UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

DEPARTAMENTO DE REPRODUÇÃO ANIMAL

MARIANA DE PAULA RODRIGUES

Perfil oxidativo e avaliação funcional de sêmen criopreservado de touros (Bos taurus taurus e Bos taurus indicus) criados em clima tropical

São Paulo
2009

MARIANA DE PAULA RODRIGUES

Perfil oxidativo e avaliação funcional de sêmen criopreservado de touros (Bos taurus taurus e Bos taurus indicus) criados em clima tropical

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 Medicina Veterinária

Departamento:
Reprodução Animal

Área de concentração:
Reprodução Animal

Orientadora:
Prof. Dra. Valquiria Hyppolito Barnabe

São Paulo
2009

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.2177
FMVZ

Rodrigues, Mariana de Paula
Perfil oxidativo e avaliação funcional de sêmen criopreservado de touros *(Bos taurus taurus e Bos taurus indicus)* criados em clima tropical / Mariana de Paula Rodrigues. – São Paulo : M. P. Rodrigues, 2009.
144 f. : il.

Dissertação (mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Reprodução Animal, 2009.

Programa de Pós-Graduação: Reprodução Animal.
Área de concentração: Reprodução Animal.

Orientadora: Profa. Dra. Valquiria Hyppolito Barnabe.

1. Bovino. 2. Sêmen criopreservado. 3. Clima tropical. 4. Perfil oxidativo. 5. Testes funcionais. I. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Perfil oxidativo e avaliação funcional de sêmen criopreservado de touros (*Bos taurus taurus e Bos taurus indicus*) criados em clima tropical", protocolado sob o nº1098/2007, utilizando 5 (cinco) bovinos, sob a responsabilidade da Profa. Dra. Valquiria Hyppolito Barnabe, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Bioética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado em reunião de 07/01/09.

(We certify that the Research "Oxidative status and functional evaluation of cryopreserved semen collected from bulls (*Bos Taurus Taurus and Bos Taurus indicus*) raised tropical conditions", protocol number 1098/2007, utilizing 5 (five) bovines, under the responsibility Profa. Dra. Valquiria Hyppolito Barnabe, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Bioethic Commission of the School of Veterinary Medicine and Zootechny of University of São Paulo and was approved in the meeting of the day 07/01/2009).

São Paulo, 13 de julho de 2009

Profa Dra Denise Tabacchi Fantoni
Presidente da Comissão de Bioética
FMVZ/USP

Alice D. Sabra
Médica Veterinária
CRMV 15103

Av. Prof. Dr. Orlando Marques de Paiva, nº 87 - 05508-270 - Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira". Fax: (11) 3032-2224 - fones: (11) 309107676/7671 - e-mail: fmvz@edu.usp.br

USP FMVZ

Av. Prof. Dr. Orlando Marques de Paiva, nº87
Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
São Paulo/SP – Brasil
05508-270

Fax: +55 11 3032-2224 / 3091-7757
fone: + 55 11 3091-7671/7676
E-mail: fmvz@usp.br
http://www.fmvz.usp.br

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: RODRIGUES, Mariana de Paula.

Título: Perfil oxidativo e avaliação funcional de sêmen criopreservado de touros (*Bos taurus taurus e Bos taurus indicus*) criados em clima tropical

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 Medicina Veterinária

Data:____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento:_____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento:_____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento:_____

DEDICATÓRIA

“As grandes caminhadas sempre começam com o primeiro passo”

Lembram disso? Pois é, outro passo foi dado e mais uma vez vocês estavam aqui do meu lado. Confiaram em mim, apoiaram minhas decisões, deram conselhos, construíram uma base forte para que tudo isso pudesse acontecer e fizeram o possível e o impossível para me ajudar.

Por isso, dedico este trabalho, esta conquista e todas que estão por vir à minha ***FAMÍLIA*** *que, não fosse o que fizeram por mim durante meus 25 anos, eu não estariam aqui, na verdade, eu não seria ninguém.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço de todo meu coração:

À Deus, por me dar a vida, por me abençoar com saúde, com uma família maravilhosa, amigos incomparáveis e pessoas inesquecíveis, pelas oportunidades, pelo fato de poder acordar todas as manhãs, pelas janelas fechadas e portas abertas.

Aos meus pais Manuel e Elizabeth, primeiramente pela criação com tanto amor e carinho, pela educação, por todo apoio em todos os momentos, pela compreensão, pelos conselhos, pelos sacrifícios, pelas abdicações, por me ensinarem o significado das palavras persistência e esforço, agradeço todas as broncas e puxões de orelha, para que hoje eu pudesse ser quem sou, e estar onde estou. É difícil colocar o quanto sou grata em apenas, algumas linhas. Simplesmente, agradeço, por serem pessoas tão maravilhosas, verdadeiros exemplos de vida, quem dera eu conseguir retribuir, pelo menos, um pouco o que fizeram por mim. OBRIGADA!!!

À minha avó Maria, pela paciência, pelos ensinamentos, pelas orações diárias, por acordar cedinho só para preparar o café da manhã e o almoço, pelas preocupações, pelo esforço em me ajudar no que precisei.

Às minhas irmãs Juliana e Fernanda, por estarem ao meu lado em todos os momentos, por compartilharem não apenas roupas, mas também palavras e gestos de carinho.

À Dra. Valquíria, uma mulher de fibra, que atravessou tantos momentos turbulentos sem perder o bom humor. Muito obrigada por ter aceitado me orientar

sem mesmo conhecer meu trabalho, por depositar toda sua confiança em mim. Espero não ter decepcionado.

Ao Dr. Renato, pela paciência, pelas conversas, por todas as contribuições, não apenas ao meu experimento, mas também à "vida" da Reprodução Animal. O senhor é um verdadeiro exemplo para nós que ainda engatinhamos.

À Maria Amélia, por estar sempre ao meu lado nas horas mais desesperadoras que aconteceram dentro da sala do HPLC, por se desdobrar e "correr atrás" de ajuda para nosso experimento, pelos conselhos, conversas, risadas, uma verdadeira AMIGA!

Ao Marcílio por ter me ajudado desde o comecinho, por ter me ensinado tantas coisas, pela paciência em explicar milhões de vezes a reação da peroxidação lipídica, pelas estatísticas, pelos churrascos, pelas reuniões em casa com pratos variados (hummm!!!!). Obrigada Má, espero que seja uma amizade para sempre.

Ao Du e à Paty, por compartilharem momentos bons e ruins, por me ouvirem quando eu precisei desabafar, pelos conselhos, pelo apoio, pela ajuda, pelas risadas, por compartilhar diversos assuntos profissionais (e outros nem tanto assim) enfim por estarem sempre ao meu lado. Amigos, Amigos, Amigos.....

À Paola, por ajudar tantas vezes com FAPESP, congresso, experimento, por ser sincera, alegre e realista.

Aos membros do Laboratório de Urologia da UNIFESP: Ricardo, Bárbara, Paulinha, Thiesa, por me receberem tão bem no laboratório, pela looooooonga ajuda com o cometa, pela atenção, pelos almoços, pelas horas de descontração. Sem vocês não teria conseguido.

Ao Prof. Pietro, por ter aberto as portas do VRA para mim quando deu a oportunidade e o privilégio de estagiar em sua equipe, e pelos ensinamentos em aula.

Ao Prof. Claudio, por ter me aceitado como monitora em suas aulas de graduação. Espero ter feito tudo certinho.

Ao Prof. Rubens, por ter permitido que eu acompanhasse trabalhos no Laboratório de Biotecnologia do Sêmen e Andrologia e pelos ensinamentos passados, tanto dentro da sala de aula, como fora dela.

Ao Prof. Marcelo, pela serenidade e paciência e pelo ótimo trabalho que faz com a pós-graduação do nosso departamento.

À Profa. Mayra e à Marcela, pelas empolgantes aulas na pós graduação, que me fizeram "até" gostar de biologia molecular.

À Profa. Aneliese, por passar tantos conhecimentos sobre pequenos ruminantes e por se preocupar com o aprendizado dos alunos.

Ao Prof. Visintin, sempre amável e alegre. Um grande homem, exemplo de esforço e competência.

Ao Prof. Ed, Profa. Camila, Profa. Carla, pelo convívio, pelo aprendizado e por estarem sempre dispostos a colaborar.

À Suzana, colega de monitoria, por ter apoiado e acompanhado todas as turbulências do trabalho. Só a gente sabe né Su...

Ao Miguel, por ter me ensinado, com toda paciência do mundo, a coletar sêmen dos touros e dos carneiros e a ser uma pessoa mais organizada.

Aos meninos Ira, Belau e Luis por disponibilizarem seu tempo para preparar os animais para as coletas.

À Harumi, Thais e Alice pela competência, por ajudarem com tantos papéis (que às vezes nem sabia que eram necessários), por nunca deixarem que perdesse os prazos e pela amabilidade com que atendem.

À D. Silvia, pelo cafezinho, pelo chá, por manter sempre limpo o laboratório e todo o departamento.

À Ana Paula Mantovani, ex-professora e agora colega, por ter despertado em mim o gosto pela reprodução animal e por ter me ajudado tanto quando eu não sabia que rumo seguir.

À família Bao muito obrigada por me receberem tão bem em casa e na família, pela hospitalidade, por me ensinarem uma cultura diferente, pela paciência em tentarem se comunicar com quem mal entende a língua (um dia eu consigo). Aos cunhados por emprestarem o carro e até o quarto.

Ao Fabián (Morsitooo!!), por ter me dado tanta força no experimento, na clínica e na vida, por ter me mudado para melhor, por ter me mostrado tantas oportunidades e também, por ter feito ver que EU dirijo bem melhor!!! (rsrsrs) TQM!!!

Ao Paulo Holanda, pelas conversas e por me ensinar todas as técnicas que utilizei nesse experimento.

Aos veterinários Marli e Giuseppe, por me aceitarem apesar de todas minhas limitações, pela paciência, por tanto conhecimento que passaram e pela confiança que depositaram em mim.

Aos colegas de VRA: Lindsay, Andrés, Gabriel, Zé Nélio, Alessandra, Henderson, Roberta, Rogério, Rodrigo(S), Taty, Lilian, Marina, Marrie, Priscila, Cinthia, Dominique, Paulão, Zeca, Flavia, Feben, Renata, Adriano, Cris, Liege..... São tantos!!! Muito obrigada à todos (inclusive os que eu não citei o nome).

À Universidade de São Paulo, à Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia e ao Departamento de Reprodução Animal.

Com certeza aprendi muitas coisas nos 32 meses em que passei nesse departamento. Convivi com tantas pessoas diferentes, me deparei com diversas situações, algumas delas bem difíceis, fiz muitos amigos, muitos colegas, infelizmente, alguns eu nem tive a oportunidade de conhecer. Enfim, foram alguns meses que me fizeram evoluir anos, não apenas no âmbito profissional, mas, principalmente, na vida pessoal.

RESUMO

RODRIGUES, M. P. **Perfil oxidativo e avaliação funcional de sêmen criopreservado de touros (*Bos taurus taurus* e *Bos taurus indicus*) criados em clima tropical.** [Oxidative status and functional evaluation of cryopreserved semen, collected from bulls (*Bos taurus taurus* and *Bos taurus indicus*) raised under tropical conditions]. 2009. 144 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

A necessidade de criopreservação seminal vem aumentando cada vez mais, concomitantemente à evolução das biotecnologias aplicadas à reprodução animal. Sabe-se que a principal causa da diminuição do desempenho reprodutivo de um touro, criado em clima tropical, é o estresse térmico. Raças de origem européia (*Bos taurus taurus*) são consideravelmente mais sensíveis à essas condições climáticas quando comparadas aos animais de origem indiana (*Bos taurus indicus*). Esses animais não adaptados podem apresentar decréscimo na qualidade espermática, como alterações estruturais, funcionais e maior suscetibilidade ao estresse oxidativo, após a descongelação do sêmen. Para avaliar essa hipótese, foram utilizadas amostras criopreservadas de 40 touros, sendo 20 da raça Nelore (*Bos taurus indicus*) e 20 da raça Simental (*Bos taurus taurus*), criados em clima tropical, dessas, 10 amostras seminais de cada raça foram coletadas durante inverno e 10 durante o verão. Após a descongelação das amostras, foram realizados os testes espermáticos convencionais como motilidade progressiva, vigor e índice de motilidade espermática, e os testes funcionais tais como integridade de membrana plasmática (Eosina/Nigrosina), integridade acrossomal (POPE), integridade de DNA (Ensaio Cometa) e atividade citoquímica mitocondrial (3'3 diaminobenzidina – DAB). Também foi avaliada a suscetibilidade das células espermáticas à peroxidação lipídica induzida, através da mensuração da concentração de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS). Os dados foram analisados levando em conta as classes: raça (Nelore e Simental) ou estação do ano (verão e inverno), através do programa SPSS 13.0 para Windows. A variável DAB I foi maior ($p=0,04$) nas amostras dos touros Nelore em comparação com Simentais ($17,85 \pm 2,38$ vs $11,4 \pm 1,84$). Observou-se o efeito das estações do ano sobre as variáveis motilidade progressiva (26,50% inverno e 13,30% verão; $p=0,02$), DAB I (22,32% inverno e 13,30% verão; $p=0,04$) e DAB III (13,88% inverno e 22,10% verão; $p=0,01$), somente no sêmen dos touros Nelore, e o efeito das raças ($p=0,03$) sobre as variáveis DAB I (22,34% Nelore e 11,60% Simental) e DAB III (13,88% Nelore e 21,19% Simental), apenas durante o inverno, quanto ao

nível de TBARS, não foi verificado diferença entre nenhum grupo. Houve correlação entre alguns testes funcionais e convencionais, porém a variável integridade de DNA não correlacionou com nenhum teste convencional. Esses resultados podem indicar que a peroxidação lipídica sofrida, espontaneamente, pelos touros Europeus, devido ao estresse térmico, selecionou espermatozóides mais resistentes à criopreservação.

Palavras-chave: Bovino. Sêmen criopreservado. Clima tropical. Perfil oxidativo. Testes funcionais.

ABSTRACT

RODRIGUES, M. P. **Oxidative status and functional evaluation of cryopreserved semen, collected from bulls (*Bos taurus taurus* and *Bos taurus indicus*) raised under tropical conditions**. [Perfil oxidativo e avaliação funcional de sêmen criopreservado de touros (*Bos taurus taurus* e *Bos taurus indicus*) criados em clima tropical]. 2009. 144 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

Seminal cryopreservation technique has been increasing concomitant reproductive biotechnologies. It is known that heat stress is the main cause that affects bulls reproductive performance under tropical environment. European breeds (*Bos taurus taurus*) are much more sensible to these conditions than Indian breeds (*Bos taurus indicus*). These non-adapted animals present a fast decrease in sperm quality as structural and functional parameters and higher oxidative stress susceptibility. In order to test this hypothesis, cryoprotected semen samples of twenty Nelore (*Bos taurus indicus*) and twenty Simmental (*Bos taurus taurus*) bulls, raised under tropical conditions, were analyzed; ten samples of each breed were collected during summer and ten during winter. After thawing, semen samples were submitted to following conventional tests: progressive motility, vigor and sperm motility index (IME), and following functional tests: plasmatic membrane integrity (eosin-nigrosin), acrosomal membrane integrity (POPE), DNA fragmentation (Comet Assay) and mitochondrial activity (3'3 diaminobenzidine - DAB). The spermatozoa susceptibility to the induced lipid peroxidation followed by measurement of thiobarbituric acid reactive substances concentration (TBARS), was used as an oxidative stress index. Statistical analysis were performed for breed (Nelore and Simmental) and season (summer and winter), using SPSS 13.0 for Windows. Comparing Nelore and Simmental, DAB I was higher (p=0,04) in the first group (17,85 ± 2,38 and 11,4 ± 1,84, respectively). Season effect was observed only in Nelore samples on: progressive motility (26,50% winter and 13,30% summer; p=0,02), DAB I (22,32% winter and 13,30% sumer; p=0,04) and DAB III (13,88% winter and 22,10% summer; p=0,01); and breed effect (p=0,03) was observed only during winter on: DAB I (22,34% Nelore and 11,60% Simmental) and DAB III (13,88% Nelore and 21,19% Simmental). TBARS index, did not differ in breed or season. Correlations were observed between some of functional and conventional tests, however, the DNA integrity did not correlate with any conventional test. These results may indicate that probably, the spontaneous peroxidation that

European bulls suffer due to the heat stress may have selected sperm more resistant to the cryopreservation.

Keywords: Bovine. Cryopreserved semen. Tropical conditions. Oxidative status. Functional tests.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Esquema da célula espermática e seus componentes 39

Figura 2 - Touro da raça Nelore (*Bos taurus indicus*) 66

Figura 3 - Touro da raça Simental *(Bos taurus taurus)* 67

Figura 4 - Ilustração esquemática dos procedimentos experimentais..... 69

Figura 5 - Eosina-Nigrosina. Espermatozóide com a membrana plasmática íntegra (a cima) e não íntegra (abaixo).Obj. 100x 72

Figura 6 - Coloração simples de POPE. Espermatozóide com acrossomo íntegro. Obj. 100x 73

Figura 7- Coloração simples de POPE. Espermatozóide com acrossomo não íntegro. Obj. 100x 73

Figura 8 - Fracionamento do sêmen in natura e com mitocôndrias inativas 74

Figura 9 - Diaminobenzidina. Espermatozóide DAB I (esquerda) e DAB III (direita). Obj. 100x 75

Figura 10 - Diaminobenzidina. Espermatozóide DAB II (direita) e DAB IV (esquerda). Obj. 100x 75

Figura 11 - Espermatozóide Cometa I. Obj. 100x 78

Figura 12 - Espermatozóides Cometa II. Obj. 100x..... 78

Figura 13 - Espermatozóide Cometa III. Obj. 100x..... 78

Figura 14 - Espermatozóide Cometa IV. Obj. 100x 78

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Efeito das raças e das estações climáticas [média ± erro padrão, (IC 95%)] sobre a motilidade (%), vigor (0-5) e índice de motilidade espermática (IME), de amostras seminais criopreservadas, de touros das raças Nelore e Simental, criados em clima tropical, coletadas em inverno e verão. 84

Tabela 2 - Efeito das estações climáticas em função das raças [média ± erro padrão, (IC 95%)] sobre a motilidade (%), vigor (0-5) e índice de motilidade espermática (IME), de amostras seminais criopreservadas, de touros das raças Nelore e Simental, criados em clima tropical, coletadas em inverno e verão. 85

Tabela 3 - Efeito das raças em função das estações climáticas [média ± erro padrão, (IC 95%)] sobre a motilidade (%), vigor (0-5) e índice de motilidade espermática (IME), de amostras seminais criopreservadas, de touros das raças Nelore e Simental, criados em clima tropical, coletadas em inverno e verão. 85

Tabela 4 - Efeito das raças e das estações climáticas [média ± erro padrão, (IC 95%)] sobre a porcentagem de espermatozóides com a membrana plasmática íntegra (E/N), de amostras seminais criopreservadas, de touros das raças Nelore e Simental, criados em clima tropical, coletadas em inverno e verão. 89

Tabela 5 - Efeito das estações climáticas em função das raças [média ± erro padrão, (IC 95%)] sobre a porcentagem de espermatozóides com a membrana plasmática íntegra (E/N), de amostras seminais criopreservadas, de touros das raças Nelore e Simental, criados em clima tropical, coletadas em inverno e verão. 90

Tabela 6 - Efeito das raças em função das estações climáticas [média ± erro padrão, (IC 95%)] sobre a porcentagem de espermatozóides com a membrana plasmática íntegra (E/N), de amostras seminais criopreservadas, de touros das raças Nelore e Simental, criados em clima tropical, coletadas em inverno e verão. 90

Tabela 7 - Efeito das raças e das estações climáticas [média ± erro padrão, (IC 95%)] sobre a porcentagem de espermatozóides com a membrana

acrossomal íntegra (POPE), de amostras seminais criopreservadas, de touros das raças Nelore e Simental, criados em clima tropical, coletadas em inverno e verão 92

Tabela 8 - Efeito das estações climáticas em função das raças [média ± erro padrão, (IC 95%)] sobre a porcentagem de espermatozóides com a membrana acrossomal íntegra (POPE), de amostras seminais criopreservadas, de touros das raças Nelore e Simental, criados em clima tropical, coletadas em inverno e verão. 92

Tabela 9 - Efeito das raças em função das estações climáticas [média ± erro padrão, (IC 95%)] sobre a porcentagem de espermatozóides com a membrana acrossomal íntegra (POPE), de amostras seminais criopreservadas, de touros das raças Nelore e Simental, criados em clima tropical, coletadas em inverno e verão. 92

Tabela 10 - Efeito das raças e das estações climáticas [média ± erro padrão, (IC 95%)] sobre a porcentagem de espermatozóides classes I, II, III e IV na avaliação da atividade mitocondrial (DAB I, DAB II, DAB III, DAB IV), de amostras seminais criopreservadas, de touros das raças Nelore e Simental, criados em clima tropical, coletadas em inverno e verão..... 94

Tabela 11 - Efeito das estações climáticas em função das raças [média ± erro padrão, (IC 95%)] sobre a porcentagem de espermatozóides classes I, II, III e IV na avaliação da atividade mitocondrial (DAB I, DAB II, DAB III, DAB IV), de amostras seminais criopreservadas, de touros das raças Nelore e Simental, criados em clima tropical, coletadas em inverno e verão. 95

Tabela 12 - Efeito das raças em função das estações climáticas [média ± erro padrão, (IC 95%)] sobre a porcentagem de espermatozóides classes I, II, III e IV na avaliação da atividade mitocondrial (DAB I, DAB II, DAB III, DAB IV), de amostras seminais criopreservadas, de touros das raças Nelore e Simental, criados em clima tropical, coletadas em inverno e verão. 95

Tabela 13 - Efeito das raças e das estações climáticas [média ± erro padrão, (IC 95%)] sobre a porcentagem de espermatozóides classes I, II, III e IV na avaliação da integridade de DNA (COMETA I, COMETA II, COMETA III e COMETA IV), de amostras seminais criopreservadas, de touros das

raças Nelore e Simental, criados em clima tropical, coletadas em inverno e verão. 98

Tabela 14 - Efeito das estações climáticas em função das raças [média ± erro padrão, (IC 95%)] sobre a porcentagem de espermatozóides classes I, II, III e IV na avaliação da integridade de DNA (COMETA I, COMETA II, COMETA III e COMETA IV), de amostras seminais criopreservadas, de touros das raças Nelore e Simental, criados em clima tropical, coletadas em inverno e verão 98

Tabela 15 - Efeito das raças em função das estações climáticas [média ± erro padrão, (IC 95%)] sobre a porcentagem de espermatozóides classes I, II, III e IV na avaliação da integridade de DNA (COMETA I, COMETA II, COMETA III e COMETA IV), de amostras seminais criopreservadas, de touros das raças Nelore e Simental, criados em clima tropical, coletadas em inverno e verão 99

Tabela 16 - Efeito das raças e das estações climáticas [média ± erro padrão, (IC 95%)] sobre as concentrações de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), de amostras seminais criopreservadas, de touros das raças Nelore e Simental, criados em clima tropical, coletadas em inverno e verão. 101

Tabela 17 - Efeito das estações climáticas em função das raças [média ± erro padrão, (IC 95%)] sobre as concentrações de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), de amostras seminais criopreservadas, de touros das raças Nelore e Simental, criados em clima tropical, coletadas em inverno e verão. 101

Tabela 18 - Efeito das raças em função das estações climáticas [média ± erro padrão, (IC 95%)] sobre as concentrações de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), de amostras seminais criopreservadas, de touros das raças Nelore e Simental, criados em clima tropical, coletadas em inverno e verão. 101

Tabela 19 - Coeficientes de correlação (significância), entre todas as variáveis respostas estudadas, de amostras seminais criopreservadas, de touros da raça Nelore (*Bos taurus indicus*), criados em clima tropical, coletadas durante o inverno. 105

Tabela 20 - Coeficientes de correlação (significância), entre todas as variáveis respostas estudadas, de amostras seminais criopreservadas, de touros da raça Nelore (*Bos taurus indicus*), criados em clima tropical, coletadas durante o verão 106

Tabela 21 - Coeficientes de correlação (significância), entre todas as variáveis respostas estudadas, de amostras seminais criopreservadas, de touros da raça Simental (*Bos taurus taurus*), criados em clima tropical, coletadas durante o inverno. 107

Tabela 22 – Coeficientes de correlação (significância), entre todas as variáveis respostas estudadas, de amostras seminais criopreservadas, de touros da raça Simental (*Bos taurus taurus*), criados em clima tropical, coletadas durante o verão 108

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Porcentagem de espermatozóides com alto potencial de atividade mitocondrial, pela diluição seminal (Sêmen fresco). 83

Gráfico 2 - Valores das médias, das variáveis estudadas em amostras seminais criopreservadas de touros das raças Nelore e Simental, criados em clima tropical, coletadas em inverno e verão. 112

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABCRSS	Associação Brasileira dos Criadores de Simental e Simbrasil
ABIEC	Associação Brasileira das Indústrias Exportadoras de Carne
ACBN	Associação Brasileira dos Criadores de Nelore
AMPc	adenosina monofosfato cíclica
ASBIA	Associação Brasileira de Inseminação Artificial
ATP	adenosina trifosfato
B. indicus	*Bos taurus indicus*
B. taurus	*Bos taurus taurus*
CASA	"Computer Assisted Semen Analisys"
CCO	citocromo C oxidase
CEPEA	Centro de estudos de pesquisa aplicada em economia avançada
cm	centímetro
DAB	3'3 – diaminobenzidina
DHA	ácido docosahexaenóico
DNA	ácido desoxirribonucléico
E/N	eosina-nigrosina
EC	Ensaio Cometa
EUA	Estados Unidos da América
Fe	ferro

$FeSO_4$	sulfato de ferro
g	gravidade
GPx	glutationa peroxidase
GSH	glutationa
H_2O	água
H_2O_2	peróxido de hidrgênio
IA	inseminação artificial
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IC	intervalo de confiança
IME	índice de motilidade espermática
JC-1	iodeto de 5,5',6,6' tetracloro 1,1',3,3' tetraetilbenzimidazolicarbocycanina
LMPA	"Low melting point agarose"
LPO	peroxidação lipídica/lipoperoxidação
M	molar
mA	miliampere
MDA	malondialdeído
µg	microgramas
µL	microlitros
mL	mililitros
mM	milimolar
NaOH	hidróxido de sódio

nm	nanômetro
NMPA	“Normal melting point agarose”
NO	óxido nítrico
O^-_2	ânion superóxido
Obj	objetiva
OH^-	radical hidroxila
PBS	“Phosphate buffered saline”
p	nível de significância
pH	potencial hidrogeniônico
r	coeficiente de correlação
ROS	espécies reativas de oxigênio
SCSA	“Sperm Chromatin Structure Assay”
Seg	segundos
SOD	superóxido dismutase
Sptz	espermatozóide
TBA	ácido tiobarbitúrico
TBARS	substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
TCA	ácido tricloroacético
TUNEL	“Terminal Uridine Nick End Labelling”
V	volts
VS	“versus”

LISTA DE SÍMBOLOS

α	Alfa
+	mais
±	mais ou menos
>	maior que
<	menor que
%	porcentagem
°C	graus Celsius
x	vezes
10^6	milhões
:	para (1:100)
=	igual

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 28

2 HIPÓTESE 32

3 OBJETIVOS 34

4 REVISÃO DE LITERATURA 36

4.1 COMPOSIÇÃO DO SÊMEN E ESPERMATOZÓIDES 36

4.2 EFEITOS DA CRIOPRESERVAÇÃO 40

4.3 MECANISMOS DA TERMORREGULAÇÃO TESTICULAR 43

4.4 CLIMA TROPICAL E ALTERAÇÕES REPRODUTIVAS: BOS TAURUS TAURUS VS BOS TAURUS INDICUS 45

4.5 ESTRESSE OXIDATIVO 47
4.5.1 Espécies Reativas de Oxigênio na fertilidade do macho 49
4.5.2 Mensuração do estresse oxidativo 52

4.6 AVALIAÇÃO SEMINAL 54
4.6.1 Testes convencionais 54
4.6.2 Testes funcionais 56
4.6.2.1 Integridade da membrana plasmática 57
4.6.2.2 Integridade da membrana acrossomal 59
4.6.2.3 Atividade citoquímica mitocondrial 60
4.6.2.4 Integridade de DNA 61

5 MATERIAIS E MÉTODOS 66

5.1 LOCAL 66

5.2 AMOSTRAS SEMINAIS 66

5.3 COLETA E CRIOPRESERVAÇÃO DE SÊMEN 67

5.4 PROCESSAMENTO E AVALIAÇÃO DO SÊMEN 68
5.4.1 Testes convencionais 70
5.4.1.1 Avaliação da motilidade espermática 70
5.4.1.2 Avaliação do vigor espermático 70
5.4.1.3 Índice de motilidade espermática 71
5.4.2 Testes funcionais 71
5.4.2.1 Avaliação da Integridade da Membrana Plasmática 71
5.4.2.2 Avaliação da Integridade da Membrana Acrossomal 72
5.4.2.3 Avaliação da Atividade Citoquímica Mitocondrial 73

5.4.2.4 Avaliação da Integridade de DNA 75
5.4.3 Avaliação do Índice de Resistência ao Estresse Oxidativo 79
5.4.4 Análise Estatística 80

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO 83

6.1 TESTES CONVENCIONAIS 84

6.2 TESTES FUNCIONAIS 89
6.2.1 Integridade da membrana plasmática 89
6.2.2 Integridade da membrana acrossomal 91
6.2.3 Atividade citoquímica mitocondrial 94
6.2.4 Integridade de DNA 97

6.3 SUBSTÂNCIAS REATIVAS AO ÁCIDO TIOBARBITÚRICO 100

6.4 CORRELAÇÕES 104

6.5 RESUMO DOS RESULTADOS 112

6.6 CONSIDERAÇÕES FINAIS 113

7 CONCLUSÃO 116

REFERÊNCIAS 118

ANEXOS 138

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

A crescente demanda por proteína animal tem exigido que os sistemas de produção sejam cada vez mais eficientes. Dentre os diversos fatores que influenciam a eficiência econômica dos sistemas, pode-se destacar a reprodução como sendo o mais básico de todos, pois sem ela não há a geração de produtos. Assim, quanto mais eficiente for o desempenho reprodutivo, maior será a possibilidade de retorno econômico positivo.

A pecuária tem uma grande importância econômica para o Brasil, principalmente a pecuária de corte; já que, o país está posicionado como o maior rebanho comercial do mundo, em torno de 200 milhões de cabeças de gado, ou seja, quase 1(uma) cabeça de gado para cada habitante (Anexo A- a) (IBGE, 2007).

Em 2004, alcançou a condição de maior exportador de carne bovina (Anexo A- b) e no primeiro trimestre de 2007 exportou 1,363 milhões de toneladas de carne. Encontra-se como o segundo maior produtor mundial de carne bovina (cerca de 9 milhões de toneladas), sendo inferior apenas aos Estados Unidos (ABIEC 2007, 2009).

Segundo a Pesquisa Trimestral do Abate, no ano de 2008 foram abatidas 28,691 milhões de cabeças de bovinos, deste abate nacional, 35,1% foi proveniente da região Centro-Oeste do Brasil; apesar da queda de 6,6% em relação ao ano anterior, devido à crise mundial (IBGE, 2009). Por possuir uma grande extensão de terra, existe ainda potencial para aumentar cada vez mais a produção de carne brasileira, para isso, basta empregar biotecnologias que aperfeiçoem o sistema de produção, sendo possível, dessa forma, prognosticar um significativo aumento na demanda interna de carne bovina.

