corados com laranja de acridina (captura com câmera acoplada a microscópio de epifluorescência; 1000x). Coloração esverdeada cromatina íntegra; coloração vermelha, laranja, amarela desnaturação total ou parcial da cromatina. Laboratório de Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária, Unesp, Campus de Araçatuba, SP, 2017.

5.5. Morfologia espermática

Para avaliação das anormalidades espermáticas foi utilizada a técnica câmara úmida, na qual uma gota da amostra de sêmen diluída em formol-salina tamponada (CBRA, 2013) foi depositada entre lâmina e lamínula. Foram contadas 200 células em microscopia de contraste de interferência diferencial (Differential interference contrast – DIC) (1000x). O número de anormalidades morfológicas foi expresso em porcentagem de acordo com a classificação de Blom (1973), defeitos maiores e menores. Espermatozoides que apresentaram gota citoplasmática como única alteração foram considerados normais (AXNÉR; HERMANSSON; LINDEFORSBERG, 2004; MÜLLER et al., 2012), já que a migração da gota ocorre durante o trânsito epididimário e sua perda no momento da ejaculação (AXNÉR; LINDEFORSBERG; EINARSSON, 1999).

5.6. Delineamento Experimental

O estudo foi iniciado pela avaliação clínica dos animais, colheita de sangue seguida de orquiectomia. As porções epididimárias foram identificadas, dissecadas e seccionadas e os espermatozoides recuperados de cada porção do epidídimo foram submetidos às análises de morfologia, morfometria, condensação da cromatina e integridade do DNA espermático pela técnica do Azul de Toluidina e Laranja de Acridina (Figura 5).

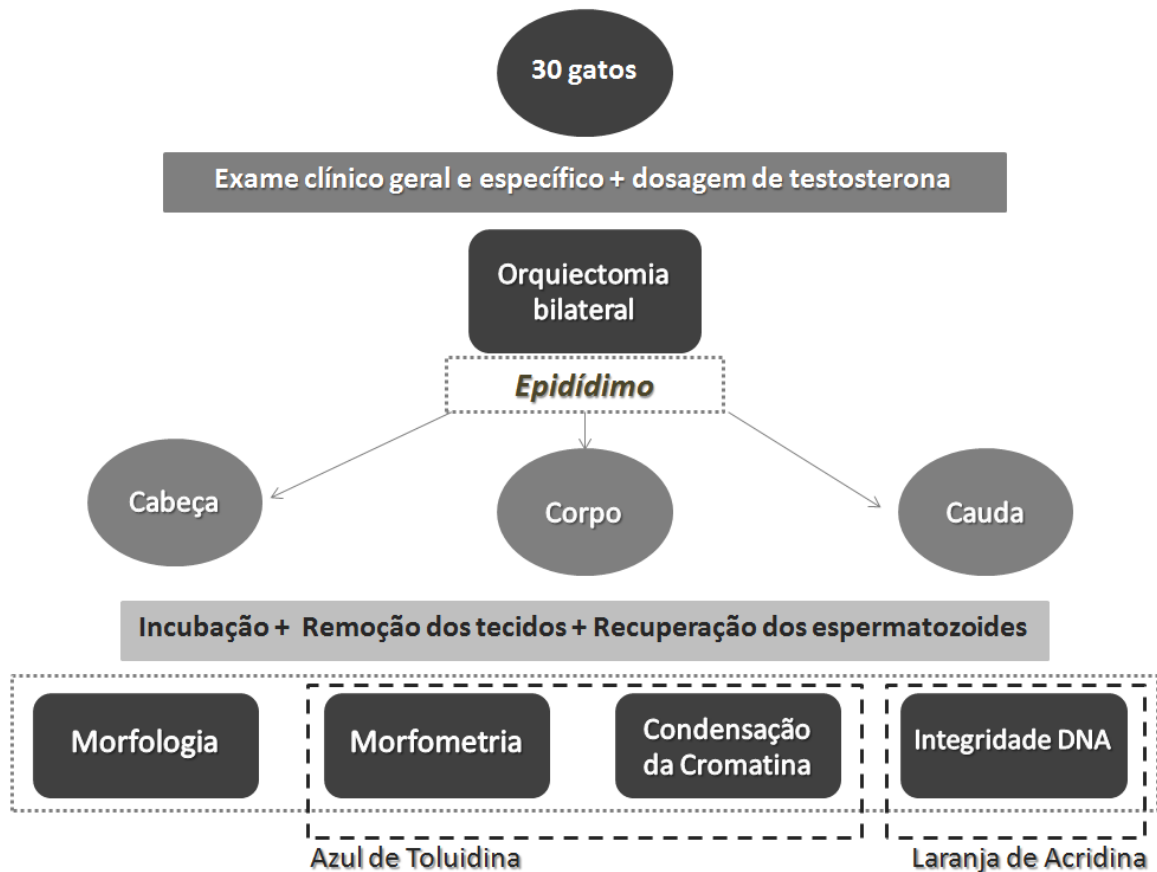


Figura 5 – Delineamento experimental com as etapas: Seleção dos animais, orquiectomia, isolamento das porções do epidídimo e análise morfológica, morfométrica, condensação e integridade do DNA de espermatozoides epididimários felinos.

5.7. Análise Estatística

Inicialmente, os dados experimentais foram testados quanto à normalidade (Shapiro-Wilk). Dados que apresentaram distribuição normal foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias foram comparadas por meio do Teste de Tukey. Os resultados que não apresentaram distribuição normal foram submetidos ao teste não paramétrico de Friedman, utilizando-se o software Action® versão 2.7 (ESTATCAMP, 2014). A análise de correlação foi realizada para as variáveis: área total da cabeça dos espermatozoides e área com descondensação da cromatina, e entre as técnicas azul de toluidina e laranja de acridina. O nível de significância adotado foi de 5% (ZAR, 1984).

