

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

**QUALIDADE ESPERMÁTICA E DANOS DE DNA EM**  
**ESPERMATOZOIDES CRIOPRESERVADOS DE TOUROS**  
**NELORE JOVENS, ADULTOS E SENIS.**

**Janaina Torres Carreira**

Médica Veterinária

JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL

2012

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

**QUALIDADE ESPERMÁTICA E DANOS DE DNA EM  
ESPERMATOZOIDES CRIOPRESERVADOS DE  
TOUROS NELORE JOVENS, ADULTOS E SENIS.**

**Janaina Torres Carreira**

**Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Adjunto Marion Burkhardt de Koivisto**

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

**JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL**

**Março de 2012**

C314q Carreira, Janaina Torres  
Qualidade espermática e danos de DNA em espermatozoides  
criopreservados de touros Nelore jovens, adultos e senis. / Janaina  
Torres Carreira. – – Jaboticabal, 2012  
xvii, 101 f. il; 28 cm

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de  
Ciências Agrárias e Veterinárias, 2012  
Orientadora: Marion Burkhardt de Koivisto  
Banca examinadora: Lúcia Helena Rodrigues, Sony Dimas  
Bicudo, César Roberto Esper, Paulo Henrique Franceschini  
Bibliografia

1. DNA espermático. 2. Qualidade espermática. 3. Bovinos. I.  
Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 619:612.6:636.2

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

## **DADOS CURRICULARES DO AUTOR**

**JANAINA TORRES CARREIRA** - nascida em Sorocaba – SP, ao dia 3 do mês de Setembro de 1977; concluiu o ensino médio na EEPSP José Vilagelin Neto, na cidade de Campinas – SP, em dezembro de 1996. Kursou a faculdade de Engenharia Florestal na Universidade de São Paulo – ESALQ-USP entre 1996 a 2000. Ingressou no curso de Graduação em Medicina Veterinária na Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba da Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho” – UNESP, em março de 2001. Concluiu o curso superior em Medicina Veterinária em dezembro de 2005. Durante a graduação realizou três estágios de iniciação científica sob orientação da Prof<sup>a</sup>. Adjunto Marion Burkhardt de Koivisto, junto à disciplina de obstetrícia veterinária. Ingressou no curso de pós-graduação, nível de Mestrado em março de 2006, com bolsa de mestrado do CNPq, sob orientação da Adjunto Marion Burkhardt de Koivisto, no Programa de Medicina Veterinária, Área de Concentração em Reprodução Animal, na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias Câmpus de Jaboticabal da Universidade Estadual Paulista – UNESP, concluído em fevereiro de 2008. Foi professora voluntária da disciplina de Obstetrícia Veterinária do curso de Medicina Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba da Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho” – UNESP, Araçatuba, entre junho de 2006 e maio de 2007. Ingressou no curso de pós-graduação, nível de Doutorado em março de 2008, sob orientação da Adjunto Marion Burkhardt de Koivisto, no Programa de Medicina Veterinária, Área de Concentração em Reprodução Animal, na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias Câmpus de Jaboticabal da Universidade Estadual Paulista – UNESP.

“Eu estou entre aqueles que pensam que a ciência tem grande beleza. Um cientista em seu laboratório não é apenas um técnico: ele é também uma criança colocada diante de um fenômeno natural que o impressiona como um conto de fadas...”

**Marie Curie (1867-1934)**

“Não espere pelos problemas, pois eles habitualmente não o desapontam.”

**Napoleon Hill (1883-1970)**

## DEDICO

Ao meu filho **Caio**.  
Aos meus pais **Clélio** e **Leila**.  
A minha avó **Julieta**.

## AGRADECIMENTOS

Sempre ouvimos que o doutorado é um desafio, mas acredito que um desafio principalmente aos nossos limites. Ainda, é a fase onde devemos ser mais independentes, no entanto, nada fazemos sem ajuda, é bem difícil ser justo o suficiente nos agradecimentos, sempre vai haver uma sensação de que ainda é pouco.

Agradeço primeiramente à minha amada família, **Caio, Mãe, Pai, e Leta**, foram quatro anos, na verdade, foi uma vida até agora, obrigada pela paciência e sacrifício.

Agradeço à minha orientadora **Prof<sup>a</sup>. Adjunto Marion Burkhardt de Koivisto** por acreditar no projeto, pela paciência, confiança, convivência e amizade. Foram dez anos de muito trabalho, muitas idéias, realizações e crescimento. Que o futuro nos permita muito mais de tudo isso.

À **Dra. Lucia Helena Rodrigues** e ao **Carlos Silva** pelo enorme apoio dispensado ao trabalho, sem isso esse projeto não poderia ser realizado.

À **Life Technologies** e aos amigos **André, Marcio** e **Willian**, fundamentais para a realização da citometria de fluxo.

Ao **Prof. Wilter Ricardo Russiano Vicente, Prof<sup>a</sup>. Vera Fernanda Martins Hossepian de Lima**, **Prof<sup>a</sup>. Maricy Apparício Ferreira** e **Prof<sup>a</sup>. Cássia Maria Barroso Orlandi** pela atenção dispensada no exame de qualificação, correções e sugestões.

À **Prof<sup>a</sup>. Sílvia Helena Venturoli Perri**, pela imprescindível ajuda para análise dos resultados.

À **Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - UNESP – Câmpus de Jaboticabal** pela oportunidade da realização do Doutorado e à **Faculdade de Medicina Veterinária – UNESP – Câmpus de Araçatuba**, minha casa.

A **CAPES** pela concessão da Bolsa de Estudos.

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

Às minhas amigas tão queridas, **Juliane Teramachi**, meu braço direito e esquerdo, pelas horas intermináveis no laboratório, dias e noites sem descanso, todo o agradecimento é pouco. **Isadora Resende de Carvalho** pela amizade, por cuidar de nós enquanto ficávamos no laboratório e por cuidar do Tini também. À **Joana Zafalon Ferreira** pelo apoio e amizade em todos esses anos que nos conhecemos e pela sua dedicação ao Proex.

Ao **Petrônio Barbosa da Costa Gomes**, pelo companheirismo, amizade, carinho e principalmente pela paciência.

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

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

## SUMÁRIO

|                                                                                                         | Páginas |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------|
| LISTA DE TABELAS.....                                                                                   | ix      |
| LISTA DE FIGURAS.....                                                                                   | xi      |
| LISTA DE ABREVIATURAS.....                                                                              | xiii    |
| RESUMO.....                                                                                             | xvi     |
| ABSTRACT.....                                                                                           | xviii   |
| CAPÍTULO 1 - CONSIDERAÇÕES GERAIS.....                                                                  | 1       |
| Introdução.....                                                                                         | 1       |
| Qualidade espermática.....                                                                              | 3       |
| A cromatina espermática.....                                                                            | 7       |
| Integridade da Cromatina.....                                                                           | 10      |
| A idade e a integridade da cromatina.....                                                               | 13      |
| Métodos de avaliação da integridade da cromatina espermática.....                                       | 15      |
| Avaliação da Protaminação Espermática (CMA3).....                                                       | 15      |
| Avaliação dos danos de DNA causados por oxidação da cromatina<br>(8OHdG).....                           | 16      |
| Suscetibilidade da cromatina à denaturação ácida (AOT e SCSA).....                                      | 18      |
| Danos nas fitas de DNA (TUNEL).....                                                                     | 19      |
| Hipótese.....                                                                                           | 20      |
| Objetivos.....                                                                                          | 20      |
| CAPÍTULO 2. QUALIDADE ESPERMÁTICA DE AMOSTRAS<br>CRIOPRESERVADAS DE TOUROS JOVENS, ADULTOS E SENIS..... | 21      |
| RESUMO.....                                                                                             | 21      |
| Introdução.....                                                                                         | 22      |

|                                                                        |           |
|------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>Material e métodos.....</b>                                         | <b>23</b> |
| Seleção dos animais e preparo das amostras.....                        | 23        |
| Análises físicas e funcionais dos espermatozóides.....                 | 24        |
| Análise microscópica da motilidade e do vigor espermático.....         | 24        |
| Teste de termo resistência lento (TTL).....                            | 24        |
| Análise computadorizada do sêmen (CASA).....                           | 25        |
| Concentração.....                                                      | 25        |
| Morfologia espermática.....                                            | 25        |
| Avaliação da integridade de membranas – PI e FITC-PSA.....             | 26        |
| Avaliação do potencial mitocondrial – JC-1.....                        | 26        |
| Análise estatística.....                                               | 27        |
| <b>Resultados.....</b>                                                 | <b>28</b> |
| <b>Discussão.....</b>                                                  | <b>36</b> |
| <b>Conclusões.....</b>                                                 | <b>40</b> |
| <b>CAPITULO 3. ANÁLISES DA INTEGRIDADE DO DNA ESPERMÁTICO DE</b>       |           |
| <b>AMOSTRAS CRIPPRESERVADAS DE TOUROS JOVENS, ADULTOS E SENIS..</b>    | <b>41</b> |
| <b>RESUMO.....</b>                                                     | <b>41</b> |
| <b>Introdução.....</b>                                                 | <b>42</b> |
| <b>Material e métodos.....</b>                                         | <b>43</b> |
| Seleção dos animais e preparo das amostras.....                        | 43        |
| Avaliação da Protaminação – CMA3.....                                  | 44        |
| Danos de DNA causado por espécies de oxigênio reativo (EROs)– 8OHdG... | 45        |
| Integridade da cromatina – SCSA e Laranja de acridina (AOT).....       | 47        |
| Integridade da cromatina – TUNEL.....                                  | 48        |

|                                     |           |
|-------------------------------------|-----------|
| <b>Análise estatística.....</b>     | <b>50</b> |
| <b>Resultados .....</b>             | <b>51</b> |
| <b>Discussão.....</b>               | <b>58</b> |
| <b>Conclusões.....</b>              | <b>62</b> |
| <b>CAPITULO 4. IMPLICAÇÕES.....</b> | <b>63</b> |
| <b>BIBLIOGRAFIA.....</b>            | <b>65</b> |
| <b>ANEXOS .....</b>                 | <b>91</b> |

## LISTA DE TABELAS

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           | Páginas   |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>CAPITULO 2. QUALIDADE ESPERMÁTICA DE AMOSTRAS</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |           |
| <b>CRIOPRESERVADAS DE TOUROS JOVENS, ADULTOS E SENIS.....</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             | <b>21</b> |
| <br>Tabela 1. Distribuição dos animais por grupo experimental determinado pela idade dos touros, média e desvio padrão das idades e idade máxima e mínima dos animais.....                                                                                                                                                                                                                                                | <br>23    |
| <br>Tabela 2. Médias e desvio padrão da motilidade (em porcentagem) e do vigor (de 0 a 5) de touros jovens (n=27), adultos (n=59) e senis (n=36) antes (0h) e após o TTL (Teste de termoresistência lento – 37°C/3h) e a porcentagem de acrossomas intactos (PIA) após o TTL, avaliados em microscopia de contraste de fase.....                                                                                          | <br>28    |
| <br>Tabela 3. Média e desvio padrão dos resultados da análise computadorizada do movimento espermático (CASA) de touros de touros jovens (27), adultos (59) e senis (36) quanto à motilidade espermática total (MOT), motilidade progressiva (MP), velocidade de trajeto (VAP); velocidade linear (VSL) e a velocidade curvilinear (VCL).....                                                                             | <br>29    |
| <br>Tabela 4. Média e desvio padrão da concentração espermática ( $\times 10^6/\text{mL}$ ), da porcentagem de defeitos maiores, menores e totais dos touros de touros jovens (n=27), adultos (n=59) e senis (n=36), avaliados em microscopia de interferência diferencial (DIC, imersão em óleo, 1000x).....                                                                                                             | <br>29    |
| <br>Tabela 5. Média e desvio padrão da porcentagem de espermatozoides com membrana íntegra e acrossoma íntegro (MIAI), membrana íntegra e acrossoma lesado (MIAL), membrana lesada e acrossoma íntegro (MLAI), membrana lesada e acrossoma lesado (MLAL), corados pela associação das sondas fluorescentes PI e FITC-PSA e avaliados pela citometria de fluxo em touros jovens (n=27), adultos (n=59) e senis (n=36)..... | <br>30    |
| <br>Tabela 6. Média e desvio padrão da porcentagem de espermatozoides com membrana lesada (MLAI+MLAL) e acrossoma lesado (MIAL+MLAL), obtidas pela soma dos resultados obtidos pela coloração simultânea com as sondas fluorescentes PI e FITC-PSA e avaliados pela citometria de fluxo em touros jovens (n=27), adultos (n=59) e senis (n=36).....                                                                       | <br>31    |

|                                                                                                                                                                                                                                                        |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Tabela 7. Média e desvio padrão das porcentagens de espermatozoides corados com JC-1 e avaliados por citometria de fluxo quanto ao potencial mitocondrial (alto, médio e baixo) dos grupos de touros Jovens (n=27), Adultos (n=56) e Senis (n=36)..... | 33 |
| Tabela 8. Coeficiente de correlação e valor de P das variáveis motilidade espermática total (MOT), motilidade progressiva (MP), potencial mitocondrial e integridade da membrana e do acrossoma em relação à idade dos touros avaliados.....           | 34 |

### **CAPITULO 3. ANÁLISES DA INTEGRIDADE DO DNA ESPERMÁTICO DE AMOSTRAS CRIPPRESERVADAS DE TOUROS JOVENS, ADULTOS E SENIS...**

|                                                                                                                                                                                                                                                                 |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Tabela 1. Distribuição dos animais por grupo experimental determinado pela idade dos touros, média e desvio padrão das idades e idade máxima e mínima dos animais.....                                                                                          | 43 |
| Tabela 2. Média e desvio padrão das porcentagens de espermatozoides com alterações na cromatina nas técnicas de CMA3, 8-OHdG, AO e TUNEL, avaliados por microscopia de fluorescência para os grupos de touros Jovens (n=27), Adultos (n=59) e Senis (n=36)..... | 51 |
| Tabela 3. Média e desvio padrão das porcentagens de espermatozoides com alterações na cromatina pelas técnicas de CMA3, 8-OHdG, SCSA e TUNEL, avaliados por citometria de fluxo para os grupos de touros Jovens (n=27), Adultos (n=59) e Senis (n=36).....      | 53 |
| Tabela 4. Coeficiente de correlação e valor de P das variáveis CMA3, 8-OHdG, SCSA e TUNEL em relação a idade dos touros avaliados.....                                                                                                                          | 57 |

## LISTA DE FIGURAS

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              | Páginas   |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>CAPITULO 2. QUALIDADE ESPERMÁTICA DE AMOSTRAS</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |           |
| <b>CRIOPRESERVADAS DE TOUROS JOVENS, ADULTOS E SENIS.....</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                | <b>24</b> |
| Figura 1. A) fotomicrografia digital de espermatozoides apresentando acrossoma e membrana lesada (microscopia de fluorescência - Olympus BX61, 400X); B) representação gráfica do histograma da coloração com PI avaliada pela citometria de fluxo, área vermelha corresponde a membrana lesada; C) histograma, área rosa espermatozoides com acrossoma lesado(coloração por FITC-PSA); D) gráfico tipo “Dotplot”, avaliação simultânea da integridade do acrossoma e da membrana plasmática, que produziu quatro classes de resultados AIML (acrossoma íntegro e membrana lesada), ALML (acrossoma lesado e membrana lesada), AIMI (acrossoma íntegro e membrana íntegra) e ALMI (acrossoma lesado e membrana íntegra)..... | 32        |
| Figura 2. Representação gráfica da média da idade (jovens, adultos e senis) e das médias e desvio padrão da motilidade progressiva (MP), porcentagem de espermatozoides com membrana íntegra e acrossoma íntegro (MIAI) e alto potencial mitocondrial.....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   | 35        |
| <b>CAPITULO 3. ANÁLISES DA INTEGRIDADE DO DNA ESPERMÁTICO DE</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |           |
| <b>AMOSTRAS CRIPPRESERVADAS DE TOUROS JOVENS, ADULTOS E SENIS...</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         | <b>41</b> |
| Figura 1. Fotomicrográfas digitais de espermatozóides corados em A) com CMA3. Nota-se em A (setas) a presença de dois espermatozóides positivos para CMA3 (protaminação deficiente), em B) OxyDNA, espermatozóides sem danos por oxidação da cromatina (8-OHdG positivo) e em C) técnica de TUNEL apresentando nas setas espermatozóides com cromatina danificada (TUNEL positivo)(Olympus BX61, microscopia de fluorescência, 400x).....                                                                                                                                                                                                                                                                                    | 52        |

- Figura 2. Fotomicrografia digital de amostra de sêmen descongelado e corado com laranja de acridina, A) células com cromatina íntegra; B) Amostra controle, cromatina lesada por indução (DTT, Triton X-100,  $\text{FeSO}_4$  e  $\text{H}_2\text{O}_2$ ) (Olympus BX61, microscopia de fluorescência, 400x)..... 53
- Figura 3. Representação gráfica dos grupos de idade (gráfico de colunas e eixo secundário) e da porcentagem e desvio padrão de células espermáticas positivas para 8-OHdG (A), CMA3 (B), SCSA (C)..... 55
- Figura 4. Histogramas referentes à avaliação da porcentagem de eventos positivos para CMA3, na área em verde e indicada como CMA3+ encontram-se os espermatozoides com protaminação deficiente. A) amostra de touro do grupo Jovens; B) controle negativo (amostra “Branca” – linha laranja), o controle positivo - desprotaminação induzida (linha vermelha), e a mistura 1:1 das amostras branco e induzida (linha azul) (Attune® Software – Applied Biosystems by Life Technologies, Grand Island, EUA)..... 56
- Figura 5. Representação gráfica dos histogramas, para a porcentagem de DFI (%DFI). A) amostra controle com a quebra da fita dupla induzida (DTT, Triton X-100 e incubação em  $\text{FeSO}_4+\text{H}_2\text{O}_2$ ); B) amostra do grupo Jovens (Flowjo® - Tree Star, Inc., San Carlos, CA, U.S.A.)..... 57

## LISTA DE ABREVIATURAS

AO= “Acridine Orange” – Laranja de Acridina

AOT= Teste de Laranja de Acridina

ATP= Adenosina trifosfato

BP= “Band Pass”

BSA= Albumina sérica bovina

CCCP= Carbonil cianida-m-clorofenilhidrazona

CASA= Análise computadorizada do movimento espermático

Ca<sup>++</sup>= Íon cálcio

CMA3= Cromomicina A3

DIC= Contraste por interferência diferencial

DFI= DNA “Fragmentation Index” – índice de fragmentação do DNA

DNA= Ácido desoxiribonucléico

DTT= Diidrotreitol

EROs= Espécies reativas de oxigênio

FITC= Isoticianato de fluoresceína

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

FIV= Fecundação *in vitro*

h= Hora

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

4(2Hydroxyethyl)piperazine- 1-ethanesulfonic acid

IA= Inseminação artificial

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

KCl= Cloreto de potássio

LP= “Long pass”

MOT= Motilidade total

MP= Motilidade progressiva

M= Molar

mL= Mililitros

mg= Miligramas

mm= Milímetros

mM= Milimolar

mV= Milivolt

nm= Nanômetros

PBS= “phosphate buffer solution”

P1= Protamina tipo 1

P2= Protamina tipo 2

PI= Iodeto de propídio

PIA= Porcentagem de acrossomas intactos

PSA= Aglutinina de *Pisum sativum*

S= Desvio padrão

SAS= “Statistical Analyses System”

SCSA= “Sperm Chromatin Structure Assay”

TALP= “Tyrode’s albumin lactate and pyruvate”

TTL= Teste de termo-resistência lento

TUNEL= “terminal deoxytransferase mediated deoxyuridine triphosphate nick end-labeling assay”

VAP= Velocidade de trajeto

VCL= Velocidade curvelinear

VSL= Velocidade Linear

8OHdG= 8-OH-2'-deoxiguanina

$\beta$ = Beta

$^{\circ}\text{C}$ = Graus centígrados

$\Delta\Psi$ = Potencial de membrana

$\mu\text{m}$ = Micrometros

$\mu\text{L}$ = Microlitros

$\mu\text{g}$ = Microgramas

$\pm$  = Mais ou menos

$<$  = Menor

$>$  = Maior

$\%$ = Porcentagem

$*$ = Asterisco

## **QUALIDADE ESPERMÁTICA E DANOS DE DNA EM ESPERMATOZÓIDES CRIOPRESERVADOS DE TOUROS NELORE JOVENS, ADULTOS E SENIS.**

**RESUMO** – Os objetivos deste projeto de pesquisa foram testar se a qualidade espermática, e a integridade da cromatina são diferentes em um grupo de touros Nelore jovens, adultos e senis. Três ejaculados, de 40 touros Nelore foram subdivididos em três faixas etárias: de 1,8 a 2 anos – Grupo Jovens, de 3,5 a 7 anos – Grupo Adultos e de 8 a 14,3 anos – Grupo Senis. As amostras foram avaliadas quanto à motilidade, o vigor, teste de termoresistência lento (TTL), análise computadorizada do movimento espermático (CASA), avaliação simultânea da integridade da membrana plasmática e do acrossoma, potencial mitocondrial, protaminação espermática, danos de DNA causados por radicais livres, suscetibilidade a denaturação da cromatina, pelos testes “Sperm Chromatin Structure Assay” (SCSA) e laranja de acridina (AOT), e danos na cromatina com a técnica TUNEL. Os animais jovens apresentaram valores superiores de motilidade e vigor antes e após o TTL, e maior porcentagem de células com alterações morfológicas, assim como maior porcentagem de espermatozóides com membrana e acrossoma íntegros e com alto potencial mitocondrial, estes parâmetros tiveram os menores índices nos animais senis ( $P<0,05$ ). Nas avaliações da integridade do DNA, os touros jovens apresentaram maior porcentagem de deficiência de protaminação, enquanto os senis danos por oxidação. No teste SCSA os touros mais jovens e mais idosos apresentaram maiores índices de danos na cromatina, diferindo dos demais ( $P<0,05$ ). O teste de TUNEL não apresentou resultados satisfatórios. Estes resultados permitem concluir que touros jovens apresentam qualidade espermática superior, seguidos pelo grupo de animais adultos, e finalmente um declínio na qualidade nos diversos parâmetros estudados para o grupo de animais senis. Quanto à integridade da cromatina, os resultados indicam que os grupos jovens e senis são mais susceptíveis a danos da fita dupla de DNA, porém, nos jovens por deficiência de protamina e nos idosos pelo ataque de radicais livres.

Palavras chave: DNA espermático, idade, nelore, CMA3, SCSA, 8-OHdG.

## SPERM QUALITY AND DNA DAMAGE IN YOUNG, ADULT AND SENILE NELORE CRYOPRESERVED SAMPLES.

**SUMMARY** – The aims of this study were to test if sperm quality and chromatin integrity are different in young, adult and senile Nelore Bull cryopreserved semen samples. Three ejaculates from 40 Nelore bulls were divided by age in three groups: 1,8 to 2 years – Young Bulls, from 3,5 to 7 years – Adult Bulls and from 8 to 14,3 years – Senile Bulls. Samples were evaluated for: motility, vigor, slow termoresistance test (TTL), computadorized sperm movement analyses (CASA), simultaneous evaluation of plasmatic membrane and acrosome integrity, mitochondrial potential, sperm protamination, DNA oxidation damages, *Sperm Chromatin Structure Assay* (SCSA) and acridine orange test (AOT), and TUNEL. Young animals presented better values for motility and vigor before and after TTR, intact membrane and acrosome and high mitochondrial potential, but higher values for sperm defects, ( $P < 0.05$ ). On DNA integrity evaluations, Young Bulls presented more protamination problems while senile bulls guanine oxidation defects, both groups were more susceptible to DNA denaturation on SCSA ( $P < 0.05$ ). TUNEL results were not satisfactory. The results indicates that Young bulls may have a high quality sperm sample after freezing, followed by the adults and finally there is a decrease in quality on senile bulls group, nevertheless the results would probably not compromised the samples approval for commercial use. Regarding DNA integrity, Young and senile bulls are more susceptible to DNA damage, nevertheless the etiology of the damage seems to be different, by protamine deficiency in Young bulls and by oxidation in senile animals.

Keywords: sperm DNA, age, Nelore, SCSA, CMA3, 8-OHdG.

## **CAPÍTULO 1 - CONSIDERAÇÕES GERAIS**

### **Introdução**

Os centros de coleta e processamento do sêmen (CCPS) procuram adquirir animais jovens e parte das atividades de seleção desses touros com potencial reprodutivo, incluem a colheita e avaliação do sêmen. No entanto, sabe-se que alguns desses animais produzem amostras seminais inferiores quanto à concentração, motilidade ou morfologia e que estes parâmetros tendem a melhorar com a idade (KARABINUS et al., 1990; WINTER et al., 1986). Essas avaliações são importantes, pois, a célula espermática deve apresentar uma associação de características, tais como membrana citoplasmática íntegra, responsável pela homeostase celular, acrossoma íntegro, crucial para fertilização do oócito e alto potencial de membrana mitocondrial, responsável pela produção de adenosina trifosfato (ATP), indispensável para o batimento flagelar e motilidade espermática (CELEGHINI, 2005).

A integridade do DNA é outro fator importante, uma vez que imperfeições na cromatina são incompatíveis com a fertilidade (BENCHAIIB et al., 2003). No entanto, são raros os trabalhos que avaliam a idade do macho e a integridade da cromatina espermática em bovinos, grande parte da literatura disponível se refere a outras espécies.

Ao estudar a influência da idade na integridade do DNA de ratos verificou-se, um declínio da protaminação e redução da formação de ligações dissulfídicas das protaminas em animais jovens. Concluiu-se que, apesar dos animais permanecerem férteis, a qualidade da cromatina espermática era inferior, podendo afetar a saúde de seus descendentes (ZUBKOVA et al., 2005).