A pecuária de corte brasileira é responsável por cerca de 8% do Produto Interno Bruto (CEPEA, 2007), sendo que a região central do país engloba, aproximadamente, 40% do rebanho bovino de corte brasileiro (Anexo A- c) (IBGE, 2007), rebanho este constituído, em sua maioria, por animais de origem zebuína (*Bos taurus indicus*), especialmente da raça Nelore, originária da índia e famosa por se adaptar às condições tropicais brasileiras, mostrando ótima capacidade de aproveitar alimentos grosseiros, resistência natural aos parasitas e fertilidade mesmo em temperaturas elevadas (ACNB, 2009).

Os bovinos de origem européia (*Bos taurus taurus*), quando criados em clima temperado são excelentes na precocidade produtiva e reprodutiva, ganho de peso e

idade ao abate (ABCRSS, 2009), no entanto, quando encontram-se em climas como o apresentado na região central do Brasil, passam a mostrar menores índices de fertilidade (GABALDI, 2000; NICHI, 2003).

Essa menor fertilidade apresentada pelos touros de origem européia em condições tropicais vem sendo bastante estudada, porém, as causas da menor resistência em relação aos animais zebuínos, apesar de bem conhecidas, ainda não foram completamente desvendadas. Estas condições, em especial no caso dos machos, culminam em um quadro de infertilidade por degeneração testicular, estresse oxidativo e alterações espermáticas.

O estresse térmico pode alterar quaisquer características seminais, tais como motilidade, concentração, membrana plasmática, membrana acrossomal, potencial de mitocôndria e até mesmo integridade de DNA, visto tanto em amostras frescas, como em criopreservadas (ZÜGE, 2002).

É de grande importância econômica na produção animal, a resposta seminal à criopreservação, já que a manutenção da qualidade espermática é estratégica para a disseminação de material genético e conseqüente melhoria do rebanho brasileiro.

Dessa maneira, as biotecnologias da reprodução tem possibilitado um verdadeiro avanço qualitativo na produção bovina, em especial, por facilitar a seleção e multiplicação de animais geneticamente superiores e possibilitar maior diversidade genética entre as populações. Devido a isso, é de suma importância maximizar os métodos de avaliação espermática e conseqüentemente o potencial fecundante da amostra, garantindo o sucesso em um programa de reprodução, tanto natural quanto assistida.

A inseminação artificial (IA) é uma potente biotecnologia, de custos mais acessíveis, que permite aos produtores usarem raças superiores em suas criações, promovendo um rápido aumento na qualidade genética e produtividade.

Trabalhos realizados nos Estados Unidos reportam que com o advento da IA foi possível a implantação dos testes de progênie e conseqüentemente, o uso dos touros provados passou a ser uma rotina nos rebanhos. O grande aumento das médias de produção nos rebanhos de gado holandês nos EUA, por exemplo, é em parte devido à melhoria genética obtida na IA. É esse mesmo fator que tem sido o precursor do melhoramento dos rebanhos em todos os países de pecuária desenvolvida (ASBIA, 2008).

Todavia, para sua ampla aplicação, é indispensável o uso de sêmen congelado. Em 1999, foram vendidas no Brasil, aproximadamente 6 milhões de doses de sêmen criopreservado de touros, e em 2008 esse número aumentou para mais de 8 milhões de

doses, ou seja, a comercialização de doses de sêmen criopreservado de bovinos mostrou uma significativa evolução de 47,35% nos últimos 10 anos, mas, infelizmente, no Brasil o uso desta técnica tem sido muito limitado, onde somente 5% dos gados são inseminados artificialmente, indicando a oportunidade de crescimento na produção e no uso das doses de sêmen criopreservado (Anexo A- d) (ASBIA, 2008). Sendo assim, para suprir essa demanda, é necessário conhecer os fatores que afetam a produção espermática e qualidade seminal.

Dentro desta perspectiva, há uma grande necessidade de se estudar mais sobre as espécies bovinas e suas condições de manejo e reprodução, visando um aumento e melhora da qualidade dos rebanhos, além do que a determinação dos aspectos qualitativos do sêmen constitui um processo crítico na tomada de decisões para a seleção de reprodutores. Isso tem permitido um verdadeiro progresso, especialmente nas últimas décadas, na adaptação de testes laboratoriais mais específicos com o objetivo de elucidar a funcionalidade espermática, a partir da relação entre os testes convencionais e funcionais.

A avaliação da integridade do material genético, atividade mitocondrial, integridade de membranas plasmática e acrossomal e resistência ao estresse oxidativo das células espermáticas criopreservadas, irão nos proporcionar a oportunidade de decifrar causas de infertilidade ou baixa fertilidade entre os animais.

HIPÓTESE

2 HIPÓTESE

A hipótese central deste experimento é a de que amostras seminais criopreservadas, provenientes de touros não adaptados a ambientes tropicais (*Bos taurus taurus* - Simental) e coletadas em duas estações climáticas distintas (inverno e verão), apresentariam, após a descongelação:

- Alterações espermáticas estruturais e funcionais, tais como: alteração de membranas plasmática e acrossomal, diminuição da atividade citoquímica mitocondrial, alto grau de fragmentação do material genético.

- Maior suscetibilidade celular ao estresse oxidativo.

Quando comparadas às características seminais de amostras, nas mesmas condições, coletadas de touros adaptados (*Bos taurus indicus* - Nelore).

OBJETIVOS

3 OBJETIVOS

Com base na literatura apresentada, na hipótese formulada e sabendo da suscetibilidade dos animais de origem européia às condições tropicais, e da ação danosa dos radicais livres sobre as características funcionais e estruturais espermáticas que afeta a fertilidade dos animais; este estudo foi realizado com os seguintes objetivos:

- Avaliar as diferenças do sêmen criopreservado de animais adaptados e não adaptados ao clima tropical, coletados durante inverno e verão, através da avaliação de motilidade, vigor, integridade de membrana plasmática, integridade de membrana acrossomal, atividade citoquímica mitocondrial, índice de fragmentação de DNA e suscetibilidade celular ao estresse oxidativo;

- Correlacionar os resultados obtidos entre ambas as subespécies utilizadas (*Bos taurus taurus* - Simental e *Bos taurus indicus* – Nelore), bem como entre as duas estações climáticas (inverno e verão).

LITERATURA

4 REVISÃO DE LITERATURA

4.1 COMPOSIÇÃO DO SÊMEN E ESPERMATOZÓIDES

Sêmen

Sêmen é a suspensão celular líquida contendo espermatozóides e secreções das glândulas acessórias do trato genital masculino. A porção fluida dessa suspensão é chamada de plasma seminal (MIES FILHO; BARRETO, 1949).

Essa fração líquida do sêmen apresenta várias funções, atuando como diluente e veículo para os espermatozóides, controlador de osmolaridade, fornecedor de energia, agente antioxidante de compostos bioquímicos, além de exercer um efeito estimulante na motilidade. Participa na modulação da capacitação espermática, possui efeito imuno-modulatório e age também como agente bactericida (LACKEY; GRAY; HENRICKS, 2002; PESCH; BERGMANN; BOSTEDT, 2006).

O plasma seminal é uma mistura envolvendo secreções provenientes do epitélio seminífero, epidídimos, ductos deferentes, ampolas, próstata, vesículas seminais, glândula bulbouretral e, em algumas espécies, glândulas uretrais (AMANN; SCHANBACHER, 1983), composto basicamente de ácido cítrico, ácido lático, ergotioneína, frutose, glicerilfosforilcolina, sorbitol, ácido ascórbico, aminoácidos, peptídeos, lipídeos, ácidos graxos, enzimas e proteínas (GARNER; HAFEZ, 2004). Essas últimas são encontradas livres no plasma seminal ou adsorvidas em diferentes regiões do espermatozóide e são responsáveis por funções específicas como integridade estrutural da membrana plasmática, organização da matriz perinuclear, inibição da capacitação espermática e reação acrossomal, sinalizações trans-membrana e habilidade fecundante (FOLTZ, 1995; FOUCHÉCOURT et al., 2002; MÉTAYER; DACHEUX; GATTI, 2002).

O ambiente que circunda o espermatozóide é caracterizado por mudanças contínuas e progressivas na composição e concentração protéicas, desde o fluído testicular até a secreção do epitélio das vesículas seminais. O papel primordial desta atividade secretora é possibilitar um ambiente favorável para a maturação e manutenção da estrutura do espermatozóide, incluindo a organização molecular de suas membranas. Isso é possível, a partir da exposição das células espermáticas à proteínas, secretadas

em diferentes segmentos do aparelho reprodutivo, especialmente no epitélio seminífero, a partir das células de Sertoli, cabeça, corpo e cauda do epidídimo e, finalmente, pelas glândulas vesiculares (HERMO; OKO; MORALES, 1994).

No decorrer do trânsito epididimário, grande parte das proteínas secretadas para o lúmen aderem-se à membrana espermática e são responsáveis por várias modificações em sua estrutura, conferindo um caráter "protetor" à função celular (DACHEUX; GATTI; DACHEUX, 2003).

Na composição lipídica do plasma seminal estão presentes os ácidos: docosahexaenóico (DHA), palmítico, oléico, linoléico, araquidônico, linolênico e esteárico (TAVILANI et al., 2006). Esses ácidos graxos desempenham um importante papel na atividade funcional do espermatozóide e, consequentemente, na fertilidade masculina (GULAYA et al., 2001), assim como na proteção celular ao choque térmico e manutenção da motilidade espermática (GRAHAM, 1994). No entanto, por outro lado, essa variedade lipídica encontrada no plasma seminal, também é responsável, pelo ataque das espécies reativas de oxigênio (ROS), tornando a amostra seminal mais susceptível à peroxidação lipídica, comprometendo, assim, sua habilidade fertilizante (DE LAMIRANDE; GAGNON, 1992; BECONI et al., 1991).

O plasma seminal é dotado de uma gama de antioxidantes que atuam como neutralizadores de radicais livres para a proteção dos espermatozóides contra o estresse oxidativo. Contem, não apenas os antioxidantes enzimáticos como a catalase, a glutationa peroxidase (GPx) e a superóxido dismutase (SOD), mas também os não-enzimáticos como o α- tocoferol (vitamina E), ascorbato (vitamina C), glutationa (GSH), urato, piruvato, taurina e hipotaurina (AGARWAL; PRABAKARAN, 2005; AGARWAL, 2006), cujas atividades permitem manter o balanço entre a produção e destruição das ROS.

Khosrowbeygi e Zarghami em 2007 reportaram que os níveis de catalase no plasma seminal de homens subférteis foram menores do que naqueles do grupo controle, mostrando que a ação dos antioxidantes, também está relacionada às características seminais.

Espermatozóide

O espermatozóide é uma célula haplóide, alongada, produzida dentro dos túbulos seminíferos dos testículos, através da divisão e transformação das células tronco germinativas, em um processo chamado espermatogênese (EDDY; O'BRIEN; MRUCK; CHENG, 2004). Seus principais componentes químicos são os ácidos nucléicos, as proteínas e os lipídeos. Esta célula é formada por regiões altamente especializadas, tais como cabeça, colo, e flagelo (SANTOS, 2003), envoltos, em sua totalidade, pela membrana plasmática (ÕURA; TOSHIMORI, 1990).

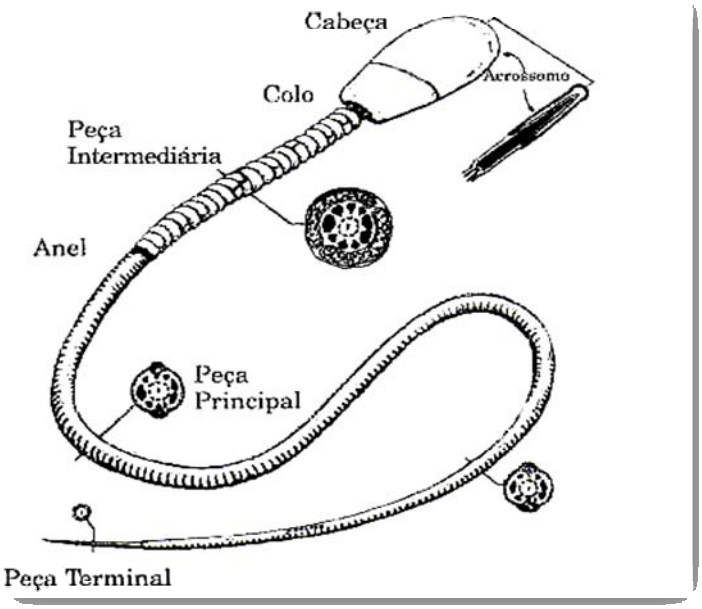
A membrana plasmática é composta basicamente de uma bicamada de lipídeos, principalmente os ácidos graxos poliinsaturados, em especial o ácido docosahexaenóico (DHA) (FLESCH; GADELLA, 2000). Por um lado, esses ácidos graxos são de grande importância celular, pois conferem as características de fluidez e permeabilidade à membrana; no entanto, por outro lado, devido às insaturações, servem como substrato aos radicais livres para que ocorra a peroxidação lipídica, tornando os espermatozóides extremamente suscetíveis ao estresse oxidativo (TAVILANI et al., 2006).

Na cabeça do espermatozóide estão contidos: o DNA, uma pequena quantidade de citoplasma e, no seu extremo apical, o acrossomo; sua principal característica é o núcleo achatado de forma oval, contendo cromatina altamente condensada (YANAGIMACHI, 1994). A extremidade anterior do núcleo espermático é recoberta pelo acrossomo, uma camada delgada, composta de dupla membrana que envolve intimamente o núcleo durante os últimos estágios da formação celular. Essa estrutura, semelhante a uma vesícula, contem acrosina, hialuronidase e outras enzimas hidrolíticas vitais para a interação espermatozóide-oócito (ÕURA; TOSHIMORI,1990; GARNER; HAFEZ, 2004).

O colo ou peça de conexão forma uma placa basal que se ajusta dentro de uma depressão na superfície posterior do núcleo, cuja função é conectar a cabeça do espermatozóide ao flagelo (GARNER; HAFEZ, 2004).

O flagelo ou cauda é subdividido em: peça intermediária, peça principal e peça terminal; está envolvido com a motilidade celular, sendo constituído internamente pelo axonema, uma estrutura especializada do citoesqueleto. O axonema é formado por um anel de nove microtúbulos duplos envolvendo um par central. As dineínas e nexinas realizam a ligação entre os pares de microtúbulos. As dineínas apresentam projeções chamadas braços de dineína, que são responsáveis pela geração da força motora do flagelo. A dineína é um complexo de multisubunidades de ATPase (GIBBONS, 1965) que traduzem energia química (ATP) em energia cinética, permitindo que pares de microtúbulos adjacentes deslizem um sobre o outro, causando uma curvatura do

axonema e então o movimento flagelar (MORTIMER, 1997; TURNER, 2006). Nele, ainda, estão presentes as mitocôndrias, cuja função fisiológica é realizar a fosforilação oxidativa e produzir o ATP como fonte de energia metabólica (FREY; MANNELLA, 2000), a posição das mitocôndrias ao redor da porção proximal do axonema sugere que elas são necessárias para o suprimento de ATP usado para a motilidade flagelar (Figura 1) (MORTIMER, 1997).



Fonte: HAFEZ; HAFEZ, 2004

Figura 1 - Esquema da célula espermática e seus componentes

A habilidade do espermatozóide de fertilizar um oócito e garantir o desenvolvimento embrionário está relacionada às variáveis como motilidade, metabolismo, integridade de membrana plasmática, acrossomal e de DNA (FOOTE, 2003). A criopreservação é conhecida por afetar, em 50%, todos esses parâmetros, reduzindo a quantidade de espermatozóides aptos para a fertilização (JANUSKAUSKAS et al., 1996; WATSON, 2000).

Toda característica estrutural especializada do espermatozóide está voltada para sua atividade funcional única, ou seja, assegurar a liberação do material genético, contido em seu núcleo, para o interior do oócito, onde ocorre a união dos pró-núcleos masculino e feminino, produzindo o zigoto (EDDY; O'BRIEN, 1994). Resumindo, a

principal função da cabeça do espermatozóide é liberar um conjunto haplóide de cromossomos para o oócito, e a do flagelo é promover motilidade à célula para permitir a sua passagem pelo trato genital feminino e a penetração através da zona pelúcida do oócito (MORTMER, 1997).

A dinâmica das transformações celulares, ao longo da espermatogênese, pode sofrer o efeito da regulação endócrina (HALL, 1994), da termorregulação testicular e temperatura ambiental (KASTELIC et al., 1997), há outros fatores que contribuem para esses distúrbios, como o nível sérico de corticóides (BARTH; BOWMAN, 1994), ruptura da barreira hemato-testicular, lesões no parênquima testicular (VAN CAMP, 1997) e alterações genéticas (STEFFEN, 1997).

Assim sendo, caso haja qualquer alteração no ambiente espermático, seja ela por aumento de temperatura, criopreservação, excesso de radicais livres ou até mesmo escassez de antioxidantes, toda característica estrutural e funcional dos espermatozóides será afetada, resultando em alterações estruturais do espermatozóide e comprometendo profundamente o potencial fertilizante destas células.

4.2 EFEITOS DA CRIOPRESERVAÇÃO

A disponibilidade de gametas viáveis e funcionalmente normais é um pré-requisito para uma fertilização bem sucedida em mamíferos, tanto in vivo quanto in-vitro e, por isso, é um ponto crítico para a implementação de uma grande variedade de tecnologias reprodutivas, tais como a inseminação artificial, fertilização in-vitro, transferência de embriões e engenharia genética. Devido a isto, a criopreservação de gametas e embriões tornou-se um procedimento complementar essencial para a aplicação destas tecnologias, já que eliminam as limitações de tempo e espaço (PARKS, 1997).

Sendo assim, a criopreservação possui um papel fundamental na fertilidade masculina, tanto para preservação dos gametas por um período indeterminado, como para utilização desses em um tratamento de reprodução assistida (SHEENA; ISHOLA, 2008).

Dessa forma, essa técnica foi estabelecida para suspender o metabolismo espermático, preservar suas características por um período de tempo prolongado, mantendo o potencial fertilizante dos espermatozóides (AMANN; PICKETT, 1987).

Os espermatozóides devem reter pelo menos quatro atributos básicos após a congelação e descongelação: 1. Integridade do flagelo, que garante produção de ATP e motilidade; 2. Integridade do núcleo, que mantém estável o armazenamento do DNA; 3. Integridade do acrossomo, já que possui enzimas responsáveis pela fecundação; 4. Integridade de membrana plasmática, importante para a sobrevivência do espermatozóide dentro do trato reprodutivo feminino e para a ligação do mesmo com a membrana do oócito durante a fertilização (AMANN; PICKETT, 1987; HAMMERSTEDT; GRAHAM; NOLAN, 1990).

O processo de criopreservação é constituído de diluição, refrigeração, congelação, armazenamento e descongelação. Cada um desses passos tem sua relação com a estrutura funcional das membranas e metabolismo celular (HAMMERSTEDT; GRAHAM; NOLAN, 1990).

No entanto, a exposição da célula à temperaturas abaixo da fisiológica, mesmo antes de ocorrer a congelação, é responsável por mudanças na organização bidimensional dos lipídeos de membrana, diminuindo a longevidade espermática (HOLT, 2000).

Apesar da interação entre diluidor, crioprotetor, curvas de refrigeração, congelação e descongelação ser responsável pela preservação das estruturas espermáticas e buscar minimizar os danos causados pelo choque frio, formação de cristais de gelo e desidratação celular (YOSHIDA, 2000), a criopreservação, ainda é um tanto quanto prejudicial às funções espermáticas, visto que a qualidade de amostras após a descongelação se mantém inferior à qualidade de amostras frescas (HOLT, 1997; PERIS et al., 2007).

É claro, que a célula espermática não está adaptada para passar pelas variações de temperatura envolvidas no processo de criopreservação, sofrendo, dessa forma, alterações na motilidade, estrutura e no material genético, simultaneamente nas diferentes etapas de congelação e descongelação (PARKS; GRAHAM, 1992).

A explicação para tais efeitos deletérios à célula está relacionada com a fase de transição dos lipídeos de membrana, resultando na perda de seletividade, característica das membranas biológicas de células vivas (WATSON; MORRIS, 1987), além da pequena quantidade de citoplasma e consequentemente de antioxidantes dos espermatozóides (HOLT, 2000).

A permeabilidade da membrana aumenta após refrigeração, podendo ser devido a mudanças nos canais protéicos, ainda, a regulação do cálcio também é afetada por esse processo, tendo conseqüências sérias em termos de função celular (BAILEY; BURH, 1994).

A sensibilidade ao choque frio varia de acordo com o grau de maturação do espermatozóide, espécie, variação individual e quantidade de plasma seminal, e pode ser determinada pelo conteúdo de colesterol da membrana e o grau de saturação dos ácidos graxos, os quais influenciam na fluidez da membrana plasmática (WATSON, 1981; COTTORELLO, 2002).

Parks e Graham (1992) detectaram em seu estudo que o tipo de fosfolipídio predominante na membrana também influenciava na sensibilidade ao choque frio, e espécies com maior proporção de fosfatidilcolina/ fosfatidiletanolamina eram mais resistentes. Esses autores observaram ainda que quanto maior o conteúdo de proteína da membrana, mais baixa a resistência ao choque frio.

Frente à isso, lesões irreversíveis ocorrem na membrana plasmática espermática durante resfriamento, congelação e após descongelação, indicativa de separação de fase, induzida por transição na fase lipídica (HOLT; NORTH, 1984), com mudanças sérias em sua fluidez (BUHR; CURTIS; KAKUDA, 1994).

Alterações acrossomais também foram encontradas em pesquisa realizada por Alvarenga et al. (1998), onde houve espessamento de segmento apical, ruptura de membrana acrossomal, conteúdo menos denso e homogêneo, e até mesmo ausência de tal estrutura.

Foi sugerido por Henry et al. (1993), que a membrana plasmática e a mitocôndria, em espermatozóides humanos, foram igualmente afetadas pela criopreservação, concordando com esse resultado, Bollwein, Fuchs e Koess (2007), encontraram em amostras de bovinos, que a mitocôndria e a membrana espermática são igualmente vulneráveis à esse processo, já o DNA se mostrou um pouco mais resistente, onde ocorreu fragmentação somente após um longo período de incubação.

Outros estudos em bovinos demonstraram que a criopreservação espermática está associada ao aumento da geração de ROS, bem como a diluição do plasma seminal, uma importante fonte de antioxidantes, predispõem as células ao estresse oxidativo (BILODEAU et al., 2000; CHATTERGEE; GAGNON, 2001).

Apoiando essa idéia, Peris et al. em 2007 investigaram o efeito da criopreservação na função espermática de carneiros, avaliando estabilidade de DNA (*SCSA*), peroxidação lipídica de membranas (*LPO*) e características funcionais, como motilidade (*CASA*), viabilidade (*eosina/nigrosina*) e integridade de acrossomo (*CTC*); depararam-se com a diminuição na qualidade espermática em todas as características avaliadas quando se tratava de sêmen criopreservado.

O grupo de pesquisas de Donnelly (2001) encontrou que a criopreservação provocou diminuição de 50% da motilidade progressiva (*CASA*) do sêmen humano, além da diminuição em 20% da integridade do DNA (*Ensaio Cometa*).

Ainda relacionando-se aos danos espermáticos, as dimensões morfológicas da cabeça de espermatozóides eqüinos foram, estatisticamente, menores em amostras criopreservadas, provavelmente causada por danos acrossomais ou pela hipercondensação do material genético sofrido pelas células espermáticas durante a congelação (ARRUDA et al., 2002).

Segundo Slowinska, Karol e Ciereszko (2008), os espermatozóides bovinos possuem um ponto importante de resistência à criopreservação, já que a porcentagem de fragmentação de DNA (*Ensaio Cometa*), mesmo sendo significante ($P<0,01$), foi muito baixa (3,8%), após a descongelação.

Ou seja, apesar do sêmen bovino ser o mais resistente, independente do método de criopreservação utilizado, todos eles submetem as células espermáticas a condições estressantes que promovem variações intensas nas estruturas celulares, podendo minimizar o potencial fertilizante, e até mesmo ser extremamente letais às mesmas (HAMMADEH et al., 2001a).

4.3 MECANISMOS DA TERMORREGULAÇÃO TESTICULAR

Nos mamíferos domésticos, os testículos ficam alojados em escrotos pendulares, uma característica extremamente importante, já que a espermatogênese e a maturação espermática epididimária são extremamente afetadas pelas altas temperaturas ambientais, dessa forma, existe a necessidade de que a temperatura testicular esteja de 2ºC a 6ºC abaixo da temperatura corpórea para que não haja mutações espontâneas, e os espermatozóides sejam produzidos com viabilidade para a fertilização (GWAZDAUSKAS, 1985; JOHNSON, 1997; KOIVISTO et al., 2008).

A manutenção da temperatura testicular dá-se pelo balanço entre calor do sangue arterial levado ao testículo pela artéria testicular, o calor gerado pelo metabolismo celular e o calor dissipado da pele do escroto (WAITES, 1970; SETCHELL, 1978).

As diversas características anatômicas permitem a regulação da temperatura testicular, como por exemplo, receptores de temperatura localizados no escroto, quando

estimulados, enviam informações para que haja uma resposta de todo o organismo, diminuindo a temperatura através da taquicardia e transpiração (WAITES, 1970).

Além disso, a pele escrotal possui maior número de glândulas sudoríparas, as quais produzem maior quantidade de suor por unidade de área quando comparadas com glândulas da pele de outra região corpórea. Em trabalho realizado por Waites e Voglymayr em 1963, foi verificado que ao elevar a temperatura escrotal, de carneiros, houve descarga das glândulas sudoríparas em intervalos de até 17 minutos, assim como a queda e subsequente elevação da temperatura testicular, além disso, foi visto que a atividade dessas glândulas foi independente da temperatura corporal, a qual se manteve constante.

Ainda, seu componente muscular permite alteração da espessura e da área superficial do escroto, e também garante a mobilidade testicular. Frente à temperaturas elevadas, este músculo, o Cremáster, relaxa totalmente, afastando as gônadas da parede abdominal e aumentando a superfície de contato entre o testículo e o escroto. Já em baixas temperaturas, esse músculo se contrai, aproximando os testículos do abdômen. No entanto, por se tratar de um músculo estriado, essa contratura não se mantem por períodos muito longos (KASTELIC; COULTER; COOK, 1995).

Dessa maneira, concomitante a esses mecanismos e como componente fundamental para a termorregulação, está a ação do plexo pampiniforme, estrutura constituída pela veia e artéria testiculares, e juntamente com os vasos linfáticos, ducto deferente e artéria e veia diferenciais, formam o funículo espermático (WAITES, 1970). No plexo pampiniforme de todos as animais domésticos, a artéria testicular é uma estrutura extremamente sinuosa, cuja espessura é maior na porção superior, conferindo a característica cônica do funículo espermático (SEALFON; ZORGNIOTTI, 1991).

No mecanismo de contracorrente, o sangue arterial que está entrando no testículo é resfriado pelo sangue venoso que está partindo em menores temperaturas. Esse sistema expressa a propriedade de transferência de calor, e sua eficiência depende das diferenças de temperatura entre os fluidos (SETCHELL, 1978, 1998)

Portanto, falhas em qualquer um desses processos de termorregulação ou ainda temperaturas ambientais extremamente elevadas, resultarão no comprometimento reprodutivo animal, já que o estresse térmico certamente resultará em degeneração testicular.

4.4 CLIMA TROPICAL E ALTERAÇÕES REPRODUTIVAS: BOS TAURUS TAURUS VS BOS TAURUS INDICUS

Os componentes fisiológicos e biológicos animais são afetados por fatores climáticos que incluem temperatura, umidade, radiação solar e vento. Temperaturas extremas aumentam ou diminuem os requerimentos normais de mantença devido a interrupção da homeostase durante a termorregulação, interferindo na troca de calor entre animal e ambiente, culminando em alterações deletéreis na reprodução (GWAZDAUSKAS, 1985).

Maior parte dos rebanhos bovinos mundiais é criada nos trópicos, nessas condições climáticas, a reprodução bovina pode ser afetada pelo estresse térmico; em altas temperaturas ambientais, os mecanismos da termorregulação corpórea são incapazes de promover a perda de calor, havendo um aumento da temperatura interna acima dos limites fisiológicos (CHEMINEAU, 1994), além de resultar em um quadro de degeneração testicular, caracterizado por alterações histológicas do epitélio seminífero (VANDEMARK; FREE, 1970).

O estresse térmico pode diminuir taxas de concepção, aumentar mortalidade embrionária em vacas (WOLFENSON et al., 2000) e diminuir a qualidade seminal de touros (BRITO et al., 2002). Estudos tem mostrado que o aumento da temperatura testicular, causada pela insulação escrotal resulta em diminuição da motilidade progressiva e concentração espermáticas, aumento das anormalidades morfológicas, na porcentagem de lesão acrossomal, bem como alterações das características do plasma seminal (VOGLER et al., 1993; BRITO et al., 2002).

A variação das características seminais, durante as quatro estações do ano já foi bem descrita por alguns autores (REKWOT et al., 1987; KOIVISTO et al., 1996). Em centrais de inseminação artificial situadas na Nigéria, uma grande quantidade de doses de sêmen criopreservado foi descartada após verificarem que a qualidade seminal, após descongelação, variou conforme a estação do ano, sendo menor durante as estações quentes (REKWOT et al., 1987), deixando claro que, mesmo um curto período e uma pequena insulação escrotal já são suficientes para afetar a viabilidade espermática após a descongelação (VOGLER et al., 1993; JANUSKAUSKAS et al., 2007).

Achados de Casady et al. (1953) indicaram que a temperatura ambiental entre 27ºC e 32ºC é crítica para ocorrer o estresse térmico testicular e a exposição contínua à temperaturas superiores a 30ºC são prejudiciais à espermatogêneses.

Fonseca e Chow (1995) induziram o processo degenerativo em touros zebuínos (insulação escrotal), por 7 dias, e verificaram profundas alterações morfológicas,

decréscimo na concentração e motilidade espermáticas. Em concordância, recentemente, Brito et al. (2003a) descreveram aspectos importantes da indução da degeneração testicular, também em touros *Bos taurus indicus*, verificaram que as alterações de núcleo espermático, caracterizadas pela presença de vacúolos nucleares, foram bem proeminentes. Provavelmente, aparecimento desses defeitos morfológicos está associado à sensibilidade das espermátides, nas fases finais da espermiogênese (VOGLER et al., 1993).

Meyerhoeffer, em 1985 verificou que a exposição de touros *Bos taurus taurus* à elevada temperatura resultou em diminuição da qualidade seminal, com base nesse resultado, Koivisto e colaboradores, em 2008, avaliaram as características seminais de touros de origem europeia (*Bos taurus taurus*) e touros de origem indiana (*Bos taurus indicus*) sob efeito das estações do ano, criados na região sudeste do Brasil, notando que a tolerância ao calor foi maior em touros zebus, já que apresentaram melhor motilidade, vigor e morfologia espermáticas, quando comparados às características seminais dos touros europeus, além de que a congelabilidade seminal desses últimos variou consideravelmente ao longo do ano, mas nos ambos genótipos, a congelabilidade foi melhor no inverno do que no verão.