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os 30 gatos envolvidos neste trabalho apresentaram em média $17,13 \pm 8,9$ meses, mais de 3 kg ($3,97 \pm 0,55$ kg) e dosagem sérica de testosterona de 0,22 a 3,79 ng/mL, indicando que todos os animais eram púberes.

Na Tabela 1 encontram-se as médias das porcentagens de espermatozoides agrupados em defeitos maiores, menores e totais de cada porção do epidídimo. Verificou-se redução significativa na porcentagem dos defeitos desde a cabeça até a cauda. As anormalidades espermáticas também foram analisadas separadamente nas diferentes regiões epididimárias (Tabela 2).

Tabela 1. Média e desvio padrão da porcentagem de espermatozoides com defeitos maiores, menores e totais obtidos das porções de cabeça, corpo e cauda de epidídimo de gatos domésticos (n=30) Jaboticabal, SP, 2017.

Porção Epididimária	Defeitos Maiores (%)	Defeitos Menores (%)	Defeitos Totais (%)
Cabeça	$14,38 \pm 5,06^a$	$17,48 \pm 6,36^a$	$31,86 \pm 8,93^a$
Corpo	$13,28 \pm 5,26^b$	$12,64 \pm 5,58^b$	$25,92 \pm 9,34^b$
Cauda	$9,22 \pm 5,03^c$	$7,48 \pm 6,28^c$	$16,7 \pm 9,87^c$
p	0,0003	< 0,0001	< 0,0001

^{a, b} Médias seguidas de letras distintas na coluna diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

Tabela 2. Média e desvio padrão da porcentagem de espermatozoides com anormalidades morfológicas obtidos das porções de cabeça, corpo e cauda de epidídimo de gatos domésticos (n=30) Jaboticabal, SP, 2017.

Alterações Morfológicas	Porções Epididimárias			p
	Cabeça	Corpo	Cauda	
Acrossoma	3,25 ± 2,71 ^a	2,17 ± 1,30 ^b	0,83 ± 0,81 ^c	< 0,0001
Subdesenvolvida	0,14 ± 0,34	0,17 ± 0,37	0,06 ± 0,36	0,1482
Cauda enrolada na cabeça	0,58 ± 1,02 ^b	1,14 ± 1,38 ^a	1,47 ± 1,69 ^a	0,0002
Isolada patológica	0,03 ± 0,12	0,00 ± 0,00	0,06 ± 0,35	0,3679
Estreita na base	0,02 ± 0,09	0,00 ± 0,00	0,02 ± 0,09	0,6065
Piriforme	0,00 ± 0,00	0,02 ± 0,09	0,00 ± 0,00	0,3679
Pequena anormal	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	-
Contorno anormal	0,30 ± 0,47	0,47 ± 0,72	0,33 ± 0,92	0,1965
Pouch formation	0,48 ± 0,79 ^a	0,44 ± 0,63 ^a	0,20 ± 0,40 ^b	0,0468
Formas duplas/teratológicas	0,67 ± 1,21	0,41 ± 0,92	0,28 ± 0,54	0,3823
Defeitos de membrana	0,08 ± 0,29	0,09 ± 0,20	0,03 ± 0,12	0,2231
Peça intermediária (edema, fratura)	4,33 ± 3,02 ^a	2,97 ± 1,92 ^a	2,14 ± 1,55 ^b	0,0096
Cauda fortemente enrolada	4,50 ± 2,81 ^{ab}	5,41 ± 2,70 ^a	3,80 ± 2,77 ^b	0,0274
Pequena normal, delgada, gigante	1,13 ± 1,88 ^a	0,20 ± 0,38 ^b	0,27 ± 0,62 ^b	0,0005
Decapitação	12,11 ± 6,66 ^a	6,47 ± 4,06 ^b	2,63 ± 2,37 ^c	< 0,0001
Peça intermediária (abaxial, oblíqua, retroaxial)	0,38 ± 0,60	0,31 ± 0,45	0,28 ± 0,57	0,6578
Cauda enrolada ou dobrada	1,80 ± 1,47 ^a	2,63 ± 1,97 ^a	1,50 ± 3,32 ^b	0,0001
Cauda dobrada com gota	2,08 ± 2,10	3,03 ± 2,39	2,81 ± 2,69	0,1045
Normais (incluindo defeitos de gota)	68,14 ± 8,93 ^c	74,08 ± 9,34 ^b	83,30 ± 9,87 ^a	< 0,0001
Gota citoplasmática proximal	14,58 ± 7,93 ^a	4,45 ± 3,43 ^b	3,73 ± 3,50 ^b	< 0,0001
Gota citoplasmática distal	11,77 ± 8,23 ^c	22,25 ± 9,21 ^b	37,14 ± 15,58 ^a	< 0,0001

^{a, b} Médias seguidas de letras distintas na linha diferem entre si pelo teste de Friedman (p < 0,05).

