THAIS ROSE DOS SANTOS HAMILTON

Estudo dos fatores envolvidos na fragmentação de DNA dos
espermatozoides em ovinos

São Paulo

2014

THAIS ROSE DOS SANTOS HAMILTON

Estudo dos fatores envolvidos na fragmentação de DNA dos espermatozoides em ovinos

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências

Departamento:

Reprodução Animal

Área de Concentração:

Reprodução Animal

Orientador:

Profª. Dra. Mayra Elena Ortiz D'Ávila
Assumpção

De acordo:

Orientadora

Obs.: A versão original se encontra disponível na Biblioteca FMVZ-USP.

São Paulo

2014

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da
Universidade de São Paulo)

T.3052
FMVZ

Hamilton, Thais Rose dos Santos
Estudo dos fatores envolvidos na fragmentação de DNA dos espermatozoides em ovinos / Thais
Rose dos Santos Hamilton. -- 2014.
147 f. : il.

Tese (Doutorado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia.
Departamento de Reprodução Animal, São Paulo, 2014.

Programa de Pós-Graduação: Reprodução Animal.

Área de concentração: Reprodução Animal.

Orientador: Profa. Dra. Mayra Elena Ortiz D'Ávila Assumpção.

1. Estresse oxidativo. 2. Fragmentação de DNA. 3. Protaminação. 4. Apoptose. 5. Espermatozoide.
6. Ovino. I. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

Comissão de Ética no uso de animais

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Estudo dos fatores envolvidos na fragmentação de DNA dos espermatozoides em ovinos", protocolado sob o nº 2445/2011, utilizando 12 (doze) ovinos, sob a responsabilidade do(a) Profa. Dra. Mayra Elena Ortiz D'Ávila Assumpção, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da "Comissão de Ética no uso de animais" da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado em reunião de 28/11/2012.

We certify that the Research "Study of factors involved in sperm DNA fragmentation in rams", protocol number 2445/2011, utilizing 12 (twelve) ovine, under the responsibility Profa. Dra. Mayra Elena Ortiz D'Ávila Assumpção, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by "Ethic Committee in the use of animals" of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of University of São Paulo and was approved in the meeting of day 11/28/2012.

São Paulo, 29 de novembro de 2012.

Denise Tabacchi Fantoni
Presidente

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: HAMILTON, Thais Rose dos Santos

Título: Estudo dos fatores envolvidos na fragmentação de DNA dos espermatozoides em ovinos

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

*A minha avó Nice
meu carinho e amor eternos
Saudades...*

DEDICO

Meus mais sinceros agradecimentos...

Aos meus pais, Paulo Hamilton e Roseli dos Santos Hamilton, por todo amor, carinho, dedicação, paciência e apoio incondicionais. Vocês são a melhor parte de mim, meu porto seguro, meu coração, minha vida! Amo, amo, amo...

*A minha irmã Thaiana, a melhor irmã do mundo, meu exemplo de profissional e de ser humano fenomenal. Uma das pessoas mais brilhantes que eu conheço!
Amor maior do mundo!*

*A minha tia Regina, por todo carinho, amor, apoio, cuidado e almocinhos deliciosos! Não existem palavras suficientes para agradecer....
Te amo demais!*

A minha amiga, irmã, comadre, confidente Lilian Alencar, um dos grandes presentes que a vida me deu! Um simples muito obrigada é pouco para agradecer tudo que você representa na minha vida.

A minha pequena, mas muito amada, família, meus primos, primas, tios e tias.

As minhas amigas e amigos, por transformar problemas em alegrias!

Aos meus focinhos queridos, Catita, Mike, Uê e Tequila, os melhores momentos de amor e cumplicidade incondicionais.

A minha querida orientadora Profa. Dra. Mayra Elena Assumpção, muito obrigada por ter me acolhido em seu grupo e me tornado parte dele. Obrigada por toda confiança e por me permitir "voar"! Você é grande responsável pelo meu crescimento profissional e pessoal, além de ser um dos meus grandes exemplos de profissional, de mulher, de guerreira, de capacidade e de verdade! Muito obrigada por ter me proporcionado viver uma das experiências mais felizes da minha vida, serei eternamente grata!

Ao Prof. Dr. José Antônio Visintin, um exemplo de profissional, de determinação e de ser humano!

*Aos meus amigos de laboratório, aos que já estavam lá quando cheguei e aos que vieram depois, Adriano, Camilla, Everton, Fernanda, Flávia, Júlia, Juliana, Letícia, Luana, Mariana, Patrícia, Renata, Robinson e Samir, por todo apoio, ajuda, confiança, amizade e respeito. A convivência com vocês tornou meus dias no laboratório muito mais leves e divertidos.
Muito obrigada!*

Ao Dr. Marcelo Goissis, Febém, por todo conhecimento compartilhado e discussões científicas incríveis.

*Ao Prof. Dr. Marcílio Nichi por toda ajuda, inspiração e cuidado com meu experimento.
Um profissional incrível!*

A todos os meus colegas de pós graduação e a todos os estagiários. Aos que me ajudaram diretamente nos experimentos e aos que de uma forma ou de outra estavam lá apoiando e dando força.

A todos os professores e funcionários do Departamento de Reprodução Animal da FMVZ USP.

Ao laboratório de Histologia do VPT, em especial ao Prof. Dr. Paulo Maiorka, ao Cláudio e ao Luciano pela disposição, paciência e ajuda.

Ao Leonardo Mesquita por todo apoio e ajuda na análise das amostras de imunohistoquímica

Ao Departamento de Reprodução Animal, por me conceder a possibilidade de realização do doutorado.

Ao Prof. Dr. José Álvaro Cebrián-Pérez e a Profa. Dra. Maria Teresa Muiño-Blanco... Pepín y Tere, mis amados profesores catedráticos! Vosotros me acogistéis con gran generosidad en vuestro laboratorio (Laboratorio de Bioquímica y Biología Molecular y Celular de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Zaragoza - España) e hicistéis que me sintiera una más en él. Con todo el afecto y la confianza que pusisteis en mí hicistéis que me sintiera como en casa! Gracias por todos los momentos únicos compartidos! Y, por supuesto, las deliciosas paellas.... Os llevaré para siempre en mi corazón!

A la Dra. Adriana Casao y la Dra. Rosaura Perez-Pé, gracias por acogerme con tanta generosidad y compartir conmigo vuestros conocimientos.

A mi amada amiga Marta González Arto, wapi... Nunca yo imaginé que iba a encontrar al otro lado del charco una persona como tú, uno de los regalos más bonitos que yo he recibido de la vida. No hay palabras suficientes para agradecerte todo el cariño y cuidado que tú tienes por mí! Te voy a llevar para siempre dentro de mi corazón!

Gracias a todos mis amigos españoles! En especial a Alejandro, Carol, Diana, Diego, Edith, Fer, Ignacio, Jimi, Juan, Noelia, Ramiro y mi amiga húngara Csilla. Vosotros me habéis acogido con mucho afecto, siempre dispuestos a prestarme vuestra ayuda y enseñarme con ilusión y alegría. He pasado momentos muy buenos y únicos en vuestras compañías!

A Harumi pela ajuda burocrática, disposição e toda compreensão.

Aos funcionários da Biblioteca, em especial a Elza.

A divisão técnica de produção agropecuária do Campus da USP de Pirassununga, pela concessão dos animais.

A FAPESP pela concessão das bolsas, doutorado país (2011-11231-8) e BEPE (2013- 05025-1).

Ao CNPq, pelo auxílio financeiro.

A FMVZ - USP, pela oportunidade.

Uma **única** nota musical
não faz uma **canção**...

Meus sinceros **agradecimentos**
a cada “nota musical” que ajudou
a compor essa **tese**.

Obrigada
Theresa Hamilton

per Thais Hamilton cm^7
Em

A collage of musical staves with handwritten names and chords. The text "Obrigado" is at the top, followed by "por Thais Kamillon". The staves contain various musical notations, including notes, rests, and chords. Chords listed include Ebsus, Fm, Cm7, Dbsus2, Bbm7, and Dbsus. Names written on the staves include: Mayra, Márcia, Jilka, Mariana, Pepin, Prof. Maioraka, Samir, Raíano, Kazumi, Mariana, Roberto, Robinson, Fernanda, Carolina, Marcelo, Jose, Daniel, Leonardo, Luciano, Diego, Vladimir, Patricia, Cláudio, Renata, Camilla, Sílvia, Rosanna, Luana, Evelyn, Juliana, Amigos especiais, Biblioteca, and others. The staves are arranged diagonally across the image.

Não importa o tamanho da platéia, faça sempre um bom trabalho

(Autor desconhecido)

RESUMO

HAMILTON, T. R. S. **Estudo dos fatores envolvidos na fragmentação de DNA dos espermatozoides em ovinos**. [Study of factors involved in DNA fragmentation of spermatozoa in rams]. 2014. 147 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

A fragmentação do DNA espermático é uma das principais causas de infertilidade nos machos. Alterações na integridade do DNA podem ser decorrentes da ação de espécies reativas de oxigênio (EROS), de defeitos na protaminação e da apoptose. A sensibilidade do espermatozoide ovino frente as biotecnologias reprodutivas pode ser resultado de uma alta suscetibilidade a ação de EROS ou alterações na protaminação espermática desencadeadas por estresse oxidativo induzido por estresse térmico, tornando o espermatozoide mais suscetível a fragmentação de DNA. Com o objetivo de entender mais este processo, foi realizado um primeiro experimento para avaliar o status oxidativo, os atributos espermáticos e a expressão gênica de proteínas envolvidas nos processos de protaminação em diferentes níveis de suscetibilidade a peroxidação lipídica (baixo, médio, alto e altíssimo) em sêmen ovino. Foi observado um aumento da atividade enzimática da glutathione peroxidase e uma diminuição da atividade enzimática da glutathione reductase no plasma seminal no grupo com suscetibilidade a peroxidação lipídica alta e altíssima. Com relação a catalase, não foi verificado esse aumento, no entanto houve maior imunodeteção desta enzima. Em relação a condição espermática, observou-se um aumento na porcentagem de defeitos totais e lesões nas membranas acrossomal e plasmática, além de porcentagens menores de espermatozoides com baixo potencial de membrana mitocondrial no grupo com maior suscetibilidade a peroxidação lipídica. Este mesmo grupo também apresentou alta suscetibilidade ao dano da cromatina e aumento do número de cópias do gene da protamina 1 (PRM1) em espermatozoides. O segundo experimento avaliou os atributos de espermatozoides provenientes do ejaculado e do epidídimo frente ao estresse térmico induzido por insulação testicular (tratado), assim como as relações com o status antioxidante. Observou-se diminuição da motilidade, vigor, turbilhonamento e aumento na porcentagem de defeitos maiores e menores, e de lesões na membrana acrossomal e plasmática em espermatozoides ejaculados no grupo tratado. Essas diferenças não foram observadas em espermatozoides epididimais. Uma maior atividade enzimática da glutathione peroxidase e da glutathione reductase foi observada no plasma seminal do grupo tratado. Foi verificado uma diminuição de espermatozoides com alto potencial de membrana mitocondrial no grupo tratado, indicando que o metabolismo mitocondrial parece

estar envolvido no quadro de estresse oxidativo. Um terceiro estudo foi conduzido para verificar o efeito do estresse térmico na integridade da cromatina espermática, na protaminação do DNA espermático e na ativação de vias apoptóticas em testículo ovino. Em espermatozoides provenientes do ejaculado, houve um aumento da porcentagem de células com suscetibilidade a fragmentação da cromatina no grupo tratado; não observado em espermatozoides epididimais. Uma alta porcentagem de espermatozoides com fragmentação de DNA grau III (ensaio COMETA) e aumento do número de cópias de mRNA da proteína de transição 1 (TNF1) em espermatozoides provenientes do ejaculado, foi observada no grupo tratado. Já em espermatozoides provenientes do epidídimo, a PRM1 apresentou maior expressão no 30º dia do ciclo espermático comparado a 7º dia, enquanto que a TNF1 comportou-se de maneira contrária. Em relação a ativação de vias apoptóticas em testículo ovino, a proteína anti-apoptótica *Bax* foi imuno-identificada em espermatócitos e a *Bcl-2* em espermátides, sem diferença entre os grupos. Em conclusão, a alta susceptibilidade dos espermatozoides ovinos a peroxidação lipídica altera o status oxidativo ocasionando um quadro de estresse oxidativo, principal causador de dano a cromatina. Adicionalmente, o estresse oxidativo induzido por estresse térmico prejudica os atributos espermáticos e aumenta a suscetibilidade dos espermatozoides a fragmentação de DNA.

Palavras-chave: Estresse oxidativo. Fragmentação de DNA. Protaminação. Apoptose. Espermatozoide. Ovino.

ABSTRACT

HAMILTON, T. R. S. **Study of factors involved in DNA fragmentation of spermatozoa in rams.** [Estudo dos fatores envolvidos na fragmentação de DNA dos espermatozoides em ovinos]. 2014. 147 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

Sperm DNA fragmentation is referred as one of the main causes of male's infertility. Among the etiologies of abnormalities on DNA integrity the action of reactive oxygen species (ROS), protamination failures and apoptosis are considered the most important. The known sensitivity of ram's sperm to reproductive biotechnologies could be a result of a higher susceptibility to the action of ROS or changes in sperm protamination triggered by oxidative stress induced by heat stress. This would increase the susceptibility of sperm DNA to fragmentation. Initially, the ram sperm quality, seminal protamine gene expression and oxidative status were evaluated in semen samples of different levels of susceptibility to lipid peroxidation (low, medium, high and very high). There was an increase on glutathione peroxidase and decreased glutathione reductase enzymes' activity in groups with high and very high susceptibility to lipid peroxidation. However, only catalase showed increased immunodetection. An increase on total defects and damaged acrosomal and plasmatic membranes were observed in the group showing the highest susceptibility to lipid peroxidation. Also, the percentage of sperm with low mitochondrial membrane potential, the percentage of sperm susceptible to chromatin damage and the number of copies of protamine 1 (PRM1) mRNA were increased in the group showing higher susceptibility to lipid peroxidation. The second study evaluated sperm's attributes from the epididymis and ejaculated sperm subjected to heat stress induced by testicular insulation (treated group), as well as correlations with the antioxidant status. We observed decrease on motility, vigor, and mass motility and increase on the percentages of sperm showing major and minor defects, and damaged plasma and acrosome membranes in the treated group. These differences were not observed in epididymal sperm. Increased enzymatic activities of glutathione peroxidase and glutathione reductase were observed in the treated group. Mitochondrial metabolism appeared to be involved in the oxidative homeostasis imbalance. This was effectively observed by a decrease on the percentage of sperm with high mitochondrial membrane potential in the treated group. A third study was conducted to determine the effect of heat stress induced by testicular insulation on the integrity of chromatin, protamination and apoptotic activation pathway in ram testis. An increase on the percentage of sperm with susceptibility to chromatin

fragmentation in the treated group was observed. However, the previous findings were not observed in epididymal sperm. A higher percentage of sperm showing DNA fragmentation level III (Comet assay) and an increase on the number of copies of transition protein 1 (TNF1) mRNA were observed in the treated group. In epididymal sperm, a higher expression of the PMR1 gene was observed on the 30th day of the spermatogenic cycle, while TNF1 behaved contrarily. In the testicular samples, the anti-apoptotic protein *Bax* was detected only in spermatocytes while *Bcl-2* was observed singularly in spermatids, with no difference between groups. In conclusion, the disruption of oxidative homeostasis may be exacerbated by the higher susceptibility of ram's sperm to lipid peroxidation, which could be the main etiology of chromatin damage. In addition, oxidative stress induced by heat stress impairs sperm attributes and DNA integrity.

Keywords: Oxidative stress. DNA fragmentation. Protamine. Spermatozoa. Apoptosis. Ram.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	17
2	REVISÃO DE LITERATURA	19
2.1	ESPERMATOGÊNESE	19
2.2	MEMBRANA PLASMÁTICA DO ESPERMATOZOIDE	21
2.3	CROMATINA ESPERMÁTICA	22
2.4	FRAGMENTAÇÃO DE DNA ESPERMÁTICO	25
2.5	MECANISMOS QUE PROVOCAM A FRAGMENTAÇÃO DE DNA ESPERMÁTICO	26
2.5.1	Dano na compactação da cromatina espermática	27
2.5.2	Apoptose	28
2.5.3	Estresse Oxidativo	29
2.5.3.1	Membrana plasmática <i>versus</i> estresse oxidativo	31
3	HIPÓTESES	33
4	OBJETIVOS	34
5	EFEITOS DA PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA NOS ATRIBUTOS ESPERMÁTICOS, FRAGMENTAÇÃO DE DNA E STATUS ANTIOXIDANTE EM SÊMEN OVINO	36
5.1	FUNDAMENTAÇÃO	36
5.2	MATERIAL E MÉTODOS	38
5.2.1	Colheita de sêmen e delineamento experimental considerando-se o grau de peroxidação lipídica	38
5.2.2	Avaliação do status oxidativo	39
5.2.2.1	Marcação intracelular de radicais livres	39
5.2.2.2	Atividade enzimática no plasma seminal	39
5.2.2.3	Gel de eletroforese SDS-polyacrylamide e Western Blotting de enzimas antioxidantes em plasma seminal ovino	40
5.2.2.4	Análise de Peroxidação lipídica espontânea no plasma seminal	41
5.2.3	Avaliações imediatas e morfologia espermática	42
5.2.4	Avaliação da integridade de membranas plasmática e acrossomal, e potencial de membrana mitocondrial do espermatozoide	42
5.2.5	Avaliação de falhas de protaminação na cromatina espermática	43
5.2.5.1	Deficiência de Protaminação	43
5.2.5.2	Expressão Gênica da Protamina 1 e das Proteínas de Transição 1 e 2 em espermatozoide ovino	44
5.2.6	Avaliação da fragmentação de DNA espermático	45
5.2.6.1	Avaliação da estabilidade da cromatina espermática	45
5.2.6.2	Avaliação da fragmentação de DNA espermático pela técnica de Cometa Alcalino	46
5.2.7	Análise estatística	46

5.3	RESULTADOS	47
5.3.1	Efeito da peroxidação lipídica na atividade enzimática antioxidante no plasma seminal	48
5.3.2	Efeito da peroxidação lipídica na avaliação imediata do sêmen, morfologia espermática, integridades de membranas plasmática e acrossomal e potencial de membrana mitocondrial do espermatozoide	49
5.3.3	Efeito da peroxidação lipídica na protaminação espermática e expressão gênica	50
5.3.4	Efeito da peroxidação lipídica na fragmentação do DNA espermático.....	51
5.3.5	Correlação entre as variáveis	51
5.4	DISCUSSÃO.....	56
6	EFEITO DO ESTRESSE TÉRMICO TESTICULAR NOS ATRIBUTOS ESPERMÁTICOS E STATUS OXIDATIVO NO SÊMEN E EM ESPERMATOZOIDES EPIDIDIMAIS DE OVINOS	62
6.1	FUNDAMENTAÇÃO.....	62
6.2	MATERIAL E MÉTODOS.....	64
6.2.1	Experimento 1.....	64
6.2.1.1	Avaliações dos atributos e morfologia espermática	65
6.2.1.2	Avaliação da integridade de membranas plasmática e acrossomal, potencial de membrana mitocondrial, e marcação intracelular de espécies reativas de oxigênio no espermatozoide	65
6.2.1.3	Atividade enzimática no plasma seminal	65
6.2.1.4	Gel de eletroforese SDS-polyacrylamide e Western Blotting de enzimas antioxidantes em plasma seminal ovino.....	66
6.2.1.5	Análise de peroxidação lipídica no plasma seminal (TBARS espontâneo) e intracelular (TBARS induzido)	66
6.2.2	Experimento 2.....	67
6.2.2.1	Análise de motilidade espermática computadorizada	67
6.2.2.2	Avaliação da integridade de membranas plasmática e acrossomal, potencial de membrana mitocondrial, e marcação intracelular de espécies reativas de oxigênio no espermatozoide	68
6.2.2.3	Atividade enzimática intracelular.....	68
6.2.2.4	Análise de peroxidação lipídica intracelular (TBARS intracelular)	69
6.2.3	Análise estatística	70
6.3	RESULTADOS	70
6.3.1	Experimento 1.....	70
6.3.1.1	Avaliação imediata e morfologia espermática	70
6.3.1.2	Avaliação da integridade de membranas plasmática e acrossomal, e potencial de membrana mitocondrial do espermatozoide.....	72
6.3.1.3	Marcação intracelular de radicais livres	73
6.3.1.4	Atividade enzimática e Western-Blot em plasma seminal	74
6.3.1.5	Peroxidação lipídica no plasma seminal e no espermatozoide.....	74
6.3.2	Experimento 2.....	75
6.3.2.1	Análise de motilidade computadorizada	75

6.3.2.2	Avaliação da integridade de membranas plasmática e acrossomal, e potencial de membrana mitocondrial e marcação intracelular de radicais livres no espermatozoide epididimal.....	76
6.3.2.3	Atividade enzimática intracelular.....	77
6.3.2.4	Peroxidação lipídica em espermatozoides do epidídimo	78
6.4	DISCUSSÃO.....	78
7	EFEITO DO ESTRESSE TÉRMICO NA CROMATINA ESPERMÁTICA E EXPRESSÃO GÊNICA DA PROTAMINA 1 E DAS PROTEÍNAS DE TRANSIÇÃO 1 E 2 EM TESTÍCULO E ESPERMATOZOIDES OVINOS.....	83
7.1	FUNDAMENTAÇÃO.....	83
7.2	MATERIAL E MÉTODOS.....	85
7.2.1	Experimento 1.....	85
7.2.1.1	Avaliação da estabilidade da cromatina espermática e fragmentação de DNA espermático por Cometa.....	86
7.2.1.2	Avaliação da deficiência de protaminação em espermatozoides ovinos.....	86
7.2.1.3	Expressão gênica da Protamina 1 e das Proteínas de Transição 1 e 2 em espermatozoides	86
7.2.2	Experimento 2.....	86
7.2.2.1	Expressão gênica da Protamina 1 e das Proteínas de Transição 1 e 2 em testículos ovinos.....	87
7.2.2.2	Imunohistoquímica testicular para identificação dos tipos celulares com ativação apoptótica mediada por EROs (<i>Bax/Bcl-2</i>)	88
7.2.3	Análise Estatística.....	89
7.3	RESULTADOS	90
7.3.1	Experimento 1.....	90
7.3.2	Experimento 2.....	93
7.4	DISCUSSÃO.....	98
8	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	104
	REFERÊNCIAS.....	105
	APÊNDICES.....	122

1 INTRODUÇÃO

A infertilidade do macho é uma síndrome multifatorial que engloba grande variedade de desordens específicas. Alterações espermatogênicas, anormalidades cromossômicas, doenças genéticas, infecções bacterianas e virais, infecções em glândulas acessórias, disfunções endócrinas e/ou imunológicas, neoplasias, exposições a agentes químicos ou radiação, fatores nutricionais e ambientais são alguns fatores que podem afetar a fertilidade do macho. Em ovinos, a infertilidade ou a sub-fertilidade é observada pela diminuição da taxa de nascimentos ou pelo aumento da taxa de retorno ao estro (TSAKMAKIDIS, 2010).

Para estimar o potencial de fertilidade de um reprodutor ovino, a avaliação do sêmen, complementa o exame clínico, sendo útil e precisa (GANTER, 2008; FARQUHARSON, 2009). Embora a análise seminal seja essencial, não prediz a fertilidade do macho a campo, isso porque a fecundação é um processo complexo que envolve um grande número de eventos. Atualmente uma série de testes é proposto com a finalidade de avaliar aspectos funcionais e estruturais dos espermatozoides.

Para o sucesso da concepção, o espermatozoide deve possuir membranas, organelas e um genoma haplóide competente. Nas técnicas de reprodução assistida, o espermatozoide passa por diversos processos que podem levar ao dano das membranas, das organelas e do DNA (SILVA; GADELLA; 2006).

O DNA espermático deve ser reorganizado e condensado durante a espermiogênese. A compactação do material genético nos espermatozoides é função das protaminas, sendo a integridade do DNA espermático essencial para o desenvolvimento do embrião (FATEHI et al., 2006). No entanto, alguns mecanismos podem levar ao surgimento de anormalidades de cromatina.

O estresse oxidativo aparece como principal causa de dano a cromatina espermática, seguido por dano no empacotamento e apoptose (TSAKMAKIDIS, 2010). A presença de DNA fragmentado em um espermatozoide adulto pode ser consequência da ação isolada destes processos ou da combinação deles (BERENGUER et al., 2008).

Existe uma grande ligação entre dano no DNA e comprometimento da espermiogênese. Este processo causa falhas no remodelamento da cromatina e é responsável pela formação de espermatozoides vulneráveis às espécies reativas de oxigênio na mitocôndria e no núcleo. (ZINI; AGARWAL, 2011b).

O estresse oxidativo é uma importante causa de dano ao DNA. Nos espermatozoides e plasma seminal existem antioxidantes capazes de controlar a ação deletéria de moléculas oxidantes. No entanto, quando ocorre um desequilíbrio entre espécies reativas de oxigênio e agentes oxidantes estabelece-se um quadro de estresse oxidativo (ZINI; AGARWAL, 2011a).

Há poucos dados na literatura sobre a fragmentação de DNA em espermatozoides de ovinos, assim como dos mecanismos, causas e moléculas envolvidas no processo de protaminação e de possíveis relações existentes entre a fragmentação de DNA espermático e a ação de espécies reativas de oxigênio.

Acredita-se que o conhecimento destes processos permitirá o desenvolvimento de técnicas direcionadas a manutenção da viabilidade do espermatozoide ovino e consequentemente a utilização de métodos menos agressivos a célula espermática, melhorando os índices produtivos e reprodutivos para espécie.

2 REVISÃO DE LITERATURA

A revisão de literatura a seguir contempla os aspectos voltados a formação da célula espermática e os mecanismos envolvidos na compactação da cromatina e a influência do estresse oxidativo, protaminação e apoptose na fragmentação do DNA espermático.

2.1 ESPERMATOGÊNESE

A espermatogênese é o processo de diferenciação da espermatogônia diplóide em espermátides, que ocorre após a puberdade e envolve divisões meióticas, mitóticas e remodelamento celular. É dividida em 3 fases: 1. Proliferação e diferenciação da espermatogônia, 2. Espermatocitogênese (Meiose) e 3. Espermio gênese.

Durante o desenvolvimento embrionário, os gonócitos são diferenciados em espermatogônias fetais que se multiplicam ativamente por mitose. Estas se transformam em espermatogônias transitórias que finalmente darão origem a espermatogônia tipo A escura (dark = Ad), que são as células tronco presentes nos túbulos seminíferos. Estas células estão em constante divisão mitótica para gerar mais espermatogônias tipo Ad e tipo A clara (pale = Ap). Outras espermatogônias tipo A também são encontradas no túbulo seminífero, como a pareada que é resultante da divisão das espermatogônias tipo A isolada e do tipo A alinhada, até que por fim sejam formadas a espermatogônias tipo B. Estas células têm como característica a formação de aglomerados de cromatina condensada no núcleo. Após a meiose, as células permanecem ligadas graças as pontes intercelulares, esta característica facilita interações bioquímicas e sincroniza a maturação das células germinativas (revisado por ZINI; AGARWAL, 2011b).

Na espermatocitogênese, os espermatócitos primários sofrem a primeira divisão meiótica (meiose I) para formar os espermatócitos secundários, num processo, na qual a prófase é estendida. Os espermatócitos secundários sofrem a segunda divisão meiótica (meiose II) para dar origem as espermátides (JOHNSON; WILKER; CERELLI, 1994; SENGER, 2003).

A espermiogênese é o processo caracterizado pela diferenciação das espermatídes arredondadas em espermatozoides, com cromatina compacta, mitocôndrias e vesículas acrossomais desenvolvidas (ZINI; AGARWAL, 2011b).

A espermiogênese ocorre em estágios determinados do ciclo espermático. Em carneiros, o ciclo espermático é dividido em oito estágios, cada estágio é caracterizado por seções dos túbulos seminíferos, na qual existe a associação de alguns dos tipos celulares participantes da espermatogênese. Cada associação de estágios tem duração aproximada de dez dias, e o ciclo espermático se finalizará quando a associação de estágios ocorrer 4,5 vezes. Nem todos os tipos celulares são encontradas em todas as seções dos túbulos seminíferos. As espermatídes, por exemplo, são encontradas no final do estágio I e início do estágio VIII, que acontecem nos dias 6,3, 16,3, 26,4, 36,5 e 46,6 do ciclo espermático de ovinos, que se finaliza em 47 dias com a formação do espermatozoide (Figura 1) (SENGER, 2003).

Figura 1 - Figura representativa dos estágios do ciclo espermático em ovinos

Fonte: (HAMILTON, T. R. S, 2014 adaptado de SENGER, 2003).

O espermatozoide é uma célula equipada com flagelo para impulsioná-lo através do meio aquoso. É desprovido de organelas como ribossomos, retículo endoplasmático, complexo de Golgi, que são desnecessários na tarefa de transportar o DNA espermático até o oócito. Por outro lado, os espermatozoides contêm muitas mitocôndrias estrategicamente localizadas na peça intermediária, para fornecer energia para o movimento do espermatozoide (ALBERTS et al., 1994).

O espermatozoide possui duas regiões distintas morfológica e funcionalmente, delimitadas por uma única membrana plasmática: a cauda, que impulsiona o espermatozoide até o oócito e o ajuda a atravessar as camadas do mesmo; e a cabeça, que contém um núcleo haplóide condensado. O DNA no núcleo é compactado, o volume diminuído facilita o transporte do DNA pelo espermatozoide (ALBERTS et al., 1994).

2.2 MEMBRANA PLASMÁTICA DO ESPERMATOZOIDE

Os lipídios da membrana espermática têm papel na interação com o oócito. A membrana plasmática do espermatozoide é formada por aproximadamente 70% de fosfolipídios, 25% de lipídios neutros e 5% de glicolipídios. Dentre os fosfolipídios, o de maior concentração é a fosfocolina, cerca de 50%, sendo esta porcentagem maior durante a capacitação espermática (FLESH; GADELLA, 2000).

Quanto aos lipídios neutros, a proporção e a composição variam bastante entre as espécies. O principal fator de variabilidade é a quantidade de colesterol, que parece se relacionar com a extensão e com a duração da capacitação, processo no qual há perda deste esterol. Existem ainda os glicolipídios, sendo o mais abundante o seminolipídio, que está associado a reação acrossômica e a fusão dos gametas, migrando para o segmento equatorial durante a capacitação (GADELLA et al., 1993).

Os fosfolipídios não se distribuem aleatoriamente entre as camadas da membrana, tem preferência por uma ou outra, conferindo a bicamada uma assimetria característica, muito importante na fluidez e na permeabilidade da membrana. Assim, a fosfatidilcolina, lisofosfatidilcolina e esfingomiélin, como também os glicoesfingolipídios, que possuem carga positiva, se orientam para o lado externo da membrana, e a fosfatidiletanolamina, fosfatidilserina, fosfatidilinositol e fosfatidilglicerol, todos aniônicos, se orientam para o lado interno. Em geral, o interior da bicamada apresenta grande fluidez e desordem, ao contrário

dos grupos polares da parte exterior. A assimetria da membrana é estabelecida e mantida por uma proteína dependente de ATP, aminofosfolipídio translocase, que pode translocar rapidamente a fosfatidilserina e a fosfatidiletanolamina da parte externa para a parte interna da membrana. A membrana plasmática possui uma elevada fluidez devido a incomum e elevada proporção de ácidos graxos poliinsaturados de cadeia longa que contém. Diferenças nos ácidos graxos de cadeia longa, interações com colesterol e o acoplamento de proteínas também afetam as interações entre os folhetos da membrana (PARKS; GRAHAM, 1992).

Com o decréscimo da temperatura pode ocorrer a reordenação de lipídios causada por uma transição de fases destes componentes da fase cristalina fluida para fase gel (PARKS; GRAHAM, 1992), fenômeno não observado durante a capacitação. Neste sentido, as diferenças no perfil lipídico das membranas espermáticas explicam diferenças na transição da fase lipídica e justificam a diferente sensibilidade ao resfriamento dos espermatozoides entre as espécies (WATSON, 1981; WHITE, 1993).

As proteínas da superfície espermática têm papel crucial na fecundação e podem estar relacionadas em múltiplas funções como: a aquisição da motilidade, a união dos espermatozoides as células do epitélio do oviduto, a capacitação espermática e subsequente reação acrossômica, a ligação dos espermatozoides as células do cummulus ou a zona pelúcida e subsequente penetração, e por último, a união com a membrana plasmática do oócito e fusão. A maioria destas interações parece mostrar relativa ou absoluta especificidade da espécie e da célula espermática. A composição proteica da membrana do espermatozoide está sujeita a constantes modificações. As proteínas de membrana sintetizadas durante a espermiogênese podem se perder ou se ocultar durante o processo de maturação ao longo do trato reprodutor masculino, ou ser substituídas por outras ou reorganizadas ao trocar a localização. Muitas das proteínas da membrana plasmática são provenientes do plasma seminal secretado pelas glândulas acessórias, passando a formar parte do espermatozoide antes da ejaculação (SANOCKA; KURPISZ, 2004).

2.3 CROMATINA ESPERMÁTICA

O espermatozoide maduro é compacto e estável resultando em uma estrutura de cromatina bem diferente da encontrada nas células somáticas ativas (WARD; COFFEY,

1991). Alterações pós traducionais nos espermatozoides são responsáveis por modular os estágios de formação, maturação e transcrição, que estariam silenciados durante a meiose.

Entre os estágios finais da espermatogênese e o início da espermiogênese, as histonas, proteínas responsáveis pelo empacotamento do DNA em células somáticas são substituídas, nas espermátides, pelas protaminas, num processo denominado protaminação.

A cromatina das espermátides tem estrutura similar as das células somáticas, apresentando alta atividade transcricional. Nestas células, núcleos espermáticos são reorganizados e o DNA é condensado. As histonas, que são proteínas nucleares básicas, são hiperacetiladas e os nucleossomos dissociados (CARRELL; EMERY; HAMMOUD, 2007). O DNA sofre remodelação, sendo as proteínas histônicas e não histônicas substituídas, total ou parcialmente, por proteínas de transição (TNP) 1 e 2. As proteínas de transição são responsáveis pela redução do número de quebras no DNA, por evitar a formação de defeitos secundários no espermatozoide e pela prevenção da perda genômica, portanto as TNPs são extremamente importantes durante a condensação normal do DNA (BALHORN, 2007).

No final da espermiogênese, na fase de espermátide alongada, as proteínas de transição são substituídas por oligopeptídeos ou nucleoproteínas específicas denominadas protaminas ou proteínas queratinosas, que possuem aproximadamente metade do tamanho de uma histona, têm caráter mais básico e são ricas em arginina e cisteína oxidada (UNANIAN, 2000; VILFAN; CONWELL; HUD, 2004).

As protaminas se ligam a curvatura menor do DNA e formam complexos altamente compactados denominados nucleoprotaminas (WOUTERS-TYROU et al., 1998). Os grupos fosfato da cadeia de DNA, possuem carga negativa, no entanto são neutralizados pelos grupos de arginina presentes nas protaminas, que são carregados positivamente e tornam a ligação com o DNA mais forte. Sabe-se que o aumento no teor de arginina às custas de resíduos de lisina, que são encontrados em alta concentração nas histonas, intensifica a afinidade de uma proteína ao DNA (LEWIS et al., 2004).

A ligação cruzada entre os resíduos de cisteína promove alta compactação dos toróides de protaminas e maior estabilidade ao DNA (GOSÁLVEZ et al., 2011). Os toróides ou estruturas toroidais das nucleoproteínas contêm aproximadamente, 50 quilo bases (kb) de DNA altamente compactado, localizado em cada domínio das curvaturas do DNA. Estas estruturas são ligadas entre si por *linkers* (ligadores de protamina). Nessas regiões, a cromatina é mais sensível à ação de agentes causadores de fragmentação de DNA (BALHORN, 1982, 2007; BALHORN et al., 1991).

A nuclease endógena, responsável por criar e ligar cortes de DNA durante a espermiogênese é a DNA topoisomerase II, enzima que participa do processo de condensação do DNA. A clivagem do DNA espermático durante a espermiogênese ocorre para aliviar a tensão de torção da estrutura terciária da cromatina, o que facilita o processo de protaminação. Porém, estes cortes endógenos de DNA não devem persistir no espermatozoide maduro (MC PHERSON; LONGO, 1993; SAKKAS et al., 2002), e devem ser reparados pela própria célula, antes do fim do processo de protaminação (BALHORN, 1982; ANDRABI, 2007).

Após a ligação da protamina, a cromatina espermática torna-se extremamente condensada e inerte, devido a neutralização do esqueleto fosfodiéster do DNA pela interação dos resíduos amina da protamina com os grupos fosfatos das fitas de DNA (ROCHA et al., 2002). A integridade do DNA espermático é um importante e independente parâmetro de qualidade seminal, que tem sido associado com o potencial de fertilidade em biotécnicas da reprodução em humanos (LARSON-COOK et al., 2003).

Nas espermatídes, a maioria dos ácidos ribonucléicos mensageiros (mRNA) ficam estocados na forma de ribonucleoproteínas. A tradução fica bloqueada, pois os transcritos ficam ligados as proteínas repressoras na região da cauda poli – A e 3'UTR. O mRNA ativado sofre redução parcial da cauda poli-A. Para os transcritos das protaminas 1 e 2, os mRNA com 160 – 180 resíduos na cauda poli-A são inativos, enquanto que os mRNA com 30 resíduos na cauda poli-A são ativos (KLEENE, 1989; KLEENE, 1993).

Em espermatozoides bovinos, os grupos amino e carboxiterminal das protaminas, são pregueados na direção central interna da molécula e fechados no local, por ligações dissulfídicas inter e intramoleculares, isso ocorre durante o processo de maturação do núcleo espermático no epidídimo e proporciona estabilidade ao DNA (BALHORN et al., 1982; TSAKMAKIDIS, 2010).

Das nucleoproteínas presentes no espermatozoide humano adulto, 85% são constituídas por protaminas, enquanto que as 15% restantes continuam associadas as histonas (SINGH et al., 2003).

O procedimento de protaminação é completado no espermatozoide na entrada dos ductos eferentes (SAKKAS et al., 2002). No entanto, segundo Lewis e Agbaje (2008), células em estágios avançados de diferenciação (espermatócitos, espermatídes e espermatozoides) não tem mecanismo de reparo de DNA; sendo assim, mesmo sendo anormais ou que tenham iniciado o processo de apoptose, estas células podem estar presentes no ejaculado.

De acordo com Balhorn et al. (1991), as protaminas são divididas em duas classes, protamina 1 e 2, encontradas em espermatozoides de mamíferos (KOSOWER et al., 1992). A

protamina 1 (PRM1) é expressa em todos os mamíferos (CARRELL et al., 2007), enquanto que a protamina 2 (PRM2) é descrita em espermatozoides humanos, primatas, murinos e equinos (MAIER et al., 1990; QUERALT et al., 1995). A tradução da PRM 2 é regulada de maneira espécie-específica.