Os animais de origem indiana são conhecidos por se adaptarem melhor às condições tropicais, sendo mais resistentes ao stress térmico quando comparado aos de origem europeia nestas mesmas condições (OHASHI et al., 1998; HANSEN, 2004), pois os zebuínos diferem quanto às características anatômicas e de termorregulação testicular; nesses animais, o escroto e a subtúnica testicular facilitam o gradiente de temperatura (troca positiva), em contraste com touros europeus, cujo gradiente é negativo. Além disso, a espessura da artéria testicular é significativamente inferior em diferentes regiões do parênquima testicular, em relação aos touros europeus, facilitando a troca ou perda de calor gerado pelo aumento do fluxo sangüíneo e metabolismo celular (BRITO et al., 2004), outra característica importante, é que possuem menor conformação, maior relação superfície de pele e tamanho corporal, mais glândulas sudoríparas e menor termogênese (TURNER, 1980).

Estudos de Lopes (2005), demonstram que as raças Bramhan e Senepol (*Bos taurus indicus*) conseguem mostrar uma adaptação às altas temperaturas incluindo funções celulares de termorregulação coordenadas por mecanismos de controle gênico. Em particular embriões de gado indiano (raça Bramhan) foram capazes de sobreviver a temperaturas altas (41ºC por 6 horas) quando comparados a embriões da raça Angus ou Holandeses (*Bos taurus taurus*) submetidos ao mesmo tratamento.

É possível que tais características confiram um aspecto diferenciado na resposta seminal frente ao choque térmico testicular. Devido isso, os bovinos de origem européia,

utilizados em cruzamentos industriais, apresentam menores índices de fertilidade em relação aos bovinos zebuínos (OHASHI et al., 1998).

O mecanismo de estresse térmico que afeta os touros não está restrito apenas ao testículo. Além do estresse testicular, ocorre um mecanismo sistêmico hormonal. Concentrações altas de testosterona são necessárias para as funções testiculares e epididimárias normais. Com o estresse, há o aumento das concentrações de cortisol, que afetam negativamente a produção de testosterona, interferindo na espermatogênese (BARTH; BOWMAN, 1994).

Porém, a hipótese mais clara para explicar a menor fertilidade dos touros europeus, seria o maior índice de estresse oxidativo sofrido em nível testicular (NICHI et al., 2006).

No Brasil, a qualidade do sêmen de touros de raças zebuínas foi considerada inferior aos de raças taurinas, especialmente no período de seca, por Silva (1981), enquanto Koivisto et al. (1998) associaram a qualidade do sêmen (porcentagem de espermatozóides anormais) das duas subespécies com altas temperaturas e umidade relativa do ar, presentes nas estações de primavera e verão. Em Cuba, ambas as subespécies apresentaram sêmen de melhor qualidade (motilidade, concentração, percentagem de espermatozóides vivos) no período frio (MENENDEZ-BUXADERA et al., 1983). Na Índia, as raças zebuínas apresentaram sêmen de melhor qualidade (volume, pH, concentração, movimento de massa, motilidade) na estação quente-chuvosa e as raças taurinas na estação quente-seca (DJIMDE; WENIGER, 1984).

Em geral, quando se compara a qualidade seminal de touros de origem europeia e indiana, fica claro que os primeiros são os que mais sofrem com o estresse térmico (MEYERHOEFFER et al., 1985, NICHI et al., 2006), porém, é importante ressaltar que até mesmo os touros zebus demonstraram alterações seminais devido a variabilidade sazonal (REKWOT et al., 1987).

4.5 ESTRESSE OXIDATIVO

O oxigênio, uma molécula essencial às plantas e animais que, através da oxidação de moléculas biológicas, produz a energia necessária para sua sobrevivência e manutenção do metabolismo celular, também pode ser potencialmente tóxico às células. De modo que em certas condições, o oxigênio pode reagir com determinadas moléculas e

culminar na formação de espécies reativas de oxigênio, dentre elas estão os radicais livres (IWASAKI; GAGNON, 1992).

O radical livre é qualquer espécie química, átomo, íon ou molécula que contem um número de elétrons não pareado na camada de valência, e pode reagir com qualquer molécula que esteja próxima ao seu local de formação (SINGH; JAISWAL, 1992).

Mesmo uma pequena quantidade de oxigênio consumida é reduzida por vias específicas fornecendo uma variedade de substâncias químicas altamente reativas tais como o óxido nítrico (NO), o ânion superóxido (O_2^-), o radical hidroxila (OH^-), e peróxido de hidrogênio (H_2O_2), substâncias essas chamadas de espécies reativas de oxigênio (ROS "*Reactive Oxygen Species*") (CHAN et al., 1999), sendo assim, sua produção é uma conseqüência inevitável desde que haja oxigênio no metabolismo celular (IWASAKI; GAGNON, 1992). A ROS mais reativa e prejudicial é o radical hidroxila (OH^-), que pode ser formado através do H_2O_2 e do O_2^- (HALLIWELL, 1991).

As ROS desempenham dupla função no organismo celular (fisiológica e patológica). Essa função dependerá não somente da natureza das ROS, mas também do momento em que é produzida, de sua concentração, do tempo de exposição (AITKEN et al, 1993a; GRIVEAU et al., 1995), e da eficácia dos mecanismos antioxidantes. Normalmente há certo equilíbrio entre a formação e a proteção contra os radicais livres, caso contrário, as ROS causariam estresse oxidativo e lesão em macromoléculas como lipídeos, proteínas e DNA (BIESALSKY, 2002).

O efeito das ROS, tanto daquelas produzidas endogenamente, como daquelas por agentes contaminantes, é limitado pela presença de vários sistemas regulatórios. Esses sistemas de defesa, não apenas os enzimáticos, mas também os não-enzimáticos mantem o balanço entre a produção e o metabolismo dessas substâncias e ainda agem em todas as etapas no processo de peroxidação (NISSEN; KREYSEL, 1983).

Três enzimas constituem um dos sistemas de proteção: 1. Catalase, a qual permite a degradação do peróxido de hidrogênio (JEULIN et al., 1989); 2. Glutationa Peroxidase, que catalisa a degradação do peróxido de hidrogênio e lipoperóxidos (ALVAREZ; STOREY, 1989); 3. Superóxido Desmutase, a qual acelera a dismutação do ânion superóxido (NISSEN; KREYSEL, 1983). Do outro sistema de proteção, o não-enzimático, fazem parte: a Vitamina E (α -tocoferol), que interrompe a reação em cadeia da peroxidação lipídica (CHOW, 1991); a Vitamina C (ascorbato), que regenera a Vitamina E, de oxidada para ativa, e neutraliza o ânion superóxido e oxigênios livres (DAWSON et al., 1992) 1; a glutationa (GSH), urato, piruvato, taurina e hipotaurina (AGARWAL, 2006).

Ao longo do processo de maturação espermática, a célula perde citoplasma, dessa forma, perde também parte dos mecanismos antioxidantes que são observadas nos outros tipos celulares (DONNELLY; MCCLURE; LEWIS, 1999). Contudo, é o plasma seminal que o protege do ataque oxidativo pela presença de enzimas e moléculas antioxidantes (LEWIS et al., 1997; HSU et al., 1998).

De acordo com estudos feitos por Lewis em 1995, Pasqualotto em 2000 e seus respectivos colaboradores, os níveis de antioxidantes, como vitamina C e E, tanto no espermatozóide como no plasma seminal, são reduzidos nos homens inférteis, quando comparados ao grupo de homens férteis, além disso, foi mostrado, em outro trabalho, os efeitos benéficos desses antioxidantes, quando adicionados durante a preparação espermática para um tratamento de reprodução assistida (HUGHES et al., 1998).

4.5.1 Espécies Reativas de Oxigênio na fertilidade do macho

As espécies reativas de oxigênio exercem dupla influência sobre espermatozóides de mamíferos, por um lado, a adição de antioxidantes em diluidores para criopreservação melhora a qualidade e função espermáticas após a descongelação (BILODEAU et al., 2000), por outro lado, pequenas concentrações de ROS exógenas ou endógenas fazem um papel estimulatório sobre os espermatozóides (AITKEN et al., 1998).

A fonte de maior produção de ROS nos ejaculados de mamíferos são leucócitos e espermatozóides anormais, presentes na maioria do sêmen (AITKEN; WST; BUCKINGHAM, 1994), além da própria mitocôndria, na cadeia de transporte de elétrons, ao realizar o processo de respiração celular.

O fato de que, fisiologicamente, a própria célula espermática produz ROS é apoiado por estudos que comprovam que essas espécies reativas estão envolvidas em funções espermáticas essenciais, tais como sua função cinética, o que permite a movimentação espermática através do aparelho reprodutivo da fêmea, sua função fusogênica, que promove a capacitação, hiperativação, reação acrossômica e a ligação espermática à zona pelúcida (AITKEN et al., 1989a; KODAMA; KURIBAYASHI; GAGNON, 1996).

No entanto, em um estudo de Iwasaki e Gagnon (1992), foi verificado que as ROS são rotineiramente detectadas em 25% das amostras seminais provenientes de homens inférteis.

O espermatozóide é particularmente susceptível à ação das ROS (JONES; MANN, 1977). Acredita-se que tal fato deve-se à pequena quantidade de citoplasma na célula espermática normal, o que limita a quantidade de antioxidantes, principalmente os enzimáticos (VERNET; AITKEN; DREVET, 2004), além de serem ricos em ácidos graxos poliinsaturados em sua membrana plasmática, principalmente o DHA (JONES; MANN; SHERINS, 1979). Esses ácidos graxos são essenciais para propiciar a fluidez necessária para que os espermatozóides atinjam o oócito, promovam a fusão e posteriormente, a fertilização (AITIKEN; KRAUSZ, 2001).

Desde a primeira metade da década de 40 há relatos de que o excesso de ROS diminui a motilidade espermática, e mais adiante, que os radicais livres são produzidos tanto por espermatozóides normais quanto por anormais, entretanto os normais possuem mecanismos de defesa que previnem o dano celular (SULEIMAN et al., 1996), e os anormais, principalmente pela presença de mitocôndrias inativas, produzem mais radicais livres.

Outro aspecto do excesso de produção de ROS pelos espermatozóides anormais parece estar envolvido com defeitos da peça intermediária, associado à retenção do citoplasma, mais especificamente da gota citoplasmática (AITKEN et al., 1994). Nichi et al. (2007), em estudo realizado em sêmen bovino proveniente de epidídimo, células que possuíam gota citoplasmática proximal (defeito maior) apresentaram maior suscetibilidade ao estresse oxidativo quando comparadas às células com gota citoplasmática distal (evento normal em células provenientes de epidídimo).

Para que o espermatozóide seja considerado qualitativamente viável e potencialmente fértil é necessário que possua morfologia, atividade metabólica e membranas normais (JOBIM et al., 2002). Fatores externos às células espermáticas, tais como, alterações na composição, pH, temperatura e osmolaridade do meio que as circunda, podem provocar alterações irreversíveis em suas membranas, limitando a função fertilizante dos das células espermáticas (WATSON, 2000), um exemplo é a peroxidação lipídica, que pode modificar estruturas protéicas, inativar hormônios e enzimas, aumentar a permeabilidade celular, resultando em perda da integridade da membrana e ruptura da célula (LI; SHANG; CHEN, 2004).

As espécies reativas de oxigênio podem atacar qualquer componente celular, porém, os ácidos graxos poliinsaturados são os principais alvos, já que possuem grandes quantidades de duplas ligações (insaturações) (IWASAKI; GAGNON, 1992).

O processo de peroxidação lipídica inicia-se na presença de ROS, que ao ter contato com os ácidos graxos poliinsaturados da membrana plasmática, em especial o DHA, retiram uma molécula de hidrogênio de uma dupla ligação, transformando-o em radical livre, que por sua vez, irá agir em outro ácido graxo poliinsaturado. Este

mecanismo desencadeia a cascata de peroxidação, causando alterações estruturais espermáticas, além da perda de fluidez e da capacidade de regular a concentração intracelular de íons envolvidos no controle do movimento espermático e mudanças no metabolismo celular (AITKEN; KRAUSZ, 2001; MARQUES et al., 2002).

Segundo Ohyashiki, Tsuka, Mohri (1988) e Block (1991) e colaboradores, o ataque dos ácidos graxos poliinsaturados e a reação em cadeia da peroxidação lipídica, causam desorganização na arquitetura da membrana plasmática, que faz com que haja perda da função celular, comprometendo a habilidade do espermatozóide em iniciar os eventos de fusão, reação acrossômica e penetração no oócito, o que resulta na perda da capacidade de fertilização do espermatozóide.

Sustentando essa idéia, a adição de ácido araquidônico, um ácido graxo poliinsaturado, em suspensão de sêmen humano estimulou a geração dose-dependente de ROS e perda de motilidade espermática (AITKEN; BAKER, 2006).

O estresse oxidativo é, dessa maneira, considerado como uma das causas mais freqüentes da disfunção espermática (ATIKEN et al., 1998); além de ser um dos principais fatores associados à perda na fertilidade de amostras de sêmen durante sua manipulação e armazenamento, principalmente quando utilizadas técnicas que necessitam da retirada do plasma seminal (WATSON, 2000; BALL et al., 2001; CALAMERA et al., 2001; AITKEN; BAKER, 2002), ainda, estudos indicam que a perda de qualidade de amostras espermáticas criopreservadas ou sob refrigeração, também pode estar relacionada ao estresse oxidativo (AURICH et al., 1997; BAUMBER et al., 2000), já que, após a descongelação, os processos metabólicos das células voltam a acontecer, dentre eles a produção de espécies reativas de oxigênio (BALL et al., 1999, 2001).

Em pesquisa realizada por Tavilani, Doosty e Salidi (2005), foi mostrado que a concentração de malondialdeído (MDA), produto da peroxidação lipídica, foi quase duas vezes maior em amostras seminais de homens astenozoospérmicos do que em sêmen de homens normozoospérmicos.

Portanto, alterações mitocondriais, danos estruturais do DNA, perda da integridade de membrana e inativação de enzimas têm sido correlacionadas com a formação de lipoperóxido (ATIKEN et al., 1998; SIKKA, 2004), dessa forma, o estresse oxidativo causado pelo acúmulo de ROS afeta, não somente a fluidez da membrana plasmática do espermatozóide, mas também promove danos celulares, que induzem a apoptose das células germinativas culminando em perda da sua função de fertilização (OLLERO; POWERS; ALVAREZ, 2000). Neste sentido, o grupo de pesquisa de Kasimanickam em 2006 verificou que os parâmetros seminais normais de carneiros foram negativamente relacionados ao índice de fragmentação de DNA e peroxidação lipídica.

4.5.2 Mensuração do estresse oxidativo

Muitas pesquisas têm sido feitas a fim de desenvolver índices de estresse oxidativo que possam identificar e quantificar, com acurácia, os efeitos desse processo sobre a infertilidade. Uma vez que, o estresse oxidativo corresponde a um desequilíbrio entre a produção de ROS e a proteção oxidativa no sêmen, torna-se concebível que a avaliação do estresse oxidativo seja feita através da mensuração dos níveis de ROS e/ou seus metabólitos, assim como, dos níveis de antioxidante no sêmen (NICHI, 2003).

Para a dosagem de ROS em amostras seminais são necessárias técnicas muito sensíveis, visto que a produção destes no sêmen é relativamente baixa quando comparada com a produzida por leucócitos, por exemplo, e, além disso, a meia-vida das espécies reativas de oxigênio é muito curta (LUNEC, 1989; KESSOPOULO et al., 1994).

A detecção da peroxidação lipídica do espermatozóide pode ser feita através da utilização de sondas fluorescentes lipofílicas ou mesmo pela cromatografia para avaliação dos lipídeos de membrana, porém estes métodos, apesar de serem sensíveis, são trabalhosos e possuem um custo muito elevado (SHEKARRIZ; THOMAS JR.; AGARWAL, 1995; SHEKARRIZ et al., 1995).

A degradação peroxidativa dos ácidos graxos poliinsaturados leva à formação de produtos finais tóxicos como o 4-hidroxilnonenal e o malondialdeído (MDA) (JONES; MANN; SHERINS, 1979), dessa forma, uma alternativa para a verificação da peroxidação lipídica é a dosagem de produtos finais deste processo que se mantém nos fluidos corporais, como, por exemplo, o (MDA) (AITKEN; HARKISS; BUCKINGHAM, 1993a; SIDHU et al., 1998), cujas concentrações apresentam correlação negativa com a motilidade espermática e com a penetração em oócito de hamster (AITKEN et al., 1989; 1993a,b).

A ocorrência da peroxidação lipídica em espermatozóides leva a um acúmulo progressivo de hidroperóxidos lipídicos na membrana plasmática espermática que posteriormente se decompõem para formar o MDA (SLATER, 1984; JANERO, 1990). A avaliação dos níveis de MDA tem sido extensivamente utilizada como marcador da peroxidação lipídica (SLATER, 1984; JANERO, 1990; NICHI, 2003).

Entre os diferentes métodos analíticos estabelecidos, a reação com o ácido 2-tiobarbitúrico (TBA) é o mais utilizado, sendo que nesta reação, o composto formado pela reação entre o MDA e o TBA pode ser mensurado através de sua absorbância ou fluorescência. Estes produtos são então chamados de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) (JANERO, 1990).

Em trabalho de Zalata et al., em 1998, estudaram o efeito do estresse oxidativo induzido, através da peroxidação lipídica dos ácidos graxos que compõe os espermatozóides, e encontraram que o aumento da produção de TBARS estava associado com uma diminuição significativa dos ácidos graxos poliinsaturados.

Um ano mais tarde, Zabludovky et al. (1999), verificaram que os níveis de TBARS em amostras seminais humanas foram inversamente correlacionados ($r = -0,59$, $p < 0.01$) com as taxas de fertilização *in vitro*. Além disso, os níveis de TBARS foram significativamente maiores nas amostras que possuíam taxa de fertilização igual a zero, quando comparadas com as amostras com taxa de fertilização maior que zero. Neste mesmo estudo, foram verificadas correlações entre os níveis de TBARS e volume espermático, número total de espermatozóides no ejaculado e morfologia espermática normal ($r = -0,48$, $p < 0,01$; $r = -0,42$, $p < 0,01$; $r = -0,35$, $p < 0,04$; respectivamente).

O ferro é o metal mais envolvido nas reações de peroxidação lipídica, como, por exemplo, na reação de Fenton. Em condições fisiológicas do organismo, o Fe^{3+} não tem a capacidade de induzir, significativamente, a formação do radical hidroxila, já que está associado à proteínas, no entanto, se esse existir em seu estado livre no plasma seminal, apoiará a reação em cadeia da peroxidação lipídica (KWENANG et al., 1987; AITKEN et al., 1993).

A adição de metais (ferro ou cobre) no sêmen de humanos resulta em uma aceleração dose dependente da peroxidação lipídica e uma diminuição na motilidade e potencial fertilizante dessas células (AITKEN et al., 1989).

Sendo assim, uma ferramenta importante e muito utilizada para a avaliação dos níveis de proteção antioxidante e de peroxidação lipídica é a geração artificial de ROS, o que permite avaliar dois aspectos: a peroxidação lipídica espermática e a disponibilidade de hidroperóxidos lipídicos na membrana plasmática do espermatozóide, pelos quais iria se iniciar a reação peroxidativa em cadeia; e a habilidade do espermatozóide em inibir a propagação deste processo através de mecanismos antioxidantes (AITKEN; HARKISS; BUCKINGHAM, 1993a).

Uma das formas de se induzir a produção de ROS é através da reação entre a hipoxantina e a xantina oxidase, que resultaria em uma redução univalente e bivalente da molécula de oxigênio para gerar ânion superóxido, e do peróxido de hidrogênio respectivamente. Estes radicais irão dar origem ao radical hidroxila, que é altamente reativo e especialmente deletério ao espermatozóide (AITKEN; HARKISS; BUCKINGHAM, 1993 a, b; SIKKA, 1996).

Outra técnica frequentemente utilizada para provocar a peroxidação lipídica, é a indução pelo sistema sulfato de ferro ($FeSO_4$) + ácido ascórbico (AITKEN; HARKISS;

BUCKINGHAM, 1993b; GRIVEAU et al., 1995). Esta técnica se baseia na formação de metais de transição (Ferro e Cobre) que irão catalisar a quebra de hidroperóxidos pré-existentes iniciando a propagação da reação em cadeia da peroxidação lipídica promovida pelo ferro através da reação de Fenton. O ácido ascórbico, por sua vez, provocaria a redução do Fe^{3+} para Fe^{2+}, alimentando novamente a reação (AITKEN; HARKISS; BUCKINGHAM, 1993b; ENGEL; SCHREINER; PETZOLDT, 1999).

4.6 AVALIAÇÃO SEMINAL

A avaliação da qualidade seminal apresenta como objetivos principais predizer o potencial de fertilidade em indivíduos desconhecidos; determinar aqueles de maior fertilidade dentro de um grupo com fertilidade conhecida; e estabelecer características confiáveis, repetitivas e de fácil comparação entre indivíduos, e que tenham boa relação com indicadores de fertilidade (AMANN; HAMMERSTEDT, 1993).

Vale ainda ressaltar que nenhum teste de avaliação, isolado, é suficiente para que a capacidade fertilizante seja verificada, sendo necessária a soma das análises de cada característica espermática a fim de alcançar um diagnóstico acurado (AX et al., 2004).

Neste sentido, muitos métodos laboratoriais foram desenvolvidos com a finalidade de identificar aspectos pertinentes à composição estrutural e funcional da célula espermática. Conforme a natureza e especificidade de cada teste, pode-se dividi-los em dois grandes grupos: testes convencionais e testes funcionais.

4.6.1 Testes convencionais

Problemas comuns de subfertilidade e infertilidade, tanto em humanos, como em animais, são caracterizados por baixa concentração espermática, alto número de células com morfologia anormal e baixa porcentagem de motilidade e vigor (WALLACE, 1992).

Por isso, as técnicas clássicas de avaliação seminal consistem de uma série de análises descritivas que visam determinar o volume de ejaculado, pH, proporção de

espermatozóides móveis, motilidade progressiva, concentração espermática, morfologia estrutural, entre outras (HOWARD, 1993) .

Usualmente, a motilidade e vigor espermáticos são estimados de forma subjetiva, sendo analisados sob microscopia óptica, com uma gota de sêmen entre lâmina e lamínula, estimando-se a porcentagem, apenas visualmente. Por sua vez, as anormalidades espermáticas são avaliadas em esfregaços corados ou câmara úmida, também sendo uma análise altamente imprecisa (VERSTEGEN; IGUER-OUADA; ONCLIN, 2002; ARRUDA; CELEGHINI; ANDRADE, 2004).

O caráter móvel dos espermatozóides é um meio facilmente distinguível de determinar seu estado fisiológico, e é amplamente aceito que a boa motilidade é um componente central para a fertilidade normal (TURNER 2003; 2006). Foi visto que espermatozóides com pouca ou nenhuma motilidade apresentaram baixa concentração de ácidos graxos poliinsaturados, em especial o DHA, juntamente com um alto grau de peroxidação lipídica (NISSEN; KREYSEL, 1983).

A estimativa da porcentagem de células espermáticas exibindo movimento progressivo é a avaliação mais utilizada durante a análise seminal e deve ser superior a 70%, quando se trata de amostra seminal fresca (FONSECA et al., 1997). No entanto, esta avaliação é considerada, em geral, mais como uma forma de verificar a viabilidade da célula espermática do que predizer sua fertilidade, pois, os espermatozóides podem perder sua capacidade fertilizante, antes mesmo de perder a motilidade (AX et al., 2004).

A energia necessária para a motilidade é derivada, aparentemente, das reservas intracelulares de adenosina trifosfato (ATP), sua utilização parece ser regulada pelo nível endógeno de adenosina monofosfato cíclico (AMPc). O AMPc não só regula a degradação do ATP, como também tem efeito direto sobre a motilidade espermática (TURNER, 2003).

Na determinação do vigor estima-se a intensidade dos movimentos que acaba influenciando a velocidade. O mesmo varia de 0, sem movimentos, até 5 com movimento muito intenso (FONSECA et al., 1997). Tal fato faz com que as avaliações da motilidade e vigor por meio visual sejam consideradas como um método subjetivo, mesmo quando feita por técnicos bem treinados, que apresentam uma boa repetibilidade e confiança nas avaliações (ROTA et al., 2004).

Uma determinação acurada do número de espermatozóides por volume de ejaculado determina quantas fêmeas poderão ser inseminadas. A concentração espermática pode ser realizada através de hemocitômetro, fotocolorímetro ou espectrofotômetro, sendo uma técnica extremamente importante de análise, já que seus

parâmetros variam devido a fatores como método e frequência de coleta, idade do reprodutor e saúde testicular (AX et al., 2004).

Todos esses testes são essenciais para fornecer informações fundamentais da qualidade espermática, e formar a base para diagnósticos iniciais, no entanto, seus valores clínicos para predizer a fertilidade são um tanto quanto questionáveis (LEWIS; AGBAJE, 2008).

Sendo assim, já é amplamente aceito que os testes espermáticos convencionais são muito pobres para confirmar a fertilidade espermática, uma vez que, para serem capazes de fertilizar o oócito e permitir o desenvolvimento embrionário, os espermatozóides precisam apresentar diversos atributos (GRAHAM; KUNZE; HAMMERSTEDT, 1990).

De acordo com Aitken (2006), a fertilidade de uma determinada amostra seminal é determinada pela sua competência funcional, o que não pode ser avaliada baseando-se nos testes morfológicos convencionais rotineiramente utilizados. Sendo assim, alguns testes voltados para a avaliação das diferentes funções da célula espermática foram desenvolvidos; estes são denominados Testes Funcionais (RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, 2003; RIJSSELAERE et al., 2005).

4.6.2 Testes funcionais

As análises convencionais de sêmen tem provado variabilidade e falta de parâmetros para o prognóstico da fertilidade, sendo assim, na última década vários marcadores moleculares da fertilidade vem sendo amplamente utilizados (LEWIS; AGBAJE, 2008), além disso, uma grande diversidade de biotécnicas está sendo desenvolvida para uma avaliação seminal mais precisa e específica, como uso de técnicas para verificação da integridade das estruturas da célula espermática, testes hiposmóticos, resistência ao ataque das espécies reativas de oxigênio e estresse oxidativo (BARROS, 2007).

Os testes funcionais podem ser divididos de acordo com as diferentes funções de cada componente da célula espermática, tais como avaliação da integridade de membrana plasmática, integridade do acrossomo, integridade do material genético e atividade mitocondrial da peça intermediária, entre outros (RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, 2003).

4.6.2.1 Integridade da membrana plasmática

A membrana plasmática das células espermáticas é um agregado de lipídeos e proteínas, construída durante a espermatogênese e modificada durante o trânsito e armazenamento no epidídimo e ejaculação (GADELLA et al., 2000).

Ela é composta basicamente de uma bicamada de lipídeos, formada por fosfolípides polares, cuja porção hidrofóbica encontra-se direcionada para o centro da membrana celular, e a hidrofílica para sua superfície, além de colesterol, proteínas estruturais e periféricas interligadas à camada lipídica. Os principais lipídeos presentes nesta estrutura celular são fosfolipídeos como colina, serina, glicerol e inositol, glicoesfingolipídeos e esteróides (FLESCH; GADELLA, 2000).

A composição lipídica da membrana espermática só é estabelecida após sua maturação epididimária (HOLT; NORTH, 1984; LENZI et al., 1996) e exerce um significativo efeito sobre a qualidade funcional do espermatozóide. Os ácidos graxos, um dos constituintes lipídicos, influenciam as propriedades da membrana celular como sua fluidez, integridade, permeabilidade e resistência ao estresse físico e químico (PARKS; LYNCH, 1992).

Os ácidos graxos são classificados como saturados, aqueles que possuem ligações simples na cadeia e insaturados apresentando uma ou mais duplas ligações entre carbonos. As duplas ligações dos ácidos graxos poliinsaturados tornam os espermatozóides mais susceptíveis, pois os radicais livres reagem com estes e formam lipoperóxidos que compõem a cascata de reações degenerativas dos lipídeos (TAVILANI et al., 2006).

Os espermatozóides, dessa forma, são altamente vulneráveis à peroxidação lipídica uma vez que contêm alta concentração de ácidos graxos poliinsaturados presentes na bicamada de fosfolípides que formam a membrana plasmática, (ALVAREZ; STOREY, 1992). Esses representam cerca de 60% dos ácidos graxos totais presentes na membrana, o principal deles é o DHA, que possui seis duplas ligações insaturadas por molécula e constitui cerca de 50% dos ácidos graxos poliinsaturados do espermatozóide (JANUSKAUSKAS; JOHANNISSON; RODRIGUEZ-MARTINEZ, 2003).

Nissen e Kreysel (1983), mostraram que a concentração de DHA foi significativamente mais baixa em amostras seminais de homens com oligozoospermia e astenozoospermia do que os normozoospérmicos, indicando que há certa correlação entre a concentração de DHA e a densidade espermática.

Mais tarde, em estudo de Tavilani et al. (2006), foi encontrado o mesmo resultado, porém, agora em relação aos ácidos graxos poliinsaturados totais. Um ano depois, esse mesmo grupo de pesquisadores mostraram que as alterações na composição lipídica do espermatozóide é que podem estar relacionadas com a infertilidade daqueles homens astenozoospérmicos, sofrendo mais ataque dos radicais livres (TAVILANI et al., 2007).

A membrana plasmática possui um importante papel nos processos de capacitação e fertilização do oócito e sua constituição bioquímica é um dos principais pontos de interesse do estudo da fisiologia e patologia espermática (KUMI-DIAKA, 1994; LENZI et al., 1996). Teorias sobre a fusão de membranas (oócito/espermatozóide) sugerem que sua fluidez é pré-requisito para a função normal da célula (LENZI et al., 2002). É responsável ainda, pela manutenção do equilíbrio osmótico e atua como uma barreira mantendo, assim, diferenças de composição entre os meios intra e extracelulares (SQUIRES et al., 1999a).

A integridade da membrana plasmática é essencial para que o espermatozóide sustente sua atividade metabólica, sofra capacitação e, posteriormente, ligue-se e penetre na zona pelúcida (TÖPFER-PETENSEN et al., 2000). Portando, danos nesta estrutura, que é a mais afetada pelo choque frio, podem levar à perda da homeostase, comprometimento da sobrevivência espermática no trato genital da fêmea, perda da sua capacidade fertilizante e posterior morte celular (AMANN; PICKETT, 1987).

Baseado nestes fenômenos, testes laboratoriais específicos para análise das condições estruturais da membrana tem sido incluídos no diagnóstico da viabilidade espermática (RODRIGUEZ-MARTINEZ; LARSSON; PERTROFT, 1997; JANUSKAUSKAS; JOHANNISSON; RODRIGUEZ-MARTINEZ, 2003). A integridade da membrana plasmática pode ser avaliada pelo teste hipo-osmótico, pelo uso de sondas fluorescentes, em microscopia de campo claro através do uso de corantes supra-vitais como: trypan-blue (KOVÁS; FOOTE, 1992) e eosina-nigrosina (HANCOCK, 1951), sendo este último, por sua praticidade e custo, o método rotineiramente mais utilizado para esta finalidade (JEYENDRAN et al., 1984; KUMI-DIAKA; BADTRAM, 1994).

Graham et al. (1990) compararam a eficiência do iodeto de propídeo (sonda fluorescente) com a técnica de coloração por eosina/nigrosina e encontraram correlação positiva (r=0,78) entre as técnicas e intervalo de confiança de 95%. A correlação positiva entre essas técnicas também foi observada em sêmen de cachaço (r=0,71) e de touro (r=0,83) (PINTADO et al., 2000).