Nesta análise individual foi observada redução de todos os defeitos durante trânsito epididimário, com exceção do defeito de cauda enrolada na cabeça, considerado defeito primário com origem no epitélio seminífero durante o processo de espermatogênese (BARTH; OKO, 1989). A tendência das anormalidades de origem primária é diminuir durante o trânsito, devido aos mecanismos de remoção ou fagocitose dos espermatozoides anormais (SETCHELL, 1991; AXNÉR, 2006; SRINGAM et al., 2011) diferente de nossos achados. Suzuki-Toyota et al. (2004) demonstraram que espermatozoides *knockout* para determinado gene (GOPC) associado à formação da cauda apresentaram desenvolvimento normal durante a espermiogênese, mas encontraram anormalidade no anel posterior que define o limite entre a porção pós-acrossomal da cabeça e a peça de conexão do espermatozoide (EDDY, 2006). Na região proximal da cabeça do epidídimo, as caudas permaneceram normais e retas, mas a maioria delas enrolou-se em torno do núcleo durante o trânsito epididimário, aumentando na região da cauda. Esses pesquisadores acreditam que o enrolamento da cauda pode ter ocorrido com a migração da gota citoplasmática devido à ausência do anel posterior (SUZUKY-TOYOTA et al., 2004). Não existem pesquisas semelhantes em gatos, mas se a má formação do anel posterior for a origem do aumento deste defeito, certamente a porcentagem de espermatozoides com cauda enrolada na cabeça seria maior durante o trânsito epididimário. A menor porcentagem de espermatozoides com este defeito na porção da cabeça do epidídimo pode ser explicada devido à diferença dos epitélios presentes na cabeça e cauda do epidídimo. O epitélio epididimário na cabeça é mais espesso, composto por células longas com estereocílios altos e pequeno diâmetro tubular. Comparativamente o epitélio da cauda do epidídimo, composto por células curtas, possui lúmen mais amplo (AXNÉR, 2006). Deste modo, a cauda do epidídimo liberaria maior quantidade de espermatozoides no momento do fatiamento, enquanto que na porção da cabeça do epidídimo, estes ficariam presos no espesso epitélio. Agora se essa suposição é verdadeira ou não, ainda precisa ser elucidado.

A soma dos defeitos totais de cabeça (defeitos de acrossoma, subdesenvolvida, cauda enrolada na cabeça, isolada patológica, estreita na base, piriforme, pequena anormal, contorno anormal, *pouch formation*, defeitos de

membrana, pequena normal, delgada, gigante) diminuiu durante a passagem pelas três porções epididimárias ($6,00 \pm 4,07^a$; $4,70 \pm 2,68^{ab}$; $3,27 \pm 2,69^b$, respectivamente $p=0,0356$) não sendo influenciado pelo aumento dos defeitos de cauda enrolada na cabeça.

A migração da gota citoplasmática ao longo da peça intermediária é alteração morfológica evidente durante a maturação do espermatozoide e sempre ocorre em região específica do epidídimo variando entre as espécies (ROBAIRE & HERMO, 1988; SETCHELL, 1991; AXNÉR, 2006; COOPER, 2011). Grupo de pesquisadores suecos observou migração da gota citoplasmática na transição entre a cabeça e o corpo do epidídimo felino (AXNÉR; LINDE-FORSBERG; EINARSSON, 1999) diferente de outro estudo no qual o início da migração da gota foi verificado já na porção distal da região da cabeça (SRINGAM et al., 2011). Em nosso estudo somente 14,58% dos espermatozoides apresentavam gota citoplasmática proximal (GCP) na cabeça do epidídimo quando comparado aos espermatozoides com gota distal (GCD) (11,77%) ou sem gota citoplasmática (41,8%). Esses resultados sugerem a eficiência do processo de migração da gota no gato e que o mesmo tem início na porção proximal da cabeça do epidídimo. Em ratos os espermatozoides já possuem gota citoplasmática distal nesta região (ROBAIRE; HERMO, 1988).

No presente estudo, a condensação e fragmentação do DNA de 18000 espermatozoides foram avaliadas, 9000 pela técnica de coloração com azul de toluidina e 9000 pela técnica do laranja de acridina, sendo 3000 provenientes de cada porção do epidídimo. A condensação da cromatina do espermatozoide começa no testículo e continua durante sua passagem pelo epidídimo, tornando seu núcleo cada vez mais compactado devido à substituição das histonas pelas protaminas, num processo denominado protaminação (HINGST; BLOTTNER; FRANZ, 1995; BALHORN, 2011; SRINGAM et al., 2011) (Figura 6). A reorganização da cromatina permite que a célula espermática se torne cada vez menor (BALHORN, 2011), corroborando com nossos dados, nos quais evidenciamos significativa diminuição tanto da área total da cabeça do espermatozoide quanto da área com cromatina descondensada, diferindo estatisticamente entre cabeça e cauda do epidídimo (Tabela 3).