Em humanos, os estudos se concentram nas consequências do envelhecimento. Muitos pesquisadores discutem as implicações da idade em relação à integridade do DNA e qualidade do ejaculado e concordam que o envelhecimento promove uma redução das funções fisiológicas, podendo ocorrer alterações quanto ao balanço

oxidativo e ainda na organização da cromatina dos espermatozoides (CENTOLA & EBERLY, 1999; CHEN et al., 2003; ZUBKOVA et al., 2005). Danos no DNA das células espermáticas têm sido associados a uma variedade de alterações importantes, incluindo a infertilidade, aumento da incidência de abortos e um risco aumentado de doenças na prole (AITKEN & DeIULIIS, 2010).

As células germinativas masculinas parecem ser particularmente suscetíveis a mudanças mutagênicas e pró-mutagênicas. Esta variabilidade biológica é útil na criação da diversidade genética auxiliando o processo evolutivo, porém, também pode ser prejudicial, pois ajuda a criar mutações responsáveis por doenças, incluindo câncer e infertilidade (AITKEN & KRAUSZ, 2001).

Os mecanismos mutagênicos envolvem erros de replicação que estão fortemente correlacionados com a idade paterna. A etiologia destas quebras de fita pode envolver recombinação aberrante, protaminação defeituosa, apoptose e estresse oxidativo (AITKEN & KRAUSZ, 2001).

Estudos que investigaram a influencia da idade na qualidade espermática e na fertilidade, observaram redução do volume do ejaculado, da motilidade e o aumento das alterações morfológicas do espermatozoide, não houve, porém, alteração da concentração (KIDD et al., 2001; ESKENAZI et al., 2003). Estes estudos forneceram fortes evidências de que espermatozoides produzidos por indivíduos idosos diferem daqueles produzidos por jovens (ZUBKOVA et al., 2005).

A relativa facilidade com que estudos podem ser conduzidos em animais, quando comparados a humanos, sugere a necessidade de expansão neste tipo de investigação. O dilema enfrentado por pesquisadores é que alguns estudos são eticamente impossíveis de serem realizados em reprodução humana, para garantir que os procedimentos de manipulação da fertilização sejam completamente seguros. Os modelos animais podem proporcionar um passo importante nessa direção, lembrando que a interpretação dos estudos em animais depende de um entendimento das diferenças entre as espécies (BARRAT et al., 2010).

Há necessidade urgente de pesquisa fundamental e de realização de experimentos utilizando modelos animais para avaliação de alterações no DNA

espermático. Progressos nessa área dependem de investimentos de base no entendimento das causas e consequências dos danos de DNA nas células germinativas, e no desenvolvimento de testes de diagnóstico que possam ser incorporados na avaliação da infertilidade (BARRAT et al., 2010).

Nosso trabalho foi elaborado buscando produzir dados quanto à qualidade espermática e, principalmente, referentes à integridade do DNA de amostras criopreservadas de espermatozoides de touros de diferentes faixas etárias. Essas informações são importantes para o entendimento da fisiologia e das alterações nas diferentes idades. Tanto para as CCPS de inseminação artificial, que buscam animais que produzam sêmen de alta qualidade precocemente e por muitos anos, ou ainda, como modelo para outras espécies, direcionando pesquisas futuras.

### **Qualidade espermática**

Para os centros de coleta e armazenamento do sêmen a produção de doses de sêmen congelado de alta qualidade é pré-requisito para o sucesso na inseminação artificial. Para isso, os touros são selecionados de acordo com suas características fenotípicas e genotípicas, fertilidade e qualidade do sêmen após congelação (BRITO et al., 2002a).

Atualmente, com o desenvolvimento da biologia molecular e com a utilização da seleção genômica de touros de elite, os animais são incluídos ainda jovens nos programas de inseminação artificial (AL NAIB et al., 2011), sem a realização de teste de fertilidade a campo, assim a avaliação da qualidade do ejaculado desses touros é de grande importância.

Estudos que avaliam a influência da idade na qualidade espermática se referem principalmente à maturidade sexual, pois a idade de entrada dos touros na reprodução sempre foi controversa, sendo que os animais de origem indiana atingem a maturidade entre os 30 e 36 meses de idade (OLIVEIRA, 1999), ou segundo SILVEIRA et al., (2010) entre 20 e 22 meses. Fatores ambientais (KOIVISTO et al., 2009), nutricionais, a

raça e a idade do touro podem influenciar a qualidade do ejaculado (BRITO et al., 2002b).

AHMAD et al. (2011) e BRITO et al. (2002a) observaram ejaculados com qualidade superior quanto ao volume e concentração em animais adultos, porém sem que houvessem diferenças na motilidade, morfologia, integridade do acrossoma ou da membrana plasmática (AHMAD et al., 2011).

BHAKAT et al. (2011) trabalharam com touros de origem indiana e observaram redução da qualidade espermática após 4 ou 5 anos de idade. Esta redução poderia ser decorrente de uma menor taxa de espermatogênese (KUMI-DIAKA et al., 1981), ou ainda da maior produção de espécies reativas de oxigênio, somada a redução da capacidade antioxidante dos animais mais velhos (KELSO et al., 1997; KIDD et al., 2001; WEIR & ROBAIRE, 2007).

Assim existe, conseqüentemente, grande interesse em encontrar métodos que possam prever o desempenho de um animal ou de seu sêmen congelado, permitindo que amostras com fertilidade baixa sejam identificadas e removidas dos programas de reprodução (ZHANG et al., 1999). Para avaliar a qualidade e a capacidade fecundante de uma amostra de sêmen existem diversos testes laboratoriais, no entanto, nenhum teste individual é capaz de prever este potencial com segurança, mas sim o conjunto deles (GRAHAM, 2001; PHILIPS, 2004).

Dentre as avaliações tradicionais da qualidade espermática, a motilidade é considerada uma das características mais importantes para prever a fertilidade do sêmen (VERSTEGEN et al., 2002). A observação subjetiva da motilidade é um dos métodos de avaliação da qualidade espermática após o processo de criopreservação (HERMAN et al., 1996).

No entanto, a estimativa visual pode subestimar a porcentagem de espermatozoides móveis (GARNER et al., 1997), sendo esse um dos motivos pelos quais os sistemas computadorizados de avaliação do movimento espermático (CASA) tendem a substituir a observação subjetiva da motilidade (RODRIGUEZ-MARTINEZ et al., 1997). O CASA é capaz de avaliar células móveis, imóveis e ainda registra suas

trajetórias individuais (FARREL et al 1997), fornecendo dados quanto às características do movimento.

Alterações na morfologia espermática também podem ser responsáveis pela redução na porcentagem de espermatozoides com motilidade progressiva, como também podem refletir alterações na espermatogênese e da integridade dos túbulos seminíferos, epidídimo e glândulas anexas (BARTH & OKO, 1989). A avaliação morfológica do sêmen tem sido correlacionada com a infertilidade e subfertilidade do macho (PESCH & BERGMANN, 2006). LIU & BAKER (2002) descreveram que a proporção de espermatozoides que se ligaram à zona pelúcida com morfologia normal e anormal está fortemente relacionada às taxas de fertilização *in vitro*.

BLOM (1973) classificou as alterações morfológicas em dois grupos, os denominados defeitos maiores, aqueles relacionados com a espermatogênese, e os defeitos menores.

Como já citado anteriormente, o espermatozoide precisa apresentar uma série de características para garantir a fecundação e fertilização do oócito, dentre elas está a integridade da membrana plasmática, que recobre totalmente a célula (PESCH & BERGMANN, 2006).

A avaliação da membrana espermática é um indicador importante do sucesso da criopreservação, uma vez que tanto a membrana plasmática quanto a mitocondrial são extremamente sensíveis às crio-injúrias (THUN et al., 2002). As inúmeras funções da membrana citoplasmática estão relacionadas ao metabolismo celular e manutenção da motilidade, capacitação, reação acrossomal, interações entre o espermatozoide e epitélio do trato genital da fêmea e interação com oócito (PEÑA et al., 2005).

A integridade da membrana plasmática garante a manutenção da homeostase celular, atuando como barreira entre os meios interno e externo (AMMAN & PICKET, 1987). Em condições de estresse provocado pela criopreservação, as membranas podem sofrer rearranjos, formando pontos vulneráveis e, com isso, induzir a excessiva permeabilidade ou mesmo rompimento da membrana (AMANN & GRAHAM, 1993). Na

membrana espermática, esse estresse está relacionado à fase de transição dos lipídeos, a qual altera o estado funcional da membrana (HOLT et al., 1992).

O iodeto de propídio (PI), corante fluorescente que se liga especificamente ao DNA, não atravessa a membrana plasmática íntegra, corando o núcleo de células com membrana plasmática lesada em vermelho (GARNER et al., 1986; GARNER et al., 1988; GRAHAM et al., 1990; COELHO et al., 1995; CELEGHINI, 2005). Este corante vem se destacando em pesquisas pela sua facilidade de preparação e aplicação da técnica, estabilidade e eficiência para avaliar a membrana plasmática, seja isoladamente ou em associação a outras sondas (ARRUDA et al., 2007). O acrossoma é essencial para o funcionamento da célula espermática. A capacitação espermática e a reação acrossomal são necessárias para a fecundação, no entanto, esses eventos só devem ocorrer no momento da fertilização. Consequentemente, a porcentagem de células com acrossoma íntegro e capazes de realizar a reação acrossomal no devido momento representam uma característica importante do sêmen (KAWAKAMI et al., 1993).

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

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

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

A integridade das mitocôndrias e seu funcionamento também fazem parte do conjunto de fatores que indicam uma célula espermática íntegra e capaz de exercer sua função. Alterações no funcionamento da mitocôndria podem estar relacionadas à infertilidade (RUIZ-PESINI et al., 1998).

As mitocôndrias, exclusivamente localizadas na peça intermediária, são responsáveis pela produção da energia necessária para a motilidade espermática (GRAVANCE et al., 2000). Estas produzem energia em forma de adenosina trifosfato (ATP) que é quebrada em moléculas de adenosina trifosfatase, liberando a energia necessária para a movimentação da cauda (BARTH & OKO, 1989). Medidas da função mitocondrial podem ser alternativas úteis para uma avaliação mais precisa da qualidade espermática (HALLAP, 2005). A sonda de iodeto de 5, 5', 6, 6' – tetracloro - 1, 1, 3, 3' - tetraetilbenzimidazolilcarbocianina (JC-1) tem sido utilizada para coloração diferencial de mitocôndrias com alto ou baixo potencial de membrana (GRAVANCE et al., 2000). A sonda separa duas populações por código de cor, mostrando mitocôndrias com alto potencial de membrana em vermelho e marcando em verde as com baixo potencial (CELEGHINI, 2005).

O uso da sonda JC-1 é mais vantajosa do que as Rodaminas e Carbocianinas, pois é capaz de se ligar seletivamente à mitocôndria e as mudanças de coloração são reversíveis, do verde ao alaranjado de acordo com o aumento do potencial de membrana acima de valores de 80 a 100mV. Esta propriedade é reversível devido à formação de agregados na membrana polarizada que causam a mudança da emissão de luz de 530nm (emissão das formas monoméricas de JC-1) para 590nm (emissão dos J-agregados), quando excitados a 488nm. Assim, quando a coloração passa de verde para laranja a membrana mitocondrial está mais polarizada (COSSARIZZA et al., 1993; GRAVANCE et al., 2000).

Na última década observou-se um grande avanço no conhecimento dos mecanismos bioquímicos e moleculares que determinam a produção de um espermatozoide funcionalmente competente (AITKEN, 2006). A presente pesquisa busca identificar testes que avaliem o maior número possível de características do sêmen, mas que também sejam de fácil execução e viáveis economicamente.

### **A cromatina espermática**

Para entender os mecanismos de dano da cromatina espermática é preciso antes entender como o DNA espermático é organizado e em quais aspectos está

organização se difere das células somáticas (SHAMAN & WARD, 2006). As mudanças que ocorrem na estrutura e função da cromatina durante a espermatogênese vêm intrigando pesquisadores há mais de um século e as diferenças entre a cromatina espermática e a das células somáticas eram desconhecidas até o início de estudos detalhados sobre a espermatogênese e espermiogênese (BALHORN, 2011).

A cromatina espermática se destaca por ser extremamente condensada. O DNA da célula espermática de um camundongo, por exemplo, é seis vezes mais condensado do que de um cromossomo em mitose (WARD, 2011). Quando o núcleo espermático é comparado com o de uma célula hepática, é possível observar que quase a totalidade do núcleo espermático é preenchida por DNA, enquanto na célula hepática ele preenche apenas parte de seu volume total (WARD & COFFEY, 1991).

Nas células somáticas o DNA é enrolado ao redor de proteínas denominadas histonas e organizados em estruturas solenóides (McGHEE et al., 1983). No entanto, o núcleo espermático não possui volume suficiente para este tipo de organização (WARD & COFFEY, 1991), conseqüentemente a cromatina do espermatozoide deve ser organizada de maneira única, altamente condensada e compactada (SHARMA & AGARWAL, 2011).

A compactação da cromatina espermática ocorre durante a espermatogênese, onde a célula germinativa, geneticamente ativa, se transforma em um espermatozóide inativo ou quiescente até a fertilização do oócito. Estas mudanças são induzidas pela modificação de proteínas que se ligam e compactam o DNA, promovendo a desprogramação temporária do genoma paterno (BALHORN, 2011).

Antes da meiose, a cromatina dos espermatócitos é estruturalmente semelhante a das células somáticas, onde as proteínas predominantes são as histonas. Com o progresso da meiose e nos primeiros estágios da espermiogênese uma série de proteínas variantes das histonas são sintetizadas, algumas dessas proteínas vão ser mantidas em pequenas proporções no espermatozoide maduro, e o restante delas é substituída por proteínas de transição (BALHORN, 2011). Com o aparecimento dessas proteínas de transição nas espermátides, se inicia a condensação da cromatina, que acontece no sentido da região apical para a caudal (OKO et al., 1996). Então, as

proteínas de transição são substituídas por proteínas de carga positiva, denominadas protaminas (BALHORN, 2011).

As protaminas condensam a cromatina formando estruturas denominadas toróides. BALHORN (1982) sugeriu que as argininas carregadas positivamente presentes na protamina neutralizam os grupos fosfato carregados negativamente no DNA, assim não haveria repulsão e as fitas de DNA poderiam ser organizadas lado a lado em um arranjo linear, como uma estrutura lamelar, permitindo a compactação em um volume mínimo.

Este processo, no entanto, exige que as fitas duplas de DNA sofram muitas quebras para se reorganizarem. As quebras são causadas pela Topoisomerase II beta, que desenrola as fitas de DNA que estavam condensadas por histonas em forma de solenoides. Esta descondensação é necessária para que as fitas de DNA sejam reorganizadas por protaminas. Ao final deste processo de protaminação, que ocorre no trânsito epididimário (ANDRABI, 2007), as quebras de fita do DNA causadas pela Topoisomerase II beta devem estar totalmente reparadas, pois, após novamente compactado, o espermatozoide perde a capacidade de reparação e se torna quiescente (WARD, 2011).

Esta organização protege a cromatina, garante a integridade do genoma paterno e o protege durante o transporte no trato masculino e feminino (OLIVA, 2006; SHARMA & AGARWAL, 2011). Além disso, permite que a célula espermática tenha uma forma hidrodinâmica e pequena, facilitando o transporte no trato feminino (BALHORN, 2011).

Na maioria dos mamíferos, o núcleo espermático contém mais de 95% de protaminas, a porcentagem restante é de histonas. Porém, no homem este número se reduz a cerca de 90% de protaminas e como este componente é essencial para a condensação ideal da cromatina, a presença de 15% de histonas no homem determina uma cromatina mais suscetível a descondensação. Ainda, o espermatozoide humano possui dois subtipos de protaminas (P1 e P2), enquanto outras espécies, como os bovinos, utilizam apenas a protamina I (P1) (VILFAN et al., 2004).

A manutenção de alguma porcentagem de histonas na cromatina espermática está associada a genes que devem ser ativados imediatamente após a fertilização do

oócito, inclusive genes de "imprint" paterno, indicando que estas histonas remanescentes possam estar associadas à programação epigenética (BALHORN, 2011).

Resumindo, a formação do espermatozoide envolve uma série de mudanças meióticas e mitóticas. Durante este processo, a substituição das histonas com transcrição de proteínas e adição final de protaminas leva a uma cromatina organizada e acondicionada de maneira singular, fazendo com que o DNA espermático ocupe quase o volume total do núcleo. Esta organização garante que o DNA paterno seja transportado, permite a fusão dos genomas favorecendo o desenvolvimento embrionário e a correta expressão da informação genética (SASSONE-CORSI, 2002; ERENPREISS et al., 2006).

### **Integridade da Cromatina**

A integridade do DNA de espermatozoides de mamíferos é de importância vital para a contribuição paterna de um descendente normal (ANDRABI, 2007; SHIBAHARA et al., 2003), uma vez que danos de DNA podem resultar em morte celular e na indução de mutações que podem ser transportadas para a próxima geração ou resultar em infertilidade do macho. Assim, a integridade do DNA se tornou importante como indicador da qualidade do espermatozoide (HUGHES et al., 1999).

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

Uma suscetibilidade aumentada à desnaturação demonstra heterogeneidade da estrutura da cromatina e tem sido relacionada a distúrbios na espermatogênese, morfologia anormal (ENCISO et al., 2011), concentração e motilidade espermática diminuídas (BENCHAIIB et al., 2003), danos ao desenvolvimento embrionário e consequente fertilidade reduzida (HALLAP, 2005). Os espermatozoides afetados possuem a capacidade de fertilizar oócitos, mas o consequente desenvolvimento embrionário depende do grau de alteração do DNA (AHMADI & NG, 1999).

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

Em humanos (SAKKAS et al., 1999) e bovinos (ENCISO et al., 2011) a relação entre alterações nos parâmetros espermáticos e os danos da cromatina indicaram problemas inerentes a espermatogênese. Segundo SAKKAS et al (1999) nesses casos duas teorias poderiam ser aplicadas quanto a origem dos danos a cromatina nos espermatozoides maduros. A primeira hipótese seria que as quebras realizadas pela Topoisomerase II beta, necessárias para protaminação espermática, não seriam totalmente recuperadas devido a um processo insuficiente de substituição de histonas por protaminas, com conseqüente compactação deficiente da cromatina. A segunda hipótese, propõe que as quebras de DNA presentes no espermatozoide ejaculado seriam resultado de um processo semelhante a apoptose das células somáticas, responsável pela eliminação de células germinativas deficientes (GORCZYCA et al 1993; MANICARDI et al., 1995; SAKKAS et al., 1999).

Outros pesquisadores complementam e propõem que os danos na cromatina podem ser induzidos por seis mecanismos principais, i) apoptose durante o processo de espermatogênese (BENCHAIIB et al., 2003); ii) quebras produzidas durante o remodelamento da cromatina (TAVALAEE et al., 2009); iii) fragmentação pós-testicular, principalmente induzida por espécies reativas de oxigênio (EROS); iv) fragmentação induzidas por endonucleases e caspases; v) induzidas por quimioterapia e radioterapia e vi) induzida por fatores intoxicantes ambientais (ALVAREZ, 2005; SAKKAS & ALVAREZ, 2010).

Além desses fatores, alterações transitórias podem influenciar a integridade da cromatina, tais como a temperatura (CARREIRA, 2008), criopreservação (BUCAK et al., 2010; WATSON, 1995), fatores biológicos como infecções e doenças de transmissão

venérea, obesidade, diabetes, idade e fatores relacionados ao estilo de vida (no caso de humanos), como o tabagismo (PACEY, 2010).

Em bovinos, a indústria da inseminação artificial esta focada em desenvolver métodos capazes de prever a fertilidade a campo quando o sêmen congelado é utilizado, permitindo eliminar touros com menor fertilidade da população de animais altamente selecionados (GARCÍA-MACÍAS et al., 2007; HALLAP et al., 2005). Apesar do núcleo ser considerado um compartimento estável e menos afetado pelos processos de congelação e descongelação do que as membranas, este componente na célula espermática também pode ser afetado negativamente pela criopreservação (WATSON, 1995).

Em touros, a influência da qualidade da cromatina paterna ainda é controversa, com trabalhos indicando que o desenvolvimento de embriões *in vitro* não foi influenciado pela integridade do DNA (SIMÕES, 2010), e outros concluindo que os danos de DNA não afetam a fertilização e sim o desenvolvimento embrionário (FATEHI et al., 2006).

Pesquisas recentes relacionam alterações da cromatina à altos índices de defeitos morfológicos, que podem estar ligados a problemas durante a espermatogênese (ENCISO et al., 2011). Espermatozoides morfolologicamente normais em meio à altos índices de espermatozoides alterados, podem apresentar danos na cromatina, acarretando em baixas taxas de fertilidade *in vitro* (WALTERS et al., 2005). Outros estudos demonstraram que os índices de fertilidade, tais como a taxa de não retorno ao estro, são correlacionados a danos de DNA em espermatozoides bovinos (EVENSON, 1999; GARCÍA-MACÍAS et al., 2007).

Animais férteis possuem porcentagens baixas de danos de DNA (DOBRINSKI et al., 1994; SIMÕES, 2010; WATERHOUSE et al., 2010; NAJA-TRUJILLO et al., 2011), muito inferiores as observadas em humanos (SIMÕES, 2010). BALLACHEY et al., (1987) ainda indicaram que existe muita variabilidade na estrutura da cromatina de bovinos e que esta variabilidade estaria ligada as diferenças individuais de fertilidade.

Em touros, entre as causas ambientais de danos ao DNA, estariam o estresse térmico, insulação testicular, alteração na alimentação, doenças e idade avançada

(SIMÕES, 2010). A criopreservação, a incubação do sêmen *in vitro* e o diluidor, também afetam a integridade da cromatina (WATERHOUSE et al., 2010; LYMBEROPOULOS; KHALIFA, 2010). KASIMANICKAM et al., (2007) sugeriram que estes danos associados a criopreservação estariam ligados a produção de radicais livres e a peroxidação lipídica. No entanto, os mecanismos de como a criopreservação afetaria a integridade da cromatina ainda não foram estudados.

Estudos sobre a etiologia dos danos são escassos, uma vez que os trabalhos na espécie bovina apenas procuram correlacionar a fertilidade do touro com os índices de fragmentação de DNA (ANZAR et al., 2002; BALLACHEY et al., 1987; DOBRINSKI et al.; 1994; EVENSON, 1999; NAJA-TRUJILLO et al., 2011; RYBAR et al., 2010; SIMÕES, 2010), ou com os efeitos da criopreservação (GONZALÉZ-MARÍN et al., 2011; LYMBEROPOULOS & KHALIFA, 2010; MARTIN et al., 2004; WATERHOUSE et al., 2010).

### **A idade e a integridade da cromatina**

Em 1979 a preocupação com o desenvolvimento sexual de touros de diferentes raças já era discutida na literatura, indicando que estes dados seriam importantes para a seleção genética de jovens reprodutores (FIELDS et al., 1979).

Como resultado dos programas de melhoramento genético, a idade da puberdade em touros Nelore tem diminuído ao longo dos anos sendo de aproximadamente 21 meses (DODE et al., 1989) ou mais recentemente de 15 meses (FRENEAU et al., 2006). A avaliação do sêmen de touros em idade precoce pode ajudar na identificação de animais produtores de sêmen de alta qualidade e geneticamente superiores. Com a maturidade sexual existe uma melhora da qualidade do ejaculado de touros *Bos taurus* e *Bos indicus*, e também de outras espécies domésticas e selvagens (CORREA et al., 2006; JAVED et al., 2000; LYMBEROPOULOS & KHALIFA, 2010; NOYES et al., 1996; SILVA et al., 2009). No entanto, não existem estudos que investiguem a qualidade da cromatina em diferentes idades.

Em humanos a avaliação da qualidade espermática em indivíduos mais jovens esbarra em conceitos éticos. (WALLACE et al., 2005). Apesar da quase inexistência de estudos nesse grupo de idade, uma forte indicação do envolvimento da paternidade na adolescência na qualidade da gestação ou na saúde do neonato foi determinada por Chen et al., (2008). Esse grupo realizou estudo retrospectivo de mais de dois milhões de nascimentos, fixando a idade da mãe entre 20 e 29 anos, para que apenas o efeito da idade paterna pudesse ser estudado. Mostrou-se que homens adolescentes (menos de 20 anos de idade) apresentaram risco maior de terem filhos por parto prematuro, pequenos ao nascimento, com “Apgar” baixo e maior índice de mortalidade infantil. A associação de espermatozoides imaturos com o aumento dos riscos de problemas gestacionais, possivelmente como resultado de alterações na placentação, foram apontados como possível causa.

Estudos da integridade da cromatina de animais jovens foram realizados em hamsters, demonstrando que eram imaturos quanto à condensação da cromatina (WEISSENBERG et al., 2009). ZUBKOVA et al., (2005) estudaram a integridade da cromatina de espermatozoides de ratos jovens e idosos, e os resultados mostraram danos semelhantes a cromatina em ambos os grupos. Porém, quando avaliada a protaminação espermática após a exposição às espécies reativas de oxigênio, os ratos jovens apresentaram mais problemas de protaminação do que ratos idosos.