Teoricamente, a integridade da membrana em uma célula viva impede a impregnação de colorações, o que não acontece em células mortas cujas membranas estão alteradas (WHO, 1992). A proporção entre células coradas e não coradas de uma

determinada amostra (porcentagem de células mortas e vivas, respectivamente), através do método de coloração Eosina/Nigrosina (E/N), foi descrita para o sêmen de diversas espécies, como suínos, caprinos, cães e felinos (POTO et al., 2000; LILY-PALOMINO et al., 2001; AXNÉR; LINDE-FORSBERG, 2003; PEÑA, NÚÑEZ-MARTÍNEZ; MORÉN, 2006).

4.6.2.2 Integridade da membrana acrossomal

O acrossomo é uma estrutura de dupla parede, situada na cabeça do espermatozóide entre a membrana plasmática e a porção anterior do núcleo (GARNER; HAFEZ, 2004). Este é formado a partir do aparelho de Golgi (GUYTON; HALL, 1997), e nele estão contidas as enzimas acrossomais, que são liberadas durante a reação acrossômica, evento essencial para a penetração do espermatozóide na zona pelúcida e fusão com a membrana plasmática do oócito (FLESCH; GADELLA, 2000).

Segundo Yanagimachi (1994), a capacitação espermática é um pré-requisito para a reação acrossomal na maioria dos mamíferos, que consiste na fusão entre a membrana externa do acrossomo e a porção da membrana plasmática que o envolve, levando à liberação das enzimas acrossomais.

Fisiologicamente, esta reação ocorre quando o espermatozóide entra em contato com a zona pelúcida, permitindo a penetração na mesma e a fusão com a membrana plasmática do oócito (YANAGIMACHI, 1994). Se a capacitação não ocorrer no seu devido tempo a fertilização estará comprometida, o que geralmente acontece quando o sêmen apresenta alterações acrossomais (LONG et al., 1996).

Portanto, a integridade acrossomal, bem como a manutenção de suas enzimas são cruciais para que ocorra a fertilização. Desta maneira, é muito importante aplicar técnicas seguras de avaliação ao se estudar viabilidade espermática (BAILEY; BILODEAU; CORMIER, 2000).

A avaliação da integridade da membrana acrossomal pode ser feita observando suas alterações morfológicas (microscopia eletrônica) ou através de testes funcionais, lançando-se mão do uso de corantes ou de sondas fluorescentes (TALBOT; CHACON, 1981; POPE; ZHANG; DRESSER, 1991; HARAYAMA; KUSUNOKI; KATO, 1993).

Diante disso, Pope, Zhang e Dresser (1991) desenvolveram um método simples e rápido para a coloração desta organela, comprovando sua eficácia para a avaliação da integridade acrossomal do espermatozóide de gato doméstico (*F. catus*), gato-do-

deserto-indiano (*F. silvestris ornata*), do gato selvagem (*F. chaus*) e do leopardo-das-neves (*P. uncia*). Desde então, esta coloração vem sendo cada vez mais utilizada para avaliação da integridade acrossomal de espermatozóides de diversas espécies (SPINDLER et al., 2004).

4.6.2.3 Atividade citoquímica mitocondrial

A mitocôndria é uma organela presente em todos os tipos celulares e constitui um exemplo de interação morfofuncional, pois fornece a fundação sobre a qual estão localizadas as moléculas que participam nas reações que transferem energia depositada nas fontes calóricas para a molécula de ATP (DE ROBERTS; HIB, 2001).

A principal função da mitocôndria é a produção de ATP. Assim como a integridade estrutural das membranas, a motilidade da célula espermática também exerce um papel fundamental na fertilização (KATO et al., 2001).

A motilidade do espermatozóide é gerada basicamente pelo movimento flagelar de sua cauda, e este movimento exige um gasto energético alto, sendo a desfosforilação da adenosina tri-fosfato (ATP) a principal fonte de energia consumida neste processo. A célula espermática produz altas quantidades de ATP através das mitocôndrias da peça intermediária, dirigida pelo potencial de membrana mitocondrial interno que é gerado pela cadeia respiratória (WOOLLEY, 1971). Portanto, é indispensável que haja produção de ATP pelas mitocôndrias para que haja motilidade espermática (COSSON, 1996).

Durante a espermatogênese ocorre uma série de mudanças na peça intermediária, como a disposição helicoidal das mitocôndrias ao redor do flagelo, é a divisão das mitocôndrias em mitocôndrias esféricas e a disposição ponta a ponta destas em duas hélices contíguas, que as permitem produzir toda a energia requerida durante o processo de fecundação (WOOLLEY, 1971; DE MARTINO et al., 1979).

Kramer et al., em 1993, afirmam que, associado à motilidade, o "status" mitocondrial e a integridade da membrana são fatores importantes para determinar a fertilidade. Mais tarde, Vetter et al. (1998), reportaram que o "status" mitocondrial pode ser útil em estudos toxicológicos do sêmen, especialmente aqueles que envolvem componentes que podem alterar o metabolismo energético sem afetar a integridade da membrana.

Estudos para mensurar o potencial de membrana de mitocôndria, evidenciaram que a atividade mitocondrial está envolvida no processo de oxidação e produção de energia ao espermatozóide (KATO et al., 2001). A avaliação da atividade mitocondrial pode ser realizada utilizando-se testes tais como a Rodamina 123, o JC-1 e o Mito-tracker®, entre outros. No entanto, na maioria das vezes, estes testes, por utilizarem fluorescência, se tornam muito dispendiosos e pouco práticos para sua utilização rotineira, visto que o material precisa ser analisado num curto espaço de tempo (CELEGHINI et al., 2007).

Diante disto, é de grande valia utilizar técnicas mais antigas, como a desenvolvida por Hrudka (1987), a qual se trata de um ensaio citoquímico para demonstração qualitativa e quantitativa da atividade da enzima Citocromo C-Oxidase (CCO) – enzima da cadeia respiratória responsável pela produção de energia do espermatozóide – através da 3,3'-diaminobenzidina (DAB).

O método citoquímico desenvolvido por Hrudka (1987) baseia-se na oxidação da 3,3'-diaminobenzidina (DAB) pelo Complexo Citocromo C, o que inclui a CCO. Através de uma reação em cadeia, o DAB é polimerizado e se deposita nos locais onde ocorre a reação, ou seja, nas mitocôndrias. Esta deposição pode ser identificada através de microscopia convencional pela sua coloração marrom. Desta maneira, é possível descrever o declínio espontâneo da CCO ocasionado por tratamentos físicos e/ou químicos a que os espermatozóides são submetidos.

4.6.2.4 Integridade de DNA

O núcleo do espermatozóide apresenta a sua cromatina altamente compactada e estável, diferindo substancialmente das células somáticas, cuja cromatina tem volume seis vezes maior (SHEN; ONG, 2000). Responsável por um terço do peso da célula espermática, a cromatina nuclear apresenta como principais componentes o DNA e proteínas, essas são conhecidas coletivamente como *histonas espermáticas*, e estabilizam o DNA nuclear, conjugando-se com o mesmo através de ligações sulfídricas (GARNER; HAFEZ, 1995; SAKKAS; MARIETHOZ; MANICARDI, 1999).

Essa compactação densa proporciona ao DNA, proteção contra agentes exógenos (OZMEN et al., 2007), contudo, ainda é possível encontrar níveis basais de DNAs danificados tanto em homens férteis, como inférteis (MC KELVEY-MARTIN et al., 1997). Isso pode ser explicado pelo fato de que o mecanismo de reparação de material genético já está inativo durante o trânsito epididimário e pós-ejaculação; pela maquinaria para

apoptose celular já estar indisponível após a maturação, sendo assim, células defeituosas não poderiam ser "deletadas"; entre outros fatores (WHO, 1999).

A integridade da cromatina é essencial para o desenvolvimento embrionário após a fertilização e união dos pró-núcleos feminino e masculino. Vários autores tem sugerido que espermatozóides que possuem núcleos irregulares apresentam cromatina com estrutura alterada, e que essas alterações poderiam ser detectadas por padrões anormais de desnaturação do DNA em testes específicos (GLEDHILL; DARZYNKIEWICZ; RINGERTZ, 1971; FRASER, 2004).

O DNA de células de morfologia irregular é menos resistente à desnaturação térmica, todavia, muitos espermatozóides normais de doadores subférteis também são anormalmente susceptíveis à desnaturação térmica de seu material genético, sendo que a sensibilidade da cromatina ao estresse térmico pode ser um determinante adicional da fertilidade (EVERSON, 1980).

Danos no DNA espermático estão intimamente associados a numerosos indicadores da saúde reprodutiva, incluindo fertilização, qualidade embrionária, implantação, abortamento espontâneo e doenças na prole (LEWIS; AGBAJE, 2008).

Nesse sentido, distúrbios na organização do material genômico do espermatozóide podem ter um sério impacto na fertilidade, pois, ainda que com seu material genético fragmentado, o espermatozóide pode vir a fecundar o oócito podendo causar problemas na prole ou mesmo em gerações futuras (HUGHES et al., 1998; HAINES, 2001). Mesmo as amostras espermáticas com resposta satisfatória em testes de penetração, poderiam gerar, por exemplo, indivíduos com maior susceptibilidade a doenças ou anormalidades de desenvolvimento (AITKEN, 1999).

Os primeiros estudos sobre mudanças na organização do núcleo espermático, nos bovinos, foram descritos por Gledhill et al. (1966). Mais tarde, diversos autores descreveram que a organização anormal da cromatina espermática é mais freqüente em machos subférteis e inférteis (SAKKAS; TOMLINSON, 2000; SHEN; ONG, 2000; DONNELLY et al., 2001).

Diversos fatores tem sido associados à presença de anormalidades na cromatina espermática, em especial, ao efeito de agentes tóxicos e patogênicos, mutação gênica e cromossomal e, mais freqüentemente, pela perda da termorregulação testicular (SLIZINSKA; SLIZINSKI, 1953; KARABINUS et al., 1997; SAAKAS et al., 1999). As alterações na cromatina originam-se a partir da diferenciação pós-meiótica, especificamente, durante o remodelamento nuclear, e estão intimamente associadas à presença de fendas no DNA e anormalidades na topoimerase II, enzima responsável pela reparação contínua de pequenas alterações no DNA. A inibição dessa enzima, antes de

completar a espermiogênese, favorecerá o aparecimento de fragmentação no DNA ou, em parte, da cromatina nuclear (RISLEY; EINHEBER; BUMCROT, 1986). Além desse aspecto, as falhas na estrutura do DNA, podem ocorrer na presença de altos níveis de estresse oxidativo e produção de H_2O_2 no ambiente testicular (TWIGG et al., 1998).

Como já se sabe, o DNA espermático se difere das células somáticas pela alta suscetibilidade ao dano oxidativo, devido, tanto a presença de grande quantidade de ácidos graxos poliinsaturados, que funcionam como substratos para os radicais livres, como pela escassez de anti-oxidantes e mecanismos de reparo (AITKEN; FISHER, 1994; AITKEN; KRAUSZ, 2001).

Sendo assim, a produção excessiva de ROS, além de atuar na fluidez e na integridade da membrana plasmática, atua também no DNA do núcleo espermático (AITKEN, 1999). Relações entre estresse oxidativo e danos no DNA espermático já foram reportados em diversos estudos (CUMMINS, 1998; TWIGG; IRVINE; AITKEN, 1998; IRVINE et al., 2000).

Dentre os compartimentos sobre os quais a criopreservação pode causar algum tipo de efeito negativo na célula espermática, o núcleo pode ser um elemento importante no contexto (HAMAMAH et al., 1990).

Com isso, a queda na fertilidade de amostras de sêmen humano criopreservadas foram observadas e sugeridas como sendo em decorrência da maior condensação da cromatina (ROYERE et al., 1991). A criopreservação do sêmen bovino também pode causar alterações do DNA e diminuição da fertilidade (ANZAR; BUHR, 2002). Contudo o sucesso da ampla utilização da inseminação artificial com sêmen congelado de bovinos fornece indícios de que poucos danos no genoma haplóide do espermatozóide devem ocorrer (WATSON, 1995).

Já é bem aceito que testes relacionados à integridade do DNA espermático são bem promissores no diagnóstico e tratamento da infertilidade masculina (LEWIS; AGBAJE, 2008), dessa maneira, nos últimos 25 anos, foram desenvolvidos diversos métodos para a avaliação de fragmentação de fitas de DNA espermático "*in situ*", sendo que os quatro principais testes para tal avaliação, são: o Ensaio TUNEL ("*Terminal Uridine Nick End Labelling*"); o Ensaio SCSA ("*Sperm Chromatin Structure Assay*"); e o SCGE ("*Single-Cell Gel Eletrophoresis*"), também chamado de Ensaio Cometa (EC) (EVENSON; WIXON, 2006).

O Ensaio TUNEL é um método enzimático de detecção da fragmentação de DNA resultante da cascata de sinalização apoptótica no qual a presença da fragmentação é identificada pela TdT (Transferase deoxinucleotidil Terminal), uma enzima que irá catalisar a adição do nucleotídeo dUTP (*deoxiuridina trifosfatada*) conjugado a uma

fluoresceína à região livre do grupo 3' hidroxil. (GAVRIELI; SHERMAN; BEN-SASSON, 1992; PAULA-LOPES, HANSEN, 2002). Durante anos, a técnica teve sua acurácia questionada, pois o protocolo original também poderia marcar as células necróticas, além das apoptóticas (GRASL-KRAUPP et al., 1995). Hoje em dia, com a técnica melhorada, é possível identificar apenas as células na fase final da apoptose (NEGOESCU et al., 1996, 1998).

O Ensaio SCSA faz a determinação qualitativa da integridade da cromatina espermática, definida pela susceptibilidade do DNA à desnaturação ácido-induzida "*in situ*" (LARSON et al., 2000). Para esta técnica, uma solução de baixo pH desnatura o DNA nos espermatozóides com a cromatina alterada (o que não acontece com a cromatina intacta), e com o uso de um corante fluorescente intercalante pode-se fazer a determinação através da citometria de fluxo (EVENSON; JOST, 1994).

O Ensaio Cometa (EC), inicialmente desenvolvido para estudos toxicológicos, se baseia em princípios da eletroforese associada ao uso de corantes intercalantes fluorescentes, sendo o único capaz de mensurar o grau de fragmentação do DNA de cada célula individualmente (DUTY et al., 2002). Por este motivo, Sakkas e Tomlinson (2000), afirmam que o Ensaio Cometa não pode deixar de ser usado em exames prognósticos de fertilidade. O EC também já foi reportado como ferramenta para avaliar os danos provocados pela criopreservação e pelo estresse oxidativo sobre a célula espermática (SAKKAS; TOMLINSON, 2000; SHEN; ONG, 2000; DONNELLY et al., 2001; ONG; SHAN; CHIA, 2002).

Recentemente Slowinska, Karol e Ciereszko (2008) compararam a integridade de DNA, através do EC, entre amostras seminais frescas e criopreservadas de bovinos.

MATERIAIS E MÉTODOS

5 MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 LOCAL

O presente estudo foi conduzido no Laboratório de Andrologia (LA), do Departamento de Reprodução Animal (VRA), da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (FMVZ-USP) e no Laboratório de Urologia e Reprodução Humana, da Escola Paulista de Medicina da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP).

5.2 AMOSTRAS SEMINAIS

Foram utilizadas amostras criopreservadas de 40 bovinos adultos, sendo 20 da raça Nelore (*Bos taurus indicus*) (Figura 2) e 20 da raça Simental (*Bos taurus taurus*) (Figura 3) com idades entre 3 e 4 anos, criados extensivamente em pasto composto de braquiária (*Brachiaria* sp.), em região de clima tropical (Dourados,MS), usados na reprodução por monta natural a campo.

Fonte: <HTTP://www.abspecplan.com.br/?modulos/abs_produtos/ver:15>. Acesso em junho de 2009.

Figura 2 - Touro da raça Nelore (*Bos taurus indicus*)

Fonte:<HTTP://www.crvlagoa.com.br/animais.asp?idR=29&Nome=SIMENTAL>. Acesso em junho de 2009.

Figura 3 - Touro da raça Simental *(Bos taurus taurus)*

Destas 20 amostras de cada subespécie, 10 delas foram coletadas durante o inverno, e as outras 10 foram coletadas durante o verão.

5.3 COLETA E CRIOPRESERVAÇÃO DE SÊMEN

As coletas de sêmen foram realizadas, previamente, durante inverno e verão, em quatro períodos: agosto de 2000 (inverno), fevereiro de 2001 (verão), julho de 2001 (inverno) e fevereiro de 2002 (verão).

Os animais foram devidamente posicionados em tronco de contenção e estimulou-se a micção. O sêmen foi coletado pelo método de eletroejaculação, depois da lavagem externa e interna do prepúcio, sendo esta última feita com solução salina e esvaziamento de conteúdo retal. Após esse procedimento, introduziu-se a probe e iniciaram-se os estímulos, primeiramente com baixa intensidade, mantendo-os por alguns segundos, e posteriormente com estímulos mais fortes até que o animal começasse ejacular. O

material foi colhido em tubo graduado estéril, pré-aquecido, protegido com peça de isopor contra choque térmico e iluminação.

Após a coleta, as amostras seminais foram diluídas em meio TRIS (Anexo B), até a concentração final mínima de $40x10^6$ espermatozóides /ml e refrigeradas até atingirem 5°C, por duas horas. Após esse período, foi adicionado diluidor contendo glicerol, e envasadas em palhetas de 0,5 ml. As palhetas foram dispostas horizontalmente no vapor de nitrogênio líquido, durante 20 minutos, e posteriormente submersas, em seguida, foram colocadas em raques e acondicionadas nos canecos do botijão de criopreservação até o presente experimento.

5.4 PROCESSAMENTO E AVALIAÇÃO DO SÊMEN

As palhetas, estocadas em botijão de nitrogênio líquido, foram descongeladas em banho-maria, a uma temperatura de 37°C durante 30 segundos e submetidas aos testes convencionais e funcionais. Foram utilizadas duas palhetas de cada animal (Figura 4).

Essas foram secas, com papel absorvente, cortadas, e o sêmen foi recolhido em tubos tipo *Eppendorf®*, os quais foram mantidos em banho-maria, a 37°C, durante todo o processo de análise seminal.

Após avaliação da motilidade e vigor espermáticos, as amostras seminais foram submetidas à duas lavagens para remoção de todo diluidor/crioprotetor. Para isso, foi adicionado ao sêmen, tampão-fosfato-salino (PBS - *Phosphate buffered saline)* pré-aquecido (37°C), e centrifugados[1] em 800g durante 10 minutos, após esse processo, o sobrenadante foi descartado e os "pellets" de espermatozóides foram ressuspendidos novamente em PBS (37°C).

[1] Centrífuga 5804R – Eppendorf®.

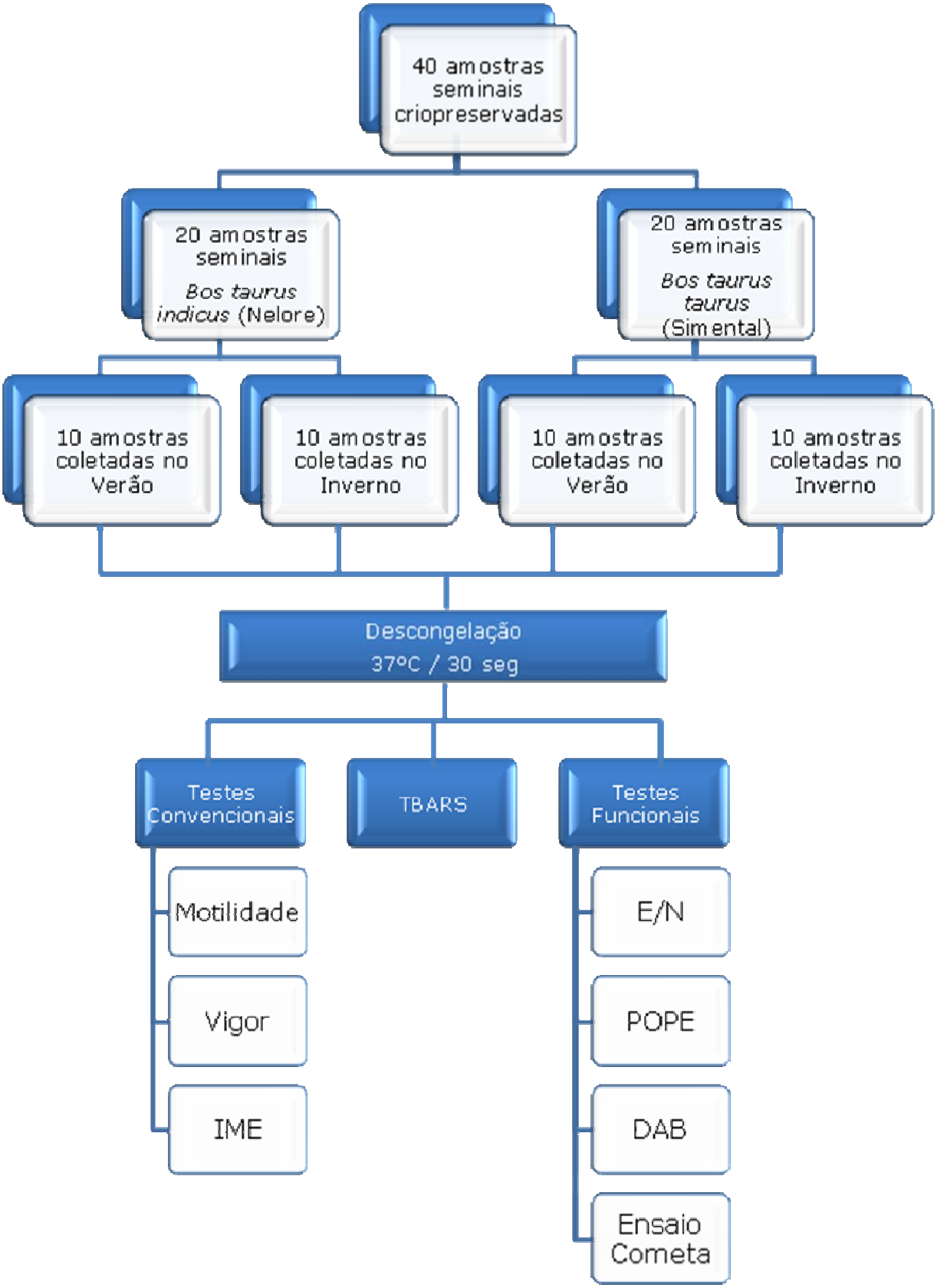


Figura 4 - Ilustração esquemática dos procedimentos experimentais

5.4.1 Testes convencionais

Os testes convencionais utilizados neste experimento foram motilidade e vigor espermáticos, através dos quais foi calculado o índice de motilidade espermática.

5.4.1.1 Avaliação da motilidade espermática

Para que o espermatozóide seja capaz de percorrer todo o trato reprodutivo da fêmea e atingir o local de fertilização é de extrema importância que ele apresente boa motilidade progressiva e vitalidade.

Para tal, uma gota de sêmen foi colocada entre lâmina e lamínula (pré-aquecidas, 37°C), e observada em microscopia de luz transmitida, com aumento de 100 vezes.

A motilidade foi dada pela estimativa visual do percentual de células moveis, sendo então, classificada numa escala entre 0 e 100%, onde 0% para nenhum espermatozóide móvel no campo e 100% para todos os espermatozóides móveis.

5.4.1.2 Avaliação do vigor espermático

Concomitante à motilidade, o vigor foi avaliado quanto ao movimento progressivo retilíneo dos espermatozóides numa escala de 0 a 5, na qual, 0 representa ausência de movimento e 5 representa movimentos vigorosos e progressivos.

5.4.1.3 Índice de motilidade espermática

Segundo Howard (1993), com os valores de motilidade e vigor é possível calcularmos uma taxa de motilidade geral denominada Índice de Motilidade Espermática (IME), utilizando-se a fórmula:

IME = [% espermatozóides móveis + (20 x vigor)] / 2.

5.4.2 Testes funcionais

Os testes funcionais utilizados neste experimento foram avaliação da integridade das membranas plasmática e acrossomal, avaliação da atividade mitocondrial e avaliação da integridade do DNA espermático.

5.4.2.1 Avaliação da Integridade da Membrana Plasmática

O espermatozóide durante todo trajeto, da ejaculação à fertilização, precisa sofrer algumas modificações bioquímicas e físicas, sendo assim, para que esses eventos ocorram, faz-se necessário que a membrana se apresente íntegra e com sua atividade preservada.

Para a avaliação da integridade da membrana plasmática, foi utilizada a coloração de Eosina-Nigrosina (E/N) segundo Barth e Oko (1989) (Anexo C). Nesta coloração, por alterações na permeabilidade das membranas dos espermatozóides, a eosina cora estas células de rosa. Os espermatozóides com membranas íntegras não permitem a entrada do corante, portanto, contrastando com o plano de fundo tomado pela coloração escura da nigrosina, as células aparecem brancas.

Desta maneira, uma alíquota de sêmen (5µl) foi misturada ao corante na proporção de 1:1 e realizados esfregaços sobre lâminas de microscopia.

As lâminas foram analisadas em microscópio convencional sob aumento de 1250 vezes. Foram contadas 200 células por lâmina, classificadas como:

- Células com membrana não-íntegra: coradas (Figura 5).
- Células com membrana íntegra: não coradas (Figura 5).

Figura 5 - Eosina-Nigrosina. Espermatozóide com a membrana plasmática íntegra (a cima) e não íntegra (abaixo).Obj. 100x

5.4.2.2 Avaliação da Integridade da Membrana Acrossomal

O acrossomo é um dos principais componentes da célula espermática, visto ser ele o responsável pela fusão do espermatozóide com o oócito (BELFORD, 1983).

Visando monitorar os possíveis danos causados durante o congelamento das amostras, a técnica da Coloração Simples de Pope (POPE; ZHANG; DRESSER, 1991) foi utilizada para a avaliação da integridade estrutural da membrana acrossomal (Anexo C).

Antes de realizar a avaliação das amostras em experimentação, foram feitos testes, utilizando amostras seminais criopreservadas, provenientes dos mesmos touros e escolhidas aleatoriamente. Foram feitos esfregaços com sêmen contendo diluidor, ou seja, retirados diretamente da palheta; com amostras submetidas à 1, 2 e 3 lavagens com PBS. Sendo observado que nas amostras puras, e lavadas apenas 1 vez não houve coloração de nenhum acrossomo, mostrando que, provavelmente, havia interferência com o diluidor, já naquelas lavadas 2 e 3 vezes, coraram-se de maneira equivalente. Diante disso, optou-se por proceder 2 lavagens prévias.

Para tanto, uma alíquota de cada amostra (5µl) foi adicionada ao Corante Simples de Pope (5µl), sendo a mistura incubada por 70 segundos. Após incubação, foram feitos

esfregaços sobre lâminas de microscopia, os quais foram analisados em microscópio convencional sob aumento de 1250 vezes. Foram contadas 200 células por lâmina, classificadas como:

- Acrossomo Íntegro: região acrossomal de coloração lilás, levemente mais escura que a região pós-acrossomal (Figura 6);
- Acrossomo Não-íntegro: região acrossomal de coloração rosa, levemente mais clara que a região pós-acrossomal (Figura 7).

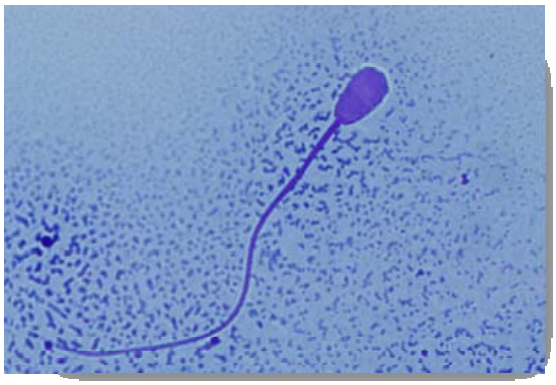


Figura 6 - Coloração simples de POPE. Espermatozóide com acrossomo íntegro. Obj. 100x

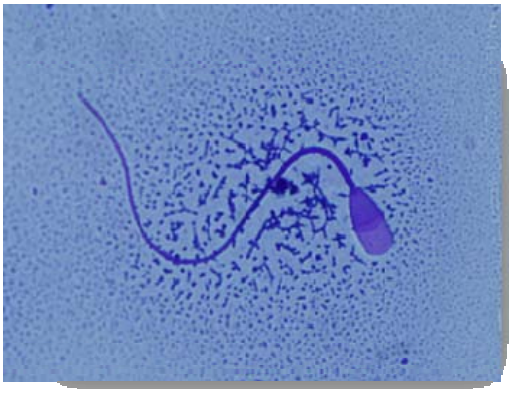


Figura 7- Coloração simples de POPE. Espermatozóide com acrossomo não íntegro. Obj. 100x

5.4.2.3 Avaliação da Atividade Citoquímica Mitocondrial

Nas células espermáticas as mitocôndrias estão dispostas de forma helicoidal na peça intermediária e o ATP produzido serve como suplemento energético para os

batimentos flagelares. Portanto, é indispensável que haja produção de ATP pelas mitocôndrias para haver motilidade espermática (COSSON, 1996).

Segundo Hrudka (1987), a enzima Citocromo C-Oxidase (CCO) tem um papel fundamental no processo de respiração celular e metabolismo energético das células, além de ser pré-requisito para as funções osmótica e sintética, para a motilidade e manutenção da estrutura celular. A técnica citoquímica desenvolvida por este autor baseia-se na oxidação da 3,3'-diaminobenzidina (DAB) pelo Complexo Citocromo C, o que inclui a CCO. Através de uma reação em cadeia, o DAB é polimerizado e se deposita nos locais onde ocorre a reação, ou seja, nas mitocôndrias. Esta deposição pode ser identificada através de microscopia convencional pela sua coloração marrom. Desta maneira, é possível descrever o declínio espontâneo da CCO ocasionado por tratamentos físicos e/ou químicos a que os espermatozóides são submetidos.

Antes da realização experimental, foi promovida a validação da técnica para testar a eficácia do corante. Para isso, foram utilizadas amostras seminais de 3 touros (Nelore, Jersey e Holandês), criados no Departamento de Reprodução Animal (VRA) da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ) da Universidade de São Paulo (USP) no campus de São Paulo, colhidas através do método de vagina artificial, em um total de 2 colheitas em intervalo de 7 dias. Logo após cada colheita, a amostra de cada animal foi dividida pela metade de seu volume, sendo uma metade mantida, em banho-maria, a 37ºC e a outra metade submetida a 75ºC durante 5 minutos e posteriormente estabilizadas até 37ºC. Após esse processo, as duas partes das amostras foram fracionadas (espermatozóides ativos + espermatozóides inativos), como indicado na figura 8, conforme os distintos graus de indução artificial de perda da atividade mitocondrial.

Diluição	Sêmen *in natura* (%)	Sêmen com mitocôndrias inativas (%)	Proporção esperada de atividade mitocondrial (%) (DAB I e II)	Porcentagem observada de atividade mitocondrial (DAB I e II)
100	100	0	100	A
80	80	20	80	B
60	60	40	60	C
40	40	60	40	D
20	20	80	20	E
0	0	100	0	F

Figura 8 - Fracionamento do sêmen in natura e com mitocôndrias inativas

Portanto, para realização desta técnica, uma alíquota de 30µL de amostra foi incubada com 30µL de DAB (1mg/ml de PBS), a 37°C, por uma hora. Após incubação, foram feitos esfregaços em lâmina de vidro e estas fixadas em formol a 10% por 10 minutos. As lâminas foram então secas em temperatura ambiente sob proteção da luz.