Segundo Maier et al. (1990), em bovinos, mutações pontuais no gene da PRM 2 acarretam a formação de uma proteína com menor afinidade pelo DNA e menos funcional, devido a adição de aminoácidos neutros e hidrofóbicos na proteína formada. Por esta razão, a PRM 2, nesta espécie, é substituída pela PRM 1, que possui maior afinidade pelo DNA.

Em relação as proteínas envolvidas no processo de protaminação em ovinos só foram descritos os genes para a PRM 1 (SAUTIÉRE et al., 1984) e das TNP 1 e 2 (NCBI, 2013).

Em mamíferos, a região central da protamina parece ser bem conservada, pois consiste de regiões formadas por grupos de arginina, enquanto que as regiões N-terminal e C-terminal são mais variáveis (SAUTIÉRE et al., 1984). Cerca de 50% dos resíduos de arginina na PRM 1 são mantidos entre os mamíferos. O número total de aminoácidos e as posições dos resíduos de arginina têm mudado consideravelmente durante a evolução dos mamíferos. Este padrão de evolução sugere que a PRM1 está sob uma forma rara de seleção de purificação, em que a proporção elevada de resíduos de arginina é mantida, mas as posições podem variar (ROONEY; ZHANG; NEI, 2000).

A protamina compacta o material genético do espermatozoide seis vezes mais do que o DNA de células somáticas. Desta forma além de compactar o material genético, estas proteínas promovem a estabilização e a proteção do núcleo do espermatozoide (MCLAY; CLARKE, 2003). A compactação do material genético diminui o volume da célula, facilitando o trajeto pelo trato reprodutivo da fêmea, a penetração e a ativação do oócito, o que dará início ao desenvolvimento embrionário sem danos ao DNA (OLIVA, 2006).

2.4 FRAGMENTAÇÃO DE DNA ESPERMÁTICO

A integridade do DNA espermático é essencial para o desenvolvimento embrionário (FATEHI et al., 2006). Espermatozoides com dano no DNA espermático têm a capacidade de fecundar os oócitos, no entanto há prejuízo no desenvolvimento embrionário. Se o dano espermático for menor que 8%, o oócito consegue repará-lo. Infertilidade, desenvolvimento

embrionário pobre e anormalidades genéticas na prole têm sido associados a danos ao DNA espermático (AHMADI; NG, 1999; TAMBURRINO et al., 2012).

López-Fernández et al. (2008), ao estudarem a fragmentação de DNA em espermatozoides ovinos, observaram que sob severas (sêmen congelado) ou médias (sêmen resfriado) mudanças de temperatura, há aumento da fragmentação de DNA e a diminuição da dos atributos espermáticos, tendo como efeito, o rápido declínio da qualidade espermática. Estes autores associaram o aumento da fragmentação de DNA as mudanças intrínsecas do espermatozoide quando em contato com alterações de temperatura. Desta forma, há necessidade de utilizar as amostras o mais rápido possível, com a finalidade de diminuir o processo de degradação do DNA.

Os mecanismos exatos que levam ao surgimento de anormalidades na cromatina e danos no DNA dos espermatozoides não são precisamente conhecidos, no entanto três hipóteses são as mais aceitas: 1. Dano no empacotamento da cromatina espermática, 2. Apoptose e 3. Estresse oxidativo.

A presença de DNA fragmentado em um espermatozoide adulto pode ser consequência da combinação de diferentes processos, já que os mecanismos mencionados não são exclusivos e o mais provável é que não ocorram como fenômenos isolados. Por exemplo, o dano gerado pelo processo apoptótico e pelas espécies reativas de oxigênio podem estar associados, e o mesmo pode acontecer depois de um processo de espermatogênese anormal com acúmulo de rupturas, fato que poderia ser detectado pelo processo de sinalização da apoptose (BERENGUER et al., 2008). Pensando numa área mais aplicada, a criopreservação do sêmen pode induzir danos na membrana plasmática do espermatozoide, e como consequência, aumento do estresse oxidativo, no qual a produção de espécies reativas de oxigênio aumenta o dano no DNA (TSAKMAKIDIS, 2010).

2.5 MECANISMOS QUE PROVOCAM A FRAGMENTAÇÃO DE DNA ESPERMÁTICO

São descritos a seguir, os principais mecanismos que podem estar envolvidos na fragmentação da cromatina espermática.

2.5.1 Dano na compactação da cromatina espermática

A primeira hipótese, relacionada ao dano no DNA, está ligada a espermiogênese, momento no qual há substituição das histonas pelas protaminas.

Quando a protaminação ocorre de maneira incorreta, ocorrem distúrbios de condensação da cromatina (complexo DNA - proteína) dos espermatozoides e a persistência dessas aberrações pode interferir no mecanismo normal de reparo (SOTOLONGO et al., 2005), com repercussões sobre a fertilidade (BELETTI; MELLO, 1996).

A protaminação incompleta torna o espermatozoide mais vulnerável ao ataque por agentes endógenos e exógenos, como as nucleases (SOTOLONGO et al., 2003), radicais livres (ALVAREZ; STOREY, 1992) ou mutágenos. Recombinação gênica alterada, apoptose abortiva, ação anormal de topoisomerasas e dano no reparo do DNA também diminuem a integridade do DNA.

O remodelamento da cromatina no espermatozoide ocorre devido a hiperacetilação das histonas e da ação da enzima DNA topoisomerase II produzindo quebras temporárias no DNA espermático que acontecem na tentativa de aliviar o estresse de torção causado pelo superenrolamento do DNA. É a própria DNA topoisomerase II a responsável por reparar estas quebras durante o processo de espermiogênese. Alguns estudos com homens inférteis relatam que falhas nos processos de regulação traducional das protaminas podem acarretar em defeitos e consequentemente prejudicam a protaminação espermática (AOKI et al., 2006).

Estudos com camundongos *knockout* para proteínas de transição verificaram que a passagem do espermatozoide pelo epidídimo gera danos a integridade da cromatina devido a falhas na proteção do DNA, conferido pelas protaminas. Nestes animais, há formação incompleta das pontes bissulfídicas e consequentemente não há produção da forma madura da protamina. Considerando-se que 11% das PRM 2 são produzidas a partir do processamento da forma madura (PRM 1), não há produção normal de protaminas e portanto a integridade do DNA fica comprometida. Nestes animais, também foi verificado redução na fertilidade por alterações durante a implantação embrionária. Portanto, alterações nas TNPs resultam em alterações das estruturas das protaminas e danos na integridade da cromatina espermática (SUGANUMA; YANAGIMACHI; MEISTRICH, 2005).

Em homens inférteis observa-se cinco substituições de aminoácidos no gene da TNP 1 causando diferentes polimorfismos de um nucleotídeo (SNP - single nucleotide polymorphisms) e uma deleção de 15 nucleotídeos na região promotora 5' da TNP 2. Esta

deleção reduziu a expressão gênica das protaminas e está associada a infertilidade em homens (MIYAGAWA et al., 2005). Espermatozoides de homens inférteis possuem cromatina espermática menos estável que espermatozoides de homens férteis, sendo esta diferença atribuída ao desequilíbrio na relação PRM1/PRM2 (GOSÁLVEZ et al., 2011).

Em bovinos, verificou-se diminuição na expressão gênica da PRM 1 em espermatozoides provenientes de ejaculados com baixa motilidade (20%) comparado aqueles com alta motilidade (60%) (GANGULY et al., 2013).

2.5.2 Apoptose

A segunda hipótese relaciona o dano no DNA espermático como consequência do processo apoptótico.

Apoptose é caracterizada pela morte celular programada que ocorre normalmente em muitos processos fisiológicos. Na espermatogênese e durante a maturação espermática no epidídimo verifica-se a expressão de vários marcadores de apoptose. No testículo, estas vias são responsáveis pela manutenção da proporção entre células germinativas e células de Sertoli, pela remoção de células germinativas defeituosas e pelo controle de qualidade da produção de espermatozoides (SHUKLA; MAHDI; RAJENDER, 2012).

As rupturas na cadeia dupla da molécula de DNA ocorrem de maneira similar ao que pode ocorrer nas células somáticas. A presença de caspases 1, 3 e 8 na região pós-acrossomal e da caspase 9 na peça intermediária estão relacionadas com este tipo de processo. A presença de marcadores de apoptose, como Fas e p53, em células espermáticas adultas, especialmente em alguns reprodutores inférteis, deve-se ao fato de que estas células possam ter escapado da ação de um processo apoptótico abortivo (SAKKAS et al., 2002).

Atualmente, não há uma metodologia eficaz com a qual se possa induzir a ativação das caspases nos espermatozoides humanos. Isto sugere que caso o processo de fragmentação do DNA seja por apoptose, este poderia ser impulsionado por um mecanismo ligeiramente diferente do que ocorre em outros tipos celulares. Este fato não seria surpreendente, já que outra via de fragmentação do DNA e de morte celular não dependente de caspases já foi reportada em espermatozoides (SAKKAS et al., 2002).

A ativação da caspase, externalização da fosfatilserina, alterações no potencial de membrana mitocondrial e fragmentação de DNA são relatados como marcadores de apoptose

encontrados em espermatozoides humanos. Homens sub férteis apresentam espermatozoides incompetentes com altas concentrações destes marcadores (SHUKLA; MAHDI; RAJENDER, 2012), embora não tenha sido identificado correlação entre a presença destes marcadores e o grau de fragmentação do DNA (SAKKAS et al., 2002).

Em ejaculados frescos de carneiros, os espermatozoides exibem certas características de células somáticas apoptóticas, como a fragmentação de DNA, prejuízo da função mitocondrial ou presença de caspases 3 e 7, e o aumento da translocação da fosfatidilserina (MARTI et al., 2008).

2.5.3 Estresse Oxidativo

A terceira hipótese propõe que a fragmentação do DNA possa ser consequência do desequilíbrio entre produção de radicais oxidativos e presença de antioxidantes no trato reprodutivo masculino. A presença de células imaturas no ejaculado contribui com excessivas quantidades de citoplasma, gotas citoplasmáticas proximais e distais, que podem provocar altos índices de oxidação. O estresse oxidativo é desencadeado quando ocorre desequilíbrio entre a produção de espécies reativas de oxigênio (EROS) e a atividade dos agentes antioxidantes presentes no plasma seminal, incluindo enzimas como a superóxido dismutase e a catalase, assim como agentes que bloqueiam a cascata de reações de redução. Normalmente este tipo de cascata de reações gera danos nas bases e rupturas em uma das duas fitas da dupla cadeia de DNA, induzindo fragmentação de DNA nos espermatozoides (AGARWAL; SALEH; BEDAIWYM, 2003).

O termo EROS abrange uma grande variedade de metabólitos derivados da redução do oxigênio molecular, incluindo os radicais livres como o ânion superóxido (O_2^-) e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2). As moléculas derivadas da reação entre radicais carbonados com o oxigênio, radicais alcóxil e hidroperóxidos orgânicos também pertencem a classe das EROS. Radicais livres, no entanto, referem-se a qualquer átomo ou molécula contendo um ou mais elétrons despareados. Tanto radicais livres como as espécies reativas têm a habilidade de reagir e modificar a estrutura de diferentes biomoléculas, incluindo proteínas, lipídios e ácidos nucleicos. Além disso, reagem entre si gerando misturas complexas de metabólitos reativos, como por exemplo, a dismutação do O_2^- gerando H_2O_2 ou a reação do NO^- com o O_2^- gerando $ONOO^-$. A reação entre O_2^- com o H_2O_2 , na presença de metais de transição gera o

radical hidroxil (OH), que é extremamente reativo e o maior responsável pelo dano oxidativo em substratos vulneráveis, como ácidos graxos poliinsaturados e DNA (ZINI; AGARWAL, 2011a).

A produção de EROS pelos espermatozoides é um processo fisiológico normal, já que participam da regulação da taxa de hiperativação necessária para reação acrossômica (AITKEN; BARKER, 2002).

Em relação aos antioxidantes enzimáticos, o espermatozoide possui a enzima superóxido dismutase (SOD), as enzimas pertencentes ao ciclo da glutathione e em menor concentração, a enzima catalase. A SOD é responsável pela dismutação do OH^- em H_2O_2 , reação esta que ocorre lentamente na ausência da enzima. O efeito antioxidante da SOD só é totalmente eficiente quando outras enzimas metabolizam o H_2O_2 , caso contrário, a conversão do radical livre OH^- , impermeável a membrana, aumentará as concentrações de H_2O_2 , permeável a membrana. A peroxidação lipídica ocorre quando o H_2O_2 não é metabolizado e na presença de metais de transição, este processo desencadeará o dano ao DNA nuclear e mitocondrial. A catalase é extremamente importante nos sistemas de antioxição, pois é responsável por remover o H_2O_2 que foi produzido nos processos de dismutação. O H_2O_2 é a EROS mais tóxica ao espermatozoide (ZINI; AGARWAL, 2011a).

Alguns experimentos já demonstraram que a adição direta de H_2O_2 no sêmen prejudica os espermatozoides verificado pela diminuição da motilidade e da competência na fusão oocitária, além de propiciar a fragmentação de DNA (AITKEN et al., 1998).

As enzimas do ciclo da glutathione (glutathione redutase e peroxidase) são responsáveis pelo metabolismo do peróxido nos espermatozoides. Sob condições normais, a nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH) é produzida pela oxidação da glicose, sendo este o combustível para a glutathione redutase. Consequentemente, os níveis de glutathione reduzida (GSH) são mantidos, níveis estes necessários para neutralizar os lipídios de membrana e o H_2O_2 produzido pelo metabolismo espermático (STOREY; ALVAREZ; THOMPSON, 1998). Já a ação da glutathione peroxidase detoxificando peróxidos lipídicos é mediada pela enzima fosfolipase A2, que é necessária para clivar peróxidos lipídicos em fosfolipídios. Só nesta forma estas moléculas tornam-se disponíveis para ação detoxificante da glutathione peroxidase (ZINI; AGARWAL, 2011a).

Além destes antioxidantes intracelulares, o espermatozoide também é protegido da ação das EROS por antioxidantes enzimáticos altamente especializados secretados no trato reprodutivo masculino. Estas enzimas incluem a glutathione peroxidase 5 (GPx 5) e uma

grande quantidade de SOD extracelular presente no plasma epididimal e seminal (MENNELLA; JONES, 1980; VERNET et al., 1996).

A insulação testicular é uma das formas de induzir estresse térmico e consequentemente, estresse oxidativo no testículo. Por este processo há elevação de temperatura na região testicular suficientemente para alterar a qualidade seminal, sem produzir maiores desequilíbrios sistêmicos nos animais. A técnica consiste em colocar os testículos do animal em uma bolsa plástica isolante térmica, internamente forrada por lã, nylon ou tecido de algodão, cuja função é minimizar as trocas de calor entre os testículos e o meio ambiente (SETCHELL, 1998). Carneiros submetidos a insulação testicular por 28 dias (BYERS, 1984) ou 14 dias (BYERS; GLOVER, 1984) apresentaram diminuição na quantidade absoluta de testosterona no tecido testicular. Esta alteração influenciou diretamente o eixo hipófise-gonadal aumentando a frequência e amplitude dos pulsos de LH. A insulação torna o testículo insensível ao LH endógeno e esta alteração afeta diretamente as células responsáveis pela produção de espermatozoides (BYERS; GLOVER, 1984).

2.5.3.1 Membrana plasmática *versus* estresse oxidativo

Em espécies nas quais os espermatozoides são muito sensíveis ao resfriamento e a congelação como a ovina, relata-se a ausência de fosfatidilinositol (WATSON, 1981) como componente da membrana plasmática. A diferente composição de fosfolípidios pode afetar as características estruturais da membrana do espermatozoide, no entanto, não é a composição de fosfolípidios a única responsável pela suscetibilidade dos espermatozoides ao choque térmico ao frio, já que espermatozoides com uma composição similar de fosfolípido apresentam resistências diferentes (HOLT, 2000). A relação de ácidos graxos poliinsaturados/saturados é um fator determinante na suscetibilidade dos espermatozoides ao frio (WHITE, 1993).

As diferenças entre EROS na assimetria dos lipídios, a difusão entre domínios, o potencial de membrana, a funcionalidade dos canais iônicos, processos endoproteolíticos de antígenos de superfície, traduz-se em diferentes comportamentos e respostas frente a troca do meio externo. A eliminação do plasma seminal, mediante centrifugações, acarreta na diminuição da difusão dos lipídios em todas as regiões da membrana do espermatozoide ovino (WOLFE et al., 2001).

Diferenças na composição lipídica da membrana ocorrem como resposta ao estresse induzido por alterações de temperatura. O carneiro possui altas proporções de ácidos graxos poliinsaturados/saturados e baixas proporções de colesterol/fosfolipídios quando comparado com outras espécies. Esta relação pode gerar uma alteração de membrana que tornará o espermatozoide mais suscetível ao dano peroxidativo na presença de EROS, com subsequente perda da integridade da membrana e do acrossoma (ALVAREZ; STOREY, 1992).

3 HIPÓTESES

O espermatozoide de ovinos apresenta maior sensibilidade frente a manipulação, o que pode ser decorrente da ação de EROS que induzem a peroxidação lipídica.

Uma alteração nos processos de protaminação decorrente da ação do estresse térmico, com consequente falha de compactação do DNA, pode aumentar a sensibilidade da célula ao estresse oxidativo. A cromatina espermática menos compactada está mais exposta as EROS e, portanto, mais suscetível a fragmentação de DNA.

Situações que provoquem o estresse oxidativo, como a elevação da temperatura testicular, conduzem o DNA espermático a fragmentação com consequente diminuição na expressão gênica das proteínas envolvidas no processo de protaminação em espermatozoides e no tecido testicular.

4 OBJETIVOS

1. Avaliar se a suscetibilidade a peroxidação lipídica em espermatozoides ovinos influencia na viabilidade espermática, na expressão gênica de protaminas e de proteínas de transição, na fragmentação de DNA espermático e no status antioxidante em ovinos.

2. Avaliar os atributos de espermatozoides provenientes do ejaculado e do epidídimo frente ao estresse térmico induzido relacionando com possíveis modificações no metabolismo enzimático antioxidante na célula e na peroxidação lipídica no plasma seminal.

3. Verificar o efeito do estresse térmico gerado por insulação testicular na integridade da cromatina, no tipo de protaminação e no metabolismo enzimático antioxidante em espermatozoides ovinos provenientes do ejaculado e do epidídimo e se há indução de vias apoptóticas ativadas por estresse oxidativo no testículo.

***EFEITOS DA PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA NOS
ATRIBUTOS ESPERMÁTICOS, FRAGMENTAÇÃO DE
DNA E STATUS ANTIOXIDANTE EM SÊMEN OVINO***

5 EFEITOS DA PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA NOS ATRIBUTOS ESPERMÁTICOS, FRAGMENTAÇÃO DE DNA E STATUS ANTIOXIDANTE EM SÊMEN OVINO

5.1 FUNDAMENTAÇÃO

O estresse oxidativo (EO) tem sido associado a diversas patologias em humanos como arterioesclerose, câncer, diabetes, problemas hepáticos, artrite reumatoide, catarata, AIDS, doenças inflamatórias intestinais, Parkinson, doenças neurológicas motoras, condições associadas ao nascimento prematuro e infertilidade (ARGAWAL; PRABAKARAN, 2005). De fato, o EO tem sido relatado, de forma direta ou indireta, como a principal causa de problemas de infertilidade. Levando-se em conta apenas o aspecto masculino da infertilidade, o EO representa uma fonte de danos ainda mais significativa, visto que a célula espermática é extremamente suscetível as espécies reativas de oxigênio (EROS). Os espermatozoides possuem na membrana plasmática, grande quantidade de ácidos graxos poliinsaturados (PUFA) e citoplasma bastante reduzido. Os PUFAs são extremamente importantes para o espermatozoide, pois conferem a fluidez necessária a membrana, fundamental para a motilidade espermática. No entanto, as duplas ligações presentes nos PUFAs são mais facilmente oxidadas pelas espécies reativas de oxigênio (PARKS; HAMMERSTEDT, 1985). O citoplasma reduzido, por sua vez, limita a célula a quantidade de enzimas antioxidantes, fundamentais para evitar os danos oxidativos.

O EO é o resultado do desequilíbrio entre EROS e os antioxidantes existentes no corpo. Este quadro pode levar as alterações espermáticas, deformidades na progênie e infertilidade no macho. No sêmen, a ação antioxidante é realizada por enzimas como a superóxido dismutase e a catalase, presentes no plasma seminal, assim como por agentes que bloqueiam a cascata de reações de oxiredução. Quantidades equilibradas de espécies reativas de oxigênio e agentes antioxidantes são necessárias para fecundação, reação acrossomal, hiperativação, motilidade e capacitação espermática (AITKEN; BARKER, 2002). No entanto, níveis aumentados de EROS tem sido correlacionados com diminuição da motilidade espermática e dano ao DNA. A perda da motilidade está correlacionada com o status de peroxidação lipídica do espermatozoide (GOMEZ et al., 1998).

Neste contexto, o carneiro se destaca por apresentar altas proporções de ácidos graxos poliinsaturados/saturados e baixas proporções de colesterol/fosfolipídios na membrana

plasmática quando comparado com outras espécies. Esta relação pode gerar uma alteração de membrana que tornará o espermatozoide mais suscetível ao dano peroxidativo na presença de EROS, com subsequente perda da integridade da membrana e do acrossoma (ALVAREZ; STOREY, 1992).

Dentre os efeitos deletérios do EO sobre o espermatozoide, um dos mais impactantes seria os danos a cromatina, visto que estes poderiam levar a problemas bastante graves ao embrião, ao feto, ao indivíduo recém nascido e mesmo a gerações posteriores. Muitos estudos, em humanos, tem demonstrado o papel da cromatina espermática no desenvolvimento embrionário. A fragmentação do DNA espermático pode influenciar o desenvolvimento embrionário (VIRRO et al., 2004) e até causar infertilidade em adultos (TESARIK et al., 2002).

Danos pequenos ao DNA podem ser reparados pelo próprio espermatozoide ou pelo oócito. No entanto, se o dano é extenso, embora ocorra fecundação, pode ocorrer apoptose e fragmentação embrionária (AHMADI; NG, 1999; TAMBURRINO et al., 2012). Neste contexto, é importante ressaltar que espermatozoides com características morfológicas normais e cromatina fragmentada podem fecundar (EVENSON; WIXON, 2006). Há, cerca de seis possíveis causas de dano a cromatina nuclear e mitocondrial do espermatozoide: 1. apoptose durante a espermatogênese, 2. problemas no processo de remodelamento da cromatina durante a espermiogênese (protaminação), 3. ação de EROS (especialmente o radical hidroxila e o óxido nítrico) durante o transporte espermático pelos túbulos seminíferos e epidídimo, 4. indução por caspases e endonucleases, 5. indução por radioterapia e quimioterapia e 6. indução por tóxicos ambientais (SAKKAS; ALVAREZ, 2010). Dentre estes, o EO testicular e epididimário parecer ser a causa mais importante de fragmentação da cromatina espermática (AGARWAL et al., 2003). As EROS provocam modificações e deleções nas bases, ligações cruzadas de DNA, rearranjos cromossômicos, quebras nas fitas de DNA, mutações e polimorfismos. Além disto, estudos indicam que o EO esta envolvido em falhas durante a compactação do DNA espermático (HAMMADED et al., 2010). No entanto, ainda existem controvérsias sobre causas e efeitos da relação entre as falhas na compactação, na fragmentação de DNA e no EO.

Em ovinos, há poucos dados na literatura sobre o efeito do EO sobre a fragmentação de DNA nos espermatozoides, e sobre o processo de compactação da cromatina. Por esta razão este estudo tem como objetivo avaliar os efeitos do EO nas características seminais de carneiros. Amostras de sêmen foram divididas em 4 grupos quanto a suscetibilidade dos espermatozoides a peroxidação lipídica induzida. Foram realizadas avaliações espermáticas

convencionais e funcionais, como verificação dos atributos espermáticos, fragmentação do DNA, dano no empacotamento da cromatina (protaminação), expressão gênica de PRM1, TNP1 e TNP2 e no plasma seminal atividade e imunodeteção de enzimas antioxidantes.

5.2 MATERIAL E MÉTODOS

Para este experimento foram utilizados doze carneiros da raça Santa Inês, com oito meses de idade, homogêneos, treinados a colheita de sêmen por vagina artificial e com perfil espermático conhecido, alocados nas dependências do Departamento de Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, Campus de São Paulo. Todos os procedimentos foram aprovados pela Comissão de Ética no uso de animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (2445-2011).

5.2.1 Colheita de sêmen e delineamento experimental considerando-se o grau de peroxidação lipídica

Durante um período de nove semanas, os animais foram submetidos a colheitas de sêmen semanais. As amostras foram divididas em quatro grupos de acordo com o grau de peroxidação lipídica quantificado por TBARS (Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico) induzido. Estas análises foram realizadas em espectrofotômetro em comprimento de onda de 532 nm, após indução de estresse oxidativo com sulfato de ferro 4mM e ascorbato 20mM, a 37 °C, conforme descrito por Simões et al. (2013). Os resultados foram comparados com uma curva padrão, feita previamente com malondialdeído. O malondialdeído é uma das principais substâncias que reagem com o ácido tiobarbitúrico e a concentração de TBARS foi determinada utilizando-se o valor $1,56 \times 10^5 \times M^{-1} mL^{-1}$ como coeficiente de extinção molar do malondialdeído. A peroxidação lipídica no sêmen foi expressa em nanogramas de TBARS/mL de sêmen. Os limites de cada grupo foram baseados na mediana e nos quartis. Grupo 1 - valores $\geq$ ao valor mínimo até o quartil inferior (baixa), grupo 2 - valores $\geq$ ao

quartil inferior até a mediana (média), grupo 3 - valores $\geq$ mediana até o quartil superior (alta) e grupo 4 - valores $\geq$ ao quartil superior até o valor máximo (altíssima).

5.2.2 Avaliação do status oxidativo

A avaliação do status oxidativo foi quantificada pelas técnicas descritas a seguir.

5.2.2.1 Marcação intracelular de radicais livres

Para avaliação do estresse oxidativo, em espermatozoides, pela marcação de radicais livres, em especial o peróxido de hidrogênio intracelular, foi utilizado citometria de fluxo capilar e o corante diclorofluoresceína (2',7' diacetato de diclorofluoresceína - DCF). A diluição final de 4.000 células/ μ L foi feita com meio TALP sêmen. A amostra de sêmen diluída foi incubada com 3,5 μ L da sonda fluorescente DCF (concentração 1mM), para evidenciar células com estresse oxidativo e 0,5 μ L PI, por 5 minutos. O PI foi utilizado para a exclusão de células com lesão de membrana, já que esta condição não permite que o corante DCF atue corretamente. Para suspensão e leitura da amostra acrescentou-se PBS sem Ca e Mg. Após 5 minutos de incubação da amostra com as sondas fluorescentes, foi realizada a leitura em citômetro de fluxo capilar no espectro de fluorescência de 500 e 530 nm, fluorescência verde. As imagens foram analisadas pelo software FlowJo v. 8.7.

5.2.2.2 Atividade enzimática no plasma seminal

Cerca de 500 μ L de sêmen fresco foi centrifugado a 5°C por 10 minutos a intensidade de centrifugação de 6000 g, para obtenção do plasma seminal. O plasma seminal foi congelado a - 20°C para que todas as análises fossem realizadas conjuntamente. A leitura foi

realizada por espectrofotômetro (Thermo Electron Corporation), medindo-se o consumo do substrato em um intervalo de tempo determinado.

A atividade da superóxido dismutase (SOD) foi quantificada inicialmente determinando-se a atividade química do sistema para transformar o O_2^- e obter XTT [2-3-Bis (methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-2H-(tetrazolium-5-carboxanilide) inner salt] reduzido para depois se determinar a transformação do substrato, em presença da amostra. Devido a existência de SOD na amostra, parte do O_2^- é transformado em peróxido de hidrogênio e o XTT reduzido. A atividade da SOD foi quantificada pelo incremento de absorbância por minuto, durante 3 minutos, no comprimento de onda de $\lambda=470$ nm, como a diferença entre as medições. O coeficiente de extinção molar utilizado foi $27,4 \times 10^3 \text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$. A atividade da glutathione peroxidase (GPx) foi medida pelo incremento de absorbância por minuto, durante 3 minutos em $\lambda=340$ nm, causado pela oxidação do NADPH formando $NADP^+$ na presença do substrato GSH (glutathione reduzida), t-BuO₂ H₂ (tert-Butyl hydroperoxide solution), enzima Glutathione Redutase (GR) e a GPx presente na amostra. Assim, obteve-se a velocidade de síntese da glutathione oxidada (GSSG) por ação da GPx. A atividade da glutathione redutase (GR) foi medida pelo incremento de absorbância por minuto, durante 3 minutos a $\lambda=340$ nm, causado pela oxidação do NADPH formando $NADP^+$ na presença do substrato GSSH e da GR presente na amostra. A velocidade de síntese da glutathione reduzida (GSG) por ação da GR foi o resultado desta mensuração. O coeficiente de extinção molar do NAPH utilizado foi $6,22 \times 10^3 \text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$. A atividade da catalase foi determinada avaliando-se o consumo do peróxido de hidrogênio durante 3 minutos em $\lambda=242$ nanômetros, e o coeficiente de extinção molar para esta quantificação foi de $18,6 \times 10^3 \text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$. Todos estes protocolos foram executados conforme descrito por Marti et al. (2003).

5.2.2.3 Gel de eletroforese SDS-polyacrylamide e Western Blotting de enzimas antioxidantes em plasma seminal ovino

Inicialmente foi feita quantificação das proteínas presentes no plasma seminal pelo Método de Bradford (BRADFORD, 1976) e 20mg de proteína por poço foram misturados a 5 μL de *loading* buffer (0,045 M Tris/HCl, 0,8 mM EDTA, 3% SDS, 10% de Glicerol, 5% de β -mercaptoetanol e 0,004% de azul de bromofenol). As proteínas foram separadas por SDS-

Page em gel poliacrilamida a 12% (v/v). Uma mistura de proteínas-padrão, pré corada foi utilizada como marcador de peso moleculares de 10 a 250 kDA (Bio-rad, Hercules, CA, USA). A eletroforese foi realizada por 90 minutos a 130 V a 4°C. Posteriormente, as proteínas foram transferidas para uma membrana de fluoreto de polivilideno (PVDF), utilizando Trans-Blot Turbo, por 10 minutos a 2,5 A - 25V (Bio-rad, Hercules, CA, USA). Após secagem da membrana ao ar, realizou-se o bloqueio dos sítios inespecíficos com BSA 5% em PBS, durante 2 horas. As membranas foram incubadas overnight com os anticorpos primários anti-catalase (H-300 - Santa Cruz Biotechnology), anti-SOD (H-90 - Santa Cruz Biotechnology), anti-GPx (H-45 - Santa Cruz Biotechnology) and anti-GR (GR24778-1 - Abcam), diluídos 1/1000 em Tween-PBS com BSA 1%. Pela alta homologia das enzimas antioxidantes humanas com as enzimas ovinas, os anticorpos comerciais produzidos a partir das sequências humanas, puderam ser utilizados. Depois de uma série de 3 lavados de 5 minutos cada, as membranas foram incubadas com anticorpo secundário donkey anti-rabbit (Li - COR Biosciences - 1/15000 em PBS - Tween com 1% BSA) durante 75 minutos, em temperatura ambiente e protegido da luz. A quantificação dos sinais e das áreas das bandas foi realizada por escaneamento das membranas em Odyssey CLX (Li-COR[®] Biosciences). O resultado foi expresso considerando-se a relação entre sinal (pixels) e área das bandas.

5.2.2.4 Análise de Peroxidação lipídica espontânea no plasma seminal

Foram quantificadas as Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico (TBARS) presentes no plasma seminal, baseando-se na metodologia descrita por Ohkawa et al. (1979), na qual duas moléculas de ácido tiobarbitúrico reagem com uma molécula de malondialdeído, produzindo um complexo de coloração rósea, que é quantificado por espectrofotometria num comprimento de onda de 532 nm. Esta reação ocorre em temperatura entre 90 e 100°C, em pH ácido. Para determinação do TBARS no plasma seminal, alíquotas de 300 µL de sêmen fresco associadas a 600 µL de solução de ácido tricloroacético 10% foram centrifugadas a 5°C, 16000 g por 10 minutos para precipitação das proteínas. Cerca de 700 µL do sobrenadante foi congelado a -20 °C para posterior análise. A quantificação seguiu-se conforme já descrito anteriormente no tópico 5.2.1.

5.2.3 Avaliações imediatas e morfologia espermática

Após a colheita, o sêmen foi mantido em banho Maria a temperatura de 37 - 38°C. Prosseguiu-se a avaliação das seguintes características: volume seminal (mL) com avaliação em tubo graduado; vigor (1 – 5); motilidade (%) e turbilhonamento (0 – 5). Para avaliação da morfologia espermática, 10 µL de sêmen fresco foi fixado em 1 mL de formol tamponado (PBS-Phosphate-Buffered Saline, Gibco®, Life Technologies com 2% de formol 37%), avaliados em microscópio de contraste de fase em magnificação de 1000 vezes, sob imersão. As anormalidades espermáticas foram quantificadas e classificadas em defeitos maiores e menores, sendo a soma dos defeitos considerada como defeitos totais. Foi avaliado um total de 200 células por amostra.

5.2.4 Avaliação da integridade de membranas plasmática e acrossomal, e potencial de membrana mitocondrial do espermatozoide

Cerca de 2 milhões de espermatozoides foram diluídos em meio *TALP sêmen* [Modified Tyrode's Albumin Lactate Pyruvate (NaCl 0,1 M, KCl 0,003 M, MgCl₂ 0,0004 M, NaH₂PO₄ 0,0003 M, NaHCO₃ 0,025 M, CaCl₂H₂O 0,003 M, Ácido Lático Syr 0,3% v/v, Hepes 0,01M, pH 7,4, Osm 295-300) para avaliação de integridade das membranas plasmática e acrossomal e atividade mitocondrial por citometria de fluxo capilar (Guava EasyCyte Mini System - Guava Technologies®).

As sondas iodeto de propídeo [PI (0,5% mg/mL, 0,9% NaCl v/v)] e *psium sativum* conjugada ao fluoróforo isotiocionato de fluoresceína [FITC-PSA (100 µg/mL, azida sódica 10% m/v, DPBS q.s.p. 20 mL)] foram adicionadas na mesma amostra seminal, obtendo-se assim o resultado combinado entre a integridade das membranas plasmática e acrossomal, da mesma população de células, conforme Celeghini et al. (2007), adaptado para citometria de fluxo (Apêndice A). Desta maneira quatro populações foram formadas: espermatozoides com acrossoma íntegro e membrana plasmática íntegra (AIMI), espermatozoides com acrossoma íntegro e membrana plasmática lesada (AIML), espermatozoides com acrossoma lesado e

membrana plasmática íntegra (ALMI) e espermatozoides com acrossoma lesado e membrana plasmática lesada (ALML).

Para avaliação do potencial de membrana mitocondrial foi utilizado a sonda JC1 [5,5',6,6'- tetrachloro - 1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazolyl-carbocyanine iodide (76,5 μ M)], que é uma sonda fluorescente carbocianina lipofílica catiônica que é internalizada de acordo com o funcionamento das mitocôndrias. Fluoresce em verde quando a membrana mitocondrial apresenta alto potencial e em vermelho quando esta apresenta baixo potencial, conforme Celeghini et al. (2007), adaptado para citometria de fluxo (Apêndice B).

5.2.5 Avaliação de falhas de protaminação na cromatina espermática

Para avaliação de danos na cromatina espermática provenientes de falhas no processo de compactação do DNA foram utilizadas duas técnicas. Descritas a seguir.

5.2.5.1 Deficiência de Protaminação

Para se investigar a deficiência de protamina em células espermáticas ovinas foi utilizado o corante Cromomicina A3 (CMA3). A Cromomicina A3 é um fluorocromo que compete com sítios de ligação da protamina na curvatura menor das fitas de DNA (BIANCHI et al., 1996). Cerca de 30 milhões de espermatozoides de cada ejaculado de cada animal foram lavados em PBS (Posphate Buffer Solution) sem cálcio (Ca) e magnésio (Mg), por centrifugação a 9000 g por 60 segundos, para posterior fixação em solução de Carnoy (3 partes de Metanol: 1 parte de ácido acético) a 4°C. Após 10 minutos, nova lavagem em PBS sem Ca e Mg foi realizada. O sedimento foi corado com solução de CMA3 (0,25mg/mL em Tampão McIlvaine). Após 20 minutos de incubação, em sala escura e em temperatura ambiente, realizou-se nova lavagem com PBS sem Ca e Mg. O sedimento foi então ressuspendido em PBS, e a leitura realizada em citômetro de fluxo capilar (Guava Easy CyteTM Mini System). O controle da técnica foi realizado por ensaio de descondensação do núcleo espermático e extração das protaminas, obtendo-se os padrões de células

deprotaminadas, segundo Simões et al. (2009). As imagens captadas pelo citômetro foram analisadas pelo software FlowJo v. 8.7.

5.2.5.2 Expressão Gênica da Protamina 1 e das Proteínas de Transição 1 e 2 em espermatozoide ovino

Após a colheita de sêmen, uma amostra de cada ejaculado de cada animal foi lavada em PBS sem Ca e Mg. Ao sedimento foi adicionado 50 µL de reagente de armazenamento aquoso, não tóxico, que estabiliza e protege o RNA da célula (RNA later® Solutions, Life Technologies, Califórnia, E.U.A). Essa solução foi mantida em nitrogênio líquido (- 196°C) até o momento da extração de RNA. O RNA total de aproximadamente 10 milhões de espermatozoides ovinos foi extraído com Trizol (TRizol Plus RNA Purification System, Life Technologies, Califórnia, E.U.A), após incubação por 15 minutos. Adicionou-se clorofórmio e as amostras permaneceram incubadas por mais 10 minutos. Passado este período, a amostra foi centrifugada a 12000 g por 15 minutos. A fase transparente da solução foi adicionado Isopropanol 99,8%, sendo realizado nova centrifugação a 12000 g por 10 minutos (4°C). O sobrenadante foi descartado, sendo adicionado etanol 70%. Nova centrifugação foi realizada a 7500 g por 5 minutos (4°C), o sobrenadante descartado e o material aderido ao fundo suspenso em 40 µL de água livre de RNase/DNase. Foi realizada remoção do DNA genômico por incubação com enzima DNase. As amostras foram avaliadas por espectrofotometria (NanoDrop ND-1- Spectrophotometer), sendo a pureza (280/260) considerada boa quando entre 1,9 - 2,1. O DNA complementar (cDNA) foi sintetizado por reação com transcriptase reversa a partir do RNA isolado, utilizando kit comercial Super Script ® VILO™ cDNA Synthesis (Life Technologies, Califórnia, E.U.A). O cDNA foi diluído para 2,5 µg/mL após quantificação em Qubit® 2.0 Fluorometer (Qubit® dsDNA BR). Os *primers* para Protamina 1 ovina (Primer Forward: ACAGTAACCGCACAGTAGCA, Primer Reverse: GTGGCATTGTTCGTCAGCAG), Proteína de transição 1 ovina (Primer Forward: GCTGTGATGATGCCAATCGC, Primer Reverse: GTCCCCCTTCTGTTCGGTTG) e Proteína de transição 2 ovina (Primer Forward: GTCCCCCTTCTGTTCGGTTG, Primer Reverse: TCAGTTGTACTTCCGTCCTGAG) foram desenhados com uso do software gratuito *online* Primer-BLAST

(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>), a partir das sequências dos respectivos transcritos de *Ovis aries*.