Apesar de alguns estudos abordarem a qualidade da cromatina em animais jovens, a maior parte dos trabalhos em humanos e em modelos animais se restringe a entender e avaliar as consequências do envelhecimento na qualidade espermática e na integridade da cromatina. O decréscimo da qualidade espermática em humanos é contínuo dos 22 aos 80 anos de idade (ESKENAZI et al., 2003) e pode estar relacionado a um aumento da produção de radicais livres, devido a disfunção da respiração mitocondrial. Estas alterações, associadas à um declínio da produção de anti-oxidantes ao longo do envelhecimento, induziriam o dano oxidativo (PASQUALOTTO & PASQUALOTTO, 2011; ZUBKOVA et al., 2005; ZUBKOVA & ROBAIRE, 2006).

Resultados obtidos da avaliação da integridade da cromatina por diferentes métodos em humanos, como por exemplo, o Cometa neutro (SINGH et al 2003) e SCSA (SPANIO et al., 1998; WYROBEK et al 2006; ZUBKOVA et al., 2005) demonstraram o declínio da integridade da cromatina com o envelhecimento.

### **Métodos de Avaliação da Integridade da Cromatina Espermática**

Alguns testes identificam formas específicas de danos à cromatina, como a Cromomicina A3 (CMA3), que identifica deficiências de protaminação (BIANCHI et al 1993) ou ainda que demonstram a formação de um aducto de DNA, a 8-hidróxi-2'-deoxiguanosina (8-OHdG), resultado do ataque oxidativo à cromatina espermática (BARRAT et al., 2010)

Os métodos mais utilizados para a avaliação da cromatina são o “terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP Nick end labeling” (TUNEL) e o “sperm chromatin structure assay” (SCSA). Ambos avaliam a fragmentação ou dano no DNA espermático, apesar de algumas diferenças técnicas entre eles (BARRAT et al., 2010; DUNGUN et al., 2011).

### **Avaliação da Protaminação Espermática (CMA3)**

Como discutido anteriormente, o DNA espermático, que ocupa quase o volume total do núcleo, é organizado de forma específica mantendo a cromatina compacta e estável. Para alcançar este estado de condensação único, o DNA espermático se organiza de maneira diferente das células somáticas, mudando sua composição de uma estrutura composta exclusivamente por histonas, para um complexo heterogêneo de histonas e principalmente protaminas (DADOUNE, 2003).

Esta organização garante que o DNA paterno seja transportado e permite a fusão dos genomas favorecendo o desenvolvimento embrionário e a correta expressão da informação genética (ERENPREISS et al., 2006; ANGELOPOLOU et al., 2007; KURTZ et al., 2009). Desta forma, alterações nas proporções de histonas e protaminas

no núcleo espermático não deve ser atribuída a fatores pós-testiculares, uma vez que a composição protéica da cromatina espermática é adquirida durante a espermatogênese (ZINI et al., 2009). São justamente as alterações do remodelamento da cromatina durante a espermatogênese que podem gerar uma maior vulnerabilidade do DNA ao ataque de agentes externos (DeIULLIS et al., 2009).

A cromomicina A3 (CMA3) é um fluorocromo isolado da bactéria *Streptomyces griseus*, que se mostrou útil na detecção indireta das deficiências de protamina (BIANCHI et al., 1996; BIZARRO et al., 1998), que estaria relacionada com a baixa compactação espermática (IRANPOUR et al., 2000).

A marcação com CMA3 está relacionada com a presença de histonas (SINGLETON et al., 2007) e a alterações na compactação da cromatina, conseqüentemente, negativamente correlacionada à presença de protaminas (IRAMPOUR et al., 2000).

O modo como a CMA3 interage com áreas deficientes de protamina ainda não está completamente claro, no entanto, supõe-se que a molécula compete com a protamina pela ligação na estrutura do DNA (MANICARDI et al., 2011).

Na espécie bovina a técnica foi primeiramente utilizada por SIMÕES et al. (2009) que avaliaram a protaminação em espermatozoides de touros Nelore em condições tropicais (no Brasil). Apesar do baixo índice de células com protaminação deficiente, a técnica foi eficiente para espécie bovina.

### **Avaliação dos danos de DNA causados por oxidação da cromatina (8-OHdG)**

As espécies reativas de oxigênio (EROs) englobam uma vasta quantidade de metabólitos derivados da redução molecular do oxigênio. O termo radicais livres se refere a qualquer átomo ou molécula contendo um ou mais elétrons não pareados. São altamente energéticos e procuram outros elétrons, se ligam a outras moléculas, modificando-as. As principais EROs são o radical superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), o radical hidroxila ( $OH^{\cdot}$ ) e o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) (AITKEN & DeIULLIS, 2011; SILVA, 2006).

A avaliação dos danos induzidos por espécies reativas de oxigênio no espermatozoide é importante, já que o mesmo é submetido a este estresse durante a maturação no trato reprodutivo masculino, no ejaculado (se leucócitos estão presentes), durante a capacitação e durante o preparo de técnicas de reprodução assistida (ZUBKOVA et al., 2005).

Durante o processo de criopreservação o aumento dos radicais livres pode contribuir para os danos à cromatina (THOMSON et al., 2009). Em humanos o estresse oxidativo é considerado a maior causa de danos a cromatina espermatozoides (AITKEN & DEIULLIS, 2007).

A oxidação das bases nitrogenadas ocorre primeiramente e preferencialmente na guanina, os produtos finais são bases modificadas, a 8-OH-guanosina e 8-OH-2'-deoxiguanina (8-OHdG) que passam a se ligar a timina, quando deveriam se ligar a citosina, aumentando o risco de mutações (COMHAIRE et al., 2000). A formação dessas bases também enfraquece o esqueleto entre a base e o açúcar (KOOPERS, 2010) e pode causar a fragmentação da fita de DNA (CUI et al., 2000).

Este processo foi denominado por EVENSON et al, (1999) como efeito "iceberg", porque, quando observamos injúria na fita dupla de DNA, diversos processos de modificação de bases já podem ter ocorrido ou estar ocorrendo simultaneamente.

Essas bases têm demonstrado ser um bio-marcador importante (NAKAMURA et al., 2002; NI et al., 1997; SHEN et al., 1999; SILVA, 2005; SILVA & GADELLA, 2006;), mas, sua utilização dependia de equipamentos especiais e caros como a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). No entanto, pesquisas mais recentes verificaram que anticorpos anti 8-oxoguanina marcados com isotiocianato de fluoresceína (FITC) permitem a quantificação destas bases por microscopia de fluorescência ou citometria de fluxo (SILVA, 2006; SILVA & GADELLA, 2006).

Em humanos observou-se correlação significativa entre o bio-marcador de dano oxidativo de DNA, 8-OHdG, e a fragmentação de DNA (DEIULLIS et al., 2009). O processo de criopreservação pode aumentar a fragmentação do DNA, o dano oxidativo de bases nitrogenadas e a ativação da caspase no sêmen humano, tanto em

espermatozoides de pouca qualidade como também espermatozoides isolados por gradiente de densidade considerados de alta qualidade (THOMSON et al., 2009).

Os danos na cromatina podem ser interpretados ainda como resultados de um processo de senescência da célula espermática, caracterizado pela ativação da formação de radicais livres pelas mitocôndrias e consequente dano oxidativo em bases nitrogenadas (AITKEN & DEIULLIS, 2009).

### **Suscetibilidade da cromatina à denaturação ácida (AOT e SCSA)**

O fluorocromo Laranja de Acridina (AO) cora especificamente o DNA e fluoresce em verde quando está em forma de monômero intercalando fitas duplas de DNA, e forma agregados que fluorescem em vermelho quando se liga a fitas simples denaturadas (ICHIMURA et al., 1971). A microscopia ótica comum não permite a detecção da condensação anormal da cromatina por meio de técnicas rotineiras como a análise de esfregaços corados ou não corados (BARTH & OKO., 1989). No entanto, técnicas como a coloração de Feulgen, citometria de fluxo e a coloração de laranja de acridina (AO) entre outras, podem ser utilizadas para avaliar a condensação anormal da cromatina em espermatozoides. DOBRINSKI et al., (1994) verificaram que estas três técnicas citadas apresentaram resultados significativamente semelhantes, sendo então válidas para a avaliação dos danos de DNA em espermatozoides.

O teste de laranja de acridina (AOT) consiste em um teste simples e que elimina a necessidade de equipamentos caros (AGARWAL et al., 2003).

EVENSON et al., (1980) desenvolveram método que utiliza as propriedades metacromáticas do Laranja de Acridina associadas à citometria de fluxo avaliando a susceptibilidade da cromatina à denaturação ácida. Desenvolveram diversos tratamentos para abrir pontos de fragilidade do DNA corando estas quebras com o AO, definindo o pré-tratamento com pH ácido (EVENSON, 2011). Esta metodologia foi denominada “Sperm Chromatin Structure Assay” – SCSA. HENKEL et al., (2010) ressaltam que o SCSA avalia um dano potencial da cromatina e não um dano “real”.

Nos últimos 30 anos o SCSA já foi testado em touros (EVENSON et al., 1980; GARCIA-MACIAS et al., 2006; JANUSKAUSKAS et al., 2003), ratos (EVENSON et al., 1980), suínos (EVENSON et al., 1994), e exaustivamente utilizado na reprodução humana (EVENSON, 2011).

O SCSA identifica cinco populações de espermatozoides de acordo com a integridade do DNA e a estrutura da cromatina: i) Fragmentação de DNA não mensurável; ii) Fragmentação de DNA moderada; iii) Alto índice de fragmentação; iv) índice total (% de moderados + % de altos índices), denominado DNA “fragmentation index” (% DFI) (EVENSON, 2011).

### **Danos nas fitas de DNA (TUNEL)**

Um dos testes mais comuns para a avaliação de danos na cromatina é a “terminal deoxytransferase mediated deoxyuridine triphosphate nick end-labeling assay” (TUNEL) (YOUNG et al., 2003). Esta técnica foi utilizada em espermatozoides pela primeira vez em 1993 (GORCZYCA et al., 1993).

Ela se baseia na incorporação de nucleotídeos (d-UTP = 2'-desoxiuridina 5' trifosfato) marcados com isotiocianato de fluoresceína (FITC) nas regiões 3'OH livres da quebra de fita simples ou duplas de DNA. Essa reação é catalizada por uma enzima denominada “terminal nucleotidil transferase” (TdT) que polimeriza os nucleotídeos modificados nas regiões de quebra do DNA. A incorporação dos nucleotídeos marcados amplificada pode ser detectada por microscopia de fluorescência e por citometria de fluxo. Esta técnica avalia os danos reais da cromatina e não os induzidos como no SCSA (HENKEL et al., 2010).

A principal desvantagem dessa técnica, mesmo sendo amplamente utilizada, é que ainda não existe padronização da metodologia (MURATORI et al., 2010).

## Hipótese

A qualidade de sêmen criopreservado e integridade do DNA espermático são diferentes em touros jovens, adultos e senis.

## Objetivos

O objetivo deste trabalho foi avaliar comparativamente qualidade espermática, o empacotamento da cromatina, os danos causados por radicais livres ao DNA e a sua integridade, em espermatozoides de touros *Bos indicus* da raça Nelore em função da idade.

Os objetivos específicos, para touros jovens, adultos e senis, foram avaliar:

- A motilidade subjetiva e a análise computadorizada do movimento espermático (CASA), o vigor, concentração e a morfologia espermática;
- O desempenho no teste de termo resistência lento (TTL);
- A integridade do acrossoma e da membrana plasmática;
- O potencial mitocondrial;
- A qualidade do empacotamento da cromatina espermática pela substituição de histonas por protaminas (CMA3);
- A produção de bases modificadas pela ação de radicais livres (8-OHdG);
- A suscetibilidade da cromatina espermática à denaturação ácida (SCSA);
- Os danos na integridade da cromatina espermática (TUNEL);

## **CAPITULO 2. QUALIDADE ESPERMÁTICA DE AMOSTRAS CRIOPRESERVADAS DE TOUROS NELORE JOVENS, ADULTOS E SENIS**

### **Qualidade Espermática de Amostras Criopreservadas de Touros Nelore Jovens, Adultos e Senis**

**RESUMO** -Os fatores que podem afetar a qualidade da amostra seminal são a genética, a dieta, o ambiente e ainda, a idade do reprodutor. O objetivo deste trabalho foi avaliar se a qualidade espermática é diferente em amostras de sêmen criopreservado de touros Nelore jovens, adultos e senis. Três ejaculados, de 40 touros Nelore, provenientes do mesmo centro de colheita e processamento de sêmen foram congelados de acordo com os padrões da central. Os touros foram subdivididos em três faixas etárias: de 1,8 a 2 anos – Grupo Jovens, de 3,5 a 7 anos – Grupo Adultos, 8 a 14,3 anos –Grupo Senis . As amostras foram avaliadas quanto à motilidade, vigor, teste de termo-resistência lento (TTL), análise computadorizada do movimento espermático (CASA), avaliação simultânea da integridade da membrana plasmática, do acrossoma e potencial mitocondrial. Os animais jovens apresentaram valores superiores de motilidade e vigor tanto antes quanto após o TTL, também foram melhores quanto a integridade do acrossoma, membrana plasmática e alto potencial mitocondrial ( $P<0,05$ ). As diferenças entre os grupos podem estar relacionadas às alterações fisiológicas do envelhecimento, tais como aumento da produção de radicais livres e redução da capacidade antioxidante. Foi possível concluir que touros idosos têm a motilidade reduzida assim como menor integridade da membrana plasmática, acrossomal e menor potencial mitocondrial. Já os touros jovens apresentaram melhor qualidade espermática pós-descongelção, quando comparados aos outros grupos. No entanto, apesar das diferenças, os touros jovens, adultos e senis apresentaram qualidade espermática satisfatória após a criopreservação.

Palavras chave: bovino, criopreservação, idade, Nelore, qualidade espermática

## Introdução

Animais cada vez mais jovens são incluídos nos programas de inseminação artificial. A seleção de tourinhos para precocidade sexual atualmente é incrementada com os avanços da biologia molecular e da seleção genômica (AL NAIB et al. 2010).

A maturidade sexual de touros jovens foi extensivamente estudada (AHMAD et al., 2005; BAHKAT et al., 2011; GARNER et al., 1996; JAVED et al., 2000), enquanto os trabalhos avaliando o impacto do avanço da idade na fertilidade de touros são escassos. Os poucos trabalhos existentes indicam alterações na espermatogênese (KUMI-DIAKA et al., 1981), no balanço lipídico e na produção de antioxidantes (KELSO et al., 1997). Grande parte dos trabalhos realizados com bovinos busca relacionar a qualidade espermática em diferentes idades com outros fatores como: ambientais, nutricionais, diferentes raças, e estações do ano (BRITO et al 2002; OLIVEIRA et al, 2008; SÖDERQUIST et al, 2006).

Os parâmetros andrológicos laboratoriais para determinação da qualidade espermática de rotina são: motilidade, vigor, concentração e morfologia espermática. Porém, essas análises convencionais podem subestimar a diversa quantidade de propriedades biológicas desta célula tão especializada (BENCHAIIB et al., 2003).

Na ultima década observou-se grande avanço no conhecimento dos mecanismos bioquímicos e moleculares que determinam a produção do espermatozoide funcionalmente competente. Estes novos conhecimentos permitiram a inclusão de ferramentas que complementam os métodos utilizados anteriormente (AITKEN, 2006). Desta forma, a utilização de diversos métodos simultâneos para acessar a fertilidade do ejaculado aumenta a confiabilidade dos resultados obtidos (PHILLIPS et al., 2004).

Este trabalho buscou avaliar por meio de diferentes parâmetros a qualidade espermática de touros jovens, adultos e senis selecionados após a criopreservação.

## Material e métodos

### Seleção dos animais e preparo das amostras

Foi realizado um estudo casualizado onde animais *Bos indicus* da raça Nelore mantidos em regime semi-extensivo do mesmo centro de coleta e processamento do sêmen (latitude 21°04'52" e longitude 48°02'24") foram colhidos duas vezes por semana pelo método da vagina artificial, completando três colheitas por animal. As colheitas foram realizadas entre os meses de setembro e fevereiro. O sêmen industrializado em palhetas (0,25mL) foi acondicionado em raques e estocado em nitrogênio líquido aguardando posterior avaliação. Os 40 animais selecionados foram divididos em três grupos de acordo com a idade na ocasião da colheita: de 1,8 a 2 anos (Grupo Jovens), de 3,5 a 7 anos (Grupo Adultos) e de 8 a 14,3 anos (Grupo Senis) (Tabela 1).

Todas as avaliações espermáticas foram realizadas nas dependências da Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba – UNESP.

Tabela 1. Distribuição dos animais por grupo experimental determinado pela idade (anos) dos touros, média e desvio padrão das idades e idade máxima e mínima dos animais.

| Grupo   | nº partidas<br>(nº animais) | Idade (anos) |        |        |
|---------|-----------------------------|--------------|--------|--------|
|         |                             | Média        | Mínima | Máxima |
| Jovens  | 27 (9)                      | 1,9±0,1      | 1,8    | 2      |
| Adultos | 57 (19)                     | 4,8±1,0      | 3,5    | 7      |
| Senis   | 36 (12)                     | 10,1±2,0     | 8      | 14,3   |

### **Análises físicas e funcionais dos espermatozoides**

Para as avaliações descritas a seguir o sêmen congelado, acondicionado em palhetas de 250µL, foi descongelado em água a 35°C durante 20 segundos. As avaliações microscópicas foram realizadas no equipamento Olympus BX61 (Olympus, Tokyo, Japão), equipado com campo claro, contraste de fase, contraste de interferência diferencial (DIC) e epifluorescência. A citometria de fluxo foi realizada no equipamento Attune® (Applied Biosystems by Life Technologies, Grand Island, EUA), equipado com lasers de 488nm e de 405nm, filtros de emissão BL1 530/30nm “band pass” (BP), BL2575/24nm BP, BL3 640nm “long pass” (LP) e VL1 450/40nm BP, VL2522/30nm BP e VL3 603/48nm BP.

### **Análise microscópica da motilidade e do vigor espermático.**

A motilidade e o vigor foram avaliados imediatamente após a descongelação. Uma gota de sêmen foi colocada em lâmina coberta por lamínula pré-aquecidas a 37°C, e observada em microscópio de contraste de fase (Olympus BX61, 200x). A motilidade foi determinada pela estimativa visual da porcentagem de células em movimento. O vigor foi avaliado de acordo com a velocidade do movimento progressivo dos espermatozoides, e classificado de 0 a 5, sendo 0 o mais lento e 5 o mais rápido (FONSECA et al., 1992).

### **Teste de termo resistência lento (TTL)**

As amostras acondicionadas em tubos de hemólise e vedadas com rolhas de latex foram mantidas em banho Maria à 37°C por 3 horas. Após este período a motilidade, o vigor foram novamente avaliadas e contou-se a porcentagem de acrossomas intactos - PIA em câmara úmida (100 células) (HERMAN et al., 1996).

### **Análise computadorizada do sêmen (CASA)**

Para a análise computadorizada do movimento espermático (CASA 12.3 – Hamilton Research®, Beverly, EUA) utilizou-se o “hardware” IVOS (Integrat Visual Optical System, Hamilton Thorne Biosciences®). O “setup” foi definido conforme o Anexo A. Preparou-se alíquota de 2 µL da amostra em lâmina de quatro câmaras (Leja, NL) da qual foram avaliados os parâmetros da cinética espermática descritos a seguir: MOT (motilidade total), MP (motilidade progressiva), VAP (velocidade de trajeto), VSL (velocidade linear) e VCL (velocidade curvilínea). Os campos foram selecionados automaticamente observando a inexistência de artefatos como bolhas, partículas ou outros elementos que pudessem prejudicar a avaliação.

### **Concentração**

Realizou-se contagem das células em câmara de Neubauer à microscopia de contraste de fase (Olympus BX61, 200x). Para tanto, foram diluídos 20 µL de sêmen em 1 mL de solução formol-salina (FONSECA et al., 1992).

### **Morfologia espermática**

Para a contagem das anormalidades espermáticas foi utilizada a técnica de câmara úmida, onde uma gota de sêmen diluído em solução de KCl (MITCHELL, J.R.- comunicação pessoal – Anexo B) foi depositada em lâmina coberta por lamínula. Foram contadas 200 células em microscopia de interferência diferencial de fase – DIC (Olympus BX61, 1000X). O número de anormalidades morfológicas foi expresso em porcentagem de acordo com a classificação de BLOM (1973).

### **Avaliação da integridade de membranas – PI e FITC-PSA**

Para avaliar simultaneamente a integridade do acrossoma e da membrana plasmática foram utilizadas as sondas fluorescentes aglutinina de *Pisum sativum* conjugada com isotiocionato de fluoresceína (FITC-PSA, Sigma, St. Louis, M.O., E.U.A.), que têm a propriedade de se ligar ao conteúdo acrossomal, fluorescendo em verde (CASEY et al., 1993); e o iodeto de propídio (PI, Sigma, St. Louis, M.O., E.U.A.), que não é permeável a membrana íntegra, se ligando ao DNA e fluorescendo em vermelho se a membrana estiver lesada (ARRUDA; CELLEGHINI, 2003).

Para a coloração, uma palheta de cada partida foi descongelada (35°C/20 segundos) e o sêmen foi diluído para  $2 \times 10^6$  espermatozoides em 200 µL de PBS (“phosphate buffer solution” – Anexo C) e adicionados 3 µL (0,2mg/mL) de PI (Anexo D) e 50 µL (100 µg/mL) de FITC-PSA (Anexo E). Após incubação por oito minutos a 37°C no escuro, as amostras foram lidas em citômetro de fluxo (Attune® - Applied Biosystems by Life Technologies, Grand Island, EUA), utilizando a excitação do laser de argônio (488nm) e leitura simultânea em BL1 (530/30) e BL3 (640LP). Para realização do controle positivo e compensação, amostras foram submetidas à três ciclos de “Flash Frozen” (CELLEGHINI et al., 2010) com objetivo de promover lesão de membranas e conseqüente coloração positiva (vermelha) do PI e do FITC-PSA (verde). Os resultados foram classificados de acordo com a integridade simultânea da membrana e do acrossoma, ou seja, membrana íntegra e acrossoma íntegro (MIAI), membrana íntegra e acrossoma lesado (MIAL), membrana lesada e acrossoma íntegro (MLAI) e membrana lesada e acrossoma lesado (MLAL). Para o registro de imagens ilustrativas da integridade da membrana e do acrossoma, 8 µL dos espermatozoides corados foram colocados entre lâmina e lamínula e fotografados em microscópio de epifluorescência (Olympus BX61, Tokyo, Japão), utilizando filtro com excitação de 460-570nm e emissão de 460-610nm.

### **Avaliação do potencial mitocondrial – JC-1**

A avaliação do potencial mitocondrial foi realizada pela utilização da sonda fluorescente iodeto de 5, 5', 6, 6' – tetracloro - 1, 1, 3, 3' – tetraetilbenzimidazolilcarbocianina (JC-1, Sigma, St. Louis, M.O., E.U.A.). Esta sonda é capaz de se ligar seletivamente à mitocôndria e as mudanças de coloração são reversíveis, do verde ao alaranjado de acordo com o aumento do potencial de membrana acima de valores de 80 a 100mV. Esta propriedade é reversível devido à formação de agregados na membrana polarizada que causam a mudança da emissão de luz de 530nm (emissão das formas monoméricas de JC-1) para 590nm (emissão dos J-agregados), quando excitados a aproximadamente 490nm (COSSARIZZA et al., 1993; COSSARIZZA, 2007; GRAVANCE et al., 2000).

Para coloração uma palheta de cada partida foi descongelada (35°C/20s) e o sêmen diluído em PBS para  $2 \times 10^6$  espermatozoides em 200µL, foram adicionados 6µL (153µM) de JC-1 (Anexo F). As amostras foram incubadas por 8 minutos a 37°C no escuro e lidas em citômetro de fluxo (Attune® - Applied Biosystems by Life Technologies, Grand Island, EUA), utilizando a excitação do laser de argônio (488nm) e leitura simultânea em BL1 (530/30nm) e BL2 (575/24nm). Para realização do controle das células somente com baixo potencial mitocondrial as amostras foram incubadas com 10µM de carbonil cianida-m-clorofenilhidrazona (CCCP, Sigma, St. Louis, M.O., E.U.A.) a 27°C durante 30 minutos e depois coradas com JC-1 conforme o protocolo descrito anteriormente. O CCCP é um agente de desacoplamento, resgata os prótons despolarizando a membrana mitocondrial (BREWIS et al., 2000).

### **Análise estatística**

Foi definida como hipótese nula ( $H_0$ ) a ausência de diferenças entre a qualidade espermática de amostras criopreservadas de touros de diferentes faixas etárias.

A análise estatística foi realizada utilizando o SAS - Statistical Analysis System software (release 9.2. SAS Institute Inc., Cary, NC, USA, 2008). Os dados em porcentagem (exceto vigor, e dados de velocidade) foram transformados em arcoseno  $\sqrt{\%}$  para obter a distribuição normal. Os resultados foram examinados utilizando “two-way” ANOVA (touro x grupo) e os resultados do teste de termo resistência pelo MANOVA (touro x grupo x tempo de incubação). As medias foram comparadas pelo teste de Duncan e consideradas significativas quando  $P < 0,05$ . O coeficiente de correlação ( $r$ ) foi calculado para variáveis selecionadas (ZAR, 1999).

## Resultados

Os resultados obtidos nas avaliações físicas dos espermatozoides e pelo Teste de termoresistência lento (TTL) seguem descritos na Tabela 2. O grupo de animais senis apresentou valores significativamente menores ( $P<0,05$ ) de motilidade e vigor, tanto antes quanto após o TTL quando comparados aos animais jovens e adultos. Após o TTL os resultados de motilidade e vigor foram inferiores para todos os grupos, no entanto, a superioridade dos resultados dos grupos de touros jovens e adultos com relação aos senis permaneceu ( $P<0,05$ ).

