

CARLOS ALONSO PACO NAGAKI

**Determinação da Protamina 1 e Protamina 2 em touros de
alta e de baixa fertilidade a campo**

São Paulo

2021

CARLOS ALONSO PACO NAGAKI

**Determinação da Protamina 1 e Protamina 2 em touros de
alta e de baixa fertilidade a campo**

Dissertação 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 Mestre em Ciências.

Departamento:
Reprodução Animal

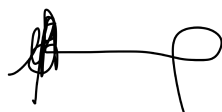
Orientadora:
Profa. Dra. Mayra Elena Ortiz D'Avila Assumpção

Coorientadora:
Dra. Thais Rose Hamilton dos Santos

São Paulo

2021

De acordo,



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. 4137
FMVZ

Paco Nagaki, Carlos Alonso Paco
Determinação da Protamina 1 e Protamina 2 em touros de alta e de baixa fertilidade a campo / Carlos Alonso Paco Nagaki. – 2021.
58 f. : il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Reprodução Animal, São Paulo, 2021.

Programa de Pós-Graduação: Reprodução Animal.

Área de concentração: Reprodução Animal.

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

Coorientadora: Dra. Thais Rose dos Santos Hamilton.

1. Cromatina. 2. Protaminação. 3. Fertilidade. 4. Ácido- desoxirribonucleico. I. Título.



Comissão de Ética no Uso de Animais

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
Universidade de São Paulo

São Paulo, 10 de novembro de 2021
CEUAx N 6404060519

Ilmo(a). Sr(a).

Responsável: Mayra Elena Ortiz D'avila Assumpção

Área: Reprodução Animal

Equipe envolvida: Camilla Mota Mendes - (colaborador); Carlos Alonso Paco Nagaki - (executante); Elizabeth Angélica Leme Martins - (colaborador); Mayra Elena Ortiz D'avila Assumpção - (orientador); Thais Rose Dos Santos Hamilton - (colaborador);

Título do projeto: "Determinação da relação entre a protamina 1 e 2 em espermatozoides de touros com alta e baixa fertilidade a campo".

Parecer Consubstanciado da CEUA FMVZ

A Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, na reunião de 29/05/2019, **ANALISOU** e **APROVOU** o protocolo de estudo acima referenciado. A partir desta data, é dever do pesquisador:

1. Comunicar toda e qualquer alteração do protocolo.
2. Comunicar imediatamente ao Comitê qualquer evento adverso ocorrido durante o desenvolvimento do protocolo.
3. Os dados individuais de todas as etapas da pesquisa devem ser mantidos em local seguro por 5 anos para possível auditoria dos órgãos competentes.
4. **Relatórios parciais** de andamento deverão ser enviados **anualmente** à CEUA até a conclusão do protocolo.

Prof. Dr. Marcelo Bahia Labruna
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo

Camilla Mota Mendes
Vice-Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: PACO NAGAKI, CARLOS ALONSO

Título: **Determinação da protamina 1 e protamina 2 em touros de alta e baixa fertilidade a campo.**

Dissertação 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 Mestre em Ciências.

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

DEDICATÓRIA

Este trabalho é dedicado ao Carlos Paco e a Keiko Nagaki, meus pais, que torcem por mim desde o começo de tudo.

AGRADECIMENTOS

Antes que nada, eu gostaria de agradecer sem dúvida alguma, à minha família. Principalmente, aos meus pais, sendo os principais protagonistas e mediadores de quem eu virei como profissional e como não, como pessoa. Sempre estarei agradecido a eles dois, **Keiko e Carlos**, por apoiar minhas ideias “locas” de estudar fora do país, por confiar e por querer sempre meu bem, apesar que isso possa significar tristeza e saudade recíproca. Porque graças a eles, consegui me aproximar a esse novo conceito de amar, onde amar pode significar sofrer, mas sorrir pelas conquistas de quem amamos.

Los amo y siempre estaré agradecido.

Ao falar da minha família, tenho também que agradecer à **Paola, Jose e ao David**, cujo apoio emocional desde Perú também foi muito importante para me sentir um pouco mais perto de casa.

Como agradecer à família e não falar daquela que eu escolhi? Sempre estarei grato às pessoas da minha primeira moradia lá na Frei Inácio, onde especialmente eu fiz não só um amigo senão um irmão para a vida toda. Agradeço ao **Felipe**, esse amigo que sempre esteve, aquele parceiro de cervejas e conversas intermináveis sobre política, filosofia e sobre a vida mesma. Obrigado também à **Valentina, a Raphaela, à Francieli, ao Andrés, ao Andrei, à Gabrielita e os outros amigos** pela oportunidade de ter conhecido vocês e pelo grande carinho que tenho por cada um de vocês, evidenciando que os amigos são a família que um escolhe.

Ao pessoal do VRA, a todos os professores do departamento. Ao **Prof. Marcilio, à Prof. Claudia, Ao Prof. Pietro e a ao pessoal da parte administrativa**. Agradecer especialmente à **Harumi**, porque o apoio dela foi muito necessário para concluir esse mestrado. Assim mesmo, agradecer ao Professor Ricardo, responsável pela Coordenação do Programa de Pós-Graduação e à Professora Carla (chefe do departamento - VRA), pela oportunidade e facilidades ao longo desses mais de 2 anos.

Agradecer aos grandes amigos que eu fiz no laboratório. A **Julita**, minha querida amiga e companheira de eternas conversas, só a gente sabe o que a gente passou nesse mestrado. Ao **Felipe**, por representar um suporte sempre dentro e fora do lab, por sempre topar umas cervejinhas e falar sobre os próximos planos da

vida. À **Vivian, Leticia, Larissa** pelas risadas e bons momentos divididos dentro e fora do lab. Às ICs, **Ju e Aline**, por estar sempre aí com um sorriso quando os dias não estavam tão legais, vocês arrasam! Ao **Professor Visintin**, pela grande referência que o senhor representa. Ao **Marcelo** pelos conselhos acadêmicos e pela sempre boa disposição!

Um especial agradecimento especial à **Camilla**, uma pessoa com grande coração e que permite o funcionamento harmonioso do laboratório. Obrigado mais uma vez Cá, pelos conselhos e guia constante! Feliz também por ser o tio que leva as crianças para correr, rs!

Thais, meus eternos agradecimentos. Acredito que você foi um pilar e a pessoa que me guiou ao longo desse mestrado, sem você não teria nem sido possível começar o meu trabalho. Muito obrigado de coração pela paciência, pela guia na escrita e conversas cotidianas. Obrigado por trazer as protaminas na minha vida, rs!

Finalmente, o meu maior e mais sincero agradecimento à **Professora Mayra**. Se não fosse pela senhora, eu não teria conseguido ficar mais próximo desse sonho, de quem sabe algum dia... ser mestre pela grande instituição que representa a Universidade de São Paulo. Obrigado à senhora por ter me acolhido e aceitado como aluno, mesmo tendo ficado pouco tempo como estagiário lá pelos inícios do 2016, como passa o tempo!! Sempre serei grato Profa, pela oportunidade, pela paciência nas correções do portunhol, pela orientação e porque a senhora me fez sentir como se estivesse em casa neste belo país.

Assim mesmo, o presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

Sempre serei grato à todas as pessoas que acompanharam essa minha caminhada ao longo do mestrado, os levarei sempre dentro do meu coração.

RESUMO

PACO NAGAKI, C. P. **Determinação da protamina 1 e protamina 2 em touros de alta e baixa fertilidade a campo**. 2021. 58 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2021.

Os touros que são utilizados nas centrais de reprodução são considerados como normospérmicos, mas o rendimento a campo entre eles pode diferir em até 40%. Sugere-se que análises convencionais de sêmen não sejam capazes de prever a capacidade fecundante real dos gametas, criando a necessidade de avaliar outros parâmetros que permitam identificar a fertilidade real dos touros. O status da cromatina espermática é relevante para a manutenção da fertilidade do espermatozoide, pois este carrega a informação genética paterna necessária para uma correta fertilização e o desenvolvimento embrionário subsequente. A cromatina espermática trata-se de uma estrutura composta por DNA ligada fortemente a nucleoproteínas, principalmente à protamina 1 (PRM1) e protamina 2 (PRM2). Entre os mamíferos, existe uma relação ideal (PRM1:PRM2) para uma adequada compactação do DNA espermático, caso contrário a fertilidade é comprometida. Em espermatozoides humanos e murinos, a expressão da PRM1 e PRM2 é relacionada com o nível de fertilidade. A protaminação dos espermatozoides bovinos era atribuída somente à Protamina 1 até a recente identificação da Protamina 2 em espermatozoides maduros. Portanto, este trabalho objetivou determinar as possíveis relações entre PRM1 e PRM2 em touros Nelore e Angus de diferente fertilidade a campo. Cada unidade experimental (touro) foi representada por um “pool” de 4 partidas diferentes e submetida ao ensaio de suscetibilidade da cromatina espermática (SCSA modificado), teste de Cromomicina A3 (CMA3) e quantificação absoluta dos transcritos para os genes PRM1, PRM2 e TNP1 por meio de qPCR. Os resultados demonstraram que não houve diferença significativa entre os grupos de alta e baixa fertilidade para nenhuma das raças para as análises consideradas. Dentro do grupo dos Nelore, a quantificação absoluta do número de cópias dos transcritos da PRM1 e PRM2 permitiu estabelecer uma relação PRM1:PRM2 de **1: 0,079** para o grupo de alta fertilidade e **1: 0,007** para os de baixa fertilidade. Nos Angus, foi observado uma relação **1: 0,27** para os touros de alta fertilidade e **1: 0,016** para os de baixa. Na sequência, foi realizada uma análise de

interação entre raças, na qual os ejaculados dos touros Nelore apresentaram maior número de cópias de transcritos de **PRM1** (Nelore= $0,986\pm 0,39$; Angus= $0,052\pm 0,012$) e de células com deficiência de protaminação (Nelore= $0,259\pm 0,033$; Angus= $0,078\pm 0,019$). Contraditoriamente, os ejaculados dos touros Angus apresentaram maior quantidade de espermatozoides com suscetibilidade à fragmentação (Nelore= $0,338\pm 0,292$; Angus= $1,7505\pm 0,185$). Foi observada uma relação entre PRM1:PRM2 de 1: 0,074 para os ejaculados dos touros Nelore e 1: 0,23 para os Angus. Os resultados observados neste trabalho não permitiram explicar a diferença de fertilidade entre touros de diferentes raças agrupados por fertilidade; no entanto, foram observadas diferenças na relação de transcritos de protamina (PRM1 e 2) nos espermatozoides de touros Nelore e Angus, que podem refletir no aparecimento de células com deficiência de protaminação e mais susceptíveis à fragmentação de DNA.

Palavras-chave: Cromatina. Protaminação. Fertilidade. Ácido- desoxirribonucleico.

ABSTRACT

PACO NAGAKI, C. P. **Protamine 1 and 2 ratio in high and low fertility bulls.**

2021. 58 s. Thesis (Master's Degree in Sciences) – School of Veterinary Medicine and Animal Science, University of São Paulo, São Paulo, 2021.

Bulls that are used in breeding centers are considered normospermic, despite the fertility rates can differ up to 40%. It is suggested that conventional semen analyzes are not able to predict the real fertilizing capacity of the spermatozoa, creating the need to evaluate other parameters that allow the identification of fertile bulls. The status of sperm chromatin is relevant for the maintenance of sperm fertility, as it carries the paternal genetic information, which is necessary for correct fertilization and subsequent embryonic development. Sperm chromatin is a structure composed of DNA tightly bound to Protamine1 and Protamine2. Among mammals, there is an ideal ratio (PRM1:PRM2) for an adequate compaction of sperm DNA, otherwise fertility is compromised. In human and murine sperm, the expression of PRM1 and PRM2 is related to the level of fertility. Protamine in bovine sperm was attributed only to Protamine 1 until the recent identification of Protamine 2 in mature sperm. Therefore, this work aimed to determine the possible relationships between PRM1 and PRM2 in Nellore and Angus bulls of different sire conception rates (*SCR*). Each experimental unit (bull) was represented by a "pool" of 4 different batches and submitted to the sperm chromatin susceptibility test (SCSA adapted), Chromomycin A3 analysis (CMA3) and absolute quantification of transcripts for PRM1, PRM2 and TNP1 genes through qPCR. High and low fertility groups were similar ($p > 0,05$) for all analysis considered, regardless of breed. Within the Nellore group, the absolute quantification of the copy number of the PRM1 and PRM2 transcripts allowed us to establish a PRM1:PRM2 ratio of 1:0.079 for the high fertility group and 1:0.007 for the low fertility group. In Angus, a ratio of 1:0.27 was observed for bulls with high fertility and 1:0.016 for the low fertility. Also, an interaction analysis between breeds was performed, in which the ejaculates of Nellore bulls had a higher number of copies of PRM1 transcripts (Nellore= 0.986 ± 0.396 ; Angus= 0.052 ± 0.012) and more cells with protamine deficiency (Nellore = 0.259 ± 0.033 ; Angus= 0.078 ± 0.019). In contrast, the ejaculates of Angus bulls had a greater amount of sperm with susceptibility to fragmentation (Nellore= 0.338 ± 0.292 ; Angus= 1.7505 ± 0.185). A

relationship between PRM1:PRM2 of 1:0.074 for the ejaculates from Nellore bulls and 1:0.23 from Angus bulls was observed. The results from this work could not explain the difference in fertility between bulls of different breeds grouped by fertility rate; however, we observed differences in the ratio of protamine transcripts (PRM1 and 2) in spermatozoa from Nellore and Angus bulls, which could reflect in the appearance of cells with protamine deficiency and more susceptible to DNA fragmentation.