Em um primeiro momento foi realizado PCR convencional (Termociclador Eppendorf® Mastercycler Gradient) para verificar a presença desses transcritos nos espermatozoides. Uma vez que a célula espermática não expressa genes endógenos foi realizado análise absoluta, no qual foi calculado o número de cópias de cada gene em uma quantidade conhecida de cDNA (Apêndice E). Para realizar a quantificação absoluta, cada gene alvo foi clonado em vetor plasmidial pGEM T Easy Vector System I (Promega, Madison, WI, EUA). Foi feita então uma curva de diluição seriada decimal dos plamídeos composta de sete pontos, baseada na concentração do DNA.

Cada amostra foi amplificada em triplicata por qPCR em Mastercycler ep realplex Thermal Cycler (Eppendorf AG, Hamburg, Germany), com o kit SYBR GreenER qPCR Supermix Universal (Invitrogen). Foram realizados 40 ciclos de amplificação compostos cada um por 95°C por 15 segundos e 60°C por 60 segundos. A expressão gênica dos genes alvos foi quantificada pela comparação do número de cópias do gene. O número de cópias foi calculado baseado na curva de diluição descrita acima considerando-se a concentração dos produtos clonados (ng/μl), o tamanho do fragmento (produto) de cada gene (em pares de bases) e o tamanho do plasmídeo (2015 pares de bases) (www.thermoscientificbio.com/webtools/copynumber).

5.2.6 Avaliação da fragmentação de DNA espermático

A fragmentação do DNA espermático foi avaliada por duas técnicas descritas a seguir.

5.2.6.1 Avaliação da estabilidade da cromatina espermática

Esta metodologia fundamenta-se na análise da estabilidade da cromatina espermática baseada no teste de avaliação da suscetibilidade da cromatina a denaturação ácida, segundo Evenson e Jost (2000) e descrito por Simões et al. (2013) (Apêndice C). A fragmentação de DNA espermático, por essa técnica, é avaliada de maneira qualitativa, quantificando, por

citometria de fluxo, a cor do fluoróforo metacromático laranja de acridina. A coloração verde indica a presença da dupla fita de DNA, enquanto que a vermelha indica a fita de DNA simples com denaturação da estrutura da cromatina.

5.2.6.2 Avaliação da fragmentação de DNA espermático pela técnica de Cometa Alcalino

Outra técnica para avaliar e quantificar danos no DNA em células espermáticas é o Ensaio Cometa Alcalino que se baseia na detecção de quebras de fita simples no DNA em célula única por eletroforese unidimensional sobre lâmina de microscopia. O protocolo utilizado foi adaptado de Donnelly et al. (2000) (Apêndice D).

Nesta técnica, as células adquirem uma morfologia semelhante a de um cometa, em que a cabeça representa o arcabouço de DNA intacto e a cauda, fragmentos provenientes de lesões no DNA. A visualização das imagens foi feita em microscópio de epifluorescência Olympus IX com filtro de excitação de 515-560 nm e filtro de barreira de 600 nm, equipado com câmera Olympus Q-Color™. As imagens de 200 células foram selecionadas aleatoriamente e analisadas por classificação visual em graus de I a IV, de acordo com a intensidade de dano no DNA. O grau I foi considerado espermatozoides com halo ao seu redor e núcleo corado, porém sem cauda de cometa evidente, indicando pouca fragmentação; o grau II aqueles espermatozoides com formação de cauda de cometa e núcleo pouco descorado, indicando danos leves no DNA; no grau III foram classificadas as células com cauda de cometa totalmente formada, porém com núcleo ainda parcialmente corado, indicando danos evidentes no DNA; e no grau IV espermatozoides com cauda de cometa totalmente formada, porém com núcleo completamente descorado, indicando intensa fragmentação no DNA. Para esta análise foram consideradas as semanas experimentais 2, 5 e 8, totalizando 36 amostras.

5.2.7 Análise estatística

Os dados foram analisados pelo programa *SAS System for Windows 9.3* e analisados quanto a normalidade dos resíduos e homogeneidade das variâncias, sendo transformados no

caso de necessidade. Foi utilizado o procedimento GLM do programa considerando-se o efeito da peroxidação lipídica nas demais variáveis. Realizou-se análise de comparação de médias pelo procedimento LSD. Correlações de *Spearman* foram utilizadas para calcular a relação entre as variáveis não paramétricas. O nível de significância de 0,05 foi considerado para correlações significativas. Correlações baixas apresentaram valor do coeficiente de correlação (r) entre 0,20 e 0,30 (20 a 30%), enquanto que correlações altas apresentaram valor de r maior que 0,30 (30%).

5.3 RESULTADOS

Totalizaram-se 108 colheitas de sêmen, das quais foram obtidos dados em resposta as variáveis dependentes estudadas. Cada grupo experimental foi composto por 27 unidades experimentais (Figura 2). Os valores de médias e erros padrão da média de todas as variáveis dependentes mensuradas e os valores de probabilidade (p) são apresentados na tabela 1.

Figura 2 - Médias e erros padrão da média de TBARS induzido em espermatozoides ovinos nos diferentes grupos experimentais quanto a peroxidação lipídica

Legenda: Grupos quanto a suscetibilidade a peroxidação lipídica: Grupo 1: baixa, Grupo 2: média, Grupo 3: alta e Grupo 4: altíssima. Letras diferentes indicam diferença estatística significativa.

Fonte: Hamilton, T.R.S (2014).

5.3.1 Efeito da peroxidação lipídica na atividade enzimática antioxidante no plasma seminal

A atividade enzimática da glutathione peroxidase, glutathione reductase, superóxido dismutase e catalase foi mensurada. Houve um aumento da atividade da glutathione peroxidase nos grupos com maior suscetibilidade a peroxidação lipídica ($0,000709 \text{ UI/mL} \pm 0,00004$; $0,000687 \text{ UI/mL} \pm 0,00003$; $0,000709 \text{ UI/mL} \pm 0,00006$; grupos 2, 3 e 4, respectivamente - Figura 3A) comparado ao grupo com baixa suscetibilidade a peroxidação lipídica ($0,000561 \text{ UI/mL} \pm 0,00004$, grupo 1). No entanto, a atividade enzimática da glutathione reductase apresentou diminuição nos grupos com maior suscetibilidade a peroxidação lipídica ($0,000039 \text{ UI/mL} \pm 0,000003$; $0,000039 \text{ UI/mL} \pm 0,0000043$; $0,0000475 \text{ UI/mL} \pm 0,0000053$; nos grupos 2, 3 e 4, respectivamente - Figura 3B) comparado ao grupo com menor suscetibilidade a peroxidação lipídica ($0,000052 \text{ UI/mL} \pm 0,000002$, grupo 1).

A proteína identificada como catalase apresentou peso molecular de 64 KDa, a superóxido dismutase de 32 KDa, a glutathione reductase de 56 KDa e a glutathione peroxidase de 23 kDa e entre 50 e 75kDa. Para a GPx, além da forma tetramérica da enzima foi também imunodetectada, as quatro subunidades com menor peso molecular, como descrito por Vaisberg et al. (2005). Por esta razão foram identificadas uma banda com maior peso molecular (GPXBS) e uma banda com menor peso molecular (GPXBI).

O grupo 4, com maior suscetibilidade a peroxidação lipídica apresentou aumento da imunodeteção (pixel/área) da enzima glutathione reductase ($0,498 \pm 0,094$) em relação aos grupos 1, 2 e 3 ($0,39 \pm 0,067$, $0,247 \pm 0,06$ e $0,259 \pm 0,055$, respectivamente). Observou-se um aumento da imunodeteção da catalase no plasma seminal, nos grupos com média (grupo 2), alta (grupo 3) e altíssima (grupo 4) suscetibilidade a peroxidação lipídica ($1,437 \pm 0,104$; $1,424 \pm 0,118$ e $1,313 \pm 0,12$, respectivamente) comparado ao grupo 1 de baixa peroxidação ($1,044 \pm 0,08$).

Figura 3 - Médias e erros padrão da média da atividade enzimática em plasma seminal ovino nos diferentes grupos experimentais quanto a peroxidação lipídica. A. Glutationa peroxidase. B. Glutationa redutase

Legenda: Grupos quanto a suscetibilidade a peroxidação lipídica: Grupo 1: baixa, Grupo 2: média, Grupo 3: alta e Grupo 4: altíssima. Letras diferentes indicam diferença estatística significativa.

Fonte: Hamilton, T.R.S (2014).

5.3.2 Efeito da peroxidação lipídica na avaliação imediata do sêmen, morfologia espermática, integridades de membranas plasmática e acrossomal e potencial de membrana mitocondrial do espermatozoide

Não foi observado efeito em relação ao volume, motilidade, vigor e concentração espermática nos grupos estudados. O grupo 4, com maior peroxidação lipídica, apresentou maior porcentagem de espermatozoides com defeitos totais ($14,70 \% \pm 2,51\%$) comparado ao grupo 1 ($8,22 \% \pm 1,37$), grupo 2 ($8,59 \% \pm 1,31$) e grupo 3 ($10,851 \% \pm 1,53$), além de um aumento da porcentagem de defeitos maiores, $11,05 \pm 2,29 \%$ comparado aos grupos 1, 2 e 3 ($4,16 \% \pm 0,90$, $4,203 \% \pm 0,59$ e $6 \% \pm 1,16$, respectivamente) (Figura 4B). Neste mesmo grupo (altíssima) houve também aumento na porcentagem de células com membranas acrossomal e plasmática lesadas ($30,96 \% \pm 1,69$ - Figura 4A). Verificou-se que os grupos com peroxidação lipídica média (grupo 2 - $20,022 \% \pm 1,71$) e alta (grupo 3 - $19,988 \% \pm 1,97$) apresentaram porcentagens menores de espermatozoides com baixo potencial de membrana mitocondrial comparado aos grupos 1 ($26,55 \% \pm 2,55$) e 4 ($25,054 \% \pm 2,6$).

Figura 4 - Médias e erros padrão das médias. A. Porcentagem de espermatozoides com membranas acrossomal e plasmática lesadas. B. Porcentagem de espermatozoides com defeitos maiores e defeitos totais

Legenda: Grupos quanto a suscetibilidade a peroxidação lipídica: Grupo 1: baixa, Grupo 2: média, Grupo 3: alta e Grupo 4: altíssima. Letras diferentes indicam diferença estatística significativa.

Fonte: : Hamilton, T.R.S (2014).

5.3.3 Efeito da peroxidação lipídica na protaminação espermática e expressão gênica

Nenhum efeito foi observado ao serem analisados possíveis falhas no processo de protaminação por marcação com o corante Cromomicina A3. No entanto, verificou-se diferenças na expressão gênica da PRM 1 e nas TNPs 1 e 2 nos diferentes grupos. Parece que a medida que há um aumento da suscetibilidade a peroxidação lipídica em espermatozoides ovinos, há um aumento do número de cópias de mRNA produzidas do gene da PRM 1 (Figura 5A), contudo não foi observado diferenças no número de cópias dos genes da TNP1 (Figura 5B) e TNP2 (Figura 5C).

Figura 5 - Média e erros padrão das médias do número de cópias de mRNA dos genes alvo em espermatozoides ovinos nos diferentes grupos experimentais quanto a peroxidação lipídica. A. Protamina 1 ovina. B. Proteína de transição 1 ovina. C. Proteína de transição 2 ovina

Legenda: Grupos quanto a suscetibilidade a peroxidação lipídica: Grupo 1: baixa, Grupo 2: média, Grupo 3: alta e Grupo 4: altíssima. Letras diferentes indicam diferença estatística significativa.

Fonte: Hamilton, T.R.S (2014).

5.3.4 Efeito da peroxidação lipídica na fragmentação do DNA espermático

O grupo com maior suscetibilidade a peroxidação lipídica também foi o grupo que apresentou maior porcentagem de células positivas coradas com laranja de acridina ($3,551 \% \pm 0,950$) *versus* os grupos 1 ($1,94 \% \pm 0,71$), 2 ($1,378 \% \pm 0,38$) e 3 ($1,985 \% \pm 0,598$) (Figura 6A). Observou-se aumento na porcentagem de espermatozoides com grau III de fragmentação de DNA espermático, pela técnica cometa alcalino, no grupo com maior suscetibilidade a peroxidação lipídica (Grupo 4 - $6,47 \% \pm 3,24$) (Figura 6B). Não houve diferença com relação aos demais graus de fragmentação de DNA.

Figura 6 - Médias e erros padrão das médias da porcentagem de espermatozoides positivos para laranja de acridina e fragmentação de DNA, segundo a técnica de cometa alcalino nos diferentes grupos experimentais quanto a peroxidação lipídica. A. Avaliação da cromatina. B. Fragmentação de DNA grau III por Cometa

Legenda: Grupos quanto a suscetibilidade a peroxidação lipídica: Grupo 1: baixa, Grupo 2: média, Grupo 3: alta e Grupo 4: altíssima. Letras diferentes indicam diferença estatística significativa. Fonte: Hamilton, T.R.S (2014).

5.3.5 Correlação entre as variáveis

As variáveis consideradas para avaliação dos atributos espermáticos (motilidade vigor, tubilhonamento e concentração) estão correlacionados de maneira positiva entre si e com a porcentagem de peróxido de hidrogênio intracelular, com a porcentagem de espermatozoides com defeitos de protaminação e com a porcentagem de espermatozoides com a cromatina mais suscetível a denaturação ácida (espermatozoides positivos corados com laranja de acridina). No entanto, se correlacionam de maneira negativa com a porcentagem de defeitos

totais. Este resultado nos indica que a medida que a viabilidade espermática diminui há um reflexo direto no aumento das espécies reativas de oxigênio intracelulares, que podem afetar negativamente o processo de protaminação, assim como aumentar a suscetibilidade da cromatina espermática a fragmentação. Em relação a suscetibilidade da cromatina espermática a denaturação ácida foi verificada correlação negativa entre as variáveis motilidade espermática, vigor, turbilhonamento, concentração espermática e porcentagem de espermatozoides com membranas acrossomal e plasmática íntegras. Já as variáveis atividade enzimática da glutathione peroxidase, peroxidação lipídica induzida e porcentagem de defeitos totais se correlacionam positivamente com a suscetibilidade da cromatina espermática a denaturação ácida. A medida que a peroxidação lipídica induzida aumenta nos espermatozoides há uma diminuição da expressão gênica da proteína de transição 2 e um aumento da expressão gênica da protamina 1 e da proteína de transição 1 em espermatozoides ovinos. Este resultado parece indicar que um quadro de estresse oxidativo influencia a expressão de genes envolvidos no processo de protaminação espermática. Se há maior vulnerabilidade do espermatozoide a fragmentação da cromatina durante um quadro de estresse oxidativo, esse poderia ser compensado pelo aumento da expressão gênica da PRM1 na tentativa de diminuir a suscetibilidade da cromatina, uma vez que a protamina compacta o DNA espermático e por fim o protege. Este quadro pode ser comprovado pelo fato do aumento da expressão gênica desse gene estar correlacionado com o aumento da imunodeteção de enzimas antioxidantes como a glutathione redutase no plasma seminal. Todas essas correlações podem ser visualizadas nos quadros de correlação apresentados nos Apêndices F, G, H, I, J e K. Baseado nesses resultados, um esquema hipotético de correlações entre peroxidação lipídica e as demais variáveis estudadas pode ser proposto (Figura 7).

Figura 7 - Modelo hipotético de correlações entre a peroxidação lipídica e as demais variáveis estudadas

Legenda: PRM1: Expressão Gênica da Protamina 1 ovina; TNP1: Expressão Gênica da Proteína de Transição 1 ovina. Linha tracejada: Indica tendência de correlação.

Fonte: Hamilton, T.R.S (2014).

Tabela 1 - Médias, erros padrão da média e valores de probabilidade das diferentes variáveis dependentes estudadas, por tratamento quanto a peroxidação lipídica

(continua)					
Variáveis Dependentes	<i>p</i>	GRUPO 1	GRUPO 2	GRUPO 3	GRUPO 4
Volume (mL)	0,06	1,02±0,04	1,170±0,04	1,1±0,053	1,014±0,02
Motilidade (%)	0,16	73,88±1,71	76,48±0,95	71,851±1,33	73,70±1,65
Vigor (0-5)	0,19	3,5±0,10	3,51±0,11	3,185±0,12	3,44±0,14
Turbilhonamento (1-5)	0,34	3,53±0,13	3,77±0,11	3,425±0,14	3,65±0,17
Defeitos Maiores (%)	0,001	4,16±0,90 ^a	4,203±0,59 ^a	6±1,16 ^a	11,05±2,29 ^b
Defeitos Menores (%)	0,72	4,05±0,81	3,596±0,899	4,851±1,018	3,648±0,74
Defeitos Totais (%)	0,055	8,22±1,37 ^a	8,59±1,31 ^a	10,851±1,53 ^{ab}	14,70±2,51 ^b
Cromomicina A3 (%)	0,43	1,87±0,51	5,25±2,82	6,64±2,341	4,537±1,52
Espermatozoides com acrossoma lesado e membrana íntegra (%)	0,99	2,39±0,47	3,43±1,21	2,761±0,73	1,99±0,34
Espermatozoides com acrossoma lesado e membrana lesado (%)	0,01	34,99±2,60 ^a	25,049±2,34 ^b	28,141±2,36 ^b	30,96±1,69 ^{ab}
Espermatozoides com acrossoma íntegra e membrana lesado (%)	0,87	36,2±1,64	34,431±2,35	34,159±1,735	34,937±1,44
Espermatozoides com acrossoma íntegra e membrana íntegra (%)	0,01	26,40±1,99 ^a	37,085±2,82 ^b	34,937±2,75 ^b	32,126±2,3 ^{ab}
Espermatozoides com Alta Atividade Mitocondrial (%)	0,88	39,788±3,97	42,985±3,34	39,27±3,400	40,942±3,55
Espermatozoides com Baixa Atividade Mitocondrial (%)	0,09	26,55±2,55 ^a	20,022±1,71 ^{ab}	19,988±1,97 ^b	25,054±2,6 ^{ab}
Espermatozoides com Atividade Mitocondrial Intermediária (%)	0,28	34,66±3,16	36,996±2,98	40,755±2,71	34,014±2,53
Marcação do Peróxido de hidrogênio intracelular por Diclorfluoresceína (%)	0,53	9,11±1,70	9,0881±1,95	6,057±1,60	9,583±2,27
Espermatozóides positivos para laranja de acridina (%)	0,10	1,94±0,71 ^{ab}	1,378±0,38 ^b	1,985±0,598 ^{ab}	3,551±0,950 ^a
Concentração espermática (x 10 ⁹ /mL)	0,13	4,47±0,24	4,290±0,212	3,94±0,293	3,597±0,243

(continua)

Variáveis Dependentes	<i>p</i>	GRUPO 1	GRUPO 2	GRUPO 3	GRUPO 4
TBARS induzido (ng/mL)	0,001	8,31±0,48 ^a	10,348±0,06 ^b	11,532±0,08 ^c	19,96±1,37 ^d
TBARS espontâneo (ng/mL)	0,28	246,08±15,8	215,728±14,7	261,88±13,7	217,12±18,9
Número de cópias do gene da Protamina 1 ovina (para cada 5ng de cDNA)	0,024	20,23±3,98 ^a	27,01±5,14 ^{ab}	18,23±3,99 ^a	35,76±4,54 ^b
Número de cópias do gene da Proteína de Transição 1 ovina (para cada 5ng de cDNA)	0,11	5,96±1,17	4,12±0,58	4,67±0,77	6,63±0,0,85
Número de cópias do gene da Proteína de Transição 2 ovina (para cada 5ng de cDNA)	0,39	0,35±0,05	0,35±0,004	0,45±0,07	0,46±0,04
Imunodeteção da Catalase (pixels /área)	0,01	1,044±0,08 ^a	1,437±0,104 ^b	1,424±0,118 ^b	1,313±0,12 ^b
Imunodeteção da Superóxido Dismutase (x 10 ¹¹ pixels /área)	0,47	2,49±0,409	2,401±0,684	2,84±0,574	1,379±0,620
Imunodeteção da Glutathione Redutase (pixels /área)	0,06	0,39±0,067 ^{ab}	0,247±0,06 ^b	0,259±0,055 ^b	0,498±0,094 ^a
Imunodeteção da Glutathione Peroxidase GPXBI (pixels /área)	0,26	0,556±0,086	0,741±0,148	0,869±0,135	0,622±0,069
Imunodeteção da Glutathione Peroxidase GPXBS (pixels /área)	0,36	0,406±0,02	0,387±0,04	0,377±0,019	0,482±0,085
Atividade Enzimática da Catalase (UI/mL)	0,67	0,0401±0,0068	0,055±0,01	0,0389±0,0070	0,036±0,015
Atividade Enzimática da Superóxido Dismutase (UI/mL)	0,44	0,120±0,004	0,128±0,0049	0,120±0,0074	0,111±0,009
Atividade Enzimática da Glutathione Redutase (UI/mL)	0,02	0,000052±0,000002 ^a	0,000039±0,000003 ^b	0,000039±0,0000043 ^b	0,0000475±0,0000053 ^{ab}
Atividade Enzimática da Glutathione Peroxidase (UI/mL)	0,05	0,000561±0,00004 ^a	0,000709±0,00004 ^b	0,000687±0,00003 ^b	0,000709±0,00006 ^b

(conclusão)					
Variáveis Dependentes	<i>p</i>	GRUPO 1	GRUPO 2	GRUPO 3	GRUPO 4
Fragmentação de DNA espermático Grau I (Cometa - %)	0,17	31,390±6,48	56,51±8,32	47,21±10,35	31,83±7,41
Fragmentação de DNA espermático Grau II (Cometa - %)	0,30	68,60±6,48	43,27±8,33	51,97±10,28	58,26±7,40
Fragmentação de DNA espermático Grau III (Cometa - %)	0,02	0 ^a	0 ^a	0,20±0,20 ^b	6,47±3,24 ^c
Fragmentação de DNA espermático Grau IV (Cometa - %)	0,64	0	0,205±0,142	0,600±0,520	0,654±0,502

Legenda: Grupos quanto a suscetibilidade a peroxidação lipídica: Grupo 1: baixa, Grupo 2: média, Grupo 3: alta e Grupo 4: altíssima. Letras diferentes indicam diferença estatística significativa.

Fonte: HAMILTON, T.R.S (2014).

5.4 DISCUSSÃO

O espermatozoide, como todas as células aeróbias, vive no constante paradoxo do oxigênio. O oxigênio é essencial para a vida; no entanto, metabólitos da respiração aeróbia, podem ser extremamente deletérios. Durante o processo de espermatogênese, as EROS são geradas pelo metabolismo do espermatozoide. No entanto, em momentos em que ocorre um acúmulo de EROS causando um desequilíbrio em relação a ação de moléculas antioxidantes, um quadro de EO pode ser observado, sendo este extremamente prejudicial a todos os componentes espermáticos. A manutenção do equilíbrio entre geração e neutralização de EROS acontece graças a capacidade antioxidante dos espermatozoides e do plasma seminal. Os antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos no plasma seminal protegem a membrana plasmática da peroxidação (LENZI et al., 2000; KANKOFER et al., 2005). Neste experimento foi verificado maior atividade enzimática da GPx nos grupos de média, alta e altíssima suscetibilidade a peroxidação lipídica. Estes dados concordam com os obtidos em trabalhos que estudaram a atividade dessas enzimas em sêmen de humano (ALVAREZ et al., 1987) e de ovinos (MARTÍ et al., 2003).

Marti et al. (2007) ao estudarem a atividade enzimática no sêmen ovino na estação reprodutiva e fora dela, observaram um aumento na atividade de SOD, GR, GPx e CAT fora

da estação reprodutiva. Indicando uma alta atividade antioxidante quando a qualidade espermática é menor, o que poderia manter o potencial reprodutivo quando as condições reprodutivas não fossem as ideais. A origem da GPx poderia justificar o comportamento de alta atividade quando em situação de estresse oxidativo. A GPx é secretada pela próstata e pelo epidídimo (OKAMURA et al., 1997), por serem duas vias em resposta ao estímulo oxidativo, a ativação enzimática aconteceria de maneira mais rápida que a das demais enzimas.

Em relação a imunodeteção das enzimas antioxidantes foi observado que a catalase apresenta aumento de expressão proteica nos grupos com maior suscetibilidade a peroxidação lipídica (Grupos 2, 3 e 4) comparado ao de baixa suscetibilidade. Leahy et al. (2010) ao estudarem espermatozoides ovinos que apresentavam maior suscetibilidade as EROs, verificaram que a suplementação com catalase aumentou a resistência das células frente ao estresse oxidativo. Este resultado explicaria o aumento da expressão proteica da catalase, no presente estudo, nos grupos com maior suscetibilidade a peroxidação lipídica. A catalase tem sido relatada como antioxidante para respostas mais diretas, como por exemplo em estresse agudo, por esta razão ocorreria aumento da expressão proteica, a nível epididimal, nos grupos mais suscetíveis a peroxidação lipídica.

Para a enzima GPx, embora tenha sido observado um aumento da atividade enzimática, não houve aumento da imunodeteção desta enzima nos grupos com maior suscetibilidade a peroxidação lipídica. O quadro de alta peroxidação lipídica estimula a via antioxidante principal da catálise do peróxido de hidrogênio, a ativação da GPx, o que justifica o aumento da atividade enzimática da GPx no plasma seminal, encontrado neste trabalho. Considerando-se que a via antioxidante por intermédio da GPx é mais eficiente, esta seria ativada antes de outras enzimas, como por exemplo a GR. Em decorrência, a GR estaria com atividade e detecção diminuída. Neste estudo foi verificado diminuição da imunodeteção e da atividade enzimática da enzima GR nos grupos com maior suscetibilidade a peroxidação lipídica, o que pode ser justificado pela ação mais eficiente e imediata da GPx.

O aumento da atividade enzimática da GPx e GR não acompanhado por aumento de expressão protéica poderia indicar que estas enzimas estariam biodisponíveis e seriam ativadas em caso de necessidade. De fato, um sistema que dependesse apenas de um mecanismo pós traducional de ativação protéica seria consideravelmente mais eficiente e rápido que a síntese de novas enzimas antioxidantes, evitando-se o início da reação em cadeia da oxidação, podendo ser uma regulação pós traducional. Este aumento de atividade enzimática não acompanhado por aumento na expressão protéica já foi observado em tecido

cardíaco submetido a deficiência antioxidante (LI; SINGAL, 2000). Além do aumento da quantidade de proteína produzida, há outros mecanismos de controle de atividade protéica, como a liberação de enzimas de áreas compartimentalizadas da célula, regulação por inibidores e ativadores, modulações covalentes e alterações do microambiente celular (JARROUGE et al., 1997). Estes mecanismos poderiam ter sido ativados pela indução de estresse térmico desenvolvido no presente estudo.

Altos níveis de EROS em espermatozoides tem sido relacionados com diminuição da motilidade (PERIS et al., 2007; AGARWAL; TVRDA; SHARMA, 2014) e com peroxidação de ácidos graxos insaturados presentes na membrana plasmática (GOMEZ; IRVINE; AITKEN, 1998). Alterações morfológicas e danos espermáticos tem sido observados em quadros de estresse oxidativo, já que a incidência de teratozoospermia pode estar diretamente associada com a produção excessiva de EROs no sêmen (AGARWAL; TVRDA; SHARMA, 2014). No presente trabalho, foi observado aumento na porcentagem de defeitos totais, em decorrência do aumento de defeitos maiores, e na porcentagem de lesões na membrana acrossomal e plasmática de espermatozoides pertencentes ao grupo com maior suscetibilidade a peroxidação lipídica.

A mitocôndria espermática está envolvida na produção de ATP por fosforilação oxidativa. Alguns estudos indicam uma clara relação entre a mitocôndria e as EROS (AITKEN; CLARKSON; FISHEL, 1989; ARGAWAL; MAKKER; SHARMA, 2008). Em situações nas quais há aumento das EROS, a mitocôndria é afetada. Da mesma forma, alterações na mitocôndria, principal fonte de EROS, desencadeiam a liberação de fatores pró-oxidativos, intensificando ainda mais a reação oxidativa em cadeia (MURPHY, 2009). Ferramosca et al. (2013), ao estudarem possíveis correlações entre estresse oxidativo e atividade mitocondrial em sêmen humano, relataram diminuição da atividade mitocondrial em pacientes que possuíam altos níveis de espécies reativas de oxigênio no sêmen. O estresse oxidativo afeta negativamente a atividade mitocondrial por um mecanismo de desacoplamento entre os transportadores de elétrons e a síntese de ATP. Neste estudo, com espermatozoides ovinos, foi possível verificar que os grupos com suscetibilidade a peroxidação lipídica alta e média apresentaram porcentagens menores de espermatozoides com baixo potencial de membrana mitocondrial, causado pelo aumento não significativo na porcentagem de espermatozoides com potencial intermediário. De fato, estudos em humanos verificaram que células apresentando atividade mitocondrial intermediária seriam indicadores mais precisos de problemas na relação EROS/mitocôndria do que células com alta ou baixa atividade (BLUMER et al., 2008). Possivelmente, estas células, ainda parcialmente ativas,

estariam liberando fatores pró-oxidativos ao meio extracelular, levando a danos oxidativos as células vizinhas. Também foi verificado alta correlação positiva entre a motilidade espermática e a alta atividade mitocondrial, sendo que essa por sua vez correlaciona-se negativamente com a peroxidação lipídica e com a suscetibilidade a fragmentação do DNA espermático.

O estresse oxidativo é considerado o principal causador de danos na cromatina espermática (SAKKAS; ALVAREZ, 2010). A integridade do DNA espermático é essencial para o desenvolvimento embrionário (FATEHI et al., 2006) e, por esta razão, o dano na cromatina tem sido associado a infertilidade, principalmente nos casos idiopáticos (SHARMA; AGARWALL, 1996). Neste trabalho pode ser observado que espermatozoides ovinos com altíssima suscetibilidade a peroxidação lipídica apresentaram alta suscetibilidade ao dano na cromatina. Esse resultado corrobora com os resultados descritos por Simões et al. (2013), nos quais amostras de sêmen congelado de bovino que apresentavam pouca suscetibilidade a peroxidação lipídica, apresentaram pouca suscetibilidade ao dano na cromatina. Estes autores também verificaram que embriões produzidos com estas amostras de altíssima suscetibilidade a peroxidação lipídica apresentaram mais danos de DNA, indicando a relevância da integridade do DNA espermático para o desenvolvimento de um indivíduo saudável.

Muitos pesquisadores tem relatado a presença de altas quantidades de RNA mensageiro (mRNA) da PRM1 em espermatozoides bovinos. Este fato não impressiona, uma vez que a PRM1 é a principal proteína responsável pela compactação do DNA espermático e quantidades remanescentes do mRNA proveniente da espermatogênese ainda podem ser encontrados (GILBERT et al., 2007). Lambard et al. (2004) encontraram altas quantidades de mRNA da PRM1 nas frações espermáticas de baixa motilidade em humanos. No entanto, Feugang et al. (2010) ao estudarem o transcriptoma de espermatozoides bovinos de touros de alta e baixa fertilidade encontram expressão semelhante da PRM1 entre os grupos.

Neste experimento foi observado aumento do número de cópias de mRNA da PRM1 no grupo de espermatozoides com maior suscetibilidade a peroxidação lipídica. Uma das justificativas destes achados seria de que o espermatozoide, durante o trajeto no trato genital feminino, possua baixa atividade de transcrição, sendo esta transitória, somente na tentativa de substituir algumas protaminas que possam apresentar defeitos. Como no grupo 4, o de altíssima suscetibilidade a peroxidação lipídica, houve maior produção de EROS, este fato poderia comprometer a transcrição gênica e, portanto, aumentar a produção de protaminas

defeituosas. Como consequência, o espermatozoide aumentaria a atividade da PRM1 na tentativa de substituir essas proteínas defeituosas (FEUGANG et al., 2010) e proteger o DNA.

Com estes resultados podemos concluir que espermatozoides ovinos com alta susceptibilidade a peroxidação lipídica possuem aumento da atividade e imunodeteção das enzimas antioxidantes no plasma seminal, diminuição de atributos espermáticos e diminuição da atividade mitocondrial com aumento da suscetibilidade a fragmentação de DNA espermático e aumento da atividade transcricional da protamina 1 e da proteína de transição 1 na tentativa de proteger a cromatina espermática. Sendo portanto, o estresse oxidativo uma das causas principais de dano a cromatina nesta espécie.

***EFEITO DO ESTRESSE TÉRMICO TESTICULAR NOS
ATRIBUTOS ESPERMÁTICOS E STATUS OXIDATIVO
NO SÊMEN E EM ESPERMATOZOIDES
EPIDIDIMAIS DE OVINOS***

6 EFEITO DO ESTRESSE TÉRMICO TESTICULAR NOS ATRIBUTOS ESPERMÁTICOS E STATUS OXIDATIVO NO SÊMEN E EM ESPERMATOZOIDES EPIDIDIMAIS DE OVINOS

6.1 FUNDAMENTAÇÃO

O testículo é o órgão do sistema reprodutivo masculino responsável pela produção de espermatozoides por um mecanismo denominado espermatogênese. Para o sucesso da espermatogênese, a temperatura testicular deve ser cerca de 2 a 8 °C menor que a temperatura corporal e este mecanismo é controlado por um sistema de resfriamento composto por escroto, plexo pampiniforme e musculatura (SENGER, 2003). Uma maior temperatura ocasiona aumento no metabolismo testicular, o que não é acompanhado pelo aumento no fluxo sanguíneo, reduzindo a capacidade de transporte de oxigênio e gerando uma situação de hipóxia. Por si só, esta hipóxia já é deletéria, no entanto, no momento em que ocorre normalização da temperatura e revascularização, similar ao que ocorre em órgãos transplantados (REYES et al., 2012; WUGANG HOU et al., 2012), gera-se um desequilíbrio oxidativo, ocasionando o quadro conhecido por síndrome hipóxia-reperfusão. Corroborando esta hipótese alguns trabalhos verificaram diminuição da fertilidade devido a supressão da função testicular em condições de estresse térmico, relatada em touros (NICHII et al., 2006), em camundongos (PAUL; TENG; SAUNDERS, 2009) e em homens acometidos por varicocele (FLEMING et al., 2004; BLUMER et al., 2008). A maioria dos estudos convergem para a conclusão de que o principal mecanismo responsável pelos danos causados pelo estresse térmico é o estresse oxidativo. No entanto, o exato mecanismo pelo qual este estresse ocorre, seja por um aumento das espécies reativas de oxigênio (EROS) ou uma diminuição dos mecanismos antioxidantes, é ainda desconhecido.

O estresse oxidativo é definido como um distúrbio no equilíbrio entre moléculas pró-oxidantes e moléculas antioxidantes, em favor das pró-oxidantes, acarretando danos oxidativos nas biomoléculas (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007). De fato, a produção excessiva de espécies reativas de oxigênio tem sido relacionada as diversas patologias, como artrite, alterações em tecido conjuntivo, câncer, infecções e síndromes de imunodeficiência (SIKKA; RAJASEKARAN; HELLSTROM, 1995).

Os espermatozoides são células altamente sensíveis ao estresse oxidativo uma vez que possuem membrana plasmática com altos níveis de ácidos graxos poliinsaturados (PUFAS), mais suscetíveis ao dano oxidativo, e citoplasma reduzido, o que limita a quantidade de antioxidantes intracelulares, principalmente os enzimáticos (VERNET; AITKEN; DREVET, 2004). Em espermatozoides, o estresse oxidativo afeta a estrutura e a função da membrana. Consequentemente, algumas funções espermáticas, necessárias para fecundação normal, ficam comprometidas. A perda da fluidez da membrana causa diminuição da motilidade espermática e da fusão espermatozoide-oócito (JONES; MANN, 1977; KOOPERS et al., 2008). Espécies reativas de oxigênio foram correlacionadas negativamente com motilidade espermática, e positivamente com incidência de fragmentação de DNA espermático em homens inférteis com altos níveis de espécies reativas de oxigênio no plasma seminal (MAHFOUZ et al., 2010). Espermatozoides ovinos produzem altos níveis de peróxido de hidrogênio, destacando-se por apresentar altas proporções de ácidos graxos poliinsaturados/saturados e baixas proporções de colesterol/fosfolipídios na membrana plasmática, quando comparado com outras espécies. Esta relação pode gerar alteração de membrana que tornará o espermatozoide mais suscetível ao dano peroxidativo na presença de EROS, com subsequente perda da integridade da membrana e do acrossoma (ALVAREZ; STOREY, 1992).

Em relação a capacidade antioxidante no espermatozoide e no plasma seminal, uma variedade de antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos presentes no plasma permite a manutenção do equilíbrio entre a geração e neutralização das EROS. De fato, estudos com peroxidação lipídica e enzimas antioxidantes em homens férteis e inférteis indicaram um aumento da atividade enzimática de SOD e GPx como forma de controlar possíveis injúrias causadas por EROS (DANDEKAR et al., 2002). Muitos trabalhos tem descrito a contribuição do epidídimo na atividade antioxidante no plasma seminal protegendo o espermatozoide do dano oxidativo durante o tempo de estocagem neste órgão (POTTS; JEFFERIES; NOTARIANNI, 1999). Neste contexto, o estudo desta atividade antioxidante em ambiente epididimário pode trazer informações sobre o funcionamento deste mecanismo numa situação de estresse térmico.

A relação entre os atributos espermáticos e a atividade antioxidante presente no plasma seminal e nos espermatozoides em condição de estresse oxidativo, em ovinos, é pouco descrita. Pouco se sabe também da contribuição do epidídimo na manutenção do equilíbrio oxidativo durante esse estresse, evitando danos ao espermatozoide que está estocado ou em processo de maturação.

Neste contexto, o objetivo deste trabalho foi avaliar como o estresse térmico, induzido por insulação testicular em ovinos, afeta os atributos espermáticos e a atividade antioxidante enzimática em espermatozoides ejaculados e epididimários; e imunodetectar e quantificar a atividade das enzimas antioxidantes no plasma seminal.

6.2 MATERIAL E MÉTODOS

Todos os procedimentos foram aprovados pela comissão de ética no uso de animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (2445-2011).

6.2.1 Experimento 1

Doze carneiros mestiços Santa Inês, com oito meses de idade, foram utilizados num delineamento inteiramente casualizado com medidas repetidas no tempo. Os animais foram distribuídos aleatoriamente em dois grupos, seis submetidos a insulação testicular (tratado) e os outros seis animais compuseram o grupo controle. Aos animais do grupo tratado foi colocado uma bolsa insuladora, composta por material isolante, nos testículos, com objetivo de estimular o estresse térmico com consequências na espermatogênese. As bolsas foram mantidas por 288 horas consecutivas. Durante os dias de insulação testicular, a temperatura interna da bolsa foi monitorada com auxílio de termômetro digital, no grupo tratado a média da temperatura foi de $33,29\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0,34$ e no grupo controle $28,05\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1,30$, a média da temperatura ambiental e umidade relativa do ar no período foi $17,01\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0,52$ e $78,08\text{ \%} \pm 0,73$. Após a retirada das bolsas iniciaram-se as colheitas de sêmen semanais, durante 9 semanas, por vagina artificial específica para ovinos.