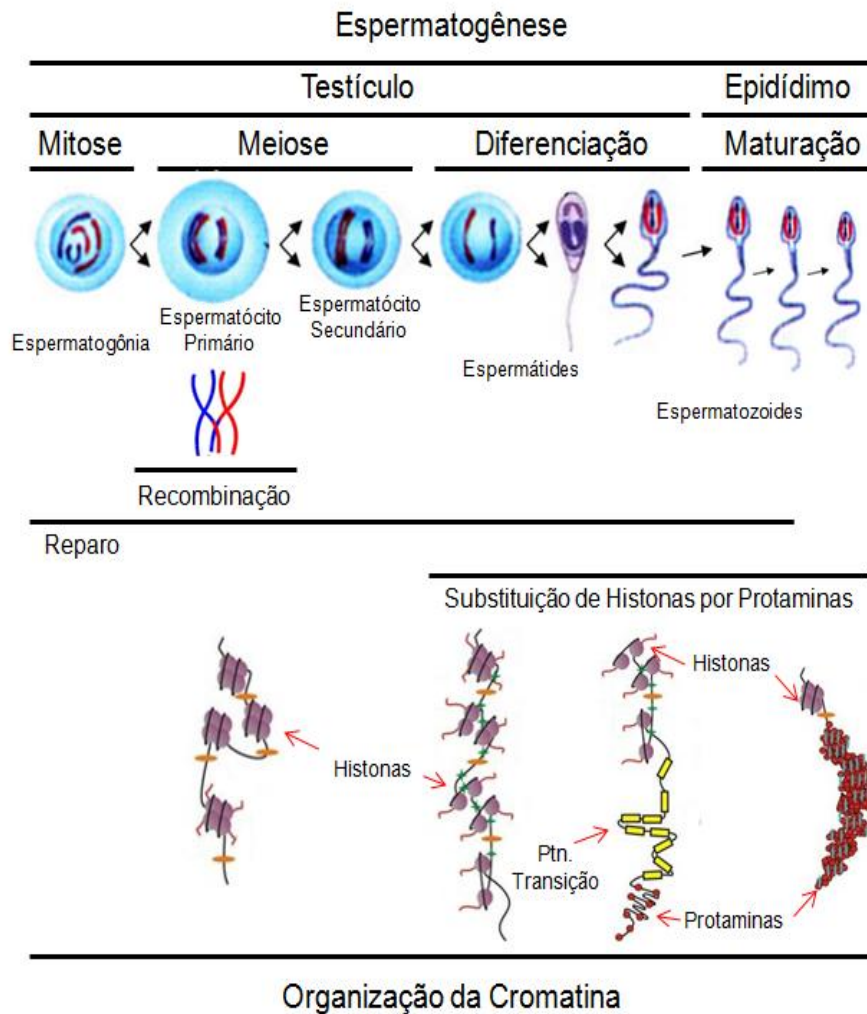


Figura 6. Alterações celulares, genéticas e da cromatina nos diferentes estágios da espermatogênese e maturação das células espermáticas. No topo da figura, diferentes estágios celulares da espermatogênese são representados junto às atividades genéticas e os locais onde ocorrem (testículo ou epidídimo). Na parte inferior da imagem, é mostrada a substituição das histonas por protaminas durante o processo de organização da cromatina dos mamíferos (Adaptado de Oliva e Castilho, 2011).

Tabela 3. Média e desvio padrão da área total da cabeça e da área com alteração da condensação da cromatina de espermatozoides epididimários de gatos (n=30) Jaboticabal, SP, 2017.

Porção Epididimária	Coloração de Azul de toluidina		
	Área total (μm^2)	Área alterada (μm^2)	Área alterada (%)
Cabeça	$10,22 \pm 1,55^a$	$0,47 \pm 0,38^a$	$3,38 \pm 2,72^a$
Corpo	$9,40 \pm 2,71^{ab}$	$0,20 \pm 0,24^b$	$1,58 \pm 1,68^b$
Cauda	$8,55 \pm 2,18^b$	$0,04 \pm 0,05^b$	$0,39 \pm 0,49^c$
p	0,0120	< 0,0001	< 0,0001

^{a, b}Médias seguidas de letras distintas na coluna diferem entre si pelo teste de Tukey.

Como a cabeça do espermatozoide é composta quase inteiramente de DNA, espera-se que diferenças sutis na sua conformação estejam relacionadas ao conteúdo e organização da cromatina (OSTERMEIER et al., 2001; LANGE-CONSIGLIO et al., 2010; ENCISO et al., 2011; MANGIARINI et al., 2013). Grupo de pesquisadores observou correlação entre a porcentagem de espermatozoides com cromatina descondensada e cabeças morfologicamente anormais (HINGST; BLOTTNER; FRANZ, 1995), diferentemente do nosso estudo ($r = 0,2304$; $p = 0,2045$) e de outra pesquisa (VERNOCCCHI et al., 2014), nos quais não foi observada correlação entre morfologia e alteração da cromatina, mesmo quando analisado apenas defeitos específicos de cabeça.

No entanto, quando correlacionamos a morfometria com a condensação da cromatina concomitantemente, pela técnica de AT, verificamos correlação de 67,61% ($r=0,6761$; $p=0,0001$) entre a área total da cabeça do espermatozoide e a área com cromatina descondensada, ou seja, cabeças maiores apresentaram cromatina mais descondensada. Desta forma, a análise computadorizada se mostrou mais sensível e precisa na detecção da relação entre a compactação da cromatina e o tamanho da cabeça de espermatozoides de gatos.

Como a técnica de AT ainda não foi descrita na espécie felina, procuramos associar a avaliação das anormalidades do DNA com a técnica de laranja de acridina, como realizado previamente em homens (ROCHA et al., 2002), equinos (NAVES et al., 2006), galos (ROCHA; BELETTI, 2008), ovinos e caprinos (KAMIMURA; JACOMINI; BELETTI, 2010). A coloração com AT avalia indiretamente a presença ou não de protaminas, corando com maior intensidade as cabeças com maior número de grupos fosfato livres, não bloqueados pelas protaminas (MELLO, 1982). O laranja de acridina por sua vez, avalia quebra de fita dupla de DNA (EVENSON; DARZYNKIEWICZ; MELAMED, 1980), portanto, essas técnicas avaliam tipos de anormalidades diferentes do DNA. Contudo, o processo de compactação da cromatina exige que as fitas duplas de DNA sofram quebras para se reorganizarem. As quebras causadas pela Topoisomerase II beta desenrolam as fitas de DNA organizadas por histonas, permitindo a substituição por protaminas. Ao final deste processo de protaminação, que ocorre no trânsito epididimário (ANDRABI, 2007)

(Figura 6), essas quebras devem estar totalmente reparadas, pois, após nova compactação, o espermatozoide perde a capacidade de reparação e se torna quiescente (BALHORN, 2011), justificando assim a comparação dos resultados das duas técnicas.

Quando comparadas as técnicas, obtivemos maior proporção de espermatozoides com alteração da cromatina evidenciados pelo AT que pelo LA (Tabela 4) independente da porção do epidídimo. Isso ocorre, pois o AT induz metacromasia mesmo quando ligado a poucas moléculas do complexo DNA-proteína, identificando alterações mais sutis, como observado num estudo em humanos, no qual 71,88% dos espermatozoides foram detectados com alteração da cromatina pelo AT e apenas 24,23% pelo LA (ROCHA et al., 2002). Em búfalos (MACHADO; BELETTI, 2002), equinos (NAVES et al., 2006), ovinos e caprinos (KAMIMURA; JACOMINI; BELETTI, 2010), também foi observada maior sensibilidade do AT quando comparado ao LA. Quando as técnicas foram comparadas, observou-se 55% de correlação em espermatozoides equinos (NAVES et al., 2006), 35% em caprinos, 89% em ovinos (KAMIMURA; JACOMINI; BELETTI, 2010) e em gatos, encontramos 65,38% ($r=0,6538$; $p=0,0002$) de correlação entre as duas técnicas.