Keywords: Chromatin. Protamination. Fertility. Desoxyribonucleic acid.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Efeito do nível de fertilidade dos touros com respeito à dose inseminante	30
Figura 2. Representação gráfica dos grupos experimentais.	34
Figura 3. Porcentagem de espermatozoides com deficiência de protaminação pela técnica CMA3 (A); Porcentagem de espermatozoides susceptíveis à fragmentação de DNA pela técnica SCSA modificado (B); e número de cópias dos transcritos para PRM1 (C) entre as raças Nelore e Angus. Letras diferentes indicam diferença significativa.	42
Figura 4. Número de cópias dos transcritos obtidos para PRM1 (A) e PRM2 (B) nos espermatozoides provenientes de touros da raça Nelore e Angus, independente dos grupos alta e baixa fertilidade. Letras diferentes indicam diferença significativa. ..	44
Figura 5.- Relação PRM1: PRM2 para cada grupo experimental em touros Nelore e Angus.....	50

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Descrição das sequências de nucleotídeos utilizados nos primers para os genes PRM1, PRM2 e TNP1.....	39
Tabela 2. Porcentagem de espermatozoides positivos para o CMA3; porcentagem de espermatozoides positivos para o SCSA modificado; e número de cópias dos transcritos para PRM1, PRM2 e TNP1 para efeito de interação raça (Nelore e Angus) e fertilidade (Alta e Baixa Fertilidade); e valores probabilidade (p).....	41
Tabela 3. Porcentagem de espermatozoides positivos para o CMA3; Porcentagem de espermatozoides positivos para o SCSA modificado; e número de cópias dos transcritos para PRM1, PRM2 e TNP1 em 10 ng de cDNA entre as raças Nelore e Angus; e valores probabilidade (p).....	42
Tabela 4. Número de cópias dos transcritos obtidos para PRM1 e PRM2 em 10 ng de cDNA espermático proveniente de touros da raça Nelore nos grupos alta e baixa fertilidade; valores de probabilidade (p).....	43
Tabela 5. Número de cópias dos transcritos obtidos para PRM1 e PRM2 em 10 ng de cDNA espermático proveniente de touros da raça Angus nos grupos alta e baixa fertilidade; valores de probabilidade (p).....	43
Tabela 6. Número de cópias dos transcritos obtidos para PRM1 e PRM2 nos espermatozoides provenientes de touros da raça Nelore e Angus, independente dos grupos alta e baixa fertilidade; valores de probabilidade (p).	44
Tabela 7. Porcentagem de espermatozoides com deficiência de protaminação pela técnica CMA3; Porcentagem de espermatozoides susceptíveis à fragmentação de DNA pela técnica SCSA; e número de cópias dos transcritos para PRM1, PRM2 e TNP1 em 10 ng de cDNA entre os grupos alta e baixa fertilidade; e valores probabilidade (p).....	45

LISTA DE ABREVIÇÕES

BBSE	Bull Breeding Soundness Evaluations
CMA3	Cromomicina A3
DFI	Índice de Fragmentação de DNA
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
EROs	Espécies Reativas de Oxigênio
H1 / H2	Histona 1 / Histona 2
IA	Inseminação artificial
IATF	Inseminação Artificial a Tempo Fixo
mL	Mililitro
mM	Milimolar
ng	Nanogramo
PBS	Tampão Fosfato Salino
PRM1	Protamina 1
PRM2	Protamina 2
Qtde	Quantidade
rcf	Força Centrifuga Relativa
RNA	Ácido Ribonucleico
qPCR	Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real
SARS	Coronavírus 2 da Síndrome Respiratória Aguda
COV2	Grave
SCD	Sperm Chromatin Dispersion
SCSA	Sperm Chromatin Susceptibility Assay
SNPs	Polimorfismo de nucleotideo único
Sptz	Espermatozoide
TNP1	Proteína de Transição 1
VLRs	Variable Length Repeat
Vol	Volume

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	17
2	REVISÃO DE LITERATURA	19
2.1	POR QUE FALAR DO PAPEL DO TOURO NA FERTILIDADE?	19
2.2	INFERTILIDADE EM TOUROS OU SUBFERTILIDADE?	20
2.2.1	Fator raça	21
2.3	CÉLULA ESPERMÁTICA	22
2.3.1	Cromatina espermática	23
2.3.1.1	Proteínas do núcleo espermático e protaminação	23
2.3.1.2	Alterações na protaminação	25
2.3.2	Avaliação da célula espermática	26
2.3.2.1	Análises rotineiras	26
2.3.2.2	Técnicas de avaliação da cromatina espermática	27
2.3.2.2.1	<i>Cromomicina A3</i>	27
2.3.2.2.2	<i>Ensaio de Susceptibilidade da Cromatina Espermática (SCSA)</i>	27
2.3.2.2.3	<i>Expressão gênica das nucleoproteínas da cromatina espermática por meio de qPCR</i>	28
2.3.3	Classificação das alterações seminais	29
2.3.3.1	Defeitos compensáveis	29
2.3.3.4	Defeitos não compensáveis	29
3	HIPÓTESE	32
4	OBJETIVOS	32
4.1	OBJETIVO GERAL	32
4.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	32
5	MATERIAIS E MÉTODOS	33
5.1	DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	33
5.1.1	Grupos experimentais	33
5.1.2	Análises imediatas	34
5.2	AVALIAÇÃO DA DEFICIÊNCIA DE PROTAMINAÇÃO	35
5.2.1	Montagem das lâminas	35
5.2.2	Leitura e identificação	36

5.2.3 Controle positivo	36
5.3 ENSAIO DE SUSCEPTIBILIDADE DA CROMATINA ESPERMÁTICA À FRAGMENTAÇÃO DE DNA.....	36
5.4 EXPRESSÃO GÊNICA DA PRM1, PRM2 E TNP1	37
5.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA	39
6 RESULTADOS	40
6.1 INTERAÇÃO RAÇA E GRUPOS DE FERTILIDADE	40
6.2 EFEITO RAÇA.....	41
6.2.1 Relação entre transcritos (PRM1 e PRM2)	43
6.2.1.1 Nelore.....	43
6.2.1.2 Angus.....	43
6.2.1.3 Nelore vs Angus.....	44
6.3 EFEITO FERTILIDADE	45
7 DISCUSSÃO	45
8 CONCLUSÕES	50
REFERÊNCIAS	51
ANEXOS	58

1 INTRODUÇÃO

A última década será lembrada na história com muita tristeza devido aos inúmeros óbitos e falências econômicas a partir da pandemia causada pelo SARS-CoV2, principalmente em países tão heterogêneos como o Brasil (ALVES et al., 2021; LOTTA et al., 2021). Para encarar esta situação, a pecuária no Brasil assumiu um papel representativo na economia nacional, sendo a pecuária de corte responsável por 10% do PIB total acumulado do presente ano (CNA E CEPEA, 2021). Para acompanhar este crescimento, as centrais de reprodução bovina dispõem de técnicas para facilitar o manejo, como a inseminação artificial em tempo fixo (IATF), os quais superaram os 21 milhões de procedimentos em 2020 (BARUSELLI, 2021).

Embora exista um crescimento sustentado da pecuária no Brasil, ainda um dos grandes problemas é a detecção da fertilidade real dos touros, uma vez que até 40% dos machos apresenta fertilidade reduzida (KASTELIC, 2013). Esta falta de relação entre a fertilidade esperada dos touros e a observado, geralmente a campo, torna-se frustrante para os produtores, porque resulta em perdas econômicas. Infelizmente, as análises rotineiras de sêmen não são capazes de prever a capacidade reprodutiva dos touros (FATEHI et al., 2006; THUNDATHIL; DANCE; KASTELIC, 2016). Frente a isto, é importante reconhecer que a capacidade reprodutiva dos touros recai na função da célula espermática, a qual sofre modificações estruturais necessárias que a preparam para uma adequada locomoção, capacitação espermática e uma provável fertilização do oócito (OLIVERA et al., 2006; STAUB; JOHNSON, 2018). Para tanto, as estruturas espermáticas deverão manter-se íntegras, principalmente o DNA que carrega a informação genética, contida na cromatina espermática (SOUZA et al., 2018).

A cromatina espermática vêm sendo bastante estudada em espermatozoides humanos e murinos, assim que a composição da cromatina possui uma relação direta com a fertilidade dessas espécies (AOKI et al., 2006a; OLIVA, 2006; SCHNEIDER et al., 2016). A composição final da cromatina espermática depende da substituição sucessiva das nucleoproteínas ao longo da espermatogênese, até a substituição final, no qual o DNA será enovelado pelas protaminas (RATHKE et al., 2014a). No entanto, podem ocorrer falhas neste processo denominado

protaminação, o qual pode refletir negativamente sobre o status final da cromatina do espermatozoide maduro (SAKKAS et al., 1995; 1996).

As nucleoproteínas encarregadas de compactar a cromatina espermática dos bovinos são semelhantes à grande maioria dos mamíferos, protamina 1 (PRM1) e protamina 2 (PRM2), no entanto, as proporções PRM1:PRM2 variam entre espécies (STEGER; BALHORN, 2018). Esta relação entre protaminas torna-se mais relevante uma vez que foram descritas relações ideais entre espécies (AMOR et al., 2018; TORREGROSA et al., 2006). Diminuição da fertilidade e alterações morfológicas dos espermatozoides podem ocorrer quando as proporções entre as protaminas se apresentam alteradas, como consequência da compactação alterada da cromatina espermática (NI et al., 2016; OLIVA, 2006; SCHNEIDER et al., 2016). Já nos bovinos, a compactação da cromatina era atribuída classicamente somente à PRM1, até a recente identificação da PRM2 em testículos e espermatozoides (HAMILTON et al., 2019). Sugere-se que a protaminação na espécie bovina seja mais conservada devido ao predomínio da PRM1 em relação à PRM2, culminando em uma cromatina melhor compactada e menos susceptível a possíveis erros na compactação (FERRAZ et al., 2013; HAMILTON et al., 2019). Os estudos relacionados à protaminação de espermatozoides humanos e murinos, evidenciam que a relação PRM1:PRM2 reflete diretamente sobre o sucesso ou a falha da fertilidade. Seguindo esta linha de raciocínio, somada à falta de estudos descritivos da cromatina espermática dos espermatozoides bovinos, cria-se um nicho de pesquisa para tentar relacionar os níveis de protaminação com a fertilidade dos touros.

Por isso, conhecer as proporções das protaminas nos espermatozoides de touros com diferentes taxas de prenhez, assim como de raças diferentes, passa a ser uma informação importante na construção deste conhecimento e com possíveis aplicações. Desta forma, em conjunto com avaliações da cromatina espermática, este trabalho visou estudar a relação da protaminação na fertilidade dos touros.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 POR QUE FALAR DO PAPEL DO TOURO NA FERTILIDADE?

Para o crescimento da pecuária bovina no Brasil é necessário a implementação de novas estratégias para otimizar os processos e melhorar o rendimento dos animais (MENEGASSI et al., 2011). Ao longo do tempo, uma estratégia relevante vem sendo a identificação dos animais com um adequado perfil reprodutivo, de acordo com os critérios estabelecidos pelo Manual de Avaliação do CBRA (2013) no Brasil ou pela *Society for Theriogenology* nos EUA; visando a avaliação das estruturas reprodutivas, o comportamento reprodutivo e as características espermáticas de cada indivíduo (VIANNA et al., 2015). O resultado destas avaliações é importante devido ao impacto direto da reprodução sobre os índices econômicos (ABDOLLAHI-ARPANAHI; MOROTA; PEÑAGARICANO, 2017).

A seleção dos indivíduos torna-se muito importante quando se trata dos machos, assim que a maioria dos sistemas de produção (bovinos, ovinos, suínos) estão baseados em poucos machos e inúmeras fêmeas (TIMLIN et al., 2021). Portanto, a intensidade de seleção recai em indivíduos com características fenotípicas e pelos genes desejados para a prole.

Na produção bovina, seja de corte ou de leite, a implementação de filtros eficazes na seleção dos touros torna-se importante para reconhecer os touros férteis daqueles com possíveis alterações na fertilidade. A identificação dos indivíduos com melhor aptidão reprodutiva (fisicamente saudável, bom libido e normospérmicos), traz benefícios econômicos devido a melhor eficiência das biotecnologias reprodutivas refletido em mais bezerros produzidos por estação e diminuindo os dias vazios das fêmeas (MENEGASSI et al., 2011).

As falhas ou sucesso na fertilidade dependem então de vários fatores; mas quando tenta-se relacionar às características espermáticas, se torna ainda mais complexo devido ao pouco entendimento sobre a interação e o impacto real dos atributos espermáticos sobre a aptidão reprodutiva (ABDOLLAHI-ARPANAHI; MOROTA; PEÑAGARICANO, 2017; BUTLER et al., 2020).

2.2 INFERTILIDADE EM TOUROS OU SUBFERTILIDADE?

As falhas nos processos reprodutivos eram classicamente atribuídas ao fator fêmea, sendo que grande parte destas falhas eram causadas por touros aparentemente normospérmicos (DEJARNETTE et al., 2004). A partir disto, tornou-se importante identificar outras características envolvidas na capacidade fertilizante dos espermatozoides (AMANN; DEJARNETTE, 2012; BUTLER et al., 2020). A grande maioria dos touros avaliados nas centrais de reprodução, apresentam ótimas características espermáticas, porém o rendimento a campo as vezes é inferior ao esperado (KASTELIC, 2013). A fertilidade nos touros depende do funcionamento adequado do sistema reprodutor, o qual é influenciado por fatores fisiológicos próprios ou intrínsecos dos indivíduos, assim como por fatores externos ou extrínsecos relacionados ao manejo (FAIR; LONERGAN, 2018). Portanto, é necessário estabelecer uma avaliação andrológica que permita encontrar alterações no próprio indivíduo, assim como conhecer o histórico do animal para verificar boas condições no manejo (KASTELIC, 2013).