6.2.1.1 Avaliações dos atributos e morfologia espermática

Após a colheita do sêmen, o mesmo foi avaliado quanto ao volume seminal (mL), vigor (1 – 5), motilidade (%), turbilhonamento (0 – 5) e morfologia espermática, conforme descrito no tópico 5.2.3.

6.2.1.2 Avaliação da integridade de membranas plasmática e acrossomal, potencial de membrana mitocondrial, e marcação intracelular de espécies reativas de oxigênio no espermatozoide

Os espermatozoides diluídos em meio TALP foram utilizados para avaliação das integridades das membranas plasmática e acrossomal e atividade mitocondrial por citometria de fluxo capilar, como já descrito no tópico 5.2.4. Para avaliação dos radicais livres intracelulares foi utilizado citometria de fluxo capilar e o corante diclorofluoresceína (2',7' diacetato de diclorofluoresceína - DCF), como já descrito no tópico 5.2.2.1.

6.2.1.3 Atividade enzimática no plasma seminal

Cerca de 500 µL de sêmen fresco foi centrifugado a 5°C por 10 minutos a intensidade de centrifugação de 6000 g, para obtenção do plasma seminal. O plasma seminal foi congelado a -20°C para que todas as análises fossem realizadas juntamente. A quantificação da atividade enzimática das enzimas SOD, GPx, GR e catalase foi realizada conforme descrito no tópico 5.2.2.2.

6.2.1.4 Gel de eletroforese SDS-polyacrylamide e Western Blotting de enzimas antioxidantes em plasma seminal ovino

Após quantificação das proteínas plasmáticas, a imunodeteção das enzimas antioxidantes foi realizada conforme técnica descrita no tópico 5.2.2.3.

6.2.1.5 Análise de peroxidação lipídica no plasma seminal (TBARS espontâneo) e intracelular (TBARS induzido)

Foram quantificadas as Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico (TBARS) presentes no plasma seminal e dentro dos espermatozoides, baseando-se na metodologia descrita por Ohkawa et al. (1979). Para determinação do TBARS no plasma seminal, após precipitação das proteínas, cerca de 700 μL do sobrenadante foi congelado a -20°C para posterior análise, já descrita no tópico 5.2.2.4.

Para a quantificação das TBARS intracelulares, cerca de 10 milhões de espermatozoides foram diluídos em 200 μL de PBS sem cálcio e magnésio e induzidas ao estresse oxidativo com sulfato de ferro 4mM e ascorbato 20mM, a 37°C por 90 minutos, conforme descrito por Simões et al. (2013). Após incubação, adicionou-se 600 μL de ácido tricloroacético 10%, gelado e prosseguiu-se a centrifugação a 16000 g por 10 minutos, a 5°C . Cerca de 800 μL do sobrenadante foi congelado a -20°C para análise posterior.

Os resultados foram comparados com uma curva padrão, feita previamente com malondialdeído. A concentração de TBARS foi determinada utilizando-se o valor $1,56 \times 10^5 \times \text{M}^{-1} \text{mL}^{-1}$ como coeficiente de extinção molar do malondialdeído. A peroxidação lipídica no sêmen expressou-se em nanogramas de TBARS/ml de sêmen ou para cada 10 milhões de espermatozoides.

6.2.2 Experimento 2

Após finalização do primeiro experimento, os mesmo animais, distribuídos nos mesmos grupos experimentais foram submetidos a um segundo período de insulação testicular (animais do grupo tratado), agora por 240 horas. Foi considerado como objeto de estudo o efeito agudo e o efeito tardio do estresse oxidativo nos espermatozoides epididimais. Desta forma, a mesma unidade experimental (animal) sofreu duas orquiectomias unilaterais, uma no dia 7 (D7) do ciclo espermático e outra no dia 30 (D30). Vinte quatro horas após a retirada da bolsa insuladora foi realizada a primeira orquiectomia unilateral dos animais, no D7, com a retirada do testículo e epidídimo esquerdo. Para permitir a comparação entre os estágios dos ciclo espermático, no D30, foi realizada a segunda orquiectomia unilateral com retirada do testículo e epidídimo direito.

Considerou-se como medida de comparação no tempo a primeira e a segunda orquiectomia unilateral, dentro de cada unidade experimental, que neste caso é o animal.

A orquiectomia foi realizada conforme descrito no Apêndice L. Após a cirurgia, os epidídimos foram imediatamente levados ao laboratório de Biologia do Sêmen protegido por compressas cirúrgicas estéreis, e em seguida lavados em solução salina a 37°C. Foram realizadas pequenas incisões com lâmina de bisturi na cauda do epidídimo, e aplicada pressão na base deste usando pinça hemostática, sendo os espermatozoides coletados com auxílio de pipeta automática (NICHII et al., 2007). Com o intuito de evitar contaminação sanguínea, a dissecação foi executada cuidadosamente evitando cortes em vasos sanguíneos e tecidos desnecessários. Os espermatozoides foram ressuspensos em PBS para realização de concentração espermática.

6.2.2.1 Análise de motilidade espermática computadorizada

Para quantificação da motilidade do sêmen proveniente do epidídimo foi utilizado a análise computadorizada com o sistema Computer Assisted Sperm Analysis (CASA) da Hamilton Thorne IVOS.

As câmaras (Standart Count 4 chanber slide, 20 micron, Leja®) aquecidas a 37°C foram preenchidas com 6µL de amostra (cerca de 5×10^7 células/mL) e 5 campos foram selecionados para análise, sendo avaliado aproximadamente 1 milhão de espermatozoides totais. Os parâmetros utilizados para a seleção dos campos foram ausência de grumos e ausência de aglutinações.

O setup utilizado foi: Image capture: frames per sec = 60 Hz, número de frames = 45. Cell Detection: minimum contrast = 70, minimum cell size 5 pix. Defaults: cell size = 10 pix, cell intensity = 80. Progressive Cells: path velocity (VAP) = 50 µ/s, straightness (STR) = 80%. Slow Cells: VAP cutoff = 20 µ/s, VSL cutoff = 5 µ/s. Static intensity gates = minimum 0,20 e maximum 1,92. Static size gates = minimum 0,60 e maximum = 4,32. Static elongation gates = minimum 7 e maximum 91.

Foram avaliados os parâmetros: velocidade média de percurso (VAP, µm/s), velocidade curvilínea (VCL, µm/s), velocidade linear progressiva (VSL, µm/s), coeficiente de linearidade (LIN, %), coeficiente de retilinearidade (STR, %), amplitude de deslocamento lateral da cabeça (ALH, µm), frequência de batimento cruzado (BCF, Hz), motilidade total (%) e progressiva (%), porcentagem de células com movimento rápido, médio, lento e estático.

6.2.2.2 Avaliação da integridade de membranas plasmática e acrossomal, potencial de membrana mitocondrial, e marcação intracelular de espécies reativas de oxigênio no espermatozoide

Procedeu-se as análises conforme descrito no tópico 6.2.1.2.

6.2.2.3 Atividade enzimática intracelular

Uma vez que o sêmen proveniente do epidídimo não possui plasma seminal, foi realizada a quantificação da atividade enzimática antioxidante intracelular.

Após extração dos espermatozoides epididimais, os mesmos foram congelados a -196°C após serem diluídos em BotuBov® (Botupharma Biotecnologia Animal). Foi realizada curva de congelamento padrão (37°C a 5°C em 2 horas com queda de $-0,25^{\circ}\text{C}/\text{minuto}$, 3 horas e 45 minutos em tempo de equilíbrio, -20°C com queda de $-5^{\circ}\text{C}/\text{minuto}$, -196°C com queda de $125^{\circ}\text{C}/\text{minuto}$). O intuito da congelamento foi realizar a quantificação simultânea de todas as amostras. Para tanto, a remoção do diluidor foi realizada por adição de 1 mL do sêmen diluído (750 μL de sêmen em 3 mL de TALP-sêmen) cuidadosamente sobre 7,5 mL de solução de sacarose (NaCl 0,9%, sacarose 7,5% e glucose 0,18%). Após duas centrifugações seguidas (200 g / 5 minutos e 900 g / 10 minutos), o sobrenadante foi descartado. Cerca de 1 mL do material aderido no fundo do tubo foi incubado com 200 μL de Triton 4% por 30 minutos em banho Maria com agitação. As amostras foram novamente centrifugadas (600 g / 8 minutos) e o sobrenadante removido e armazenado a -20°C , para posterior análise.

A quantificação da atividade antioxidante intracelular das enzimas SOD e GPx foi realizada conforme Nichi et al. (2006). A atividade da SOD foi medida indiretamente por redução do citocromo C pelo superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$), gerado pelo sistema xantina oxidase / xantina. A SOD presente na amostra vai competir com o citocromo C pela conversão de superóxido em peróxido de hidrogênio. A absorbância foi acompanhada por 5 minutos em espectrofotômetro equipado com regulador de temperatura e mantido a 25°C . A atividade enzimática da GPx foi baseada no consumo de NADPH pela conversão da GSSH em GSH. Foi induzida uma reação entre o peróxido de hidrogênio e glutathione reduzida (GSH), catalisada pela GPx e pela enzima glutathione redutase (GR). O consumo de NADPH foi detectado a um comprimento de onda de 340 nm, por 10 minutos a 37°C (medições a cada 5 segundos). Os resultados de GPx foram expressos em unidades de GPx / mL de amostra, e para os cálculos foi utilizado o coeficiente de extinção molar do NADPH ($6,22 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

6.2.2.4 Análise de peroxidação lipídica intracelular (TBARS intracelular)

Procedeu-se esta análise como descrito no tópico 6.2.1.5.

6.2.3 Análise estatística

As variáveis dependentes foram analisadas pelo programa *SAS System 9.3* (SAS Institute, Cary, NC). Todos os dados foram quanto a normalidade dos resíduos e homogeneidade das variâncias. No caso de premissas estatísticas não obedecidas, os mesmos foram transformados. No experimento 1 foi utilizado o procedimento MIXED para análise de variância com medidas repetidas no tempo. A comparação de médias das diferentes variáveis dependentes para cada condição do modelo estatístico (tratamento, semana e interação tratamento x semana) foi calculada pelo método dos quadrados mínimos (procedimento LSMEANS). Para dados não paramétricos foi utilizado análise de variância não paramétrica (KRUSKAL WALLIS, pelo procedimento NPAR1WAY), e a comparação de médias por comparação de dois grupos por vez (WILCOXON). No experimento 2 foi utilizado análise de variância pelo procedimento GLM considerando o fatorial 2x2. Os fatores consideraram o efeito de tratamento (grupo controle *versus* grupo tratado) e o efeito agudo e tardio dos danos induzidos pelo estresse térmico (primeira e segunda orquiectomia unilateral), com posterior comparação de médias pelo método LSD. Utilizou-se nível de significância de 5% para rejeitar a hipótese de nulidade.

6.3 RESULTADOS

6.3.1 Experimento 1

Os valores de médias, erros padrão das médias e probabilidade para as variáveis analisadas são apresentados nos apêndices M (efeitos de tratamento), N (efeito de semana) e O (efeito de interação tratamento x semana).

6.3.1.1 Avaliação imediata e morfologia espermática

Observou-se efeito de tratamento (controle *versus* tratado) dentro de cada semana (1 a 9) para as variáveis motilidade espermática, vigor espermático, turbilhonamento e

porcentagem de espermatozoides com defeitos menores. Para motilidade (Figura 8A), vigor (Figura 8B) e turbilhonamento espermático (Figura 8C) foi verificado uma diminuição da porcentagem de células móveis no grupo tratado, até a 5ª semana experimental. A partir da sexta semana estas diferenças entre os grupos não foram mais observadas, o que pode indicar uma resposta de recuperação das células ao estresse térmico. Pode ser observado, para a porcentagem de espermatozoides com defeitos maiores, um aumento significativo no grupo tratado [2,5 (1,5; 4,5) - Figura 9A] comparado ao grupo controle [2 (1,5; 3)]. Em relação aos defeitos menores, o grupo tratado apresentou maiores porcentagens comparado ao grupo controle até a quarta semana experimental (Figura 9B e 9C).

Figura 8 - Gráfico para efeito de tratamento por semana, médias e erros padrão das médias para: A. Motilidade espermática, B. Vigor espermático e C. Turbilhonamento

Legenda: C = controle, T = tratado, * Diferença estatística significativa ($p < 0,05$).

Fonte: Hamilton, T.R.S (2014).

Figura 9 - A. Gráfico boxplot para efeito de tratamento, para a variável porcentagem de espermatozoides com defeitos maiores. B. Gráfico boxplot para efeito dos tratamentos por semana, para a variável porcentagem de espermatozoides com defeitos menores. C. Gráfico de medianas para visualização do efeito de tratamento por semana, para variável porcentagem de espermatozoides com defeitos menores.

Legenda: C = controle, T = tratado, * Diferença estatística significativa ($p < 0,05$).

Fonte: Hamilton, T.R.S (2014).

6.3.1.2 Avaliação da integridade de membranas plasmática e acrossomal, e potencial de membrana mitocondrial do espermatozoide

Observou-se um aumento da porcentagem de espermatozoides com alterações na membrana plasmática e acrossomal (Figura 10B), no grupo tratado ao longo das 9 semanas experimentais, de maneira complementar foi verificado diminuição na porcentagem de espermatozoides com membranas plasmática e acrossomal íntegras neste mesmo grupo (Figura 10A). Para a porcentagem de espermatozoides com apenas lesão acrossomal, não foram observados efeitos do tratamento, somente efeito de tempo (semanas), na qual na sétima semana as porcentagens foram maiores comparadas as demais semanas. Para a porcentagem de espermatozoides com apenas lesão de membrana, verificou-se que no grupo tratado, as porcentagens foram maiores a partir da sexta semana experimental comparada as demais.

Para avaliação do potencial de membrana mitocondrial foram observados efeitos somente na variável alto potencial de membrana mitocondrial, no qual o grupo tratado apresentou menor porcentagens comparado ao grupo controle, ao longo das nove semanas experimentais (Figura 11A e 11B).

Figura 10 - Gráfico de médias e erros padrão das médias para efeito dos tratamentos por semana: A. Porcentagem de espermatozoides com membranas plasmática e acrossomal íntegras, B. Porcentagem de espermatozoides com membranas plasmática e acrossomal lesadas

Legenda: C = controle, T = tratado, * Diferença estatística significativa ($p < 0.05$).

Fonte: Hamilton, T.R.S (2014).

Figura 11 - A. Gráfico boxplot para efeito dos tratamentos por semana, para variável porcentagem de espermatozoides com alto potencial de membrana mitocondrial. B. Gráfico de medianas para visualização do efeito de tratamentos por semana, para variável porcentagem de espermatozoides com alto potencial de membrana mitocondrial

Legenda: C = controle, T = tratado, * Diferença estatística significativa ($p < 0,05$).
Fonte: Hamilton, T.R.S (2014).

6.3.1.3 Marcação intracelular de radicais livres

Constatou-se um aumento na porcentagem de células coradas por diclorfluoresceína no grupo tratado comparado ao grupo controle ($5,60 \pm 2,09$ versus $3,35 \pm 0,6$, respectivamente - Figura 12A). Sendo que a maior diferença entre os grupos foi observada na semana sete (Figura 12B).

Figura 12 - Gráficos de médias e erros padrão da média para variável porcentagem de espermatozoides positivos para diclorfluoresceína. A. Efeito de tratamento B. Efeito dos tratamentos por semana

Legenda: C = controle, T = tratado, * Diferença estatística significativa ($p < 0,05$).
Letras diferentes indicam diferença estatística significativa.
Fonte: Hamilton, T.R.S (2014).

6.3.1.4 Atividade enzimática e Western-Blot em plasma seminal

Houve um aumento na atividade enzimática da glutathiona peroxidase ($0,00120 \text{ UI/ml} \pm 0,000069$) no grupo tratado, comparado ao grupo controle ($0,00096 \text{ UI/ml} \pm 0,000070$) (Figura 13A) e na atividade da glutathiona redutase, também no grupo tratado ($0,000081 \text{ UI/ml} \pm 0,0000048$) comparado ao grupo controle ($0,000043 \text{ UI/ml} \pm 0,00000221$) (Figura 13B). Não foram observadas diferenças entre os grupos na atividade enzimática da superóxido dismutase e da catalase.

Nenhuma diferença foi observada na imunodeteção dessas mesmas enzimas estudadas para efeito de tratamento e de interação. Para imunodeteção da catalase e da glutathiona peroxidase também não foi observado efeito de tempo.

Figura 13 - Médias e erros padrão das médias da atividade enzimática para efeito de tratamento: A. Glutathiona peroxidase. B. Glutathiona redutase

Legenda: C = controle, T = tratado. Letras diferentes indicam diferença estatística significativa.
Fonte: Hamilton, T.R.S (2014).

6.3.1.5 Peroxidação lipídica no plasma seminal e no espermatozoide

Não foram observadas diferenças nos grupos controle e tratado na quantificação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico no plasma seminal. Porém, foi possível observar efeito de semana, independente do tratamento, para a quantificação de TBARS na célula espermática (Figura 14A) e no plasma seminal (Figura 14B).

Figura 14 - Médias e erros padrão das médias da peroxidação lipídica, em ng/ml, ao longo das semanas experimentais. A. Plasma seminal (TBARS espontâneo), B. Espermatozoides (TBARS induzido)

Letras diferentes indicam diferença estatística significativa.

Fonte: Hamilton, T.R.S (2014).

6.3.2 Experimento 2

Os valores de médias, erros padrão das médias e probabilidade para os efeitos analisados estão apresentados nos apêndices P (efeitos de tratamento), Q (efeito agudo e tardio dos danos induzidos pelo estresse térmico) e R (efeito de interação tratamento x efeito agudo e tardio).

6.3.2.1 Análise de motilidade computadorizada

Não foram observadas diferenças entre os grupos para efeito de tratamento e para avaliação de efeito agudo e tardio do estresse térmico no testículo, em nenhum dos parâmetros mensurados pelo sistema de análise de motilidade computadorizada (HAMILTON THORNE®).

6.3.2.2 Avaliação da integridade de membranas plasmática e acrossomal, e potencial de membrana mitocondrial e marcação intracelular de radicais livres no espermatozoide epididimal

Não foram observadas diferenças em nenhuma das 4 categorias celulares referentes as membranas plasmática e acrossomal, entre os grupos controle e tratado, assim como na comparação entre o efeito agudo e tardio do estresse térmico nos espermatozoides epididimais, com utilização combinada dos fluóforos IP/FITC - PSA em citometria de fluxo.

Um aumento da porcentagem de espermatozoides com potencial de membrana mitocondrial intermediário ($29,96\% \pm 4,71$ *versus* $18,41\% \pm 1,45$) e baixo ($9,04\% \pm 2,06$ *versus* $4,15\% \pm 1,35$), foi verificado ao serem corados com JC1 e analisados por citometria de fluxo, no grupo tratado comparado ao grupo controle (Figuras 15B e 15C). De maneira complementar, pode ser observado um aumento na porcentagem de espermatozoides com alto potencial de membrana mitocondrial no grupo controle em comparação ao grupo tratado ($78,39\% \pm 2,29$ *versus* $61\% \pm 5,62$) (Figura 15A). Não foram observadas diferenças em relação ao efeito agudo e tardio do estresse térmico nas porcentagens de espermatozoides com potencial de membrana mitocondrial alto, intermediário e baixo.

Verificou-se aumento na porcentagem de espermatozoides com marcação positiva para diclorofluoresceína, por citometria de fluxo, no grupo tratado comparado ao grupo controle ($2,27\% \pm 0,56$ *versus* $1,10\% \pm 0,33$) (Figura 16).

Figura 15 - Média e erros padrão das médias das porcentagens de espermatozoides epididimais com diferentes potenciais de membrana mitocondrial, nos diferentes tratamentos. A. Potencial de membrana mitocondrial alto, B. Potencial de membrana mitocondrial intermediário, C. Potencial de membrana mitocondrial baixo

Letras diferentes significam diferença estatística significativa.

Fonte: Hamilton, T.R.S (2014).

Figura 16 - Média e erro padrão da média da porcentagem de espermatozoides epididimais com marcação positiva para diclorofluoresceína (marcação de EROS intracelular), nos grupos controle e tratado

Letras diferentes indicam diferença estatística significativa.

Fonte: Hamilton, T.R.S (2014).

6.3.2.3 Atividade enzimática intracelular

Não foram observadas diferenças na atividade enzimática da glutathiona peroxidase e superóxido dismutase intracelular nos espermatozoides epididimais entre o grupo controle e o grupo tratado (Figura 17A e 17B). Não foram detectadas diferenças em relação ao efeito agudo e tardio do estresse térmico na atividade dessas mesmas enzimas (Figura 17C e 17D).

Figura 17 - Médias e erros padrão das médias da atividade enzimática em espermatozoides epididimais. A. GPx para efeito de tratamento, B. SOD para efeito de tratamento, C. GPx na comparação entre efeito agudo e efeito tardio do estresse térmico, D. SOD na comparação entre efeito agudo e efeito tardio do estresse térmico

Fonte: Hamilton, T.R.S (2014).

6.3.2.4 Peroxidação lipídica em espermatozoides do epidídimo

Não foram observadas diferenças na quantidade de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico nos grupos avaliados (controle *versus* tratado) (Figura 18A) e na comparação entre efeito agudo e tardio do estresse térmico (Figura 18B) na peroxidação lipídica no espermatozoide.

Figura 18 - Médias e erros padrão das médias da peroxidação lipídica, em ng/ml, em espermatozoides epididimais submetidos ao estresse térmico. A. Comparação para efeito de tratamento (controle *versus* tratado), B. Comparação para efeito de tempo (agudo *versus* tardio)

Fonte: Hamilton, T.R.S (2014).

6.4 DISCUSSÃO

Muitos autores tem relatado diminuição da motilidade, concentração e viabilidade espermática em murinos (PÉREZ-CRESPO; PINTADO; GUTIÉRREZ-ADÁN, 2008), bovinos (FIELDS et al., 1979; BARROS et al., 2006; NICHI et al., 2006; RAHMAN et al., 2011), humanos (THONNEAU et al., 1998) e ovinos (VOGLMAYR; SETCHELL; WHITE, 1971; WILLIAMSON, 1974) quando estes são submetidos ao estresse térmico. Neste trabalho foi observado uma diminuição da motilidade, vigor e turbilhonamento até a quinta semana experimental, e um aumento na porcentagem de defeitos maiores e menores. Foram observados também lesões na membrana acrossomal e plasmática em espermatozoides provenientes do ejaculado, no grupo tratado comparado ao grupo controle. Neste caso, o estresse térmico prejudicou a qualidade espermática durante aproximadamente 1 ciclo espermático (47 dias), uma vez que a partir da sexta semana experimental não foram

observadas diferenças nessas variáveis quando comparadas com o grupo controle, indicando uma recuperação nos possíveis danos causados pelo estresse térmico.

Os lipídios presentes na membrana plasmática na forma de PUFAS são as moléculas mais susceptíveis a peroxidação (WALCZAK-JEDRZEJOWSKA; WOLSKI; SLOWIKOWSKA-HILCZER, 2013) e tem sido associada a maior causa de diminuição da motilidade em espermatozoides em decorrência do aumento nas concentrações de EROS (SULEIMAN et al., 1996; PERIS et al., 2007; FERRAMOSCA et al., 2013; AGARWAL; TVRDA; SHARMA, 2014). O aumento de EROS também tem sido associado as alterações morfológicas e teratozoospermia em espermatozoide (AGARWAL; TVRDA; SHARMA, 2014). A extensão do dano depende da natureza, da quantidade de EROS envolvidas, da duração da exposição e de fatores extra celulares como temperatura e tensão de oxigênio (WALCZAK-JEDRZEJOWSKA; WOLSKI; SLOWIKOWSKA-HILCZER, 2013). Apesar das diferenças encontradas nos espermatozoides provenientes do ejaculado, neste presente estudo, após a segunda insulação testicular, não foram observadas diferenças nos espermatozoides epididimais. Uma possível explicação para tal fato seria a de que as células suscetíveis aos danos causados pelas EROS foram, provavelmente, eliminadas após o estresse da primeira insulação (experimento 1), restando células mais resistentes para a segunda indução (experimento 2). Estas células mais resistentes parecem ter passadas ilesas pelo estresse térmico induzido, não sendo observadas alterações de motilidade e de integridade de membrana plasmática e acrossomal. A apoptose poderia ser o mecanismo envolvido nesta eliminação, no entanto um delineamento experimental mais direcionado ao estudo deste mecanismo, sob influência do estresse térmico, seria necessário para confirmar essa hipótese.

Em relação a avaliação do status oxidativo, apesar de não ter sido observado nenhuma diferença na quantificação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico no plasma seminal, foi observada uma maior atividade enzimática da glutathione peroxidase e da glutathione reductase no grupo tratado quando comparado ao controle. Alguns estudos tem correlacionado o aumento da atividade da GPx em situações no qual o estresse oxidativo está relacionado com causas de processos patológicos, como, por exemplo, em mulheres com pré eclâmpsia (SHARMA et al., 2006), pacientes com Síndrome de Down (GARAIÓVÁ et al., 2004), estresse pós exercício (BARCELOS et al., 2014; BOUZID et al., 2014) e mesmo em infertilidade (GIANNATTASIO et al., 2002; MAIORINO et al., 2003). De fato, em estudos comparando homens férteis e inférteis foi verificado aumento, em 10 vezes, na atividade da GPx no último grupo (GARRIDO et al., 2004) indicando que esta enzima pode servir como marcador de situações na qual o balanço oxidativo tenha sido comprometido. Este aumento da

atividade da GPx viria em resposta a um aumento das EROS, em especial ao peróxido de hidrogênio. Neste presente estudo, efetivamente, foi observado um aumento na porcentagem de espermatozoides marcados por diclorfluoresceína, provenientes tanto do ejaculado quanto do epidídimo, no grupo tratado comparado ao controle. A marcação por diclorfluoresceína avalia preferencialmente os níveis de peróxido de hidrogênio (MAHFOUZ et al., 2009; AZIZ et al., 2010; SUE-HEE KIM; DO-HYEON YU; YOUNG-JUN KIM, 2010), o que reforça os resultados encontrados em relação a GPx. Além disso, apesar de não ser possível verificar diferença significativa, houve um aumento de 4 vezes ($8,89 \pm 0,42$ no grupo tratado *versus* $2,05 \pm 3,42$ no grupo controle, $p = 0,24$) na suscetibilidade da célula ao estresse oxidativo, quantificado por TBARS induzido. Comprovando a hipótese de que o estresse térmico ocasiona danos na célula espermática mediado pelo estresse oxidativo.

Apesar do aumento na atividade enzimática da GPx, não foram observadas diferenças na imunodeteção dessas mesmas enzimas. Uma hipótese seria de que estas enzimas, GPx e GR, estejam presentes no epidídimo num estado inativo, e em caso de necessidade (estresse térmico) esta ativação ocorreria. No ambiente epididimal tal mecanismo (ativação da proteína) é essencial para a proteção dos espermatozoides, já que a ativação de enzimas biodisponíveis é mais rápido e eficaz do que a síntese de novas proteínas, evitando-se o início de reação de oxidação. Essa hipótese pode ser corroborada por Garrido et al. (2004) que observaram que, enquanto a atividade da GPx correlacionava-se com características seminais em homens inférteis, o mesmo não ocorria com os níveis de mRNA para GPx. Segundo esses autores, existe um controle pós transcricional da atividade da GPx por mecanismos ainda não conhecidos. Mais estudos são necessários com o objetivo de esclarecer como ocorre a ativação desta importante enzima antioxidante.

O metabolismo mitocondrial possivelmente está relacionado a pato-fisiologia do desequilíbrio da homeostase oxidativa, causado pelo estresse térmico. Com efeito, diversos estudos observaram uma clara relação entre atividade mitocondrial e estresse oxidativo (BLUMER et al., 2008; GUTHRIE; WELCH; LONG, 2008; FERRAMOSCA et al., 2013). As mitocôndrias presentes nos espermatozoides são as principais responsáveis pela produção de ATP, por fosforilação oxidativa, sendo portanto a maior responsável pela produção de EROS. Fisiologicamente, cerca de 1% do oxigênio formado é convertido em anião superóxido, dando origem a cadeia de formação de EROS (ARGAWAL; MAKKER; SHARMA, 2008; AITKEN; CLARKSON; FISHEL, 1989), fundamental para diversas funções fisiológicas (AITKEN; BARKER, 2002). No caso de um dano mitocondrial, essa produção poderá ser exacerbada pela liberação de mais fatores pró oxidativos (AITKEN;

CLARKSON, 1987; AITKEN; CLARKSON; FISHEL, 1989; AITKEN; BAKER, 2002; GUTHRIE; WELCH; LONG, 2008; ARGAWAL; MAKKER; SHARMA, 2008). Realmente, neste trabalho, tanto em espermatozoides provenientes do ejaculado como em espermatozoides epididimais, houve diminuição da porcentagem de células com alto potencial de membrana mitocondrial no grupo tratado comparado ao controle, sugerindo que o dano mitocondrial possa ser a origem do dano oxidativo.

É possível concluir que o estresse térmico causa alterações nos atributos espermáticos devido ao estresse oxidativo. Sendo esse estresse possivelmente causado por uma alteração mitocondrial.

***EFEITO DO ESTRESSE TÉRMICO NA CROMATINA
ESPERMÁTICA E EXPRESSÃO GÊNICA DA
PROTAMINA 1 E DAS PROTEÍNAS DE TRANSIÇÃO 1 E
2 EM TESTÍCULO E ESPERMATOZOIDES OVINOS***

7 EFEITO DO ESTRESSE TÉRMICO NA CROMATINA ESPERMÁTICA E EXPRESSÃO GÊNICA DA PROTAMINA 1 E DAS PROTEÍNAS DE TRANSIÇÃO 1 E 2 EM TESTÍCULO E ESPERMATOZOÍDES OVINOS

7.1 FUNDAMENTAÇÃO

Espermatozoídes com dano no DNA espermático têm a capacidade de fecundar os oócitos, no entanto há prejuízo no desenvolvimento embrionário (FATEHI et al, 2006). Infertilidade, desenvolvimento embrionário pobre e anormalidades genéticas na prole têm sido associados a danos ao DNA espermático (AHMADI; NG, 1999; TAMBURRINO et al., 2012). Em humanos, defeitos na cromatina tem sido associado a infertilidade e em menor significância a câncer infantil (AITKEN; KRAUSZ, 2001; PERREAULT et al., 2003) e acondroplasia (AITKEN; DE IULLIS; MCLACHLAN, 2008). Quando espermatozoídes murinos com dano na cromatina foram utilizados para fecundar oócitos, observou-se efeitos adversos no desenvolvimento embrionário, no crescimento pós natal e na longevidade da ninhada, além de suscetibilidade a tumores (FERNÁNDEZ-GONZÁLEZ et al., 2008). As causas exatas que levam ao surgimento de anormalidades na cromatina e danos no DNA dos espermatozoídes não são precisamente conhecidos, no entanto três hipóteses são as mais aceitas: 1. estresse oxidativo, 2. dano no empacotamento da cromatina espermática e 3. apoptose.

O estresse oxidativo pode ser relacionado, direta ou indiretamente a fragmentação de DNA espermático. Este quadro será desencadeado pelo desequilíbrio entre a produção de espécies reativas de oxigênio (EROS) e a atividade dos agentes antioxidantes. Esse tipo de cascata de reações gera danos nas bases e rupturas nas fitas da dupla cadeia de DNA, induzindo fragmentação de DNA nos espermatozoídes (AGARWAL et al., 2003). Diversos estudos verificaram uma clara relação entre o estresse térmico e o estresse oxidativo (NICHII et al., 2006; BLUMER et al., 2008). O estresse oxidativo tem sido descrito como a principal causa de fragmentação de DNA espermático (SAKKAS; ALVAREZ, 2010), podendo estar relacionado a falhas de protaminação e apoptose abortiva. Alguns trabalhos tem relatado redução da integridade do DNA espermático em condições de estresse térmico em ovinos submetidos a insulação testicular (FLEMING et al., 2004).

O empacotamento da cromatina no espermatozoide tem como função proteger o DNA espermático de danos físicos e químicos, e compactar o material genético. Na espermatogênese de mamíferos, a maioria das histonas são substituídas por proteínas de transição em espermátides. Elas são responsáveis por desestabilizar os nucleossomos prevenindo a torção do DNA, facilitando o reparo das quebras da fita de DNA e contribuindo para condensação da cromatina (WOUTERS-TYROU et al., 1998; ROCHA et al., 2002; CARRELL; EMERY; HAMMOUD, 2007; GOSÁLVEZ et al., 2011). Por fim, estas proteínas de transição são substituídas por proteínas positivamente carregadas chamadas de protaminas (BALHORN, 1982; BALHORN, 2007). Quando a protaminação ocorre de maneira incorreta, ocorrem distúrbios de condensação da cromatina dos espermatozoides, sendo que a persistência dessas aberrações no espermatozoide pode interferir no mecanismo normal de reparo (SOTOLONGO et al., 2005), com repercussões sobre a fertilidade (BELETTI; MELLO, 1996). A protaminação incompleta torna o espermatozoide mais vulnerável ao ataque por radicais livres (ALVAREZ, STOREY, 1992).

A fragmentação de DNA espermático causada por estresse térmico e consequente estresse oxidativo pode levar a apoptose. A apoptose de células germinativas ocorre normalmente nos testículos (OLDEREID et al., 2001). Entretanto, fatores como calor, agentes tóxicos, radiação, congelamento-descongelamento, intensificam o processo apoptótico (GU et al., 2014). Embora a apoptose germinal esteja associada a maturação espermática (JURISCOVA et al., 1999), alguns pesquisadores relataram danos celulares decorrentes da apoptose em células com espermatogênese completa (BARROSO et al., 2000; GANDINI et al., 2000; SAKKAS et al., 2000). A presença de espermatozoides apoptóticos no ejaculado não está clara, alguns autores sugerem que estes espermatozoides são imaturos (PAASCH et al., 2004) e outros acreditam que estas células são decorrentes do fenômeno de apoptose testicular abortiva (SAKKAS et al., 2004). Seria lógico pensar que o espermatozoide presente no trato genital feminino, que não tenha fecundado o oócito, deva ser destruído, e com esse objetivo, seria ativado um mecanismo de eliminação: a apoptose (MARTIN et al., 2004). No entanto, qualquer que seja a razão para a existência de espermatozoides apoptóticos no ejaculado, representa uma fertilidade reduzida. Neste contexto, o dano gerado pelas espécies reativas de oxigênio pode estar associado a apoptose, podendo ser detectado por sinalizadores desse mecanismo (BERENGUER et al., 2008). Uma rota de apoptose é mediada por ação de espécies reativas de oxigênio, esta via conduz a um fenótipo necrótico devido a liberação de EROS e de cálcio da mitocôndria. Há um aumento nos níveis de *Bax* e/ou uma diminuição

dos níveis de *Bcl-2* que poderiam permeabilizar a mitocôndria para liberar fatores pró-apoptóticos (CROMPTON, 2000).

Em ovinos pouco se sabe da interferência do estresse térmico nos processos voltados a compactação do DNA espermático, seja na expressão gênica das proteínas envolvidas ou na substituição das histonas gerando falhas de protaminação, e ainda se há ativação de rotas apoptóticas mediadas por EROS no testículo. Acredita-se que o estresse térmico provoque alterações no DNA espermático em ovinos. Este trabalho avaliou a fragmentação de DNA espermático, a suscetibilidade a fragmentação de cromatina espermática e as falhas de protaminação em espermatozóides ejaculados e epididimais de ovinos submetidos ao estresse térmico induzido por insulação testicular. Além disso, foi avaliado a expressão gênica das protaminas e das proteínas de transição em testículo, espermatozoides ejaculados e epididimais; e a imunohistoquímica de proteínas pró e anti apoptóticas em testículo.

7.2 MATERIAL E MÉTODOS

Todos os procedimentos foram aprovados pela Comissão de Ética no uso de animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (2445-2011).

7.2.1 Experimento 1

Doze carneiros mestiços Santa Inês, com oito meses de idade, foram utilizados num delineamento inteiramente casualizado com medidas repetidas no tempo. Os animais foram distribuídos aleatoriamente em dois grupos, seis foram submetidos a insulação testicular (tratado) e os outros seis animais compuseram o grupo controle. Os animais do grupo tratado usaram bolsa insuladora com a finalidade de estimular o estresse térmico com consequências na espermatogênese. A média da temperatura ambiental e umidade relativa do ar no período de insulação testicular foi $20,59^{\circ}\text{C} \pm 0,49$ e $77,11\% \pm 0,31$. As bolsas foram mantidas por 288 horas consecutivas. Após a retirada das bolsas iniciou-se o período de colheitas de sêmen semanais, ao longo de 9 semanas, por vagina artificial específica para ovinos.

7.2.1.1 Avaliação da estabilidade da cromatina espermática e fragmentação de DNA espermático por Cometa

A avaliação da estabilidade da cromatina espermática foi realizada conforme descrito no tópico 5.2.6.1.

Danos quantitativos no DNA das células espermáticas foram verificados por Ensaio Cometa Alcalino conforme descrito no tópico 5.2.6.2

7.2.1.2 Avaliação da deficiência de protaminação em espermatozoides ovinos

A deficiência de protaminação foi quantificada conforme a técnica descrita no tópico 5.2.5.1.

7.2.1.3 Expressão gênica da Protamina 1 e das Proteínas de Transição 1 e 2 em espermatozoides

A técnica utilizada está descrita no tópico 5.2.5.2.

7.2.2 Experimento 2

Após a finalização do primeiro experimento, os mesmos animais foram distribuídos nos mesmos grupos experimentais e novamente submetidos a um período de insulação testicular ou não, por 240 horas. Foi considerado como objeto de estudo neste experimento, os estágios I e VIII do ciclo espermático, para verificar possíveis danos da insulação testicular no processo de compactação da cromatina espermática no testículo e em espermatozoides epididimais. Nos dias 7 (D7) e no 37 (D30) do ciclo espermático (contados a partir de 96 horas após início da insulação) foram realizadas orquiectomias unilaterais em cada unidade

experimental. Desta forma, a mesma unidade experimental (animal) sofreu duas orquiectomias unilaterais. Vinte quatro horas após a retirada da bolsa insuladora foi realizada a primeira orquiectomia unilateral, com a retirada do testículo esquerdo e trinta dias após a primeira castração, foi realizada a segunda com retirada do testículo direito. Considerou-se como medida de comparação no tempo a primeira e a segunda orquiectomia unilateral, dentro de cada unidade experimental, que neste caso é o animal.

A orquiectomia foi realizada conforme descrito no Apêndice L. Após cirurgia, os testículos e epidídimos foram imediatamente levados ao laboratório de Biologia do Sêmen e lavados em solução salina a 37°C.

Fragmentos de 30 mg de cada testículo, com aproximadamente 1 cm³, foram coletados com auxílio de pinça anatômica e tesoura cirúrgica para análise de expressão gênica e imunohistoquímica.