Tabela 2. Médias e desvio padrão da motilidade (porcentagem) e do vigor (0 a 5) de touros jovens ( $n=27$ ), adultos ( $n=59$ ) e senis ( $n=36$ ) antes (0h) e após o TTL (Teste de termoresistência lento –  $37^{\circ}\text{C}/3\text{h}$ ) e a porcentagem de acrossomas intactos (PIA) após o TTL, avaliados em microscopia de contraste de fase.

| Grupo          | Motilidade           |                     | Vigor              |                    | PIA            |
|----------------|----------------------|---------------------|--------------------|--------------------|----------------|
|                | 0h                   | 3h                  | 0h                 | 3h                 |                |
| <b>Jovens</b>  | $38,89\pm10,95^{aA}$ | $27,04\pm6,24^{aB}$ | $3,74\pm0,68^{aA}$ | $2,96\pm0,46^{aB}$ | $52,00\pm4,43$ |
| <b>Adultos</b> | $38,33\pm6,42^{aA}$  | $28,02\pm6,42^{aB}$ | $3,63\pm0,57^{aA}$ | $2,94\pm0,29^{aB}$ | $51,67\pm5,42$ |
| <b>Senis</b>   | $33,79\pm6,13^{bA}$  | $24,09\pm7,55^{bB}$ | $3,50\pm0,41^{bA}$ | $2,59\pm0,59^{bB}$ | $50,00\pm7,69$ |

<sup>a,b</sup> Médias seguidas de letras minúsculas distintas na coluna diferem entre si pelo teste de Duncan ( $P<0,05$ ).

<sup>A,B</sup> Médias seguidas de letras maiúsculas distintas na linha diferem entre si pelo teste de Duncan ( $P<0,05$ ).

Além da avaliação subjetiva da motilidade, as amostras espermáticas foram submetidas ao CASA (Tabela 3), e os resultados indicaram que o grupo de touros jovens apresentou valores superiores aos demais para motilidade total (MOT) e motilidade progressiva (MP). Porém, nas avaliações de velocidade, o grupo de touros jovens apresentou os menores valores para o VAP e o VSL.

Tabela 3. Média e desvio padrão dos resultados da análise computadorizada do movimento espermático (CASA) de touros de touros jovens (27), adultos (59) e senis (36) quanto à motilidade espermática total (MOT), motilidade progressiva (MP), velocidade de trajeto (VAP); velocidade linear (VSL) e a velocidade curvilinear (VCL).

|                | <b>MOT (%)</b>           | <b>MP (%)</b>            | <b>VAP (µm/s)</b>        | <b>VSL (µm/s)</b>        | <b>VCL (µm/s)</b>          |
|----------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|----------------------------|
| <b>Jovens</b>  | 67,80±17,68 <sup>a</sup> | 36,93±11,28 <sup>a</sup> | 74,85±12,53 <sup>b</sup> | 53,41±10,23 <sup>b</sup> | 144,82±25,48 <sup>b</sup>  |
| <b>Adultos</b> | 39,83±13,52 <sup>b</sup> | 23,13±8,65 <sup>b</sup>  | 85,80±12,23 <sup>a</sup> | 68,13±10,89 <sup>a</sup> | 160,44±23,10 <sup>a</sup>  |
| <b>Senis</b>   | 37,99±17,75 <sup>b</sup> | 22,12±11,64 <sup>b</sup> | 82,93±13,29 <sup>a</sup> | 65,59±12,84 <sup>a</sup> | 155,66±24,37 <sup>ab</sup> |

<sup>a,b</sup> Médias seguidas de letras distintas na coluna diferem entre si pelo teste de Duncan (P<0,05).

Os resultados da concentração espermática e da avaliação da morfologia encontram-se na Tabela 4. O grupo de touros Jovens apresentou concentração espermática maior do que os animais adultos e senis.

Quanto à porcentagem de defeitos maiores, os touros jovens apresentaram maiores índices quando comparados aos demais. Entretanto, a porcentagem de defeitos menores não diferiu entre os grupos estudados.

A porcentagem de defeitos totais foi maior no grupo de touros jovens, que diferiu dos touros Adultos, no entanto, os Senis não diferiram dos Jovens e dos Adultos (P>0,05). As alterações morfológicas encontradas nas amostras estão descritas no Anexo G.

Tabela 4. Média e desvio padrão da concentração espermática ( $\times 10^6$ /palheta), da porcentagem de defeitos maiores, menores e totais dos touros de touros jovens (n=27), adultos (n=59) e senis (n=36), avaliados em microscopia de interferência diferencial (DIC, imersão em óleo, 1000x).

| <b>Grupo</b>   | <b>Concentração</b>     | <b>Defeitos Maiores</b> | <b>Defeitos Menores</b> | <b>Defeitos Totais</b>   |
|----------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|--------------------------|
| <b>Jovens</b>  | 28,56±8,67 <sup>a</sup> | 13,72±5,05 <sup>a</sup> | 5,06±3,30               | 18,78±7,02 <sup>a</sup>  |
| <b>Adultos</b> | 21,05±3,32 <sup>b</sup> | 9,45±5,59 <sup>b</sup>  | 6,28±3,97               | 14,62±7,80 <sup>b</sup>  |
| <b>Senis</b>   | 24,44±4,77 <sup>c</sup> | 9,40±4,67 <sup>b</sup>  | 6,20±5,01               | 15,14±6,37 <sup>ab</sup> |

<sup>a,b</sup> Médias seguidas de letras distintas na coluna diferem entre si pelo teste de Duncan (P<0,05).

A avaliação simultânea das membranas plasmática e do acrossoma espermático foram classificadas em quatro classes de resultados descritos na Tabela 5.

Tabela 5. Média e desvio padrão da porcentagem de espermatozoides com membrana íntegra e acrossoma íntegro (MIAI), membrana íntegra e acrossoma lesado (MIAL), membrana lesada e acrossoma íntegro (MLAI), membrana lesada e acrossoma lesado (MLAL), corados pela associação das sondas fluorescentes PI e FITC-PSA e avaliados pela citometria de fluxo em touros jovens (n=27), adultos (n=59) e senis (n=36).

| Grupo          | MIAI                     | MIAL                     | MLAI                     | MLAL       |
|----------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|------------|
| <b>Jovens</b>  | 54,70±9,49 <sup>a</sup>  | 10,62±8,41 <sup>b</sup>  | 12,81±4,90 <sup>b</sup>  | 21,90±9,38 |
| <b>Adultos</b> | 46,68±10,13 <sup>b</sup> | 14,51±10,37 <sup>b</sup> | 15,09±5,40 <sup>ab</sup> | 23,72±7,01 |
| <b>Senis</b>   | 37,53±9,84 <sup>c</sup>  | 20,71±13,36 <sup>a</sup> | 16,62±6,45 <sup>a</sup>  | 25,14±8,53 |

<sup>a,b</sup> Médias seguidas de letras distintas na coluna diferem entre si pelo teste de Duncan (P<0,05).

Touros Jovens possuíram maior porcentagem de espermatozoides com membrana íntegra e acrossoma íntegro (MIAI), seguido pelo grupo de animais adultos e com o grupo de animais senis apresentando os menores valores em relação aos demais (P<0,05). Para os parâmetros intermediários, membrana íntegra e acrossoma lesado (MIAL), os touros jovens e adultos apresentaram os menores valores quando comparados aos senis, e quanto às membranas lesadas e acrossomas íntegros (MLAI) jovens obtiveram a menor média e os senis a maior, porém o grupo de touros adultos não diferiu dos demais. Para a variável que avaliou a ocorrência simultânea dos piores parâmetros, ou seja, membrana lesada e acrossoma lesado (MLAL) os grupos não apresentaram diferença significativa (P>0,05).

Agruparam-se os quatro parâmetros dos resultados obtidos na associação do PI com FITC-PSA de acordo com a integridade da membrana (MLAI+MLAL) e do acrossoma (MIAL+MLAL). Com essa sumarização dos dados, os jovens apresentaram a menor média de espermatozoides com membrana lesada e os senis a maior, enquanto os touros adultos não diferiram dos demais. Quanto à integridade do acrossoma, o grupo de animais senis apresentou a maior média de espermatozoides

acrossoma lesados, os touros jovens as menores médias, enquanto os adultos não diferiram dos demais ( $P<0,05$ ) (Tabela 6).

Tabela 6. Média e desvio padrão da porcentagem de espermatozoides com membrana lesada (MLAI+MLAL) e acrossoma lesado (MIAL+MLAL), obtidas pela soma dos resultados obtidos pela coloração simultânea com as sondas fluorescentes PI e FITC-PSA e avaliados pela citometria de fluxo em touros jovens ( $n=27$ ), adultos ( $n=59$ ) e senis ( $n=36$ ).

| Grupo          | Membrana Lesada          | Acrossoma Lesado         |
|----------------|--------------------------|--------------------------|
| <b>Jovens</b>  | 34,70±12,27 <sup>b</sup> | 32,52±8,75 <sup>c</sup>  |
| <b>Adultos</b> | 38,81±9,76 <sup>ab</sup> | 38,23±11,52 <sup>b</sup> |
| <b>Senis</b>   | 41,76±10,67 <sup>a</sup> | 45,85±13,72 <sup>a</sup> |

<sup>a,b</sup> Médias seguidas de letras distintas na coluna diferem entre si pelo teste de Duncan ( $P<0,05$ ).

A Figura 1-A, apresenta a fotomicrografia de espermatozoides bovinos corados simultaneamente com FITC-PSA e PI em microscópio de fluorescência (Olympus BX61). A dupla coloração é avaliada na citometria de fluxo em gráficos do tipo histogramas para verificar cada coloração (FITC-PSA e PI, Figuras 1-B e 1-C) e então simultaneamente em gráficos “dotplot”, que exibem no eixo horizontal unidades correspondentes à intensidade da fluorescência verde (BL1, FITC-PSA) e no eixo vertical à fluorescência vermelha (BL-3, PI) (figura 1-D).

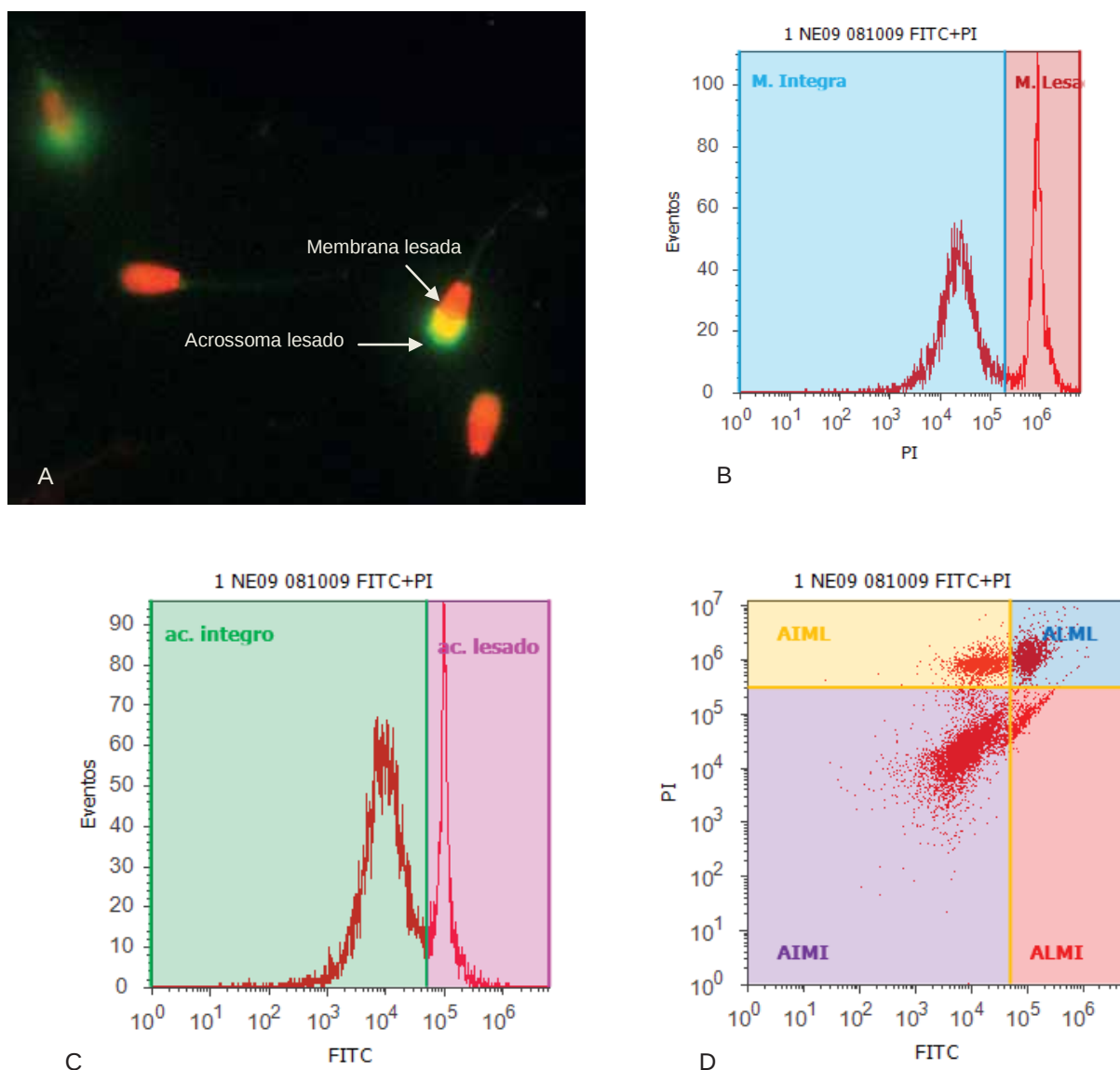


Figura 1. A) fotomicrografia digital de espermatozoides apresentando acrossoma e membrana lesada (microscopia de fluorescência - Olympus BX61, 400X); B) representação gráfica do histograma da coloração com PI avaliada pela citometria de fluxo, área vermelha corresponde a membrana lesada; C) histograma, área rosa espermatozoides com acrossoma lesado (coloração por FITC-PSA); D) gráfico tipo "Dotplot", avaliação simultânea da integridade do acrossoma e da membrana plasmática, que produziu quatro classes de resultados AIML (acrossoma integro e membrana lesada), ALML (acrossoma lesado e membrana lesada), AIMI (acrossoma integro e membrana íntegra) e ALMI (acrossoma lesado e membrana íntegra).

Os resultados para as avaliações do potencial mitocondrial estão descritos na Tabela 7. Os touros jovens apresentaram valores superiores de espermatozoides com alto e médio potencial mitocondrial quando comparado aos grupos de animais adultos e senis ( $P<0,05$ ); conseqüentemente, dos touros adultos e senis apresentam índices de baixo potencial mitocondrial bem mais elevados do que os touros jovens ( $P<0,05$ ).

Tabela 7. Média e desvio padrão das porcentagens de espermatozoides corados com JC-1 e avaliados por citometria de fluxo quanto ao potencial mitocondrial (alto, médio e baixo) dos grupos de touros Jovens ( $n=27$ ), Adultos ( $n=56$ ) e Senis ( $n=36$ ).

| Grupo          | Potencial mitocondrial   |                         |                          |
|----------------|--------------------------|-------------------------|--------------------------|
|                | Alto                     | Médio                   | Baixo                    |
| <b>Jovens</b>  | 81,70±9,40 <sup>a</sup>  | 13,44±6,60 <sup>a</sup> | 4,86±4,23 <sup>b</sup>   |
| <b>Adultos</b> | 67,82±10,38 <sup>b</sup> | 7,77±4,59 <sup>b</sup>  | 24,41±12,57 <sup>a</sup> |
| <b>Senis</b>   | 65,31±12,12 <sup>b</sup> | 5,57±3,56 <sup>b</sup>  | 29,11±13,77 <sup>a</sup> |

<sup>a,b</sup> Médias seguidas de letras distintas na coluna diferem entre si pelo teste de Duncan ( $P<0,05$ ).

A Tabela 8 demonstra os valores do coeficiente de correlação de algumas variáveis estudadas em relação à idade dos touros. Variáveis consideradas desejáveis tais como a motilidade total, motilidade progressiva, alto e médio potencial mitocondrial, membrana e acrossoma íntegros apresentaram correlação negativa com a idade. Enquanto, parâmetros como baixo potencial mitocondrial, membrana lesada e acrossoma lesado, obtiveram coeficiente de correlação positivo.

Tabela 8. Coeficiente de correlação e valor de P das variáveis motilidade espermática total (MOT), motilidade progressiva (MP), potencial mitocondrial e integridade da membrana e do acrossoma em relação à a idade dos touros avaliados.

| Variável                             | Correlação | P       |
|--------------------------------------|------------|---------|
| MOT                                  | -0,45      | <0,0001 |
| MP                                   | -0,37      | <0,0001 |
| Alto potencial mitocondrial          | -0,35      | 0,0001  |
| Médio potencial mitocondrial         | -0,45      | <,0001  |
| Membrana Íntegra e Acrossoma Íntegro | -0,36      | 0,0001  |
| Baixo potencial mitocondrial         | 0,47       | <,0001  |
| Membrana Lesada                      | 0,25       | 0,0091  |
| AcrossomaLesado                      | 0,19       | 0,042   |

Na Figura 2 foram selecionadas três características de qualidade espermática desejáveis para amostras criopreservadas como a motilidade progressiva, porcentagem de espermatozoides com membrana íntegra e acrossoma íntegro e a porcentagem de células com alto potencial mitocondrial para os grupos de idade estudados. Observa-se a redução nos parâmetros de qualidade em relação à faixa etária estudada.

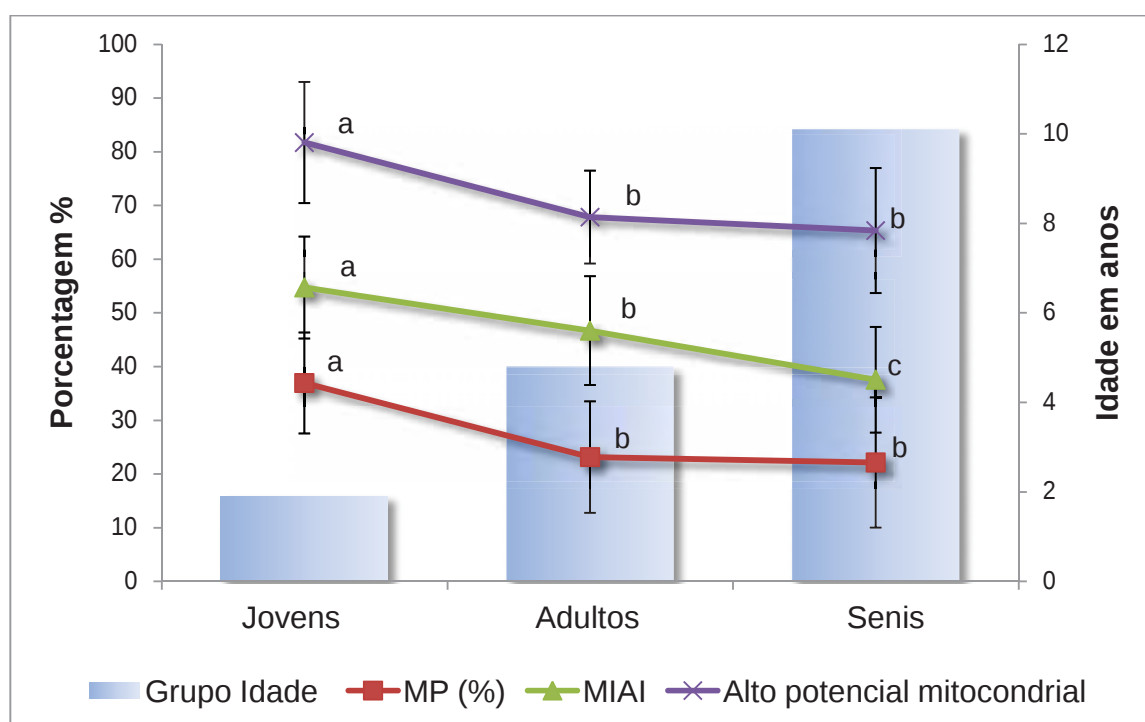


Figura 2. Representação gráfica da média da idade (jovens, adultos e senis) e das médias e desvio padrão da motilidade progressiva (MP), porcentagem de espermatozoides com membrana íntegra e acrossoma íntegro (MIAI) e alto potencial mitocondrial.

## Discussão

A avaliação da qualidade espermática em amostras criopreservadas de touros de diferentes idades apresentou valores satisfatórios com relação aos parâmetros físicos, segundo o Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (FONSECA et al., 1992). Estes resultados refletem as condições de obtenção das amostras utilizadas neste experimento, onde todos os animais são provenientes da mesma central de inseminação artificial, hígidos, possuem dieta controlada, fazendo parte da rotina de colheita da central.

Por outro lado, é possível supor que pequenas diferenças nos parâmetros seminais desses animais altamente selecionados sejam importantes. Neste trabalho o grupo de animais jovens apresentou valores superiores de motilidade, tanto avaliada subjetivamente quanto avaliada pelo CASA.

A literatura consultada apresenta resultados variados de motilidade para touros jovens, já que a maioria das pesquisas tem como objetivo avaliar mudanças ocorridas com o objetivo de determinar a puberdade, como também foram elaboradas em diferentes raças, *Bos taurus*, dificultando a comparação dentro das mesmas faixas etárias (AHMAD et al., 2005; BAHKAT et al., 2011; GARNER et al., 1996; JAVED et al., 2000).

BHAKAT et al. (2011) avaliaram touros *Bos indicus* de diferentes idades e não encontraram diferenças significativas quanto à motilidade. O mesmo resultado foi verificado em touros cruzados (*Bos indicus* x *Bos taurus* de aptidão leiteira) (AHMAD et al., 2011; MANDAL et al., 2010).

Com resultados semelhantes aos encontrados neste trabalho BRITO et al. (2002) associaram a diminuição da motilidade e do volume com o aumento da idade. Pesquisa realizada em touros *Bos taurus*, que foram criados em um mesmo sistema de manejo e divididos em grupos etários semelhantes a este estudo, também verificaram valores decrescentes de motilidade e atribuíram a redução ao envelhecimento e à drástica diminuição da produção de antioxidantes (KELSO et al., 1997).

Com relação à qualidade do movimento, as amostras estudadas apresentaram valores de velocidade linear progressiva (VSL) menores do que os de velocidade média da trajetória (VAP) e de velocidade curvilínea (VCL), indicando que os espermatozoides estudados possivelmente apresentavam grande movimento lateral da cabeça (VERSTEGEN et al. 2002). Valores maiores de VCL em relação ao VSL sugerem que as células espermáticas podem estar atingindo movimento de hiperativação (HALLAP et al. 2004).

Desta maneira, os valores obtidos de velocidade para os grupos adultos e senis podem não indicar uma melhor qualidade do movimento espermático, mas, que os que todos os grupos de idade apresentaram características de movimento provavelmente resultantes do processo de criopreservação.

Todos os grupos sofreram uma redução da motilidade e do vigor após o TTL e não houve diferenças com relação à porcentagem de acrossomas intactos. Entretanto, é importante observar que o PIA foi avaliado após o TTL, e não logo após a descongelação. Portanto, sugere-se que os grupos foram afetados pela incubação, uma vez que obtiveram resultados semelhantes para a integridade do acrossoma e houve redução da motilidade e do vigor.

A morfologia também se apresentou dentro dos limites aceitáveis (<30% para defeitos totais – FONSECA et al. 1992) No entanto, o grupo de touros jovens apresentou maior porcentagem de defeitos totais e de defeitos maiores, seguido pelo grupo de touros senis ( $P<0,05$ ). Estes resultados diferem dos obtidos por AHMAD et al. (2011) que não encontraram grandes diferenças quanto às alterações morfológicas em diferentes idades de touros. Já MARTI et al., (2011) observaram, em carneiros, espermatozoides morfométricamente maiores nos animais jovens.

Tradicionalmente a maturidade sexual é determinada pelo alcance de características da produção espermática, onde se observa um platô no volume e concentração, além do aumento da motilidade e redução drástica dos defeitos espermáticos (FRENEAU, 1991; GUIMARÃES, 1999). Desta maneira os touros jovens avaliados nesse experimento, apesar das maiores porcentagem de defeitos maiores e totais, se mostraram sexualmente maduros.

BRITO et al.,(2002) também notaram a redução da porcentagem de defeitos maiores e defeitos totais em animais com idade entre 24 a 36 meses, mas, como no presente estudo, as porcentagens de defeitos encontradas não superaram a recomendação do Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (FONSECA et al., 1998).

É possível supor que as diferenças entre os grupos para a porcentagem de defeitos espermáticos podem não ter sido suficientes para afetar a qualidade das amostras avaliadas, uma vez que os resultados da motilidade, vigor e da integridade das membranas do grupo de touros jovens foram bons.

As avaliações simultâneas da membrana e do acrossoma produziram dados importantes, mostrando que houve um declínio com a idade na porcentagem de espermatozoides com características desejáveis, ou seja, membrana íntegra e acrossoma íntegro.

A combinação de sondas fluorescentes possibilita a avaliação simultânea de diferentes estruturas espermáticas (ARRUDA et al., 2005), facilitando a avaliação mais ampla dos danos sofridos pela célula. A membrana dos espermatozoides é altamente vulnerável à criopreservação, observando-se, frequentemente, a queda significativa da viabilidade espermática em função do processamento (FREITAS-DELL'AQUA et al., 2009). Assim espermatozoides com membranas íntegras podem ser um indicativo de maior eficiência de sobrevivência à tecnologia envolvida na criopreservação.