A atividade citoquímica da mitocôndria espermática foi avaliada segundo descrito por Hrudka (1987) (Anexo D). Desta maneira, as lâminas foram observadas em microscópio de contraste de fase, sob aumento de 1000 vezes, em imersão. Foram contados 200 espermatozóides/lâmina e classificados de acordo com o grau de coloração da peça intermediária em 4 classes:

- Classe I: células espermáticas com peça intermediária totalmente corada, alta atividade mitocondrial (DAB I; Figura 9);
- Classe II: células espermáticas com segmentos corados (ativos) e não-corados (inativos), havendo predominância dos ativos (DAB II; Figura 10);
- Classe III: células espermáticas com segmentos corados (ativos) e não-corados (inativos), havendo predominância dos inativos (DAB III; Figura 9);
- Classe IV: células espermáticas com peça intermediária totalmente descorada, sem atividade mitocondrial (DAB IV; Figura 10).

Figura 9 - Diaminobenzidina. Espermatozóide DAB I (esquerda) e DAB III (direita). Obj. 100x

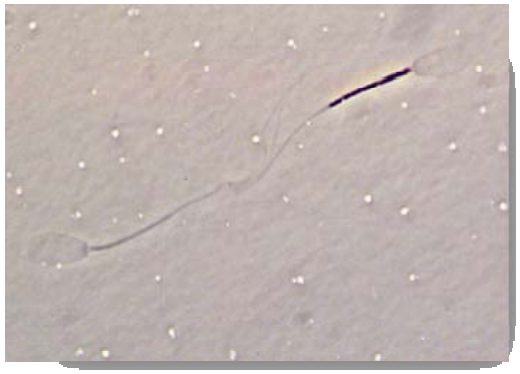


Figura 10 - Diaminobenzidina. Espermatozóide DAB II (direita) e DAB IV (esquerda). Obj. 100x

5.4.2.4 Avaliação da Integridade de DNA

A integridade do DNA espermático é essencial para uma transmissão acurada do material genético para gerações futuras, sua fragmentação, além de ser um marcador inicial de apoptose celular, pode causar anormalidades congênitas na prole.

Para avaliar a integridade do DNA nuclear espermático realizou-se a técnica de eletroforese de célula única em gel de agarose, em solução alcalina, ou Ensaio Cometa Alcalino (EC), adaptado de Donnelly, Mcclure e Lewis et al. (2000) (Anexo D). Esta técnica é capaz de detectar quebras em fita simples de DNA em sítios álcali sensíveis. As células adquirem morfologia similar à de um cometa, no qual a cauda representa os fragmentos de DNA que migraram durante a eletroforese.

Previamente, foram realizados testes para a adaptação do protocolo que melhor se encaixasse para espermatozóides bovinos. Inicialmente, foi verificado, que sem o uso da enzima Proteinase K não havia lise das células, após isso, mais testes foram desenvolvidos para descobrir a melhor concentração enzimática a ser usada.

As amostras destinadas ao EC foram aliquotadas (300µL) em criotubos e imediatamente mergulhadas em nitrogênio líquido.

Para esta técnica:

- As amostras foram descongeladas em banho-maria, a uma temperatura de 37°C durante 30 segundos.
- Lâminas foram previamente preparadas com 1000µl de Agarose "*Normal Melting Point*" (NMPA) a 1% em TBE.
- Foi diluído uma alíquota da amostra em Agarose *"Low Melting Point"* (LMPA) a 0,75% em TBE, para obter uma concentração final de 1x 10^6 / ml.
- Dessa mistura foi adicionado 100µl em cada lâmina, e essas cobertas com lamínula e mantidas a 4°C por 10 minutos.
- Passado esse tempo, as lamínulas foram removidas, e sobre as lâminas foram adicionados 300 µl LMPA a 0,75% em TBE.
- Novamente, as lâminas foram cobertas com lamínulas e deixadas a 4°C por mais 10 minutos.

- Após a remoção das lamínulas, as lâminas foram cobertas com 1 ml de solução de lise I e mantidas em incubação, durante 1 hora a 55ºC.
- As lâminas foram, então, lavadas com água bidestilada, por 15 minutos, para remover excesso de sais.
- Em seguida, foram novamente cobertas com 1ml, porém, de solução de lise II e deixadas durante 2 horas a 4ºC.
- Mais uma vez as lâminas foram lavadas com água bidestilada por 15 minutos.
- Após, foram imersas em solução alcalina de eletroforese por 20 minutos.
- A eletroforese foi realizada por 20 minutos a 1,5 V/cm, intensidade de corrente até 270mA.
- Posteriormente, as lâminas foram lavadas com TBE (3 vezes por 5 minutos) e fixadas com etanol (3vezes por 2 minutos).
- As lâminas foram, então, cobertas com 1ml de solução corante de Brometo de Etídeo, durante 15 minutos.
- Foram, novamente lavadas com TBE (3 vezes por 15 minutos) para remover a coloração do fundo.
- Finalmente, as lâminas foram avaliadas em microscópio de epifluorescência[2], equipado com um filtro de excitação de 510-560nm, um espelho dicróico de 565nm e um filtro de barreira de 590nm, em aumento de 400x.
- Contando 200 células por lâmina, a classificação se fez de acordo com a intensidade do dano no DNA observado pela cauda e intensidade nuclear:

    - Classe I: Células com halo ao seu redor e núcleo corado, porém sem cauda de cometa evidente, indicando pouca fragmentação no DNA (COMETA I; Figura 11);
    - Classe II: Célula com formação de cauda e com núcleo pouco descorado, indicando danos leves no DNA (COMETA II; Figura 12);
    - Classe III: Célula com cauda de cometa já formada, porém com núcleo ainda parcialmente corado, indicando danos evidentes no DNA (COMETA III; Figura 13);
    - Classe IV: Célula com núcleo completamente descorado e apenas a cauda do cometa, indicando fragmentação intensa do DNA (COMETA IV; Figura 14).

[2] *G-2A, Nikon, Japão*

Figura 11 - Espermatozóide Cometa I. Obj. 100x

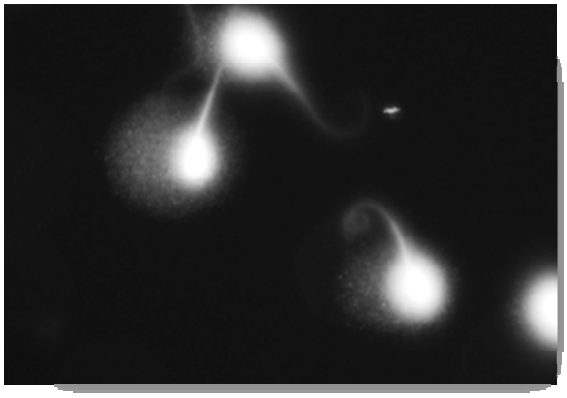


Figura 12 - Espermatozóides Cometa II. Obj. 100x

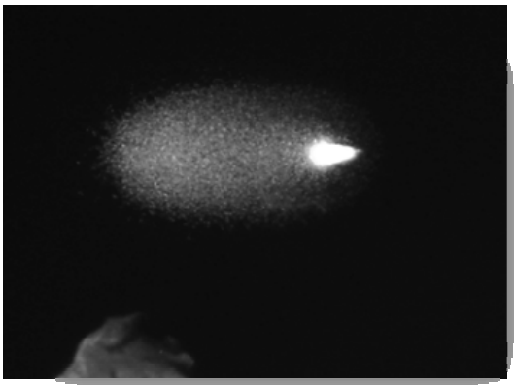


Figura 13 - Espermatozóide Cometa III. Obj. 100x

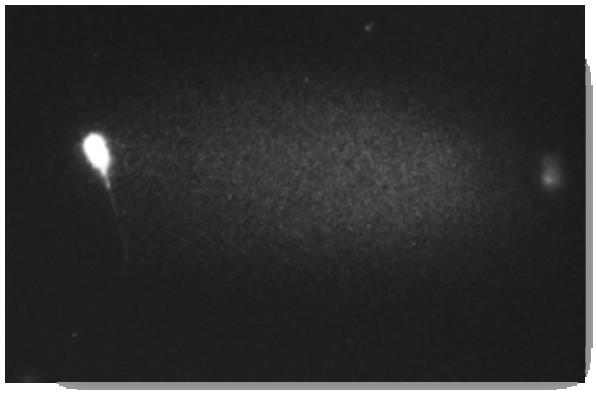


Figura 14 - Espermatozóide Cometa IV. Obj. 100x

5.4.3 Avaliação do Índice de Resistência ao Estresse Oxidativo

É de grande importância a avaliação do índice de resistência ao estresse oxidativo, já que, ao mensurar a susceptibilidade das células à peroxidação lipídica, é possível também determinar o potencial fertilizante do espermatozóide bovino e diagnosticar a infertilidade.

As determinações baseiam-se na metodologia descrita por Ohkawa, Ohish e Yagi (1979), que tem como fundamento a reação de duas moléculas de ácido tiobarbitúrico (TBA) com uma molécula de malondialdeído (MDA), subproduto da peroxidação de lipídeos. Foi utilizado um sistema gerador de ROS com posterior mensuração da concentração de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) através da espectrofotometria (Anexo E).

- Em uma alíquota de 400µl da amostra foi adicionado o "sistema gerador de espécies reativas de oxigênio – ROS" formado pelo ácido ascórbico (100µL) e o sulfato de ferro (100µL) (Solução 1).
- Mantido em incubação durante 90 minutos a 37ºC.
- Após o período de incubação, foram adicionados 1200µL de solução de ácido tricloroacético (TCA) e centrifugados a 19.700g, durante 10 minutos, em temperatura de 4°C, para precipitação de proteínas (Solução 2).
- Alíquotas de 1ml do sobrenadante foram colocadas em criotubos juntamente com 1ml de ácido tiobarbitúrico (TBA), dissolvido em hidróxido de sódio (NaOH), preparado instantes antes de ser utilizado (Solução 3).
- Os tubos contendo esta mistura foram incubados em banho-maria (90 a 100ºC) por 15 minutos e resfriados imediatamente em banho de gelo, no intuito de parar a reação.
- A concentração de TBARS foi quantificada através de leitura em espectrofotômetro[3], num comprimento de onda de 532nm.
- Os resultados foram comparados com uma curva padrão feita previamente com malondialdeído.

O MDA é uma das principais substâncias que reagem com o ácido tiobarbitúrico e a concentração de TBARS é determinada utilizando-se o valor 1,56 x 105 x M^{-1} mL^{-1} como coeficiente de extinção molar do malondialdeído (BUEGE; AUST, 1978).

[3]Ultrospec 3300pro, Amersham Pharmacia

A concentração de TBARS nas amostras foi expressa em nanogramas de TBARS por milhões de espermatozóides (ng/10^6 sptz).

5.4.4 Análise Estatística

Todos os dados foram analisados através do programa SPSS 13.0 para Windows (SPSS, Inc., Chicago, IL).

Para a análise estatística dos dados sobre a validação da coloração 3'3-diaminobenzidina (DAB), estes foram submetidos à análise de regressão, tendo como variável independente a proporção esperada de atividade mitocondrial (0, 20, 40, 60, 80, 100) e como variável dependente a porcentagem observada (A, B, C, D, E, F). A técnica foi considerada padronizada, pois o r^2 desta análise de regressão foi maior a 0,7.

Os dados experimentais foram testados quanto à normalidade dos resíduos e homogeneidade das variâncias. Caso não obedecessem a estas premissas foram transformados (logarítmo na base 10 – Log_{10} X; Raiz quadrada – RQ X; Quadrado – X^2) e se a normalidade não fosse obtida empregou-se então, o procedimento NPAR1WAY de análise de variância não paramétrica (teste de Kruskal Wallis para interação e teste de Wilcoxon para efeito do grupo). Os dados que obedeceram às premissas foram analisados através do teste LSD e do teste t de Student para efeito de interação e para efeito do grupo, respectivamente.

Para descrição dos resultados, foram empregados os erros padrões das médias e as médias (média ± erro padrão da média) e os níveis de significância (p) dos dados originais (quando obedecessem às premissas), dos dados transformados (quando necessária a transformação) e dos dados analisados através da análise não paramétrica (quando não obedecessem às premissas e não houvesse transformações possíveis).

O nível de significância utilizado para rejeitar H0 (hipótese de nulidade) foi de 5%, isto é, para um nível de significância menor que 0,05, considerou-se que ocorreram diferenças estatísticas entre as variáveis classificatórias (tratamentos) para uma determinada variável resposta.

As variáveis classificatórias utilizadas foram raça (Nelore e Simental) e estação do ano (Inverno e Verão). As variáveis respostas avaliadas foram motilidade, vigor, índice de motilidade espermática (IME), porcentagem de espermatozóides com membrana

plasmática íntegra (E/N), porcentagem de espermatozóides com membrana acrossomal íntegra (POPE), porcentagem de espermatozóides classes I, II, III e IV na avaliação da atividade mitocondrial (DAB), porcentagem de espermatozóides classes I, II, III e IV na avaliação da integridade de DNA (Cometa) e concentração de substância reativa ao ácido tiobarbitúrico (TBARS).

As variáveis respostas foram analisadas através da correlação de Pearson (PROC CORR) e Spearman (PROC CORR SPEARMAN), para variáveis paramétricas e não paramétricas, respectivamente, sendo os resultados expressos através do coeficiente de correlação (r) e seu nível de significânica (p). Foram assumidos quatro grupos: Nelore/Inverno, Nelore/Verão, Simental/Inverno e Simental/Verão.

Na análise de variância foram verificados os efeitos das variáveis classificatórias estações climáticas (Verão e Inverno), raças (Nelore e Simental) e a interação estações climáticas X raças (Neore/Inverno, Nelore/Verão, Simental/Inverno e Simental/Verão).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Como resultado da validação da coloração 3'3-diaminobenzidina (DAB), foi encontrada alta correlação entre a porcentagem de células espermáticas apresentando alto potencial de atividade mitocondrial (DAB I e II), com a diluição (Gráfico 1).

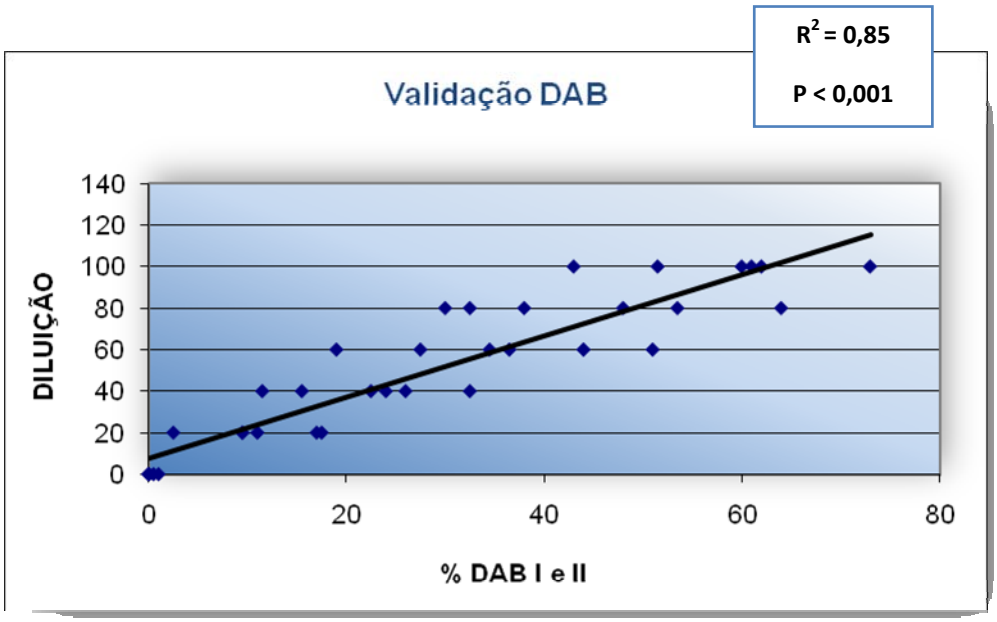


Gráfico 1 - Porcentagem de espermatozóides com alto potencial de atividade mitocondrial, pela diluição seminal (Sêmen fresco)

Os resultados de cada variável estudada neste experimento estão apresentados em forma de tabelas. Cada uma delas contém informações sobre as análises de amostras seminais criopreservadas dos grupos: Nelore e Simental, durante o inverno e verão.

6.1 TESTES CONVENCIONAIS

Os testes convencionais para análise de sêmen utilizados no presente experimento foram: a porcentagem de células móveis (motilidade), o vigor (motilidade progressiva) e o índice de motilidade espermática (IME).

Os resultados referentes às variáveis motilidade, vigor e IME estão descritos nas tabelas 1, 2 e 3.

Tabela 1 - Efeito das raças e das estações climáticas [média ± erro padrão, (IC 95%)] sobre a motilidade (%), vigor (0-5) e índice de motilidade espermática (IME), de amostras seminais criopreservadas, de touros das raças Nelore e Simental, criados em clima tropical, coletadas em inverno e verão

	Nelore	Simental	p*	Verão	Inverno	p**
Motilidade (%)	19,90 ± 3,33 (12,93–26,87)	18,65 ± 3,12 (12,12–25,18)	0,79	16,05 ± 2,83 (10,13-21,97)	22,50 ± 3,43 (15,32-29,68)	0,14
Vigor (0-5)	3,00 ± 1,0 (2,21–2,98)	3,00 ± 0,75 (2,57–3,12)	0,33	3,00 ± 1,00 (2,35-3,15)	3,00 ± 1,00 (2,43-2,97)	0,64
IME	35,95 ± 2,93 (29,80–42,09)	37,82 ± 2,32 (32,97–42,67)	0,62	35,52 ± 2,83 (29,61-41,44)	38,25 ± 2,43 (33,17-43,33)	0,47

* referente à comparação entre raças (Nelore e Simental);
** referente à comparação entre estações climáticas (inverno e verão);
IC95%: intervalo de confiança de 95% da média.

Tabela 2 - Efeito das estações climáticas em função das raças [média ± erro padrão, (IC 95%)] sobre a motilidade (%), vigor (0-5) e índice de motilidade espermática (IME), de amostras seminais criopreservadas, de touros das raças Nelore e Simental, criados em clima tropical, coletadas em inverno e verão

	Nelore			Simental		
	Verão	Inverno	p*	Verão	Inverno	p**
Motilidade (%)	13,30 ± 3,86 (4,57-22,03)	26,50 ± 4,72 (15,83-37,17)	0,02	18,8 ± 4,15 (9,41–28,19)	18,5 ± 4,90 (7,44–29,57)	0,94
Vigor (0-5)	2,50 ± 1,25 (1,71-3,09)	3,00 ± 1,00 (2,35-3,25)	0,32	3,00 ± 0,25 (2,70–3,50)	3,00 ± 1,00 (2,23–2,97)	0,06
IME	30,65 ± 4,50 (20,47-40,83)	41,25 ± 3,14 (34,13-48,36)	0,07	40,4 ± 2,87 (34,0–46,90)	35,25 ± 3,60 (27,10–43,40)	0,28

* referente à comparação entre inverno e verão dos touros da raça Nelore;
** referente à comparação entre inverno e verão dos touros da raça Simental;
IC95%: intervalo de confiança de 95% da média.

Tabela 3 - Efeito das raças em função das estações climáticas [média ± erro padrão, (IC 95%)] sobre a motilidade (%), vigor (0-5) e índice de motilidade espermática (IME), de amostras seminais criopreservadas, de touros das raças Nelore e Simental, criados em clima tropical, coletadas em inverno e verão

	Verão			Inverno		
	Nelore	Simental	p*	Nelore	Simental	p**
Motilidade (%)	13,30 ± 3,86 (4,57-22,09)	18,08 ± 4,15 (9,41-28,19)	0,37	26,50 ± 4,74 (15,83-37,17)	18,50 ± 4,89 (7,44-29,56)	0,17
Vigor (0-5)	2,50 ± 1,25 (1,71-3,09)	3,00 ± 0,25 (2,69-3,51)	0,07	3,00 ± 1,00 (2,35-3,25)	3,00 ± 1,00 (2,23-2,97)	0,48
IME	30,65 ± 4,50 (20,47-40,83)	40,04 ± 2,87 (33,92-46,88)	0,08	41,25 ± 3,14 (34,13-48,37)	35,25 ± 3,60 (27,10-43,30)	0,22

* referente à comparação entre raças (Nelore e Simental), durante o verão;
** referente à comparação entre raças (Nelore e Simental), durante o inverno;
IC95%: intervalo de confiança de 95% da média.

Em relação à variável resposta motilidade espermática das amostras seminais, não houve diferenças estatísticas entre os touros das raças Nelore e Simental (19,90 ± 3,33 e 18,65 ± 3,12, respectivamente; p= 0,079), e nem entre os meses de verão e inverno (16,05 ± 2,83 e 22,50 ± 3,43, respectivamente; p= 0,14) (Tabela 1). Já na comparação entre as estações climáticas, dentro de cada raça separadamente, verificou-se que nos touros nelores, a motilidade espermática foi maior durante o inverno em relação ao verão (26,50 ± 4,72 e 13,30 ± 3,86, respectivamente; p=0,02), enquanto que dentro da raça Simental, não houve diferença significativa (p=0,94) (Tabela 2). Assim como, quando comparados Nelore e Simental dentro das estações climáticas separadamente, não foram encontradas diferenças significativas, tanto no verão (13,30 ± 3,86 e 18,08 ± 4,15, respectivamente, p=0,37), como no inverno (26,50 ± 4,74 e 18,50 ± 4,89, respectivamente, p=0,17) (Tabela 3).

Esta diferença na porcentagem de células móveis, ocorrida no inverno, dentro da raça Nelore, era esperada, visto que os touros de origem zebuína, mesmo adaptados ao clima tropical, sofrem problemas de estresse térmico, durante períodos de elevada temperatura ambiental, refletindo sobre as características espermáticas (FIELDS et al., 1979; FERNANDES, 2005).

Como pode ser visto, ainda nas tabelas 1, 2 e 3, em relação às variáveis respostas vigor espermático e índice de motilidade espermática (IME) das amostras seminais, não foram encontradas diferenças significativas entre nenhuma das comparações realizadas (p>0,05). Esses resultados não eram esperados, já que, além de ter havido diferença sobre a motilidade espermática dentro da raça nelore durante o inverno, em diversos trabalhos foi verificado que a qualidade seminal de touros taurinos foi inferior durante períodos de alta temperatura, em relação aos touros zebuínos (BARTH; OKO, 1989; GARCIA, 2004; KOIVISTO et al., 2008).

Em experimento realizado por Fields (1979) e colaboradores, na região subtropical da Flórida (Estados Unidos), touros *Bos taurus indicus* (Brahma) e *Bos taurus taurus* (Angus e Hereford) foram submetidos a coletas de sêmen no verão e inverno. Os touros de origem européia não apresentaram diferenças na porcentagem de espermatozóides móveis entre inverno e verão (68 ± 2,8 e 70 ± 2,8, respectivamente; p>0,05). Já os touros zebuínos, assim como no presente experimento, apresentaram valores de porcentagem de espermatozóides móveis menores no verão em relação ao inverno (37 ± 4,9 e 59 ± 4,9, respectivamente; p<0,01).

Em 1999 Chandolia et al. submeteram amostras espermáticas de touros de origem européia (*Bos taurus taurus*) e touros de origem indiana (*Bos taurus indicus*) ao calor, sendo que não houve diferenças entre as raças na porcentagem de

espermatozóides móveis, na velocidade espermática e na freqüência de batimentos da cauda ($p>0,05$).

Diferentemente ao presente experimento, Nichi (2003), ao comparar características espermáticas de amostras seminais à fresco de touros Nelore e Simental, criados em clima tropical e coletadas durante inverno e verão, observou que, durante o inverno, os animais da raça Nelore demonstraram maior porcentagem de células móveis ($62,7 \pm 14,0$) quando comparados aos de raça Simental ($53,0 \pm 14,5$) ($p=0,04$).

Garcia, em 2004, trabalhando com touros da raça simental, submetidos à insulação testicular, durante 22 semanas, obteve como resultado a diminuição imediata da motilidade e vigor espermáticos, logo ao início do tratamento ($p=0,0001$). Concluindo que as características espermáticas de touros *Bos taurus taurus* são influenciadas pelo estresse térmico testicular. Ao contrário do que foi observado no presente experimento, onde os touros da raça simental não demonstraram nenhuma diferença em relação às estações de frio e calor. Essa diferença pode ser explicada pela intensidade e constância da temperatura agindo diretamente sobre o testículo ser diferente da temperatura ambiental variando de intensidade a cada dia.

Igualmente, em estudo realizado por Fernandes, em 2005, também promovendo degeneração testicular por insulação, porém em touros nelores (*Bos taurus indicus*), durante 21 dias, foi visto que tanto a motilidade como o vigor espermáticos diminuíram gradativamente ao longo do processo, sendo significativamente menor a partir do dia 14 ($p<0,05$), mostrando mais uma vez, a influência negativa da alta temperatura sobre as características espermáticas, mesmo em animais adaptados ao calor.

Koivisto e colaboradores em 2008 estudaram animais taurinos (Simental e Limosin) e zebuínos (Nelore), na região sudeste do Brasil, comparando o efeito da estação do ano sobre as características seminais e congelabilidade das amostras. Em amostras seminais frescas, observaram que os maiores valores de porcentagem da motilidade espermática progressiva, ocorreu no inverno em ambas as raças, além disso, o vigor espermático foi maior nos nelores, durante o verão. Ao avaliar a congelabilidade espermática, foi verificado que 52% das amostras seminais criopreservadas de touros *Bos indicus* foram consideradas adequadas para serem utilizadas na inseminação artificial, contra 40,6% de amostras seminais criopreservadas dos touros *Bos taurus* ($p<0,05$). Por fim, a congelabilidade seminal, também foi influenciada pela estação, sendo descartadas mais doses coletadas durante o inverno do que no verão ($p<0,05$). Segundo os autores, quando criados em altas temperaturas ambientais, os animais taurinos são afetados com maior severidade em relação aos zebuínos para as características espermáticas.

O grupo de pesquisa de Anchieta, em 2005 analisou as características seminais e congelabilidade de sêmen de touros de raças zebuínas e taurinas, no sudeste brasileiro em temperaturas elevadas (>19,0ºC). Contrariamente aos resultados encontrados no trabalho de Koivisto et al. (2008), o sêmen das raças taurinas foi superior ao das raças zebuínas nos aspectos turbilhonamento, motilidade e concentração ($p<0,05$), além disso, a congelabilidade do sêmen das raças taurinas foi superior à dos touros das raças zebuínas ($p<0,05$).

Defoin, Granados e Donnay (2008), através do Sistema Computadorizado de Análise Espermática (CASA), avaliaram os parâmetros da motilidade espermática antes e após a criopreservação seminal. E como já era esperado, o processo de congelação alterou significativamente todos os parâmetros da motilidade, com efeito deletério na porcentagem de células móveis (de 73,74% para 26,26%) e espermatozóides com movimento progressivo (de 74,84% para 25,16%)($p<0,0001$).

A motilidade e vigor espermáticos são variáveis da qualidade espermática cuja eficácia é muito discutida, quando utilizadas isoladamente para predizer a fertilidade de determinada amostra seminal, já que suas correlações com diferentes índices de fertilidade são extremamente variáveis. Para a análise visual da motilidade (estimada em percentual), o nível de correlação pode variar entre 0,15 a 0,83 (JANUSKAUSKAS et al., 2003) e para a motilidade estimada pela análise computadorizada, entre 0,82 a 0,98 (FARREL et al., 1998).

Isto ocorre, principalmente, devido à subjetividade, baixa acurácia e imprecisão do método visual utilizado, imprecisão da mensuração da fertilidade de ejaculados individuais e influência de fatores não relacionados ao sêmen, como a infertilidade da fêmea e estação do ano (HAFEZ; HAFEZ, 2004). Porém, é de grande importância, ressaltar que a motilidade e vigor espermáticos, quando avaliados em conjunto com outras técnicas laboratoriais, se tornam parâmetros importantes na avaliação seminal (SMITH et al., 1981).

6.2 TESTES FUNCIONAIS

No presente experimento foram utilizados, como testes funcionais de análise de sêmen, as avaliações da integridade da membrana plasmática (E/N), da integridade do acrossomo (POPE), da atividade mitocondrial (DAB) e da integridade de DNA espermático (Ensaio Cometa).

6.2.1 Integridade da membrana plasmática

Os resultados referentes à variável integridade da membrana plasmática (E/N), estão descritos nas tabelas 4, 5 e 6.

Tabela 4 - Efeito das raças e das estações climáticas [média ± erro padrão, (IC 95%)] sobre a porcentagem de espermatozóides com a membrana plasmática íntegra (E/N), de amostras seminais criopreservadas, de touros das raças Nelore e Simental, criados em clima tropical, coletadas em inverno e verão

	Nelore	Simental	p*	Verão	Inverno	p**
E/N (%)	19,75 ± 2,71 (14,06-25,43)	18,87 ± 2,15 (14,37–23,38)	0,80	20,85 ± 2,66 (15,30-26,41)	17,77 ± 2,17 (13,23-22,32)	0,38

* referente à comparação entre raças (Nelore e Simental);
** referente à comparação entre estações climáticas (inverno e verão);
IC95%: intervalo de confiança de 95% da média.

Tabela 5 - Efeito das estações climáticas em função das raças [média ☐ erro padrão, (IC 95%)] sobre a porcentagem de espermatozóides com a membrana plasmática íntegra (E/N), de amostras seminais criopreservadas, de touros das raças Nelore e Simental, criados em clima tropical, coletadas em inverno e verão

	Nelore			Simental		
	Verão	Inverno	p*	Verão	Inverno	p**
E/N (%)	18,95 ± 4,64 (8,45-29,45)	20,55 ± 3,07 (13,60-27,50)	0,78	22,75 ± 2,73 (16,60–29,0)	15 ± 3,0 (8,30–21,71)	0,07

* referente à comparação entre inverno e verão dos touros da raça Nelore;
** referente à comparação entre inverno e verão dos touros da raça Simental;
IC95%: intervalo de confiança de 95% da média.

Tabela 6 - Efeito das raças em função das estações climáticas [média ± erro padrão, (IC 95%)] sobre a porcentagem de espermatozóides com a membrana plasmática íntegra (E/N), de amostras seminais criopreservadas, de touros das raças Nelore e Simental, criados em clima tropical, coletadas em inverno e verão

	Verão			Inverno		
	Nelore	Simental	p*	Nelore	Simental	p**
E/N (%)	18,95 ± 4,64 (8,45-29,45)	22,75 ± 2,73 (16,58-28,92)	0,49	20,55 ± 3,07 (13,60-27,50)	15,00 ± 2,96 (8,29-21,70)	0,21

* referente à comparação entre raças (Nelore e Simental), durante o verão;
** referente à comparação entre raças (Nelore e Simental), durante o inverno;
IC95%: intervalo de confiança de 95% da média.