Inicialmente, os touros são submetidos a avaliações físicas, para descartar patologias morfológicas (alterações no epidídimo, nos testículos, no escroto, no cordão espermático, na glândula bulbouretral, nas vesículas seminais, no próprio pênis, no prepúcio ou alterações derivadas do sistema urinário) capazes de comprometer a qualidade seminal do indivíduo (CAMP, 1997).

Após descartar as lesões físicas, o próximo passo é verificar a qualidade dos gametas. Para esse fim, os ejaculados dos touros são submetidos às avaliações macroscópicas e microscópicas (detalhados no item 2.3.2). Apesar de existirem critérios particulares e a subjetividade dos avaliadores para estas avaliações espermáticas, estas técnicas servem como um primeiro filtro de avaliação espermática. Por exemplo, a detecção precoce de alterações morfológicas é importante, uma vez que a presença de alterações estruturais na cabeça ou na cauda pode significar uma diminuição na capacidade fertilizante do espermatozoide (PERRY, 2021).

Os parâmetros de avaliação espermática em bovinos não são tão exigentes com respeito à motilidade espermática, dado que as técnicas atuais, como a inseminação artificial, facilitam a chegada dos espermatozoides até os cornos

uterinos. Portanto, tolera-se como aceitável o mínimo de 30% de motilidade progressiva, sendo que valores abaixo estão relacionados a quedas nas taxas reprodutivas de referência (CHENOWETH et al., 2010).

Como resultado destas avaliações, os defeitos encontrados nos espermatozoides podem ser categorizados como defeitos maiores e menores, ou também classificados, como não compensáveis e compensáveis (SAACKE et al., 2000). Após avaliação dos espermatozoides, examina-se a concentração espermática com o objetivo de verificar se há quantidade de células suficientes para que o animal seja considerado apto para reprodução.

2.2.1 Fator raça

A produção bovina no Brasil se caracteriza por apresentar raças zebuínas pertencentes à subespécie *Bos taurus indicus* e as raças europeias à subespécie *Bos taurus Vol.*, sendo ambas populações destinadas à produção de carne e de leite. Para cada fim, são utilizadas diferentes raças que apresentam diferenças evolutivas que desenvolveram melhores mecanismos adaptativos frente às condições ambientais, tais como: localização geográfica, estresse térmico e manejo intensivo; gerando assim diferentes graus de rusticidade e características específicas para cada raça (HANSEN, 2006).

Dentro dos aspectos fisiológicos mais influenciados pelas condições externas, encontra-se a função reprodutiva. As vacas zebuínas (*B. indicus*) apresentam-se mais resistentes que as europeias (*B. taurus*) frente ao estresse térmico, sendo capazes de manter a ingesta calórica e a produção leiteira; assim como o desempenho reprodutivo (HANSEN, 2004). Além disto, as vacas zebuínas são consideradas melhores doadoras e possuem melhor qualidade oocitária para o posterior uso nas biotecnologias reprodutivas (GUIMARÃES et al., 2020). Neste último ponto, deve ser considerado que o sucesso reprodutivo depende também da capacidade reprodutiva dos touros e das características próprias dos gametas para cada subespécie.

Os touros zebuínos apresentam adaptações evolutivas que permitem uma maior perda de calor geral, assim como adaptações vasculares em nível testicular em resposta ao estresse térmico para evitar comprometimento da gametogênese

(HANSEN, 2004). Os espermatozoides de cada subespécie apresentam também diferenças evolutivas. Um primeiro indício desta divergência foram as diferenças morfológicas. Há relatos de que os gametas dos touros zebuínos são menores e com cabeças menos elípticas quando comparadas aos gametas de touros europeus, no entanto, isto não reflete sobre a simetria e características hidrodinâmicas dos espermatozoides (BELETTI; COSTA; GUARDIEIRO, 2005).

Posteriormente, alguns estudos tentaram comparar também a tolerância dos espermatozoides a estímulos negativos como o estresse térmico. Os embriões produzidos por espermatozoides oriundos de *B. indicus* foram capazes de suportar melhor o estresse térmico nas primeiras fases do desenvolvimento quando comparados aos embriões gerados por *B. taurus*, demonstrando assim uma termotolerância herdada (MONTEIRO et al., 2007).

Com o intuito de entender melhor as diferenças, foi realizada proteômica dos espermatozoides zebuínos e foi encontrando proteínas que estariam ausentes em animais híbridos (*B. indicus* x *B. taurus*), sendo essas proteínas espermáticas relacionadas ao melhor uso da energia e motilidade espermática (ASHRAFZADEH; NATHAN; KARSANI, 2013).

2.3 CÉLULA ESPERMÁTICA

Os espermatozoides são células produzidas a partir de um processo chamado espermatogênese, o qual acontece dentro dos testículos dos mamíferos (AMANN, 1962). Estas células caracterizam-se por possuir uma morfologia diferenciada composta por uma cauda ou flagelo que permite a locomoção ao longo do trato feminino, uma peça intermediária envolta por mitocôndrias e uma cabeça hidrodinâmica, com variações entre espécies, que sofrerá alterações estruturais num eventual encontro com o oócito durante a fecundação. Devido a essa particularidade e especificidade estrutural é fundamental que cada estrutura espermática esteja próxima à perfeição (Carli et al., 2015). O núcleo espermático contido na cabeça do espermatozoide é considerado como uma das estruturas mais importantes dessa célula, porque contém a informação genética paternal (DNA) numa estrutura altamente compactada e enovelada por nucleoproteínas conhecida como cromatina espermática. As nucleoproteínas encarregadas de compactar o

DNA espermático variam ao longo da espermatogênese e a composição final da cromatina também varia entre espécies, acreditando-se ser necessário para regular diferentes genes em estágios iniciais após fertilização do oócito (FILHO; BELETTI; DE OLIVEIRA, 2015; RATHKE et al., 2014a).

2.3.1 Cromatina espermática

2.3.1.1 Proteínas do núcleo espermático e protaminação

A cromatina espermática é uma estrutura complexa e de composição dinâmica, encontra-se no núcleo espermático de espermatozoides maduros e sua função é preservar integralmente a informação paterna e a carga epigenética até o oócito (HIRAIWA et al., 2021). Essa sofre mudanças estruturais ao longo da espermatogênese devido às constantes substituições de nucleoproteínas que permitem uma compactação do DNA e a preservação da hidrodinâmica do gameta masculino. Nos estágios iniciais da espermatogênese, as primeiras células, chamadas de células tronco espermáticas, se diferenciarão em espermatogônias contendo o DNA ainda unido à proteínas chamadas histonas canônicas (H2A, H2B, H3 e H4) (TALBERT; HENIKOFF, 2010). Em seguida, essas histonas serão desestabilizadas por meio de modificações pós-transcricionais, permitindo a substituição dessas histonas por variantes de histonas e histonas específicas dos testículos (BAO; BEDFORD, 2016). Posteriormente, a cromatina dos espermatócitos ainda imaturos sofrerão substituições das histonas por proteínas de transição, marcando assim a fase prévia à diferenciação espermática (MEISTRICH et al., 2003). Após a diferenciação espermática, torna-se importante que o DNA seja compactado de uma forma mais eficiente para reduzir o tamanho do núcleo e assim favorecer o hidrodinamismo do espermatozoide (RATHKE et al., 2014b). Para tal fim, as proteínas de transição serão substituídas finalmente por proteínas básicas chamadas de protaminas (PRMs) (BALHORN, 2007; OLIVA, 2006).

As protaminas são proteínas compostas principalmente por arginina e cisteína oxidada, resultando numa molécula carregada positivamente permitindo a afinidade pela carga negativa do DNA (BALHORN, 2007). Estas proteínas permitem que a cromatina espermática esteja hiper compactada, com maquinaria de

transcrição inativa e protegida até o encontro com o oócito, quando as PRMs serão substituídas novamente por histonas maternas (MCLAY; CLARKE, 2003). Existem duas grandes famílias de protaminas: a PRM1 e a PRM2. A PRM1 é sintetizada como proteína madura, cuja presença é reportada em quase todos os espermatozoides dos mamíferos. No entanto, a PRM2 é uma proteína sintetizada geralmente como um precursor e cuja expressão varia nas poucas espécies já estudadas, como humana e murina, por exemplo (BALHORN, 2007; BALHORN et al., 2018). Por tanto, a relação entre ambas protaminas é diferente entre as espécies estudadas (LÜKE et al., 2014a).

Dentro dos modelos de protaminação mais estudados, encontram-se os espermatozoides humanos e murinos. Nestas duas espécies, estabeleceu-se que existe uma relação ideal de protaminas (PRM1:PRM2) para a preservação da fertilidade do macho, sendo nos humanos próximo a 1 e nos murinos a 0,65, sendo reportada infertilidade caso haja alterações nessa relação (AOKI et al., 2006a; OLIVA, 2006; SCHNEIDER et al., 2016). Nos bovinos, a protaminação era classicamente atribuída à PRM1, até a recente identificação da PRM2 em tecido testicular e em espermatozoides maduros (HAMILTON et al., 2019). No entanto, ainda não se conhece qual o real papel da PRM2 em bovinos, e a relação ideal entre a PRM1:PRM2 para esta espécie.

2.3.1.2 Alterações na protaminação

A protaminação ou amadurecimento da cromatina espermática, é alvo de sinalizações de natureza intrínseca e extrínseca (BALHORN, 2007; STEGER; BALHORN, 2018). A partir disto, podem ocorrer falhas biológicas dentro do conjunto de sinalizações.

Dentro dos fatores intrínsecos, podem acontecer falhas na sinalização das modificações pós-transcricionais que são necessárias para uma marcação e substituição adequada das nucleoproteínas, principalmente nas histonas H3T e TH2B (AUSIO; ZHANG; ISHIBASHI, 2016; YUEN et al., 2014). Assim sendo, podem existir mutações em regiões não codificantes que seriam capazes interferir na expressão gênica da PRM1 e PRM2, especificamente em sequências denominadas *Variable Length Repeat* (VLRs), assim como em regiões com polimorfismo de único nucleotídeo (SNPs) (HAMMOUD et al., 2007; RAVEL et al., 2007). Finalmente, sugere-se também que caso haja alterações nas vias regulatórias da protaminação (via CREM, via MSY2 e via PRBP), estas podem refletir negativamente sobre a tradução das PRMs (BLENDY et al., 1996; LEE; FAJARDO; BRAUN, 1996; YU; HECHT; SCHULTZ, 2002).

Em contraste, existem fatores externos também capazes de alterar a protaminação dos espermatozoides. Nesta classificação, são considerados principalmente a exposição à altas temperaturas e agentes oxidantes, que por si só ou em conjunto são capazes de aumentar o metabolismo dos espermatozoides e a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) (HAMILTON et al., 2018; WU, SCARLATA, O'FLAHERTY 2020). Desta forma, quando a produção excessiva de EROs não é compensada pela produção própria ou suplementação de antioxidantes, cria-se uma condição chamada de estresse oxidativo, a qual pode interferir também na substituição de histonas por protaminas nos espermatozoides (GAO et al., 2021).

Independente da causa, os eventos fisiológicos corretos e eficientes relacionados à protaminação permitem uma compactação adequada da cromatina espermática. Mesmo sabendo que falhas na protaminação geram uma cromatina frágil e suscetível à fragmentação do DNA, a avaliação da cromatina espermática não é utilizada para as avaliações rotineiras dos espermatozoides bovinos.

2.3.2 Avaliação da célula espermática

2.3.2.1 Análises rotineiras

Os touros são representados pelas características dos ejaculados, sendo inicialmente submetido a uma avaliação quanto ao odor, cor, aspecto e volume, para um descarte precoce de anomalias. Posteriormente, os ejaculados são submetidos às análises microscópicas básicas (turbilhonamento, motilidade, concentração e morfologia), as quais fornecem informações relevantes sobre a viabilidade dos espermatozoides, assim como a sobrevivência destes após o descongelamento (VASAN, 2011; VINCENT et al., 2014).

A obtenção da concentração espermática da amostra servirá para estimar quantas vacas poderão ser inseminadas ou quantas palhetas poderão ser criopreservadas a partir de um ejaculado. Na sequência, a motilidade espermática é considerada como um indicador de vitalidade dos espermatozoides após descongelamento, podendo ser avaliada em massa ou individualmente (progressiva), sendo considerada aceitável o mínimo de 30% de motilidade progressiva (CHENOWETH et al., 2010). Além disto, o espermatozoide precisa de uma morfologia adequada que o permita passar pelo trato reprodutivo feminino até chegar ao oócito, portanto, torna-se importante a identificação de anormalidades na cabeça, peça intermediária e no flagelo (CARLI et al., 2015). Para ser considerado como aceitável, necessita-se um mínimo de 70% dos espermatozoides com morfologia normal, segundo a Society for Theriogenology (www.therio.org).

Embora estas análises sejam utilizadas rotineiramente para avaliar as características seminais, deve-se considerar a particularidade dos dados fornecidos por cada central, dada a subjetividade de cada avaliador local (THUNDATHIL; DANCE; KASTELIC, 2016). Portanto, torna-se necessário implementar novas avaliações uma vez que as atuais são incapazes de predizer a capacidade fertilizante real dos espermatozoides bovinos.

2.3.2.2 Técnicas de avaliação da cromatina espermática

A cromatina espermática é uma estrutura que possui o DNA enovelado por protaminas que permitem um maior grau de compactação quando comparadas às células somáticas (BALHORN, 2007). A finalidade desta hiper compactação é manter a integridade da cromatina e evitar deixar regiões expostas a agentes deletérios, portanto, é importante detectar possíveis falhas precoces e o status real desta cromatina.