Os danos sofridos durante o processamento do sêmen podem resultar na redução das células viáveis, iniciando na membrana plasmática, atingindo o acrossoma e as membranas mitocondriais (WATSON, 2000).

O agrupamento dos padrões de coloração da membrana plasmática e acrossomal facilitam a interpretação dos resultados (CELEGHINI, 2005; CARREIRA, 2008;). O agrupamento possibilita observar o aumento das porcentagens de espermatozoides com membrana lesada e acrossoma lesado no grupo de animais senis, quando comparado aos demais. Essas diferenças foram mais importantes para a porcentagem de acrossomas lesados, lembrando que o processo de criopreservação causa grandes lesões na estrutura celular e aumento significativo da produção de radicais livres (BANSAL et al., 2011).

O mesmo se reflete no potencial mitocondrial, uma vez que a porcentagem de células com alto potencial mitocondrial foi maior no grupo de touros jovens. TROIANO et al., (1998) observaram correlação significativa entre potencial mitocondrial e motilidade. Os valores para esse parâmetro estão em acordo com os resultados obtidos para a motilidade espermática, pois a energia necessária para o batimento flagelar é promovida pelas mitocôndrias (GRAVANCE et al., 2000).

Portanto, qualquer mudança na função mitocondrial pode ser refletida na alteração da motilidade espermática (GRAVANCE et al., 2000) podendo ser utilizada como medida indireta da motilidade,

As amostras avaliadas neste trabalho foram criopreservadas e descongeladas para análise. Sabe-se que o processo de criopreservação, onde baixas temperaturas e ambiente aeróbico causam danos a célula espermática, e gera um aumento da produção de radicais livres, além da redução da capacidade antioxidante. Esses danos ocorrem inicialmente na membrana plasmática e podem inviabilizar a célula espermática, conseqüentemente gerando maior produção de espécies reativas de oxigênio pela presença de espermatozoides mortos na amostra (UPRETI et al., 1998).

A sensibilidade da membrana a alterações da camada lipídica durante a criopreservação depende muito da sua composição (HAMMERSTEDT, 1993), em mamíferos, os ácidos graxos insaturados são predominantes, tornando as membranas suscetíveis à peroxidação (HALLIWELL & GUTTERRIDGE, 1984).

Para evitar esses danos um eficiente sistema antioxidante é necessário, porém, o próprio processo de criopreservação causa redução de até 78% na concentração de glutathione peroxidase e 50% da superóxido desmutase (importantes antioxidantes) no sêmen de touros após a congelação (BILODEAU et al., 2000). Ainda como agravante, verificou-se acentuada redução na produção e capacidade antioxidante de espermatozoides de animais mais velhos em bovinos (KELSO et al., 1997) e ratos (ROBAIRE, 2004; ZUBKOVA & ROBAIRE, 2004). Essas observações podem justificar os resultados obtidos nesse trabalho, pois o envelhecimento promove uma série de alterações, tais como fibrose testicular e calcificação dos túbulos seminíferos (CHACON et al., 1999), e talvez a mais significativa delas seria justamente a redução da

capacidade antioxidante não só do sistema reprodutivo, mas como do organismo como um todo (ZUBKOVA & ROBAIRE, 2004; WEIR & ROBAIRE, 2007).

Estas observações se confirmam quando a correlação dos parâmetros avaliados com a idade é considerada. Parâmetros desejáveis, que indicariam espermatozóides com boa qualidade, tais como alta motilidade progressiva e membranas e mitocôndrias integras e funcionais foram negativamente correlacionados com a idade apresentando valores de P altamente significativos ( $P < 0,001$ ), contrariamente aqueles que indicam baixa qualidade, como baixo potencial mitocondrial, membrana lesada e acrossoma lesado, que apresentaram correlação positiva com a idade.

Desta maneira a redução da qualidade espermática em amostras criopreservadas estaria relacionada ao envelhecimento do animal e uma possível redução da sua capacidade antioxidante, gerando danos as membranas plasmáticas, acrossomais e mitocondriais, com conseqüente reflexo na motilidade.

## **Conclusões**

Apesar das diferenças entre os grupos, os touros jovens, adultos e senis apresentaram qualidade espermática dentro dos padrões estabelecidos pelo CBRA após a criopreservação.

Os touros jovens apresentaram melhor qualidade espermática pós-descongelção para as variáveis estudadas, quando comparados aos demais grupos. Touros idosos têm a motilidade reduzida assim como menor integridade da membrana plasmática, acrossomal e menor potencial mitocondrial.

### **CAPITULO 3. ANÁLISES DA INTEGRIDADE DO DNA ESPERMÁTICO DE AMOSTRAS CRIOPRESERVADAS DE TOUROS NELORE JOVENS, ADULTOS E SENIS**

#### **Análises da Integridade do DNA Espermático de Amostras Criopreservadas de Touros Nelore Jovens, Adultos e Senis**

**RESUMO** – A integridade do DNA espermático pode ser afetada pela criopreservação e a idade. Os objetivos deste trabalho foram testar se a protaminação, os danos causados por radicais livres e a integridade da cromatina são diferentes em um grupo de touros Nelore jovens, adultos e senis. Três ejaculados, de 40 touros provenientes do mesmo centro de coleta e processamento do sêmen foram congelados de acordo com os padrões da centro. Os touros foram subdivididos em três faixas etárias: de 1,8 a 2 anos – Grupo Jovens, de 3,5 a 7 anos – Grupo Adultos, 8 a 14,3 anos – Grupo Senis. As amostras foram avaliadas quanto à protaminação espermática, danos de DNA causados por radicais livres, suscetibilidade à denaturação da cromatina, pelos testes “Sperm Chromatin Structure Assay” (SCSA) e laranja de acridina (AOT), e danos na cromatina pela técnica de TUNEL. Os touros jovens apresentaram maior porcentagem de deficiência de protaminação ( $P<0,05$ ) e houve correlação negativa com a idade. Os touros senis mostraram maior porcentagem de danos por oxidação ( $P<0,05$ ) e correlação positiva do parâmetro com a idade do touro. No teste SCSA, os touros jovens e idosos apresentaram maiores índices de danos na cromatina, diferindo dos adultos ( $P<0,05$ ). A técnica de TUNEL apresentou resultados divergentes, o grupo adulto apresentou maior porcentagem de danos quando avaliados pela citometria de fluxo, enquanto o grupo de animais senis obteve média maior na microscopia de epifluorescência ( $P<0,05$ ). Touros jovens e senis apresentam maior suscetibilidade aos danos de DNA. Nos animais jovens os danos foram causados pela deficiência de protamina e nos senis pelo ataque de radicais livres.

Palavras chave: Bovino, DNA espermático, idade, CMA3, 8-OHdG, SCSA.

## **Introdução**

Danos no DNA das células espermáticas têm sido associados a uma variedade de alterações importantes, incluindo a infertilidade, aumento da incidência de abortos e um risco aumentado de doenças na prole (AITKEN & De IULIIS, 2010).

As células germinativas masculinas parecem ser particularmente suscetíveis a mudanças mutagênicas e pro-mutagênicas. Esta variabilidade biológica é útil na criação da diversidade genética auxiliando o processo evolutivo, no entanto, também ajuda a criar mutações responsáveis por doenças, incluindo câncer e infertilidade. Os mecanismos mutagênicos envolvem erros de replicação que estão fortemente correlacionados com a idade paterna. A etiologia destas quebras de fita pode envolver recombinação aberrante, protaminação defeituosa, apoptose e estresse oxidativo (AITKEN & KRAUSZ, 2001).

A avaliação dos danos induzidos por espécies reativas de oxigênio no espermatozoide é importante, já que o mesmo é submetido a este estresse durante a maturação no trato reprodutivo masculino, se leucócitos estão presentes no ejaculado, durante a capacitação e durante o preparo de técnicas de reprodução assistida (ZUBKOVA et al., 2005).

Durante o processo de criopreservação o aumento dos radicais livres podem contribuir para os danos à cromatina (THOMSON et al,2009). A integridade do DNA de espermatozoides de mamíferos é de importância vital para a contribuição paterna de um descendente normal (SHIBAHARA et al., 2003), uma vez que danos de DNA podem resultar em morte celular, na indução de mutações que podem ser transportadas para a próxima geração ou ainda resultar em infertilidade do macho.

Este trabalho avaliou aspectos físicos e funcionais de espermatozoides e elegeu quatro procedimentos distintos para avaliar a integridade da cromatina em touros Nelore de diferentes faixas etárias como: a avaliação da protaminação espermática, utilizando a sonda fluorescente Cromomicina A3 (CMA3); o estudo da oxidação da guanina, com a formação de 8-Oxoguanina (8-OHdG), utilizando um anticorpo marcado com FITC, disponível no “kit” comercial OxyDNA® (Biotrin, Irlanda), o teste “Sperm

Chromatin Structure Assay” (SCSA), que avalia a suscetibilidade da cromatina a denaturação *in situ* e a porcentagem de células com danos na cromatina pelo uso da técnica de TUNEL.

## Material e métodos

### Seleção dos animais e preparo das amostras

Foi realizado um estudo casualizado onde animais hígidos *Bos indicus* da raça Nelore, mantidos em regime semi-extensivo de um mesmo centro de colheita e processamento do sêmen (latitude 21°04'52" e longitude 48°02'24") foram colhidos duas vezes por semana pelo método da vagina artificial, completando três colheitas por animal. O sêmen industrializado em palhetas foi acondicionado em raques e estocado em nitrogênio líquido aguardando posterior avaliação. Os 40 animais selecionados foram divididos em três grupos de acordo com a idade na ocasião da colheita: de 1,8 a 2 anos (Grupo Jovens), de 3,5 a 7 anos (Grupo Adultos) e de 8 a 14,3 anos (Grupo Senis) (tabela 1).

As avaliações da integridade da cromatina foram realizadas nas dependências da Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba – UNESP.

Tabela 1. Distribuição dos animais por grupo experimental determinado pela idade dos touros, média e desvio padrão das idades e idade máxima e mínima dos animais.

| Grupo   | n° partidas<br>(n° animais) | Idade (anos) |        |        |
|---------|-----------------------------|--------------|--------|--------|
|         |                             | Média        | Mínima | Máxima |
| Jovens  | 27 (9)                      | 1,9±0,1      | 1,8    | 2      |
| Adultos | 57 (19)                     | 4,8±1,0      | 3,5    | 7      |
| Senis   | 36 (12)                     | 10,1±2,0     | 8      | 14,3   |

Para as avaliações descritas a seguir, o sêmen congelado, acondicionado em palhetas de 250µL, foi descongelado em água a 35°C durante 20 segundos. As avaliações da integridade do DNA espermático nas diferentes idades foram realizadas primeiramente em microscopia de fluorescência e posteriormente pela citometria de fluxo. Os equipamentos utilizados foram o microscópio Olympus BX61 (Olympus, Tokyo, Japão), equipado com campo claro, contraste de fase, contraste de interferência diferencial (DIC) e epifluorescência, e o citômetro de fluxo de focalização acústica Attune® (Applied Biosystems by Life Technologies, Grand Island, EUA), equipado com lasers de 488nm e de 405nm, filtros de emissão BL1 530/30nm “bandpass” (BP), BL2575/24nm BP, BL3 640nm “longpass” (LP) e VL1 450/40nm BP, VL2522/30nm BP e VL3 603/48nm BP.

### **Avaliação da Protaminação – CMA3**

Para avaliação da protaminação foi utilizado o corante fluorescente CMA3 (Sigma, St. Louis, MO, E.U.A.) segundo o protocolo estabelecido por SIMÕES et al.(2009), o protocolo de coloração para citometria de fluxo foi desenvolvido segundo TAVALEE et al., (2010).

O protocolo para leitura em microscopia está sucintamente descrito a seguir. Amostras de sêmen foram descongeladas (água, 35°C/20 segundos) e centrifugadas com PBS a 500g durante cinco minutos. Os pellets ressuspensos em 100µL de PBS e 100µL de paraformaldeído a 4% foram incubados a 4°C por 15 minutos. Após lavagem com PBS, um esfregaço foi realizado com uma alíquota de 10µL e seco em temperatura ambiente por 2 horas. As lâminas secas foram submersas em 0,2% de Triton X a 4°C por 5 minutos, após este tempo, enxaguadas com PBS e incubadas com 0,25mg/mL de CMA3 em tampão Mc Ilvaine's (Anexo H) por 20 minutos. Nos últimos três minutos foi adicionado 3µL de Hoescht 33342 (Sigma, St. Louis, MO, E.U.A.). Para leitura, as lâminas foram lavadas com tampão Mc Ilvaine's, ainda úmidas foram cobertas com lamínula e levadas ao microscópio de fluorescência (microscópio Olympus BX61 –

Japão), contadas 200 células e todos os campos fotografados para coloração de Hoescht 33342 e CMA3, a fim de conferir a contagem de espermatozoides.

Para o controle foi utilizado o protocolo descrito por SIMÕES et al., (2009), onde as amostras de sêmen descongeladas foram centrifugadas em meio Mc Ilvaine's a 500g por cinco minutos, ressuspensas e incubadas por 15 minutos a 37°C em PBS contendo 5mM de ditioneitol (DTT) e triton X-100, para quebrar as pontes dissulfídicas entre as cadeias de protamina e permeabilizar a membrana plasmática. Após duas lavagens para remover a solução de detergente e o DTT, os espermatozoides foram fixados por 45 minutos em solução de Carnoy (três partes de metanol e uma parte de ácido acético). Para leitura foram realizados esfregaços cobertos com lamínula e lidos em microscópio de fluorescência (Olympus BX61 - Japão) em filtro com excitação de 460-570nm e emissão de 460-610nm.

Para análise por citometria de fluxo os espermatozoides foram diluídos em 200µL de tampão Mc Ilvaine's ( $2 \times 10^6$  espermatozoides), centrifugados a 500g por 5 minutos; após desprezar o sobrenadante, a amostra foi ressuspensa em 200µL de solução Carnoy (3 partes de metanol e 1 parte de ácido acético) e mantidas a 4°C por 5 minutos. Após lavar duas vezes com PBS as amostras foram incubadas por 60 minutos a temperatura ambiente com a solução de coloração de CMA<sub>3</sub> (0,25mg/mL de CMA<sub>3</sub> em tampão Mc Ilvaine's). Após 60 minutos, as amostras foram lavadas e ressuspensas em 1mL de PBS e lidas no citômetro de fluxo Attune® (Applied Biosystems by Life Technologies, Grand Island, EUA), equipado com laser de 488nm e filtro BL2 (575/24 nm), 10.000 eventos correspondentes a espermatozoides foram avaliados. O protocolo de indução para o controle positivo foi semelhante ao utilizado para microscopia, utilizando após a indução o protocolo de coloração descrito acima.

### **Danos de DNA causado por espécies de oxigênio reativo (EROs)– 8-OHdG**

Danos de DNA causados por oxidação foram detectados utilizando “kit” comercial que contém um anticorpo contra o 8-OHdG, que é uma base de DNA (Guanina) que se modificou após ação oxidativa de radicais livres. Neste procedimento o anticorpo está ligado ao FITC e pode ser detectado pela citometria de fluxo (SILVA, 2006). Para a avaliação da oxidação da guanina foi utilizado protocolo descrito por DeIULLIS et al. (2009) onde o sêmen de uma palheta descongelada de cada partida foi lavada com PBS (500g) e ressuspensa em 100µL de DTT (2mM) e incubadas a 37°C por 45 minutos. As amostras foram lavadas com PBS e foram adicionados 100µL de paraformaldeído 4% em 100µL de PBS, mantidas a 4°C por 15 minutos. Após a fixação e lavagem com PBS as células foram incubadas em 100µL de Triton X100 a temperatura ambiente por 15 minutos. Em seguida foram lavadas com a solução “Wash solution” contida no “kit” OXYDNA<sup>®</sup> (Biotrin, Irlanda), diluída em água destilada a 1:25. Em seguida as amostras foram incubadas durante 60 minutos à temperatura ambiente com uma solução contendo uma parte da solução de anticorpo anti-8-OHdG marcado com FITC diluída em nove partes da solução de lavagem. As amostras coradas foram lavadas e ressuspensas em 1mL de PBS.

Após o protocolo de coloração, a leitura foi realizada pela citometria de fluxo, onde 10.000 eventos correspondentes a espermatozoides foram excitados pelo laser de argônio de 488nm e lidas no filtro BL1 (530/30nm). O controle positivo foi realizado incubando uma amostra espermática em DDT por 45 minutos e, em seguida, acondicionada em peróxido de hidrogênio e sulfato ferroso por 60 minutos.

Para a análise em microscopia foi seguido o mesmo protocolo de coloração com a diferença que apenas três minutos antes do final do procedimento foi adicionado 1µL de Hoescht 33342. As imagens foram fotografadas com filtro azul (Hoeschst) e em seguida com verde (8-OHdG - FITC), foram contadas 200 células e classificadas de acordo com a intensidade da fluorescência verde emitida, sendo as mais intensas positivas e as menos intensas as negativas (Olympus BX61, 400X).

### **Integridade da cromatina – SCSA e Laranja de acridina (AOT)**

A análise da suscetibilidade da estrutura da cromatina à desnaturação ácida foi realizada pelas técnicas descritas por TEJADA et al. (1984) modificada por UNANIAN, (2000), utilizando o corante fluorescente laranja de acridina, um corante metacromático de DNA que permite a detecção da fragmentação do DNA em microscopia de fluorescência pela emissão da coloração verde quando o DNA está íntegro, e de laranja a vermelha quando o DNA está lesado. Paralelamente foi utilizado protocolo descrito por EVENSON et al. (2002), o “Sperm Chromatin Structure Assay” - SCSA. Esta metodologia envolve uso do corante laranja de acridina associado à leitura da amostra pelo citômetro de fluxo, com excitação do laser de argônio de 488nm e filtros de emissão BL1 530/30 (verde) e BL3 640 LP (vermelho). Após aquisição no citômetro, os dados de leitura devem ser analisados em software de análise específico, o Flowjo® (Tree Star, Inc., San Carlos, CA, U.S.A.). A porcentagem de células com DNA lesado é dado pela equação  $\% \text{ DFI} = \text{vermelho} / (\text{vermelho} + \text{verde})$ . Este índice seria altamente correlacionado com a fertilidade do animal testado.

Para coloração com laranja de acridina e avaliação em microscopia de fluorescência, alíquotas de 100µL de sêmen descongelado foram adicionadas a microtubos contendo 100µL de água destilada e centrifugado a 500g por 5 minutos. Este procedimento foi repetido adicionando 200µL de água destilada.

Em seguida, uma amostra de 30µL foi retirada do sedimento formado, para o preparo de pelo menos dois esfregaços que foram deixados secar à temperatura ambiente durante 60 minutos. Os esfregaços foram imersos em Solução de Carnoy (3 partes de metanol para 1 parte de ácido acético) para a fixação por 12 horas. As lâminas foram secas à temperatura ambiente e posteriormente cobertas com 3mL da solução de acridina laranja (10mL da solução de solução de acridina laranja 1µg/mL com 40mL de solução de ácido cítrico 0,1M com 2,5mL de solução de fosfato dissódico 0,3M; pH 2-3 – anexo I), de modo a permanecerem coradas por 5 minutos em ambiente escuro. Os esfregaços foram lavados cuidadosamente em água destilada e antes de secarem, foram cobertas por lamínulas (24 x 40 mm). As lâminas foram

examinadas em microscópio de epifluorescência (400x, microscópio Olympus BX61 - Japão) em filtro com excitação de 460-570nm e emissão de 460-610nm. Para cada esfregaço foram contadas 200 células e classificadas de acordo com TEJADA et al, (1984), sendo que as células que emitiram fluorescência verde foram consideradas normais, ou seja, com cromatina íntegra, enquanto, as células que emitiram fluorescência vermelha, laranja, amarela distribuídas de forma regular ou irregular no interior da cabeça foram considerados anormais, indicando desnaturação total ou parcial da cromatina.

Para realização do protocolo da técnica SCSA, a concentração foi ajustada a  $2 \times 10^6$  sptz/mL em PBS para um volume final de 200µL e posteriormente adicionado 400µL de solução detergente ácida (0,08M HCl, 15M NaCl, e 0,1% de Triton X, pH 1,2). Após 30 segundos exatos adicionou-se a solução de AO (6µg de AO por mL de tampão – 0,037M ácido cítrico, 0,126M de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1,1M de EDTA e 0,15M de NaCl, pH 6,0). As amostras foram lidas no máximo três minutos após a adição do detergente ácido e 10.000 eventos foram adquiridos no “gate” correspondente aos espermatozoides. As avaliações foram posteriormente realizadas no programa Flowjo® (Tree Star, Inc., San Carlos, CA, U.S.A.) e foram considerados para a análise a porcentagem total de espermatozoides com danos a cromatina (% DFI).

O controle positivo foi realizado incubando uma amostra espermática em DDT por 45 minutos e em seguida em peróxido de hidrogênio e sulfato ferroso por 60 minutos.

### **Integridade da cromatina – TUNEL**

A presença de terminações de DNA 3'-OH livres foi acessada utilizando a técnica de TUNEL associada à microscopia de fluorescência e a citometria de fluxo, utilizando o “*In Situ* Cell Death detection kit, fluorescein” (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemanha). Para a microscopia foi utilizado o protocolo descrito por VAGNINI et al. (2007) com pequenas adaptações (MITCHELL et al., 2010).

Alíquotas de 100µL de sêmen descongelado foram adicionadas a microtubos contendo 100µL de água destilada e centrifugado a 500g por 5 minutos. Então, as alíquotas foram incubadas com 200µL de DTT (2mM) em PBS por 45 minutos em temperatura ambiente. Ao fim desse procedimento foram lavadas duas vezes, adicionando 200µL de PBS.

Em seguida, uma amostra de 30µL foi retirada do sedimento formado, para o preparo de pelo menos dois esfregaços que foram deixados secar à temperatura ambiente durante 60 minutos. As lâminas foram fixadas em solução de PBS com paraformaldeído a 4% durante 25 minutos e permeabilizadas em seguida, com 0,1% de triton X-100 em 0,1% de citrato de sódio, a 4°C, por 2 minutos.

Após a lavagem com PBS, as lâminas foram processadas para a técnica de TUNEL. A mistura de reação ("Label solution e Enzyme solution") foi adicionada em cada lâmina e incubadas a 37°C por 2 horas em atmosfera úmida, ao final da incubação as lâminas foram lavadas com PBS e 3µL de Hoescht 33342 foram adicionados (Sigma, St. Louis, MO, E.U.A.). Para leitura, as lâminas foram lavadas com PBS, ainda úmidas foram cobertas com lamínula e levadas ao microscópio de fluorescência (microscópio Olympus BX61 – Japão), foram contadas 200 células e todos os campos fotografados para coloração de Hoescht 33342 e TUNEL, a fim de conferir a contagem de espermatozoides. O controle positivo foi obtido pré-tratando as células com deoxiribonuclease I (100U/mL) por 20 minutos a temperatura ambiente. O controle negativo consistirá de espermatozoides incubados na solução de coloração sem a presença da enzima TdT.

Para a citometria de fluxo o procedimento adotado seguiu o protocolo descrito por FATEHI et al., (2007) com algumas adaptações (MITCHELL et al., 2010), onde os espermatozoides foram lavados com PBS e a concentração ajustada para  $2 \times 10^6$  spz/mL em PBS em 200µL. Antes do início do protocolo as alíquotas foram incubadas com 200µL de DTT (2mM) em PBS por 45 minutos em temperatura ambiente. As amostras foram lavadas (200µL de PBS, 500g/5 minutos) e fixadas (15 minutos, 4°C) em 100µL de solução de paraformaldeído 4% em PBS.

Depois de fixadas, foram lavadas duas vezes (200µL de PBS, 500g/5 minutos) e ressuspendidas em solução de permeabilização (0,5% Triton X-100 e 0,1% de citrato de sódio em PBS) por 30 minutos em temperatura ambiente. O controle positivo foi ressuspendido em 2UI de DNase I e incubado por 10 minutos a 37°C. O restante das amostras recebeu 25µL da mistura de reação de TUNEL ("Label Solution e Enzyme Solution") e o controle negativo 25µL da "Label Solution" apenas.

As amostras foram incubadas por 60 minutos a 37°C no escuro e após este período, lavadas duas vezes em PBS.

Ao fim protocolo de coloração, foi realizada a leitura por citometria de fluxo, onde 10000 eventos correspondentes a espermatozoides foram excitados pelo laser de argônio de 488nm e lidas no filtro BL1 (530/30nm).

### **Análise estatística**

Foi definida como hipótese nula ( $H_0$ ) a ausência de diferenças entre a integridade do DNA e o tipo de alteração na cromatina de espermatozoides criopreservados em touros de diferentes faixas etárias.

A análise estatística foi realizada utilizando o SAS –“Statistical Analysis System software” (release 9.2. SAS Institute Inc., Cary, NC, USA, 2008). Os dados em porcentagem foram transformados em  $\arcseno\sqrt{\%}$  para obter a distribuição normal. Os resultados foram examinados utilizando “two-way” ANOVA (touro x grupo). As medias foram comparadas pelo teste de Duncan e consideradas significativas quando  $P < 0,05$ . O coeficiente de correlação ( $r$ ), de determinação ( $r^2$ ) e a equação da regressão foram calculados para variáveis selecionadas (ZAR, 1999).

## Resultados

A Tabela 2 representa as avaliações da integridade da cromatina por microscopia de fluorescência. Na avaliação da protaminação com a CMA3 em microscopia de fluorescência, a porcentagem de espermatozoides com coloração positiva no grupo de touros jovens foi maior quando comparada aos grupos de touros adultos e senis.