Para coleta dos espermatozoides epididimais, foram realizadas pequenas incisões com lâmina de bisturi na cauda do epidídimo, em seguida foram coletados com auxílio de pipeta automática, concomitantemente a aplicação de pressão na base do epidídimo com pinça hemostática, segundo Nichi et al. (2007). Os espermatozoides foram ressuspensos em PBS para realização de concentração espermática. Após ajuste de concentração, a estabilidade da cromatina espermática foi avaliada pela técnica descrita no tópico 5.2.4.1. Cerca de 10 milhões de espermatozoides epididimais também foram utilizados para a quantificação da expressão gênica da protamina 1 e das proteínas de transição 1 e 2 por qPCR absoluto, já descrito anteriormente no tópico 5.2.5.2.

7.2.2.1 Expressão gênica da Protamina 1 e das Proteínas de Transição 1 e 2 em testículos ovinos

Um fragmento de 30 mg de cada testículo foi armazenado em 300 µL de RNA Later (Life Technologies) a -80°C para posterior extração de RNA. O RNA foi extraído utilizando Trizol associado a coluna de purificação (TRizol Plus RNA Purification System, Life Technologies). O DNA genômico foi removido por incubação com enzima DNase I (Life Technologies). Na sequência, o cDNA foi sintetizado por reação com transcriptase reversa a partir do RNA isolado, para tanto foi utilizado o kit comercial Super Script® VILO™ cDNA Synthesis (Life Technologies, Califórnia, E.U.A).

O cDNA foi diluído para 2 µg/mL, após quantificação em Qubit® 2.0 Fluorometer (Qubit® dsDNA BR). Cada amostra foi utilizada em triplicata para amplificação do cDNA por qPCR. Devido a possibilidade dos fragmentos testiculares terem diferentes números de células, foi utilizado a quantificação relativa para determinar a expressão gênica da protamina 1 (*PRM1*), proteína de transição 1 (*TNP1*) e proteína de transição 2 (*TNP2*) em testículos ovinos. GAPDH (Primer Foward ATGCCTCCTGCACCACCA, Primer Reverse AGTCCCTCCACGATGCAA) e β -actina ((Primer Foward CTCTTCCAGCCTTCCTTCCT, Primer Reverse GGGCAGTGATCTCTTTCTGC) foram usados como genes endógenos.

7.2.2.2 Imunohistoquímica testicular para identificação dos tipos celulares com ativação apoptótica mediada por EROs (*Bax/Bcl-2*)

Fragmentos testiculares foram imediatamente colocados em solução fixadora de metacarn [60% (v/v) de metanol, 30% (v/v) de clorofórmio e 10% (v/v) de ácido acético glacial]. Após 24 horas de fixação em metacarn, os fragmentos foram recortados para adquirirem o tamanho de 0,5 cm³ e imersos em etanol 95% (v/v), até processamento e inclusão em parafina.

Cortes de 5 µm dos fragmentos já incluídos, foram acondicionados em lâminas silanizadas e submetidos a desparafinização e hidratação. O bloqueio da peroxidase endógena foi realizado com solução de 5% (v/v) peróxido de hidrogênio em metanol (1:1) por 30 minutos e a recuperação antigênica foi realizada em banho-maria com tampão citrato de sódio 10mM pH 6,0 a 96°C por 20 minutos. Em temperatura ambiente, foi realizado o bloqueio dos sítios inespecíficos com solução 5% (m/v) de leite desnatado em pó (Molico® Nestlé) em PBS, por 60 minutos. Os anticorpos primários [anti-*Bax* murino (P-19: sc-526 Santa Cruz Biotechnology, Inc.), anti-*Bcl-2* humano (N-19: sc-492 Santa Cruz Biotechnology, Inc.) e para controle positivo da técnica anti-vimentina (Clone V9 - Abcam)], diluídos 1:100 em PBS foram aplicados, sob as lâminas em câmara úmida a 4°C por 16-18h. Após incubação e lavagem em PBS, as lâminas foram incubadas por 30 minutos com os anticorpos secundários anti-camundongo e anti-coelho num tampão Tris-HCl (ADVANCE™ HRP Link). Após nova lavagem em PBS, as lâminas foram incubadas por mais 30 minutos com anticorpos polimerizados com peroxidase, em tampão Tris-HCl (Enzima ADVANCE™ HRP). Posteriormente procedeu-se a incubação com cromógeno (VECTOR® Novared Substrate Kit

for peroxidase SK4800) por 2 minutos ou até adquirirem coloração rosa-claro. A reação foi bloqueada realizando-se lavagem em água destilada. Foi realizada contra-coloração com Hematoxilina de Harris por 1 minuto, e em seguida, as lâminas foram lavadas uma vez em água destilada corrente por 10 minutos. As lâminas foram submetidas a desidratação e diafanização em xilol. Realizou-se avaliação das mesmas em microscópio óptico de luz (Nikon Eclipse Ni) acoplado a câmera fotográfica (Nikon DS-Ri1), sendo as imagens obtidas pelo programa NIS Elements®. Foram identificados os tipos celulares marcados por *Bax* e *Bcl-2* nos túbulos seminíferos de ovinos.

7.2.3 Análise Estatística

As variáveis dependentes foram analisadas pelo programa *SAS System 9.3* (SAS Institute, Cary, NC). Todos os dados foram testados quanto a normalidade dos resíduos e homogeneidade das variâncias. No caso de premissas estatísticas não obedecidas, os mesmos foram transformados. No experimento 1 foi utilizado o procedimento MIXED para análise de variância com medidas repetidas no tempo para as seguintes variáveis dependentes analisadas: avaliação da cromatina espermática, cometa, CMA3 e qPCR absoluto. A comparação de médias das diferentes variáveis dependentes para cada condição do modelo estatístico (tratamento, semana e interação tratamento x semana) foi calculada pelo método dos quadrados mínimos (procedimento LSMEANS). Para dados não paramétricos foi utilizado análise de variância não paramétrica (KRUSKAL WALLIS, pelo procedimento NPAR1WAY), e a comparação de médias por comparação de dois grupos por vez (WILCOXON). No experimento 2 foi realizado análise de variância pelo procedimento GLM, considerando o fatorial 2x2 para as variáveis dependentes: avaliação da estabilidade da cromatina espermática e qPCR absoluto. Foram considerados efeito de tratamento (grupo controle *versus* grupo tratado) e efeito dos danos do estresse térmico testicular no processo de compactação da cromatina espermática no testículo e em espermatozoides epididimais no D7 e D30 do ciclo espermático (primeira e segunda orquiectomia unilateral), com posterior comparação de médias pelo método LSD. Utilizou-se nível de significância de 5% para rejeitar a hipótese de nulidade. Os dados do qPCR relativo em amostras testiculares foram analisados pelo procedimento MIXED, como descrito por Steibel et al. (2009).

7.3 RESULTADOS

Os resultados serão apresentados por experimento.

7.3.1 Experimento 1

O objetivo deste experimento foi avaliar a fragmentação de DNA espermático, a estabilidade da cromatina espermática, as falhas de protaminação e a expressão gênica das protaminas e proteínas de transição em espermatozoides provenientes do ejaculado de ovinos submetidos ao estresse térmico por insulação testicular.

Nos espermatozoides provenientes do ejaculado foi observado um aumento ($p < 0,047$) da porcentagem de espermatozoides positivos para laranja de acridina, no grupo tratado comparado ao grupo controle ($2,81 \% \pm 1,08$ *versus* $1,68 \% \pm 0,73$ - Figura 19B). O efeito de tempo também pode ser observado. Houve aumento da porcentagem de espermatozoides positivos para laranja de acridina na sétima semana experimental (Figura 19A), no entanto outras diferenças relevantes nas demais semanas estudadas não foram visualizadas ($p > 0,05$).

Na análise quantitativa da cromatina espermática, pela técnica Cometa Alcalino, a maior diferença observada foi nos graus II e III de fragmentação. Enquanto o grau III de fragmentação espermática foi maior no grupo tratado quando comparado ao controle (Figura 20C), o grau II foi maior no grupo controle quando comparado ao tratado (Figura 20B). O grau II de fragmentação indica danos leves no DNA espermático e o grau III indica danos evidentes no DNA. A insulação testicular promoveu estresse térmico e consequentemente estresse oxidativo. O estresse oxidativo provoca danos no DNA que foram evidenciados pelo aumento da porcentagem de espermatozoides com danos evidentes na cromatina (grau III) no grupo tratado até a sexta semana experimental. Já a população de espermatozoides grau II diminuiu no grupo tratado, pois ao sofrerem mais dano, estes passaram a compor a população grau III. A partir da sexta semana experimental estas diferenças não foram mais evidenciadas.

O grupo tratado apresentou, já na primeira semana pós insulação testicular, uma porcentagem muito menor de espermatozoides com poucos danos de DNA (grau I) ($30,05\% \pm 9,29$) comparado ao grupo controle ($8,03\% \pm 2,09$), indicando uma resposta aguda a insulação

(Figura 20A). Ao ser analisada a porcentagem de espermatozoides com grau IV (Figura 20D) observou-se que no grupo tratado há uma tendência ($p = 0,07$) de aumento ($4,96\% \pm 1,90$) comparado ao grupo controle ($0,87\% \pm 0,50$), este fato pode ser justificado pela indução de estresse oxidativo neste grupo, o que gerou maior lesão na cromatina dos espermatozoides. Os valores de médias, erros padrão das médias e probabilidade para cada grau de fragmentação de DNA espermático, em cada semana experimental, é apresentado no apêndice S.

Quanto as falhas na compactação do DNA espermático pela técnica do CMA3, não foram observadas diferenças entre o grupo tratado $0,185\%$ ($0,1; 0,37$) e o controle $0,27\%$ ($0,12; 0,45$), em espermatozoides provenientes do ejaculado após o estresse térmico ($p > 0,05$). Não foi observado efeito de semana para esta variável.

Figura 19 - Médias e erros padrão da média para porcentagem de espermatozoides ovinos, provenientes do ejaculado, positivos para laranja de acridina. A. Efeito de semana e B. Efeito de tratamento

Letras diferentes significam diferença estatística significativa ($p < 0,05$)

Fonte: Hamilton, T.R.S (2014).

Figura 20 - Médias e desvios padrão da média da porcentagem de espermatozoides ovinos com fragmentação de DNA nos grupos experimentais, controle e tratado, ao longo das 9 semanas experimentais. A. Grau I, B. Grau II, C. Grau III e D. Grau IV

Legenda: * $p < 0,05$ ** $0,05 < p < 0,10$.
Fonte: Hamilton, T.R.S (2013).

A expressão dos genes PRM1, TNP1 e TNP2 em espermatozoides provenientes do ejaculado foi verificada por qPCR. Foi observado diferença na expressão gênica da TNP1 ($p = 0,042$), em relação ao número de cópias de mRNA, no qual o grupo tratado apresentou um número de cópias menor do que o grupo controle ($17,19 \pm 4,84$ versus $4,09 \pm 1,02$; Figura 21B). Não foram observadas diferenças significativas na expressão dos genes PRM1 ($p = 0,63$ - Figura 21A) e TNP2 ($p = 0,55$ - Figura 21C) em relação ao número de cópias de mRNA, em espermatozoides ovinos provenientes de ejaculados nos diferentes tratamentos (Tabela 2). Não foram observados efeito de semana para nenhum dos genes estudados.

Tabela 2 - Médias, erros padrão das médias e valores de probabilidade do número de cópias de mRNA dos genes protamina 1, proteína de transição 1 e proteína de transição 2 ovina em espermatozoides provenientes do ejaculado para efeito de tratamento.

Genes Alvo	Controle	Tratado	<i>p</i>
Protamina (número de cópias)	31,11±13,69	19,59±5,85	0,63
Proteína de Transição 1 (número de cópias)	17,19±4,84	4,09±1,02	0,042
Proteína de Transição 2 (número de cópias)	1,97±0,79	1,01±0,14	0,55

Figura 21 - Médias e erros padrão das médias do número de cópias de mRNA dos genes alvo analisados em espermatozoides ovinos provenientes de ejaculado quanto ao efeito de tratamento. A. Protamina 1 ovina, B. Proteína de Transição 1 ovina e C. Proteína de Transição 2 ovina

Letras diferentes significam diferença estatística significativa ($p < 0,05$)

Fonte: Hamilton, T.R.S (2014).

7.3.2 Experimento 2

Após avaliação da estabilidade da cromatina espermática pela porcentagem de células positivas para laranja de acridina, não foi verificada diferença ($p = 0,60$) entre os grupos tratado e controle nos espermatozoides provenientes do epidídimo ($1,40 \% \pm 0,41$ versus $1,02 \% \pm 0,23$ - Figura 22). Também não foram observadas diferenças ($p = 0,14$) quanto ao efeito da insulação no D7 em relação ao D30 ($0,68 \% \pm 0,48$ e $1,62 \% \pm 1,37$, respectivamente).

Figura 22 - Médias e erro padrão da média, para efeito de tratamento, da porcentagem de espermatozoides ovinos provenientes do epidídimo positivos para laranja de acridina (controle versus tratado)

Fonte : Hamilton, T.R.S (2014).

Quanto a expressão gênica da protamina 1 e das proteínas de transição 1 e 2 em espermatozoides ovinos provenientes do epidídimo, é importante enfatizar que além de ter sido avaliado o efeito da insulação testicular (controle *versus* tratado), foi também levado em conta o estágio do ciclo espermático (D7 e D30). Teoricamente, durante os dias do ciclo espermático estipulados, as espermatídes estariam compactando o DNA, substituindo as histonas por protaminas. Para efeito de insulação testicular, não foram observadas diferenças na expressão dos genes alvo nos grupos controle e tratado (Tabela 3). Para efeito de protaminação, no D7 e no D30, a PRM1 ($p < 0,0001$) apresentou maior expressão no D30 do ciclo espermático quando comparado ao D7 ($10,745 \pm 2,87$ *versus* $0,92 \pm 0,128$ - Figura 23A). No entanto, não foram observadas diferenças na expressão gênica das TNP1 ($p = 0,12$) e TNP2 ($p = 0,24$) (Figura 23 B e 23C), para efeito de protaminação (Tabela 4).

Tabela 3 - Médias, erros padrão das médias e valores de probabilidade do número de cópias de mRNA dos genes protamina 1, proteína de transição 1 e proteína de transição 2 ovina em espermatozoides ovinos provenientes do epidídimo para efeito de tratamento

Genes Alvo	Controle	Tratado	<i>p</i>
Protamina (número de cópias)	6,73±3,01	8,21±3,81	0,86
Proteína de Transição 1 (número de cópias)	2,76±0,88	2,14±0,65	0,64
Proteína de Transição 2 (número de cópias)	0,35±0,03	0,56±0,19	0,34

Figura 23 - Médias e erros padrão das médias do número de cópias de mRNA dos genes alvo em espermatozoides ovinos provenientes do epidídimo quanto aos dias do ciclo espermático (D7 e D30). A. Protamina 1 ovina, B. Proteína de Transição 1 ovina e C. Proteína de Transição 2 ovina

Letras diferentes significam diferença estatística significativa ($p < 0,05$)

Fonte : Hamilton, T.R.S (2014).

Tabela 4 - Médias, erros padrão das médias e valores de probabilidade do número de cópias dos genes protamina 1, proteína de transição 1 e proteína de transição 2 ovina em espermatozoides ovinos provenientes do epidídimo para efeito de dias do ciclo espermático

Genes Alvo	D7	D30	p
Protamina (número de cópias)	0,92±0,12	10,74±2,87	<0,0001
Proteína de Transição 1 (número de cópias)	2,81±0,61	0,94±0,18	0,12
Proteína de Transição 2 (número de cópias)	0,39±0,08	0,72±0,35	0,24

A expressão dos genes alvo (protamina 1 e proteínas de transição 1 e 2) em testículos ovinos, não diferiram, quando avaliados os efeitos do estresse térmico por insulação testicular e dos estágios do ciclo espermático (D7 e D30) ($p > 0,05$) (Figura 24 e Tabela 5).

Figura 24 - Quantificação relativa dos genes PRM1, TNP1 e TNP2. A. Comparação entre grupo controle e grupo tratado. B. Comparação entre D7 e D30 do ciclo espermático. C. Comparação entre grupo controle e grupo tratado no D7 do ciclo espermático. D. Comparação entre grupo controle e grupo tratado no D30 do ciclo espermático. E. Comparação entre D7 e D30 do ciclo espermático no grupo controle. F. Comparação entre D7 e D30 do ciclo espermático no grupo tratado. Valores expressos em $\log_2$ (FC)

Legenda: FC = Fold change, C=grupo controle, T=grupo tratado.

Fonte: Hamilton, T.R.S (2014).

Tabela 5 - Valores de probabilidade (p) para os diferentes efeitos analisados para expressão de protamina 1 (PRM1), proteína de transição 1 (TNP1) e proteína de transição 2 (TNP2) em testículos ovinos submetidos ao estresse térmico

EFEITOS	PRM1	TNP1	TNP2
Tratamento (controle <i>versus</i> tratado)	0,6347	0,8066	0,5903
Protaminação (D7 <i>versus</i> D30 do ciclo espermático)	0,2099	0,8324	0,3767
No D7 do ciclo espermático: controle <i>versus</i> tratado	0,7649	0,5405	0,7851
No D30 do ciclo espermático: controle <i>versus</i> tratado	0,3243	0,7884	0,3061
No grupo controle: D7 <i>versus</i> dia 30 do ciclo espermático	0,1365	0,5559	0,2075
No grupo tratado: D7 <i>versus</i> D30 do ciclo espermático	0,7880	0,7705	0,9811

Para avaliar se as EROS ativam vias de apoptose, foi realizada imunolocalização das proteínas pró apoptóticas (*Bax*) e anti apoptóticas (*Bcl-2*) em túbulos seminíferos, após a insulação testicular. Para tal, foi considerado o efeito da insulação testicular (controle *versus* tratado) e o efeito da insulação em dois estágios do ciclo espermático (D7 e D30).

Histologicamente, os animais do grupo tratado apresentaram vacuolização das células de Sertoli, multifocal discreta, bem como presença de células com três ou mais núcleos (células gigantes) no lúmen dos túbulos seminíferos (Figura 25A). Adicionalmente, foram visualizadas escamação/esfoliação das células germinativas (Figura 25B) e fibrose intersticial multifocal discreta (Figura 25C), alterações características de degeneração testicular inicial. No grupo controle, não foram visualizadas lesões histológicas. Ao verificar as diferenças entre os estágios do ciclo espermático, no D30 observou-se túbulos com mais espermátócitos II quando comparado aos túbulos observados no D7. O mesmo ocorreu com o número de espermatogônias, que estava diminuído no D30. Esse achado pode estar relacionado com a proliferação e o aumento de diferenciação celular em decorrência da recuperação do tecido ao estresse térmico. Foi observada uma menor intensidade de descamação/esfoliação das camadas celulares do túbulo seminífero para o lúmen e leve proliferação de células menos diferenciadas, como espermatogônias, no D30 quando comparado ao D7, sugestivo de regeneração.

Figura 25 - Testículo ovino submetido a insulação corado com hematoxilina e eosina por MO. A. Descamação celular com células gigantes no lúmen tubular (seta), B. Túbulos seminíferos apresentando escamação de células germinativas para o lúmen tubular e C. Fibrose intersticial multifocal leve (★)

Legenda: MO = Microscopia óptica de luz.

Figuras A e B: magnificação de 400 vezes, barra: 50 μ m. Figura C: magnificação de 200 vezes, barra: 100 μ m.

Fonte: Hamilton, T.R.S (2014).

Para averiguar se o estresse oxidativo induziu uma resposta da célula por ativação de vias apoptóticas, a proteína pró-apoptótica *Bax* foi investigada. O efeito do estresse oxidativo em testículos submetidos ao estresse térmico no D7 do ciclo espermático apresentou, no grupo controle, uma marcação granular difusa intracitoplasmática em espermatócitos primários e secundários (Figura 26A), predominantemente em espermatócitos primários. No grupo tratado, foi verificado maior intensidade e distribuição de marcação no citoplasma de espermatócitos primários, especialmente em células descamadas presentes no lúmen dos túbulos seminíferos (Figura 26B) e em células binucleadas (Figura 26C). No entanto, no D30 do ciclo espermático não foram observadas diferenças entre grupo controle e tratado.

Figura 26 - Imunohistoquímica de testículos ovinos submetidos a insulação com anticorpo anti-*Bax* em MO. A. Marcação no citoplasma de espermatócitos I, B. Marcação intracitoplasmática em células descamadas presentes no lúmen. e C. Marcação intracitoplasmática em células descamadas binucleadas em lúmen

Legenda: MO = Microscopia óptica de luz.

Figuras A, B e C: Magnificação de 400 vezes. Barra: 50 μ m

Fonte: Hamilton, T.R.S (2014).

A proteína anti-apoptótica *Bcl-2* também foi investigada para verificação de resposta celular. Não foram observadas diferenças entre o grupo controle e tratado, nem o efeito da insulação nos dois estágios do ciclo espermático estudados. De maneira geral, pode ser verificado marcação intracitoplasmática intensa em espermátides (Figura 27A). Em células descamadas presentes no lúmen dos túbulos seminíferos (Figura 27B), tais como espermatócitos I (Figura 27C), foi visualizada marcação menos intensa.

Figura 27 - Imunohistoquímica de testículos ovinos submetidos a insulação com anticorpo anti-*Bcl2* em MO. A. Marcação em espermátides, B. Marcação menos intensa em células presentes no lúmen e C. Marcação em espermatócitos I menos intensa comparada com a marcação em espermátides

Legenda: MO = Microscopia óptica de luz.

Figuras A, B e C: Magnificação de 400 vezes. Barra: 50 µm

Fonte: Hamilton, T.R.S (2014).

7.4 DISCUSSÃO

Epermatozoides com dano de cromatina são capazes de fecundar e podem ser críticos na etiologia da infertilidade, especialmente em casos idiopáticos (FATEHI et al., 1996). O estresse térmico pode ser uma das causas de aumento na fragmentação no DNA por aumento do estresse oxidativo, falhas na compactação da cromatina e apoptose (YANSEN LI et al., 2014). Neste estudo, foi avaliado o efeito do estresse térmico no sêmen e nos testículos de carneiros, focando na fragmentação de DNA espermático, na suscetibilidade a fragmentação de cromatina espermática, nas falhas de protaminação, na expressão gênica das protaminas e proteínas de transição.

Ao analisar os espermatozoides provenientes do ejaculado, nota-se que houve aumento da porcentagem de células positivas para laranja de acridina (com suscetibilidade a fragmentação na cromatina) no grupo tratado; efeito não observado nos espermatozoides

epididimais após a segunda insulação (experimento 2). Quanto a fragmentação de DNA dos espermatozoides provenientes do ejaculado, foi observado maior porcentagem de Cometa grau III e menor porcentagem de Cometa grau II, no grupo tratado comparado ao grupo controle. Não foram observadas diferenças quanto a protaminação nos grupos estudados. Em relação a expressão gênica da protamina 1 e das proteínas de transição 1 e 2 em amostras de espermatozoides provenientes de ejaculado, foi observado aumento do número de cópias de mRNA da TNP1 no grupo tratado. Por outro lado, não foi verificada diferença entre os grupos, em amostras testiculares. Já em espermatozoides provenientes do epidídimo, a PRM1 apresentou maior expressão no D30 do ciclo espermático quando comparado D7, enquanto que a TNP1 de maneira contrária apresentou tendência de menor expressão no D30 ($p = 0,12$), quando comparado ao D7. Quanto a ativação de vias apoptóticas mediada por EROS, pode-se observar que a proteína anti-apoptótica *Bax* foi imuno-identificada preferencialmente em espermátócitos, enquanto que a *Bcl-2* preferencialmente em espermátides, porém sem diferença entre os grupos estudados.

A clara relação entre o aumento na porcentagem de células com a cromatina suscetível a denaturação ácida e o aumento de células grau III de fragmentação sugerem que o aumento da fragmentação no grupo tratado ocorre exatamente na população que apresentou maior suscetibilidade. A análise da suscetibilidade da cromatina espermática a denaturação ácida consegue acessar as regiões onde o DNA está mais exposto, uma vez que a denaturação ocorre mais frequentemente em regiões em que os danos já existem (SHAMAN; PRISZTOKA; WARD, 2006). O Cometa alcalino é uma técnica utilizada para quantificar os graus das lesões na cromatina espermática, sendo uma complementação a análise de suscetibilidade da cromatina a denaturação ácida. Essa relação também foi observada por Simões et al. (2013) quando do estudo da fragmentação de DNA espermático em bovinos. Espermatozoides com este quadro, rapidamente, numa situação de estresse oxidativo, sofrem maior dano na cromatina. O aumento do dano no DNA foi relacionado com o estresse oxidativo induzido pelo estresse térmico no sêmen de pacientes com varicocele em humanos (SMITH et al., 2006).

A ausência de diferenças entre os grupos controle e tratado na suscetibilidade da cromatina a denaturação ácida em espermatozoides de epidídimo após a segunda insulação deste trabalho, foi inesperada. Uma explicação plausível é a de que as células espermáticas lesadas e portanto mais suscetíveis aos danos do estresse térmico foram eliminadas durante o primeiro experimento (após a primeira insulação). Na segunda insulação, a população de células presentes no testículo eram mais resistentes aos danos oxidativos. Este mecanismo foi

relatado em casos de rejeição de transplante renal, no qual uma correlação negativa foi observada entre o grau de apoptose no momento do transplante e a concentração de creatina sérica 6 meses após este procedimento (OTT et al., 2007). Desta maneira, a apoptose não foi prejudicial a função renal, pelo contrário, este mecanismo serviu para facilitar a eliminação de células danificadas e limitar a infiltração de células inflamatórias. Embora a relação entre estresse térmico testicular e órgãos transplantados pareça distante, uma clara relação entre elas pode ser observada: a síndrome da hipóxia-reperfusão (WUGANG HOU et al., 2012). Quando o órgão é retirado para o transplante, a vascularização tecidual é bloqueada levando o órgão a hipóxia. No momento do transplante ocorre a reperfusão tecidual e um aumento de danos oxidativos pelo aumento de aporte de oxigênio (CHANGHE ZHANG et al., 2014; MAHFOUDH-BOUSSAID et al., 2014; TEOH et al., 2014; WELWELL JIANG et al., 2014). De maneira similar, o testículo, por ser pouco vascularizado, funciona no limite da hipóxia (REYES et al., 2012). No caso de um aumento na temperatura testicular (insulação), a atividade metabólica aumenta sem haver eficiente vasodilatação. Neste momento, caracteriza-se um quadro de hipóxia. Quando a temperatura testicular volta ao normal ocorre a re-oxigenação, de maneira semelhante ao que acontece nos órgãos transplantados. Este mecanismo de eliminação de células danificadas acaba gerando um efeito benéfico, propiciando o funcionamento tecidual ideal. Desta forma, a maior fragmentação frente a um desafio, poderia indicar que o processo de apoptose estaria funcionando e consequentemente os animais com alta fragmentação estariam eliminando as células danificadas de uma maneira mais eficiente. Assim, em um eventual estresse posterior, as células presentes estariam mais adaptadas e não teriam uma resposta exacerbada.

A diminuição na expressão gênica de TNP1 no sêmen ejaculado do grupo tratado poderia indicar uma necessidade de compactação de DNA maior neste grupo refletindo maior consumo do mRNA. Segundo Feugang et al. (2010), o espermatozoide possui uma baixa atividade de tradução transitória para substituir algumas protaminas que podem apresentar defeitos durante o trajeto do espermatozoide no trato genital feminino. Neste contexto, um agravante seria que a maior produção de EROS no grupo submetido ao estresse térmico poderia comprometer a tradução e aumentar a produção de protaminas defeituosas. Como consequência, o espermatozoide aumentaria a atividade traducional da PRM1, na tentativa de substituir essas proteínas defeituosas. No momento em que se submeteu estes mesmos animais há uma condição de indução do estresse oxidativo, como é o caso desse experimento 2, a produção de proteínas danificadas aumenta e por essa razão aumenta-se o consumo dos mRNAs. Apesar deste efeito detectado na expressão gênica, seria fundamental avaliar a

expressão proteica. No entanto, esta resposta transcripcional parece ter sido eficiente, visto que não foram observadas diferenças entre o grupo tratado e o controle, quando avaliado a protaminação *per se*, pela técnica de CMA3, em espermatozoides ejaculados.

Com relação a expressão gênica da PRM1, TNP1 e TNP2 em espermatozoides ovinos provenientes do epidídimo submetidos ao estresse oxidativo por meio de insulação testicular, somente a PRM1 apresentou maior expressão no D30. O trauma físico na região escrotal, com a retirada do testículo esquerdo, pode ter estimulado um comprometimento da espermatogênese no testículo direito, levando a maior expressão gênica da PRM1 de maneira compensatória.

Curiosamente, quando avaliado o material testicular, submetidos ao mesmo tratamento, essas diferenças não foram observadas. Uma possível explicação seria a de que a protaminação espermática ocorre, durante a espermiogênese, em espermátides. Quando se utilizou material testicular para extração de RNA, todos os tipos celulares foram lisados. Desta maneira, não foi separado o mRNA proveniente de cada tipo celular. Por esta razão, se houvesse um aumento ou uma diminuição da expressão gênica destes genes envolvidos na protaminação, isso só poderia ser observado se o material fosse proveniente somente de espermátides.

Quanto a ativação de vias apoptóticas foi possível observar que a proteína *Bax* foi imuno-identificada preferencialmente em espermátócitos, enquanto que a *Bcl-2* preferencialmente em espermátides. Membros da família de proteínas *Bcl-2* desempenham um papel importante na regulação de vias apoptóticas dependentes de ativação mitocondrial. Proteínas *Bax* funcionam como indutores de apoptose, enquanto que as *Bcl-2* como supressores (ADAMS; CORY, 1998; HENGARTNER, 2000). Em células suscetíveis ao estresse térmico, a ativação da apoptose se inicia pela redistribuição de *Bax* do citoplasma para a região paranuclear (HIKIM et al., 2003). No presente estudo, essa redistribuição não foi observada tanto no grupo controle como no tratado. Há descrição na literatura de que espermátócitos e espermátides redondas são as células mais suscetíveis a apoptose, sendo esse achado consistente em diferentes espécies, como roedores (LUE et al., 1999), macacos (JIA et al., 2007) e humanos (WANG et al., 2007). No entanto, pela primeira vez, foi descrito em testículos ovinos submetidos ao estresse oxidativo por estresse térmico, os tipos celulares envolvidos em vias de ativação apoptótica mediada por EROS. Espermátócitos seriam células mais sensíveis a apoptose, uma vez que apresentam maior marcação por *Bax*, enquanto que as espermátides seriam células mais resistentes a apoptose devido a maior marcação por *Bcl-2*. Este fato é condizente com a característica de que as células mais diferenciadas,

espermatozoides, por terem que passar por situações mais estressantes, como maturação e trânsito pelo trato genital da fêmea, devem manter níveis mais altos de proteínas anti-apoptóticas.

Em conclusão, o estresse térmico altera a suscetibilidade dos espermatozoides a fragmentação de DNA. No entanto, quando o testículo passa por um estresse térmico, as células mais suscetíveis aos danos são acometidas e eliminadas do ambiente testicular. Desta forma, o arcabouço testicular é composto por células mais resistentes e, portanto, se houver novo estímulo de estresse térmico estas células acabam não sendo afetadas e consequentemente há menor dano na cromatina espermática.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

8 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A idéia inicial deste trabalho foi estudar os principais aspectos envolvidos na fragmentação de DNA na espécie ovina. Isso porque, a alta sensibilidade do espermatozoide ovino as biotecnologias reprodutivas pode ser decorrente de alterações no padrão de protaminação conferindo-o maior suscetibilidade a fragmentação de DNA e tornando-o menos compactado, e conseqüentemente mais exposto ao estresse oxidativo. Mediante esta justificativa, a avaliação do índice de fragmentação de DNA na espécie, o tipo de protamina presente em espermatozoides de ovinos, e o estabelecimento da relação entre o tipo de protamina e o índice de fragmentação de DNA foi o objetivo inicial deste trabalho. Por esta razão foi conduzido um experimento descritivo de avaliação de atributos espermáticos, *status* oxidativo, índices de fragmentação de DNA e expressão gênica das protaminas envolvidas no processo de protaminação. No entanto, ao serem avaliados os resultados foi verificado uma alta correlação entre o prejuízo de atributos espermáticos e a peroxidação lipídica. Mediante este fato e os dados da literatura no que refere a alta sensibilidade do espermatozoide ovino a peroxidação lipídica, foi proposta uma análise para se verificar como os diferentes níveis de suscetibilidade a peroxidação lipídica poderiam influenciar os atributos espermáticos, o *status* oxidativo, a protaminação espermática e a fragmentação de DNA espermático em ovinos. Os resultados obtidos foram muito interessantes e permitiram concluir que a alta suscetibilidade dos espermatozoides ovinos a peroxidação lipídica provoca alterações no *status* oxidativo, diminuição de atributos espermáticos e de atividade mitocondrial com conseqüente aumento da suscetibilidade a fragmentação de DNA espermático. Logo, o estresse oxidativo é a principal causa de injúria ao DNA espermático.

Este achado relaciona-se diretamente com a hipótese gerada inicialmente para esta tese e gerou novas hipóteses que contemplaram a relação entre o estresse oxidativo e os danos na cromatina espermática. Por esta razão foi proposto o segundo experimento utilizando um modelo de indução de estresse oxidativo por estresse térmico. O modelo de insulação testicular já largamente estudado e sabidamente considerado como indutor de danos espermáticos, durante o processo de espermatogênese, poderia trazer respostas robustas quanto aos processos que envolvem danos biológicos, seja no âmbito celular, genético e protéico, causado por dano mitocondrial resultante da ação de espécies reativas de oxigênio ou por apoptose abortiva, com conseqüente dano na cromatina espermática. Como resultado, o estresse térmico agudo causou aumento da suscetibilidade da fragmentação de DNA, o que

não foi evidenciado após um segundo momento de estresse térmico, pois provavelmente as células espermáticas mais suscetíveis ao estresse térmico foram eliminadas após a primeira insulação. Este resultado pode justificar a diminuição da quantidade de espermatozoides com danos na cromatina, pois essa seria uma população mais resistente. Consideramos que com este achado seria extremamente relevante estudar mais profundamente as proteínas envolvidas nos processos de compactação da cromatina. Para tanto, a imunoidentificação das proteínas envolvidas na protaminação em células testiculares ovinas seria um dos objetivos deste trabalho. No entanto, problemas na confecção dos anticorpos impossibilitaram a apresentação dos resultados. Novos clones para estas proteínas estão sendo confeccionados e, tão logo seja possível a realização dos métodos analíticos e análises de resultados, os mesmos serão incorporados na publicação.

Os resultados deste trabalho nos fornecem uma abordagem bastante completa sobre os aspectos mais relevantes da biologia do espermatozoide ovino e suas relações entre o atributos espermáticos, estresse oxidativo, apoptose e fragmentação de DNA. Portanto, esclarecedor de lacunas anteriormente verificadas na literatura quanto ao conhecimento da célula espermática ovina e de como os aspectos da sua biologia poderiam influenciar as biotecnologias aplicadas na espécie.

A partir deste conhecimento, mais estudos seriam necessários para relacionar estes novos conhecimentos da biologia do espermatozoide ovino com as biotecnologias aplicadas na espécie para melhorar os índices reprodutivos.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

- ADAMS, J. M.; CORY, S. The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival. **Science**, v. 281, p. 1322-1326, 1998.
- AGARWAL, A.; PRABAKARAN, S. A. Mechanism, measurement, and prevention of oxidative stress in male reproductive physiology. **Indian Journal of Experimental Biology**, v. 43, p. 963-974, 2005.
- AGARWAL, A.; SALEH, R. A.; BEDAIWYM, A. Role of reactive oxygen species in the pathophysiology of human reproduction. **Fertility and Sterility**, v. 79, p. 829-843, 2003.
- AGARWAL, A. L.; MAKKER, K.; SHARMA, R. Clinical relevance of oxidative stress in male factor infertility: an update. **American Journal of Reproductive Immunology**, v. 59, p. 2-11, 2008.
- AGARWAL, A. L.; TVRDA, E.; SHARMA, R. Relationship amongst teratozoospermia, seminal oxidative stress and male infertility. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 12, n. 45, p. 1-8, 2014.
- AHMADI, A.; NG, S. C. Fertilizing ability of DNA-damaged spermatozoa. **Journal of Experimental Zoology**, v. 284, n. 6, p. 696-704, 1999.
- AITKEN, R. J.; BARKER, M. A. Reactive oxygen species generation by human spermatozoa: a continuing enigma. **International Journal of Andrology**, v. 25, p. 191-194, 2002.
- AITKEN, R. J.; CLARKSON, J. S. Cellular basis of defective sperm function and its association with the genesis of reactive oxygen species by human spermatozoa. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 81, p. 459-469, 1987.
- AITKEN, R. J.; CLARKSON, J. S.; FISHEL, S. Generation of reactive oxygen species, lipid peroxidation, and human sperm function. **Biology of Reproduction**, v. 41, n. 1, p. 183-197, 1989.
- AITKEN, R. J.; DE IULIIS, G. N. On the possible origins of DNA damage in human spermatozoa. **Molecular Human Reproduction**, v. 16, n. 1, p. 3-12, 2010.
- AITKEN, R. J.; DE IULIIS, G. N.; MCLACHLAN, R. I. Biological and clinical significance of DNA damage in the male germ line. **International Journal of Andrology**, v. 32, p. 46-56, 2008.
- AITKEN, R. J.; GORDON, E.; HARKISS, D.; TWIGG, J. P.; MILNE, P.; JENNINGS, Z. Relative impact of oxidative stress on the functional competence and genomic integrity of human spermatozoa. **Biology of Reproduction**, v. 59, p. 1037-1046, 1998.
- AITKEN, R. J.; KRAUSZ, C. Oxidative stress, DNA damage and the Y chromosome. **Reproduction**, v. 122, n. 4, p. 497-506, 2001.

- ALBERTS, B.; BRAY, D.; LEWIS, J.; RAFF, M. ROBERTS, K.; WATSON, J. D. Germs cells and fertilization. **Molecular biology of the cell**. 3. ed. New York: Garland Publishing, 1994. 1294 p.
- ALVAREZ, J. G.; STOREY, B. T. Evidence for increased lipid peroxidative damage and loss of superoxide dismutase activity as a mode of sublethal cryodamage to human sperm during cryopreservation. **Journal of Andrology**, v. 13, n. 3, p. 232-241, 1992.
- ALVAREZ, J. G.; TOUCHSTONE, J. C.; BLASCO, L.; STOREY, B. T. Spontaneous lipid peroxidation and production of hydrogen peroxide and superoxide in human spermatozoa. Superoxide Dismutase as major enzyme protectant against oxygen toxicity. **Human Sperm Peroxidation**, v. 8, p. 338-348, 1987.
- ANDRABI, S. M. H. Mammalian sperm chromatin structure and assessment of DNA fragmentation. **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**, v. 24, n. 12, p. 561-569, 2007.
- AOKI, V. 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, n. 6, p. 890-898, 2006.
- AZIZ, N.; NOVOTNY, J.; OBORNA, I.; FINGEROVA, H.; BREZINOVA, J.; SVOBODOVA, M. Comparison of chemiluminescence and flow cytometry in the estimation of reactive oxygen and nitrogen species in human semen. **Fertility and Sterility**, v. 94, n. 1, p. 2604-2608, 2010.
- BADOUARD, C.; MÉNÉZO, Y.; PANTEIX, G.; RAVANAT, J. L.; DOUKI, T.; CADET, J.; FAVIER, A. Determination of new types of DNA lesions in human sperm. **Zygote**, v. 16 n. 1, p. 9-13, 2008.
- BALHORN, R. A model for the structure chromatin in mammalian sperm. **The Journal of Cell Biology**, v. 93, n. 2, p. 298-305, 1982.
- BALHORN, R. Protein family review: the protamine family of sperm nuclear proteins. **Genome Biology**, v. 8, n. 9, p. 227-235, 2007.
- BALHORN, R. ; CORZETT, M.; MAZRIMAS, J.; WATKINS B. Identification of bull protamine disulfides. **Biochemistry**, v. 30, p. 175 – 181, 1991.
- BARCELOS, R. P.; SOUZA, M. A.; AMARAL, G. P.; STEFANELLO, S. T.; BRESCIANI, G.; FIGHERA, M. R.; SOARES, F. A. A.; BARBOSA, N. V. Caffeine supplementation modulates oxidative stress markers in the liver of trained rats. **Life Sciences**, v. 96, p. 40-45, 2014.
- BARROS, C. M.; PEGORER, M. F., VASCONCELOS, J. L., EBERHARDT, B. G.; MONTEIRO, F. M. Importance of sperm genotype (indicus versus taurus for fertility and embryonec development at elevated temperatures. **Theriogenology**, v. 56, n. 1, p. 210-218, 2006.