Tabela 4. Média e desvio padrão da porcentagem de espermatozoides com DNA compactado, descompactado, íntegro ou fragmentado obtidos das três porções do epidídimo de gatos domésticos (n=30) Jaboticabal, SP, 2017.

Porção do Epidídimo	Azul de Toluidina		Laranja de Acridina	
	DNA compactado (%)	DNA descompactado (%)	DNA íntegro (%)	DNA fragmentado (%)
Cabeça	73,64 ± 18,84 ^c	26,36 ± 18,84 ^a	92,06 ± 9,86 ^b	7,94 ± 9,86 ^a
Corpo	84,31 ± 15,72 ^b	15,69 ± 15,72 ^b	96,16 ± 6,78 ^a	3,84 ± 6,78 ^b
Cauda	96,62 ± 3,64 ^a	3,38 ± 3,64 ^c	97,94 ± 3,90 ^a	2,06 ± 3,90 ^b
P	< 0,0001	< 0,0001	0,0023	0,0023

^{a, b} Médias seguidas de letras distintas na coluna diferem entre si pelo teste de Friedman ($p<0,005$).

Ao analisarmos os resultados obtidos pelas técnicas de AT e LA (Tabela 4), observamos aumento significativo na porcentagem de espermatozoides com DNA compactado e íntegro, durante o trânsito epididimário, demonstrando a contínua substituição das histonas por protaminas, compactando o material genético e garantindo a integridade do genoma paterno (OLIVA, 2006; SHARMA; AGARWAL, 2011).

Com relação à porcentagem de espermatozoides com DNA íntegro (Tabela 4), não houve diferença significativamente entre os espermatozoides do corpo e da cauda, corroborando com outros estudos que apoiam a hipótese de que espermatozoides do corpo já possuem maturidade reprodutiva (HINGST; BLOTTNER; FRANZ, 1995; SRINGAM et al., 2011). Entretanto, a utilização dos espermatozoides provenientes da cabeça deve ser considerada em conjunto com os do corpo e da cauda, já que grande quantidade destes espermatozoides encontra-se com a cromatina condensada (73,64%) e íntegra (92,06%). Mais estudos são necessários para avaliar a qualidade dos espermatozoides da cabeça do epidídimo e confirmar a possibilidade de preservação dessas células ampliando as possibilidades de obtenção de um número maior de gametas provenientes do mesmo indivíduo.

7. CONCLUSÃO

Constatamos que existe correlação entre área da cabeça do espermatozoide felino e condensação da cromatina. Há diminuição da cabeça devido a maior compactação do DNA durante o trânsito epididimário. Demonstramos que a técnica de coloração com azul de toluidina é aplicável na espécie felina, permitindo análise eficiente e rotineira da condensação do DNA espermático, sendo mais sensível que a coloração com laranja de acridina.

REFERÊNCIAS

- AHMADI, A.; NG, S.C. Developmental capacity of damaged spermatozoa. **Human Reproduction**, v. 14, n. 9, p. 2279-2285, 1999.
- ANDRABI, S. M. H.; Mammalian sperm chromatin structure and assessment of DNA fragmentation. **Journal of Assisted Reproduction Genetics**, v. 24, p. 561–569, 2007.
- APPARICIO, M.; VICENTE W.R.R. **Reprodução e obstetrícia em cães e gatos**. São Paulo: MedVet, 2015.
- ARONSON; COOPER, 1967 **Applied Small Animal Andrology**. In CHENOWETH, P. J.; LORTON, S. P. *Animal Andrology*, Boston: CABI, 2014. cap. 8 p .177-196.
- AXNÉR, E. Sperm maturation in the domestic cat. **Theriogenology**, v. 66, n. 1, p. 14-24, 2006.
- AXNÉR, E.; FORSBERG, C. Sperm Morphology in the Domestic Cat, and its Relation with Fertility: A Retrospective Study. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 291, n. April, p. 282-291, 2007.
- AXNÉR, E.; HERMANSSON, U.; LINDE-FORSBERG, C. The effect of Equex STM paste and sperm morphology on post-thaw survival of cat epididymal spermatozoa. **Animal reproduction science**, v. 84, n. 1, p. 179-191, 2004.
- AXNÉR, E.; LINDE-FORSBERG, C.; EINARSSON, S. Morphology and motility of spermatozoa from different regions of the epididymal duct in the domestic cat. **Theriogenology**, v. 52, n. 5, p. 767-778, 1999.
- AXNÉR, E.; MALMQVIST, M.; LINDE-FORSBERG, C.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Regional histology of the ductus epididymidis in the domestic cat. **J Reprod Dev**, v. 45, p. 151–160, 1999.
- AXNÉR, E.; STRÖM, B.; LINDE-FORSBERG, C. Sperm morphology is better in the second ejaculate than in the first in domestic cats electroejaculated twice during the same period of anesthesia. **Theriogenology**, v. 47, p. 929–934, 1997.
- AXNÉR, E.; STRÖM-HOLST, B.; LINDE-FORSBERG, C. Morphology of spermatozoa in the cauda epididymidis before and after electroejaculation and a comparison with ejaculated spermatozoa in the domestic cat. **Theriogenology**, v. 50, p. 973– 979, 1998.
- BALHORN, R. **Sperm Chromatin: an overview**. In: ZINI, A.; AGARWAL, A. *Sperm Chromatin: Biological and Clinical Applications in Male Infertility and Assisted Reproduction*, USA:Springer; 2011. cap. 1 p. 3-18.

BARTH, A. D.; OKO, R. J. **Abnormal Morphology of Bovine Spermatozoa**. Ames: Iowa State University Press, 1989.