Já a média da porcentagem de espermatozoides com danos causados por radicais livres pela avaliação da oxidação da guanina (8-OHdG) foi maior ( $P<0,05$ ) para o grupo de touros senis quando comparada com os grupos jovens e adultos.

No teste de Laranja de Acridina, que avalia a susceptibilidade da cromatina à desnaturação ácida, não houve diferença entre os grupos ( $P>0,05$ ).

Porém, a avaliação dos danos da cromatina (TUNEL) indicou que os grupos Jovens e Adultos apresentaram valores inferiores aos touros Senis ( $P>0,05$ ).

Tabela 2. Média e desvio padrão das porcentagens de espermatozoides com alterações na cromatina nas técnicas de CMA3, 8-OHdG, AO e TUNEL, avaliados por microscopia de fluorescência para os grupos de touros Jovens ( $n=27$ ), Adultos ( $n=59$ ) e Senis ( $n=36$ ).

| Grupo          | CMA3            | 8-OHdG          | AO            | TUNEL           |
|----------------|-----------------|-----------------|---------------|-----------------|
| <b>Jovens</b>  | $0,96\pm0,86^a$ | $2,13\pm0,61^b$ | $0,44\pm0,59$ | $7,06\pm5,23^b$ |
| <b>Adultos</b> | $0,51\pm0,48^b$ | $2,42\pm1,33^b$ | $0,17\pm0,20$ | $7,20\pm3,46^b$ |
| <b>Senis</b>   | $0,60\pm0,49^b$ | $4,73\pm1,58^a$ | $0,46\pm0,57$ | $9,10\pm3,15^a$ |

<sup>a,b</sup> Médias seguidas de letras distintas na coluna diferem entre si pelo teste de Duncan ( $P<0,05$ ).

As fotomicrografias apresentadas na Figura 1 A se referem à técnica de coloração com CMA3, B “kit “OxyDNA<sup>®</sup> (8-OHdG), C técnica de TUNEL e na Figura 2 técnica do AOT.

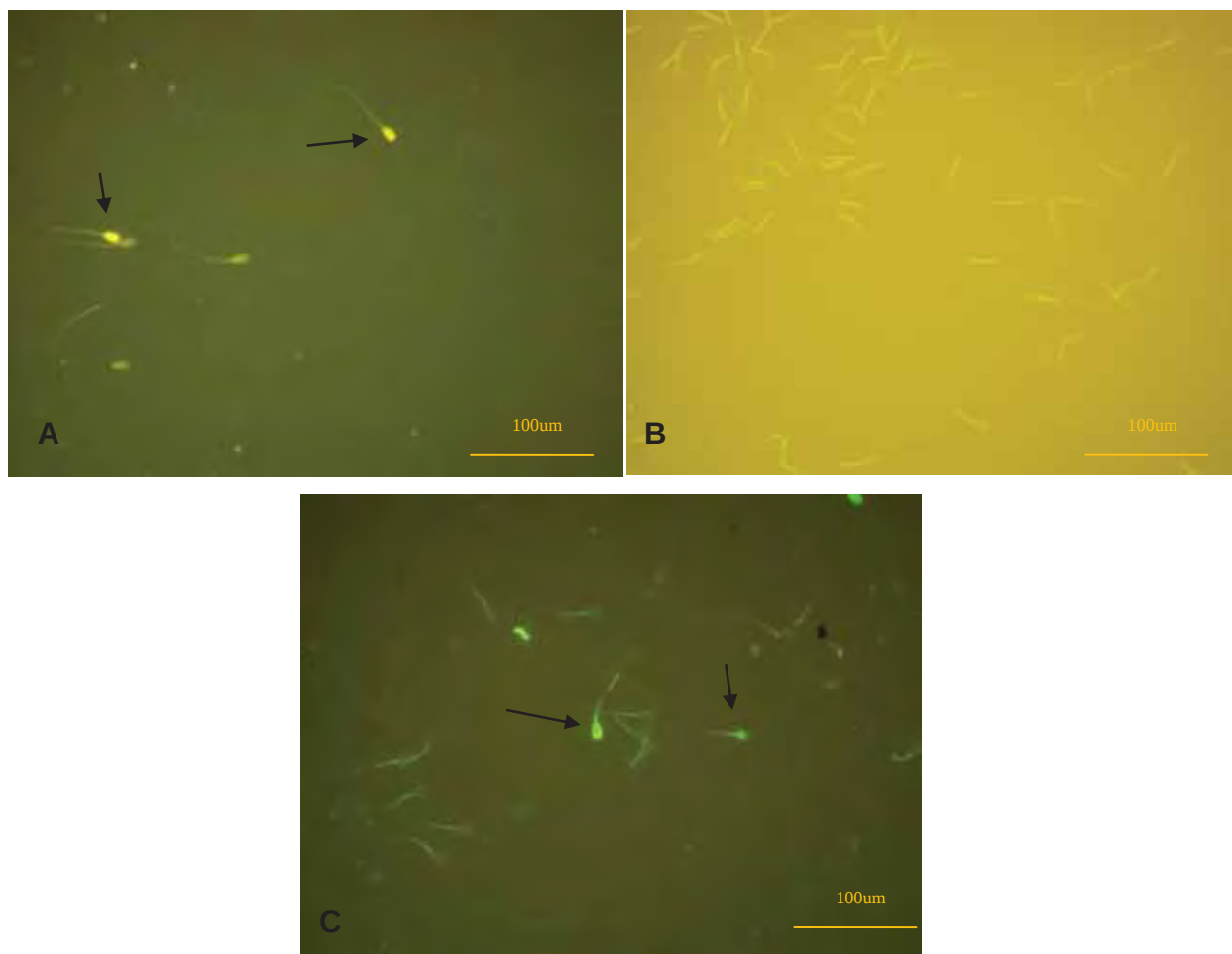


Figura 1. Fotomicrográfas digitais de espermatozoides corados. A) com CMA3. Nota-se (setas) a presença de dois espermatozoides positivos para CMA3 (protaminação deficiente); B) OxyDNA, espermatozoides sem danos por oxidação da cromatina; C) técnica de TUNEL, espermatozoides com cromatina danificada (setas - TUNEL positivo) (Olympus BX61, microscopia de fluorescência, 400x).

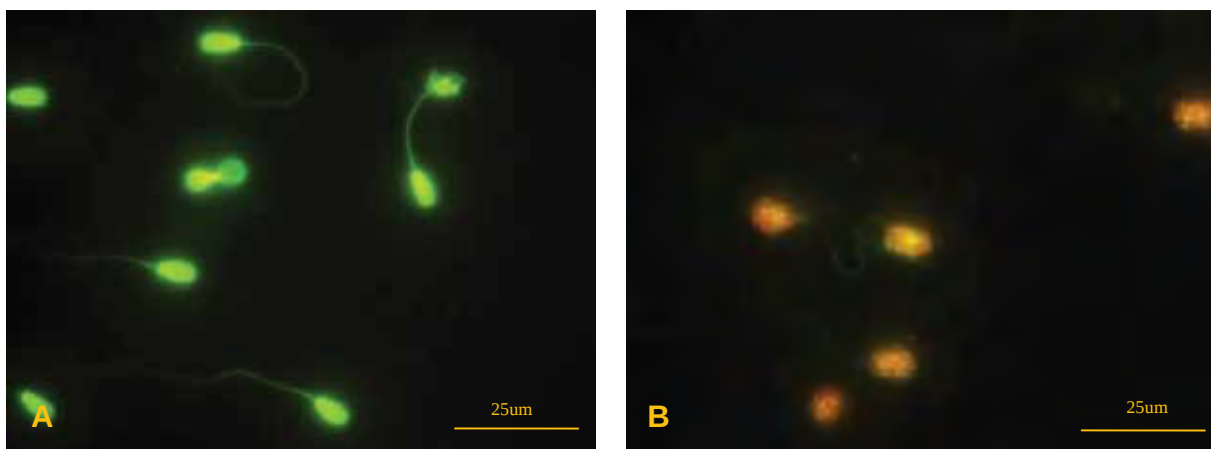


Figura 2. Fotomicrografia digital de amostra de sêmen descongelado e corado com laranja de acridina, A) células com cromatina íntegra; B) Amostra controle, cromatina lesada por indução (DTT, Triton X-100,  $\text{FeSO}_4$  e  $\text{H}_2\text{O}_2$ ) (Olympus BX61, microscopia de fluorescência, 400x).

Os resultados das avaliações da integridade da cromatina pela citometria de fluxo estão apresentados na Tabela 3. Na avaliação da protaminação espermática, os touros jovens apresentaram uma maior porcentagem de espermatozoides corados com CMA3, em comparação aos grupos adultos e senis ( $P < 0,05$ ).

No entanto, quando os danos de DNA associados à oxidação e formação de bases modificadas (8-OHdG) foram avaliados, os resultados para os touros jovens, seguidos pelos adultos e senis foram crescentes ( $P < 0,05$ ).

Na técnica pelo SCSA, a porcentagem do índice de fragmentação total (%DFI), que pode ser entendida como a porcentagem de espermatozoides suscetíveis a desnaturação ácida, foi maior para os animais jovens e senis, e menor para o grupo de touros adultos ( $P<0,05$ ). Entretanto, pela técnica de TUNEL, que avaliou a presença de quebras da fita de DNA, os animais jovens e adultos apresentaram médias superiores aos senis. Para facilitar a visualização dos resultados obtidos pela citometria de fluxo, as médias e desvios para os parâmetros 8-OHdG, CMA<sub>3</sub> e SCSA foram representados na Figura 3.

Tabela 3. Média e desvio padrão das porcentagens de espermatozoides com alterações na cromatina pelas técnicas de CMA3, 8-OHdG, SCSA e TUNEL, avaliados por citometria de fluxo para os grupos de touros Jovens (n=27), Adultos (n=59) e Senis (n=36).

| Grupo          | CMA3                   | 8-OHdG                   | SCSA<br>(%DFI total)   | TUNEL                  |
|----------------|------------------------|--------------------------|------------------------|------------------------|
| <b>Jovens</b>  | 1,57±0,76 <sup>a</sup> | 25,69±6,29 <sup>c</sup>  | 3,55±0,61 <sup>a</sup> | 0,83±0,49 <sup>a</sup> |
| <b>Adultos</b> | 1,09±0,63 <sup>b</sup> | 34,89±9,20 <sup>b</sup>  | 2,13±0,78 <sup>c</sup> | 1,23±1,20 <sup>a</sup> |
| <b>Senis</b>   | 0,90±0,59 <sup>b</sup> | 44,11±11,00 <sup>a</sup> | 3,09±0,96 <sup>b</sup> | 0,50±0,32 <sup>b</sup> |

<sup>a,b</sup>Médias seguidas de letras distintas na coluna diferem entre si pelo teste de Duncan ( $P<0,05$ ).

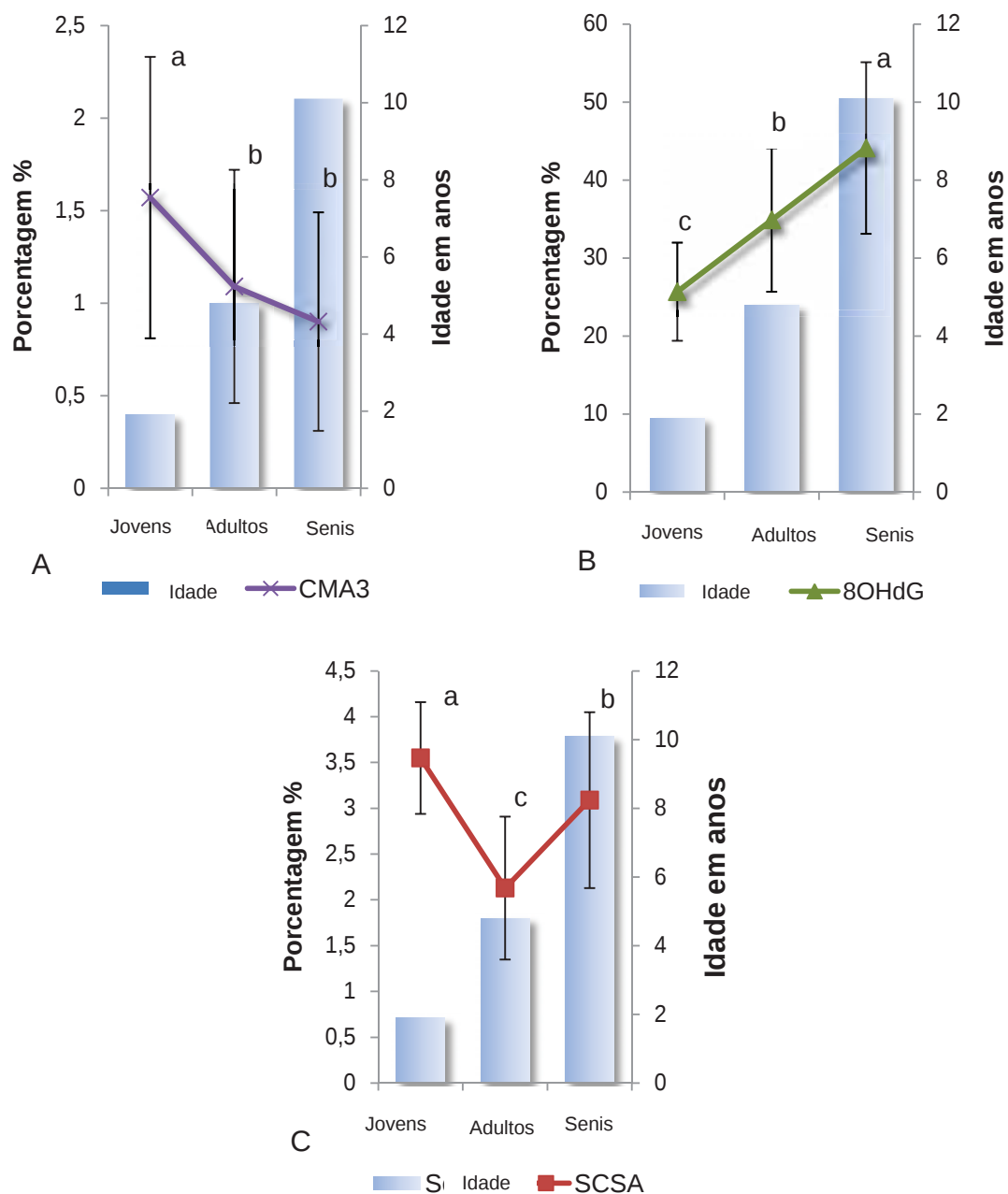


Figura 3. Representação gráfica dos grupos de idade (gráfico de colunas e eixo secundário) e da porcentagem e desvio padrão de células espermáticas positivas para CMA3 (A), 8-OHdG (B), SCSA (C) avaliadas por citometria de fluxo.

A Figura 4 ilustra os gráficos obtidos pela citometria de fluxo para a coloração com a CMA<sub>3</sub> e analisados pelo programa Attune® (Applied Biosystems by Life Technologies, Grand Island, E.U.A.).

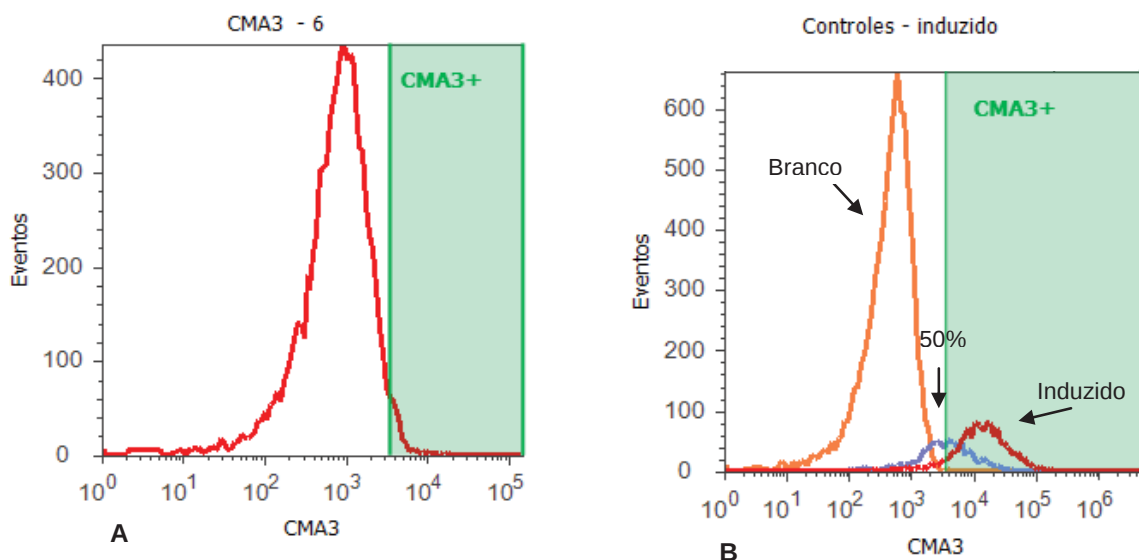


Figura 4. Histogramas referentes à avaliação da porcentagem de eventos positivos para CMA3, na área em verde e indicada como CMA3+ encontram-se os espermatozoides com protaminação deficiente. A) amostra de touro do grupo Jovens; B) controle negativo (amostra "Branca" – linha laranja), o controle positivo - desprotaminação induzida (linha vermelha), e a mistura 1:1 das amostras branco e induzida (linha azul) (Attune® Software – Applied Biosystems by Life Technologies, Grand Island, EUA).

A Figura 5 ilustra a composição da amostra controle para o SCSA e de uma amostra avaliada do grupo de touros jovens analisadas pelo programa Flowjo® (Tree Star, Inc., San Carlos, CA, U.S.A.).

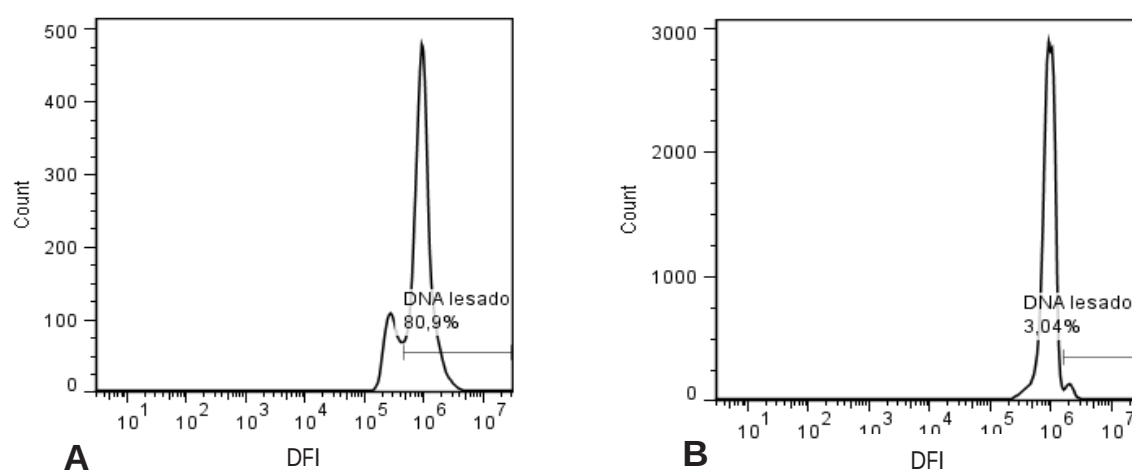


Figura 5. Representação gráfica dos histogramas, para a porcentagem de DFI (%DFI). A) amostra controle com a quebra da fita dupla induzida (DTT, Triton X-100 e incubação em FeSO<sub>4</sub>+H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>); B) amostra do grupo Jovens (Flowjo® - Tree Star, Inc., San Carlos, CA, U.S.A.).

Na Tabela 4 observam-se os coeficientes de correlação entre as variáveis avaliadas e a idade dos touros, o CMA3 e o TUNEL apresentaram um coeficiente de correlação negativo significativo e o 8-OHdG um coeficiente positivo significativo. O coeficiente de correlação negativo do SCSA com relação à idade não foi significativo ( $P>0,05$ ).

Tabela 4. Coeficiente de correlação e valor de P das variáveis CMA3, 8-OHdG, SCSA e TUNEL em relação a idade dos touros avaliados.

| Variável         | Correlação | P       |
|------------------|------------|---------|
| CMA <sub>3</sub> | -0,33      | >0,0001 |
| 8-OHdG           | 0,63       | >0,0001 |
| SCSA             | -0,14      | 0,1401  |
| TUNEL            | -0,20      | 0,0383  |

## Discussão

A fertilização do oócito por um espermatozoide contendo alterações de DNA pode gerar um grave impacto negativo no desenvolvimento embrionário, na saúde do feto (EVENSON & JOST, 2000) como também transmitir mutações que afetariam a fertilidade da geração futura (AITKEN & KRAUSZ, 2001). Assim, a integridade da cromatina é de vital importância à contribuição paterna na produção de um feto saudável.

Neste trabalho, foram obtidos dados inéditos com relação aos tipos de alterações na cromatina que podem afetar a viabilidade espermática de touros jovens, adultos e senis. Estes danos podem ser causados basicamente pela apoptose durante o processo de espermatogênese, por quebras durante o remodelamento da cromatina e ainda por fragmentação induzida por espécies reativas de oxigênio (TAVALAEE et al., 2009; SAKKAS & ALVAREZ, 2010).

Aanimais jovens apresentaram maiores porcentagens de espermatozoides com protaminação deficiente, ou seja, positivos para a coloração com CMA<sub>3</sub>, tanto na microscopia, como na citometria de fluxo. Em humanos as falhas de protaminação podem ser causadas pelo estresse, uso de drogas, fumo e hábitos de vida (AGARWAL et al., 2005). Em touros geneticamente selecionados, em um mesmo ambiente de centros de coleta e processamento do sêmen, estes não sofreriam a exposição aos agentes que afetam humanos (SIMÕES et al., 2009).

Porém, vale lembrar que as técnicas de reprodução assistida envolvem a manipulação de gametas justamente durante períodos críticos de reprogramação e modificações epigenéticas, que incluem a metilação do DNA e a modificação das histonas (PIEDRAHITA, 2011).

ZUBKOVA et al (2005) avaliaram os índices de protaminação em ratos jovens e idosos, e verificaram que os animais jovens possuíam maior porcentagem espermatozoides positivos na coloração com CMA<sub>3</sub> quando comparados aos idosos.

A retenção de histonas pode ser um indicativo de imaturidade espermática, assim, como a protaminação deficiente também está ligada a falhas durante o empacotamento da cromatina (OVARI et al., 2010). Essas observações corroboram com a correlação negativa entre a idade e a porcentagem de espermatozóides com protaminação deficiente encontrada neste estudo. A escassez de trabalhos publicados utilizando a coloração com CMA3 em bovinos, dificulta a interpretação dos resultados, que foram sempre bem inferiores aos valores encontrados em humanos (SIMÕES et al., 2009; CARREIRA et al., 2010a; CARREIRA et al., 2010b)

A condensação do DNA espermático protege o material genético e ao mesmo tempo define forma e tamanho desta célula especializada (BALHORN, 2011; SHARMA & AGARWAL, 2011) Desta maneira, é possível supor que alterações na morfologia da cabeça possam ter relação com o grau de compactação da cromatina (ZINI et al., 2009).

MARTI et al., (2011), avaliaram morfometricamente a cabeça dos espermatozoides de ovinos jovens logo após atingirem a maturidade sexual e notaram que eles possuíam um tamanho maior do que os animais adultos, indicando que pode haver um período de transição após a puberdade, para que a maturidade completa seja alcançada.

Chen et al, (2008) notaram que casais constituídos por mulheres adultas e homens jovens (com menos de 20 anos) apresentavam mais riscos de alterações no nascimento, associados a supostas alterações na placentação (CHEN et al., 2008). Essas alterações placentárias teriam sido causadas por mudanças em genes de "imprint" paterno, deleções em cromossomos ou mutações em regiões de expressão gênica (MIOZZO et al., 2002), que podem ser encontradas em espermatozoides com cromatina danificada ou pouco compactada (AITKEN & KRAUSZ, 2001).

Quanto aos resultados da avaliação da oxidação da guanina, pela detecção da 8-OHdG, houve correlação positiva com a idade do touro, sugerindo que animais mais velhos foram mais afetados. Os danos à cromatina acontecem principalmente pela ação do radical hidroxila que tem preferência pela ligação à guanina. Esta ligação indesejável modifica a base e pode gerar mutações (COMHAIRE et al., 2000).

SILVA et al. (2007) obtiveram valores de 8-OHdG em amostras de sêmen bovino semelhantes aos observados nesse trabalho, mas ainda desafiaram as amostras com diferentes concentrações de peróxido de hidrogênio, afetando a produção de embriões, mas não a porcentagem de células com a guanina oxidada.

O envelhecimento afeta todo o organismo e a baixa produção de antioxidantes somada ao aumento da produção de espécies reativas de oxigênio fazem parte desse processo (WEIR & ROBAIRE, 2004). Em ratos idosos, a redução da capacidade da produção de antioxidantes foi observada tanto no trato reprodutivo (WEIR & ROBAIRE, 2004; ZUBKOVA et al, 2004) como no fígado (ZUBKOVA et al., 2004).

Em bovinos tanto as consequências da criopreservação (BILODEAUET et al., 2000) como o envelhecimento (KELSO et al., 1997), podem reduzir drasticamente o nível de antioxidantes no sêmen. Por hipótese, no presente estudo tanto os efeitos da idade como da criopreservação, favoreceram os danos por oxidação.

Nas últimas décadas diversas ferramentas foram desenvolvidas para acessar a integridade do DNA, dentre elas o SCSA, que se mostrou importante para avaliação complementar do sêmen de bovinos (JANUSKAUSKAS et al., 2000).