BARROSO, G.; MORSHEDI, M.; OEHNINGER, S. Analysis of DNA fragmentation, plasma membrane translocation of phosphatidylserine and oxidative stress in human spermatozoa. **Human Reproduction**, v. 15, p. 1338-1344, 2000.

BELETTI, M. E.; MELLO, M. L. S. Methodological variants contributing to detection of abnormal DNA – protein complexes in bull spermatozoa. **Brazilian Journal of Genetics**, v. 19, n. 1, p. 97–103, 1996.

BERENGUER, J. G.; PEREGRIN, P. C.; LÓPEZ-FERNÁNDEZ, C.; FERNANDÉZ, J. L.; CALONGE, R. N. Fragmentación Del ADN espermático. **Revista Internacional de Andrologia**, v. 6, n. 3, p. 193–209, 2008.

BERNARDINI, A.; HOZBOR, F.; SANCHEZ, E.; FORNÉS, M. W.; ALBERIO, R. H.; CESARI, A. Conserved ram seminal plasma proteins bind to the sperm membrane and repair cryopreservation damage. **Theriogenology**, v. 76, n. 3, p. 436-447, 2011.

BIANCHI, P. G.; MANICARDI, G. C.; URNER, F.; CAMPANA, A.; SAKKAS, D. Chromatin packaging and morphology in ejaculated human spermatozoa: evidence of hidden anomalies in normal spermatozoa. **Molecular Human Reproduction**, v. 2, n. 3, p. 139-144, 2014.

BLUMER, C. G.; FARIELLO, R. M.; RESTELLI, A. E.; SPAINE, D. M.; BERTOLLA, R. P.; CEDENHO, A. P. Sperm nuclear DNA fragmentation and mitochondrial activity in men with varicocele. **Fertility and Sterility**, v. 90, n. 5, p. 1716-1722, 2008.

BOE HANSEN, G. B.; MORRIS, I. D.; ERSBOLL, A. K.; GREVE, T.; CHRISTENSEN, P. DNA integrity in sexed bull sperm assessed by neutral comet assay and sperm chromatin structure assay. **Theriogenology**, v. 63, p. 1789-1802, 2005.

BOUZID, M. A.; HAMMOUDA, O.; MATRAN, R.; ROBIN, S.; FABRE, C. Changes in oxidative stress markers and biological markers of muscle injury with aging at rest and in response to an exhaustive exercise. **Plos One**, v. 9, n. 3, p. [e90420-e90427], 2014

BRADFORD, M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. **Anal Biochemistry**, v. 72, p. 248-254, 1976.

BYERS, S. W. Effect of scrotal insulation on the ability of ram testes to produce testosterone in vitro. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 71, n. 1, p. 17-21, 1984.

BYERS, S. W.; GLOVER, T. D. Effect of scrotal insulation on the pituitary-testicular axis of the ram. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 71, n. 1, p. 23-31, 1984.

CARRELL, D. T.; EMERY, B. R.; HAMMOUD, S. Altered protamine expression and diminished spermatogenesis: what is the link? **Human Reproduction update**, v. 13, n. 3, p. 1-15, 2007.

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, acrosomal and mitochondrial membranes. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 42, p. 479-488, 2007.

CHANGHE ZHANG; CHANGJUN HUANG; YUAN TIAN; XIANGCHENG LI. Polyol pathway exacerbated ischemia/reperfusion-induced injury in steatotic liver. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2014, p. 1-9, 2014

CROMPTON, M. Bax, bid and the permeabilization of the mitochondrial outer membrane in apoptosis. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 12, p. 414-419, 2000.

DANDEKAR, S. P.; NADKARNI, G. D.; KULDARNI, V. S.; PUNEKAR, S. Lipid peroxidation and antioxidant enzymes in male infertility. **Journal of Postgraduate Medicine**, v. 48, n. 3, p. 186-189, 2002.

DE LAMIRANDE, E.; JIANG, H.; ZINI, A.; KODAMA, H.; GAGNON, C. Reactive oxygen species and sperm physiology. **Reviews of Reproduction**, v. 2, p. 48-54, 1997.

DONNELLY, E.T.; O CONNELL, M.; MCCLURE, N.; LEWIS, S. E. M. Differences in nuclear DNA fragmentation and mitochondrial integrity of semen and prepared human spermatozoa. **Human Reproduction**, v. 15, n.7, p. 1552-1561, 2000.

DREVET, J. R. The antioxidant glutathione peroxidase family and spermatozoa: A complex story. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 250, p. 70-79, 2006.

EVENSON, D.; JOST, L. Sperm chromatin structure assay is useful for fertility assessment. **Methods Cell Science Journal**, v. 22, n. 2-3, p. 169-189, 2000.

EVENSON, D. P.; WIXON, R. Clinical aspects of sperm DNA fragmentation detection and male infertility. **Theriogenology**, v. 65, p. 979-991, 2006.

FARQUHARSON, B. A whole farm approach to planned animal health and production for sheep clients in Australia. **Small Ruminant Research**, v. 86, n. 1 - 3, p. 26-29, 2009.

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, n. 2, p. 176-188, 2006.

FERNÁNDEZ-ABELLA, D.; DA COSTA, M.; GUÉRIN, Y.; DACHEUX, J. L. Fertility os undiluted ram epididymal spermatozoa stored for several days at 4 C. **Animal**, v. 25, p. 1-7, 2014.

FERNÁNDEZ-GONZALEZ, R.; MOREIRA, P. N.; PÉREZ-CRESPO, M.; SÁNCHEZ-MARTÍN, M.; RAMIREZ, M. A.; PERICUESTA, E.; BILBAO, A.; BERMEJO-ALVAREZ, P.; HOURCADE, J. D.; FONSECA, F. R.; GUTIÉRREZ-ADÁN, A. Long-term effects of mouse intracytoplasmic sperm injection with DNA - Fragmented sperm on health and behavior of adult offspring. **Biology of Reproduction**, v. 78, p. 761-772, 2008.

FERRAMOSCA, A.; PROVENZANO, S. P.; MONTAGNA, D. D.; COPPOLA, L.; ZARA, V. Oxidative stress negatively affects human sperm mitochondrial respiration. *Urology*, v. 82, n. 1, p. 78-83, 2013.

FERRAZ, M. A. M. M.; SIMÕES, R.; BARROS, F. R. O.; MILLAZZOTO, M. P.; VISINTIN, J. A.; ASSUMPÇÃO, M. E. O. A. Gene expression profile of protamines and transition nuclear proteins in bovine testis. **Brazilian Journal Veterinary Research and Animal Science**, v. 50, n. 4, p. 316-322, 2013.

FEUGANG, J. M.; RODRIGUEZ-OSORIO, N.; KAYA, A.; WANG, H.; PAGE, G.; OSTERMEIER, G. C.; TOPPER, E. K.; MEMILI, E. Transcriptome analysis of bull spermatozoa: implications for male fertility. **Reproductive Biomedicine Online**, v. 21, p. 312-324, 2010.

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, n. 6, p. 1299-1304, 1979.

FLEMING, J. S.; FU YU; MCDONALD, R. M.; NEYERS, S. A.; MONTGOMERY, G. W.; SMITH, J. F.; NICHOLSON, H. D. Effects of scrotal heating on sperm surface protein PH-20 expression in sheep. **Molecular Reproduction and Development**, v. 68, p. 103-114, 2004.

FLESCHE, F. M.; GADELLA, B. M. Dynamics of the mammalian sperm plasma membrane in the process of fertilization. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1469, n. 3, p. 197-235, 2000.

GADELLA, B.; COLENBRANDER, B.; VAN-GOLDE, L.; LOPEZ-CARDOZO, B. Boar seminal vesicles secrete arylsulfatases into seminal plasma: evidence that desulfation of seminolipid occurs only after ejaculation. **Biology of Reproduction**, v. 48, p. 483-489, 1993.

GANDINI, L.; LOMBARDO, F.; PAOLI, D.; CAPONECCHIA, L.; FAMILIARI, G.; VERLENGIA, C.; PONDERO, F.; LENZI, A. Study of apoptotic DNA fragmentation in human spermatozoa. **Human Reproduction**, v. 15, p. 830-839, 2000.

GANGULY, I.; GAUR, G. K.; KUMAR, S.; MANDAL, D. K.; KUMAR, M.; SINGH, U.; KUMAR, S.; SAHARMA, A. Differential expression of protamine 1 and 2 genes in mature spermatozoa of normal and motility impaired sêmen producing crossbred Frieswal (HF x Sahiwal) bulls. **Research in Veterinary Science**, v. 94, n.2, p. 256-262, 2013.

GANTER, M. Veterinary consultancy and health schemes in sheep: experiences and reflection form a local German outlook. **Small Ruminant Research**, v. 76, n. 1 - 2, p. 55-67, 2008.

GARAIOVÁ, I.; MUCHOVA, J.; SUSTROVÁ, M.; BLAZICEK, P.; SIVONOVÁ, M.; KVASNICKA, P.; PUESCHEL, S.; DURACKOVA, Z. The relationship between antioxidant systems and some markers of oxidative stress in persons with Down syndrome. **Biologia Bratislava**, v. 59, n. 6, p. 787-794, 2004.

GARRIDO, N.; MESEGUER, M.; SIMON, C.; PELLICER, A.; REMOHI, J. Pro-oxidative and anti-oxidative imbalance in human semen and its relation with male fertility. **Asian Journal of Andrology**, v. 6, p. 59-65, 2004.

- GAT, Y.; BACHAR, G. N.; ZUKERMAN, Z.; BELENKY, A.; GORNISH, M. Varicocele: a Bilateral disease. **Fertility and Sterility**, v. 81, n.2, p. 424-429, 2004.
- GIANNATTASIO, A.; DE ROSA, M.; SMERAGLIA, R.; ZARRILLI, S.; CIMMINO, A.; DI ROSARIO, B.; RUGGIERO, R.; COLAO, A.; LOMBARDI, G. Glutathione peroxidase (GPx) activity in seminal plasma of healthy and infertile males. **Journal of Endocrinological Investigation**, v. 25, p. 983-986, 2002.
- GILBERT, I.; BISSONNETTE, N.; BOISSONNEAULT, G.; VALLÉE, M.; ROBERT, C. A molecular analysis of the population of mRNA in bovine spermatozoa. **Reproduction**, v. 133, n. 6, p. 1073-1086, 2007.
- GILL-SHARMA, M. K.; CHOUDHURI, J.; D'SOUSA, S. Sperm Chromatin Protamination: an endocrine Perspective. **Protein & Peptide Letters**, v. 18, p. 786-801, 2011.
- GOMEZ, E.; IRVINE, D. S.; AITKEN, R. J. Evaluation of a spectrophotometric assay for the measurement of malondialdehyde and 4-hydroxyalkenals in human spermatozoa: relationships with semen quality and sperm function. **International Journal of Andrology**, v. 21, p. 81-94, 1998.
- GOSÁLVEZ, J.; LÓPEZ-FERNÁNDEZ, C.; FERNÁNDEZ, J. L.; GOURAUD, A.; HOLT, W. V. Relationships between the dynamics of iatrogenic DNA damage and genomic design in mammalian spermatozoa from eleven species. **Molecular Reproduction and Development**, v. 78, n. 12, p. 951-961, 2011.
- GU, Z. T.; WANG, H.; LI, L.; LIU, Y. S.; DENG, X. B.; HUO, S. F.; YUAN, F. F.; LIU, Z. F.; TONG, H. S.; SU, L. Heat stress induces apoptosis through transcription-independent p53-mediated mitochondrial pathways in human umbilical vein endothelial cell. *Scientific Reports*, v. 4, n. 4469, p. 1-10, 2014
- GUR, Y.; BREITBART, H. Protein synthesis in sperm: dialog between mitochondria and cytoplasm. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 282, p. 45-55, 2008.
- GUTHRIE, H. D.; WELCH, G. R.; LONG, J. A. Mitochondrial function and reactive oxygen species action in relation to boar motility. **Molecular and Cell Endocrinology**, v. 70, p. 1209-1215, 2008.
- HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. Cellular responses to oxidative stress: adaptation, damage, repair, senescence and death. In: _____ **Free Radicals in Biology and Medicine**. Oxford: Oxford University Press, 2007. Cap. 4, p. 187-268.
- HAMMADEH, M.; HAMAD, M.; MONTENARH, M.; FISCHER-HAMMADEH, C. Protamine contents and P1/P2 ratio in human spermatozoa from smokers and non-smokers. **Human Reproduction**, v. 25, n. 11, p. 2708-2720, 2010.
- HENGARTNER, M. O. The biochemistry of apoptosis. **Nature**, v. 407, p. 770-776, 2000.

HIKIM, A. P. S.; LUE, Y. ; YAMAMOTO, C. M.; VERA, Y.; RODRIGUEZ, S.; YEN, P. H.; SOENG, K.; WANG, C.; SWEDLOFF, R. Key apoptotic pathways for heat-induced programmed germ cell death in the testis. **Endocrinology**, v. 144, n. 7, p. 3167-3175, 2003.

HOLT, W. Fundamental aspects of sperm cryobiology: the importance of species and individual differences. **Theriogenology**, v. 53, p. 47-58, 2000.

JARROUGE, M. G.; DOMINGOS, M. F.; TUNDISI, M.; MARTIN, N. F. Regulação do metabolismo. In: _____ **Bioquímica Básica**. São Paulo: Luana Livraria e Editora LTDA, 1997. Parte IV, p. 207-263.

JIA, Y.; HIKIM, A. P. S.; LUE, Y.; SWERDLOFF, R.; VERA, Y.; ZHANG, X.; HU, Z.; LI, Y.; LIU, Y.; WANG, C. Signaling pathways for germ cell death in adult cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*) induced by mild testicular hyperthermia and exogenous testosterone treatment. **Biology of Reproduction**, v. 77, p. 83-92, 2007.

JOHNSON, L. A.; WILKER, C. E.; CERELLI, J. S. Spermatogenesis in the bull. In: TECHNICAL CONFERENCE AN ARTIFICIAL INSEMINATION AND REPRODUCTION, 15., 1994. Milwaukee, WI. **Proceedings...** Columbia, MO:NAAB, 1994. p. 9-27.

JONES, R.; MANN, T. Damage to ram spermatozoa by peroxidation of endogenous phospholipids. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 50, p. 261-168, 1977.

JURISCOVA, A.; LOPES, S.; MERIANO, J.; OPPEDISANO, L.; CASPER, R.; VARMUZA, S. DNA damage in round spermatids of mice with targeted disruption of the Pplc gene and in testicular biopsies of patients with non-obstructive azoospermia. **Molecular Human Reproduction**, v. 5, p. 323-330, 1999.

KANKOFER, M.; KOLM, M.; AURICH, J.; AURICH, C. Activity of glutathione peroxidase, superoxide dismutase and catalase and lipid peroxidation intensity in stallion semen during storage at 58°C. **Theriogenology**, v. 63, p. 1354-1365, 2005.

KLEENE, K. C. Multiple controls over the efficiency of translation of the mRNAs encoding transition proteins, protamines, and the mitochondrial capsule selenoprotein in late spermatids in mice. **Developmental Biology**, v.159, n.2, p. 720-731, 1993.

KLEENE, K. C. Poly (A) shortening accompanies the activation of translation of five mRNAs during spermiogenesis. **Development**, v.106, n.2, p. 367-373, 1989.

KOOPERS, A. J.; DE IULIIS, G. N.; FINNIE, J. M.; MCLAUGHLIN, E. A.; AITKEN, R. J. Significance of mitochondrial reactive oxygen species in the generation of oxidative stress in spermatozoa. **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 93, n. 8, p. 3199-3207, 2008.

KOSOWER, N. S.; KATAYOSE, H.; YANAGAMACHI R. Thiol-disulfide status and acridine orange fluorescence of mammalian sperm nuclei. **Journal of Andrology**, v. 13, p. 34-348, 1992.

- LAMBARD, S.; GALERAUD-DENIS, I.; MARTIN, G.; LEVY, R.; CHOCAT, A.; CARREAU, S. Analysis and significance of mRNA in human ejaculated sperm from normozoospermic donors: relationship to sperm motility and capacitation. **Molecular Human Reproduction**, v. 10, n. 7, p. 535-541, 2004.
- LARSON-COOK, K. L.; BRANNIAN, J. D.; HANSEN, K. A.; KASPERSON, K. M.; AAMOLD, E. T.; 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, n. 4, p. 895-902, 2003.
- LEAHY, T.; CELI, P.; BATHGATE, R.; EVANS, G.; MAXWELL, W. M. C.; MARTI, J. I. Flow-sorted ram spermatozoa are highly susceptible to hydrogen peroxide damage but are protected by seminal plasma and catalase. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 22, p. 1131-1140, 2010.
- LENZI, A.; GANDINI, L.; PICARDO, M.; TRAMER, F.; SANDRI, G.; PANFILI, E. Lipoperoxidation damage of spermatozoa polyunsaturated fatty acids (PUFA): scavenger mechanisms and possible scavenger therapies. **Front Biosciences**, v. 5, p. 1-5, 2000.
- LEWIS, J. D.; SAPERAS, N.; SONG, Y.; ZAMORA, M. J.; CHIVA, M. AUSIÓ, J. Histone H1 and the origin of protamines. **Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America**, v. 101, n. 12, p. 4148-4152, 2004.
- LEWIS, S. E.; AGBAJE, I. M. Using the alkaline comet assay in prognostic test for male infertility and assisted reproductive technology outcome. **Mutagenesis**, v. 23, n. 3, p. 163 – 170, 2008.
- LI, T.; SINGAL, P. K. Adriamycin-induced early changes in myocardial antioxidant enzymes and their modulation by probucol. **Circulation**, v. 102, n. 17, p. 2105 - 2110, 2000.
- LINDAHL, T.; ANDERSSON, A. Rate of chain breakage at apurinic sites in double-stranded deoxyribonucleic acid. **Biochemistry**, v. 11, p. 3618-3623, 1972.
- LÓPEZ-FERNÁNDEZ, C.; FERNÁNDEZ, J. L.; GOSÁLBEZ, A.; ARROYO, F.; VÁSQUEZ, J. M.; HOLT, W. V.; GOSÁLVEZ, J. Dynamics of sperm DNA fragmentation in domestic animals. III. Ram. **Theriogenology**, v. 70, n. 8, p. 898-908, 2008.
- LUE, Y.; HIKIM, A. P. S.; SWERDLOFF, R. S.; IM, P.; TAING, K. S.; BUI, T.; LEUNG, A.; WANG, C. Single exposure to heat inducer stage-specific germ cell apoptosis in rats: role of intratesticular testosterone on stage specificity. **Endocrinology**, v. 140, n. 4, p. 1709-1717, 1999.
- MAHFOUDH-BOUSSAID, A.; TKA, K. H. A.; ZAOUALI, M. A.; ROSELLÓ-CATAFAU, J.; ABDENNEBI, H. B. Effects of trimetazidine on the Akt/eNOS signaling pathway and oxidative stress in an in vivo rat model of renal ischemia-reperfusion. **Renal Failure**, v. 36, n. 9, p. 1436-1442, 2014.
- MAHFOUZ, R.; SHARMA, R.; LACKNER, J.; AZIZ, N.; AGARWAL, A. Evaluation of chemiluminescence and flow cytometry as tools in assessing production of hydrogen peroxide

and superoxide anion in human spermatozoa. **Fertility and Sterility**, v. 92, n. 2, p. 819-827, 2009.

MAHFOUZ, R.; SHARMA, R.; THIYAGARAJAN, A.; KALE, V.; GUPTA, S.; SABANEKH, E.; AGARWAL, A. Semen characteristics and sperm DNA fragmentation in infertile men with low and high levels of seminal reactive oxygen species. **Fertility and Sterility**, v. 94, n. 6, p. 2141-2146, 2010.

MAIER, W. M.; NUSSBAUM, G.; DOMENJOUR, L.; KLEMM, U.; ENGEL, W. The lack of protamine 2 (PT 2) in boar and bull spermatozoa is due to mutations within P 2 gene. **Nuclei Acid Research**, v. 18, n. 5, p. 1249-1254, 1990.

MAIORINO, M.; BOSELLO, V.; URSINI, F.; FORESTA, C.; GAROLLA, A.; SCAPIN, M.; SZTAJER, H.; FLOHÉ, L. Genetic variations of gpx-4 and male infertility in humans. **Biology of Reproduction**, v. 68, p. 1134-1141, 2003.

MANOCHANTR, S.; CHIAMCHANYA, C.; SOBHON. P. Relationship between chromatin condensation, DNA integrity and quality of ejaculated spermatozoa from infertile men. **International Journal of Andrology**, v. 44, p. 187-199, 2012.

MARTI, E.; MARA, L.; MARTI, J. I.; MUIÑO-BLANCO, M. T.; CEBRIÁN-PÉREZ, J. A. Seasonal variations in antioxidant enzyme activity in ram seminal plasma. **Theriogenology**, v. 67, p. 1446-1454, 2007.

MARTI, E.; PEREZ-PE, R.; COLAS, C.; MUINO-BLANCO, T.; CEBRIAN-PEREZ, J. A. Study of apoptosis-related markers in RAM spermatozoa. **Animal Reproduction Science**, v. 106, n. 1-2, p. 113-132, 2008.

MARTI, J.; MARTI, E.; CEBRIÁN-PEREZ, J. A.; MUIÑO-BLANCO, T. Survival rate and antioxidant enzyme activity of ram spermatozoa after dilution with different extenders or selection by a dextran swim-up procedure. **Theriogenology**, v. 60, p. 1025-1037, 2003.

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.

MATTIOLI, M.; BARBONI, P.; LUCIDI, P.; SEREN, E. Identification of capacitation in boar spermatozoa by chlortetracycline staining. **Theriogenology**, v. 45, n. 2, p. 373-381, 1996.

MCLAY, D. W.; CLARKE, H. J. Remodeling the paternal chromatin at fertilization in mammals. **Reproduction**, v. 125, n. 5, p. 625-633, 2003.

MCPHERSON, S.; LONGO, F. J. Chromatin structure function during mammalian spermatogenesis: DNA nicking repair in elongating spermatidis. **European Journal of Histochemistry**, v. 37, p. 109-128, 1993.

MENNELLA, M. R.; JONES, R. Properties of spermatozoal superoxide dismutase and lack of involvement of superoxides in metal-ion-catalysed lipid-peroxidation reactions in semen. **Biochemical Journal**, v. 191, n. 2, p. 289-297, 1980.

MIES FILHO, A. **Reprodução dos animais e inseminação artificial**. 4. ed. Porto Alegre: Sulina, 1978. v. 1, 765 p.

MING-YI ZHOU; GOMEZ-SANCHEZ, C. E. Universal TA Cloning. **Current Issues in Molecular Biology**, v. 2, n. 1, p. 1-7, 2000.

MIYAGAWA, Y.; NISHIMURA, H.; TSUJIMA, A.; MATSUOKA, Y.; MATSUMIYA, K.; OKUYAMA, A.; NISHIMUNE, Y.; TANAKA, H. Single-nucleotide polymorphisms and mutation analyses of the TNP 1 and TNP 2 genes of fertile and infertile human male populations. **Journal of Andrology**, v. 26, n. 6, p. 779–786, 2005.

MURPHY, M. P. How mitochondria produce reactive oxygen species. **Biochemical Journal**, v. 417, p. 1-13, 2009.

NCBI. **National Center for Biotechnology Information. Gene. TNP 1 e TNP 2**. 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/?term=TNP1+OVIS>>. Acesso em: 10 mar. 2013.

NICHI, M.; BOLS, P. E. J.; ZUGE, R. M.; BARNABE, V. H.; GOOVAERTS, I. G. G.; BARNABE, R. C.; CORTADA, C. N. Seasonal variation in semen quality in *Bos indicus* and *Bos taurus* bulls raised under tropical conditions. **Theriogenology**, v. 66, p. 822-828, 2006.

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

OHKAWA, H.; OHISHI, N.; YAGI, K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. **Analytical Biochemistry**, v. 95, p. 351-358, 1979.

OKAMURA, N.; IWAKY, Y.; HIRAMOTO, S.; TAMBA, M.; BANNAL, S.; SUGITA, Y. Molecular cloning and characterization of the epididymis-specific glutathione peroxidase-like protein secreted in the porcine epididymal fluid. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1336, p. 99-109, 1997.

OLDEREID, N.; DE ANGELI, P.; WIGER, R. CLAUSEN, O. Expression of Bcl-2 family proteins and spontaneous apoptosis in normal human testis. **Molecular Human Reproduction**, v. 7, p. 403-308, 2001.

OLIVA, R. Protamines and male fertility. **Human reproduction update**, v. 12, n. 4, p. 417 – 435, 2006.

OTT, U.; ASCHOFF, A.; FUNFSTUCK, G.; JIRIKOWSKI, G.; WOLF, G. DNA fragmentation in acute and chronic rejection after renal transplantation. **Transplantation Proceedings**, v. 39, n. 1, p. 73-77, 2007.

PAASCH, U.; GRUNEWALD, S.; AGARWAL, A.; GLANDER, H. The activation pattern of caspases in human spermatozoa. **Fertility & Sterility**, v. 81, p. 802-809, 2004.

- PARADOWSKA-DOGAN, A.; FERNANDEZ, A.; BERGMANN, M.; KRETZER, K.; MALLIDIS, C.; VIEWEG, M.; WALISZEWSKI, P.; ZITZMANN, M.; WEIDNER, W.; STEGER, K.; KLIESCH, S. Protamine mRNA ratio in stallion spermatozoa correlates with mare fecundity. **Andrology**, v. 2, n. 4, p. 521-530, 2014.
- PARKS, J. E.; GRAHAM, J. K. Effects of cryopreservation procedures on sperm membranes. **Theriogenology**, v. 38, n. 2, 209-222, 1992.
- PARKS, J. E.; HAMMERSTEDT, R. H. Developmental changes occurring in the lipids of ram epididymal spermatozoa plasma membrane. **Biology of Reproduction**, v. 32, p. 653-668, 1985.
- PAUL, C.; TENG, S.; SAUNDERS, P. T. K. A single, mild, transient scrotal heat stress causes hypoxia and oxidative stress in mouse testes, which induces germ cell death. **Biology of Reproduction**, v. 80, p. 913-919, 2009.
- PÉREZ-CRESPO, M.; PINTADO, B.; GUTIÉRREZ-ADÁN, A. Scrotal heat stress effects on sperm viability, sperm DNA integrity, and the offspring sex ratio in mice. **Molecular Reproduction and Development**, v. 75, p. 40-47, 2008.
- PERIS, S. I.; BILODEAU, J. F.; DUFOUR, M.; BAILEY, J. L. Impact of cryopreservation and reactive oxygen species on DNA integrity, lipid peroxidation, and functional parameters in ram sperm. **Molecular Reproduction Development**, v. 74, p. 878-892, 2007.
- PERREAULT, S.; BELKER, A.; HESS, R.; TENOVER, L. Synopsis: 2003 Annual Meeting of the American Society of Andrology. **Journal of Andrology**, v. 24, n. 6, p. 928-931, 2003.
- POTTS, R. J.; JEFFERIES, T. M.; NOTARIANNI, L. J. Antioxidant capacity of the epididymis. **Human Reproduction**, v. 14, n. 10, p. 2513-2516, 1999.
- PUGLISI, R.; MACCARI, I.; PIPOLO, S.; MANGIA, F.; BOITANI, C. The nuclear form of glutathione peroxidase 4 colocalizes and directly interacts with protamines in the nuclear matrix during mouse sperm chromatin assembly. **Spermatogenesis**, v. 4, p. e28460-e28468, 2014.
- QUERALT, R.; ADROER, R.; OLIVA, R.; WINKFEIN, R. J.; RETIEF, J. D.; DIXON, G. H. Evolution of protamine P1 genes in mammals. **Journal of Molecular Evolution**, v. 40, n. 6, p. 601-607, 1995.
- RAHMAN, M. B.; VANDAELE, L.; RIJSSELAERE, T.; MAES, D.; HOOGEWIJS, M.; FRIJTERS, A.; NOORDMAN, J.; GRANADOS, A.; DERNELLE, E.; SHAMSUDDIN, M.; PARRISH, J. J.; VAN SOOM, A. Scrotal insulation and its relationship to abnormal morphology, chromatin protamination and nuclear shape of spermatozoa in Holstein-Friesian and Belgian Blue bulls. **Theriogenology**, v. 76, p. 1246-1257, 2011.
- REYES, J. G.; FARIAS, J. G.; HENRÍQUEZ-OLAVARRIETA, S.; MADRID, E.; PARRAGA, M.; ZEPEDA, A. B.; MORENO, R. D. The hypoxic testicle: physiology and pathophysiology. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2012, p. 1-14, 2012.

ROCHA, H. L. O. G.; BELETTI, M. E.; MARCOLINI, T. T.; AMORIN, D. A. Z. Uso de laranja de acridina e azul de toluidina na avaliação da fertilidade masculina. **Journal of Biosciences**, v.18, n. 1, p. 65–77, 2002.

RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, H. State of the art in farm animal sperm evaluation. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 9, n. 1, p. 91-101, 2007.

ROONEY, A. P.; ZHANG, J.; NEI, M. An unusual form of purifying selection in sperm protein. **Molecular Biology and Evolution**, v. 17, n. 2, p. 278 – 283, 2000.

SAKKAS, D.; ALVAREZ, J. G. Sperm DNA fragmentation: mechanisms of origin, impact on reproductive outcome, and analysis. **Fertility and Sterility**, v. 93, n. 4, p. 1027-1036, 2010.

SAKKAS, D.; MANICARDI, G.; TOMLINSON, M.; MANDRIOLI, M.; BIZZARO, D.; BIANCHI, P.; BIANCHI, U. The use of two density gradient centrifugation techniques and the swim-up method to separate spermatozoa with chromatin and nuclear DNA anomalies. **Human Reproduction**, v. 15, p. 1112-1116, 2000.

SAKKAS, D.; MOFFATT, O.; MANICARDI, G. C.; MARIETHOZ, E.; TAROZZI, N.; BIZARRO, D. Nature of DNA damage in ejaculated human spermatozoa and the possible involvement of apoptosis. **Biology of Reproduction**, v. 66, n. 4, p. 1061–1067, 2002.

SAKKAS, D.; SELI, E.; BIZZARO, D.; TAROZZI, N.; MANICARDI, G. Abnormal spermatozoa in the ejaculate: abortive apoptosis and faulty nuclear remodelling during spermatogenesis. **Reproductive Biomedicine Online**, v. 7, p. 428-432, 2004.

SANOCKA, D.; KURPISZ, M. Reactive oxygen species and sperm cells. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 2, p. 1 -7, 2004.

SANTIANI, A.; EVAGELISTA, S.; SEPÚLVEDA, N.; RISOPATRÓN, J.; VILLEGAS, J.; SÁNCHEZ, R. Addition of superoxide dismutase mimics during cooling process prevents oxidative stress and improves semen quality parameters in frozen/thawed ram spermatozoa. **Theriogenology**, v. 82, p. 884-889, 2014.

SAUTIERE, P.; BELAICHE, D.; MARTINAGE, A.; LOIR, M. Primary structure of the ram (*Ovis aries*) protamine. **European Journal of Biochemistry**, v. 144, p. 121-125, 1984.

SENGER, P. L. **Pathways to pregnancy and parturition**. 2. ed. Washington: Current Conceptions, 2003a. v. 1, 368 p.

SENGER, P. L. The organization and function of the male reproductive system. In: SENGER, P. L. **Pathways to pregnancy and parturition**. Pullman: Current Conceptions, 2003b. Cap. 3, p 44 - 79.

SETCHELL, B. P. The parkes lecture: heat an the testis. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 114, n. 2, p. 179-194, 1998.

- SHAMAN, J. A.; PRISZTOKA, R.; WARD, W. S. Topoisomerase IIB and an extracellular nuclease interact to digest sperm DNA in an apoptotic-like manner. **Biology of Reproduction**, v. 75, n. 5, p. 742-748, 2006.
- SHARMA, J. B.; SHARMA, A.; BAHADUR, A.; VIMALA, N.; SATYAM, A.; MITTAL, S. Oxidative stress markers and antioxidant levels in normal pregnancy and pre-eclampsia. **International Journal of Gynecology and Obstetrics**, v. 94, p. 23-27, 2006.
- SHARMA, R. K.; AGARWAL, A. Role of reactive oxygen species in male infertility. **Urology**, v. 48, n. 6, p. 835-850, 1996.
- SHUKLA, K. K.; MAHDI, A. A.; RAJENDER, S. Apoptosis, spermatogenesis and male infertility. **Frontiers in Bioscience (Elite Edition)**, v. 1, n. 4, p. 746-754, 2012.
- SIKKA, S. C.; RAJASEKARAN, M.; HELLSTROM, W. Role of oxidative stress and antioxidants in male infertility. **Journal of Andrology**, v. 16, n. 6, p. 464-468, 1995.
- SILVA, P. F. N.; GADELLA, B. M. Detection of damage in mammalian sperm cells. **Theriogenology**, v. 65, p. 958-978, 2006.
- SIMÕES, R.; FEITOSA, W. B.; MENDES, C. M.; MARQUES, M. G.; NICACIO, A. C.; 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. 83, n. 3, p. 79-83, 2009.
- SIMÕES, R.; FEITOSA, W. B.; SIQUEIRA, A. F. P.; NICHI, M.; PAULA-LOPES, F. F.; MARQUES, M. G.; PERES, M. A.; BARNABE, V. H.; VISINTIN, J. A.; ASSUMPÇÃO, M. E. O. A. Influence of bovine sperm DNA fragmentation and oxidative stress on early embryo in vitro development outcome. **Reproduction**, v. 146, p. 433-441, 2013.
- SINGH, N. P.; MULLER, C. H. ; BERGER, R. E. Effect of age on DNA double-strand breaks and apoptosis in human sperm. **Fertility and sterility**, v. 80, n. 6, p. 1420-1430, 2003.
- SIVANARAYANA, T.; KRISHNA, C. R.; PRAKASH, G. J.; KRISHNA, K. M.; MADAN, K.; RANI, S.; SUDHAKAR, G.; RAJU, G. A. CASA derived human sperm abnormalities: correlation with chromatin packing and DNA fragmentation. **Gamete Biology**, v. 29, p. 1327, 1334, 2012.
- SMITH, R.; KAUNE, H.; PARODI, D.; MADARIAGA, M.; RIOS, R.; MORALES, I.; CASTRO, A. Increased sperm DNA damage in patients with varicocele: relationship with seminal oxidative stress. **Human Reproduction**, v. 21, n.4, p. 986-993, 2006.
- SOTOLONGO, B.; HUANG, T. T. F.; ISENBERGER, E.; WARD, S. An endogenous nuclease in hamster, mouse and human spermatozoa cleaves DNA into loop-sized fragments. **Journal of Andrology**, v. 26, n. 2, p. 272-280, 2005.
- STOREY, B.T.; ALVAREZ, J.G.; THOMPSON, K.A. Human sperm glutathione reductase activity in situ reveals limitation in the glutathione antioxidant defense system due to supply of NADPH. **Molecular Reproduction and Development**, v. 49, p. 400 – 407, 1998.

- SUE-HEE KIM; DO-HYEON YU; YOUNG-JUN KIM. Apoptosis-like change, ROS, and DNA status in cryopreserved canine sperm recovered by glass wool filtration and Percoll gradient centrifugation techniques. **Animal Reproduction Science**, v. 119, p. 106-114, 2010.
- SUGANUMA, R.; YANAGIMACHI, R.; MEISTRICH, M.L. Decline in fertility of mouse sperm with abnormal chromatin during epididymal passage as revealed by ICSI. **Human Reproduction**, v. 20, n. 11, p. 3101-3108, 2005.
- SULEIMAN, S. A.; ELAMIN ALI, M.; ZAKI, Z. M. S.; EL-MALIK, E. M. A.; NASH, M. A. Lipid Peroxidation and human sperm motility: protective role of vitamin E. **Journal of Andrology**, v. 17, n. 5, p. 530-537, 1996.
- TAMAYO-CANUL, J.; ÁLVAREZ, M.; MATA-CAMPUZANO, M.; ÁLVAREZ-RODRÍGUEZ, M.; DE PAZ, P.; ANEL, L.; MARTÍNEZ-PASTOR, F. Effect of storage method and extender osmolality in the quality of cryopreserved epididymal ram spermatozoa. **Animal Reproduction Science**, v. 129, p. 188-199, 2011.
- TAMBURRINO, L.; MARCHIANI, S.; MONTOYA, M.; MARINO, F. E.; NATALI, I.; CAMBI, M.; FORTI, G.; BALDI, E.; MURATORI, M. Mechanisms and clinical correlates of sperm DNA damage. **Asian Journal of Andrology**, v. 14, n. 1, p. 24-31, 2012.
- TEOH, N. C.; AJAMIEH, H.; WONG, H. J.; CROFT, K.; MORI, T.; ALLISON, A. C.; FARRELL, G. C. Microparticles mediate hepatic ischemia-reperfusion injury and are the targets of diannexin. **Plos One**, v. 9, n. 9, p. 1 - 13, 2014.
- TESARIK, J.; MENDONZA, C.; GRECO, E. Paternal affects acting during the first cell cycle of human preimplantation development after ICSK. **Human Reproduction**, v. 17, n. 1, p. 184-189, 2002.
- 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, n. 9, p. 2061-2070, 2009.
- THONNEAU, P.; BUJAN, L.; MULTIGNER, L.; MIEUSSET, R. Occupational heat exposure and male fertility: a review. **Human Reproduction**, v 13, n. 5, p. 2122-2125, 1998.
- TSAKMAKIDIS, I. A. RAM semen evaluation: Development and efficiency of modern techniques. **Small Ruminant Research**, v. 92, n. 1-3, p. 126-130, 2010.
- UNANIAN, M. M. **Integridade da cromatina**: método complementar para avaliação da qualidade do sêmen bovino. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2000. 21p. (Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Documents, 56).
- VAISBERG, C. N.; LACHEZAR, V. J.; DISHLIANOVA, B.; CHAUSHEV, T. A. Activity, substrate detection and immunolocalization of glutathione peroxidase (GPx) in bovine reproductive organs and semen. **Theriogenology**, v. 65, p. 416-428, 2005.
- VERNET, P.; AITKEN, R. J.; DREVET, J. R. Antioxidant strategies in the epididymis. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 210, p. 31-39, 2004.