2.3.2.2.1 Cromomicina A3

Dada a natureza da cromatina espermática, a qual é constituída principalmente por toróides de DNA e protaminas, uma forma de avaliá-la é pela detecção de deficiência no processo protaminação. A verificação do *status* da protaminação torna-se relevante, pois com uma protaminação adequada há preservação da integridade da cromatina espermática, caso contrário esta fica mais susceptível e mais exposta a agentes exógenos. Para tanto, é utilizado um fluorocromo chamado Cromomicina A3 (CMA3), o qual se liga à curvatura menor do DNA, caso não haja ligação prévia de protaminas (BIANCHI et al., 1996). Esta técnica permite a detecção dos espermatozoides positivos ao CMA3, que emitirão uma fluorescência (verde fluorescente) detectável por meio de microscopia de fluorescência, sendo um protocolo utilizado amplamente em humanos e também adaptado para espermatozoides bovinos (SIMÕES et al., 2009). A implementação desta técnica é importante já que deficiências de protaminação detectadas pelo CMA3 possuem correlação positiva com fragmentação de DNA e consequente subfertilidade (FORTES et al., 2014).

2.3.2.2.2 Ensaio de Susceptibilidade da Cromatina Espermática (SCSA)

Este ensaio é uma análise que avalia a porcentagem de desnaturação do DNA espermático após incubação com um detergente ácido, ou seja, verifica as células que estão susceptíveis à fragmentação do DNA. Esta técnica utiliza um corante metacromático chamado laranja de acridina que se intercala ao DNA, emitindo uma fluorescência, variando desde verde (DNA integro- dupla fita) até vermelho (DNA

desnaturado -fitas quebradas) (EVENSON, 2016). O SCSA é considerado um ensaio de grande utilidade para avaliar a integridade do DNA espermático em diversas espécies e atualmente é um teste padrão na avaliação espermática humana, sendo demonstrado correlação negativa com a fertilidade (ERENPREISS et al., 2006). Na espécie bovina, o SCSA vem sendo adaptado e usado experimentalmente em protocolos de avaliação espermática, sendo que os resultados junto com outras análises seminais podem ajudar a conhecer a real capacidade fertilizante do espermatozoide bovino (CASTRO et al., 2018; SELLEM et al., 2015). Portanto, a identificação precoce de touros que apresentem espermatozoides com DNA suscetível à fragmentação auxiliaria na inclusão ou exclusão dos touros nos programas de reprodução.

2.3.2.2.3 Expressão gênica das nucleoproteínas da cromatina espermática por meio de qPCR

A avaliação da expressão gênica das nucleoproteínas, tanto para as protaminas como para as proteínas de transição, deve ser realizada por meio da quantificação absoluta após qPCR. Embora alguns estudos tenham considerado a utilização do qPCR relativo para este fim (FERRAZ et al., 2013; KREMLING et al., 1992), a atividade transcricional acontece antes da diferenciação espermática, ou seja, é polêmica a efetividade de se comparar a atividade transcricional com um gene endógeno. Os espermatozoides provenientes de ejaculados são células maduras e consideram-se células com atividade transcricional basal até a descompactação induzida pelas histonas dos oócitos (MEISTRICH et al., 2003). Baseado nisto, uma melhor alternativa é realizar a quantificação absoluta dos transcritos das protaminas por meio do qPCR absoluto (HAMILTON et al., 2019). A quantificação absoluta é uma ferramenta que permite calcular o número de cópias de transcritos de acordo com uma curva de diluição do mesmo gene com quantidades conhecidas. Esta técnica é útil também porque permite estabelecer as relações de PRM1:PRM2, assim como é realizado rotineiramente nos espermatozoides humanos (SOLER-VENTURA et al., 2020). A partir deste cálculo, é possível verificar a relação ideal entre os transcritos de PRM nos espermatozoides da espécie bovina.

2.3.3 Classificação das alterações seminais

2.3.3.1 Defeitos compensáveis

Desde o ponto de vista funcional, os espermatozoides precisam de uma morfologia íntegra para atravessar as barreiras físicas e químicas do trato reprodutor feminino (SULLIVAN; ELLIOTT, 1968). A presença de alterações na cabeça do espermatozoide ou na cauda interferem na hidrodinâmica e na motilidade do gameta e impedirão a chegada dele até o oócito e serão rejeitados pela zona pelúcida (SAACKE et al., 1998). Dentro desta classificação há os defeitos no acrossomo, alterações na composição do fluido seminal e alterações na integridade da membrana plasmática, devido às possíveis alterações na capacitação espermática e reconhecimento oócito-espermatozoide e a consequente falha na fertilização (SAACKE, 2008).

Embora as características mencionadas anteriormente diminuam as chances de fertilizar o oócito, estas alterações podem ser compensadas aumentando o número de espermatozoides por palheta (Touro A, B, C e D na Figura 1).

2.3.3.4 Defeitos não compensáveis

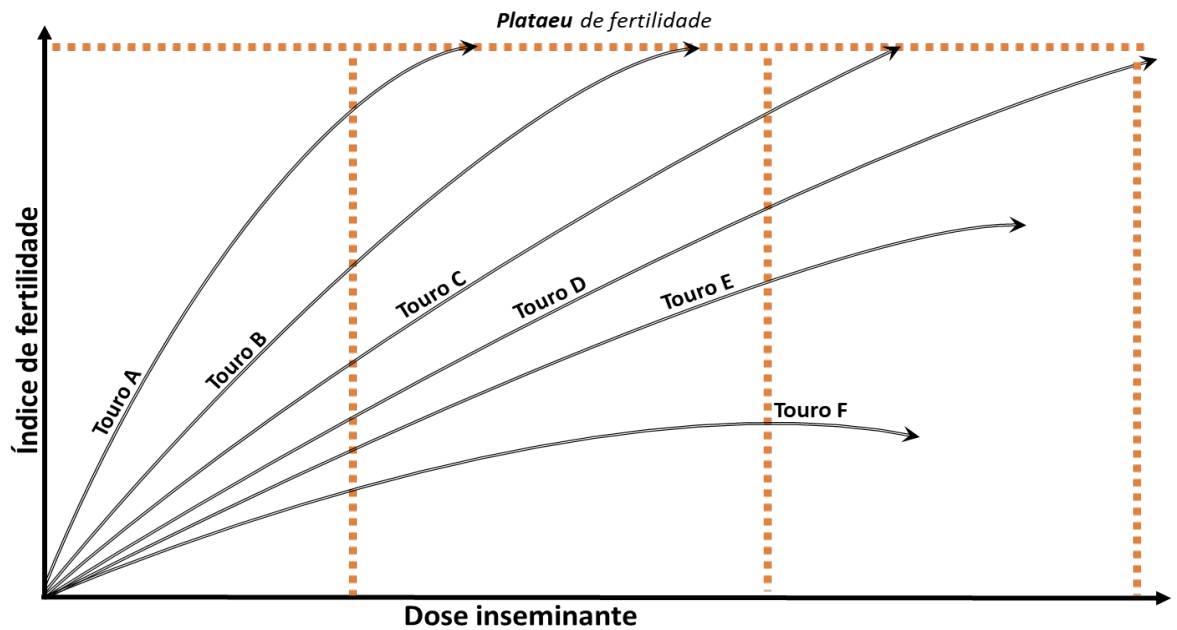
Apesar de algumas alterações espermáticas poderem ser compensadas ao se aumentar a dose inseminante, existem outras capazes de diminuir a fertilidade independentemente do número total de espermatozoides na dose. Esses defeitos são chamados de não compensáveis, já que a presença deles têm um impacto mais severo sobre a fertilidade, resultando em infertilidade ou subfertilidade refletida (touro E F da Figura 1) incapazes de atingir valores mínimos, o *plataeu*, de fertilidade (SAACKE, 2008).

Dentro dos defeitos encontrados neste grupo, estão as alterações cromossômicas, deficiências de protaminação e na composição do RNA no núcleo espermático que comprometem a embriogênese e o desenvolvimento embrionário inicial (KASTELIC, 2013). As deficiências de protaminação resultam em uma

compactação menor da cromatina espermática, gerando assim espermatozoides com maior suscetibilidade à fragmentação espermática sem alterar a morfologia da cabeça dos gametas (SAACKE, 2008).

Esta condição de gametas aparentemente inalterada porém, com possíveis alterações internas, em nível nuclear, dificulta muito a identificação dos defeitos considerados como não compensáveis. Para conseguir identificar estes defeitos, precisa-se de análises mais aprofundadas. Portanto, é necessário a utilização de técnicas de laboratório mais específicas, como o Sperm Chromatin Susceptibility Assay (SCSA), permite avaliar o estado da cromatina e a porcentagem de fragmentação do DNA espermático.

Figura 1. Efeito do nível de fertilidade dos touros com respeito à dose inseminante



Representação de gráfica de diferentes touros cujas características seminais refletem na quantidade de espermatozoides necessários para atingir o *plateau* necessário de fertilidade. O Touro A precisa de menos espermatozoides para atingir o *plateau* em comparação ao touro B, C e D. Os touros E F possuem características seminais que não permitem atingir o *plateau*, inclusive aumentando a dose inseminante. (Adaptada de Saacke, 2008)

3 HIPÓTESE

A diferença de fertilidade a campo entre touros normospérmicos das raças Nelore e Angus pode ser explicada por uma diferente relação entre PRM1 e PRM2, encontrando-se diminuída nos touros de baixa fertilidade.

4 OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GERAL

Estabelecer a relação PRM1:PRM2 em touros Nelore (*Bos taurus indicus*) e Angus (*Bos taurus Plataeu*) de alta e de baixa fertilidade

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a resistência da cromatina espermática por SCSA modificado.
- Avaliar a deficiência de protaminação pelo ensaio da Cromomicina A3.
- Determinar a expressão gênica por qPCR absoluto das protaminas 1 e 2; e da proteína de transição 1.
- Calcular a relação entre os transcritos da PRM1 e da PRM2 em espermatozoides bovinos com alta e baixa fertilidade a campo; e entre raças, Nelore e Angus.

5 MATERIAIS E MÉTODOS

O presente estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais sob o registro #6404060519.

5.1 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

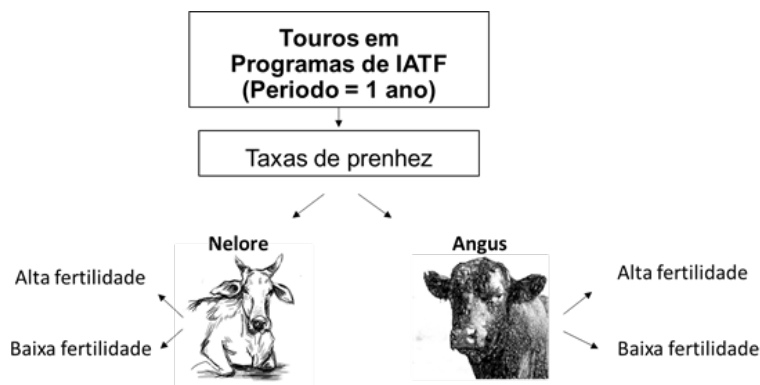
5.1.1 Grupos experimentais

Foram utilizadas palhetas de sêmen criopreservado provenientes da Central de Processamento e Distribuição de Sêmen Bovino CRV Lagoa, de 14 touros da raça Nelore e 20 da raça Angus. Para as análises, cada unidade experimental foi representada por um “pool” de espermatozoides provenientes de 4 partidas de sêmen do mesmo animal apresentando características (motilidade, morfologia e concentração) adequadas para uso comercial.

Todos os touros foram utilizados em um programa chamado Líder IATF. Para tanto, este programa considera a participação de mais de 543 touros reprodutores da raça nelore com mais de 70000 IATFs, para as quais centenas de matrizes com potencial reprodutivo semelhante foram inseminadas em diferentes lotes para reduzir e isolar os fatores do lote, focando só no fator macho. Para o ranqueamento dos touros Angus, foram considerados um total de quase 1000 touros.

A conformação dos grupos de alta e baixa fertilidade foi realizada de acordo com a taxa de prenhez obtida após um ano de avaliação no programa Líder IATF. A partir disto, os melhores touros foram classificados no grupo de alta fertilidade e os de menor taxa para o grupo de baixa fertilidade, a critério da CRV Lagoa (Figura 2).

Figura 2. Representação gráfica dos grupos experimentais.



5.1.2 Análises imediatas

As 4 doses representativas do mesmo touro (1 dose por partida) foram descongeladas utilizando um descongelador eletrônico (Fertilize, Brasil) à 37 °C por 30 segundos.

Após a descongelação, cada palheta foi higienizada com papel toalha com álcool 70% e vertida sutilmente dentro de um tubo de microcentrífuga (1,5 ml) contendo 500 uL de solução Percoll 30%, com a finalidade de remover o diluidor e promover maior recuperação de espermatozoides. Na sequência, as amostras foram lavadas por meio de centrifugação a 6600 x G por 5 minutos. Os sedimentos de cada tubo (aproximadamente 100 uL) foram retirados e colocados em tubo de microcentrífuga contendo 1000 uL de solução PBS e centrifugado duas vezes por 1100 x G por 3 minutos. O sedimento das 4 doses processadas foi alocado conjuntamente em microtubo novo e realizada a concentração espermática utilizando a câmara de Neubauer.

5.2 AVALIAÇÃO DA DEFICIÊNCIA DE PROTAMINAÇÃO

5.2.1 Montagem das lâminas

A deficiência de protaminação dos espermatozoides foi avaliada por meio do corante Cromomicina A3 (CMA3). O CMA3 é um fluorocromo específico para regiões de união citosina-guanina, compete pelos mesmos sítios de ligação da protamina na curvatura menor das fitas do DNA (Bianchi *et al.*, 1996), tendo sido adaptado para sêmen bovino por Simões *et al.* (2009). A coloração dos espermatozoides seguiu o protocolo laboratorial adaptado por Castro *et al.* (2018).