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.; COSTA, L. F.; VIANA, M. P. A comparison of morphometric characteristics of sperm from fertile *Bos taurus* and *Bos indicus* bulls in Brazil. **Animal Reproduction Science**, v. 85, n. 1-2, p. 105 – 116, 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, p. 398 – 402, 2004.

BELETTI, M. E.; MELLO, M. L. S. Methodological variants contributing to detection of abnormal DNA-protein complexes in bull spermatozoa. **Brazilian Journal of Genetics**, v. 19, p. 97-104, 1996.

BIANCHI, P.G.; MANICARDI, G.C.; URNER, F. Chromatin package: Relationship with sperm morphology, sperm-zona pellucida binding. **Molecular Human Reproduction**, v. 2, p. 139–144, 1996.

BLOM E. The ultrastructure os some characteristic sperm defects and a proposal for a new classification of the bull spermogram. **Nordisk Veterinäre Medicin**, v. 25, p. 383 – 391, 1973.

BLOOM, G.; NICANDER, L. On the ultrastructure and development of the protoplasmic droplet of spermatozoa. **Cell and Tissue Research**, v. 55, n. 6, p. 833-844, 1961.

BOGLIOLO, L.; LEONI, G.; LEDDA, S.; NAITANA, S.; ZEDDA, M.; CARLUCCIO, A.; PAU, S. Intracytoplasmic sperm injection of in vitro matured oocytes of domestic cats with frozen-thawed epididymal spermatozoa. **Theriogenology**, v. 56, p. 955–67, 2001.

BRINSKO S. P. **Fisiologia Reprodutiva do Macho** In: CUNNINGHAM, J. G. Tratado de fisiologia veterinária. 2 ed. LOCAL: Guanabara Koogan, 1999. cap. 39, p. 401.

BUARPUNG, S.; THARASANIT, T.; COMIZZOLI, P.; TECHAKUMPHU, M. Feline spermatozoa from fresh and cryopreserved testicular tissues have comparable ability to fertilize matured oocytes and sustain the embryo development after intracytoplasmic sperm injection. **Theriogenology**, v. 79, n. 1, p. 149-158, 2013.

CBRA - Colégio Brasileiro de Reprodução Animal. **Manual para exame andrológico e avaliação seminal**. 3.ed. Belo Horizonte: CBRA, 2013.

CELIK-OZENCI, C.; JAKAB, A.; KOVACS, T.; CATALANOTTI, J.; DEMIR, R.; BRAYWARD, P.; WARD, D.; HUSZAR, G. Sperm selection for ICSI: shape properties do not predict the absence or presence of numerical chromosomal aberrations. **Human Reproduction**, v. 19, p. 2052–9, 2004.

COMIZZOLI, P.; WILDT, D. E.; PUKAZHENTHI, B. S. In vitro development of domestic cat embryos following intra-cytoplasmic sperm injection with testicular spermatozoa. **Theriogenology**, v. 66, p. 1659–63, 2006.

COOPER, T. G. The epididymis, cytoplasmic droplets and male fertility. **Asian journal of andrology**, v. 13, n. 1, p. 130, 2011.

CRUZ, R. E. S.; BELETTI, M. E.; TRAVENÇOLO, B. A. N. Using image analysis and processing for morphological characterization of bovine spermatozoa. In: X WORKSHOP DE VISÃO COMPUTACIONAL, Uberlândia, MG. **Proceedings of the X Workshop de Visão Computacional**, p. 270-274, 2014.

EDDY, E. M. **The Spermatozoon**. In: KNOBIL & NEILL'S. Physiology of Reproduction. 3. ed. San Diego, CA: ELSEVIER, 2006. cap. 1, p. 3 – 54.

ENCISO, M.; CISALE, H.; JOHNSTON, S. D.; SARASA, J.; FERNANDEZ, J. L.; GOSALVEZ, J. Major morphological sperm abnormalities in the bull are related to sperm DNA damage. **Theriogenology**, v. 76, p. 23–32, 2011.

ESTATCAMP. Software Action® 2.7. São Carlos: Estatcamp, Disponível em <<http://www.portalaction.com.br>>. Acesso em: 03/10/2014.

EVENSON, D. P.; DARZYNKIEWICZ, Z.; MELAMED, M. R. Relation of Mammalian Sperm Chromatin Heterogeneity to Fertility. **Science**, v. 210, p. 1131-1133, 1980.

FRANÇA, L. R.; GODINHO, C.L. Testis Morphometry, Seminiferous Epithelium Cycle Length, and Daily Sperm Production in Domestic Cats (*Felis catus*). **Biology of Reproduction**, v. 68, p. 1554–1561, 2003.

GLOVER, T. D.; NICANDER, L. Some aspects of structure and function in the mammalian epididymis. **Journal of reproduction and fertility. Supplement**, v. 13, p. Suppl 13: 39, 1971.

GOMEZ M. C.; POPE, C. E.; HARRIS, R.; DAVIS, A.; MIKOTA, S.; DRESSER, B. L. Births of kittens produced by intracytoplasmic sperm injection of domestic cat oocytes matured in vitro. **Reprod Fertil Dev**, v. 12, p. 423–33, 2000.

HINGST, O.; BLOTTNER, S.; FRANZ, C. Chromatin condensation in cat spermatozoa during epididymal transit as studied by aniline blue and acridine orange staining. **Andrologia**, v. 27, p. 275–279, 1995.

HOWARD, J. G.; BROWN, J. L.; BUSH, M.; WILDT, D. E. Teratospermic and normospermic domestic cats: ejaculate traits, pituitary-gonadal hormones, and improvement of spermatozoal motility and morphology after swim-up processing. **Journal of Andrology**, v. 11, n. 3, p. 204-15, 1990.

IUCN - International Union For Conservation Of Nature – Red List of Threatened Species. <http://www.iucnredlist.org/> [Acesso: 04/03/2015].