O SCSA somente avalia a sensibilidade à denaturação ácida (EVENSON & JOST, 2000), portanto não distingue ou determina a causa do dano, apenas a consequência (fragilidade na cromatina). Essa característica pode ser observada neste trabalho, com o aumento na porcentagem de espermatozóides com danos à cromatina para os grupos jovens e senis, que são respectivamente o reflexo dos danos de protaminação e da oxidação da guanina.

O teste de laranja de acridina (AOT), que avaliou a suscetibilidade à denaturação ácida por microscopia de fluorescência, produziu resultados diferentes dos obtidos pelo SCSA. A leitura em microscopia de fluorescência do AOT pode ser afetada por problemas tais como: a subjetividade da leitura, o rápido desbotamento da fluorescência e a heterogeneidade da coloração na lâmina, As dificuldades encontradas teriam levado ao desenvolvimento da técnica de SCSA, que é similar ao AOT, mas, eliminam a subjetividade e aumentando drasticamente a contagem de células (EVENSON et al., 1999).

A técnica de SCSA foi padronizada há 30 anos (EVENSON, 2011) e não possui grandes variações metodológicas. Ao contrario da técnica de TUNEL, que neste experimento produziu resultados muito divergentes.

As duas técnicas abordam por metodologias e interpretações diferenciadas da integridade da cromatina. O SCSA detecta danos potenciais, ou seja, aponta regiões de fragilidade à quebra após a denaturação por tratamento ácido, já o TUNEL avalia danos existentes, pela detecção das terminações 3'OH livres (HENKEL et al., 2010).

A falta de padronização, variação e dificuldade dos protocolos da técnica de TUNEL já foram relatadas anteriormente (MURATORI et al., 2008; SHARMA et al., 2010).

Com base nos resultados e na grande dificuldade encontrada durante a padronização da técnica de TUNEL neste trabalho, é possível supor que os resultados obtidos tanto na microscopia quanto na citometria de fluxo podem não refletir os valores reais, dificultando a interpretação desses dados.

Atualmente nenhum dos testes de avaliação da integridade da cromatina é capaz de determinar consequencia clínica dos danos observados (SHARMA et al., 2010). Em bovinos estes estudos ainda necessitam de investimento em pesquisa básica, já que os resultados são variados e falta padronização das técnicas.

Neste trabalho observa-se que os danos na cromatina podem ter diferentes origens em touros jovens e senis e que apesar do pouco substrato para fundamentar as discussões, os resultados são interessantes e sinalizam para necessidade de investigações futuras.

## Conclusões

Com base nos objetivos delimitados e nos resultados obtidos, conclui-se que:

-Animais jovens e senis apresentam maior susceptibilidade da cromatina à desnaturação ácida, e que esta fragilidade é consequência de processos distintos de danos ao DNA.

- Nos touros jovens estes danos são consequência de protaminação deficiente, possivelmente decorrente da imaturidade reprodutiva.

- Nos animais idosos são causados pelo ataque de radicais livres à guanina em consequência do envelhecimento e desbalanceamento entre a produção de radicais livres e antioxidantes.

- Apesar das diferenças encontradas entre os grupos, não é possível afirmar que estes danos possam afetar a fertilidade das amostras, pois não existem valores de referência estabelecidos para a espécie.

## **CAPITULO 4. IMPLICAÇÕES**

Com relação às técnicas utilizadas, não há dúvidas quanto aos benefícios do uso da citometria de fluxo associada ao emprego de corantes fluorescentes para a avaliação espermática, porém a padronização dos testes é a etapa mais importante de todo o experimento. Técnicas com padronização mais difícil, como o TUNEL, demandam tempo e experiência, e muitas vezes não resultam em dados satisfatórios. Outras técnicas são de fácil execução (SCSA) e possuem protocolos muito bem estabelecidos e padronizados, portanto, devem ser escolhidas por usuários com pouca experiência em citometria de fluxo.

Este trabalho abre um leque de questionamentos, principalmente, de quão pouco sabemos sobre todo processo de maturidade sexual e principalmente sobre as particularidades da compactação e proteção do DNA espermático.

Os resultados obtidos indicam que touros jovens apresentaram maiores porcentagens de danos na cromatina por deficiências na protaminação podendo estar associado à maturidade sexual, uma vez que os valores decaem para touros adultos e senis. No entanto, ainda não se sabe qual o limite destas porcentagens de danos que causariam impacto à fertilidade.

Estes resultados são ainda mais intrigantes quando se considera que, durante o trânsito epididimário o espermatozoide adquire condição de apresentar motilidade no futuro, sendo esta etapa, a mesma onde ele termina sua condensação e empacotamento por protaminas. Portanto, podemos imaginar que existem muitos fatores associados à maturidade reprodutiva que ainda permanecem desconhecidos. Provavelmente, com a idade adulta, a capacidade de empacotamento se torna mais eficiente, como consequência do amadurecimento do processo de espermatogênese e do alcance de uma plena maturidade sexual.

De qualquer maneira, até que a fase de maturidade sexual de touros Nelore seja completamente compreendida, vale observar cautelosamente os animais precocemente introduzidos nas CCPS, uma vez que podem apresentar amostras de

sêmen satisfatórias quanto aos parâmetros tradicionais de avaliação, como observado no Capítulo 2, mas ocultar danos estruturais da cromatina.

Estudos futuros são necessários para o entendimento das particularidades da protaminação em bovinos, que possam trazer respostas para a fragilidade observada em outras espécies.

Por outro lado, os danos de DNA causados por radicais livres podem ocorrer por diversos fatores. Nos animais mais velhos se deve a redução da produção de antioxidantes e ao envelhecimento dos tecidos dos túbulos seminíferos e epidídimo.

Desta forma, um aprofundamento de investigação deve ser feita, envolvendo os dois grupos extremos de idade, buscando entender o processo de protaminação e de proteção antioxidante ao DNA e para depois estabelecer valores que possivelmente poderiam afetar a fertilidade de uma amostra.

## BIBLIOGRAFIA

AGARWAL, A., ALLAMANENI, S.S.R. Sperm DNA damage assessment: a test whose time has come. **Fertility and Sterility**, v. 84, p. 850 – 853, 2005.

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

AHMAD, E.; AHMAD, N.; NASEER, Z.; ALEEM, M.; KHAN, M.S.; ASHIQ, M.; YOUNIS, M. Relationship of age to body weight, scrotal circumference, testicular ultrasonograms, and semen quality in Sahiwal bulls. **Tropical Animal Health and Production**, v. 43, p.159–164, 2011.

AHMADI, A.; NG, S. Fertilizing ability of DNA-damaged spermatozoa. **The Journal of Experimental Zoology**, v. 284, p.696-704, 1999.

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

AITKEN, R.J.; DE IULIIS, G.N. On the possible origins of DNA damage in human spermatozoa. **Molecular Human Reproduction**, v. 16, p. 3–13, 2010.

AITKEN, R.J.; DE IULIIS, G.N. Role of Oxidative Stress in the Etiology of Sperm DNA Damage. ZINI, A. & AGARWAL, A. (editores) **Sperm Chromatin: Biological and Clinical Applications in Male Infertility and Assisted Reproduction**. 1<sup>a</sup> ed., USA: Springer, 2011. Cap. 19, p. 277-294.

AITKEN, R.J.; DeIULIIS, G.N. On the possible origins of DNA damage in human spermatozoa. **Molecular Human Reproduction**, v.16, p.3-13, 2010.

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

AL NAIB, A.; HANRAHAN, J.P.; LONERGAN, P.; FAIR, S. In vitro assessment of sperm from bulls of high and low field fertility. **Theriogenology**, v.76, p.161-167, 2011.

ALVAREZ, J.G. Replay to: The predictive value of sperm chromatin assay. **Human reproduction**. v. 20, p. 2365-2367, 2005.

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

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

ANDRABI, S.M.H. Mammalian sperm chromatin structure and assessment of DNA fragmentation. **Journal of Assisted Reproduction Genetics**, v. 24, p.561–569, 2007.

ANGELOPOULOU, R.; PLASTIRA, K.; MSAOUEL, P. Spermatozoal sensitive biomarkers to defective protaminosis and fragmented DNA. **Reproductive Biology and endocrinology**, v. 5, p. 36-51, 2007.

ANZAR, M.; HE, L.; BUHR, M.M.; KROETSCH, T.G.; PAULS, K.P. Sperm Apoptosis in Fresh and Cryopreserved Bull Semen Detected by Flow Cytometry and Its Relationship with Fertility. **Biology of Reproduction**, v.66, p.354–360, 2002.

AOKI, T. W.; EMERY, B.R. ; LIU, L.; CARRELL, D.T. Protamine Levels Vary Between Individual Sperm Cells of Infertile Human Males and Correlate With Viability and DNA Integrity. **Journal of Andrology**, v.27, p. 290-298, 2006.

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

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

BALHORN, R. A model for the structure of chromatin structure in mammalian sperm. **Journal of Cell Biology**, v.93, p. 298-305, 1982.

BALHORN, R. Sperm Chromatin: an overview. In: ZINI, A. & AGARWAL, A. (editores) **Sperm Chromatin: Biological and Clinical Applications in Male Infertility and Assisted Reproduction**. 1ª ed., USA: Springer, 2011. Cap. 1, p. 3-18.

BANSAL, A.K.; BILASPURI, G.S. Impacts of oxidative stress and antioxidants on semen functions. **Veterinary Medicine International**, v. 2011, p. 1-7, 2011.

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.00, p. 1–15, 2010.

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

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

BHAKAT, M.; MOHANTY, T.K.; RAINA, V.S.; GUPTA, A.K.; KHAN, H.M. MAHAPATRA, R.K.; SARKAR, M. Effect of age and season on semen quality parameters in Sahiwal bulls. **Tropical Animal Health and Production**, v.43, p.1161–1168, 2011.

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.

BILODEAU, O.F.J; CHATTERJEE, S.; SIRSD, A.M.; GAGNON,C. Level of antioxidant defense are decreased in bovine spermatozoa after a cycle of freezing and thawing. **Molecular Reproduction and Development**. v.55, p. 282-288, 2000.

BIZZARO, D.; MANICARDI, G.C.; BIANCHI, P.G.; BIANCHI, U.; MARIETHOZ, E.; SAKKAS D. In situ competition between protamine and fluorochromes for sperm DNA. **Molecular Human Reproduction**. v.4, p.127–132, 1998.

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

BREWIS, I.A.; MORTON, I.E.; MOHAMMAD, S.N.; BROWES, C.E.; MOORE, H.D.M. Measurement of Intracellular Calcium Concentration and Plasma Membrane Potential in Human Spermatozoa Using Flow Cytometry. *Journal of Andrology*, v. 21, p.238-249, 2000.

BRITO, L.F.C.; SILVA, A.E.D.F; RODRIGUES, L.H.; VIEIRA, F.V.; DERAGON, L.A.G; KASTELIC, J.P. Effects of environmental factors, age and genotype on sperm production and semen quality in Bos indicus and Bos Taurus AI bulls in Brazil. *Animal Reproduction Science*, v. 70, p. 181-190, 2002.

BRITO, L.F.C.; SILVA, A.E.D.F; RODRIGUES, L.H.; VIEIRA, F.V.; DERAGON, L.A.G; KASTELIC, J.P. Effect of age and genetic group on characteristics of the scrotum, testes and testicular vascular cones, and on sperm production and semen quality in AI bulls in Brazil. *Theriogenology*, v. 58, p. 1175-1186, 2002.

BRUSKOV, V.I.; MALAKHOVA, L.V.; MASALIMOV, Z.K.; CHERNIKOVA, A.V. Heat induced formation of reactive oxygen species and 8-oxoguanine, a biomarker of damage to DNA. *Nucleic acids research*. V.30, p.1354-1363.

BUCAK, M.N.; TUNCER, P.B.; SARIOZKAN, S.; BASPINAR, N.; TAPINAR, M.; COYAN, K.; BILGILI, A.; AKALIN, P.P; BUYUKLEBLEBICI, S.; AYDOS, S.; ILGAZ, S.; SUNGUROĞLU, A.; Effects of antioxidants on post-thawed bovine sperm and oxidative stress parameters: Antioxidants protect DNA integrity against cryodamage. *Cryobiology*, v.61, p. 248–253, 2010.

CARREIRA, J.T. **Avaliação da integridade do acrossoma, membrana citoplasmática, potencial mitocondrial, cromatina e produção de embriões *in vitro* de sêmen bovino com altos índices de gota citoplasmática proximal.** Dissertação de mestrado. Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, São Paulo, Brasil, 2008.

CARREIRA, J.T. ; RODRIGUES, L.H. ; TREVIZAN, J.T.; CARVALHO, I.R. ; SOUZA, N.C.; KOIVISTO, M.B. Evaluation of a Nelore bull with high degree of chromatin damage and protamination deficiency: a case report.. In: III International Symposium on Animal Biology of Reproduction, Águas de São Pedro. **Animal Reproduction**, v. 7.p. 292-292, 2010.

CARREIRA, J.T. ; TREVIZAN, J.T.; CARVALHO, I.R.; SOUZA, N.C.; KOIVISTO, M.B. DNA integrity and protamination of Bos taurus and Bos indicus Bulls - previous note.In: III International Symposium on Animal Biology of Reproduction, Águas de São Pedro. **Animal Reproduction**, v. 7.p.294-294, 2010.

CARRELL, D.T.; EMERY, B.R.; HAMMOUD, S.The aetiology of sperm protamine abnormalities and their potential impact on the sperm epigenome.**International journal of andrology**, v. 31, p. 1–9, 2008.

CASEY, P.J.; HILLMAN, R.B. ROBERTSON, K.R.; YUDIN, A.I.; LIU, I.K.M.; DROBNIS, E.Z. Validation of an acrosomal stain for equine sperm that differentiates between living and dead sperm. **Journal of Andrology**.v.14, p. 289-297, 1993.

CELEGHINI. E.C.C. **Efeitos da criopreservação do sêmen bovino sobre as membranas plasmática, acrossomal e mitocondrial e estrutura da cromatina dos espermatozoides utilizando sondas fluorescentes**. Tese de doutorado. Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil, 2005, 188p.

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

CELEGHINI, E.C.C.; NASCIMENTO, J.; RAPHAEL, C.F.; ANDRADE, A.F.C.; ARRUDA, R.P. Simultaneous assessment of plasmatic, acrosomal, and mitochondrial membranes in ram sperm by fluorescent probes. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.62, n.3, p.536-543, 2010.

CENTOLA, G.M.; EBERLY, S. Seasonal variations and age-related changes in human sperm count, motility, motion parameters, morphology, and White blood cell concentration. **Fertility and sterility**, v. 72, p. 803-808, 1999.

CHACON, J.; PÉREZ, E.; MÜLLER, E.; SÖDDERQUIST, L.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Breeding soundness evaluation of extensively managed bulls in Costa Rica. **Theriogenology**, v.52, p.221-231, 1999.

CHEN, Z.; TOTH, T.; GODFREY-BAILEY, L.; MERCEDAT, N.; SCHIFF, I.; HAUSER, R. Seasonal Variation and Age-Related Changes in Human Semen Parameters. **Journal of andrology**, v. 24, p. 226-231, 2003.

CHEN, XK; WEN, S.W.; KREWSKI, D.; FLEMING, N.; YANG, Q.; WALKER, M.C. Paternal age and adverse birth outcomes: teenager or 40+, who is at risk? **Human Reproduction**, v.23, p. 1290–1296, 2008.

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

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

COMHAIRE, F.H.; CHRISTOPHE, A.B.; ZAIATA, A.A. The effects of combined conventional treatment, oral antioxidants and essential fatty acids on sperm biology in subfertile men. **Prostaglandins Leukocytes and Essential Fatty Acids**. v. 63, p.159–165, 2000.

CORRÊA, A.B.; VALE FILHO, V.R.; CORRÊA, G.S.S.; ANDRADE, V.J.; SILVA, M.A.; DIAS, J.C. Características do sêmen e maturidade sexual de touros jovens da raça Tabapuã (*Bos taurus indicus*) em diferentes manejos alimentares. **Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 58, p. 823-830, 2006.

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

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

CUI, J.; HOLMES, E.H.; GREENE, T.G.; LIU, F.K. Oxidative DNA damage precedes DNA fragmentation after experimental stroke in rat brain. **The FASEB Journal**, v. 7, p. 955-967, 2000.

DADOUNE, J.P. Expression of mammalian spermatozoa nucleoproteins. **Microscopy research and technique**, v.61, p. 56-75, 2003.

DeIULIIS, G.N.; THOMSON, L.K.; MITCHELL, L.A.; FINNIE, J.M.; KOPPERS, 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-20-Deoxyguanosine, a Marker of Oxidative Stress. **Biology of Reproduction**. v.81, p.517–524, 2009.

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

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

DODE, MAN, SCHENK, JAP, SILVA, AEDF. Determinação da puberdade em machos Nelore e Mestiços. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**. v.14, n, p.227-233, 1989.

DUNGUN, M.; SANDLOW, J.I.; BRANNIGAN, R.E. Sperm DNA damage evaluation techniques.**Journal of Andrology**, v.32, p.207-209, 2011.

ENCISO, M.; CISALE, H.; JOHNSTON, S.D.; SARASA, J.; FERNÁNDEZ, J.L.; GONSÁLVEZ, J. Major morphological abnormalities in the Bull are related to sperm DNA damage. **Theriogenology**, v. 26, p.23-32, 2011.

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

ESKENAZI, B.; WYROBEK, A.J.; SLOTER, E.; KIDD, S.A.; MOORE, L.; YOUNG, S.; MOORE, D. The association of age and semen quality in healthy men. **Human Reproduction**, v.18, p. 447-454, 2003.

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. Loss of livestock breeding efficiency due to uncompensable sperm nuclear defects. **Reproduction, Fertility and Development**, v.11, p. 1-15, 1999.

EVENSON, D.P. Sperm Chromatin Structure Assay (SCSA®): 30 Years of Experience with the SCSA®. In: ZINI, A. & AGARWAL, A. (editores) **Sperm Chromatin: Biological and Clinical Applications in Male Infertility and Assisted Reproduction**. 1<sup>a</sup> ed., USA: Springer, 2011. Cap. 9, p.125-150.

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

EVENSON, D.P.; JOST, L.K. Sperm chromatin structure assay is useful for fertility assessment. **Methods in cells science**. v. 22, p.169-189, 2000.

EVENSON, D.P.; LARSON, K.L.; JOST, L.K. Sperm chromatin structure assay: its clinical use for detecting sperm DNA fragmentation in male infertility and comparisons with other techniques. **Journal of andrology**, v. 23, p. 25-43, 2002.

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

FARREL, P.B.; PRESICCE, C.C.; BROCKET, R.H.; FOOTE, R.H. Quantification of bull sperm characteristics measured by computer-assisted sperm analysis (CASA) and relationship to fertility. **Theriogenology**, v. 49, p. 871-879, 1997.

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

FIELDS, M. J.; BURNS, W. C.; WARNICK, A. C. Age, season and breed effects on testicular volume and semen traits in young beef bulls. **Journal of Animal Science**, v. 48, p. 1299-1304, 1979.

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

FREITAS-DELL'AQUA, C.P.; CRESPILO, A.M.; PAPA, F.O.; DELL'AQUA JUNIOR, J.A. Metodologia de avaliação laboratorial do sêmen congelado bovino. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 33, p. 213-222, 2009.

FRENEAU, G.E., VALE FILHO, V.R; MARQUES JR., A.P.; MARIA,W.S.Puberdade em touros Nelore criados em pasto no Brasil: características corporais testiculares e seminais e de índice de capacidade andrológica por pontos. **Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia** v.58, p.1107-1115, 2006.

GARCÍA-MACÍAS, V.; PAZ, P.; MARTINEZ-PASTOR, F.; ALVAREZ, M.; GOMES-ALVES, S.; BERNARDO, J.; ANEL, E.; ANEL, L. DNA fragmentation assessment by flow cytometry and Sperm-Bos-Halomax (bright-field microscopy and fluorescence microscopy) in bull semen. **International Journal of Andrology**, v. 30, p. 88-98, 2006.

GARNER, D.L.; THOMAS, A.C.; JOERG, H.W.; DEJARNETTE, J.M.; MARSHALL, C.E. Fluorimetric assessments of mitochondrial function and viability in cryopreserved bovine spermatozoa. **Biology of Reproduction**, v. 57, p. 1401-1406, 1997.

GORCZYCA, W.; TRAGANOS, F.; JESIONOWSKA, H.; DARZYNKIEWICZ, Z. Presence of strand breaks and increased sensitivity of DNA in situ to denaturation in abnormal human sperm cells: analogy to apoptosis of somatic cells. **Experimental Cell Research**, v.207, p.202-205, 1993.

GONZALEZ-MARIN, C.; ROYA, R.; LOPEZ-FERNANDEZ, C.; DIEZA, B.; CARABANO, M.J.; Fernandez, J.L.; Kjellandd, M.E.; Morenod, J.F.; Gosalvez, J. Bacteria in bovine semen can increase sperm DNA fragmentation rates: A kinetic experimental approach. **Animal Reproduction Science**, v.123, p. 139–148, 2011.

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

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

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

HALLAP, T.; HAARD, M.; JAAKMA, U.; LARSSON, B.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Does cleasing frozen-thawed bull semen before assessment provide samples that relate better to potential fertility? **Theriogenology**, v. 62, p. 702-713, 2004.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. Lipid peroxidation, oxygen radicals, cell damage and antioxidant therapy. **The Lancet**, v.323, p. 1396-1397, 1984.

HAMMERSTEDT, R.H.; GRAHAM, J.K.; NOLAN, J.P. Cryopreservation of mammalian sperm: what we ask then to survive. **Journal of Andrology**, v.11, p. 73-88, 1990.

HENKEL, R.; HOOGENDIJK, C. F.; BOUIC, D.T.; KRUGER, F. TUNEL assay and SCSA determine different aspects of sperm DNA damage. **Andrologia**. v.42, p. 305-313, 2010.

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

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

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

ICHIMURA, S.; ZAMA, M.; FUJITA, H. Quantitative determination of single-stranded sections in DNA using the fluorescent probe acridine orange. **Biochemistry and Biophysics Acta**, v.240, p.485–495, 1971.

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

JANUSKAUSKAS, A.; JOHANMSSON, A.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Assessment of sperm quality through fluorometry and sperm chromatin structure assay in relation to field fertility of frozen thawed semen from swedish ai bulls. **Theriogenology**. v.55, p. 947-961, 2001.

JAVED, M.T.; KHAN, A.; KAUSAR, R. Effect of age and season on some semen parameters of Nili-Ravi (*Bubalus bubalis*) bulls. **Veterinaeski Archiv**, v.70, p.83-94, 2000.

KARABINUS, D. S.; EVENSON, D. P.; JOST, L. K. ; BAER, R. K. Comparison of Semen Quality in Young and Mature HolsteinBulls Measured by Light Microscopy and Flow Cytometry. **Journal of dairy science**, v.73, p.2364-2371, 1990.

KASIMANICKAM, R.; KASIMANICKAM, V.; THATCHER, C.D.; NEBEL, R.L; CASSELL B.G.Relationships among lipid peroxidation, glutathione peroxidase, superoxide dismutase, sperm parameters, and competitive index in dairy bulls. **Theriogenology**, v.67, p.1004–1012, 2007.

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

KELSO, K.A.; REDPATH, A.; NOBLE, R.C.; SPEAKE, B.K. Lipid and antioxidant changes in spermatozoa and seminal plasma throughout the reproductive period of bulls. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.109, p. 1-6, 1997.

KIDD, S.S.; ESKENAZI, B.; WYROBECK, A.J.; Effects of male age on semen quality and fertility: a review of the literature. **Fertility and Sterility**, v. 75, p. 237-248, 2001.

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* in the southeastern region of Brazil. **Reproduction in Domestic Animals**, v.44, p. 587-592, 2009.

KOPPERS, A.J. **Significance of Mitochondrial Reactive Oxygen Species Production in Male Infertility**. Tese de doutorado.University of Newcastle, Newcastle, Austrália. 2010.

KUMI-DIAKA, J.; NAGARATNAM, V; RWUAAN J. Seasonal and age-related changes in semen quality and testicular morphology of bulls in a tropical environment. **Veterinary Record**, v.3, p. 13-15, 1981.

KURTZ, K.; SAPERAS, N.; AUSIO, J.; CHIVA, M. Spermiogenic nuclear protein transitions and chromatin condensation.proposal for an ancestral – model of nuclear spermiogenesis. **Journal of experimental zoology (molecular development evolution)**, v. 312, p. 1-15, 2009.

LARSON-COOK, K.L.; BRANNIAN, J.D.; HANSEN, K.A.; KASPERSON, K.M.; AAMOLD, E.D.; EVENSON, D.P. Relationship between the outcomes of assisted reproductive techniques and sperm DNA fragmentation as measured by the sperm chromatin structure assay. **Fertility and sterility**, v. 80, p. 895-902, 2003.

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

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

LYMBEROUPOULOS, A.G.; KHALIFA, T.A.A. Sperm chromatin stability during *in vitro* manipulation of beef bull semen. **Reproduction in Domestic Animals**, v.45, p. 307-314, 2010.

MANDAL, D.K.; KUMAR, M.; TYAGI, S. Effect of age on spermiogram of Holstein Friesian × Sahiwal crossbred bulls. **Animal**, v. 4, p. 595–603, 2010.

MANICARDI, G.C.; BIANCHI, P.G.; PANTANO, S.; AZZONI, P.; BIZZARO, D.; BIANCHI, U.; SAKKAS, D. Presence of Endogenous Nicks in DNA of Ejaculated Human Spermatozoa and Its Relationship to Chromomycin A3 Accessibility. **Biology of Reproduction**, v. 52, p. 864-867, 1995.