Cerca de 30 milhões de espermatozoides foram utilizados para o preparo da lâmina. Os espermatozoides foram espalhados na lâmina por meio de um esfregaço manual e fixadas com solução Carnoy (3 partes de etanol: 1 parte de ácido acético; Merck, Darmstadt, Germany) à 4° C por 5 minutos.

Após esta etapa, as lâminas foram colocadas em cubeta e submersas em solução PBS sem cálcio e magnésio por 5 minutos. Na sequência, o PBS foi descartado e as lâminas foram novamente submersas e lavadas com água destilada por mais 5 minutos. Depois disto, as lâminas foram deixadas para secar à temperatura ambiente.

A partir deste momento, todos os procedimentos se realizaram no escuro. Cada lâmina foi tratada com 100 uL a solução de uso do corante CMA3 (0,25 mg/ml em tampão McIlvaine (7 ml ácido cítrico 0,1 M + 32,9 ml Na₂HPO₄·7H₂O, 0,2 M, pH 7,0, contendo 10 mM MgCl₂) e cobertas com uma lamínula (24mm x 50 mm) para manter a câmara úmida por 20 minutos. As lamínulas e os excessos da solução foram removidos utilizando água destilada. Em seguida, as lâminas foram tratadas com solução Hoescht (1ug/ml) 33342 por 2 a 5 minutos para visualização e contagem dos espermatozoides totais.

Na sequência, as lâminas foram submersas na cubeta novamente contendo PBS sem cálcio e magnésio para remover a solução anterior, por 5 minutos. Depois de secas, as lâminas foram tratadas com 30 uL de solução 1,4-diazabicyclo(2.2.2)

octane (DABCO) e cobertas com as lamínulas, sendo armazenadas à 4° C, até a leitura.

5.2.2 Leitura e identificação

A leitura das lâminas se realizou 24 horas após a montagem das lâminas. Para tanto, foram consideradas 500 células por lâmina e identificadas pelo microscópio de epifluorescência (Olympus IX80, Olympus Corporation) utilizando a ampliação 200x. A identificação total das células por lâmina foi obtida pela coloração Hoechst (filtros: 460- 490 nm de excitação e 520 nm de emissão) e para a identificação dos espermatozoides positivos à coloração CMA3 (amarelo fluorescente) foi utilizado o filtro 330- 385 nm de excitação e 420 nm de emissão.

5.2.3 Controle positivo

Para a obtenção de uma amostra seminal utilizada como controle positivo, foi preciso remover as proteínas nucleares, resultando em espermatozoides “deprotaminados” e positivos à coloração CMA3. Para esse fim, uma amostra seminal aleatória foi tratada com 5 mM DTT + 0,1 % Triton X-100 por 10 minutos a 37°C e posteriormente lavado com 1mL de PBS sem cálcio (Ca^{+2}) e magnésio (Mg^{+2}) por meio de centrifugação a 200 x G por 10 min. Na sequência, foi montada em lâmina, seguindo o descrito no item 5.2.2.

5.3 ENSAIO DE SUSCEPTIBILIDADE DA CROMATINA ESPERMÁTICA À FRAGMENTAÇÃO DE DNA

O ensaio de susceptibilidade da cromatina espermática à fragmentação de DNA (SCSA modificado) é uma técnica amplamente utilizada para verificar a suscetibilidade e integridade da cromatina espermática. Por meio deste ensaio, as amostras foram expostas a um detergente ácido que desestabiliza as fitas duplas do DNA espermático tornando-as suscetíveis à fragmentação. Para esse fim, as amostras são incubadas com um corante metacromático (laranja de acridina) para

a posterior leitura em citometria de fluxo, no qual a coloração verde confirma a integridade da dupla fita do DNA; no entanto, uma coloração vermelha sugere a presença de uma fita de DNA com possível desnaturação da estrutura da cromatina segundo Boe-Hansen et al. (2005).

O protocolo seguido neste experimento foi realizado conforme descrito por Evenson e Jost (2000) e adaptado por Simões *et al.* (2013). No dia da leitura, cada uma das amostras foi descongelada e centrifugada a 200 x G por 3 minutos para sedimentar os espermatozoides. Na sequência foi retirado o sobrenadante e adicionados 50 uL do buffer TNE (0,01M Tris-HCl, 0,15 M NaCl, 1 mM EDTA, pH 7.4). Em seguida foram adicionados 100 uL do detergente ácido e incubados por 30 segundos. Finalmente, foram adicionados 300 uL do corante laranja de acridina (LA) contendo 6 ug LA/ml de tampão (Sigma, St Louis, MO, EUA).

A validação do SCSA foi realizada de acordo a Castro (2018). Para o controle positivo, foi utilizado um tubo de microcentrífuga contendo detergente ácido (amostra com 100% de fragmentação de DNA) e como controle negativo, uma amostra de sêmen normal com valores próximos a 0% de fragmentação de DNA. Posteriormente, foram feitas as diluições, misturando volumes dos controles positivo e negativo a fim de se obter populações espermáticas com 0%, 25%, 50%, 75% e 100% de DNA fragmentado, após leitura no citômetro de fluxo. Posteriormente, por meio do software FlowJo® v10.2, foi possível obter os gráficos com os diferentes níveis de fragmentação de DNA, obtendo um R² próximo a 1.

A leitura das amostras foi realizada pelo Citômetro de Fluxo EasyCyte (Guava Technologies, Hayward, CA, EUA) com excitação de 488 nm e 15 mW.

5.4 EXPRESSÃO GÊNICA DA PRM1, PRM2 E TNP1

Cerca de 10 milhões de espermatozoides por amostra foram utilizados para essa avaliação. Para manter a integridade do RNA amostral as amostras foram armazenadas em RNA Later Solutions (Life Technologies, Califórnia, EUA) e à -80° C até o momento da extração do RNA.

No dia das extrações, cada amostra foi repetidamente (Mínimo 10 vezes) descongelada e congelada no nitrogênio líquido (-196°C). Na sequência, o RNA foi extraído conforme protocolo descrito por Hamilton et al. (2019). Resumidamente, as

amostras foram incubadas em 1000 μ L de Trizol (Trizol Plus RNA Purification System, Life Technologies, Calif3rnia, EUA) por 15 minutos. Passado esse tempo, foram adicionados 200 μ L de clorof3rmio e incubação por 10 minutos. Conclu3do esse tempo, cada amostra foi centrifugada a 12000 g por 15 minutos à 4° C.

Ap3s a centrifuga3o, a fase aquosa e transparente foi transferida a um novo tubo, sendo adicionados 500 μ L Isopropanol 99,8% e centrifugado novamente a 12000 G por 10 minutos a 4° C. Nesta etapa o sobrenadante foi descartado por invers3o, sendo ent3o adicionado 1000 μ L de etanol 70% e submetido a nova centrifuga3o a 7500 G por 5 minutos a 4° C.

Para obter o sedimento, o sobrenadante foi descartado por invers3o dos tubos. O sedimento de cada amostra foi ent3o ressuspendido em 30 μ L de 3gua livre de RNase/DNase e posteriormente incubadas com enzima DNase para a remo3o do DNA gen3mico. As amostras foram ent3o avaliadas por espectrofotometria (NanoDrop ND-1Spectrophotometer), sendo a pureza (280/260) considerada 3tima no intervalo de 1,9-2,1.

Na sequ3ncia, o DNA complementar (cDNA) foi sintetizado por meio da transcriptase reversa a partir do RNA isolado, utilizou-se o kit comercial Super Script Vilo cDNA Synthesis (Life Technologies, Calif3rnia, EUA). O cDNA obtido foi dilu3do para 4 μ g/mL ap3s quantifica3o em Qubit 2.0 Fluorometer (Qubit dsDNA BR) para que cada rea3o de qPCR obtivesse 10 ng de cDNA.

Os primers para a PRM1, PRM2 e TNP1 foram os mesmos utilizados nos trabalhos de Ferraz et al. (2013) e Hamilton et al. (2019), sendo descritos na Tabela 1.

Considerando que os espermatozoides n3o expressam genes end3genos, foi realizada a quantifica3o absoluta dos genes alvos (PRM1, PRM2 e TNP1) em uma quantidade conhecida de cDNA. Para esse fim, ambas protaminas foram clonados no vetor plasmidial PX330. Ap3s essa etapa, foi feita a dilui3o seriada decimal dos plasm3deos composta por sete pontos, de acordo com a concentra3o do DNA.

Cada amostra foi amplificada em triplicata por qPCR (quantifica3o absoluta) no Mastercycler ep Realplex Thermal Cycler (Eppendorf AG, Hamburg, Germany), utilizando o kit SYBR GreenER qPCR Supermix Universal (Invitrogen). Foram considerados 40 ciclos de amplifica3o, cada um composto por 95°C por 15

segundos e 60°C. A expressão gênica dos genes alvos foi quantificada pela comparação com o número de cópias do gene.

O número de cópias (transcritos) foi calculado baseado na curva de diluição descrita previamente considerando a concentração dos produtos clonados, o tamanho do fragmento (produto) de cada gene (quantidade de pares de bases) e o tamanho do plasmídeo (<http://www.thermoscientificbio.com/webtools/copynumber>), para a quantidade de 10 ng de cDNA por reação de qPCR.

Tabela 1. Descrição das sequências de nucleotídeos utilizados nos primers para os genes PRM1, PRM2 e TNP1

Gene/ Primer	FORWARD	REVERSE
PRM1	AGATACCGATGCTCCTCACC	GCAGCACACTCTCCTCCTG
PMR2	GGTCTACGGGAGGACTCACA	TCCTCCTCCTCCTCATCCTT
TNP1	ATTAAGAGTCAGGGCATGAGG	CTACTCTTCAGGCTGCTCTTCC

Fonte: Adaptado da Simões (2013)

5.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram analisados por meio do programa SAS System for Windows versão 9.3 (SAS Institute, Cary, NC, USA). Os dados foram analisados quanto à normalidade dos resíduos e homogeneidade das variâncias, sendo transformados quando necessário. As variáveis dependentes foram analisadas considerando o efeito de grupo experimental (alta e baixa) e raça (Nelore e Angus) pelo procedimento de ANOVA, como fatorial 2x2, considerando-se o efeito de interação. Foi considerada uma significância de 0,05 para rejeitar a hipótese de nulidade. Os dados foram apresentados como média \pm EPM (erro padrão da média).

6 RESULTADOS

Para todas as análises realizadas foram utilizadas 34 unidades experimentais, representadas pelos diferentes touros, sendo 14 da raça Nelore e 20 da raça Angus. Dentro dos touros Nelore foram considerados 7 unidades experimentais no grupo de alta fertilidade e 7 no grupo de baixa fertilidade; enquanto para os touros Angus, foram considerados 10 unidades experimentais no de alta e 10 unidades no de baixa fertilidade.

6.1 INTERAÇÃO RAÇA E GRUPOS DE FERTILIDADE

Não foram observadas diferenças para efeito de interação para a porcentagem de espermatozoides com deficiência de protaminação (espermatozoides positivos para CMA3); porcentagem de espermatozoides com susceptibilidade à fragmentação do DNA espermático (espermatozoides positivos para o ensaio SCSA modificado) e para quantificação dos transcritos da PRM1, PRM2 e TNP1 entre os grupos experimentais (alta e baixa fertilidade) dentro de cada raça, como descrito na Tabela 2.

Tabela 2. Porcentagem de espermatozoides positivos para o CMA3; porcentagem de espermatozoides positivos para o SCSA modificado; e número de cópias dos transcritos para PRM1, PRM2 e TNP1 para efeito de interação raça (Nelore e Angus) e fertilidade (Alta e Baixa Fertilidade); e valores probabilidade (p).

INTERAÇÃO			
<i>CMA3 (% Células com deficiência de protaminação)</i>			
RACAS/FERT	ALTA FERTILIDADE	BAIXA FERTILIDADE	<i>p</i>
NELORE	0,255 ± 0,057	0,323 ± 0,077	0,4981
ANGUS	0,052 ± 0,030	0,101 ± 0,021	0,63
<i>SCSA modificado (% Células susceptíveis à fragmentação de DNA)</i>			
NELORE	0,055 ± 0,024	0,622 ± 0,585	0,4334
ANGUS	1,902 ± 0,283	1,599 ± 0,243	0,42
<i>PRM1 (transcritos em 10 ng de cDNA)</i>			
NELORE	1,196 ± 0,605	0,776 ± 0,546	0,6157
ANGUS	0,054 ± 0,019	0,0502 ± 0,016	0,87
<i>PRM2 (transcritos em 10 ng de cDNA)</i>			
NELORE	0,095 ± 0,072	0,052 ± 0,029	0,5937
ANGUS	0,015 ± 0,003	0,008 ± 0,006	0,09
<i>TNP1 (transcritos em 10 ng de cDNA)</i>			
NELORE	1,158 ± 0,552	0,977 ± 0,8925	0,863
ANGUS	0,816 ± 0,1218	0,9052 ± 0,192	0,699

Fonte: Nagaki (2021)

6.2 EFEITO RAÇA

Uma vez que não houve efeito de interação, foi considerado nesse tópico a avaliação dos resultados para o efeito raça (Nelore e Angus).

Para essa avaliação foi considerado agrupar os animais (n) de acordo com a raça do touro, independentemente do nível de fertilidade, totalizando 14 touros Nelore e 20 touros Angus. Esse agrupamento está apresentado na Tabela 3 e na Figura 3.

Dentro das análises consideradas, os touros da raça Nelore apresentaram maior quantidade de espermatozoides positivos para o CMA3, quando comparado aos da raça Angus, **0,26 ± 0,03 %** e **0,078 ± 0,02 %**, respectivamente ($p < 0,0001$).