KAMIMURA, C. D. F.; JACOMINI, J. O.; BELETTI, M. E. Alterações de cromatina em espermatozoides de ovinos e caprinos avaliadas por azul de toluidina e alaranjado de acridina. **Ciênc. Agrotec.** v. 34, n. 1, p. 212-219, 2010.

KAYA, A.; BIRLER, S.; ENWALL, L.; MEMILI, E. **Determinants of Sperm Morphology**. In: CHENOWETH, P. J.; LORTON, S.P. *Animal Andrology 1^a Ed* Boston: CABl, 2014. cap. 3, p. 34 – 56.

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.

KUNKITTI, P.; BERGQVIST, A. S.; SJUNNESSON, Y.; AXNÉR, E. The ability of feline spermatozoa in different epididymal regions to undergo capacitation and acrosome reaction. **Animal reproduction science**, v. 161, p. 64-74, 2015.

LANGE-CONSIGLIO, A.; ANTONUCCI, N.; MANES, S.; CORRADETTI, B.; CREMONESI, F.; BIZZARO, D. Morphometric characteristics and chromatin integrity of spermatozoa in three Italian dog breeds. **J Small Anim Pract**, v. 51, p. 624–7, 2010.

MACHADO, M. M.; BELETTI, M. E. Methods for abnormal spermatozoa chromatin condensation identification in buffaloes (*Bubalus bubalis*). **Bubalus Bubalis**, Salerno, v. 8, n.1, p. 57-65, 2002.

MANGIARINI, A.; PAFFONI, A.; RESTELLI, L.; FERRARI, S.; GUARNERI, C.; RAGNI, G.; SOMIGLIANA, E. Specific sperm defects are differentially correlated with DNA fragmentation in both normozoospermic and teratozoospermic subjects. **Andrology**, v. 1, n. 6, p. 838 – 844, 2013.

MARCHESI, D. E.; BIEDERMAN, H.; FERRARA, S.; HERSHIAG, A.; FENG, H. L. The effect of semen processing on sperm DNA integrity: comparison of two techniques using the novel Toluidine Blue Assay. **European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology**, v. 151, n. 2, p. 176-180, 2010.

McGHEE, J. D.; NICKEL, J. M.; FELSENFELD, G.; FTAU, D.C. Higher Order Structure of Chromatin: Orientation of Nucleosomes within the 30 nm Chromatin Solenoid Is Independent of Species and Spacer Length. **Cell**, v. 33, p. 831-841, 1983.

MELLO, M. L. S. Induced metachromasy in bull spermatozoa. **Histochemistry**, Smithville, v. 74, n. 3, p. 387-392, 1982.

MILLER, D.; BRINKWORTH, M.; ILES, D. 2010 **Paternal DNA packaging in spermatozoa: more than the sum of its parts? DNA, histones, protamines and epigenetics** *Reproduction* **139** 287–301. In: CHENOWETH, P. J.; LORTON, S.P. *Animal Andrology 1ª Ed Boston: CABI, 2014. p .525.*

MÜLLER G.; MARTINO-ANDRADE, A. J.; SANTOS, A. S.; REGHELIN, A. L.; GARCIA, D. M.; SANT'ANA, G. R.; SPERCOSKI, K. M.; TORRES, S. M.; SILVA JÚNIOR, V. A.; MORAIS, R. N. Testicular testosterone: estradiol ratio in domestic cats and its relationship to spermatogenesis and epididymal sperm morphology. **Theriogenology**, v. 78, n. 6, p. 1224-1234, 2012.

NAVES, C. S.; BELETTI, M. E.; DUARTE, M. B.; VIEIRA, R. C.; DINIZ, E. G.; JACOMINI, J. O. Avaliação da cromatina espermatocitária em eqüinos com azul de Toluidina e "Acridine Orange". **Bioscience Journal**, v. 20, n. 3, 2006.

OLIVA, R.; CASTILLO, J. Proteomics and the genetics of sperm chromatin condensation. **Asian journal of andrology**, v. 13, n. 1, p. 24, 2011.

OLIVA, R. Protamines and Male Infertility. **Human Reproduction Update**, v. 12, p. 417-35, 2006.

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, 2001.

POPE, C. E.; CRICHTON, E. G.; GÓMEZ, M. C.; DUMAS, C.; DRESSER, B. L. Birth of domestic cat kittens of predetermined sex after transfer of embryos produced by in vitro fertilization of oocytes with flow sorted sperm. **Theriogenology**, v.71, p. 864–71, 2009.

POPE, C. E.; GÓMEZ, M. C.; DRESSER, B. L. In vitro embryo production in domestic and non-domestic cats. **Theriogenology**, v. 66, p. 1518–24, 2006.

POPE, C. E.; GÓMEZ, M. C.; KAGAWA, N.; KUWAYAMA, M.,.; LEIBO, S. P.; DRESSER, B. L. In vivo survival of domestic cat oocytes after vitrification, intracytoplasmic sperm injection and embryo transfer. **Theriogenology**, v. 77, p. 531-8, 2012.

POPE, C. E.; JOHNSON, C. A.; MCRAE, M. A.; KELLER, G. L.; DRESSER, B. L. Development of embryos produced by intracytoplasmic sperm injection of cat oocytes. **Anim Reprod Sci**, v. 53, p. 221-36, 1998.

RIBAS-MAYNOU, J.; GARCIA-PEIRÓ, A.; FERNÁNDEZ-ENCINAS, A.; ABAD. C.; AMENGUAL, M. J.; PRADA, E.; NAVARRO, J.; BENET, J. Comprehensive analysis of sperm DNA fragmentation by five different assays: TUNEL assay, SCSA, SCD test and alkaline and neutral Comet assay. **Andrology**, v. 1, n. 5, p. 715-722, 2013.

ROBAIRE, B.; HERMO, L. **Efferent Ducts, epididymis and vas deferens: structure, functions, and their regulation.** In: KNOBIL E.; NEILS, J.D. *The Physiology of Reproduction.* 1 ed. New York: Raven Press, 1988. cap. 23, p. 999-1080.