A membrana plasmática do espermatozóide é o sítio primário de lesões ocorridas durante a criopreservação ou qualquer alteração na espermatogênese (KROGENAES et al., 1994). Uma membrana plasmática intacta e funcionalmente ativa é essencial para que a célula sustente seu metabolismo (WOELDERS, 1991). Uma vez danificada, o espermatozóide se torna inapto a manter os íons em concentrações ideais para promover a capacitação e reação acrossomal, bem como penetração nos envoltórios do ovócito, ligação à zona pelúcida e fusão com o oolema (JEYENDRAN et al., 1984).

Neste sentido, avanços recentes na tecnologia de coloração têm fornecido novos meios de se avaliar a capacidade funcional de espermatozóides em várias espécies (CELEGHINI et al., 2007). Baseado nisto, para as amostras seminais analisadas, deste

estudo (Nelore, Simental; Inverno e Verão), foi avaliado a integridade da membrana plasmática dos espermatozóides pela coloração por Eosina-Nigrosina.

No presente experimento a variável resposta porcentagem de espermatozóides com membrana plasmática íntegra não apresentou diferenças estatísticas entre as raças Nelore e Simental (19,75 ± 2,71 e 18,87 ± 2,15, respectivamente; p=0,80) e entre as estações do ano verão e inverno (20,85 ± 2,66 e 17,77 ± 2,17, respectivamente; p=0,38) (Tabela 4). Bem como não houve diferença na porcentagem de espermatozóides com membrana plasmática integra referente à comparação das estações do ano nas raças Nelore e Simental (p>0,05) (Tabela 5) e referente à comparação das raças durante inverno e verão (p>0,05) (Tabela 6).

Estes resultados contradizem aos obtidos por Garcia (2004), que ao promover insulação escrotal em touros da raça Simental, observou, em sêmen fresco, imediatamente após o início do tratamento o aumento da quantidade de células espermáticas com membrana plasmática não íntegra (sonda fluorescente PI) (p<0,05). Assim como observado por Fernandes em 2005, insulando touros Nelore, houve diminuição significativa na porcentagem de células com membranas plasmática e acrossomal íntegras (T*rypan Blue Giemsa*)(p<0,05).

Já em experimento realizado por Tarragó (2009), no qual touros da raça Nelore, mantidos em piquetes com e sem sombra, durante 120 dias, em uma temperatura média de 26,4ºC, não houve nenhuma diferença significativa quanto à variável integridade de membrana plasmática (sonda fluorescente PI) (66% e 59,2%, nos grupos com sombra e sem sombra, respectivamente; p<0,05), assim como o obtido no presente estudo, indicando que as alterações de temperatura, provavelmente, não sejam suficientes para alterarem características seminais como a integridade da membrana plasmática.

A média de valor obtidos no presente experimento para a variável integridade de membrana plasmática, para os touros da raça Simental foi de 18,87% ± 2,15, inferior ao encontrado no estudo de Bollwein et al.(2008), o qual coletou amostras seminais de touros simentais, procedeu a criopreservação e avaliou integridade de membrana plasmática através de citometria de fluxo (SYBR-14) após a descongelação, obtendo média de 37,4% ± 6,8.

6.2.2 Integridade da membrana acrossomal

Os resultados referentes à variável integridade da membrana acrossomal (POPE), estão descritos nas tabelas 7, 8 e 9.

Tabela 7 - Efeito das raças e das estações climáticas [média ± erro padrão, (IC 95%)] sobre a porcentagem de espermatozóides com a membrana acrossomal íntegra (POPE), de amostras seminais criopreservadas, de touros das raças Nelore e Simental, criados em clima tropical, coletadas em inverno e verão

	Nelore	Simental	p*	Verão	Inverno	p**
POPE (%)	69,27 ± 3,0 (63,00-75,55)	66,5 ± 3,83 (58,49-74,51)	0,57	68,92 ± 3,47 (61,61-76,18)	66,85 ± 3,42 (59,69-74,01)	0,56

* referente à comparação entre raças (Nelore e Simental);
** referente à comparação entre estações climáticas (inverno e verão);
IC95%: intervalo de confiança de 95% da média.

Tabela 8 - Efeito das estações climáticas em função das raças [média ± erro padrão, (IC 95%)] sobre a porcentagem de espermatozóides com a membrana acrossomal íntegra (POPE), de amostras seminais criopreservadas, de touros das raças Nelore e Simental, criados em clima tropical, coletadas em inverno e verão

	Nelore			Simental		
	Verão	Inverno	p*	Verão	Inverno	p**
POPE (%)	69,90 ± 4,83 (58,97-80,83)	68,65 ± 3,80 (60,05-77,25)	0,84	67,95 ± 5,21 (56,15–79,74)	65,05 ± 5,85 (52,00–78,30)	0,72

* referente à comparação entre inverno e verão dos touros da raça Nelore;
** referente à comparação entre inverno e verão dos touros da raça Simental;
IC95%: intervalo de confiança de 95% da média.

Tabela 9 - Efeito das raças em função das estações climáticas [média ± erro padrão, (IC 95%)] sobre a porcentagem de espermatozóides com a membrana acrossomal íntegra (POPE), de amostras seminais criopreservadas, de touros das raças Nelore e Simental, criados em clima tropical, coletadas em inverno e verão

	Verão			Inverno		
	Nelore	Simental	p*	Nelore	Simental	p**
POPE (%)	69,90 ± 4,83 (58,97-80,83)	67,95 ± 5,21 (56,16-79,74)	0,79	68,65 ± 3,80 (60,05-77,25)	65,05 ± 5,85 (51,80-78,29)	0,61

* referente à comparação entre raças (Nelore e Simental), durante o verão;
** referente à comparação entre raças (Nelore e Simental), durante o inverno;
IC95%: intervalo de confiança de 95% da média.

O número de espermatozóides com acrossomo lesado, dentro de uma população espermática, constitui importante informação, uma vez que a integridade da membrana acrossomal é requisito fundamental para que a célula possa ser capacitada no momento adequado e apresentar potencial fecundante.

Dessa forma, acrossomo intacto após a descongelação, também é crucial para a fertilização. A característica acrossomal em sêmen congelado de touros há muito, já vem sendo relacionada com a fertilidade (SAACKE et al., 1994). Alguns estudos do efeito da criopreservação sobre a função de diversas organelas espermáticas também demonstraram grande importância (GARNER et al., 1997; THOMAS et al., 1998). No entanto, é necessária a avaliação simultânea de vários parâmetros para predizer a fertilidade de uma amostra seminal a fresco ou criopreservada (GRAHAM et al., 1990).

Nas quarenta amostras seminais criopreservadas pôde-se observar que a porcentagem de espermatozóides com membrana acrossomal íntegra não variou entre verão e inverno (68,92 ± 3,47 e 66,85 ± 3,42, respectivamente; p=0,56). Assim como, não houve diferença significativa entre animais nelore e simental (69,27 ± 3,0 e 66,5 ± 3,83, respectivamente; p=0,57) (Tabela 7).

Ao se comparar as estações de verão e inverno dentro da raça Nelore, também não foram encontradas diferenças (69,90 ± 4,83 e 68,65 ± 3,80, respectivamente, p=0,84); igualmente, comparando as amostras provenientes de animais taurinos (67,95 ± 5,21 para verão e 65,05 ± 5,85 para inverno; p=0,72) (Tabela 8).

A tabela 9 mostra que a porcentagem de células com acrossomo íntegro também não diferiu quanto às raças, em função das estações de verão e inverno (p=0,79 e p=0,61, respectivamente).

Em 1985, Meyerhoeffer e colaboradores já submetiam animais *Bos taurus taurus* (Angus) à temperaturas ambientais elevadas (35ºC, durante oito semanas por 8 horas, a cada 24 horas, em câmara climática). A partir da segunda semana de tratamento, houve um aumento significativo na porcentagem de células com alterações acrossomais, o chamado acrossomo envelhecido (p<0,01), visualizados através do método de morfologia espermática. Indicando que a exposição de touros europeus à elevadas temperaturas ambientais resulta em diminuição da qualidade seminal.

Outros trabalhos também avaliaram o efeito do estresse térmico sobre a característica espermática (integridade de acrossomo) em touros taurinos e zebuínos, e todos sugerem a diminuição da qualidade seminal a partir do momento em que se inicia o tratamento (GARCIA 2004; FERNANDES, 2005). Porém, esses autores, avaliaram amostras seminais a fresco, além de o estresse térmico ser promovido por insulação

testicular e câmara climática, intensidade de calor, essa, diferente da que ocorre em condições naturais.

Um exemplo da temperatura influenciando a integridade acrossomal, foi visto em experimento realizado por Queiroz em 2003, o qual avaliou a temperatura de transporte sobre as características seminais, provenientes de jaguatiricas, onde a coloração simples de POPE demonstrou que a integridade acrossomal foi maior quando as amostras eram transportadas em temperatura ambiente em relação ao transporte refrigerado (63,85 ± 14,99 e 53,98 ± 18,74, respectivamente).

Já de acordo com os resultados do presente experimento, Tarragó (2009) verificou que não houve diferença significativa na porcentagem de células espermáticas com acrossomo íntegro (sondas fluorescentes FITC-PSA), ao analisar amostras seminais frescas de touros nelores criados em piquete com e sem acesso a sombra.

6.2.3 Atividade citoquímica mitocondrial

Os resultados referentes à variável atividade citoquímica mitocondrial (DAB), estão descritos nas tabelas 10, 11 e 12.

Tabela 10 - Efeito das raças e das estações climáticas [média ± erro padrão, (IC 95%)] sobre a porcentagem de espermatozóides classes I, II, III e IV na avaliação da atividade mitocondrial (DAB I, DAB II, DAB III, DAB IV), de amostras seminais criopreservadas, de touros das raças Nelore e Simental, criados em clima tropical, coletadas em inverno e verão

	Nelore	Simental	p*	Verão	Inverno	p**
DAB I	17,82 ± 2,38 (12,84-22,80)	11,4 ± 1,84 (7,55-15,25)	0,04	12,25 ± 1,71 (8,68-15,82)	17,97 ± 2,57 (11,58-22,36)	0,13
DAB II	42,6 ± 1,84 (38,75-46,45)	41,70 ± 2,75 (35,94-47,47)	0,79	40,35 ± 2,53 (35,05-45,64)	43,95 ± 2,06 (39,64-48,27)	0,28
DAB III	17,99 ± 1,73 (14,36-21,62)	20,07 ± 1,93 (16,03-24,11)	0,35	20,52 ± 1,68 (17,01-24,02)	17,53 ± 1,95 (13,45-21,61)	0,15
DAB IV	21,59 ± 2,64 (16,07-27,11)	26,82 ± 3,87 (18,72-34,93)	0,35	26,97 ± 3,61 (19,31-34.43)	21,54 ± 2,98 (15,30-27,78)	0,17

* referente à comparação entre raças (Nelore e Simental);
** referente à comparação entre estações climáticas (inverno e verão);
IC95%: intervalo de confiança de 95% da média.

Tabela 11 - Efeito das estações climáticas em função das raças [média ± erro padrão, (IC 95%)] sobre a porcentagem de espermatozóides classes I, II, III e IV na avaliação da atividade mitocondrial (DAB I, DAB II, DAB III, DAB IV), de amostras seminais criopreservadas, de touros das raças Nelore e Simental, criados em clima tropical, coletadas em inverno e verão

	Nelore			Simental		
	Verão	Inverno	p*	Verão	Inverno	p**
DAB I	13,30 ± 2,51 (7,63-18,97)	22,34 ± 3,62 (14,15-30,53)	0,04	11,20 ± 2,40 (5,77–16,70)	11,60 ± 2,92 (5,0–18,20)	0,92
DAB II	40,15 ± 2,72 (34,00-46,29)	45,05 ± 2,36 (39,70-50,40)	0,19	40,55 ± 4,43 (30,52 – 50,60)	42,90 ± 3,50 (35,0 – 51,0)	0,70
DAB III	22,10 ± 2,67 (16,05-28,15)	13,88 ± 1,34 (10,85-16,91)	0,01	18,95 ± 2,04 (14,32–23,60)	21,20 ± 3,36 (13,60–28,80)	0,60
DAB IV	24,45 ± 3,97 (15,47-33,43)	18,73 ± 3,43 (10,97-26,50)	0,43	29,30 ± 6,17 (15,35–43,25)	24,35 ± 4,90 (13,30–35,42)	0,54

* referente à comparação entre inverno e verão dos touros da raça Nelore;
** referente à comparação entre inverno e verão dos touros da raça Simental;
IC95%: intervalo de confiança de 95% da média.

Tabela 12 - Efeito das raças em função das estações climáticas [média ± erro padrão, (IC 95%)] sobre a porcentagem de espermatozóides classes I, II, III e IV na avaliação da atividade mitocondrial (DAB I, DAB II, DAB III, DAB IV), de amostras seminais criopreservadas, de touros das raças Nelore e Simental, criados em clima tropical, coletadas em inverno e verão

	Verão			Inverno		
	Nelore	Simental	p*	Nelore	Simental	p**
DAB I	13,30 ± 2,50 (7,63-18,97)	11,20 ± 2,40 (5,76-16,64)	0,48	22,34 ± 3,62 (14,15-30,53)	11,60 ± 2,92 (5,00-18,20)	0,03
DAB II	40,15 ± 2,72 (34,00-46,29)	40,55 ± 4,43 (30,52-50,57)	0,94	45,05 ± 2,36 (39,70-50,40)	42,86 ± 3,48 (34,99-50,73)	0,61
DAB III	22,10 ± 2,67 (16,05-28,15)	18,95 ± 2,05 (14,32-23,58)	0,36	13,88 ± 1,34 (10,85-16,91)	21,19 ± 3,36 (13,59-28,79)	0,03
DAB IV	24,45 ± 3,97 (15,47-33,43)	29,30 ± 6,17 (15,35-43,25)	0,81	18,73 ± 3,43 (10,97-16,50)	24,35 ± 4,90 (13,28-35,42)	0,36

* referente à comparação entre raças (Nelore e Simental), durante o verão;
** referente à comparação entre raças (Nelore e Simental), durante o inverno;
IC95%: intervalo de confiança de 95% da média.

A energia necessária para a ação do flagelo é metabolizada pelas mitocôndrias, localizadas na peça intermediária do espermatozóide, essa combinação propulsiona o gameta masculino para alcançar o oócito e penetrar na zona pelúcida (O'CONNELL et al., 2002). Devido a isso há a crescente necessidade de avaliar o potencial mitocondrial de amostras seminais, para predizer seu poder fecundante.

No presente experimento, ao comparar as raças Nelore e Simental, verificou-se maior porcentagem de células espermáticas com alta atividade mitocondrial (DAB I), nas amostras dos animais zebuínos (17,82 ± 2,38) em relação aos taurinos (11,4 ± 1,84) (p=0,04), ao contrário do que ocorreu na comparação entre as estações do ano, onde não houve diferenças significativas (p>0,05) (Tabela 10).

Na avaliação do efeito das estações climáticas em função das raças, observou-se que dentro da raça Nelore, houve maior porcentagem de células com alta atividade mitocondrial (DAB I) durante o inverno em relação ao verão (22,34 ± 3,62 e 13,30 ± 2,51, respectivamente, p=0,04), enquanto a ocorrência de células com potencial intermediário (DAB III) foi maior durante o verão (22,10 ± 2,67) em relação ao inverno (13,88 ± 1,34) (p= 0,01). Porém, analisando a raça Simental, não foi encontrado diferenças entre as estações em nenhuma das classes de atividade mitocondrial (p>0,05) (Tabela 11).

Por fim, quando se comparou as raças, dentro de cada estação do ano, especificamente no inverno, verificou-se a presença de maior quantidade de células com alta atividade mitocondrial (DAB I) em touros Nelore e menor quantidade em touros Simental (22,34 ± 3,62 e 11,60 ± 2,92, respectivamente, p=0,03); e o percentual de células classificadas DAB III, foi de 21,19 ± 3,36 em simentais contra 13,88 ± 1,34 (p=0,03). Por outro lado, durante o verão, não houve nenhuma diferença significativa entre as raças estudadas (p>0,05) (Tabela 12).

A maior porcentagem de células com alto potencial de mitocôndria encontrado em sêmen proveniente de *B. indicus* (Tabela 10) e a ocorrência de maior quantidade de células com mitocôndria ativa (DAB I), no inverno, em touros da raça Nelore e maior quantidade de espermatozóides com mitocôndria pouco ativa (DAB III) em touros europeus (Tabela 12), no presente estudo, diferiu dos dados obtidos por Züge (2002), que ao comparar amostras seminais criopreservadas, também de touros da raça Nelore e Simental, não encontrou diferença entre raças em nenhuma classe de atividade mitocondrial (DAB I = Nelore 72,86 ± 13,06 e Simental 70,93 ± 7,31, p=0,75), porém, a autora não levou em consideração o clima do local, nem a estação do ano em que as amostras foram colhidas.

Os resultados apresentados na tabela 11, onde, nas amostras seminais de touros nelores, houve maior ocorrência de células classificadas como DAB I durante o inverno e DAB III durante o verão sugerem uma influência deletéria das altas temperaturas do verão na atividade mitocondrial espermática. Apesar de não ter havido diferenças nos animais da raça Simental, esses dados eram esperados, já que diversos trabalhos mostram os danos da alta temperatura sobre a qualidade seminal (VOGLER et al., 1993; KOIVISTO et al., 2008).

Em Cuba, ambas as subespécies apresentaram sêmen de melhor qualidade (motilidade, concentração, percentagem de espermatozóides vivos) no período frio (MENENDEZ-BUXADERA et al., 1983).

Em apoio ao presente estudo, Blumer e colaboradores, em 2008, ao realizar estudo com homens que sofriam de varicocele, alteração essa que aumenta a temperatura testicular, obtiveram como resultados maior porcentagem de células com mitocôndria inativa (DAB III) no grupo em estudo do que no controle (14,4 ± 6,0 e 7,8 ± 4,7, respectivamente, p=0,001), enquanto que em amostras de pacientes do grupo controle houve uma tendência de maior número de espermatozóides classificados como DAB II (p=0,086).

Contrariamente, durante o verão não houve diferenças entre amostras seminais dos taurinos e zebuínos, embora diversos autores tenham descrito a sensibilidade dos animais *Bos taurus taurus* em regiões de temperatura elevada (OHASHI et al., 1998; GARCIA 2004; HANSEN, 2004; FERNANDES 2005; KOIVISTO et al., 2008).

A ocorrência de maior quantidade de células com mitocôndria ativa (DAB I), no inverno, em touros da raça Nelore e maior quantidade de espermatozóides com mitocôndria pouco ativa (DAB III) em touros europeus, não equivale ao encontrado por Koivisto et al., 2008 onde não houve diferença sobre a motilidade espermática, no inverno, entre touros zebuínos e taurinos, já que a motilidade espermática progressiva relaciona-se em parte com a atividade mitocondrial (TURNER, 2003).

6.2.4 Integridade de DNA

Os resultados referentes à variável integridade de DNA espermático (Ensaio Cometa) estão descritos nas tabelas 13, 14 e 15.

Tabela 13 - Efeito das raças e das estações climáticas [média ± erro padrão, (IC 95%)] sobre a porcentagem de espermatozóides classes I, II, III e IV na avaliação da integridade de DNA (COMETA I, COMETA II, COMETA III e COMETA IV), de amostras seminais criopreservadas, de touros das raças Nelore e Simental, criados em clima tropical, coletadas em inverno e verão

	Nelore	Simental	p*	Verão	Inverno	p**
Cometa I	20,62 ± 3,40 (13,52-27,71)	24,72 ± 2,53 (19,43-30,02)	0,34	20,02 ± 2,88 (14,00-26,05)	25,32 ± 3,05 (18,94-31,70)	0,21
Cometa II	55,63 ± 3,40 (48,53-62,74)	57,70 ± 2,24 (53,00-62,39)	0,61	57,95 ± 3,56 (50,50-65,40)	55,38 ± 1,95 (52,30-59,47)	0,53
Cometa III	18,84 ± 2,68 (13,24-24,45)	14,02 ±1,02 (11,90-16,15)	0,16	17,70 ± 2,47 (12,52-22,88)	15,17 ± 1,59 (11,85-18,49)	0,37
Cometa IV	4,90 ± 1,45 (1,85-7,95)	3,55 ± 0,72 (2,04-5,05)	0,57	4,32 ± 1,40 (1,38-7,26)	4,12 ± 0,84 (2,36-5,89)	0,28

* referente à comparação entre raças (Nelore e Simental);
** referente à comparação entre estações climáticas (inverno e verão);
IC95%: intervalo de confiança de 95% da média.

Tabela 14 - Efeito das estações climáticas em função das raças [média ± erro padrão, (IC 95%)] sobre a porcentagem de espermatozóides classes I, II, III e IV na avaliação da integridade de DNA (COMETA I, COMETA II, COMETA III e COMETA IV), de amostras seminais criopreservadas, de touros das raças Nelore e Simental, criados em clima tropical, coletadas em inverno e verão

	Nelore			Simental		
	Verão	Inverno	p*	Verão	Inverno	p**
Cometa I	17,1 ± 4,52 (6,87-27,32)	24,14 ± 5,03 (12,75-35,53)	0,31	22,95 ± 3,56 (14,9 – 31,01)	26,50 ± 3,69 (18,15 – 34,84)	0,5
Cometa II	55,6 ± 6,20 (41,56-69,63)	55,67 ± 3,18 (48,46-62,88)	0,99	60,30 ± 3,71 (51,90 – 68,70)	55,10 ± 2,43 (49,60 – 60,60)	0,27
Cometa III	21,55 ± 4,56 (11,23-31,87)	16,14 ± 2,80 (9,81-22,46)	0,27	13,85 ± 1,32 (10,85 – 16,84)	14,20 ± 1,61 (10,55 – 17,85)	0,87
Cometa IV	5,75 ± 2,71 (-0,39-11,89)	4,05 ± 1,19 (1,36-6,74)	0,95	2,90 ± 0,71 (1,28 – 4,51)	4,20 ± 1,26 (1,36 – 7,04)	0,12

* referente à comparação entre inverno e verão dos touros da raça Nelore;
** referente à comparação entre inverno e verão dos touros da raça Simental;
IC95%: intervalo de confiança de 95% da média.

Tabela 15 - Efeito das raças em função das estações climáticas [média ± erro padrão, (IC 95%)] sobre a porcentagem de espermatozóides classes I, II, III e IV na avaliação da integridade de DNA (COMETA I, COMETA II, COMETA III e COMETA IV), de amostras seminais criopreservadas, de touros das raças Nelore e Simental, criados em clima tropical, coletadas em inverno e verão

	Verão			Inverno		
	Nelore	Simental	p*	Nelore	Simental	p**
Cometa I	17,10 ± 4,52 (6,87-27,32)	22,95 ± 3,65 (14,89-31,01)	0,32	24,14 ± 5,03 (12,75-35,53)	26,50 ± 3,69 (18,15-34,84)	0,71
Cometa II	55,60 ± 6,20 (41,56-69,64)	60,30 ± 3,71 (51,90-68,70)	0,52	55,67 ± 3,18 (48,46-62,88)	55,10 ± 2,43 (49,59-60,61)	0,89
Cometa III	21,55 ± 4,56 (11,23-31,87)	13,85 ± 1,32 (10,85-16,85)	0,10	16,14 ± 2,80 (9,81-22,46)	14,20 ± 1,61 (10,55-17,85)	0,55
Cometa IV	5,75 ± 2,71 (-0,39-11,89)	2,90 ± 0,71 (1,28-4,51)	0,33	40,05 ± 1,19 (1,36-6,74)	4,20 ± 1,26 (1,36-7,04)	0,71

* referente à comparação entre raças (Nelore e Simental), durante o verão;
** referente à comparação entre raças (Nelore e Simental), durante o inverno;
IC95%: intervalo de confiança de 95% da média.

A estabilidade estrutural inerente à cromatina paterna é de vital importância para o processo de fertilização e desenvolvimento embrionário inicial (WARD et al., 1999). Com isso, nota-se a grande importância de realizar técnicas laboratoriais para avaliação da integridade do DNA nuclear espermático.

Analisando-se os dados de todas as amostras, e os efeitos: da raça, do clima, das estações climáticas em função das raças e por fim, o efeito das raças em função das estações do ano, não observou-se nenhuma diferença estatística em relação à porcentagem de espermatozóides com DNA íntegro ou fragmentado.

Esses resultados não eram esperados, uma vez que, em estudo realizado por Bertolla et al. (2006), verificou-se maior porcentagem de células espermáticas com DNA nuclear fragmentado (cometa III e IV) em grupo de adolescentes com varicocele bilateral (20.43 ± 8.97, e 19.57 ± 10.68) quando comparado ao grupo de pacientes sem qualquer alteração (11.38 ± 5.55, e 5.71 ± 2.35) (p=0,014). Concluindo que o aumento da temperatura testicular, em decorrência de varicocele, causa diminuição da qualidade espermática e aumento na fragmentação no DNA nuclear.

Da mesma forma, Karabinus et al. (1997), Garcia (2004) e Fernandes (2005), que ao induzirem degeneração testicular por insulação, em touros das raças Holandesa,

Simental e Nelore (respectivamente), analisaram a fragmentação nuclear através do ensaio SCSA, da coloração de Acridina-laranja e coloração de Fuelgen, respectivamente, e obtiveram como resultado maior quantidade de células com DNA não íntegro a partir do início do tratamento, ou seja, a alta temperatura, novamente alterando a estabilidade da cromatina.

Degeneração testicular, por estresse térmico escrotal (42ºC, durante 30 minutos) em camundongos também evidenciou a diminuição de células espermáticas com DNA íntegro (TUNEL), em amostras colhidas em 7, 14, 21 e 28 dias após o tratamento (PEREZ-CRESPO et al., 2008).

Porém, em todos os trabalhos, a cima, citados, o aumento de temperatura ocorreu diretamente sobre o testículo, cujo dano é efetivamente maior quando se compara com aumento de temperatura ambiental, que ocorre em nível sistêmico.

Slowinska, Karol e Ciereszko (2008), afirmaram que a congelação de sêmen bovino causa baixa taxa (4% a 5%, $p<0,05$) de fragmentação de DNA (Ensaio Cometa), sendo essa, uma característica importante de resistência do espermatozóide bovino à criopreservação.

Paul et al. (2008) submeteram camundongos ao leve estresse térmico (38ºC, durante 24 horas) , e através do método SCSA, observaram leve aumento, porém não significativo, na porcentagem de fragmentação o DNA. Equivalente ao presente estudo, onde o aumento da temperatura ambiental, do inverno para o verão, não foi suficiente para promover alterações no DNA espermático.

6.3 SUBSTÂNCIAS REATIVAS AO ÁCIDO TIOBARBITÚRICO

Para a avaliação do status oxidativo da célula espermática foi utilizada indução da peroxidação lipídica seguida da mensuração das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico, índice de estresse oxidativo.

Os resultados referentes à variável substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) estão descritos nas tabelas 16, 17 e 18.

Tabela 16 - Efeito das raças e das estações climáticas [média ± erro padrão, (IC 95%)] sobre as concentrações de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), de amostras seminais criopreservadas, de touros das raças Nelore e Simental, criados em clima tropical, coletadas em inverno e verão

	Nelore	Simental	p*	Verão	Inverno	p**
TBARS ($ng/10^6$sptz)	1198,95 ± 236,59 (703,76-1694,14)	735,95 ± 214,29 (287,42-1184,47)	0,12	828,42 ± 242,45 (320,97-1335,87)	1106,48 ± 216,15 (654,07-1558,10)	0,28

* referente à comparação entre raças (Nelore e Simental);
** referente à comparação entre estações climáticas (inverno e verão);
IC95%: intervalo de confiança de 95% da média.

Tabela 17 - Efeito das estações climáticas em função das raças [média ± erro padrão, (IC 95%)] sobre as concentrações de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), de amostras seminais criopreservadas, de touros das raças Nelore e Simental, criados em clima tropical, coletadas em inverno e verão

	Nelore			Simental		
	Verão	Inverno	p*	Verão	Inverno	p**
TBARS ($ng/10^6$sptz)	1045,71 ± 358,84 (233,96-1857,46)	1352,20 ± 319,93 (628,46-2075,94)	0,53	611,12 ± 330,05 (-153,50–1357,75)	860,77 ± 285,48 (214,96–1506,57)	0,34

* referente à comparação entre inverno e verão dos touros da raça Nelore;
** referente à comparação entre inverno e verão dos touros da raça Simental;
IC95%: intervalo de confiança de 95% da média.

Tabela 18 - Efeito das raças em função das estações climáticas [média ± erro padrão, (IC 95%)] sobre as concentrações de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), de amostras seminais criopreservadas, de touros das raças Nelore e Simental, criados em clima tropical, coletadas em inverno e verão

	Verão			Inverno		
	Nelore	Simental	p*	Nelore	Simental	p**
TBARS ($ng/10^6$sptz)	1045,71 ± 358,84 (233,96-1857,46)	611,12 ± 330,05 (-135,40-1357,75)	0,22	1352,20 ± 319,93 (628,46-2075,94)	860,77 ± 285,48 (214,96-1506,57)	0,24

* referente à comparação entre raças (Nelore e Simental), durante o verão;
** referente à comparação entre raças (Nelore e Simental), durante o inverno;
IC95%: intervalo de confiança de 95% da média.

Em relação à variável resposta concentração de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico das amostras seminais, não houve diferenças (p=0,12) entre os touros das raças Nelore e Simental (1198,95 ± 236,59 e 735,95 ± 214,29, respectivamente), e nem entre os meses de verão e inverno (828,42 ± 242,45 e 1106,48 ± 216,15, respectivamente; p= 0,28) (Tabela 16).

Da mesma forma, como demonstrado na tabela 17, não foi observado diferença significativa (p=0,53), entre verão (1045,71 ± 358,84) e inverno (1352,20 ± 319,93) nos zebuínos, e tampouco entre verão (611,12 ± 330,05) e inverno (860,77 ± 285,48) nos taurinos (p=0,34).

Quando analisou-se o efeito das raças em função das estações do ano, também não encontrou-se diferença entre Nelore e Simental nem no verão (p=0,22), como no inverno (p=0,24) (Tabela 18).

Em contradição ao presente estudo, Nichi em 2003 ao dosar TBARS de amostras seminais frescas, colhidas de touros das raças Nelore e Simental, criados em clima tropical, durante inverno e verão, obteve como resultados maior nível de estresse oxidativo em amostras colhidas no verão em relação ao inverno (728,1 ± 462,5, e 423,7 ± 410,6, respectivamente, p=0,004), assim como maior concentração de TBARS (p=0,006) nas amostras dos animais taurinos durante o verão (842,6 ± 527,9) em relação ao inverno (419,3 ± 434,1), indicando que a menor qualidade espermática e a menor fertilidade observadas nos animais simentais em regiões quentes, podem estar relacionadas à um maior índice de peroxidação lipídica. Porém, esse autor, além de analisar amostras seminais a fresco, dosou os níveis de peroxidação lipídica espontânea, sem fazer uso do sistema de indução do estresse oxidativo (sulfato de ferro + ácido ascórbico) como no presente estudo.

Em 2008, Rodrigues e colaboradores promoveram estudo comparando o nível de TBARS em amostras seminais frescas (espontâneo) e criopreservadas (induzido) colhidas de animais *B. taurus* (Simental) e *B. indicus* (Nelore) durante o verão, e notaram que nas amostras frescas, o nível de peroxidação lipídica foi maior nos touros simentais (845 ng/10^6 espermatozóides VS 497 ng/10^6 espermatozóides, p<0,05), enquanto que nas mesmas amostras, criopreservadas, o nível de TBARS foi maior nos animais da raça Nelore (548 ng/10^6 espermatozóides VS 118 ng/10^6 espermatozóides, p< 0,05).