Quanto a susceptibilidade à fragmentação do DNA espermático, os touros da raça Nelore apresentaram menor porcentagem de espermatozoides susceptíveis à

fragmentação do DNA espermático quando comparado aos da raça Angus, **0,34 ±0,29 % e 1,75 ± 0,18 %**, respectivamente ($p= 0,0002$).

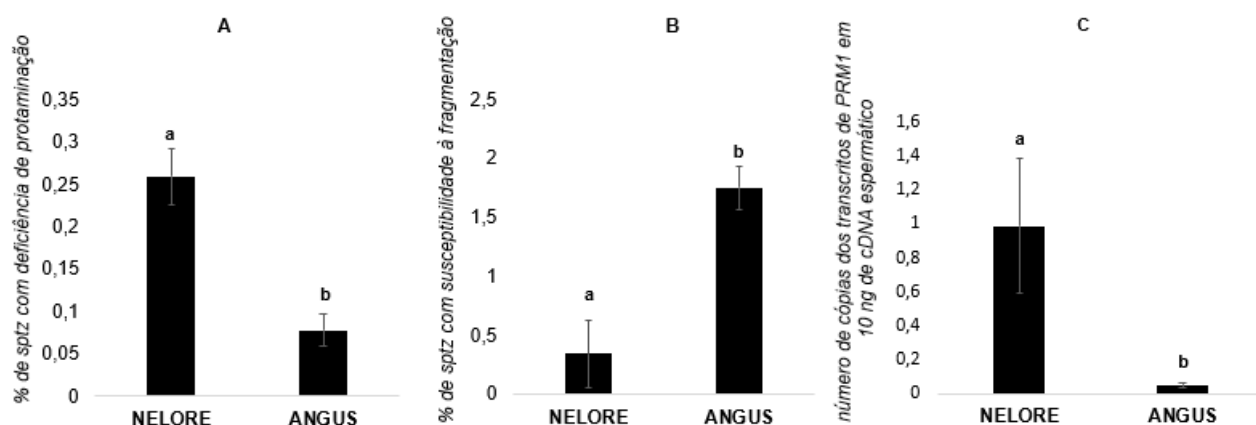
Em relação aos transcritos da PRM1, PRM2 e TNP1, os espermatozoides dos touros Nelore apresentaram maior número de cópias dos transcritos da PRM1 em comparação aos Angus, sendo **0,99 ±0,40 e 0,05 ± 0,01**, respetivamente ($p = 0,0409$). No entanto, não foram observadas diferenças entre as raças para os transcritos de PRM2 e TNP1.

Tabela 3. Porcentagem de espermatozoides positivos para o CMA3; Porcentagem de espermatozoides positivos para o SCSA modificado; e número de cópias dos transcritos para PRM1, PRM2 e TNP1 em 10 ng de cDNA entre as raças Nelore e Angus; e valores probabilidade (p).

EFEITO RAÇA			
	NELORE	ANGUS	p
CMA3 (%)	0,259 ±0,033 ^a	0,078 ±0,019 ^b	<0,0001
SCSA (%)	0,338 ±0,292 ^a	1,7505±0,185 ^b	0,0002
PRM1	0,986±0,396 ^a	0,052±0,012 ^b	0,0409
PRM2	0,073±0,037	0,012±0,002	0,3922
TNP1	0,8612±0,262	0,892±0,629	0,8625

Nagaki (2021)

Figura 3. Porcentagem de espermatozoides com deficiência de protaminação pela técnica CMA3 (A); Porcentagem de espermatozoides susceptíveis à fragmentação de DNA pela técnica SCSA modificado (B); e número de cópias dos transcritos para PRM1 (C) entre as raças Nelore e Angus. Letras diferentes indicam diferença significativa.



Nagaki (2021)

6.2.1 Relação entre transcritos (PRM1 e PRM2)

Por meio da quantificação dos transcritos de PRM1 e PRM2, foi calculado a relação PRM1:PRM2 nos grupos experimentais (alta e baixa fertilidade) e nas raças utilizadas nesse experimento (Nelore e Angus).

6.2.1.1 Nelore

Foi estabelecido uma relação entre a quantificação dos transcritos da PRM1 e PRM2 para os grupos alta e baixa fertilidade na raça Nelore. Os touros de raça Nelore de alta fertilidade apresentaram uma relação PRM1:PRM2 de 1:0,079, e os de baixa fertilidade uma relação de 1:0,0675 (Tabela 4).

Tabela 4. Número de cópias dos transcritos obtidos para PRM1 e PRM2 em 10 ng de cDNA espermático proveniente de touros da raça Nelore nos grupos alta e baixa fertilidade; valores de probabilidade (p).

Variável	ALTA	BAIXA	p
PRM1	1,19 ± 0,6	0,77 ± 0,54	0,6157
PRM2	0,094 ± 0,07	0,052 ± 0,02	0,5937
PRM1: PRM2	1 : 0,079	1 : 0,0675	

Nagaki (2021)

6.2.1.2 Angus

Foi estabelecido uma relação entre a quantificação dos transcritos da PRM1 e PRM2 para os grupos alta e baixa fertilidade na raça Angus.

Os touros de raça Angus de alta fertilidade apresentaram uma relação PRM1:PRM2 de 1:0,27; e os de baixa fertilidade uma relação de 1:0,16 (Tabela 5)

Tabela 5. Número de cópias dos transcritos obtidos para PRM1 e PRM2 em 10 ng de cDNA espermático proveniente de touros da raça Angus nos grupos alta e baixa fertilidade; valores de probabilidade (p).

Variável	ALTA	BAIXA	p
PRM1	0,054 ± 0,018	0,05 ± 0,016	0,8785
PRM2	0,015 ± 0,003	0,008 ± 0,0005	0,0894
PRM1: PRM2	1 : 0,27	1 : 0,16	

Nagaki (2021)

6.2.1.3 Nelore vs Angus

Foi observada maior número de cópias dos transcritos de PRM1 na raça Nelore comparada à raça Angus ($0,986 \pm 0,396$ e $0,052 \pm 0,012$; respectivamente) (Tabela 6; Figura 4).

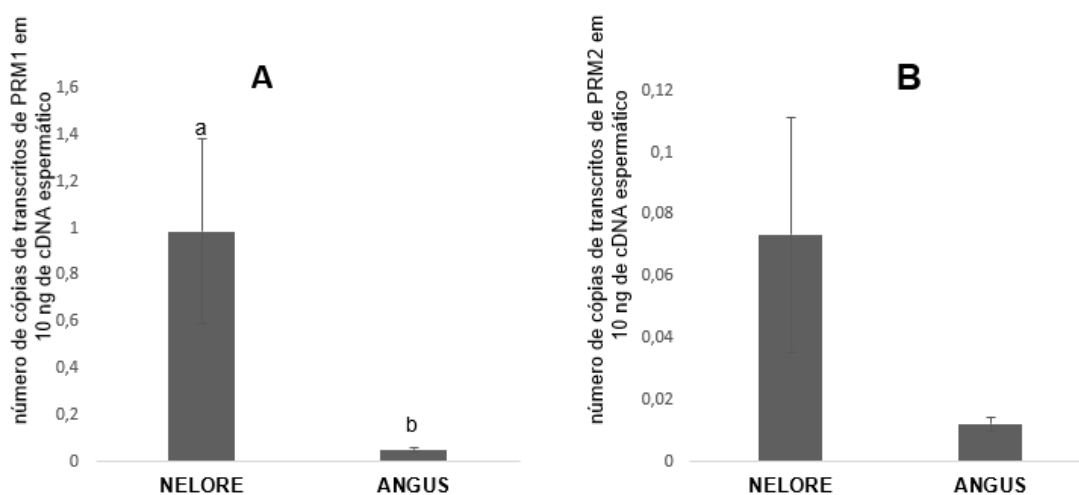
Foi realizado o cálculo da relação PRM1: PRM2 para os touros Nelore e Angus. Para os touros Nelore, a relação foi de 1:0,074 e para os Angus, de 1:0,23.

Tabela 6. Número de cópias dos transcritos obtidos para PRM1 e PRM2 nos espermatozoides provenientes de touros da raça Nelore e Angus, independente dos grupos alta e baixa fertilidade; valores de probabilidade (p).

Raças/ Variável	Nelore	Angus	p
PRM 1	$0,986 \pm 0,396^a$	$0,052 \pm 0,012^b$	0,0409
PRM 2	$0,073 \pm 0,038$	$0,0123 \pm 0,002$	0,3922
PRM1:PRM2	1: 0,074	1:0,23	

Nagaki (2021)

Figura 4. Número de cópias dos transcritos obtidos para PRM1 (A) e PRM2 (B) nos espermatozoides provenientes de touros da raça Nelore e Angus, independente dos grupos alta e baixa fertilidade. Letras diferentes indicam diferença significativa.



Nagaki (2021)

6.3 EFEITO FERTILIDADE

Uma vez que não houve efeito de interação, foi considerado nesse tópico a avaliação dos resultados para o efeito de grupos de fertilidade (alta e baixa fertilidade).

Os resultados foram agrupados de acordo com o nível de fertilidade, totalizando 17 unidades experimentais em cada grupo (alta e baixa fertilidade). No entanto, não foram encontradas diferenças significativas na comparação de grupos em todas as análises consideradas (tabela 7).

Tabela 7. Porcentagem de espermatozoides com deficiência de protaminação pela técnica CMA3; Porcentagem de espermatozoides susceptíveis à fragmentação de DNA pela técnica SCSA; e número de cópias dos transcritos para PRM1, PRM2 e TNP1 em 10 ng de cDNA entre os grupos alta e baixa fertilidade; e valores probabilidade (*p*)

EFEITO NIVEL FERTILIDADE			
	ALTA	BAIXA	<i>p</i>
CMA3 (%)	0,141 ±0,157	0,168 ±0,116	0,4645
SCSA modificado (%)	1,14 ± 1,15	1,2 ±1,22	0,8663
PRM1	0,625 ± 1,25	0,349 ±0,96	0,5733
PRM2	0,0579 ±0,142	0,0362 ±0,0635	0,4109
TNP1	0,913± 0,640	0,922 ± 0,822	0,8110

Nagaki (2021)

7 DISCUSSÃO

A escolha dos touros nos programas de reprodução para fins comerciais, depende principalmente da carga genética e das características fenotípicas desejadas. Na sequência, essa escolha deve ser embasada na aptidão reprodutiva demonstrada por meio das análises seminais realizadas nas centrais de reprodução. Embora a grande maioria dos touros seja aprovado nessas avaliações e sejam considerados como normospérmicos, ainda apresentam taxas de prenhez irregulares. Diante disso, conclui-se que as análises seminais realizadas rotineiramente (motilidade, concentração e morfologia) não são capazes de

comprovar a real capacidade fecundante dos espermatozoides; ou então que existam outras características, de correlação negativa com a fertilidade que possam mascarar os resultados. O fato é que há uma grande oportunidade para o estudo de avaliações complementares da aptidão reprodutiva de touros (THUNDATHIL; DANCE; KASTELIC, 2016; UTT, 2016).

Dentro dos modelo-biológicos utilizados na pesquisa andrológica, encontram-se os espermatozoides humanos pela alta casuística de infertilidade nas clínicas de reprodução assistida; e os espermatozoides murinos, pela facilidade no manejo laboratorial. Nestas duas espécies, verificou-se que existe uma correlação positiva entre alterações na composição da cromatina espermática e maiores índices de fragmentação do DNA espermático refletindo numa fertilidade diminuída (AOKI et al., 2005, 2006b; OLIVA, 2006). Contudo, na espécie bovina, a relação entre a cromatina espermática e a fertilidade ainda é pouco esclarecida.

Um desafio na produção bovina é a dificuldade para predizer ou avaliar a fertilidade real dos animais utilizados comercialmente. Além disto, as pesquisas recentes apontam diferenças no rendimento reprodutivo nas raças bovinas devido à mecanismos adaptativos, portanto, comparar o estado da cromatina por meio da protaminação entre touros Nelore e Angus foi também objeto de estudo deste trabalho; uma vez que é um processo fisiológico importante para a proteção da cromatina espermática (STEGER; BALHORN, 2018).

Para verificar o status da protaminação, o fluorocromo CMA3 é considerado como primeira análise, nesta o corante intercala-se em regiões onde deveriam existir ligações com as protaminas na cromatina espermática (SAKKAS et al., 1996). Nos espermatozoides humanos, a utilização do CMA3 permitiu verificar uma grande “variedade” de deficiência de protaminação entre indivíduos normospermicos (ZANDEMAMI et al., 2012). Mesmo que a avaliação seminal humana considere vários atributos em conjunto, existe uma correlação negativa entre as deficiências de protaminação e o resultado positivo das técnicas *in vitro* (MARCHIANI et al., 2017). Embora existam dados robustos sobre a protaminação e fertilidade em humanos, os mecanismos ainda são pouco elucidados. Com o intuito de avaliar também a protaminação nos espermatozoides bovinos, usamos o protocolo do CMA3 adaptado pela Simões et al. (2009). Não foi observada alterações de protaminação entre os grupos experimentais (alta e baixa) para as raças testadas

(Nelore e Angus); diferente do observado por Castro et al. (2018), que verificaram maior deficiência de protaminação em touros com alta fertilidade *in vitro*. A diferença de resultados entre os estudos pode ser atribuída ao ambiente *in vitro* que é muito mais controlado, com menos variáveis que podem influenciar as primeiras fases do desenvolvimento embrionário; já no ambiente *in vivo*, os espermatozoides podem ser alvo de diversos fatores ao longo do trato reprodutivo feminino, assim como outros fatores fisiológicos não controlados. Diante disso, as condições ambientais *in vivo vs in vitro*) nos quais os espermatozoides se desenvolvem, criaria diferenças na aptidão reprodutiva dos espermatozoides. Na sequência, foi observado que os espermatozoides dos touros Nelore apresentam maiores deficiências de protaminação quando comparado aos touros Angus. No entanto, os valores observados para as duas raças foram menores aos relatados previamente em espermatozoides de touros considerados normospérmicos (BOE-HANSEN; FORTES; SATAKE, 2018; FORTES et al., 2014). Estes resultados poderiam ser consequência da maior rusticidade e protaminação mais conservada dos touros criados no Brasil comparado aos touros criados em outros trópicos. As deficiências de protaminação observadas na espécie bovina são baixas (BOE-HANSEN; FORTES; SATAKE, 2018; CASTRO et al., 2018; FORTES et al., 2014; SIMÕES et al., 2009), em comparação aos espermatozoides humanos (ZANDEMAMI et al., 2012); o que sugere que os níveis de protaminação e o grau de amadurecimento da cromatina espermática podem ser específicos para cada espécie. Fisiologicamente, a função das protaminas é compactar o DNA para protegê-lo e preservar a informação paterna, portanto, espécies com protaminação conservada deveriam apresentar menor suscetibilidade à fragmentação do DNA.