ROCHA, H. L. O. G.; BELETTI, M. E.; MARCOLINI, T. T.; AMORIM, D. A. Z. Uso de laranja de acridina e azul de Toluidina na avaliação da fertilidade masculina. **Biosci. J**, v. 18. n. 1, p. 65-77, 2002.

ROCHA, J. V.; BELETTI, M. E. Uso do azul de toluidina e alaranjado de acridina na avaliação computacional da compactação cromatânica de espermatozoides de galo. **Horizonte Científico**, v. 2, n. 2, 2008.

SARDOY, M. C.; CARRETERO, M. I.; NEILD, D. M. Evaluation of stallion sperm DNA alterations during cryopreservation using toluidine blue. **Animal Reproduction Science**, v. 107, n. 3, p. 349-350, 2008.

SELI, E.; SAKKAS, D. Spermatozoal nuclear determinants of reproductive outcome: implications for ART. **Hum Reprod Update**, v. 11, p. 337-49, 2005.

SENGER, P. L. **The Organization and Function of the Male Reproductive System.** In: SENGER, P. L. *Pathways to Pregnancy and Parturition.* 2 ed. Pullman, WA: Current Conceptions, Inc., 2003. cap. 3, p. 44 – 79.

SETCHELL, B. P. **Male Reproductive Organs and Semen.** In: CUPPS, P. T. *Reproduction in Domestic Animals.* 4 ed. San Diego, CA: ACADEMIC PRESS, INC., 1991. cap. 6, p. 234 – 238.

SHARMA, R.; AGARWAL, A. **Spermatogenesis: an overview.** In: ZINI, A.; AGARWAL, A. *Sperm Chromatin: Biological and Clinical Applications in Male Infertility and Assisted Reproduction, USA: Springer; 2011, p. 19-44*

SRINGNAM, S.; KITIYANANT, Y.; LEWIN, L. M.; SAIKHUN, K. Semen quality and chromatin condensation in domestic cat sperm during passage through the epididymis. **Kasetsart J Nat Sci**, v. 45, p. 46-58, 2011.

SULLIVAN, 1978 **Determinants of Sperm Morphology.** In: CHENOWETH, P. J.; LORTON, S.P. *Animal Andrology* 1ª Ed. Boston: CABI, 2014. cap. 3, p. 34-56.

SUTOVSKY, P.; MORENO, R.; RAMALHO-SANTOS, J.; DOMINKO, T.; THOMPSON, W. E.; SCHATTEN, G. A putative, ubiquitin-dependent mechanism for the recognition and elimination of defective spermatozoa in the mammalian epididymis. **Journal of Cell Science**, v. 114, n. 9, p. 1665-1675, 2001.

SUTOVSKY, P.; NEUBER, E.; SCHATTEN, G. Ubiquitin-dependent sperm quality control mechanism recognizes spermatozoa with DNA defects as revealed by dual ubiquitin-TUNEL assay. **Molecular reproduction and development**, v. 61, n. 3, p. 406-413, 2002.

SUZUKI-TOYOTA, F.; ITO, C.; TOYAMA, Y.; MAEKAWA, M.; YAO, R.; NODA, T.; TOSHIMORI, K. The coiled tail of the round-headed spermatozoa appears during epididymal passage in GOPC-deficient mice. **Archives of histology and cytology**, v. 67, n. 4, p. 361-371, 2004.

TEJADA, R. I.; MITCHELL, J. C.; NORMAN, A.; MARIK, J. J.; FRIEDMAN, S. A test for the practical evaluation of male fertility by acridine orange (AO) fluorescence. **Fertility and sterility**, v. 42, n.1, p. 87-91, 1984.

VERNOCCHI, V.; MORSELLI, M. G.; CONSIGLIO, A. L.; FAUSTINI, M.; LUVONI, G. C. DNA fragmentation and sperm head morphometry in cat epididymal spermatozoa. **Theriogenology**, v. 82, p. 982-87, 2014.

WARD, W. S.; COFFEY, D. S., 1991 **Determinants of Sperm Morphology**. In: CHENOWETH, P. J.; LORTON, S.P. *Animal Andrology* 1^a Ed Boston: CABI, 2014. cap. 3, p .34-56.

ZAR, J. H. Comparing simple linear regression equations. *Biostatistical analysis*, v. 2, p. 292-305, 1984.

APÊNDICES

APÊNDICE – 1. TÉCNICA CIRÚRGICA - ORQUIECTOMIA

Após ampla tricotomia da região perineal e da bolsa testicular pós-anestesia, o animal foi colocado em decúbito dorsal com os membros fletidos no sentido cranial e procedeu-se com a antisepsia (álcool iodado seguido de álcool). O campo cirúrgico foi isolado com pano de campo fenestrado e compressas estéreis e o procedimento iniciado com a incisão da bolsa testicular do lado direito paralelo à rafe, abertura da túnica vaginal parietal, exposição do testículo e divulsão até o cordão espermático. Três pinças (mosquito/Kelly) foram colocadas no cordão, a excisão foi feita entre a 2ª e 3ª pinça e ligadura dupla abaixo da 1ª pinça com fio de nylon 2-0 (TECHNOFIO®). O mesmo procedimento foi realizado do lado esquerdo. Não foi feita a rafia da pele.

APÊNDICE – 2. PROTOCOLO ANESTÉSICO

MPA + INDUÇÃO: (Via intramuscular)

Acepromazina (Vetnil®) = 0,03mg/kg

Quetamina (Vetnil®) = 12mg/kg

Morfina (Cristália®) = 0,2mg/kg

Midazolam (Cristália®) = 0,2mg/kg

* Aplicação de 1mg/kg de Propofol (Cristália®) por via endovenosa para realização da anestesia epidural.

ANESTESIA EPIDURAL (L7S1):

0,25mL/kg de Lidocaína 2% com vasoconstritor (Cristália®)