Um fator que poderia influenciar os níveis de TBARS verificados no presente experimento seria a frutose, fonte de energia do espermatozóide bovino e presente na solução crioprotetora, que reage com o ácido tiobarbitúrico (TBA), diminuindo as

concentrações de TBARS, por isso não foi encontrado diferenças entre os animais e as estações do ano.

A comparação entre os resultados obtidos no presente experimento e os resultados obtidos por outros pesquisadores torna-se complicada visto que poucos são os estudos sobre o nível de TBARS (induzido) no sêmen de touros estudando o efeito do clima e da raça.

Beconi et al. (1991), verificaram que amostras seminais provenientes de touros da raça holandesa, ao serem tratadas com sulfato de ferro e ácido ascórbico, apresentaram uma produção de 500ng/ml de TBARS no período de duas horas de incubação, sendo que a adição de α-tocoferol reduziu este nível à metade ($p<0,05$).

Resultados semelhantes foram encontrados em experimento realizado por Schöneck et al. (1996), no qual amostras seminais de touros *Bos taurus taurus* foram submetidas ao tratamento com sulfato de ferro e ácido ascórbico para indução da peroxidação lipídica. Nas amostras tratadas com este mecanismo oxidante, houve uma produção de cerca de 500ng/ml de TBARS, no intervalo de 60 minutos, o que ocorreu com as amostras sem a adição do sulfato de ferro e ácido ascórbico, nas quais não houve produção de TBARS no mesmo intervalo de tempo.

O'Flaherty et al. (1997), verificaram que os níveis de TBARS em touros da raça holandesa, obtidos com a peroxidação induzida pelo sistema sulfato de ferro + ácido ascórbico, foram menores quando as amostras foram tratadas com α-tocoferol (6160 ± 900 e 9470 ± 1200 ng/10^8 espermatozóides, respectivamente, $p< 0,05$).

Nair et al. (2006) mantiveram sêmen de bovinos e bubalinos sob refrigeração (4-8ºC) e verificaram que, ao longo do tempo, estas espécies comportaram-se de maneira distinta. Enquanto que os bubalinos apresentaram um aumento significativo nos níveis de malondialdeído (MDA), entre os tempos 0, 12 e 24 horas (1,99 ± 0,26; 4,62 ± 0,07 e 7,12 ± 0,12, respectivamente; $p<0,05$), para os bovinos não foi possível verificar diferenças nos mesmo tempos (1,17 ± 0,29; 2,50 ± 0,28 e 4,33 ± 0,56, respectivamente; $p>0,05$). Para estes autores, essas diferenças podem ter ocorrido por variações interespecíficas no perfil lipídico da membrana espermática; os bubalinos possivelmente apresentando uma maior quantidade de PUFA, sendo, conseqüentemente, mais susceptíveis aos ataques das ROS.

6.4 CORRELAÇÕES

As correlações entre as variáveis respostas foram avaliadas nos quatro grupos separadamente: Nelore/Inverno, Nelore/Verão, Simental/Inverno e Simental/Verão, os resultados estão apresentados nas tabelas 19, 20, 21 e 22.

Tabela 19 - de correlação (significância), entre todas as variáveis respostas estudadas, de amostras seminais criopreservadas, de touros da raça Nelore (*Bos taurus indicus*), criados em clima tropical, coletadas durante o inverno

	MOT	VIGOR	IME	E/N	POPE	DAB I	DAB II	DAB III	DAB IV	COM I	COM II	COM III	COM IV	TBARS
MOT	1,0	0,03 (0,92)	0,77 (0,0089)	0,80 (0,006)	0,22 (0,54)	0,46 (0,18)	-0,34 (0,34)	-0,20 (0,59)	-0,18 (0,62)	0,36 (0,30)	-0,51 (0,13)	-0,08 (0,83)	0,008 (0,98)	0,15 (0,67)
VIGOR	.	1,0	0,66 (0,04)	0,42 (0,23)	0,61 (0,06)	-0,36 (0,30)	0,20 (0,58)	0,07 (0,84)	0,22 (0,54)	0,11 (0,75)	-0,24 (0,51)	0,07 (0,84)	-0,02 (0,96)	0,25 (0,49)
IME	.	.	1,0	0,86 (0,0013)	0,55 (0,09)	0,12 (0,75)	-0,13 (0,73)	-0,10 (0,18)	0,004 (0,99)	0,34 (0,33)	-0,53 (0,11)	-0,001 (0,98)	-0,06 (0,99)	0,27 (0,45)
E/N	.	.	.	1,0	0,47 (0,17)	0,22 (0,55)	-0,15 (0,69)	-0,02 (0,96)	-0,12 (0,74)	0,21 (0,56)	-0,42 (0,22)	0,06 (0,86)	0,09 (0,80)	0,35 (0,32)
POPE	.	.	.	.	1,0	-0,33 (0,35)	0,11 (0,75)	0,59 (0,07)	0,04 (0,91)	0,23 (0,51)	-0,08 (0,83)	-0,20 (0,58)	-0,31 (0,38)	-0,10 (0,78)
DAB I	.	.	.	.	.	1,0	-0,13 (0,72)	-0,69 (0,03)	-0,70 (0,02)	-0,05 (0,88)	0,27 (0,45)	-0,15 (0,68)	-0,16 (0,66)	0,20 (0,56)
DAB II	.	.	.	.	.	.	1,0	0,03 (0,93)	-0,56 (0,09)	0,20 (0,58)	0,27 (0,44)	-0,41 (0,24)	-0,62 (0,05)	0,07 (0,84)
DAB III	.	.	.	.	.	.	.	1,0	0,32 (0,37)	0,01 (0,97)	0,05 (0,88)	-0,06 (0,86)	-0,04 (0,92)	-0,22 (0,54)
DAB IV	.	.	.	.	.	.	.	.	1,0	-0,09 (0,81)	-0,50 (0,14)	0,46 (0,18)	0,61 (0,06)	-0,18 (0,61)
COM I	.	.	.	.	.	.	.	.	.	1,0	-0,63 (0,05)	-0,79 (0,006)	-0,66 (0,04)	0,38 (0,28)
COM II	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	1,0	0,05 (0,90)	-0,09 (0,80)	-0,19 (0,60)
COM III	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	1,0	0,90 (0,0009)	-0,41 (0,24)
COM IV	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	1,0	-0,16 (0,66)
TBARS	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	1,0

Tabela 20 - Coeficientes de correlação (significância), entre todas as variáveis respostas estudadas, de amostras seminais criopreservadas, de touros da raça Nelore (*Bos taurus indicus*), criados em clima tropical, coletadas durante o verão

	MOT	VIGOR	IME	E/N	POPE	DAB I	DAB II	DAB III	DAB IV	COM I	COM II	COM III	COM IV	TBARS
MOT	1,0	0,61 (0,06)	0,84 (0,002)	0,71 (0,02)	0,02 (0,96)	0,62 (0,06)	0,48 (0,16)	-0,50 (0,14)	-0,38 (0,28)	-0,14 (0,70)	0,21 (0,55)	-0,04 (0,91)	-0,18 (0,61)	0,43 (0,22)
VIGOR	.	1,0	0,94 (<.0001)	0,30 (0,39)	0,14 (0,69)	0,40 (0,25)	0,32 (0,37)	0,06 (0,88)	-0,51 (0,13)	0,04 (0,90)	0,24 (0,51)	-0,22 (0,53)	-0,24 (0,50)	0,26 (0,47)
IME	.	.	1,0	0,51 (0,13)	0,10 (0,78)	0,54 (0,11)	0,42 (0,22)	-0,18 (0,62)	-0,51 (0,13)	-0,03 (0,94)	0,25 (0,48)	-0,17 (0,64)	-0,24 (0,50)	0,36 (0,31)
E/N	.	.	.	1,0	0,39 (0,26)	0,44 (0,20)	0,59 (0,07)	-0,22 (0,55)	-0,54 (0,11)	-0,10 (0,79)	0,03 (0,92)	0,10 (0,77)	-0,09 (0,80)	0,02 (0,96)
POPE	.	.	.	.	1,0	0,08 (0,82)	0,20 (0,58)	0,08 (0,82)	-0,24 (0,49)	-0,11 (0,76)	0,13 (0,72)	0,02 (0,95)	-0,15 (0,67)	-0,42 (0,22)
DAB I	.	.	.	.	.	1,0	0,53 (0,11)	-0,56 (0,09)	-0,62 (0,06)	-0,17 (0,64)	-0,48 (0,16)	0,55 (0,10)	0,47 (0,17)	0,44 (0,20)
DAB II	.	.	.	.	.	.	1,0	-0,33 (0,35)	-0,80 (0,006)	-0,18 (0,63)	-0,19 (0,61)	0,31 (0,38)	0,20 (0,58)	0,42 (0,23)
DAB III	.	.	.	.	.	.	.	1,0	-0,09 (0,79)	0,44 (0,20)	0,06 (0,87)	-0,37 (0,29)	-0,24 (0,50)	-0,56 (0,09)
DAB IV	.	.	.	.	.	.	.	.	1,0	-0,07 (0,85)	0,39 (0,26)	-0,31 (0,39)	-0,27 (0,45)	-0,18 (0,61)
COM I	.	.	.	.	.	.	.	.	.	1,0	-0,12 (0,73)	-0,57 (0,09)	-0,43 (0,22)	-0,56 (0,09)
COM II	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	1,0	-0,74 (0,01)	-0,83 (0,003)	-0,19 (0,60)
COM III	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	1,0	0,96 (<.0001)	0,51 (0,13)
COM IV	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	1,0	0,51 (0,13)
TBARS	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	1,0

Tabela 21 - Coeficientes de correlação (significância), entre todas as variáveis respostas estudadas, de amostras seminais criopreservadas, de touros da raça Simental (*Bos taurus taurus*), criados em clima tropical, coletadas durante o inverno

	MOT	VIGOR	IME	E/N	POPE	DAB I	DAB II	DAB III	DAB IV	COM I	COM II	COM III	COM IV	TBARS
MOT	1,0	0,54 (0,10)	0,92 (0,0001)	0,91 (0,0002)	-0,06 (0,87)	0,74 (0,01)	0,17 (0,65)	-0,26 (0,46)	-0,38 (0,28)	0,62 (0,06)	-0,49 (0,15)	-0,50 (0,14)	-0,24 (0,50)	0,29 (0,41)
VIGOR	.	1,0	0,82 (0,004)	0,49 (0,15)	-0,27 (0,45)	0,21 (0,56)	-0,03 (0,93)	-0,33 (0,36)	0,12 (0,73)	0,46 (0,18)	-0,32 (0,36)	-0,28 (0,43)	-0,36 (0,30)	0,09 (0,81)
IME	.	.	1,0	0,84 (0,002)	-0,16 (0,65)	0,60 (0,07)	0,10 (0,79)	-0,33 (0,36)	-0,20 (0,58)	0,63 (0,05)	-0,48 (0,16)	-0,46 (0,18)	-0,33 (0,36)	0,24 (0,50)
E/N	.	.	.	1,0	0,10 (0,79)	0,67 (0,03)	0,37 (0,29)	-0,39 (0,26)	-0,40 (0,25)	0,68 (0,03)	-0,56 (0,09)	-0,54 (0,10)	-0,22 (0,54)	0,26 (0,47)
POPE	.	.	.	.	1,0	-0,26 (0,46)	0,27 (0,46)	0,20 (0,58)	-0,17 (0,64)	-0,04 (0,90)	0,20 (0,58)	-0,20 (0,59)	-0,009 (0,98)	-0,52 (0,12)
DAB I	.	.	.	.	.	1,0	0,36 (0,30)	-0,44 (0,20)	-0,55 (0,10)	0,28 (0,44)	-0,29 (0,41)	-0,10 (0,78)	-0,11 (0,75)	0,30 (0,40)
DAB II	.	.	.	.	.	.	1,0	-0,29 (0,42)	-0,73 (0,02)	0,05 (0,89)	0,27 (0,44)	-0,29 (0,42)	-0,31 (0,38)	0,03 (0,93)
DAB III	.	.	.	.	.	.	.	1,0	-0,22 (0,54)	-0,09 (0,81)	0,44 (0,20)	-0,15 (0,69)	-0,42 (0,23)	-0,10 (0,78)
DAB IV	.	.	.	.	.	.	.	.	1,0	-0,14 (0,70)	-0,32 (0,36)	0,36 (0,30)	0,57 (0,08)	-0,13 (0,72)
COM I	.	.	.	.	.	.	.	.	.	1,0	-0,71 (0,02)	-0,85 (0,002)	-0,47 (0,17)	0,69 (0,03)
COM II	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	1,0	0,29 (0,42)	-0,22 (0,53)	-0,54 (0,10)
COM III	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	1,0	0,64 (0,04)	-0,57 (0,09)
COM IV	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	1,0	-0,25 (0,49)
TBARS	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	1,0

Tabela 22 – Coeficientes de correlação (significância), entre todas as variáveis respostas estudadas, de amostras seminais criopreservadas, de touros da raça Simental (*Bos taurus taurus*), criados em clima tropical, coletadas durante o verão

	MOT	VIGOR	IME	E/N	POPE	DAB I	DAB II	DAB III	DAB IV	COM I	COM II	COM III	COM IV	TBARS
MOT	1,0	0,09 (0,80)	0,78 (0,008)	0,50 (0,14)	0,21 (0,56)	0,64 (0,05)	0,39 (0,27)	-0,30 (0,40)	-0,43 (0,22)	0,24 (0,50)	-0,17 (0,65)	-0,14 (0,69)	-0,07 (0,84)	0,47 (0,17)
VIGOR	.	1,0	0,69 (0,03)	-0,21 (0,56)	-0,33 (0,35)	0,41 (0,24)	0,08 (0,82)	-0,51 (0,13)	-0,05 (0,89)	0,54 (0,11)	-0,62 (0,05)	0,03 (0,93)	0,48 (0,15)	0,008 (0,98)
IME	.	.	1,0	0,22 (0,53)	-0,05 (0,88)	0,71 (0,02)	0,33 (0,35)	-0,54 (0,11)	-0,34 (0,34)	0,51 (0,13)	-0,51 (0,13)	-0,08 (0,81)	0,25 (0,48)	0,34 (0,33)
E/N	.	.	.	1,0	0,44 (0,20)	0,46 (0,18)	0,42 (0,23)	0,13 (0,71)	-0,52 (0,12)	-0,10 (0,77)	0,42 (0,22)	-0,73 (0,01)	-0,32 (0,37)	0,27 (0,44)
POPE	.	.	.	.	1,0	0,12 (0,73)	0,70 (0,02)	0,29 (0,41)	-0,64 (0,04)	-0,53 (0,12)	0,66 (0,04)	-0,30 (0,39)	-0,23 (0,51)	-0,17 (0,63)
DAB I	.	.	.	.	.	1,0	0,69 (0,03)	-0,41 (0,24)	-0,75 (0,01)	0,48 (0,16)	-0,38 (0,27)	-0,32 (0,37)	0,18 (0,62)	0,48 (0,16)
DAB II	.	.	.	.	.	.	1,0	-0,13 (0,73)	-0,95 (<,0001)	-0,11 (0,76)	0,23 (0,52)	-0,30 (0,39)	-0,07 (0,85)	0,13 (0,72)
DAB III	.	.	.	.	.	.	.	1,0	-0,08 (0,82)	-0,67 (0,03)	0,58 (0,08)	0,20 (0,57)	-0,04 (0,90)	0,08 (0,82)
DAB IV	.	.	.	.	.	.	.	.	1,0	0,12 (0,75)	-0,21 (0,56)	0,27 (0,44)	-0,006 (0,98)	-0,31 (0,39)
COM I	.	.	.	.	.	.	.	.	.	1,0	-0,88 (0,0009)	-0,25 (0,49)	0,03 (0,94)	-0,01 (0,97)
COM II	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	1,0	-0,23 (0,53)	-0,41 (0,23)	-0,15 (0,68)
COM III	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	1,0	0,55 (0,10)	0,23 (0,52)
COM IV	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	1,0	0,41 (0,24)
TBARS	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	1,0

Nos quatro grupos estudados, **Nelore/Inverno, Nelore/Verão, Simental/Inverno** e **Simental/Verão** (Tabelas 19, 20, 21 e 22), foi encontrada, em comum, correlação negativa entre DAB IV e DAB I e/ou DAB II ($p<0,05$), indicando que conforme aumenta a porcentagem de células com mitocôndria inativa, diminui a porcentagem daquelas que possuem atividade mitocondrial. Assim como a ocorrência de correlação negativa entre as classes de células classificadas como cometa II e cometa I ($p<0,05$), com excreção do grupo nelore durante o verão.

Para efetuar o cálculo do índice de motilidade espermática, utilizam-se os valores de motilidade e vigor, portanto, em todos os grupos estudados, houve também, correlações positivas do IME com: motilidade e vigor ($p<0,05$).

Somente nas amostras seminais dos touros da raça **Simental,** houve correlação positiva entre DAB I e motilidade tanto no verão ($r=0,64$; $p=0,05$), como no inverno ($r=0,74$; $p=0,01$), ou seja, quanto maior a quantidade de células com mitocôndria ativa, maior a porcentagem de células com motilidade progressiva o mesmo foi encontrado por Barros (2007) ao analisar sêmen de gato-do-mato-pequeno (*Leopardus tigrinus*) ($r=0,63$; $p=0,0001$) (Tabelas 21 e 22).

No grupo **Simental/Verão** (Tabela 22), observou-se correlação positiva entre DAB I e IME ($r=0,71$; $p=0,02$), em concordância com o trabalho acima citado, onde mostrou coeficiente de correlação igual a 0,59 e $p=<0,0001$(BARROS, 2007).

Foi encontrada, ainda, correlação entre DAB II e POPE ($r=0,70$; $p=0,02$), indicando que quanto maior a porcentagem de células com mitocôndria ativa, maior a porcentagem de células com acrossomo íntegro. Assim como a correlação negativa entre DAB IV e POPE ($r= -0,64$; $p=0,04$), quanto mais aumenta a quantidade de células com mitocôndria inativa, diminui a quantidade daquelas com acrossomo íntegro, Barros em 2007 também descreveu essa correlação entre DAB IV e POPE ($r=-0,58$; $p=<0,0001$).

Houve, também, correlação negativa entre células classe I do cometa e classe III do DAB ($r=-0,67$; $p=0,03$), ou seja, quanto maior a porcentagem de células com o DNA íntegro, menor a quantidade de células com mitocôndria parcialmente inativa, resultados semelhantes foram encontrados por Blumer et al. (2008), no grupo de homens sem varicocele onde houve correlação negativa entre cometa I e DAB IV ($r=-0,473$; $p=0,035$).

Correlações positivas entre DAB I e II ($r=0,69$; $p=0,03$), e entre células com DNA parcialmente íntegro (cometa II) e porcentagem de acrossomo íntegro (POPE) ($r=0,66$; $p=0,04$), também ocorreram no presente experimento.

Ao avaliar o grupo **Simental/Inverno** (Tabela 21), observou-se correlação positiva entre células classificadas DAB I com E/N (r=0,67; p=0,03), ou seja, quanto maior a porcentagem de células com membrana plasmática íntegra, maior a quantidade de espermatozóides com mitocôndrias ativas, o mesmo foi encontrado por Barros em 2007, porém em sêmen de gato-do-mato-pequeno (r=0,73; p=0,0001).

A variável, alto grau de integridade de DNA (cometa I), correlacionou-se positivamente com: IME (r=0,63; p=0,05), E/N (r=0,68; p=0,03) e houve tendência de correlação com motilidade (r=0,62; p=0,06). Januskauskas et al. (2003) verificaram que mudanças na membrana plasmática podem estar relacionadas a danos do DNA após a criopreservação de sêmen bovino, pois encontraram correlação altamente significativa (p<0,001) entre porcentagem de células com desnaturação de DNA (acridina laranja) e células com membrana plasmática lesada (corada por iodeto de propídio).

Ao comparar as correlações encontradas nos grupos **Nelore/Inverno** e **Nelore/Verão** (Tabelas 19 e 20), foi visto que em comum, houve correlação positiva entre E/N e motilidade (r=0,80; p=0,006 e r=0,71; p=0,02, inverno e verão respectivamente). Da mesma forma, Barros 2007, descreveu correlação positiva entre essas duas variáveis (r=0,74; p=0,006). Valcárcel et al. (1994) indicaram a integridade de membrana plasmática, determinada por sondas fluorescentes, como sendo um marcador da viabilidade de espermatozóides de carneiros, e da estimativa da sobrevivência espermática a 37ºC, após a descongelação, já que verificaram correlação positiva (r=0,64) entre motilidade e integridade de membrana plasmática.

Também foi visto alta correlação positiva entre as variáveis cometa IV e cometa III (r=0,90; p=0,0009 e r=0,96; p= <0.0001, inverno e verão respectivamente), já que ambos estão relacionados à alta fragmentação de DNA.

Avaliando somente o grupo **Nelore/Verão** (Tabela 20), foi verificada uma tendência em correlação positiva entre vigor e motilidade (r=0,61; p=0,06).

Houve correlação negativa entre células classificadas como cometa II e: cometa III (r=-0,74; p=0,01) e cometa IV (r=-0,83; p=0,003), indicando que conforme aumentou a porcentagem de células com DNA parcialmente íntegro, diminuiu a porcentagem daquelas com DNA fragmentado.

Correlação negativa entre DAB I e DAB III (r=-0,69; p=0,03), foi encontrada no grupo dos touros **Nelore/Inverno** (Tabela 19). E também entre cometa IV e DAB II (r=-0,62; p=0,05), indicando que quanto maior a porcentagem de células com DNA fragmentado, menor aquelas com mitocôndria ativa. Corroborando com esses resultados, Blumer et al., em 2008, indicaram correlação positiva entre espermatozóides

classificados com DAB III e cometa IV (r=0,657; p=0,006), em homens com varicocele, ou seja, quanto maior a quantidade de células com DNA fragmentado, maior também a quantidade de células com mitocôndria inativa.

Houve tendência a correlacionar-se a quantidade de células com DNA fragmentado (cometa IV) e células com mitocôndrias inativas (DAB IV) (r=0,61; p=0,06). E também, tendência de correlação entre as variáveis integridade de acrossomo (POPE) e vigor (r=0,61;p=0,06). Ambos os resultados se assemelham, novamente, com os encontrados por Barros (2007), trabalho no qual a correlação entre cometa I e DAB I foi positiva (r=0,43; p=0,01), assim como entre POPE e vigor (r=0,59; p=0,003).

Por fim, quanto maior a ocorrência de células com DNA fragmentado (cometa IV), menor a quantidade de espermatozóides com DNA íntegro (cometa I) (r=-0,66; p=0,04), foi visto no presente experimento nos touros zebuínos, durante o inverno.

Estudando os grupos **Nelore / Verão** (Tabela 20) e **Simental / Verão** (Tabela 22), percebeu-se correlação entre motilidade e DAB I (r=0,64; p=0,05) em touros simentais e tendência à correlação em touros nelores (r=0,62; p= 0,06), da mesma forma como já havia sido observado no grupo Simental/inverno.

Ao comparar a ocorrência de correlações em comum dos grupos **Nelore / Inverno** (Tabela 19) e **Simental / Inverno** (Tabela 21) foi verificada a correlação positiva entre E/N e: motilidade (r=0,80; p=0,006 e r=0,91; p=0,0002, nelore e simental respectivamente), IME (r=0,86; p=0,001 e r=0,84; p=0,002, nelore e simental respectivamente).

Conforme aumentou a porcentagem de células com DNA fragmentado (cometa III), diminuiu aquelas com DNA íntegro (cometa I) (r=-0,79; p=0,006 e r=-0,85; p=0,002, nelore e simental respectivamente), equivalente ao encontrado no grupo dos zebuínos durante o inverno, do presente experimento.

Foi visto também, que em comum, apresentaram correlação positiva entre as variáveis cometa III e cometa IV (r=0,90; p=0,0009 e r=0,64; p=0,04, nelore e simental respectivamente).

6.5 RESUMO DOS RESULTADOS

Os resultados de todas as variáveis estudadas, dentro dos quatro grupos (Nelore/Verão, Nelore/Inverno, Simental/Verão e Simental/Inverno), estão representados no gráfico 2.

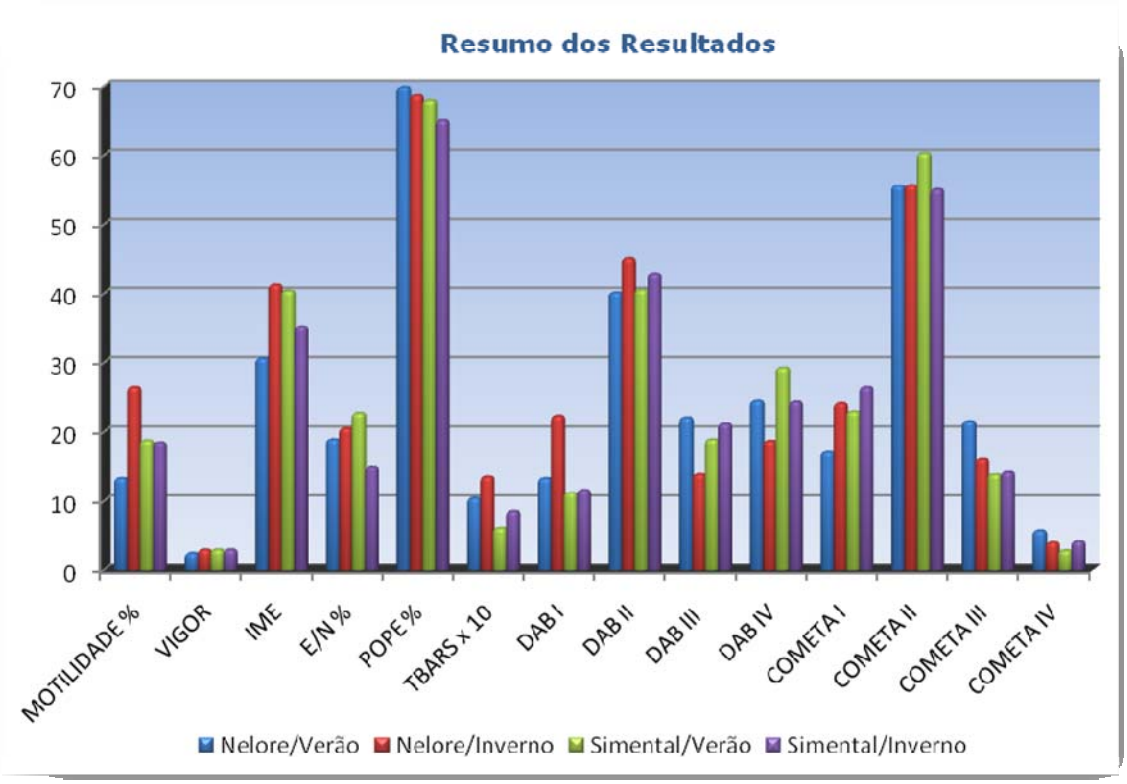


Gráfico 2 - Valores das médias, das variáveis estudadas em amostras seminais criopreservadas de touros das raças Nelore e Simental, criados em clima tropical, coletadas em inverno e verão

6.6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Apesar de diversos trabalhos já terem demonstrado maior sensibilidade dos touros de origem européia ao estresse térmico, os resultados apresentados neste experimento mostraram poucas alterações em amostras seminais criopreservadas de animais não adaptados ao clima tropical quando comparadas às amostras seminais de touros de origem indiana, famosos por sua resistência às altas temperaturas.

Outro parâmetro importante foi a ocorrência de maior atividade mitocondrial durante o inverno, nos animais zebuínos, mostrando que, mesmo animais adaptados à essas condições climáticas, também sofrem conseqüências do estresse térmico.

Os testes convencionais são de grande importância para a análise espermática, porém para determinação do diagnóstico de infertilidade, é fundamental a realização de testes que avaliem as diferentes funções da célula espermática (AITKEN, 1994). Para que seja viável a aplicação prática destes testes, é muito importante que os mesmos sejam simples de serem executados, dependam o mínimo possível de equipamentos sofisticados e tenham baixo custo. Testes muito complexos limitam sua aplicação, tornando inviável a utilização fora de uma infra-estrutura laboratorial adequada. A maioria das técnicas de avaliação funcional da célula espermática utilizadas neste experimento (DAB, POPE e E/N), é bom exemplo de testes simples cuja aplicação a campo é viável e que trazem respostas valiosas sobre a fertilidade do animal.

No entanto, algumas ferramentas são essenciais mesmo que sua aplicação não seja tão acessível pelo custo e praticidade, como é o caso da avaliação da integridade do material genético da célula espermática. No presente experimento, não foram encontradas correlações entre a integridade do DNA e os testes convencionais, que podem indicar que mesmo com o DNA fragmentado, o espermatozóide pode vir a fecundar o oócito. Estes danos na cromatina podem resultar em falhas na fertilização, baixas taxas de implantação, morte embrionária precoce, aborto ou doenças genéticas na prole (AITKEN, 2005).

Além disso, o teste de indução da peroxidação lipídica, através de um sistema gerador de ROS formado pelo sulfato de ferro e ácido ascórbico, é de grande valia para que possa determinar se uma amostra é mais resistente que outra ao estresse oxidativo. Neste estudo, foi visto que, após a descongelação seminal, a suscetibilidade celular ao estresse oxidativo foi muito semelhante entre os dois grupos animais, tanto durante o inverno, como durante o verão.

Esse resultado pode indicar que, apesar dos animais Europeus serem mais sensíveis ao estresse oxidativo, visto principalmente em amostras seminais frescas (NICHI, 2003), apresentaram, após a descongelação seminal, nível de proteção antioxidante semelhante aos animais da raça Nelore, indicando que a peroxidação lipídica sofrida, espontaneamente, devido ao estresse térmico, selecionou espermatozóides mais resistentes à criopreservação.

CONCLUSÃO

7 CONCLUSÃO

Baseado nos resultados obtidos, dentro das condições de realização deste experimento, conclui-se que:

- Os touros da raça Nelore (*Bos taurus indicus*) apresentaram maior motilidade progressiva durante o inverno em relação ao verão.

- Os touros da raça Simental (*Bos taurus taurus*) apresentaram menor porcentagem de células com mitocôndrias ativas em relação aos touros da raça Nelore.

- Os touros da raça Nelore apresentaram maior porcentagem de células com atividade mitocondrial alta, e maior porcentagem de células com atividade mitocondrial baixa, durante inverno e verão, respectivamente.

- Amostras seminais coletadas durante o inverno, provenientes de touros da raça Simental, demonstraram menor porcentagem de células com alta atividade mitocondrial e maior porcentagem de células com baixa atividade mitocondrial, em relação às amostras de touros da raça Nelore, nesta mesma época.

- Não houve diferenças significativas, nas características espermáticas, em relação ao vigor, IME, integridade de membrana plasmática, integridade de membrana acrossomal e integridade de DNA, entre os animais da raça Nelore e Simental, durante inverno ou verão.

- Bem como, não houve efeito de raça ou de estação do ano sobre a suscetibilidade espermática ao estresse oxidativo, sendo os níveis de TBARS semelhantes entre os animais adaptados (*Bos taurus indicus* - Nelore) e não adaptados (*Bos taurus taurus* - Simental), durante as duas estações climáticas distintas.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

ABCRSS. Associação Brasileira dos Criadores das Raças Simental e Simbrasil. **A Raça**. 2009. Disponível em: <www.simentalsimbrasil.com.br>. Acesso em 15 abr. 2009.