Para verificar a susceptibilidade à fragmentação de DNA dos espermatozoides bovinos foi empregado o ensaio SCSA modificado, que apresenta uma correlação positiva com infertilidade em humanos (EVENSON et al., 2020). Não foi observada diferenças na susceptibilidade à fragmentação de DNA dos espermatozoides bovinos nos grupos de alta e baixa fertilidade. Esses resultados diferem de autores que encontraram maiores porcentagens de espermatozoides susceptíveis à fragmentação de DNA em touros de baixa fertilidade (DOGAN et al., 2015; KUMARESAN et al., 2017). Como foi mencionado anteriormente, cada touro foi representado por um *pool* de 4 partidas. Apesar de serem da mesma Central de

Processamento de Sêmen, foi observado que algumas partidas, em ambos grupos (alta e baixa fertilidade), possuíam data de colheita de sêmen ao longo do ano, podendo ter havido um possível efeito das condições ambientais (algumas colheitas realizadas no verão) que estariam diversificando as características do pool para cada touro independente do grupo de fertilidade.

Ao avaliar o efeito raça, foi observado que touros da raça Angus apresentaram maior porcentagem de espermatozoides susceptíveis à fragmentação de DNA quando comparados aos Nelore. Sendo essa a primeira vez em que se relata diferenças nos índices de fragmentação da cromatina espermática entre raças de mesmo propósito (produção de carne); uma vez que já foi relatado entre raças de diferente propósito (carne versus leite) (MORRELL et al., 2018). Foi verificado também no presente estudo, que independente da raça, a porcentagem de espermatozoides bovinos susceptíveis à fragmentação de DNA é menor que 2%. Segundo Karoui et al. (2012), valores acima de 7% já refletem negativamente sobre as taxas de prenhez, portanto valores observados neste trabalho não seriam suficientes para explicar a diferença de fertilidade entre os touros. A baixa porcentagem de células espermáticas bovinas susceptíveis à fragmentação de DNA parece ser uma característica da espécie (EVENSON et al., 2020 e SIMÕES et al., 2009).

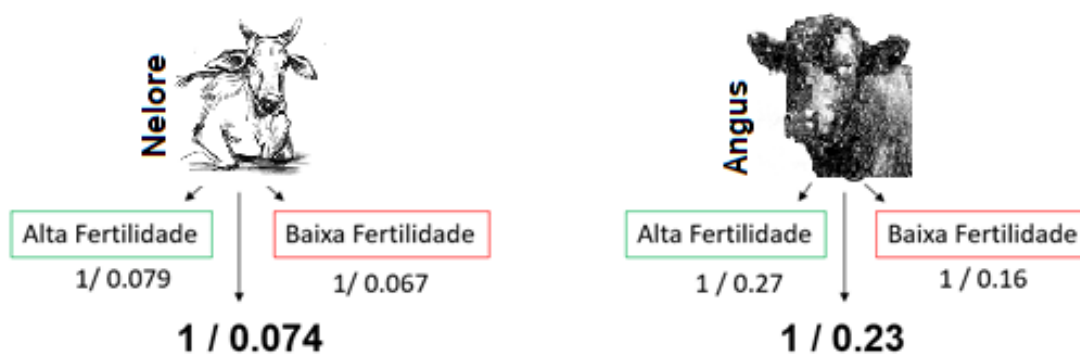
A protaminação do espermatozoide bovino parece ser quase totalmente atribuída à PRM1, portanto a compactação aconteceria de maneira mais conservada nessa espécie (FERRAZ et al., 2013; HAMILTON et al., 2019). A relação entre PRM1:PRM2 em humanos é considerada um biomarcador de fertilidade, já que alterações na proporção ideal (1:1) possuem correlação positiva com fragmentação de DNA, resultando em infertilidade clínica (AOKI et al., 2006b; ISHCHUK et al., 2021). A utilização do qPCR em espermatozoides bovinos para a detecção de protaminas foi previamente validado no nosso grupo de pesquisa, cuja utilidade foi demonstrada no primeiro trabalho que identificou a PRM2 em espermatozoides maduros e em tecido testicular de touros sem considerar o nível de fertilidade (HAMILTON et al. 2019). Esperava-se, no presente estudo, encontrar diferenças na quantificação absoluta dos genes (TNP1, PRM1 e PRM2) entre os grupos de alta e baixa fertilidade dentro de cada raça, o qual não foi confirmada. No entanto, os touros Nelore apresentaram porcentagens maiores de espermatozoides

com deficiências de protaminação e maior número de cópias transcritos da PRM1 comparado aos Angus. Apesar de possuir mais transcritos de PRM1 nos espermatozoides, os resultados demonstraram que, aparentemente, a expressão da PRM1 não reflete sobre o nível de fertilidade e sobre as deficiências de protaminação detectadas pelo CMA3, coincidindo com o relatado por Bernecic et al. (2020).

A expressão da PRM2 nos espermatozoides foi mais baixa em comparação à PRM1 para ambas as raças estudadas nesse trabalho. Dentro da espécie bovina, as raças apresentam diversas características fenotípicas e fisiológicas adaptativas, portanto, sugere-se que a rusticidade reprodutiva dos touros Nelore poderia estar relacionada com uma melhor compactação do DNA espermático devido a maior transcrição da protamina funcional (PRM1), em comparação aos espermatozoides dos touros Angus. Em conjunto, a espécie bovina apresenta uma protaminação mais conservada com o predomínio da PRM1, em contraste às espécies que possuem maior quantidade de PRM2 funcional, cuja incidência de alterações na PRM1:PRM2 é mais frequente e principalmente atribuída à deficiência de PRM2 (AMOR et al., 2018; AOKI et al., 2006a; SCHNEIDER et al., 2020). Embora não tenha sido possível estabelecer uma relação “ideal” de PRM1: PRM2 em bovinos como em outras espécies (humanos, murinos e equinos), estas novas informações podem servir como base para estudos funcionais da protaminação em bovinos (CARRELL; EMERY; HAMMOUD, 2007; LÜKE et al., 2014b). Ademais, a PRM2 parece ser mais suscetível à reguladores de transcrição e alterações. Contudo, bovinos poderiam apresentar menor porcentagem de espermatozoides com deficiências de protaminação, e conseqüentemente menor porcentagem de células susceptíveis à fragmentação de DNA por apresentarem baixa expressão da PRM2.

Embora não tenham sido encontradas diferenças significativas entre fertilidade e entre raças; este é o primeiro trabalho que relata a relação PRM1:PRM2 na espécie bovina (Resumo apresentado na Figura 5).

Figura 5.- Relação PRM1: PRM2 para cada grupo experimental em touros Nelore e Angus



Nagaki (2021)

8 CONCLUSÕES

1. Touros da raça Nelore e Angus, quando agrupados quanto à alta e baixa fertilidade não apresentaram espermatozoides com diferenças na deficiência de protaminação, na susceptibilidade à fragmentação de DNA e na expressão dos transcritos de PRM1, PRM2 e TNP1
2. Touros da raça Nelore possuem espermatozoides mais susceptíveis à deficiência de protaminação, menos susceptíveis à fragmentação de DNA e com maior expressão dos transcritos de PRM1; o que determinou uma relação PRM1:PRM2 diferencial comparado aos touros da raça Angus.

REFERÊNCIAS

- ABDOLLAHI-ARPANAHI, R.; MOROTA, G.; PEÑAGARICANO, F. Predicting bull fertility using genomic data and biological information. **Journal of Dairy Science**, v. 100, n. 12, p. 9656–9666, 2017.
- ALVES, J. D. et al. Impact of COVID-19 on the indigenous population of Brazil: A geo-epidemiological study. **Epidemiology and Infection**, 2021.
- AMANN, R. P. Reproductive capacity of dairy bulls. IV. Spermatogenesis and testicular germ cell degeneration. **The American journal of anatomy**, v. 110, p. 69–78, jan. 1962.
- AMANN, R. P.; DEJARNETTE, J. M. Impact of genomic selection of AI dairy sires on their likely utilization and methods to estimate fertility: A paradigm shift. **Theriogenology**, v. 77, n. 5, p. 795–817, 2012.
- AMOR, H. et al. Protamine ratio as predictor of the fertility potential of sperm by couple undergoing ICSI. **International Journal of Women's Health and Reproduction Sciences**, v. 6, n. 4, p. 400–409, 2018.
- AOKI, V. W. et al. DNA integrity is compromised in protamine-deficient human sperm. **Journal of Andrology**, v. 26, n. 6, p. 741–748, 2005.
- AOKI, V. W. et al. 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, 2006a.
- AOKI, V. W. et al. Sperm protamine 1/protamine 2 ratios are related to in vitro fertilization pregnancy rates and predictive of fertilization ability. **Fertility and Sterility**, v. 86, n. 5, p. 1408–1415, 2006b.
- ASHRAFZADEH, A.; NATHAN, S.; KARSANI, S. A. Comparative analysis of mafriwal (*Bos taurus* × *Bos indicus*) and Kedah Kelantan (*Bos indicus*) sperm proteome identifies sperm proteins potentially responsible for higher fertility in a tropical climate. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 14, n. 8, p. 15860–15877, 2013.
- AUSIO, J.; ZHANG, Y.; ISHIBASHI, T. **Histone Variants and Posttranslational Modifications in Spermatogenesis and Infertility**. [s.l.] Elsevier Inc., 2016.
- BALHORN, R. The protamine family of sperm nuclear proteins. **Genome Biology**, v. 8, n. 9, 2007.
- BALHORN, R. et al. New monoclonal antibodies specific for mammalian protamines P1 and P2. **Systems Biology in Reproductive Medicine**, v. 64, n. 6, p. 424–447, 2018.
- BAO, J.; BEDFORD, M. T. Epigenetic regulation of the histone-to-protamine transition during spermiogenesis. **Reproduction**, v. 151, n. 5, p. R55–R70, maio 2016.

BARUSELLI, P. . Mercado da IATF cresce 30 % em 2020 e supera 21 milhões de procedimentos. v. 5, p. 2, 2021.

BELETTI, M. E.; COSTA, L. DA F.; GUARDIEIRO, M. M. Morphometric features and chromatin condensation abnormalities evaluated by toluidine blue staining in bull spermatozoa. **Braz. j. morphol. sci**, n. January, p. 85–90, 2005.

BERNECIC, N. et al. Protamine 1 as a potential biomarker of bull fertility. **Animal Reproduction Science**, v. 220, n. 2020, p. 106429, 2020.

BIANCHI, P. G. et al. Chromatin packaging and morphology in ejaculated human spermatozoa: Evidence of hidden anomalies in normal spermatozoa. **Molecular Human Reproduction**, v. 2, n. 3, p. 139–144, 1996.

BLENDY, J. A. et al. Severe impairment of spermatogenesis in mice lacking the CREM gene. **Nature**, v. 380, n. 6570, p. 162–165, 1996.

BOE-HANSEN, G. B.; FORTES, M. R. S.; SATAKE, N. Morphological defects, sperm DNA integrity, and protamination of bovine spermatozoa. **Andrology**, v. 6, n. 4, p. 627–633, 2018.

BUTLER, M. L. et al. Selection for bull fertility: A review. **Translational Animal Science**, v. 4, n. 1, p. 423–441, 2020.

CAMP, S. D. VAN. COMMON CAUSES OF INFERTILITY IN THE BULL. v. 13, n. 2, p. 203–231, 1997.

CARLI, G. DE et al. Morfologia espermática de touros: interpretação e impacto na fertilidade. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 39, n. 1, p. 47–60, 2015.

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. 313–327, 2007.

CASTRO, L. S. et al. Effect of bovine sperm chromatin integrity evaluated using three different methods on in vitro fertility. **Theriogenology**, v. 107, p. 142–148, 2018.

CHENOWETH, P. J. et al. Guidelines for using the bull breeding soundness evaluation form. **Clinical Theriogenology**, v. 2, n. 1, p. 43–50, 2010.

CNA E CEPEA. PIB do agronegocio. 2021.

DEJARNETTE, J. M. et al. Sustaining the fertility of artificially inseminated dairy cattle: The role of the artificial insemination industry. **Journal of Dairy Science**, v. 87, n. SUPPL. 1, p. E93–E104, 2004.

DOGAN, S. et al. Sperm Protamine-Status Correlates to the Fertility of Breeding Bulls¹. **Biology of Reproduction**, v. 92, n. 4, p. 1–9, 2015.

ERENPREISS, J. et al. Sperm chromatin structure and male fertility: Biological and clinical aspects. **Asian Journal of Andrology**, v. 8, n. 1, p. 11–29, 2006.