MANICARDI, G.C.; BIZZARO, D.; SAKKAS, D. Basic and Clinical Aspects of Sperm Chromomycin A3 Assay. In: ZINI, A. & AGARWAL, A. (editores) **Sperm Chromatin: Biological and Clinical Applications in Male Infertility and Assisted Reproduction**. 1<sup>a</sup> ed., USA: Springer, 2011. Cap. 11, p. 171-180.

MARTÍ, J.I.; APARICIO, I.M.; GARCÍA-HERREROS, M. Head morphometric changes in cryopreserved ram spermatozoa are related to sexual maturity. **Theriogenology**, v.75, p.473-481, 2011.

MARTIN, G.; SABIDO, O.; DURAND, P.; LEVY, R. Cryopreservation Induces an Apoptosis-Like Mechanism in Bull Sperm. **Biology of Reproduction**, v. 71, p. 28–37, 2004.

MATHEVON, M.; BURH, M.M.; DECKERS, J.C.M. Environmental, management, and genetic factors affecting semen production in Holstein bulls. **Journal of Dairy Science**, v.81, p. 3321-3320, 1998.

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.

MIOZZO, M.; SIMONI G. The Role of Imprinted Genes in Fetal Growth. **Biology of Neonate**, v. 81, p. 217–228, 2002.

MITCHELL, L.A.; DeIULIIS, G.N.; AITKEN, R.J. The TUNEL assay consistently underestimates DNA damage in human spermatozoa and is influenced by DNA compactation and cell vitality: development of an improved methodology. **International Journal of Andrology**, v. 33, p. 1-12, 2010.

MURATORI, M.; TAMBURRINO, L.; TOCCI, V.; COSTANTINO, A.; MARCHIANI, S.; GIACHINI, C.; LAFACE, I.; KRAUZ, C.; MERIGGIOLA, M.C.; FORTI, G.; BALDI, E. Small variations in crucial steps of TUNEL assay coupled to flow cytometry greatly affect measures of sperm DNA fragmentation. **Journal of Andrology**, v.31, p. 336-345, 2010.

NAJA-TRUJILLO, H. QUINTERO-MORENO, A.; FINOL-PARRA, G.; CARRUYO, G.; VILCHEZ-SIU, M.V.; OSORIO-MELENDEZ, C.; RUBIO-GUILLÉN, J.; VALERIS-CHACÍN, R. Relationship among damaged chromatin, motility and viability in cryopreserved spermatozoa from Brahman bulls. **Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias**, v.24, p. 116-122, 2011.

NI, Z.; LIU, Y.; SHEN, H.; CHIA, S.E.; ONG, C.N. Does the increase of 8-hydroxydeoxyguanosine lead to poor sperm quality. **Mutation Research**, v.381, p.77-82, 1997.

NOYES, J.H.; JOHNSON, B.K.; BRYANT, L.D.; FINDHOLT, S.L.; THOMAS, J.W. Effect of bull age on conception dates and pregnancy rates of cow Elk. **The Journal of Wildlife Management**, v.60, p. 508-517, 1996.

OKO, R.J.; JANDO, V.; WAGNER, C.L.; KISTLER, W.S.; HERMO, L.S. Chromatin reorganization in rat spermatids during the disappearance of testis-specific histone, H1t, and the appearance of transition proteins TP1 and TP2. **Biology of Reproduction**, v.54, p. 1141-1157, 1996.

OLIVA R. Protamines and Male Infertility. **Human Reproduction Update**, v.12, p. 417–435, 2006.

OLIVEIRA, J.D.G. **Maximização do uso de touros a campo**. Anais do I Simpósio de Produção de Gado de Corte, Uberaba, Minas Gerais, Brasil, p.279-296, 1999.

ÓVÁRI, L.; SATI, L.; STRONK, J.; BORSOS, A.; WARD, D.C.; HUSZAR, A. Double probing individual human spermatozoa: aniline blue staining for persistent histones and fluorescence in situ hybridization for aneuploidies. **Fertility and Sterility**. V. 93, p.2255-2261, 2010.

PACEY, A.A. Environmental and lifestyle factors associated with sperm DNA damage. **Human Fertility**, v.13, p.189-193, 2010.

PASQUALOTTO, F.F.; PASQUALOTTO, E.B. Aging and Sperm DNA Damage. In: ZINI, A. & AGARWAL, A. (editores) **Sperm Chromatin: Biological and Clinical Applications in Male Infertility and Assisted Reproduction**. 1ª ed., USA: Springer, 2011. Cap. 23, p. 337-350.

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

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

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

PIEDRAHITA, J.A. The Role of Imprinted Genes in Fetal Growth Abnormalities. **Birth Defects Research**, v. 91, p.682-692, 2011.

RODRIGUEZ-MARTINEZ, H.; LARSSON, B.; PERTOFT, H. Evaluation of sperm damage and techniques for sperm clean-up. **Reproduction, Fertility and Development**, v.9, p. 297-308, 1997.

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

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

RYBAR, R.; KOPECKA, V.; PRINOSILOVA, P.; KUBICKOVA, S.; VEZNIK, Z.; RUBES, J. Fertile bull sperm aneuploidy and chromatin integrity in relationship to fertility. **International Journal of Andrology**, v.33, p.613–622, 2010.

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

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

SAKKAS, D.; MARIETHOZ, E.; MANICARDI, G.; BIZZARO, D.; BIANCHI, P.G.; BIANCHI, U. Origin of DNA damage in ejaculated human spermatozoa. **Revised Reproduction**, v.4, p. 31–37, 1999.

SAKKAS, D.; ALVAREZ, J.G. Sperm DNA fragmentation: mechanisms of origin, impact on reproductive outcome, and analysis. **Fertility and Sterility**, *article in press*, 2010.

SASSONI-CORSI, P. Unique chromatin remodeling and transcriptional regulation in spermatogenesis. **Science**, v. 296, p.2176-2178, 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. (editores). **The Sperm Cell: Production, Maturation, Fertilization, Regeneration**. 1<sup>a</sup> ed. UK: Cambridge University Press, 2006. Cap 2, p. 31-48.

SHARMA, R.; AGARWAL, A. Spermatogenesis: an overview. In: ZINI, A.; AGARWAL, A. **Sperm Chromatin: Biological and Clinical Applications in Male Infertility and Assisted Reproduction**. 1<sup>a</sup> ed., USA: Springer, 2011. Cap. 2, p. 19-44.

SHEN, H.M.; CHIA, S.E.; ONG, C.N. Evaluation of oxidative DNA damage in human sperm and its association with male infertility. **Journal of Andrology**, v.20, p.718–723, 1999.

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

SILVA, A.R.S.; FERRAUDO, A.S.; PERECIN, D.; LIMA, V.F.M.H. Efeito da idade do touro e do período de colheita de sêmen sobre as características físicas e morfológicas do sêmen de bovinos de raças européria e zebuínas. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.38, p. 1218-1222, 2009.

SILVA, P.F.N. **Physiology of peroxidation processes in mammalian sperm**. PhD Thesis, Utrecht University, Faculty of Veterinary Medicine. Utrecht, Holanda, 2006, 186p.

SILVA, P.F.N.; GADELLA, B.M. Detection of damage in mammalian sperm cells. **Theriogenology**, v. 65, p. 958–978, 2006.

SILVEIRA, T.S.; SIQUEIRA, J.B.; FACIONI, S.E.; PAULA, T.A.R.; MIRANDA NETO, T. GUIMARÃES, J.D. Maturação sexual e parâmetros reprodutivos em touros da raça Nelore criados em sistema extensivo. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.39, p.503-511, 2010.

SINGH, N.P.; MULLER, C.H.; BERGER, R.E. Effects of age on DNA doublestrand breaks and apoptosis in human sperm. **Fertility and Sterility**, v.80, p.1420–1430, 2003.

SINGLETON, S.; ZALENSKY, A.; DONCEL, G.F.; MORSHEDI, M.; ZALENSKAYA, I.A. Testis/sperm-specific histone 2B in the sperm of donors and subfertile patients: variability and relation to chromatin packaging. **Human Reproduction**, v.22, p.743–750, 2007.

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.

SIMÕES, R. **Influencia da Fragmentação de DNA espermático na produção in vitro de embriões bovinos**. 2010 105f, tese de doutorado – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

SPANO, M.; KOLSTAD, A.H.; LARSEN, S.B.; CORDELLI, E.; LETER, G.; GIWERCMAN, A. The applicability of the flow cytometric sperm chromatin structure assay in epidemiological studies. **Human Reproduction**, v.13, p. 2495–2505, 1998.

TAVALAEE, M.; RAZAVI, S.; NASR-ESFAHANI, M. H. Influence of sperm chromatin anomalies on assisted reproductive technology outcome. **Fertility and sterility**, v.91, p. 1119-1126, 2009.

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.

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

THOMSON, L.K; FLEMING, S.D.; AITKEN, R.J.; DE IULIIS, G.N.; ZIESCHANG, J.A.; CLARK, A.M. Cryopreservation-induced human sperm DNA damage is predominantly mediated by oxidative stress rather than apoptosis. **Human Reproduction**, v. 24, p. 2061–2070, 2009.

THUN, R.; HURTADO, M.; JANETT, F. Comparison of Biociphos-Plus and Thris-egg yolk extender for cryopreservation of Bull sêmen. **Theriogenology**, v.53, p. 1087-1094, 2002.

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

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

UPRETI, G.C.; JENSEN, K.; MUNDAY, R.; DUGANZICH, D.M.; VISHWANATH, R.; SMITH, J.F. Studies on aromatic amino acid oxidase activity in ram spermatozoa: role of pyruvate as an antioxidant. **Animal Reproduction Science**, v. 51, p. 275–287, 1998.

VAGNINI, L.; BARUFFI, R.L.R.; MAURI, A.L. PETERSEN, C.G.; MASSARO, F.C.; PONTES, A.; OLIVEIRA, J.B.A.; FRANCO JR, J.G. The effects of male age on sperm DNA damage in an infertile population. **Reproductive BioMedicine Online**.v.15, p. 514-519, 2007.

VERSTEGEN, J.; IGUER OUADA, M.; ONCLIN, K. Computer assisted sêmen analyzers in andrology research and veterinary practice. **Theriogenology**, v. 57, p. 149-179, 2002.

VILFAN, I.G.; CONWELL, C.C.; HUD, N.V. Formation of Native-like Mammalian Sper Cell Chromatin with Folded Bull Protamine. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 279, p. 20088-20095, 2004.

WALLACE, W.H.B.; ANDERSON, R.A.; IRVINE, D.S. Fertility preservation for young patients with cancer: who is at risk and what can be offered? **The Lancet Oncology**, v.6, p. 209-218, 2005.

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

WARD, W.S.; COFFEY, D.S. DNA Packaging and Organization in mammalian spermatozoa: Comparison with somatic cells. **Biology of Reproduction**, v.44, p. 569-574, 1991.

WARD, W.S. Regulating DNA Supercoiling: Sperm Points the Way. **Biology of Reproduction**, v. 84, p. 841-843, 2011.

WATERHOUSE, K.E.; GJELDNE, A.; TVERDAL, A.; DE ANGELIS, P.M.; FARSTAD, W.; HÅRDE, M.; KOMMISRUDE, 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.

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

WEIR, P.C.; ROBAIRE, B. Spermatozoa have decreased antioxidant enzymatic capacity and increased reactive oxygen species production during ageing in Brown Norway Rat. **Journal of Andrology**. v.28, p. 229-240, 2007.

WEISSENBERG, R.; BELLA, R.; YOSSEFI, S.; LEWIN, L.M. Changes during puberty in chromatin condensation, morphology and fertilizing ability of epididymal spermatozoa of the golden hamster. **Andrologia**, v.27, p. 341-344, 1995.

WINTER, J.; PENNINGTON, D.; GILBERT, J.; RYCROFT, H. Young sire management (Transport to the stud through initial sampling).11th Procedures of Technique Congress.A.I. Reproduction, **National Association of Animal Breeders**, Columbia, MO, p.44-55, 1986.

WYROBEK, A.J.; EVENSON, D.; ARNHEIM, N.; JABS, E.W.; YOUNG, S.; PEARSON, F. Advancing male age increase the frequencies of sperm with DNA fragmentation and certain gene mutations, but not aneuploidies or diploidies. **Proceedings of the Natural Academy of Science**, v.103, p.9601–9606, 2006.

YOUNG, K.E.; ROBBINS, W.A.; XUN, L. Evaluation of chromosome breakage and DNA integrity in sperm: an investigation of remote semen collection conditions. **Journal of Andrology**, v. 24, p.853–861, 2003.

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

ZHANG, B.R.; LARSSON, B.; LUDEHEIM, N.; HAARD, M.G.H.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Prediction of bull fertility by combined in vitro assessments of frozen-thawed semen from young dairy bulls entering an AI-programe. **International Journal of Andrology**, v.22, p. 253-260, 1999.

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, p.217-219, 2006.

ZINI, A.; GABRIEL, M.S.; BAAZEEM, A. Antioxidants and sperm DNA damage: a clinical perspective. **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**, v. 26, p.427–432, 2009.

ZINI, A.; PHILLIPS, M.; COURCHESNE, A.; BOMAN, J.M.; BAAZEEM, A.; BISSOUNNETTE, F.; KADOCH, I.J.; SAN GABRIEL, M. Sperm head morphology is related to high deoxyribonucleic acid stainability assessed by sperm chromatin structure assay. **Fertility and Sterility**, v.91, p. 2495-2500, 2009.

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

ZUBKOVA, E.V.;ROBAIRE, M. Effects of ageing on spermatozoal chromatin and its sensitivity to *in vivo* and *in vitro* oxidative challenge in the Brown Norway rat. **Human Reproduction**, v.21, p. 2901–2910, 2006.

## ANEXOS

## ANEXO A

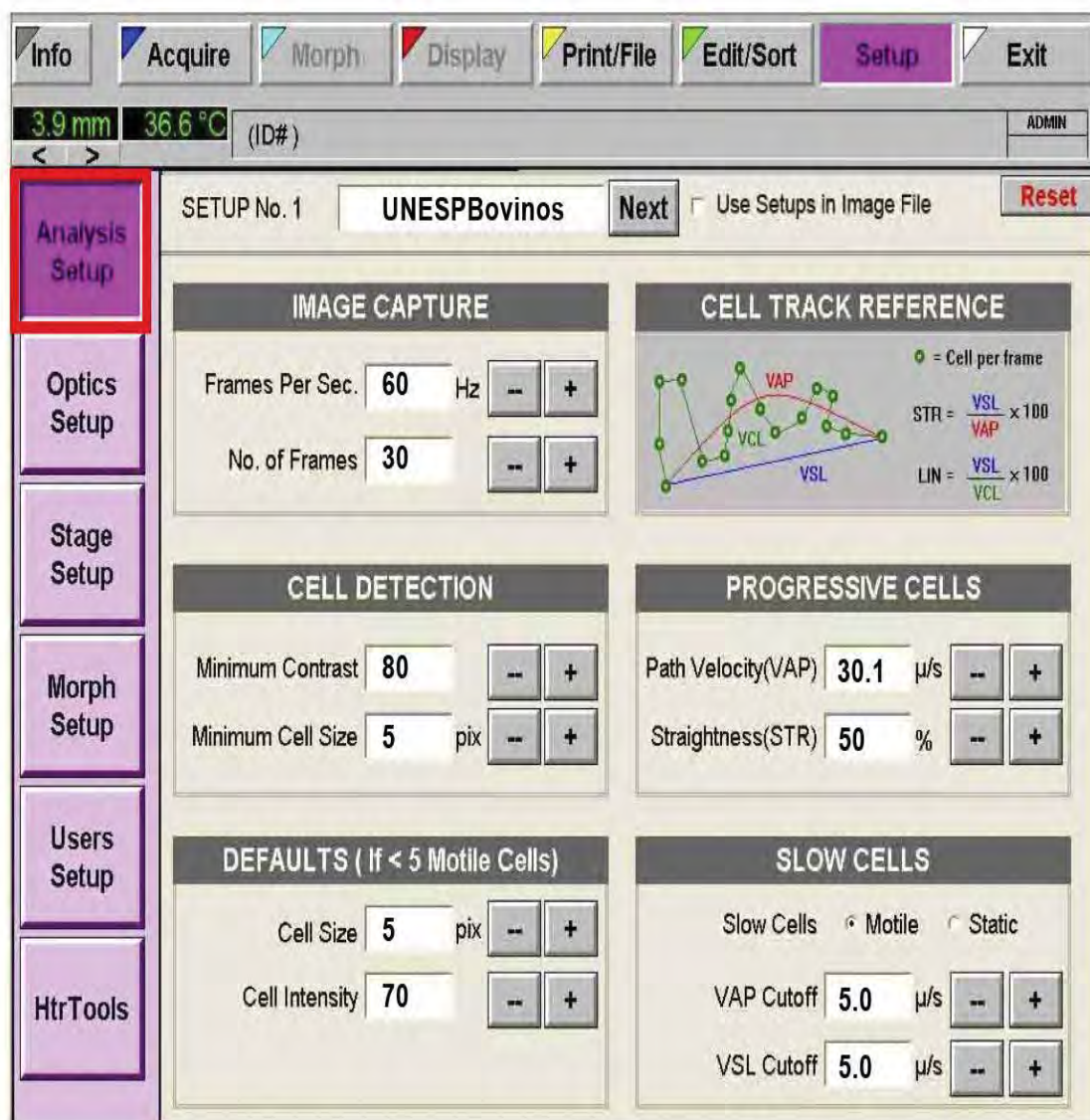


Figura 1. Fotografia digital da tela de “setup” do CASA (versão 12.3 – Hamilton Research®, Beverly, EUA), “hardware” IVOS (“Integrat Visual Optical System”, Hamilton Thorne Biosciences®)

**ANEXO B****SOLUÇÃO KCl**

- **Solução A – Tampão citrato 2,94%**

| <b>Reagentes</b> | <b>quantidade</b> |
|------------------|-------------------|
| Citrato de sódio | 14,7g             |
| Água destilada   | 500mL q.s.p.      |

- **Solução final**

| <b>Reagentes</b> |              |
|------------------|--------------|
| KCl              | 13,05g       |
| Solução A        | 500mL q.s.p. |

**ANEXO C****PBS**

| <b>Reagentes</b>                                     | <b>quantidade</b> |
|------------------------------------------------------|-------------------|
| NaCl                                                 | 100g              |
| KCl                                                  | 2,5g              |
| NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 12 H <sub>2</sub> O | 14,4g             |
| Água destilada                                       | 1000mL q.s.p.     |

- Manter a -20°C

\* Quando diluir para PBS 1X filtrar

\* A solução 1X pode ser congelada novamente

**ANEXO D****IODETO DE PROPIDIO(PI)**

- **Solução estoque**

| <b>Reagentes</b> | <b>10mg/mL PI</b> |
|------------------|-------------------|
| PI               | 10mg              |
| DMSO             | 1mL               |

- **Solução de trabalho**

| <b>Reagentes</b>   | <b>2mg/mL PI</b> |
|--------------------|------------------|
| PI solução estoque | 100µL            |
| PBS                | 500µL            |

- Armazenar no freezer em frasco coberto protegido da luz.

## ANEXO E

### FITC-PSA

- **Solução estoque**
  - FITC-PBS 1000µg/mL
  - PBS + Azida: 810µl PBS + 90µL Azida 10%.

- **Solução de trabalho**

| Reagentes | 1mL de FITC-PSA |
|-----------|-----------------|
| FITC-PSA  | 100µL           |
| PBS+AZIDA | 900µL           |

- Guardar solução de trabalho em frasco âmbar ou coberto, manter refrigerado. Manipular e diluir as sondas em ambiente protegido da luz.

## ANEXO F

## JC-1

- Solução estoque A

| Reagentes | 5mg/mL JC-1 |
|-----------|-------------|
| JC-1      | 5g          |
| DMSO      | 1mL         |

- Solução estoque B

| Reagentes              | 0,5mg/mL JC-1 |
|------------------------|---------------|
| JC-1 solução estoque A | 100µL         |
| DMSO                   | 1mL           |

- Manter no freezer

- Solução de trabalho

| Reagentes              | 0,1mg/mL JC-1 = 153µM |
|------------------------|-----------------------|
| JC-1 solução estoque B | 200µL                 |
| DMSO                   | 500µL                 |

- Manter no freezer

## ANEXO G

Tabela 1-G. Média e desvio padrão da porcentagem de defeitos maiores, menores e totais para os grupos de touros Jovens (n=27), Adultos (n=59) e Senis (36)., avaliados em microscopia de interferência diferencial (DIC, imersão em óleo, 1000x).Contagem de 200 células

| <b>Defeito</b>                      | <b>Jovens</b> | <b>Adultos</b> | <b>Senis</b> |
|-------------------------------------|---------------|----------------|--------------|
| <b>Acrossoma</b>                    | 2,5±1,6       | 1,4±1,3        | 2,4±2,0      |
| <b>Gota citoplasmática proximal</b> | 0,8±0,9       | 0,6±0,7        | 0,7±0,8      |
| <b>Subdesenvolvida</b>              | 0,1±0,3       | 0,0±0,0        | 0,1±0,4      |
| <b>Enrolada na cabeça</b>           | 0,1±0,3       | 0,4±0,6        | 0,4±0,6      |
| <b>Isolada patológica</b>           | 0,1±0,3       | 0,1±0,3        | 0,3±0,5      |
| <b>Estreita na base</b>             | 0,6±1,7       | 0,2±0,3        | 0,1±0,3      |
| <b>Piriforme</b>                    | 0,1±0,4       | 0,1±0,2        | 0,1±0,4      |
| <b>Pequena anormal</b>              | 0,1±0,2       | 0,0±0,1        | 0,0±0,1      |
| <b>Contorno anormal</b>             | 0,8±0,8       | 0,3±0,7        | 0,3±0,5      |
| <b>“Pouch formation”</b>            | 0,1±0,2       | 0,1±0,3        | 0,2±0,5      |
| <b>Formas duplas</b>                | 0,1±0,3       | 0,0±0,1        | 0,2±0,4      |
| <b>Defeitos de membrana</b>         | 1,0±1,2       | 1,4±1,5        | 0,8±0,8      |
| <b>Peça intermediária</b>           | 3,6±2,7       | 1,9±1,5        | 1,4±1,0      |
| <b>Cauda fortemente enrolada</b>    | 3,8±3,7       | 3,3±3,4        | 1,7±1,6      |
| <b>Total de maiores</b>             | 13,7±5,0      | 9,7±5,8        | 8,2±4,4      |
| <b>Pequena, delgada, gigante</b>    | 0,3±0,5       | 0,0±0,1        | 0,1±0,1      |
| <b>Decaptação</b>                   | 2,4±2,0       | 3,7±3,2        | 3,1±3,2      |
| <b>Peça intermediária abaxial</b>   | 1,1±2,1       | 1,0±1,7        | 0,6±0,5      |
| <b>Cauda dobrada</b>                | 0,5±0,9       | 0,6±1,0        | 0,5±1,0      |
| <b>Gota citoplasmática distal</b>   | 0,2±0,5       | 0,7±1,0        | 1,6±2,7      |
| <b>Cauda dobrada com gota</b>       | 0,5±1,1       | 0,5±0,6        | 1,1±1,9      |
| <b>Total menores</b>                | 5,1±3,3       | 6,4±4,3        | 6,2±5,3      |
| <b>Total geral</b>                  | 18,8±7,0      | 16,1±8,5       | 15,0±7,1     |

## ANEXO H

### **Tampão McIlvaine (volume final = 10ml)**

- 0,03676g ácido cítrico (diluir em 1,75ml de água destilada) – 0,1M ácido cítrico
- 0,23359g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (diluir em 8,25ml de água destilada) – 0,2M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$

\*fazer as soluções separadas e depois juntá-las

- 0,02033g  $\text{MgCl}_2$  pH 7.0 (colocar direto na solução preparada acima) - 10mM  $\text{MgCl}_2$
- 0,00125g  $\text{CMA}_3$  (colocar direto na solução preparada acima)
- Aliquotar (100ul) e estocar a  $-20^\circ\text{C}$  abrigado da luz (Validade = 2 anos)

### 2- $\text{MgCl}_2$ STOCK (volume final = 1ml)

- 0,0020g  $\text{MgCl}_2$
- Água destilada (q.s.p) = 1ml
- Armazenar em geladeira

## ANEXO I

## Acridine Orange (AO) – Laranja de Acridina

- **Solução estoque**

| Reagentes      | 0,1M   |
|----------------|--------|
| Ácido cítrico  | 9,605g |
| Água destilado | 500mL  |

- **Solução estoque**

| Reagentes         | 0,3M  |
|-------------------|-------|
| Fosfato dissódico | 8,42g |
| Água destilado    | 100mL |

- **Solução estoque**

| Reagentes       |       |
|-----------------|-------|
| Acridine Orange | 0,25g |
| Água destilado  | 250mL |

- **Preparo das soluções de uso imediato:**
- Fixador: Solução de Carnoy: preparar 3 partes de metanol e 1 parte de ácido acético. Fixar os esfregaços “overnight”.
- **Solução de coloração acridine Orange:**  
 10mL solução estoque acridine Orange  
 40mL solução estoque de ácido cítrico  
 2,5mL solução estoque de fosfato dissódico

Preparar em ambiente escuro.

Utilizar imediatamente – cobrir as laminas fixadas e secas com aproximadamente 3mL da solução e aguardar 5 minutos, incubar em ambiente escuro. Lavar com água destilada, cobrir as lâminas com lamínula antes de secar completamente e ler em microscopia de fluorescência (filtro de 490nm, aumento de 100x em imersão) Contar 200 células.