- VERNET, P.; RIGAUDIÈRE, N.; GHYSELINCK, N.; DUFAURE, J. P.; DREVET, J. R. In vitro expression. Of a mouse tissue specific glutathione-peroxidase-like protein lacking the selenocysteine can protect stably transfected mammalian cells against oxidative damage, **Biochemistry and Cell Biology**, v. 74, p. 125–131, 1996.
- VERNET, P.; ROCK, E.; MAZUR, A.; RAYSSIGUIER, Y.; DUFAURE, J.; DREVET, J. R. Selenium-independent epididymis-restricted glutathione peroxidase 5 protein (GPX5) can back up failing se-dependent GPXs in mice subjected to selenium deficiency. **Molecular Reproduction and Development**, v. 54, p. 362–370, 1999.
- VILFAN, I. D.; CONWELL, C. C.; HUD, N. Formation of native like mammalian sperm cell chromatin with folded bull protamine. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 19, p. 2088–2095, 2004.
- VIRRO, M. R.; LARSON-COOK, K. L.; EVENSON, D. P. Sperm chromatin structure assay (SCSA) parameters are related to fertilization, blastocyst development, and ongoing pregnancy in in vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection cycles. **Fertility and Sterility**, v. 81, n. 5, p. 1289–1295, 2004.
- VOGLMAYR, J. K.; SETCHELL, B. P.; WHITE, I. G. The effects of heat on the metabolism and ultrastructure of ram testicular spermatozoa. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 24, p. 71–80, 1971.
- WALCZAK-JEDRZEJOWSKA, R.; WOLSK, J. K.; SLOWIKOWSKA-HILCZER, J. The role of oxidative stress and antioxidants in male fertility. **Central European Journal of Urology**, v. 66, n. 1, p. 60–66, 2013.
- WANG, C.; CUI, Y.; WANG, X.; JIA, W. Y.; HIKIM, A. S.; LUE, Y.; TONG, J.; QIAN, L.; SHA, J.; ZHOU, Z.; HULL, L.; LEUNG, A.; SWEDLOFF, S. Transiente scrotal hyperthermia and levonorgestrel enhance testosterone-induced spermatogenesis suppression in men through increased germ cell apoptosis. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 92, n. 8, p. 3292–3304, 2007.
- WANG, H.; JOSEPH, J. A. Quantifying cellular oxidative stress by dichlorofluorescein assay using microplate reader. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 27, n. 5/6, p. 612–616, 1999.
- WARD, W. S.; COFFEY, D. S. DNA packaging and organization in mammalian spermatozoa: comparison with somatic cells. **Biology of Reproduction**, v. 37, p. 569–574, 1991.
- WATSON, P. The roles of lipid and protein in the protection of ram spermatozoa at 5 degrees C by egg-yolk lipoprotein. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 62, p. 483–492, 1981.
- WELWELL JIANG; LIANGLIANG KONG; QINGFENG NL; WENZHOU DING; LIYONG PU; WELBING TANG; LIANBAO KONG. miR-146a Ameliorates liver ischemia/reperfusion injury by suppressing IRAK1 and TRAF6. **Plos One**, v. 9, n. 7, p. e101530–e101542, 2014.

WHITE, I. Lipid and calcium uptake of sperm in relation to cold shock and preservation: A review. **Reproduction Fertility Development**, v. 5, p. 639-658, 1993.

WILLIAMSON, P. The fine structure of ejaculated ram spermatozoa following scrotal heating. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 40, p. 191-195, 1974.

WOLFE, C.; JAMES, P.; GUNNING, A.; LADHA, S.; CHRISTOVA, Y.; JONES, R. Lipid dynamics in the plasma membrane of ram and bull spermatozoa after washing and exposure to macromolecules BSA and PVP. **Molecular Reproduction Development**, v. 59, p. 306-313, 2001.

WOUTERS-TYROU, D.; MARTINAGE, A.; CHEVAILLIER, P.; SAUTIÈRE, P. Nuclear basic proteins in spermiogenesis. **Biochimie**, v. 80, n. 2, p. 117-128, 1998.

WUGANG HOU; YUSHU DONG; JINSHAN ZHANG; ZHONGMIN YIN; HUA WEN; LIZE XIONG; WEI LI. Hypoxia-induced deacetylation is required for tetraploid differentiation in response to testicular ischemia-reperfusion injury. **Journal of Andrology**, v. 33, n. 6, p. 1379-1386, 2012.

YANSEN LI; YUN CAO; FEI WANG; CHUNMEI LI. Scrotal heat induced the nrf2-driven antioxidant response during oxidative stress and apoptosis in the mouse testis. **Acta Histochemica**, v. 116, n. 5, p. 883-890, 2014.

ZINI, A.; AGARWAL, A. Sperm chromatin. Biological and clinical applications in male infertility and assisted reproduction. In: AITKEN, R. J.; DE LULIIS, G. N. **Role of oxidative stress in the etiology of sperm DNA damage**. New York: Springer, 2011a, p. 277-294.

ZINI, A.; AGARWAL, A. Sperm chromatin. Biological and clinical applications in male infertility and assisted reproduction. In: SHARMA, R.; AGARWAL, A. **Spermatogenesis: an overview**. New York: Springer, 2011b, p. 277-294.

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

APÊNDICE A - AVALIAÇÃO DA INTEGRIDADE DE MEMBRANAS PLASMÁTICA E ACROSSOMAL POR CITOMETRIA DE FLUXO CAPILAR.

As sondas iodeto de propídeo [PI (0,5% mg/mL, 0,9% NaCl v/v)] e *psium sativum* conjugada ao fluoróforo isotiocionato de fluoresceína [FITC-PSA (100 µg/mL, azida sódica 10% m/v, DPBS q.s.p. 20 mL)] foram adicionadas na mesma amostra seminal, obtendo-se assim o resultado combinado entre a integridade das membranas plasmática e acrossomal, da mesma população de células.

Os gráficos destas avaliações foram analisados utilizando-se o software FlowJo v8.7 (Flow Cytometry Analysis Software – Tree Star Inc., Ashland, Oregon, USA). Para análise dos gráficos, a população de interesse foi identificada e selecionada segundo o tamanho e a fluorescência das mesmas. Para avaliação das integridades das membranas plasmática e acrossomal, com as sondas fluorescentes PI e FITC-PSA foi observada a distribuição da população de interesse em duas subpopulações de acordo com a intensidade de fluorescência verde. O gráfico foi transformado em histograma e o ponto de encontro da queda da população de baixa fluorescência e do aumento da população de alta fluorescência foi utilizado como ponto de corte. Células que apresentaram fluorescência superior a este ponto foram consideradas verdes positivas (acrossomo íntegro – AI) e as que apresentaram fluorescência inferior a este foram consideradas verdes negativas (acrossomo lesado – AL). A mesma metodologia foi adotada para a fluorescência vermelha, fluorescência superior ao corte, vermelha positiva (membrana plasmática lesada – ML) e fluorescência inferior ao corte, células vermelhas negativas (membrana plasmática íntegra – MI). Os cortes para as duas fluorescências, quando simultâneas e aplicadas a mesma população originaram quatro populações (AIPI, AIPL, ALPI e ALPL).

Figura 28 - Avaliação da integridade das membranas acrossomal e plasmática pelo software FlowJo v8.7 para a análise da associação de sondas FITC-PSA/PI. a: histograma da fluorescência verde; b: histograma da fluorescência vermelha; c: gráfico das fluorescências verde/vermelha, no qual estão representadas as quatro populações e respectivas porcentagens.

Fonte: Hamilton, T.R.S (2014).

APÊNDICE B - AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE MEMBRANA MITOCONDRIAL EM ESPERMATOZOIDES POR CITOMETRIA DE FLUXO CAPILAR.

Como as células espermáticas podem apresentar graduações do potencial de membrana mitocondrial, é comum detectar fluorescências que vão desde o verde, passando pelo alaranjado até o vermelho. Para captar os espectros de fluorescência foi utilizada fluorescência amarela. A população que fluoresce intensamente em amarelo representa células com alto potencial de membrana mitocondrial, pois a excitação e a emissão desta fluorescência são cruzadas com as da fluorescência verde. Já a população que apresenta baixo potencial de membrana mitocondrial será representada na baixa intensidade de fluorescência amarela, células que emitiram fluorescência vermelha serão pouco excitadas por este comprimento de onda. As células foram divididas em subpopulações, de 2 a 3, delimitadas pelas diferentes intensidades de fluorescência. Para análise das amostras foi estabelecido dois pontos de corte ao longo da intensidade de fluorescência com base na distribuição das células. A população que apresentava fluorescência superior a nota de corte mais alta foi definida como população de alto potencial de membrana mitocondrial, a população que se localizava entre os dois pontos de corte foi definida com potencial de membrana mitocondrial intermediário e a população com fluorescência inferior ao ponto de corte mais baixo, definida como população com baixo potencial de membrana mitocondrial.

Figura 29 - Avaliação do potencial de membrana mitocondrial pelo software FlowJo v. 8.7. a. Gráfico de intensidade de fluorescência vermelha para identificação da região selecionada como espermatozoides. b. Populações de alta e baixa atividade mitocondrial. c. Histograma de alta (direita) e baixa (esquerda) atividade.

Fonte: Hamilton, T.R.S (2014).

APÊNDICE C - ANÁLISE DA ESTABILIDADE DA CROMATINA ESPERMÁTICA

Em sala escura, 50 µl de tampão TNE (Tris-HCL 0,01M, NaCl 0,15M, EDTA 1mM, água destilada q.s.p. 500 mL) foi adicionado em aproximadamente 200.000 células, posteriormente acrescentou-se 100 µl de detergente ácido [HCl 0.08 M, NaCl 0.15 M, Triton X-100 0,1% (v/v), água destilada q.s.p. 500 mL]. Após 30 segundos de incubação acrescentou-se por fim 300 µl de solução de laranja de acridina uso [Ácido Cítrico 0.1 M, Na₂PO₄ 0.2 M, EDTA 0.001 M, NaCl 0.15 M, laranja de acridina estoque 6µg/mL (1mg/ml de laranja de acridina – Sigma, água destilada q.s.p. 10 mL), água destilada q.s.p. 120 mL], após 3 -5 minutos realizavam-se as leituras em citômetro de fluxo microcapilar (Guava Easy Cyte™ Mini System). Para validação e caracterização das células em ovinos determinou-se o controle da população de células negativas (não susceptíveis a ação do detergente ácido – fluorescência verde) e o de células positivas (susceptíveis a ação do detergente ácido – fluorescência vermelha). Para tanto utilizou-se gradientes de fragmentação, por incubação com peróxido de hidrogênio 30%. O alfaTYlog é o resultado da divisão da fluorescência vermelha pela fluorescência total (vermelha+verde) e serve para quantificar a extensão da denaturação da estrutura da cromatina da amostra de espermatozoides. Esta análise dos resultados foi realizada pelo software FlowJo v. 8.

Figura 30 - Avaliação da estabilidade da cromatina espermática pelo pelo software FlowJo v. 8.7. a. Gráfico de intensidade de fluorescência verde para identificação da região selecionada como espermatozoides. b. Histograma de alfa T Y log após aplicação da fórmula ($Y_{lw}/Y_{lw+Green}$). População da esquerda sem fragmentação de DNA espermático, população da direita com fragmentação de DNA espermático.

Fonte: Hamilton, T.R.S (2014).

APÊNDICE D - COMETA ALCALINO

Cerca de 25×10^4 espermatozoides por mL foram diluídos em agarose low melting 0,75% (LM) em TBE (0,089M, Tris, 0,089M de ácido bórico e 0,002M EDTA). Para controle positivo da técnica o sêmen foi incubado com H_2O_2 30% (Perhydrol® - Merck) nas proporções de 1:1; 1:2, 1:4 e 1:10. As lâminas foram previamente preparadas com uma camada fina de agarose Normal Melting 1% em TBE, secas em temperatura ambiente. Posteriormente foram adicionados 100 µl da amostra de sêmen diluída em agarose LM e coberto por lamínula. Após solidificação do gel em 4°C, as lamínulas foram retiradas, sendo acrescido mais 300µl de agarose LM e novamente coberta com lamínula. Após solidificação do gel em 4°C, as lamínulas foram retiradas e foi adicionado solução de lise I (100 mM EDTA, 10 mM Tris HCl, 2,5 M NaCl e 40 µg Proteinase K). As lâminas foram incubadas em câmara úmida a 56°C, por 1 hora. Após três lavagens sucessivas com água ultrapura (MilliQ™), em intervalos de cinco minutos, acrescentou-se 1 mL de solução de lise II (SDS 4%). As lâminas foram então incubadas em câmara úmida a 56°C por 1 hora. Após mais três lavagens sucessivas com água ultrapura em intervalos de 5 minutos, as lâminas foram incubadas com solução de lise III (100 mM EDTA, 10 mM tris HCl, 2,5 M NaCl, 4% de triton X100 e 40 mM dithiothreitol) e acondicionou-se as lâminas a 4°C por 2 horas. Após três lavagens sucessivas com água ultra pura em intervalos de 5 minutos, as lâminas foram posicionadas na cuba de eletroforese e imersas em solução de corrida (300 mM NaOH, 1 mM EDTA) por 20 minutos. Após eletroforese (25 minutos, 1,5 V/cm, 270 mA), prosseguiu-se a lavagem com TBE, desidratação com etanol 70%, seguido por etanol 95% e finalizado com álcool etílico absoluto. No dia da leitura, as lâminas foram reidratadas por 1 hora e coradas com Syber Green (SYBR green I, Sigma) diluído 10000 vezes por 1 hora.

Figura 31 - Fotografia de microscopia de epifluorescência da avaliação de fragmentação do DNA espermático de ovinos pelo ensaio cometa alcalino (aumento de 200 x) representando os graus de fragmentação I (a), II (b), III (c) e IV (d).

Fonte: Hamilton, T.R.S (2014).

APÊNDICE E - CLONAGEM DOS GENES CANDIDATOS.

Para a introdução dos produtos de PCR dos genes de interesse, foi utilizado o vetor de clonagem pGEM® T Easy Vector System I - Promega. Resumidamente, o fragmento purificado foi incubado por uma hora e 30 minutos a temperatura ambiente com o plasmídeo modificado e enzima T4 DNA ligase. Cerca de 5 µl da reação foi adicionado a bactérias DH5alfa competentes (método cloreto de cálcio) previamente descongeladas em gelo por 5 minutos. Após incubação por 30 minutos foi induzido um choque térmico a 42°C por dois minutos, seguido por nova incubação por 5 minutos em gelo. Cerca de 450 µl de meio de cultivo de bactérias LB (Invitrogen) foi adicionado e incubado a 37°C por 1 hora. Cinquenta, 100 e 150 µl da cultura foram depositados em placas de meio LB ágar sólido (LB Agar - Lennox - Invitrogen) com 100 µg/ml de ampicilina e X-Gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-beta-D- galacto-pyranoside Thermo Cientific). Estas placas permaneceram por 16 horas a 37°C, quando então foi possível visualizar o crescimento das colônias resistentes a ampicilina e identificar colônias com inserto (brancas) e sem insertos (azuis) pela presença de X-Gal. Quatorze colônias para cada gene foram inoculadas em 5 ml de meio LB líquido com antibiótico overnight para amplificação. Após amplificação, um PCR foi realizado para confirmar a presença do inserto de interesse. Uma cultura positiva para cada gene foi utilizada para a extração do DNA plasmidial através do kit comercial (Illustra plasmidPrep Mini Spin Kit - GE). O DNA resultante foi quantificado em espectrofotômetro nanodrop (NanoDrop ND-1- Spectrophotometer) e confirmado por PCR. Este material foi enviado para sequenciamento e foram obtidas confirmações de que os sequências clonadas eram os genes candidatos. De cada gene clonado foi realizada uma curva de diluição para verificação da eficiência de amplificação e que também foi usada para comparação quantitativa, em número de cópias, com as amostras de cDNA proveniente dos espermatozóides ovinos.

APÊNDICE F - QUADRO DE CORRELAÇÕES ENTRE AS VARIÁVEIS ESTUDADAS NA PARTE 1.

	Volume	Motilidade	Vigor	Turbilho- namento	Concen- tração	Defeitos Maiores	Defeitos Menores	Defeitos Totais	Cometa Grau IV	Cromo- micina A3
Volume	1	0,18184 0,0596	0,14674 0,1296	0,22725 0,018	0,21617 0,0246	-0,14704 0,1289	-0,14599 0,1317	-0,2168 0,0242	-0,03094 0,8578	-0,02693 0,8022
Motilidade		1	0,75346 <.0001	0,75768 <.0001	0,25604 0,0075	-0,41815 <.0001	-0,06358 0,5133	-0,35859 0,0001	0,15297 0,3731	-0,0684 0,5242
Vigor			1	0,86381 <.0001	0,3564 0,0002	-0,34468 0,0003	0,05712 0,5571	-0,23893 0,0128	0,1517 0,3771	-0,00102 0,9924
Turbilho- namento				1	0,43473 <.0001	-0,39257 <.0001	-0,0378 0,6977	-0,3307 0,0005	0,16873 0,3252	0,06024 0,575
Concen- tração					1	-0,31907 0,0008	-0,27041 0,0046	-0,41282 <.0001	0,06296 0,7153	-0,09818 0,36
Defeitos Maiores						1	0,09253 0,3409	0,74733 <.0001	0,23691 0,1642	0,03302 0,7587
Defeitos Menores							1	0,66711 <.0001	-0,29084 0,0853	0,05378 0,6167
Defeitos Totais								1	-0,00448 0,9793	0,05044 0,6388
Cometa Grau IV									1	0,02395 0,9019
Cromo- micina A3										1

Legenda: Valores de p vermelho = correlação significativa ($<0,05$) ; azul = correlação com tendência de efeito significativo ($0,05 < p < 0,10$).

APÊNDICE G - QUADRO DE CORRELAÇÕES ENTRE AS VARIÁVEIS ESTUDADAS NA PARTE 1.

	DNA	ALMI	ALML	AIML	AIMI	Atividade Mito. ALTA	Atividade Mito. BAIXA	Atividade Mito. INTER	Peróxido de Hidrogênio Intracelular	TBARS Induzido	TBARS Espontâneo
Volume	-0,14267 0,1526	-0,04008 0,6805	-0,02572 0,7916	-0,11454 0,2378	0,04743 0,6259	-0,08912 0,359	0,00135 0,989	0,11014 0,2565	0,02019 0,8396	-0,07614 0,4335	-0,04601 0,6363
Motilidade	-0,22434 0,0234	-0,0641 0,5098	-0,11283 0,245	0,093 0,3384	0,03049 0,7541	0,30268 0,0015	-0,16435 0,0892	-0,21325 0,0267	-0,11136 0,2628	-0,13474 0,1644	-0,17171 0,0756
Vigor	-0,18116 0,0684	0,02558 0,7927	-0,1666 0,0848	0,05084 0,6013	0,13852 0,1528	0,30766 0,0012	-0,21145 0,028	-0,19787 0,0401	-0,02871 0,7735	-0,07552 0,4373	-0,31475 0,0009
Turbilhamento	-0,2266 0,022	0,00255 0,9791	-0,25618 0,0074	0,10502 0,2794	0,15567 0,1077	0,3448 0,0003	-0,187 0,0526	-0,25975 0,0066	-0,13617 0,1702	-0,02248 0,8174	-0,28334 0,003
Concentração	-0,3261 0,0008	0,05851 0,5475	-0,09845 0,3107	-0,12384 0,2016	0,08157 0,4013	0,18907 0,05	-0,07383 0,4477	-0,21396 0,0262	-0,2128 0,0309	-0,24183 0,0117	-0,27674 0,0037
Defeitos Maiores	0,33579 0,0006	0,09404 0,333	0,1462 0,1311	0,01222 0,9001	-0,07574 0,4359	-0,14026 0,1477	0,14968 0,1221	0,02814 0,7725	0,07719 0,4384	0,31984 0,0007	0,04174 0,668
Defeitos Menores	-0,13385 0,1798	0,04304 0,6583	0,04963 0,61	0,05319 0,5846	-0,02723 0,7796	0,01457 0,8811	0,05799 0,5511	-0,06389 0,5112	0,201 0,0418	0,02757 0,777	0,14014 0,148
Defeitos Totais	0,18316 0,0654	0,0712 0,464	0,12984 0,1805	0,0366 0,7069	-0,06568 0,4994	-0,07817 0,4213	0,1435 0,1385	-0,02721 0,7799	0,22621 0,0216	0,24666 0,0101	0,15983 0,0985
Cometa Grau IV	0,19449 0,2557	0,28502 0,092	-0,16319 0,3416	0,24424 0,1511	0,05029 0,7708	0,22984 0,1775	-0,09351 0,5875	-0,17732 0,3008	-0,02533 0,8834	0,25444 0,1343	-0,07115 0,6801
Cromomicina A3	-0,00736 0,9467	-0,25308 0,0167	-0,11722 0,274	0,18866 0,0766	0,12195 0,2549	0,00692 0,9487	-0,09 0,4016	0,11938 0,2651	0,24378 0,0246	0,17503 0,1009	0,09601 0,3708
SCSA Modificado	1	0,10723 0,2834	0,20854 0,0354	0,06215 0,5349	-0,26075 0,0081	0,0045 0,9642	-0,00214 0,983	0,02152 0,83	-0,02405 0,8151	0,17431 0,0797	0,16137 0,1052

Legenda: AIMI: Espermatozoides com acrossoma e membrana íntegros, ALML: Espermatozoides com acrossoma e membrana lesados, ALMI: Espermatozoides com acrossoma lesado e membrana íntegra, AIML: Espermatozoides com acrossoma íntegro e membrana lesada, DNA: Avaliação da estabilidade da cromatina espermática, TBARS: substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico. Valores de p vermelho = correlação significativa (<0,05) ; azul = correlação com tendência de efeito significativo (0,05<p<0,10).

APÊNDICE H - QUADRO DE CORRELAÇÕES ENTRE AS VARIÁVEIS ESTUDADAS NA PARTE 1.

	E.G. TNP2	E.G. PRM1	E.G. TNP1	Imuno- deteccção CAT	Imuno- deteccção SOD	Imuno- deteccção GR	Imuno- deteccção GPX bs	Imuno- deteccção GPX bi	A.E. GPX	A.E. GR	A.E. SOD	A.E. CAT
Volume	0,00078 0,9947	0,03404 0,7341	-0,0441 0,6846	0,03026 0,8609	0,04519 0,7935	-0,2178 0,2018	-0,1000 0,5615	-0,0447 0,7954	0,33205 0,0479	-0,0922 0,5928	0,06114 0,7232	0,06681 0,6987
Motil- idade	-0,007 0,9518	0,02782 0,7814	-0,1589 0,1414	0,12413 0,4707	-0,0592 0,7314	-0,0957 0,5787	0,07688 0,6558	0,29832 0,0772	-0,0208 0,9039	-0,0084 0,9608	-0,2278 0,1814	0,2853 0,0917
Vigor	-0,1074 0,3521	0,01136 0,9098	-0,1719 0,1113	0,13034 0,4486	-0,1041 0,5457	-0,1624 0,344	0,12326 0,4739	0,4081 0,0135	0,16895 0,3246	-0,0680 0,6933	-0,2313 0,1747	0,32366 0,0542
Turbilho- namento	-0,0783 0,4985	0,02477 0,8048	-0,1946 0,0708	0,16757 0,3286	-0,0176 0,9187	-0,1912 0,2639	0,08298 0,6304	0,39087 0,0184	0,22048 0,1963	-0,2153 0,2071	-0,2148 0,2083	0,384 0,0208
Concen- tração	0,07224 0,5324	-0,0609 0,5425	-0,0703 0,5171	0,06972 0,6862	-0,2467 0,1469	0,24518 0,1495	0,10845 0,529	0,12123 0,4812	0,23397 0,1696	0,25086 0,14	0,01496 0,931	0,22233 0,1925
Defeitos Maiores	-0,1629 0,1567	-0,0170 0,8651	0,13018 0,2294	0,24992 0,1416	0,11427 0,5069	0,15703 0,3604	0,1236 0,4726	-0,0003 0,9982	0,3401 0,0424	0,17626 0,3038	0,22369 0,1897	-0,4013 0,0153
Defeitos Menores	-0,0205 0,8594	-0,0227 0,8206	-0,05648 0,6034	-0,09076 0,5986	-0,01558 0,9281	0,02415 0,8888	0,13049 0,4481	0,03467 0,8409	0,25969 0,1261	0,01199 0,9447	0,05238 0,7616	-0,03245 0,851
Defeitos Totais	-0,06928 0,5494	-0,057 0,5693	0,03318 0,7603	0,09226 0,5925	0,08877 0,6067	0,06164 0,721	0,12482 0,4682	-0,02946 0,8646	0,25533 0,1329	0,11068 0,5205	0,18459 0,2812	-0,32288 0,0548
Cromo- micina A3	0,01375 0,9141	0,12255 0,2667	-0,12917 0,2795	0,04525 0,8157	0,18719 0,3309	0,06701 0,7298	-0,16345 0,3969	0,10905 0,5734	-0,00892 0,9634	-0,31327 0,098	-0,04822 0,8038	0,0755 0,6971
DNA	-0,10285 0,3832	0,09086 0,3787	0,1908 0,0767	0,40036 0,0284	0,18844 0,3186	-0,10931 0,5653	-0,0731 0,7011	0,22063 0,2413	0,51101 0,0039	-0,51393 0,0037	-0,06309 0,7405	0,04978 0,7939

Legenda: E.G.: Expressão Gênica, A.E.: Atividade enzimática, GPXbs: glutatona peroxidase banda superior, GPXbi: glutatona peroxidase banda inferior, GR: Glutathione Redutase, SOD: Superóxido Dismutase, CAT: Catalase, DNA: Avaliação da estabilidade da cromatina espermática, PRM1: protamina1, TNP1: proteína de transição 1, TNP2: proteína de transição 2. Valores de p vermelho = correlação significante (<0,05) ; azul = correlação com tendência de efeito significante (0,05<p<0,10).

APÊNDICE I - QUADRO DE CORRELAÇÕES ENTRE AS VARIÁVEIS ESTUDADAS NA PARTE 1.

	ALMI	ALML	AIML	AIMI	Atividade Mito. ALTA	Atividade Mito. BAIXA	Atividade Mito. INTER	Peróxido de Hidrogênio Intracelular	TBARS Induzido	TBARS Espontâneo
ALMI	1	0,21466 0,0257	-0,48469 <.0001	-0,07592 0,4349	-0,1745 0,0709	0,32625 0,0006	-0,04219 0,6646	-0,1294 0,1927	0,07719 0,4272	-0,02346 0,8095
ALML		1	-0,17962 0,0629	-0,85149 <.0001	-0,39319 <.0001	0,53773 <.0001	0,05502 0,5717	-0,03396 0,7335	-0,06545 0,5009	0,37734 <.0001
AIML			1	-0,2571 0,0072	0,2284 0,0174	-0,16207 0,0938	-0,10528 0,2782	0,03238 0,7454	-0,05753 0,5542	0,0625 0,5205
AIMI				1	0,2754 0,0039	-0,48683 <.0001	0,03821 0,6946	0,06669 0,5033	0,1723 0,0746	-0,37328 <.0001
Atividade Mito. ALTA					1	-0,56826 <.0001	-0,7718 <.0001	-0,17814 0,0718	-0,02019 0,8357	-0,29634 0,0018
Atividade Mito. BAIXA						1	0,02422 0,8035	0,10419 0,2949	-0,05714 0,5569	0,29499 0,0019
Atividade Mito. INTER							1	0,17352 0,0796	0,05753 0,5543	0,15615 0,1066
Peróxido de Hidrogênio Intracelular								1	-0,1023 0,3038	-0,06272 0,5291
TBARS Induzido									1	0,02908 0,7651
TBARS Espontâneo										1

Legenda: AIMI: Espermatozoides com acrossoma e membrana íntegros, ALML: Espermatozoides com acrossoma e membrana lesados, ALMI: Espermatozoides com acrossoma lesado e membrana íntegra, AIML: Espermatozoides com acrossoma íntegro e membrana lesada, Mito.: Mitocondrial, Inter: Intermediária, TBARS: substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico. Valores de p vermelho = correlação significante (<0,05) ; azul = correlação com tendência de efeito significante (0,05<p<0,10).

APÊNDICE J - QUADRO DE CORRELAÇÕES ENTRE AS VARIÁVEIS ESTUDADAS NA PARTE 1.

	E.G. TNP2	E.G. PRM1	E.G. TNP1	ID CAT	ID SOD	ID GR	ID GPX bs	ID GPX bi	A.E. GPX	A.E. GR	A.E. SOD	A.E. CAT
ALMI	-0,1041 0,3673	-0,2394 0,0154	-0,0053 0,9611	0,22076 0,1957	-0,2509 0,1398	0,02324 0,893	0,09837 0,5681	0,31913 0,0578	0,34142 0,0416	0,04845 0,779	0,07695 0,6555	-0,1480 0,3888
ALML	-0,0368 0,7503	0,01913 0,8487	0,37858 0,0003	-0,1142 0,5069	-0,2010 0,2397	-0,2072 0,2252	-0,1847 0,2807	0,03215 0,8523	-0,3137 0,0624	0,02032 0,9064	-0,0946 0,5829	-0,1222 0,4775
AIML	0,12375 0,2836	0,02904 0,772	-0,0233 0,8299	-0,0282 0,87	-0,0476 0,7826	-0,0042 0,9803	0,03951 0,819	0,10808 0,5304	-0,0805 0,6406	0,03224 0,8519	0,09019 0,6009	0,36833 0,0271
AIMI	-0,0461 0,6905	0,07112 0,4775	-0,3112 0,0033	0,01317 0,9392	0,14215 0,4082	0,29979 0,0757	0,17701 0,3017	-0,1285 0,4548	0,2297 0,1778	0,03868 0,8228	-0,0929 0,59	-0,0369 0,8307
Atividade Mito. ALTA	-0,1356 0,2394	0,06238 0,5334	-0,0838 0,4398	-0,22696 0,1831	-0,40124 0,0153	0,56468 0,0003	0,2409 0,157	-0,09992 0,562	0,17498 0,3074	0,4974 0,002	-0,1181 0,4925	0,08939 0,6041
Atividade Mito. BAIXA	0,11975 0,2996	-0,1581 0,1124	0,17386 0,1073	-0,20063 0,2407	-0,10032 0,5605	-0,10109 0,5574	-0,22232 0,1925	-0,16539 0,3351	-0,5189 0,0012	-0,0715 0,6786	0,13662 0,4269	0,10203 0,5538
Atividade Mito. INTER	0,12173 0,2916	-0,0130 0,8967	-0,0806 0,4576	0,33125 0,0484	0,55518 0,0004	-0,58385 0,0002	-0,16775 0,3281	0,13366 0,4371	0,06947 0,6872	-0,5634 0,0003	0,10206 0,5537	-0,1755 0,3058
Peróxido de Hidrogênio Intracelular	0,16389 0,1689	0,04276 0,6775	-0,0777 0,4875	0,00542 0,975	0,01782 0,9179	0,02943 0,8647	-0,01936 0,9107	0,00387 0,9821	-0,3208 0,0564	0,16567 0,3342	0,15702 0,3604	0,23941 0,1596
TBARS Induzido	-0,39072 0,0004	0,25153 0,0108	0,18529 0,0858	0,3842 0,0207	0,04415 0,7982	-0,02324 0,893	-0,12858 0,4548	0,18668 0,2756	0,35112 0,0358	-0,33329 0,047	-0,17334 0,312	-0,06491 0,7068
TBARS Espontâneo	0,12846 0,2655	-0,06873 0,4925	0,15137 0,1616	0,17738 0,3007	0,02789 0,8717	-0,07204 0,6763	-0,02634 0,8788	0,21146 0,2157	0,04074 0,8135	-0,03907 0,821	0,02721 0,8748	-0,17529 0,3065

Legenda: E.G.: Expressão Gênica, A.E.: Atividade enzimática, ID: imunodeteção, GPXbs: glutatona peroxidase banda superior, GPXbi: glutatona peroxidase banda inferior, GR: Glutatona Redutase, SOD: Superóxido Dismutase, CAT: Catalase, AIMI: Espermatozoides com acrossoma e membrana íntegros, ALML: Espermatozoides com acrossoma e membrana lesados, ALMI: Espermatozoides com acrossoma lesado e membrana íntegra, AIML: Espermatozoides com acrossoma íntegro e membrana lesada, TBARS: substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico. Valores de p vermelho = correlação significativa ($<0,05$) ; azul = correlação com tendência de efeito significativo ($0,05 < p < 0,10$).

APÊNDICE K - QUADRO DE CORRELAÇÕES ENTRE AS VARIÁVEIS ESTUDADAS NA PARTE 1.

	E.G. TNP2	E.G. PRM1	E.G. TNP1	ID CAT	ID SOD	ID GR	ID GPX bs	ID GPX bi	A.E. GPX	A.E. GR	A.E. SOD	A.E. CAT
E.G. TNP2	1	-0,3389 0,0031	-0,2773 0,0211	-0,35571 0,0745	-0,20692 0,3105	0,25502 0,2086	0,36713 0,065	0,16332 0,4253	-0,4930 0,0105	0,09781 0,6345	-0,1000 0,6268	-0,2441 0,2294
E.G. PRM1		1	0,73202 <.0001	-0,34266 0,0408	-0,28671 0,09	0,56643 0,0003	-0,18182 0,2886	-0,53147 0,0009	-0,2066 0,2266	0,0388 0,8222	-0,5754 0,0002	0,32983 0,0495
E.G. TNP1			1	-0,2 0,3172	-0,36667 0,0599	0,51667 0,0058	-0,46667 0,0141	-0,68333 <.0001	-0,45 0,0185	0,12552 0,5327	-0,6025 0,0009	0,07531 0,7089
ID CAT				1	0,29371 0,0821	-0,3706 0,0261	0,16084 0,3487	0,64336 <.0001	0,52189 0,0011	-0,2539 0,135	0,34737 0,0379	-0,2947 0,081
ID SOD					1	-0,54545 0,0006	-0,01399 0,9355	-0,06294 0,7154	0,18214 0,2877	-0,5114 0,0014	0,49474 0,0022	-0,3614 0,0303
ID GR						1	0,22378 0,1895	-0,32867 0,0503	-0,0245 0,8871	0,61731 <.0001	-0,2666 0,1159	0,04912 0,776
ID GPX bs							1	0,34965 0,0366	0,33976 0,0426	0,20459 0,2313	0,16842 0,3261	-0,5719 0,0003
ID GPX bi								1	0,42382 0,01	-0,1199 0,486	0,00351 0,9838	-0,0421 0,8074
A.E. GPX									1	-0,1360 0,4289	0,31986 0,0572	-0,1687 0,3253
A.E. GR										1	-0,1309 0,4464	-0,1362 0,428
A.E. SOD											1	-0,2940 0,0818
A.E. CAT												1

Legenda: E.G.: Expressão Gênica, A.E.: Atividade enzimática, ID: imunodeteção, GPXbs: glutathione peroxidase banda superior, GPXbi: glutathione peroxidase banda inferior, GR: Glutathione Redutase, SOD: Superóxido Dismutase, CAT: Catalase. Valores de p vermelho = correlação significativa (<0,05) ; azul = correlação com tendência de efeito significativo (0,05<p<0,10).

APÊNDICE L - ORQUIECTOMIA UNILATERAL

Após 24 horas de jejum alimentar e 18 horas de jejum hídrico, os animais foram sedados (0,2 mg de xilazina por quilograma de peso vivo, aplicação intra muscular, Sedomin, Konig, uso veterinário) e receberam anestesia epidural. Os animais que ainda apresentavam dor na manipulação testicular receberam no local no cordão espermático 5 mL de cloridrato de lidocaína 2% sem vasoconstritor (administrado por via sub-cutânea, Xylestesin 2% sem vasoconstritor, Cristália). Realizou-se tricotomia e desinfecção do local cirúrgico com tintura de iodo 10% (v/v) em álcool, os campos cirúrgicos foram fixados com pinças bacaus e iniciou-se o procedimento cirúrgico. Foi realizada uma incisão longitudinal em sentido dorso ventral entre 7 a 10 cm na pele do escroto com auxílio de lâmina de bisturi número 22. As túnicas dartos, albugíneas e vaginal foram incisadas com tesoura cirúrgica para total exposição do testículo, este foi exposto por completo e envolto em compressa estéril. O plexo pampiniforme e o ducto deferente foram expostos, fixados com pinça hemostática para realização da ligadura (ligadura e sobre ligadura) com fio de sutura sintético Mononylon Ethilon 0, Johnson e Johnson. O plexo e o ducto foram então incisados 3 cm abaixo da ligadura e sobreligadura, assim o testículo foi retirado. A túnica vaginal foi suturada com pontos simples contínuo com fio vicryl 0, Johnson e Johnson. Na abertura cirúrgica foi realizada sutura simples contínua do tipo kurschner com fio vicryl 0, Johnson e Johnson. No local da ferida cirúrgica foi aplicado tintura de iodo 10% (v/v). Finalizado o procedimento cirúrgico, os animais receberam pentabiótico, 1mL (250.000 U.I. de benzilpenicilina procaína + 83.334 U.I. de benzilpenicilina potássica + 134 mg de estreptomicina) para cada 30 kg de peso vivo, administrado por via intra-muscular, dose única, Agrovét® 5.000.000, Novartis Animal Health. Como medicação anti-inflamatória e analgésica utilizou-se meloxicam 2%, 2,5 mL para cada 100 kg de peso corporal (0,5 mg de meloxicam por kg de peso corporal), administrado por via intra-muscular, SID, por 3 dias consecutivos, Maxicam® 2%, Ouro Fino, uso veterinário.

APÊNDICE M - QUADRO DOS VALORES DAS MÉDIAS E ERROS PADRÃO DA MÉDIA, POR TRATAMENTO, DAS VARIÁVEIS ANALISADAS PARA EFEITO DE TRATAMENTO NO EXPERIMENTO 1 DA PARTE 2.