- EVENSON, D. P. The Sperm Chromatin Structure Assay (SCSA®) and other sperm DNA fragmentation tests for evaluation of sperm nuclear DNA integrity as related to fertility. **Animal Reproduction Science**, v. 169, p. 56–75, 2016.
- EVENSON, D. P. et al. Relationships between the age of 25,445 men attending infertility clinics and sperm chromatin structure assay (SCSA®) defined sperm DNA and chromatin integrity. **Fertility and Sterility**, v. 114, n. 2, p. 311–320, 2020.
- FAIR, S.; LONERGAN, P. Review: Understanding the causes of variation in reproductive wastage among bulls. **Animal**, v. 12, n. s1, p. s53–s62, 2018.
- FATEHI, A. N. et al. 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, 1 mar. 2006.
- FERRAZ, M. A. M. M. et al. 212 Gene Expression Profile of Protamines and Transition Nuclear Proteins in Bovine Testis. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 25, n. 1, p. 254, 2013.
- FILHO, R. M.; BELETTI, M. E.; DE OLIVEIRA, F. Ultrastructure of bovine sperm chromatin. **Microscopy Research and Technique**, v. 78, n. 12, p. 1117–1120, 2015.
- FORTES, M. R. S. et al. Sperm protamine deficiency correlates with sperm DNA damage in *Bos indicus* bulls. **Andrology**, v. 2, n. 3, p. 370–378, 2014.
- GAO, Y. et al. Vitamin E can promote spermatogenesis by regulating the expression of proteins associated with the plasma membranes and protamine biosynthesis. **Gene**, v. 773, n. 2, p. 145364, 2021.
- GUIMARÃES, A. S. B. et al. In vitro performance of Zebu (*Bos indicus*) and Taurus (*Bos taurus*) donor cow embryos. **Revista Brasileira de Saude e Producao Animal**, v. 21, p. 1–11, 2020.
- HAMILTON, T. R. D. S. et al. Effect of heat stress on sperm DNA: Protamine assessment in ram spermatozoa and testicle. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2018, 2018.
- HAMILTON, T. R. S. et al. Detection of protamine 2 in bovine spermatozoa and testicles. **Andrology**, n. 2006, p. 1–9, 2019.
- HAMMOUD, S. et al. Identification of genetic variation in the 5' and 3' non-coding regions of the protamine genes in patients with protamine deregulation. **Archives of Andrology**, v. 53, n. 5, p. 267–274, 2007.
- HANSEN, P. J. Physiological and cellular adaptations of zebu cattle to thermal stress. **Animal Reproduction Science**, v. 82–83, p. 349–360, 2004.
- HANSEN, P. J. **Effects of Environment on Bovine Reproduction**. Second Edition. [s.l.] Elsevier Inc., 2006.
- HIRAIWA, S. H. et al. Classification of the sperm chromatin compaction alterations in bulls (*Bos taurus*) and its correlation with the efficiency of the in vitro production of embryos. **Bioscience Journal**, v. 37, n. Oliva 2006, p. 1–10, 2021.

- ISHCHUK, M. A. et al. Protamine 1 and 2 mRNA Abundance in Human Spermatozoa and Its Relation to Semen Quality and Sperm DNA Fragmentation among Fertility Clinic Patients. **Russian Journal of Genetics**, v. 57, n. 2, p. 213–220, 22 fev. 2021.
- KASTELIC, J. P. Male involvement in fertility and factors affecting semen quality in bulls. **Animal Frontiers**, v. 3, n. 4, p. 20–25, 2013.
- KREMLING, H. et al. The bovine protamine 2 gene: Evidence for alternative splicing. **BBA - Gene Structure and Expression**, v. 1132, n. 2, p. 133–139, 1992.
- KUMARESAN, A. et al. Sperm viability, reactive oxygen species, and DNA fragmentation index combined can discriminate between above- and below-average fertility bulls. **Journal of Dairy Science**, v. 100, n. 7, p. 5824–5836, 2017.
- LEE, K.; FAJARDO, M. A.; BRAUN, R. E. A testis cytoplasmic RNA-binding protein that has the properties of a translational repressor. **Molecular and Cellular Biology**, v. 16, n. 6, p. 3023–3034, 1996.
- LOTTA, G. S. et al. The impact of the Covid-19 pandemic on the performance of street level bureaucrats in Brazil. **Revista Brasileira de Ciência Política**, n. 35, p. 1–36, 2021.
- LÜKE, L. et al. Sexual selection on protamine and transition nuclear protein expression in mouse species. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 281, n. 1783, 2014a.
- LÜKE, L. et al. Evolution of protamine genes and changes in sperm head phenotype in rodents. **Biology of Reproduction**, v. 90, n. 3, p. 1–8, 2014b.
- MARCHIANI, S. et al. Chromatin Protamination and Catsper Expression in Spermatozoa Predict Clinical Outcomes after Assisted Reproduction Programs. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 1–12, 2017.
- MCLAY, D. W.; CLARKE, H. J. Remodelling the paternal chromatin at fertilization in mammals. **Reproduction**, v. 125, n. 5, p. 625–633, 2003.
- MEISTRICH, M. L. et al. Roles of transition nuclear proteins in spermiogenesis. **Chromosoma**, v. 111, n. 8, p. 483–488, 2003.
- MENEGASSI, S. R. O. et al. Bioeconomic impact of bull breeding soundness examination in cow-calf systems. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 40, n. 2, p. 441–447, 2011.
- MONTEIRO, F. M. et al. Resistance of embryos from *Bos indicus* cattle during early stages of in vitro development to heat shock compared to embryos crossbred from crossbred cattle. **Animal Reproduction (Belo Horizonte)**, v. 4, n. 1/2, p. 51–58, 2007.
- MORRELL, J. M. et al. Sperm quality in frozen beef and dairy bull semen. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v. 60, n. 1, p. 1–10, 2018.
- NI, K. et al. The impact of sperm protamine deficiency and sperm DNA damage on human male fertility: a systematic review and meta-analysis. **Andrology**, v. 4, n. 5,

p. 789–799, 2016.

OLIVA, R. Protamines and male infertility. **Human Reproduction Update**, v. 12, n. 4, p. 417–435, 2006.

OLIVERA, M. et al. El espermatozoide, desde la eyaculación hasta la fertilización. **Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias**, v. 19, n. 4, p. 426–436, 2006.

PERRY, V. E. A. The Role of Sperm Morphology Standards in the Laboratory Assessment of Bull Fertility in Australia. **Frontiers in Veterinary Science**, v. 8, n. May, p. 1–9, 2021.

RATHKE, C. et al. Chromatin dynamics during spermiogenesis. **Biochimica et Biophysica Acta - Gene Regulatory Mechanisms**, v. 1839, n. 3, p. 155–168, 2014a.

RATHKE, C. et al. Chromatin dynamics during spermiogenesis. **Biochimica et Biophysica Acta - Gene Regulatory Mechanisms**, v. 1839, n. 3, p. 155–168, 2014b.

RAVEL, C. et al. Mutations in the protamine 1 gene associated with male infertility. **Molecular Human Reproduction**, v. 13, n. 7, p. 461–464, 2007.

SAACKE, R. G. et al. Can spermatozoa with abnormal heads gain access to the ovum in artificially inseminated super- and single-ovulating cattle? **Theriogenology**, v. 50, n. 1, p. 117–128, 1998.

SAACKE, R. G. et al. Relationship of seminal traits and insemination time to fertilization rate and embryo quality. **Animal Reproduction Science**, v. 60–61, p. 663–677, 2000.

SAACKE, R. G. Sperm morphology : Its relevance to compensable and uncompensable traits in semen. v. 70, p. 473–478, 2008.

SAKKAS, D. et al. Relationship between the presence of endogenous nicks and sperm chromatin packaging in maturing and fertilizing mouse spermatozoa. **Biology of Reproduction**, v. 52, n. 5, p. 1149–1155, 1995.

SAKKAS, D. et al. Sperm chromatin anomalies can influence decondensation after intracytoplasmic sperm injection. **Human Reproduction**, v. 11, n. 4, p. 837–843, 1996.

SCHNEIDER, S. et al. Re-visiting the Protamine-2 locus: Deletion, but not haploinsufficiency, renders male mice infertile. **Scientific Reports**, v. 6, n. October, p. 1–13, 2016.

SCHNEIDER, S. et al. Prm2 deficiency triggers a Reactive Oxygen Species (ROS) -mediated destruction cascade during epididymal sperm maturation in mice. p. 1–27, 2020.

SELLEM, E. et al. Use of combinations of in vitro quality assessments to predict fertility of bovine semen. **Theriogenology**, v. 84, n. 9, p. 1447- 1454.e5, 2015.

SIMÕES, R. et al. Use of chromomycin A3 staining in bovine sperm cells for

detection of protamine deficiency. **Biotechnic and Histochemistry**, v. 84, n. 3, p. 79–83, 2009.

SOLER-VENTURA, A. et al. Characterization of Human Sperm Protamine Proteoforms through a Combination of Top-Down and Bottom-Up Mass Spectrometry Approaches. **Journal of Proteome Research**, v. 19, n. 1, p. 221–237, 2020.

SOUZA, E. T. et al. Sperm chromatin alterations in fertile and subfertile bulls. **Reproductive Biology**, v. 18, n. 2, p. 177–181, 2018.

STAUB, C.; JOHNSON, L. Review: Spermatogenesis in the bull. **Animal**, v. 12, n. s1, p. s27–s35, 2018.

STEGER, K.; BALHORN, R. Sperm nuclear protamines: A checkpoint to control sperm chromatin quality. **Journal of Veterinary Medicine Series C: Anatomia Histologia Embryologia**, v. 47, n. 4, p. 273–279, 2018.

SULLIVAN, J. J.; ELLIOTT, F. I. **Bull fertility as affected by an interaction between motile spermatozoa concentration and fertility level in artificial insemination** Int Congr Anim Reprod Artif Insemination [Proc], 1968.

TALBERT, P. B.; HENIKOFF, S. Histone variants ancient wrap artists of the epigenome. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 11, n. 4, p. 264–275, 2010.

THUNDATHIL, J. C.; DANCE, A. L.; KASTELIC, J. P. Fertility management of bulls to improve beef cattle productivity. **Theriogenology**, v. 86, n. 1, p. 397–405, 1 jul. 2016.

TIMLIN, C. L. et al. A retrospective analysis of bull:cow ratio effects on pregnancy rates of beef cows previously enrolled in fixed-time artificial insemination protocols. **Translational Animal Science**, v. 5, n. 3, p. 1–9, 2021.

TORREGROSA, N. et al. Protamine 2 precursors, protamine 1/protamine 2 ratio, DNA integrity and other sperm parameters in infertile patients. **Human Reproduction**, v. 21, n. 8, p. 2084–2089, 2006.

UTT, M. D. Prediction of bull fertility. **Animal Reproduction Science**, v. 169, p. 37–44, 2016.

VASAN, S. S. Semen analysis and sperm function tests: How much to test. **Indian Journal of Urology**, v. 27, n. 1, p. 41–48, 2011.

VIANNA, E. et al. Seleção de touros para reprodução a campo: novas perspectivas Bull selection for natural breeding: new perspectives. **Rev. Bras. Reprod. Anim. Belo Horizonte**, v. 39, n. 1, p. 22–31, 2015.

VINCENT, P. et al. Bovine Semen Quality Control in Artificial Insemination Centers. **Bovine Reproduction**, p. 685–695, 2014.

WU, P. Y.; SCARLATA, E.; O'FLAHERTY, C. Long-term adverse effects of oxidative stress on rat epididymis and spermatozoa. **Antioxidants**, v. 9, n. 2, 2020.

YU, J.; HECHT, N. B.; SCHULTZ, R. M. RNA-binding properties and translation repression in vitro by germ cell-specific MSY2 protein. **Biology of Reproduction**, v. 67, n. 4, p. 1093–1098, 2002.

YUEN, B. T. K. et al. Histone H3.3 regulates dynamic chromatin states during spermatogenesis. **Development (Cambridge)**, v. 141, n. 18, p. 3483–3494, 2014.

ZANDEMAMI, M. et al. Correlation of CMA3 staining with sperm quality and protamine deficiency. **Laboratory Medicine**, v. 43, n. 6, p. 262–267, 2012.

ANEXOS

11.1 Solução de PBS sem Calcio e Magnésio

Solução de PBS (Sem cálcio e magnésio)			
Reagente	Quantidade	Concentração	Marca/ código
NaCl	10g	0,17111 M	Sigma/ S- 5886
KCl	0,25g	0,0034M	Sigma/ S- 5405
NaH ₂ PO ₄	1,44g	0,012M	Sigma/ S- 5011
KH ₂ PO ₄	0,25g	0,0018M	Sigma/ S- 5655
Armazenar 8°C , Validade : 2 meses			

11.2 Solução Hoescht

Solução de Hoechst 33342 5ug/ml (estoque)		
Reagente	Quantidade	Marca/ código
Hoechst 33342	5 ug	Sigma/ S 2261
DMSO	1mL	Sigma/ S 2650
Armazenar – 6 °C Validade: 6 meses		

Solução de Hoechst 33342 5ug/ml (uso)	
Reagente	Quantidade
Hoechst 33342 (Estoque)	1 uL
PBS	1 mL
Usar no mesmo dia	

11.3 Solução DABCO

Solução de DABCO		
Reagente	Quantidade	Marca/ código
1,4 - Diazabicyclo [2.2.2] Octane	0,23g	Sigma/ D-2522
Tris 0,5 M, ph 8.0	0,4 ml	Fluka 93363
Glicerol	5 ml	Sigma/ G- 5516
Água destilada	4,6 ml	-
Armazenar a 8°C Validade= 6 meses		