VARIÁVEIS	CONTROLE	TRATADO	<i>p</i>
Volume seminal (mL)	1,35 ± 0,05	1,45 ± 0,05	0,3027
Motilidade espermática (%)	79,90 ± 0,66	69,90 ± 1,38	< 0,0001
Vigor espermático (1-5)	3,85 ± 0,05	3,22 ± 0,08	< 0,0001
Concentração Espermática (x 10 ⁹ / mL)	4,78 ± 2,05	4,87 ± 1,68	0,4167
Turbilhonamento (0-5)	4,05 ± 0,08	3,33 ± 0,10	0,0011
Defeitos Totais (%)	3,45 ± 0,21	8,66 ± 1,90	0,1230
Espermatozoides com Defeitos Maiores (%)*	2 (1,5; 3)	2,5 (1,5; 4,5)	0,019
Espermatozoides com Defeitos Menores (%)*	1 (0,5; 1,5)	1,25 (0,5; 3)	0,057
TBARS induzido (ng/mL)	2,05 ± 3,42	8,89 ± 0,42	0,24
TBARS espontâneo (ng/mL)	275,05 ± 12,13	263,27 ± 12,28	0,5998
Diclorofluoresceína positiva (%)	3,35 ± 0,60	5,60 ± 2,09	0,05
Potencial de Membrana Mitocondrial Alto (%)*	81,95 (74,6; 87,5)	77,75 (62,4; 85,8)	0,026
Potencial de Membrana Mitocondrial Baixo (%)	4,59 ± 0,95	6,88 ± 1,29	0,2631
Potencial de Membrana Mitocondrial Intermediário (%)	17,46 ± 1,68	21,11 ± 1,80	0,2297
Acrossoma Lesado e Membrana Íntegra (%)	3,19 ± 0,52	3,67 ± 0,51	0,2678
Acrossoma Íntegro e Membrana Íntegra (%)	52,95 ± 2,05	41,80 ± 2,06	0,0019
Acrossoma Íntegro e Membrana Lesada (%)*	10,15 (6,8; 17)	18,25 (11; 24,9)	0,044
Acrossoma Lesado e Membrana Lesada (%)*	29,4 (22,6; 35,2)	32,55 (26,7; 41,5)	< 0,0001
Atividade Enzimática da Glutathiona Peroxidase (UI/ml)	0,00096 ± 0,000070	0,00120 ± 0,000069	0,0127
Atividade Enzimática da Glutathiona Redutase (UI/ml)	0,000043 ± 0,0000221	0,000081 ± 0,0000048	0,002
Atividade Enzimática da Superóxido Dismutase (UI/ml)	0,000084 ± 0,0000049	0,000081 ± 0,0000041	0,5239
Atividade Enzimática da Catalase (UI/ml)	0,037 ± 0,0006	0,045 ± 0,0091	0,8081
Imunodeteção da Catalase (pixels /área)	1,62 ± 0,20	1,72 ± 0,23	0,48
Imunodeteção da Superóxido Dismutase (x 10 ¹¹ pixels /área)	1,39 ± 0,56	1,04 ± 0,749	0,57
Imunodeteção da Glutathiona Redutase (pixels /área)	0,35 ± 0,05	0,32 ± 0,04	0,65
Imunodeteção da Glutathiona Peroxidase GPXBI (pixels /área)	0,64 ± 0,08	0,71 ± 0,11	0,74

* Medianas e quartis.

APÊNDICE N - QUADRO DOS VALORES DAS MÉDIAS E ERROS PADRÃO DA MÉDIA, POR SEMANA, DAS VARIÁVEIS ANALISADAS PARA EFEITO DE SEMANA NO EXPERIMENTO 1 DA PARTE 2.

SEMANAS	1	2	3	4	5	6	7	8	9	p
Volume seminal (mL)	1,30 ± 0,11	1,23 ± 0,09	1,44 ± 0,11	1,55 ± 0,09	1,70 ± 0,08	1,45 ± 0,08	1,441 ± 0,16	1,27 ± 0,08	1,23 ± 0,08	0,015
Motilidade espermática (%)	75,41 ± 2,71	72,08 ± 2,34	72,5 ± 3,71	73,33 ± 4,40	75,41 ± 2,08	80 ± 2,13	74,58 ± 1,43	72,5 ± 2,71	78,33 ± 1,42	0,032
Vigor espermático (1-5)	3,5 ± 0,23	3,33 ± 0,14	3,41 ± 0,25	3,58 ± 0,19	3,41 ± 0,14	3,83 ± 0,16	3,5 ± 0,15	3,41 ± 0,14	3,83 ± 0,11	0,048
Conc. Espermática (x 10 ⁹ / mL)	4,88 ± 0,31	2,99 ± 0,30	5,53 ± 0,42	4,93 ± 0,34	4,98 ± 0,29	5,21 ± 0,50	5,02 ± 0,33	4,87 ± 0,25	4,94 ± 0,37	< 0,0001
Turbilhonamento (0-5)	3,58 ± 0,28	3,5 ± 0,23	3,5 ± 0,28	3,66 ± 0,25	3,83 ± 0,29	4 ± 0,21	3,83 ± 0,11	3,58 ± 0,22	3,75 ± 0,13	0,444
Defeitos Totais (%)	4,25 ± 0,61	3,79 ± 1	14,58 ± 7,5	6,45 ± 2,58	5,91 ± 2,33	3,91 ± 1,18	3,37 ± 0,59	7 ± 1,76	5,25 ± 0,97	0,075
Defeitos Maiores (%)*	2,75 (1,25;3,25)	1,25 (1;2)	2,75 (2,25;4)	2 (1,5;5)	2 (1,25;3,2)	2 (1,5; 3,25)	1,5 (1;2,25)	3,25 (1,75;3,75)	2,5 (1,5; 3,2)	> 0,05
Defeitos Menores (%)*	1,5 (0,75; 2)	1,5 (1; 1,75)	1 (1; 2,25)	1 (0,5; 2,25)	1 (0,5; 2,5)	0,5 (0; 1)	1 (0,5;2,25)	1,75 (0,75; 3)	2,5 (0,25; 4,5)	< 0,05
TBARS induzido (ng/mL)	1,69 ± 0,76	7,16 ± 0,5	1,64 ± 0,55	2,63 ± 1,27	1,79 ± 0,48	1,82 ± 0,98	2,62 ± 0,5	2,09 ± 0,45	2,17 ± 0,93	< 0,0001
TBARS espontâneo (ng/mL)	221,26 ± 18,01	238,97 ± 13,64	226,63 ± 18,69	363,34 ± 31,68	277,1 ± 25,89	263,98 ± 28,18	252,82 ± 22,22	233,32 ± 22,43	345,00 ± 15,09	< 0,0001
Diclorofluoresceína positiva (%)	2,91 ± 0,65	2,17 ± 0,68	1,82 ± 0,34	2,77 ± 0,84	0,84 ± 0,18	2,37 ± 0,73	20,89 ± 8,48	4,00 ± 1,11	2,53 ± 0,56	0,072
PMM. Alto (%)*	64,3 (61,55; 75,7)	83,65 (75,35; 86,7)	72 (48,65; 85,1)	79,95 (71; 86,55)	78,1 (66,8; 83,3)	87,35 (79,45; 89,65)	81,65 (61,65; 88,8)	81,05 (74,25; 85,65)	84,35 (79,4; 88,15)	< 0,05
PMM.Baixo (%)	7,92 ± 2,17	4,44 ± 1,22	8,84 ± 3,88	7,19 ± 1,82	3,64 ± 0,73	2,80 ± 0,61	10,59 ± 4,88	2,72 ± 0,26	3,11 ± 0,37	0,270
PMM. Intermediário (%)	25,53 ± 2,74	15,48 ± 1,71	22,85 ± 5,55	18,50 ± 3,59	21,02 ± 3,05	12,60 ± 1,93	21,39 ± 5	20,19 ± 4,31	15,94 ± 3,61	0,259
Acrossoma Lesado Membrana Íntegra (%)	1,59 ± 0,68	2,22 ± 0,59	2,20 ± 0,54	2,63 ± 0,92	5,61 ± 0,74	2,95 ± 0,80	7,68 ± 2,31	3,11 ± 0,59	2,50 ± 0,50	< 0,0001

(conclusão)

Acrossoma Íntegro Membrana Íntegra (%)	40,21 ± 4,09	54,60 ± 3,37	39,25 ± 4,21	36,86 ± 4,77	37,55 ± 3,32	52,82 ± 5,97	54,13 ± 3,73	52,92 ± 3,52	58,04 ± 3,64	< 0,0001
Acrossoma Íntegro Membrana Lesada (%)*	43,8 (33,6; 51,35)	26,5 (24,45; 29,8)	32,1 (28,45; 45,1)	30,15 (25,9; 40,3)	34,3 (31,0;37,2)	28,65 (17,8; 41,8)	26,55 (21,8; 31,65)	30,45 (25,85; 35,65)	26,1 (21,1; 33,35)	< 0,05
Acrossoma Lesado Membrana Lesada (%)*	14,65 (10,9; 21,6)	12,05 (8,36; 16,6)	20,1 (11,6; 32,35)	24,65 (16,35; 3,15)	18,7 (12,2; 26,8)	9,735 (6,94; 16,3)	10,01 (6,04; 18,2)	13,15 (8,19; 17,85)	9,625 (6,89; 13,95)	< 0,05
Atividade Enzimática GPX (UI/ml)	0,001 ±0,0001	0,001 ±0,0001	0,001 ±0,0001	0,001 ±0,0001	0,0012 ±0,0001	0,0008 ±0,0002	0,00080 ±0,0002	0,0008 ±0,00008	0,001 ±0,0001	0,01
Atividade Enzimática GR (UI/ml)	0,000004 ±0,000001	0,00008 ±0,00002	0,000056 ±0,0000048	0,00005 ±0,000006	0,000049 ±0,000008	0,00004 ±0,000008	0,000046 ±0,0000048	0,000049 ±0,00001	0,00004± 0,00001	0,16
Atividade Enzimática SOD (UI/ml)	0,00009 ±0,00001	0,0001 ±0,00003	0,00009 ±0,00001	0,000068 ±0,0000081	0,000079 ±0,000001	0,00007 ±0,00015	0,000074 ±0,0000069	0,00007 ±0,0000057	0,00007± 0,00001	0,007
Atividade Enzimática Catalase (UI/ml)	0,047 ±0,001	0,05 ±0,002	0,043 ±0,02	0,074 ±0,02	0,01 ±0,003	0,02 ±0,003	0,025 ±0,013	0,084 ±0,06	0,038 ±0,001	0,35
ID. da Catalase (pixels /área)	1,85 ±0,14	2,40 ±0,26	2,22 ±0,22	2,42 ±0,20	0,08 ±0,008	1,85 ±0,14	0,11 ±0,008	1,90 ±0,18	2,22 ±0,22	< 0,001
ID. da Superóxido Dismutase (x 10 ¹⁰ pixels /área)	0,0763 ±0,0035	0,502 ±0,027	0,010 ±0,0080	0,56 ±0,29	0,094 ±0,0031	0,65 ±0,035	5,88 ±3,02	2,48 ±1,32	0,59 ±0,29	0,056
ID. da Glutathiona redutase (pixels /área)	0,22 ±0,03	0,36 ±0,13	0,29 ±0,06	0,44 ±0,11	0,15 ±0,09	0,27 ±0,08	0,39 ±0,11	0,53 ±0,12	0,34 ±0,09	0,28
ID. da Glutathiona Peroxidase GPXBI (pixels /área)	0,30 ±0,02	0,92 ±0,18	0,58 ±0,24	1,09 ±0,21	0,81 ±0,15	0,37 ±0,07	1,16 ±0,03	0,60 ±0,18	0,25 ±0,05	0,003
ID. da Glutathiona Peroxidase GPXBS (pixels /área)	0,25 ±0,04	0,28 ±0,03	0,58 ±0,02	0,43 ±0,14	0,81 ±0,15	0,49 ±0,08	1,16 ±0,03	0,52 ±0,04	0,45 ±0,09	0,002

Legenda: PMM.: Potencial de Membrana Mitocondrial; TBARS: substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico, ID.: Imunodeteção; GPXbs: glutathiona peroxidase banda superior, GPXbi: glutathiona peroxidase banda inferior, GR: Glutathiona Redutase, SOD: Superóxido Dismutase, CAT: Catalase. * Medianas e quartis.

APÊNDICE O - QUADRO DOS VALORES DAS MÉDIAS E ERROS PADRÃO DA MÉDIA, POR SEMANA E POR TRATAMENTO, DAS VARIÁVEIS PARAMÉTRICAS ANALISADAS PARA EFEITO DOS TRATAMENTOS POR SEMANA NO EXPERIMENTO 1 DA PARTE 2.

SEMANAS	1	2	3	4	5	6	7	8	9	<i>p</i>
VOLUME SEMINAL (mL)										
Controle	1,16 ± 0,09	1 ± 0	1,38 ± 0,17	1,75 ± 0,13	1,71 ± 0,15	1,4 ± 0,13	1,23 ± 0,17	1,3 ± 0,16	1,28 ± 015	0,076
Tratado	1,45 ± 0,20	1,46 ± 0,13	1,5 ± 0,16	1,35 ± 0,09	1,7 ± 0,10	1,51 ± 0,11	1,65 ± 0,27	1,25 ± 0,08	1,18 ± 0,07	
MOTILIDADE ESPERMÁTICA (%)										
Controle	83,33 ± 1,66	78,33 ± 1.05	81,66 ± 1,05	80,83 ± 1,53	80,83 ±1,53	79,16 ±2,38	78,33 ± 1,05	75,83 ± 3,96	80,83 ± 1,53	0,007
Tratado	67,5 ± 2,14	65,83 ± 2,71	63,33 ±5,10	65,83 ± 7,79	70 ± 2,23	80,83 ± 3,74	70,83 ± 1,53	69,16 ± 3,51	75,83 2,00	
VIGOR ESPERMÁTICO (1 – 5)										
Controle	4 ± 0	3,66 ± 0,21	4,16 ± 0,16	4 ± 0	3,83 ± 0,16	3,83 ± 0,16	3,83 ± 16	3,5 ± 0,22	3,83 ± 0,16	0,001
Tratado	3 ± 0,36	3 ± 0	2,66 ± 0,21	3,16 ± 0,30	3 ± 0	3,83 ± 0,30	3,16 ± 0,16	3,33 ± 0,21	3,83 ± 0,16	
CONCENTRAÇÃO ESPERMÁTICA (x 10 ⁹ espermatozoides/mL)										
Controle	4,25 ± 0,34	3,16 ± 0,57	6,22 ± 0,59	4,81 ± 0,55	4,59 ± 0,40	5,05 ± 0,99	4,55 ± 0,44	5,24 ± 0,45	5,08 ± 0,50	0,907
Tratado	5,52 ± 0,39	2,81 ± 0,25	4,85 ± 0,50	5,04 ± 0,40	5,37 ± 0,36	5,37 ± 0,45	5,48 ± 0,12	4,51 ± 0,58	4,80 ± 0,07	
TURBILHONAMENTO (0 – 5)										
Controle	4,33 ± 0,21	4 ± 0,36	4,33 ± 0,21	4 ± 0	4,5 ± 0,22	4 ± 0,25	4 ± 0	3,66 ± 0,42	3,66 ± 0,21	0,000
Tratado	2,83 ± 0,30	3 ± 0	2,66 ± 0,21	3,33 ± 0,49	3,16 ± 0,40	4 ± 0,36	3,66 ± 0,21	3,5 ± 0,22	3,83 ± 0,16	
DEFEITOS TOTAIS (%)										
Controle	3,41 ± 0,41	3,33± 0,27	3,75 ± 0,55	2,91 ± 0,74	3,41 ± 0,67	3,16 ± 0,87	2,83 ± 0,27	3,83 ± 0,57	4,41 ± 1,04	0,338
Tratado	5,08 ± 1,09	4,25 ± 2,06	25,41 ± 4,30	10 ± 4,88	8,41 ± 4,59	4,66 ± 2,28	3,91 ± 1,17	10,16 ± 3,06	6,08 ± 1,69	
ESPERMATOZOIDES COM DEFEITOS MAIORES (%)*										
Controle	1,75 (1 ; 2,5)	1,5 (1,5; 2,5)	2,75 (2,5; 3,5)	2 (1;3)	1,5 (1;2,5)	2,25 (1,5;3)	1,25 (1; 1,5)	2,75 (1,5; 3,5)	2,5 (2,5; 3,5)	> 0,05
Tratado	3 (3;3,5)	1 (1;1)	3 (2;2)	2 (2;7)	3,25 (1,5; 6,5)	2 (1,5; 3)	2,25 (1,5; 4,5)	3,5 (2;4)	2,25 (1;3)	
ESPERMATOZOIDES COM DEFEITOS MENORES (%)*										
Controle	1,5 (1;2)	1,5 (1,5; 1,5)	1 (0,5; 1)	0,75 (0;1)	1,5 (0,5; 2,5)	0,5 (0;1)	1,5 (1; 2,5)	0,75 (0,5; 2,5)	1,75 (0;3)	< 0,05
Tratado	1,5 (0,5;2)	1,25 (1;2,5)	2 (1;31)	2,25 (0,5; 3,5)	0,5 (0,5; 2,5)	0,5 (0;1)	0,5 (0,5;2)	2,25 (2; 5,5)	3,25 (1; 5,5)	
TBARS INDUZIDO (ng/mL)										
Controle	1,99 ± 0,99	3,63 ± 1,44	1,59 ± 0,60	2,16 ± 1,57	1,87 ± 0,45	2,41 ± 1,10	1,97 ± 0,72	1,92 ± 0,36	2,13 ± 0,81	0,170
Tratado	1,38 ± 0,25	10,67±10,69	1,76 ± 0,51	3,10 ± 0,75	1,70 ± 0,53	1,24 ± 0,27	3,26 ± 3,84	2,25 ± 0,49	2,20 ± 1,12	

(continua)

TBARS ESPONTÂNEO (ng/mL)										
Controle	238,81 ± 33,20	245,41 ± 15,66	197,36 ± 11,16	350,68 ± 20,83	300,93 ± 49,07	310,7 ± 46,22	259,21 ± 29,41	217,86 ± 28,65	354,46 ± 27,75	0,338
Tratado	203,71 ± 14,69	232,56 ± 23,59	255,9 ± 2,73	376 ± 62,60	253,26 ± 17,75	217,26 ± 22,05	246,43 ± 35,93	248,78 ± 36,01	335,55 ± 14,02	
DICLOROFLUORESCÉINA POSITIVO (%)										
Controle	2,64 ± 1,07	1,28 ± 0,46	2,06 ± 0,64	3,35 ± 1,48	0,67 ± 0,18	1,84 ± 0,60	8,73 ± 4,14	6,72 ± 1,54	2,87 ± 0,36	0,010
Tratado	3,18 ± 0,82	3,05 ± 1,23	1,57 ± 0,30	2,19 ± 0,89	1,02 ± 0,32	2,89 ± 1,37	33,05 ± 5,51	1,27 ± 0,38	2,20 ± 1,09	
POTENCIAL DE MEMBRANA MITOCONDRIAL ALTO (%)*										
Controle	67,25 (62,8; 80,2)	84,2 (80;86,6)	82,2 (74,9; 91,1)	77,55 (71,3; 86)	81 (75,5; 82,1)	88,6 (85,1; 93,1)	86,85 (60,9; 92,5)	82,55 (76,8; 87,3)	81,4 (76,1; 89,6)	< 0,05
Tratado	62,2 (61,2; 75,1)	80,45 (74,5; 86,8)	61,55 (24,8; 69,1)	82,25 (41,6; 88,9)	68,5 (56,9; 87,6)	82,35 (72,8; 87,5)	79,65 (62,4; 82)	79,45 (71,7; 84)	84,35 (83,5; 86,9)	
POTENCIAL DE MEMBRANA MITOCONDRIAL BAIXO (%)										
Controle	5,85 ± 1,78	4,28 ± 1,76	3,23 ± 1,10	6,46 ± 1,72	3,34 ± 1,01	2,57 ± 1,05	9,81 ± 8,04	2,59 ± 0,27	3,23 ± 0,63	0,766
Tratado	10,02 ± 3,98	4,6 ± 1,85	14,46 ± 7,25	7,93 ± 3,38	3,95 ± 1,15	3,03 ± 0,75	11,37 ± 6,31	2,88 ± 0,50	2,99 ± 0,63	
POTENCIAL DE MEMBRANA MITOCONDRIAL INTERMEDIÁRIO (%)										
Controle	24,88 ± 4,97	15,61 ± 3,13	19,16 ± 8,61	15,17 ± 1,83	17,3 ± 2,25	9,08 ± 1,09	19,96 ± 7,81	16,10 ± 3,44	19,92 ± 7,11	0,871
Tratado	26,18 ± 2,89	15,35 ± 1,76	26,54 ± 7,49	21,83 ± 7,00	24,75 ± 5,52	16,13 ± 3,20	22,82 ± 6,93	25,09 ± 8,56	11,96 ± 0,79	
ESPERMATOZOÍDES COM ACROSSOMA LESADO E MEMBRANA ÍNTEGRA (%)										
Controle	1,06 ± 0,38	2,79 ± 1,06	1,36 ± 0,34	1,40 ± 0,42	6,39 ± 1,08	3,29 ± 1,57	8,01 ± 3,38	2,31 ± 0,25	2,15 ± 0,68	0,339
Tratado	2,12 ± 1,34	1,64 ± 0,52	3,04 ± 0,96	4,71 ± 1,56	4,83 ± 1,01	2,61 ± 0,55	7,36 ± 3,48	3,90 ± 1,11	2,85 ± 0,77	
ESPERMATOZOÍDES COM ACROSSOMA ÍNTEGRO E MEMBRANA ÍNTEGRA (%)										
Controle	38,08 ± 4,37	58,06 ± 5,52	48,76 ± 2,90	44,43 ± 5,82	41,166±5,37	65,38 ± 6,59	53,58 ± 5,58	60,96 ± 5,06	66,18 ± 2,67	0,028
Tratado	42,35 ± 7,26	51,15 ± 3,86	29,73 ± 5,78	29,29 ± 6,58	33,95 ± 3,81	40,26 ± 7,12	54,68 ± 5,48	44,88 ± 1,76	49,9 ± 4,98	
ESPERMATOZOÍDES COM ACROSSOMA ÍNTEGRO E MEMBRANA LESADA (%)*										
Controle	42,05 (34,2; 58,9)	25 (24;27,5)	36,95 (30,2; 46,6)	33,1 (27,1; 45,1)	33,25 (29,7; 34,4)	17,8 (13,3; 30)	24,35 (21,6; 28)	25,85 (22; 29,3)	21,9 (20,8; 22,6)	< 0,05
Tratado	45,85 (23,1; 48,4)	29,4 (25,5; 41,5)	32,05 (26,7; 43,6)	27,95 (20,9; 39,4)	36,45 (32; 51,2)	39,4 (27,3; 43,7)	27,85 (23,8; 34)	32 (30,9; 40,7)	33,15 (29,6; 37)	

(continua)

ESPERMATOZOIDES COM ACROSSOMA LESADA E MEMBRANA LESADA (%)*										
Controle	12,3 (11,3; 21,7)	9,66 (6,82, 14,9)	11,6 (5,62; 14,6)	19,85 (10,5; 22,9)	17,2 (11,9; 29,2)	6,94 (5,75; 7,77)	9,38 (6,5; 13,8)	8,195 (6,5; 13,8)	7,595 (3,14; 9,86)	< 0,05
Tratado	17,25 (10,5; 21,5)	14,05 (10; 17,6)	32,35 (21,6; 36,7)	33,15 (28,4; 43,7)	19,3 (12,5; 31,9)	16,3 (12,1; 31,9)	13,56 (5,41; 19,2)	15,35 (12,8; 18,5)	10,75 (9,39; 22)	
ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA GLUTATIONA PEROXIDASE (UI/ML)										
Controle	.	.	0,0010397	0,0013934	.	0,001179	0,000610932	0,000889603	0,000889603	0,90
Tratado	0,0014898	0,0011254	0,0012755	0,0011683	0,0012433	0,0016613	0,0010289	0,000728832	0,0012433	
ATIVIDADE ENZIMÁTICA GLUTATIONA REDUTASE (UI/ML)										
Controle	0,000048	0,000054662	0,000051447	0,000041801	0,000041801	0,000038585	0,000041801	0,00003537	0,000045016	0,75
Tratado	0,000045016	0,000109325	0,000061093	0,000061093	0,000057878	0,000054662	0,000051447	0,000064309	0,000051447	
ATIVIDADE ENZIMÁTICA SUPERÓXIDO DISMUTASE (UI/ML)										
Controle	0,000076389	0,000134259	0,000108796	0,000076389	0,000078704	0,00005787	0,00006713	0,000083333	0,000074074	0,56
Tratado	0,000106481	0,00006713	0,000085648	0,000060185	0,000081019	0,000087963	0,000081019	0,000071759	0,000071759	
ATIVIDADE ENZIMÁTICA CATALASE (UI/ML)										
Controle	0,0458716	0,0527523	0,0229358	0,0481651	0,0068807	0,0321101	0,0389908	0,0183486	0,0389908	0,42
Tratado	0,0481651	0,0573394	0,0642202	0,1009174	0,0137615	0,0252294	0,0114679	0,1513761	.	
IMUNODETECÇÃO DA CATALASE (PIXELS /ÁREA)										
Controle	1,63±0,14	2,47±0,007	2,15±0,04	2,37±0,32	0,09±0,01	1,63±0,14	0,12±0,01	2,00±0,07	2,15±0,04	0,95
Tratado	2,07±0,10	2,34±0,64	2,29±0,55	2,48±0,35	0,077±0,01	2,07±0,10	0,10±0,01	1,79±0,42	2,29±0,55	
IMUNODETECÇÃO DA SUPERÓXIDO DISMUTASE (X 10 ¹⁰ PIXELS /ÁREA)										
Controle	0,011±0,05	0,59±0,5	0,014±0,014	1,03±0,25	0,12±0,02	0,71±0,71	4,81±4,10	4,77±0,15	4,23±0,41	0,37
Tratado	0,038±0,0381	0,43±0,41	0,0019±0,0014	0,093±0,0016	0,006±0,0061	0,60±0,48	6,96±5,96	0,20±0,13	0,944±0,01	
IMUNODETECÇÃO DA GLUTATIONA REDUTASE (PIXELS /ÁREA)										
Controle	0,26±0,04	0,27±0,16	0,40±0003	0,31±0,13	0,26±0,18	0,25±0,19	0,41±0,26	0,63±0,27	0,34±0,20	0,66
Tratado	0,18±0,06	0,45±0,25	0,19±0,03	0,56±0,18	0,037±0,018	0,29±0,05	0,36±0,13	0,43±0,06	0,35±0,06	

(conclusão)

IMUNODETECÇÃO DA GLUTATIONA PEROXIDASE GPXBI (PIXELS /ÁREA)										
Controle	0,28±0,02	0,73±0,04	0,41±0,008	1,13±0,39	0,91±0,001	0,47±0,05	1,11±0,004	0,47±0,19	0,23±0,10	0,88
Tratado	0,33±0,03	1,11±0,34	0,76±0,53	1,04±0,35	0,713±0,35	0,27±0,10	1,20±0,06	0,73±0,37	0,27±0,06	
IMUNODETECÇÃO DA GLUTATIONA PEROXIDASE GPXBS (PIXELS /ÁREA)										
Controle	0,18±0,01	0,30±0,07	0,57±0,006	0,43±0,32	0,91±0,01	0,12±0,01	1,11±0,004	0,53±0,07	0,37±0,04	0,87
Tratado	0,31±0,06	0,26±0,0004	0,60±0,062	0,43±0,13	0,712±0,35	0,42±0,12	1,20±0,06	0,51±0,06	0,53±0,20	

* Medianas e quartis

APÊNDICE P - QUADRO DOS VALORES DAS MÉDIAS E ERROS PADRÃO DA MÉDIA DAS VARIÁVEIS ANALISADAS PARA EFEITO DE TRATAMENTO NO EXPERIMENTO 2 DA PARTE 2.

Variáveis dependentes	Controle	Tratado	p
Acrossoma Íntegro e Membrana Íntegra (%)	80,50±2,12	78,46±4,46	0,58
Acrossoma Lesado e Membrana Íntegra (%)	1,43±0,30	1,78±0,35	0,47
Acrossoma Lesado e Membrana Lesada (%)	4,72±0,70	5,17±1,03	0,96
Acrossoma Íntegro e Membrana Lesada (%)	13,33±1,50	12,453±2,58	0,47
Potencial de Membrana Mitocondrial Alto (%)	78,39±2,29	61±5,62	0,002
Potencial de Membrana Mitocondrial Baixo (%)	4,15±1,35	9,044±2,06	0,02
Potencial de Membrana Mitocondrial Intermediário (%)	18,41±1,45	29,96±4,71	0,01
Diclorofluoresceína positiva (%)	1,10±0,33	2,27±0,56	0,03
TBARS induzido (ng/mL)	854,05±74,28	813,53±26,92	0,87
Velocidade média de percurso (VAP, µm/s)	148,141±9,83	139±10,73	0,55
Velocidade linear progressiva (VSL, µm/s)	117,61±9,27	112,18±9,75	0,69
Velocidade curvo-linear (VCL, µm/s)	236,625±11,43	217,4±12,96	0,30
Amplitude de movimento lateral da cabeça (ALH, µm/s)	8,025±0,32	7,62±0,34	0,44
Frequência de batimento da cauda (BCF, Hz)	41,391±1,00	40,01±0,70	0,29
Coeficiente de retilinearidade (STR, %)	76,5±2,18	77,3±1,38	0,77
Coeficiente de linearidade (LIN, %)	49,5±2,89	51,3±2,13	0,52
Motilidade total (%)	78,66±4,12	72,9±6,70	0,49
Motilidade progressiva (%)	43,083±4,12	40±3,69	0,59
Células com movimento rápido (%)	69,16±4,57	62,7±6,72	0,43
Células com movimento médio (%)	9,5±1,10	10,3±1,57	0,82
Células com movimento lento (%)	7,33±1,15	6±0,77	0,36
Células com movimento estático (%)	13,83±3,95	21,2±6,52	0,48
Atividade enzimática GPX (UI/ml)	14,38±3,04	16,18±2,26	0,37
Atividade enzimática SOD (UI/ml)	121,35±12,97	98,58±12,89	0,22

APÊNDICE Q - QUADRO DOS VALORES DAS MÉDIAS E ERROS PADRÃO DA MÉDIA DAS VARIÁVEIS ANALISADAS PARA COMPARAÇÃO DO EFEITO AGUDO E TARDIO DO ESTRESSE OXIDATIVO NO EXPERIMENTO 2 DA PARTE 2.

Variáveis dependentes	Efeito agudo	Efeito tardio	p
Acrossoma Íntegro e Membrana Íntegra (%)	75,26±3,21	83,44±3,13	0,08
Acrossoma Lesado e Membrana Íntegra (%)	1,27±0,31	1,94±0,32	0,18
Acrossoma Lesado e Membrana Lesada (%)	5,90±0,82	3,99±0,85	0,27
Acrossoma Íntegro e Membrana Lesada (%)	15,70±1,45	10,63±2,08	0,18
Potencial de Membrana Mitocondrial Alto (%)	61,2±5,66	76,75±3,44	0,06
Potencial de Membrana Mitocondrial Baixo (%)	10,44±1,76	2,75±1,16	0,0001
Potencial de Membrana Mitocondrial Intermediário (%)	28,76±5,00	20,48±2,44	0,06
Diclorofluoresceína positiva (%)	2,091±0,61	1,27±0,32	0,38
TBARS induzido (ng/mL)	820,75±46,8	846,83±63,93	0,83
Velocidade média de percurso (VAP, µm/s)	147,95±5,77	140,018±12,59	0,45
Velocidade linear progressiva (VSL, µm/s)	118,82±5,77	111,46±12,10	0,41
Velocidade curvo-linear (VCL, µm/s)	228,27±9,38	227,5±14,98	0,30
Amplitude de movimento lateral da cabeça (ALH, µm/s)	7,92±0,31	7,75±0,36	0,44
Frequência de batimento da cauda (BCF, Hz)	41,7±0,75	39,82±0,98	0,16
Coefficiente de retilinearidade (STR, %)	77,09±1,34	76,63±2,35	0,95
Coefficiente de linearidade (LIN, %)	51,72±1,89	48,90±3,15	0,40
Motilidade total (%)	77,63±3,41	74,45±7,27	0,74
Motilidade progressiva (%)	43,27±3,24	40,09±4,59	0,65
Células com movimento rápido (%)	66,09±3,05	66,36±7,40	0,91
Células com movimento médio (%)	11,63±1,35	8,09±1,03	0,02
Células com movimento lento (%)	7,72±0,88	5,72±1,09	0,07
Células com movimento estático (%)	14,36±3,24	20±6,65	0,76
Atividade enzimática GPX (UI/ml)	15±2,66	15,56±2,72	0,93
Atividade enzimática SOD (UI/ml)	96,16±13,34	123,77±12,05	0,14

APÊNDICE R - QUADRO DOS VALORES DAS MÉDIAS E ERROS PADRÃO DA MÉDIAS DAS VARIÁVEIS ANALISADAS PARA COMPARAÇÃO DE TRATAMENTO E DO EFEITO AGUDO E TARDIO DO ESTRESSE OXIDATIVO NO EXPERIMENTO 2 DA PARTE 2.

Tratamento	Efeito agudo	Efeito tardio	<i>p</i>
Acrossoma Íntegro e Membrana Íntegra (%)			
Controle	77,9±1,100	83,116±3,996	0,49
Tratado	72,1±7,093	83,766±5,224	
Acrossoma Lesado e Membrana Íntegra (%)			
Controle	1,123±0,25	1,744±0,56	0,60
Tratado	1,425±0,60	2,141±0,37	
Acrossoma Lesado e Membrana Lesada (%)			
Controle	5,131±0,7616	4,308±1,2365	0,38
Tratado	6,676±1,480	3,681±1,2917	
Acrossoma Íntegro e Membrana Lesada (%)			
Controle	15,816±1,418	10,86±2,355	0,70
Tratado	15,53±3,297	10,401±3,689	
Potencial de Membrana Mitocondrial Alto (%)			
Controle	72,92±3,15	82,95±1,87	0,61
Tratado	51,43±8,31	70,56±5,78	
Potencial de Membrana Mitocondrial Baixo (%)			
Controle	7,348±1,965	0,97±0,305	0,64
Tratado	13,54±2,457	4,548±2,13	
Potencial de Membrana Mitocondrial Intermediário (%)			
Controle	21,24±1,87	16,06±1,73	0,96
Tratado	35,03±8,48	24,9±3,93	
Diclorofluoresceína positiva (%)			
Controle	1,50±0,61	0,70±0,24	0,82
Tratado	2,79±1,12	1,83±0,51	
TBARS induzido (ng/mL)			
Controle	833,93±86,43	874,18±129,01	0,98
Tratado	807,58±46,16	819,48±32,31	
Velocidade média de percurso (VAP, µm/s)			
Controle	154,48±9,85	141,8±17,66	0,76
Tratado	140,12±10,74	137,88±20,06	
Velocidade linear progressiva (VSL, µm/s)			
Controle	124,53±7,19	110,7±17,53	0,59
Tratado	111,98±9,16	112,38±18,54	
Velocidade curvo-linear (VCL, µm/s)			
Controle	235,68±13,41	237,56±19,86	0,87
Tratado	219,38±13,35	215,42±24,01	
Amplitude de movimento lateral da cabeça (ALH, µm/s)			
Controle	7,93±0,53	8,11±0,42	0,39
Tratado	7,92±0,34	7,32±0,60	
Frequência de batimento da cauda (BCF, Hz)			
Controle	42,53±1,28	40,25±1,51	0,72
Tratado	40,7±0,42	39,32±1,33	

conclusão

Coeficiente de retilinearidade (STR, %)			
Controle	78,16±2,19	74,83±3,89	0,26
Tratado	75,8±1,39	78,8±2,35	
Coeficiente de linearidade (LIN, %)			
Controle	52,83±3,12	46,16±4,75	0,23
Tratado	50,4±2,06	52,2±3,99	
Motilidade total (%)			
Controle	82,166±3,57	75,16±8,94	0,62
Tratado	72,2±5,62	73,6±13,05	
Motilidade progressiva (%)			
Controle	47,66±4,60	38,5±6,74	0,26
Tratado	38±3,64	42±6,78	
Células com movimento rápido (%)			
Controle	72,33±2,62	66±9,01	0,38
Tratado	58,6±3,90	66,8±13,41	
Células com movimento médio (%)			
Controle	9,83±1,62	9,16±1,64	0,08
Tratado	13,8±1,98	6,8±1,06	
Células com movimento lento (%)			
Controle	7,5±1,64	7,16±1,77	0,13
Tratado	8±0,44	4±0,70	
Células com movimento estático (%)			
Controle	9,66±2,64	18±7,41	0,46
Tratado	20±5,72	22,4±12,58	
Atividade enzimática GPX (UI/ml)			
Controle	15,21±4,53	14,79±3,24	0,51
Tratado	13,55±4,45	17,57±3,34	
Atividade enzimática SOD (UI/ml)			
Controle	110,26±19,41	82,06±18,08	0,76
Tratado	132,44±17,73	115,10±17,17	

APÊNDICE S - PORCENTAGEM DE ESPERMATOZOIDES OVINOS COM DIFERENTES GRAUS DE FRAGMENTAÇÃO DE DNA, GRAU I (POUCOS DANOS), GRAU II (DANOS LEVES), GRAU III (DANOS EVIDENTES), GRAU IV (DANOS INTENSOS), POR SEMANA EXPERIMENTAL, NOS GRUPOS CONTROLE E TRATADO, NA PARTE 3.

Grau	Semana	Controle	Tratado	p
I	1	30,05 ± 9,29	8,03% ± 2,09	0,06
	2	12,97% ± 4,33	14,06 ± 2,45	0,19
	3	13,25% ± 3,23	8,67 ± 2,62	0,19
	4	14,36% ± 5,76	18,83 ± 5,83	0,24
	5	4,80% ± 1,71	1,87 ± 1,20	0,54
	6	4,5% ± 2,07	0,94% ± 0,60	0,04
	7	3,23% ± 1,59	9,35% ± 3,33	0,06
	8	9,75% ± 3,22	4,89% ± 1,94	0,16
	9	13,12% ± 3,78	7,71% ± 1,79	0,15
II	1	41,46% ± 7,35	23,10% ± 5,56	0,06
	2	54,80% ± 6,14	16,98% ± 3,38	0,001
	3	64,76% ± 10,25	23,47% ± 6,93	0,013
	4	50,83% ± 12,83	24,49% ± 6,10	0,02
	5	83,49% ± 3,84	35,58% ± 5,58	0,001
	6	72,95% ± 4,90	51,52% ± 10,14	0,12
	7	76,06% ± 5,96	48,66% ± 11,25	0,06
	8	71,90% ± 4,17	64,19% ± 10,43	0,46
	9	71,56% ± 4,36	66,68% ± 4,90	0,34
III	1	27,61% ± 8,78	64,85% ± 5,50	0,002
	2	32,00% ± 7,58	68,57% ± 3,91	0,001
	3	20,14% ± 9,26	65,35 ± 5,12	0,007
	4	33,84% ± 7,49	55,99% ± 5,07	0,02
	5	11,58% ± 3,63	60,25% ± 6,90	0,0011
	6	21,65% ± 5,80	47,52% ± 10,18	0,03
	7	20,70% ± 5,70	41,68% ± 11,57	0,12
	8	18,34% ± 6,25	30,90% ± 11,30	0,34
	9	15,22% ± 8,24	25,19% ± 3,93	0,04
IV	1	0,87% ± 0,50	4,96% ± 1,90	0,07
	2	0,31% ± 0,21	0,38% ± 0,17	0,42
	3	1,83% ± 1,36	2,50% ± 1,82	0,43
	4	0,96% ± 0,74	0,68% ± 0,68	0,21
	5	0,11% ± 0,11	2,28% ± 1,25	0,02
	6	0,83% ± 0,40	0	0,09
	7	0	0,29% ± 0,29	0,50
	8	0	0	1
	9	0,10% ± 0,10	0,40% ± 0,40	0,50

Legenda: Valores de probabilidade (p) em vermelho indicam $p < 0,05$ e em verde indicam $0,05 < p < 0,10$.