ABIEC. Associação Brasileira das Indústrias Exportadoras de Carne. **Relatório detalhado sobre as exportações de carne brasileira 2007; 2009.** Disponível em: <www.abiac.org.br/estatísticas>. Acesso em: 24 abr. 2009.

ACNB. Associação dos Criadores de Nelore do Brasil. **A Raça.** 2009. Disponível em: <www.nelore.org.br>. Acesso em: 15 abr.2009.

AGARWAL, A.; PRABAKARAN, S. A. Mechanism, measurement, and prevention of oxidative stress in male reproductive physiology. **Indian Journal of Experimental Biology,** v. 43, p. 963-974, 2005.

AGARWAL, A.; GUPTA, S.; SIKKA, S. The role of free radicals and antioxidants in reproduction. **Current Opinion in Obstetetrics and Gynecology**, v. 18, p. 325–332, 2006.

AITKEN, R. J.; HARKISS, D.; BUCKINGHAM, D. W. Analysis of lipid peroxidation mechanisms in human spermatozoa. **Molecular Reproduction and Development**, v. 35, p. 302-315, 1993a.

AITKEN, R. J.; HARKISS, D.; BUCKINGHAM, D. W. Relationship between iron-catalysed lipid peroxidation potential and human sperm function. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 98, p. 257-265, 1993b.

AITKEN, J.; FISHER, H. Reactive oxygen species generation and human spermatozoa: the balance of benefit and risk. **Bioessays,** v. 16, p. 259-267, 1994.

AITKEN, R. J.; WST, K.; BUCKINGHAM, D. Leukocytic infiltration into the human ejaculate and its association with semen quality, oxidative stress and sperm function. **Journal of Andrology,** v. 15, p. 343-352, 1994.

AITKEN, R. J.; GORDON, E.; HARKISS, D.; TWIGG, J. P.; MILNE, P.; JENNINGS, J.; IRVINE, D. S. Relative impact of oxidative stress on the functional competence and genomic integrity of human spermatozoa. **Biology of Reproduction,** v. 59, p. 1037-1046, 1998.

AITKEN, R. J. The Amoroso lecture. The human spermatozoon - a cell in crisis? **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 115, p. 1-7, 1999.

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

AITKEN, R. J.; BARKER, M. A. Reactive oxygen species generation by human spermatozoa: a continuing enigma. **International Journal of Andrology**, v. 25, p. 191-194, 2002.

AITKEN R. J.; BAKER M. A. Oxidative stress, sperm survival and fertility control. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 250, n. 1, p. 66-69, 2006.

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

ALVARENGA, M. A.; LANDIN E ALVARENGA, F. C.; MOREIRA, R. M.; CESARINO, M. M. Utilization of ethylene glycol as a cryoprotector for equine sêmen. In: ANNUAL MEETING OF THE SOCIETY FOR THERIOGENOLOGY, 1998. Proceedings for annual meeting Baltimore: **Society for Theriogenology**, 1998. p. 155.

ALVAREZ, J. G.; STOREY, B. T. Role of glutathione peroxidase in protecting mammalian spermatozoa from loss of motility caused by spontaneous lipid. **Gamete Research**, v. 23, p. 77-90, 1989.

ALVAREZ, J. G.; STOREY, B. Evidence for increase peroxidative damage and loss of superoxide dismutase activityas a model of subtethal cryodamage to human sperm during cryopreservation. **Journal of Andrology,** v. 13, p. 232-241, 1992.

AMANN, R. P. Sperm production rates. In: JOHNSON, A. D.; GOMES, W. R.; VANDEMARK, N. L. **The testis**. New York: Academic Press, 1970, v. 1, p.433-482.

AMANN, R. P.; SCHANBACHER, B. D. Reproductive physiology of male. **Journal of Animal Science**, v. 2, p. 380-403, 1983.

AMANN, R. P.; PICKETT, B. W. Principles of cryopreservation and a review of cryopreservation of stallion spermatozoa. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 7, n. 3, p. 145-174, 1987.

AMANN, R. P.; HAMMERSTEDT, R. H. In vitro evaluation of sperm quality: an opinion. **Journal of Andrology**, v. 14, p. 397-406, 1993.

ANCHIETA, M. C.; VALE FILHO, V. R.; COLOSIMO, E.; SAMPAIO, I . B. M.; ANDRADE, V. J. Descarte e congelabilidade do sêmen de touros de raça zebuínas e taurinas em central de inseminação artificial no Brasil. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia,** v. 57, n. 2, p. 196-204, 2005.

ANZAR, M.; HE, L.; BUHR, M.M. Sperm apoptosis in fresh and cryopreserved bull semen detected by flow citometry and its relation with fertility. **Biology of Reproduction**, v. 66, p. 354-360, 2002.

ARRUDA, R. P.; BALL, B. A.; GRAVENCE, C. G.; GARCIA, A. R.; LIU, I. K. M. Effects of extenders and cryoprotectants on stallion sperm head morphometry. **Theriogenology,** v. 58, p. 253-256, 2002.

ARRUDA, R. P.; CELEGHINI, E. C. C.; ANDRADE, A. F. C. Importância da qualidade do sêmen em programas de IATF e TETF. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE REPRODUÇÃO ANIMAL APLICADA, Londrina, PR. 2004. São Paulo: Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, 2004. p. 166-179.

ASBIA - Associação Brasileira de Inseminação Artificial. **Relatório estatístico de produção, importação e comercialização de sêmen, 2008.** Disponível em: <www.asbia.org.br>. Acesso em: 23 abr. 2009.

AURICH, J. E.; SCHONHERR, U.; HOPPE, H.; AURICH, C. Effects of antioxidants on motility and membrane integrity of chilled-stored stallion semen. **Theriogeniology**, v. 48, p. 185–192, 1997.

AX, R. L.; DALLY, M.; DIDION, B. A.; LENZ, R. W.; LOVE, C. C.; VERNER, D. D.; HAFEZ, B.; BELLIN, M. E. Avaliação de semen. In: HAFEZ, B.; HAFEZ, E. S. E**. Reprodução Animal**. 7. ed. São Paulo: manole, 2004. p. 369-379.

AXNÉR, E.; LINDE-FORSBERG, C. Semen collection and assessment, artificial insemination in the cat. In: CONCANNON, P. W.; ENGLAND, G.; VERSTEGEN, J.; LINDE-FORSBERG, C. (Ed.). **Recent advances in small animal reproduction international**

veterinary information service. Ithaca: New York, 2003. Disponível em: <http://www.ivis.org/advances/concannon/axner/ivis.pdf>. Acesso em: 20 abr. 2009.

BAILEY, J. L.; BURTH, M. M. Cryopreservation alters Ca^{++} flux of bovine spermatozoa. **Canadian Journal of Animal Science,** v. 74, p. 45-51, 1994.

BAILEY, J. L.; BILODEAU, J. F.; CORMIER, N. Semen cryopreservation in domestic animals: a damaging and capacitating phenomenon. **Journal of Andrology**, v. 24, n. 1, p. 1-7, 2000.

BALL, B. A.; BAUMBER, J.; GRAVANCE, C. G.; VO, A. T. Effect of oxidative stress on equine spermatozoa. **Journal of Equine Veterinary Science,** v. 19, p. 582, 1999, Abstract.

BALL, B. A.; VO, A. Osmotic tolerance of equine spermatozoa and the effects of soluble cryoprotectants on equine sperm motility, viability and mitochondrial membrane potential. **Journal of Andrology**, v. 22, p. 1061-1069, 2001.

BARROS, P. M. H. **Estresse oxidativo e integridade de DNA em sêmen resfriado de gato-do-mato-pequeno (Leopardus tigrinus, schreber, 1775)**. 2007, 120 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

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

BARTH, A. D.; BOWMAN, P. A. The sequential appearance of sperm abnormalities after scrotal insulation or dexamethasone treatment in bulls. **Canadian Veterinary Journal**, v. 34, p. 93-102, 1994.

BAUMBER, J.; BALL, B. A.; GRAVANCE, C. G.; MEDINA, V.; DAVIES-MOREL, M. C. G. The Effect of Reactive Oxygen Species on Equine Sperm Motility, Viability, Acrosomal Integrity, Mitochondrial Membrane Potential, and Membrane Lipid Peroxidation. **Journal of Andrology**, v. 21, n. 6, p. 895-902, 2000.

BECONI, M.; AFFRANCHINO, M.; SCHANG, L.; BEORLEGUI, N. Influence of antioxidants on SOD activity in bovine sperm. **Biochemistry International**, v. 23, p. 545-553, 1991.

BELFORD, J. M. Significance of the need for sperm capacitation before fertilization in eutherian animals. **Biology of Reproduction**, v. 28, p. 108-120, 1983.

BERTOLLA, R. P.; CEDENHO, A. P.; FILHO, P. A. H.; LIMA,S. B.; ORTIZ, V.; SROUGI, M. Sperm nuclear DNA fragmentation in adolescents with varicocele.**Fertility and Sterility**, v. 85, n. 3, p. 625-628, 2006.

BIESALSKY, H. K. Free radicals theory of aging. **Current Opinion in Clinical Nutrition Metabolic Care,** v. 5, p. 5-10, 2002

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

BLOCK, E. R. Hydrogen peroxide alters the physical state and function of the plasma membrane of pulmonary artery endothelial cells. **Journal of Cellular Physiology**, v. 20, p. 362-369, 1991.

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

BOLLWEIN, H.; FUCHS, I.; KOESS, C. Interrelationship between plasma membrane integrity, mitochondrial membrane potential and DNA fragmentation in cryopreserved bovine spermatozoa. **Reproduction in Domestic Animal**, v. 43, p. 189-195, 2008.

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

BRITO, L. F. C.; BARTH, A. D.; BILODEAU-GOESEELS, S.; PANICH, P. L.; KASTELIC, J. P. Comparison of methods to evaluate the plasmalemma of bovine sperm and their relationship with in vitro fertilization rate. **Theriogenology**, v. 60, p. 1539-1551, 2003.

BRITO, L. F. C.; SILVA, A. E. D. F.; BARBOSA, R. T.; KASTELIC, J. P. Testicular thermoregulation in *Bos indicus*, crossbred and *Bos Taurus* bulls: relationship with scrotal, testicular vascular cone and testicular morphology, and effects on semen quality and sperm production. **Theriogenology**, v. 61, p. 511-528, 2004.

BUHR, M. M.; CURTIS, E. F.; KAKUDA, N. S. Composition behavior of head membrane lipids of fresh and cryopreserved boar sperm. **Cryobiology,** v. 31, p. 224-238, 1994.

CALAMERA, J. C.; FERNANDEZ, P. J.; BUFFONE, M. G.; ACOSTA, A. A.; DONCEL, G. F. Effect of long-term in vitro incubation of human spermatozoa: functional parameters and catalase effect. **Andrologia**, v. 33, n. 2, p. 79-86, 2001.

CASADY, R. B.; MYERS, R. M.; LEGATES, J. E. The effects of exposure to high ambient temperature on spermatogenesis in the dairy bull. **Journal of Dairy Sciene**, v. 36, p. 14-23, 1953.

CELEGHINI, E. C.; ARRUDA, R. P.; DE ANDRADE, A. F.; NASCIMENTO, J.; RAPHAEL, C. F. Practical Techniques for Bovine Sperm Simultaneous Fluorimetric Assessment of Plasma, Acrosomal and Mitochondrial Membranes. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 42, n. 5, p. 479-488, 2007.

CEPEA – Centro de Estudos Avançados em Economia Aplicada. **PIB do agronegócio 1994-2007.** Disponível em: <www.cepea.esalq.usp.br/pib>. Acesso em: 24 abr. 2009.

CHAN, A. C.; CHOW, C. K.; CHIU, D. Interaction of Antioxidants and Their Implication in Genetic Anemia. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine,** v. 222, n. 3, p. 274-282, 1999.

CHANDOLIA, R. K.; REINERTSEN, E. M.; HANSEN, P. J. Short communication: lack of breed differences in response of bovine spermatozoa to heat shock. **Journal of Dairy Science**, v. 82, p. 2617-2619, 1999.

CHATTERGEE, S.; GAGNON, C. Production of reactive oxygen species by spermatozoa undergoing cooling, freezing and thawing. **Molecular Reproduction and Development**, v. 59, p. 451-458, 2001.

CHEMINEAU, P. Medio ambiente y reproduction animal. **Revista Mundial de Zootecnia**, v. 77, p. 2–14, 1994.

CHOW, C. K. Vitamin E and oxidative stress. **Free Radicals Biology and Medicine**, v. 11, p. 215-232, 1991.

COSSON, J. A moving image of flagella: news and views on the mechanisms involved in axonemal beating. **Cell Biology International,** v. 20, n. 2, p. 83-94, 1996.

COTTORELLO, A. C. P. **Criopreservação de sêmen eqüino utilizando associação de etilenoglicol e glicerol.** 2002. 47f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) -

Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, 2002.

CUMMINS, J. Mitochondrial DNA in mammalian reproduction. **Reviews of Reproduction**, v. 3, p. 172-182, 1998.

DACHEUX, J. L.; GATTI, J. L.; DACHEUX, F. Contribution of epididymal secretory proteins for spermatozoa maturation. **Microscopy Research Technology**, v. 61, p. 7-17, 2003.

DAWSON, E. B.; HARRIS, W. A.; TETER, M. C.; POWELL, L. C. Effect of ascorbic acid supplementation on the sperm quality of smokers. **Fertility and Sterility**, v. 58, p. 1034-1039, 1992.

DE LAMIRANDE, E.; GAGNON, C. Reactive oxygen species and human spermatozoa. Depletion of adenosine triphosphate plays an important role in the inhibition of sperm motility. **Journal of Andrology**, v. 13, p. 379-386, 1992.

DE MARTINO, C.; FLORIDI, A.; MARCANTE, M. L.; MALORNI, W.; SCORZA BARCELLONA, P.; BELLOCCI, M.; SILVESTRINI, B. Morphological, histochemical and biochemical studies on germ cell mitochondria of normal rats. **Cellular Tissue Research,** v. 196, n. 1, p. 1-22, 1979.

DE ROBERTS, E. M. F.; HIB, J. As mitocôndrias. In: __ **Bases da biologia celular e molecular.** 3. Ed. Guanabara Koogan: Rio de Janeiro, 2001. p. 155-175.

DEFOIN, L.; GRANADOS, A.; DONNAY, I. Analysing motility parameters on fresh Bull sêmen could help to predict resistance to freezing: A preliminary study. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 43, p. 606-611, 2008.

DJIMDE, M.; WENIGER, J. H. Semen quality of bulls in relation to breeding groups and seasons in Bangladesh. **Zeitisch. Tierzuch. Zuchtungsbiol**, v. 101, p. 59-69, 1984.

DONNELLY, E. T.; MCCLURE, N.; LEWIS, S. E. M. Antioxidant supplementation in vitro does not improve human sperm motility. **Fertility and Sterility**, v. 72, n. 3, p. 484-495, 1999.

DONNELLY, E. T.; MCCLURE, N.; LEWIS, S. E. M. Glutathione and hypotaurine in vitro: effects on human sperm motility, DNA integrity and production of reactive oxygen species. **Mutagenesis**, v. 15, n. 1 , p. 61-68, 2000.

DONNELLY, E. T.; MCCLURE, N.; LEWIS, S. E. M. cryopreservation of human semen and prepared sperm: effects on motility parameters and DNA integrity. **Fertility and Sterility,** v. 76, n. 5, 2001.

DUTY S. M.; SINGH, N. P.; RYAN, L.; CHEN, Z.; LEWIS, C.; HUANG, T.; HAUSER, R. Reliability of the comet assay in cryopreserved human sperm. **Human Reproduction**, v. 17, n. 5, p. 1274-80, 2002.

EDDY, E. M.; O'BRIEN, D. A. The spermatozoon. In: KNOBIL, E.; NEIL, J.D. **The physiology of reproduction**. New York: Raven Press. 1994. Cap. 2, p. 29-77.

ENGEL, S.; SCHREINER, T.; PETZOLDT, R. Lipid peroxidation in human spermatozoa and maintenance of progressive sperm motility. **Andrologia**, v. 31, n. 1, p. 17-22, 1999.

EVERSON, D. P. Flow citometry evaluation of male germ cells. In: YEN, A. Flow Citometry: advanced research and clinical applications. Boca Raton, Florida: CRC Press, 1980, p. 217-246.

EVENSON, D. P.; JOST, L. K. Sperm chromatin structure assay: DNA denaturability. In: DARZYNKIEWICZ, Z.; ROBINSON, J. P.; CRISSMAN, H. A. (Ed.). Methods in cell biology, 1994, **Flow Cytometry**. Orlando, Florida: Academic Press, 1994, v. 42, p. 159–176.

EVENSON, D. P.; WIXON, R. Clinical aspects of sperm DNA fragmentation detection and male infertility. **Theriogenology**, v. 65, n. 5, p. 979-991, 2006.

FARREL, P. B.; PRESICCE, G. A.; BROCKETT, C. C.; FOOTE, R. H. Quantification of bull sperm characteristics measured by Computer-Assisted Sperm Analysis (CASA) and the relationship to fertility. **Theriogenology,** v. 49, p. 871-979, 1998.

FERNANDES, C. E. S. **Perfil eletroforético, características estruturais e fertilidade *in vitro* do sêmen de touros Nelore submetidos à degeneração testicular por insulação**. 2005, 106 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2005.

FIELDS, M. J.; BURNS, W. C.; WARNICK, A. C. Age, season, and breed effects on testicular volume and semen traits in young beef bulls. **Journal of Animal Science**, v. 48, n. 6, p. 1299-1304, 1979.

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

FOLTZ, K. R. Sperm-binding proteins. **International Review of Cell & Molecular Biology**, v. 163, p. 249-303, 1995.

FONSECA, C. O.; FILHO, V. R. V.; FILHO, A. M.; ABREU, J. J. **Manual para exame Andrológico e avaliação do sêmen animal.** Belo horizonte: Colégio Brasileiro de Reprodução Animal; Ministério da Agricultura e do Abastecimento, 1997 CBRA N° 021/1997.

FONSECA, V. O.; CHOW, L. A. Seminal characteristics of zebu bulls with transitory testicular degeneration. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 47, p. 707-716, 1995.

FOOTE, R. H. Fertility estimation: a review of past experience and future prospects. **Animal Reproduction Science**, v. 75, p. 119–139, 2003.

FOUCHÉCOURT, S.; CHAMPIGNY, G.; REINAUD, P.; DUMENT, P.; DACHEUX, J. L. Mammalian lipocalin-type prostaglandin d2 synthase in the fluids of the male genital tract: putative biochemical and physiological functions. **Biology of Reproduction**, v. 66, p. 458-467, 2002.

FRASER, L. Structural damage to nuclear DNA in mammalian spermatozoa: its evaluation techniques and relationship with male infertility. **Polish Journal of Veterinary Science,** v. 7, n. 4, p. 311-321, 2004.

FREY, T. G.; MANNELLA, C. A. The internal structure of mitochondria. **Trends in Biochemical Science,** v. 25, n. 7, p. 319-324, 2000.

GABALDI, S. H. **Alterações espermáticas e dos níveis plasmáticos de testosterona e cortisol em touros da raça Nelore, submetidos à insulação escrotal**. 1999. 85 p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2000.

GADELLA, B. M.; RATHI, R.; BROUWERS, J. F. H. M.; STOUT, T. A. E.; COLENBRANDER, B. Capacitation and the acrosome reaction in equine sperm. **Animal Reproduction Science,** v. 68, p. 249-265, 2001.

GARCIA, A. R. **Efeitos do estresse térmico testicular e do uso da somatotropina recombinante bovina nas características seminais, integridade de membranas, função mitocondrial e estrutura da cromatina de espermatozóides de touros Simental (*Bos taurus taurus*)**. 2004, 258 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária). Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2004.

GARNER, D. L.; HAFEZ, E. S. E. Espermatozóides e plasma seminal. In: HAFEZ, E. S. E. (Ed.) **Reprodução animal.** 6. ed. São Paulo: Editora Manole Ltda, 1995. p. 167-190.

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

GARNER, D. L.; HAFEZ, E. S. E. Espermatozóides e Plasma Seminal. In: HAFEZ, B.; HAFEZ, E. S. E. **Reprodução Animal**. 7. ed. São Paulo: Manole, 2004. p. 97-110.

GAVRIELI, Y.; SHERMAN, Y.; BEN-SASSON, S. A. Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. **Journal of Cell Biology**, v. 119, n. 3, p. 493-501, 1992.

GIBBONS, I. R. Chemical dissection of cilia. **Archive of Biology**, v. 76, n. 2, p. 317–352, 1965.

GLEDHILL, B. L.; GLEDHILL, M. P.; RIGLER, J. R. R.; RINGERSTZ, N. R. Chages in deoxyribonucleoprotein during spermiogenesis in the bull. **Experimental Cell Research**, v. 41, p. 652-665, 1966.

GLEDHILL, B. L.; DARZYNKIEWICZ, Z.; RINGERTZ, N. R. Changes in deoxyribonucleoprotein during spermatogenesis in the bull: increased actinomycin D binding to nuclear chromatin of morphology abnormal spermatozoa. **Journal of Reproduction and Fertility,** v. 26, p. 25, 1971.

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

GRAHAM, J. K. Effect of seminal plasma on the motility of the epididymal and ejaculated spermatozoa of the ram and bull during the cryopreservation process. **Theriogenology,** v. 41, p. 1151-1162, 1994.

GRASL-KRAUPP, B.; RUTTKAY-NEDECKY, B.; KOUDELKA, H.; BUKOWSKA, K.; BURSCH, W.; SCHULTE-HERMANN, R. In situ detection of fragmented DNA (TUNEL assay) fails to discriminate among apoptosis, necrosis, and autolytic cell death: a cautionary note. **Hepatology**, v. 21, n. 5, p. 1465-1468, 1995.

GRIVEAU, J. F.; DUMONT, E.; RENARD, P.; CALLEGARI, J. P.; LE LANNOU, D. Reactive oxygen species, lipid peroxidation and enzymatic defense systems in human spermatozoa. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 103, n. 1, p. 17-26, 1995.

GULAYA, N. M.; MARGITCH, V. M.; GOVSEEVA, N. M.; KLIMASHEVSKY, V. M.; GORPYNCHENKO, I. I.; BOYKO, M. I. Phospholipid composition of human sperm and seminal plasma in relation to sperm fertility. **Archive of Andrology**, v. 46, p. 169-175, 2001.

GUYTON, A. C.; HALL, J. E. Funções reprodutoras masculinas. In:__ **Tratado de fisiologia médica.** Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1997. p. 911-923.

GWAZDAUSKAS, F. C. Effects of Climate on Reproduction in Cattle. **Journal of Dairy Science**, v. 68, p. 1568-1578, 1985.

HAFEZ, B.; HAFEZ, E. S. E. Anatomia da Reprodução Masculina. In: HAFEZ, B.; HAFEZ, E. S. E**. Reprodução Animal**. 7. ed. São Paulo: manole, 2004. p. 03-12.

HAINES, G. A.; HENDRY, J. H.; DANIEL, P.; MORRIS, I. D. Increased levels of comet-detected spermatozoa DNA damage following in vivo isotopic- or X-irradiation of spermatogonia. **Mutation Research**, v. 495, p. 21–32, 2001.

HALL, F. P. Testicular steroid synthesis: organization and regulation. In: KNOBIL, E.; NEILL, J. D. **The physiology of reproduction**. New York: Raven, 1994. p.1335-1433.

HALLIWELL, B. Reactive oxygen species in living systems: source, biochemistry and role in human disease. **American Journal of Medicine**, v. 91, p. 14-22, 1991.

HAMAMAH, S.; ROYERE, D.; NICOLLE, J. C.; PAQUIGNON, M.; LANSAC, J. Effects of freezing-thawing on the spermatozoa nucleous: a chromatin cytometric study in the porcine and human species. **Reproduction Nutrition and Developments,** v. 30, p. 59-64, 1990.

HAMMADEH, M. E.; DEHN, M.; HIPPACH, M.; ZEGINIADOU, T.; STIEBER, M.; GEORG, T.; RESENBAUM, P.; SCHIMIDT, W. Comparison between computerized slow-stage and static liquid nitrogen vapour freezing methods with respect to the deleterious effect on chromatin and morphology of spermatozoa from fertile and subfertile men. **International Journal of Andrology**, v. 24, p. 66-72, 2001.

HAMMERSTED, R. H.; GRAHAM, J. K.; NOLAN, J. P. Cryopreservation of mammalian sperm: What we ask them to survive. **Journal of Andrology**, v. 11, n. 1, p. 73-78, 1990.

HANCOCK, J. L. A staining technique for the study of temperature shock in semen. **Nature**, v. 167, p. 323-324, 1951.

HANSEN, P. J. Physiological and cellular adaptations of zebu cattle to thermal stress. **Animal Reproduction Science,** v. 82–83, p. 349–360, 2004.

HARAYAMA, H.; KUSUNOKI, H.; KATO, S. Capacity of goat epididymal spermatozoa to undergo the acrosome reaction and subsequent fusion with the egg plasma membrane. **Reproduction Fertility and Development**, v. 5, n. 3, p. 239-246, 1993.

HENRY, M. A.; NOILES, E. E.; GAO, D.; MAZUR, P.; CRISTER, J. K. Cryopreservation of human spermatozoa. The effects of cooling rate and warming rate on the maintenance of motility plasma membrane integrity, and mitochondrial function. **Fertility and Sterility**, v. 60, p. 911-918, 1993.

HERMO, L.; OKO, R.; MORALES, C. R. Secretion and endocytosis in the male reproductiove tract: a role in sperm maturation. **International Review of Cell & Molecular Biology**, v. 154, p. 105-189,1994.

HOLT, W. V.; NORTH, R. D. Partially irreversible cold-induced lipid phase transitions in mammalian sperm plasma membrane domains: freeze-fracture study. **Journal of Experimental Zoology,** v. 230, p. 473–483, 1984.

HOLT, W.V. Alternative strategies for the long-term preservation of spermatozoa. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 9, p. 309-319, 1997.

HOLT, W. V. Basic aspects of frozen storage of semen. **Animal Reproduction Science**, v. 62, p. 3-22, 2000.

HOWARD, J. G. Semen collection and analysis in carnivores. In: FOWLER, M. E. **Zoo & wild animal medicine current therapy**. 3. ed. Philadelphia: WB Saunders, 1993. p. 390-399.

HRUDKA, F. Cytochemical and ultracytochemical demonstration of cytochrome-c oxidase in spermatozoa and dynamics of changes accompanying ageing or induced by stress. **International Journal of Andrology**, v. 10, n. 6, p. 809-828, 1987.

HSU, P. C.; LIU, M. Y.; HSU, C. C.; CHEN, L. Y.; GUO, Y. L. Effects of vitamin E and/or C on reactive oxygen species-related lead toxicity in rat sperm. **Toxicology**, v. 128, n. 3, p. 169-179, 1998.

HUGHES, C. M.; LEWIS, S. E.; McKELVEY-MARTIN, V. J.; THOMPSON, W. The effects of antioxidants supplementation during Percoll preparation on human sperm DNA integrity. **Human Reproduction**, v. 13, p. 1240-1247, 1998.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Efetivo do rebanho brasileiro e regional 2006 - 2007**. Disponível em: <www.ibge.gov.br>. Acesso em: 23 abr. 2009.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Indicadores IBGE – Estatística da produção pecuária, março 2009.** Disponível em: <www.ibge.gov.br>. Acesso em: 23 abr. 2009.

IRVINE, D. S.; TWIGG, J. P.; GORDON, E. L.; FULTON, N.; MILNE, P. A.; AITKEN, J. DNA integrity in human spermatozoa: ralationships with semen quality. **Journal of Andrology**, v. 21, p. 33-44, 2000.

IWASAKI, A.; GAGNON, C. Formation of reactive oxygen species in spermatozoa of infertile patients. **Fertility and Sterility,** v. 57, p. 2409-2416, 1992.

JANERO, D. J. Malondialdehyde and thiobarbituric acid-reactivity indices of lipid peroxidation and peroxidative injury. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 9, p. 515-540, 1990.

JANUSKAUSKAS, A.; HAARD, M. G.; HAARD, M. C.; SODERQUIST, L.; LUNDEHEIM, N.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Estimation of sperm viability in frozen-thawed semen from Swedish A.I.bulls. **Zentralbl Veterinarmed A**, v. 43, p. 281–287, 1996.

JANUSKAUSKAS, A.; JOHANNISSON, A.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Subtle membrane changes in cryopreserved Bull semen in relation with sperm viability, chromatin structure, and field fertility. **Theriogenology,** v. 60, p. 743-758, 2003.

JANUSKAUSKAS, A.; GIL, J.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H.; SODERQUIST, L.; LUNDEHEIM, N. Effects of a brief elevation of scrotal temperature on the post-thaw viability of bull semen. **Reproduction in Domestics Animals,** v. 30, n. 5, p. 271-277, 2007.

JEULIN, C.; SOUR, J. C.; WEBER, P.; LAVAL-MARTIN, D.; CALVAYRAC, R. Catalase activity in human spermatozoa and seminal plasma. **Gamete Research**, v. 24, p. 185-196. 1989.

JEYENDRAN, R. S.; VAN DER VEM, H. H.; PEREZ-PELAEZ, M.; GRAVO, B. G.; ZANEVELD, L. J. D. Development of an assay to assess the funcional integrity of the human sperm membrane and its relationship to other semen characteristics. **Journal of Reproduction and Fertitlity**, v. 70, n. 1, p. 219-228, 1984.

JOBIM, M. I. M.; OBERST, E.R; SALBERGO, C. G.; SOUZA, D. O.; CIMAROSTI, H.I.; MATTOS, R. C. Albumina e osteopontina – Proteínas do plasma seminal bovino relacionada com a congelabilidade do sêmen. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 26, n. 3, p. 136-141, 2002.

JOHNSON, L.; VARNER, D. D.; ROBERTS, M. E. Efficiency of spermatogenesis: a comparative approach. **Animal Reproduction Science**, v. 60-61, p. 471-480, 2000.

JOHNSON, W. H. The significance to bull fertility of morphological abnormal sperm. In: VAN CAMP, S. Bull infertility. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, v. 13, p. 255-270, 1997.

JONES, R.; MANN, T. Damage to spermatozoa by peroxidation endogenous phospholipids. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 50, p. 261-268, 1977.

JONES, R.; MANN, T.; SHERINS, R. Peroxidative breakdown of phospholipids in human spermatozoa, spermicidal properties of fatty acids peroxides, and protective action of seminal plasma. **Fertility and Sterility**, v. 31, p. 531-537, 1979.

KARABINUS, D.; VOGLER, C. J.; SAACKE, R. G.; EVENSON, D. P. Chromatin structural changes in sperm after scrotal insulation of holstein bulls. **Journal of Andrology**, v. 18, p. 549-555, 1997.

KASIMANICKAM, R.; PELZER, K. D.; KASIMANICKAM, V.; SWECKER, W. S.; TATCHER, C. D. Association of classical semen parameters, sperm DNA fragmentation index, lipid peroxidation and antioxidant enzymatic activity of semen in ram-lambs. **Theriogenology,** v. 65, p. 1407-1421, 2006.

KASTELIC, J. P.; COULTER, G. H.; COOK, R. B. Scrotal surface, subcutaneous, intratesticular and intraepididymal temperatures in bulls. **Theriogenology,** v. 44, p. 147-152, 1995.

KASTELIC, J. P.; COOK, R. B.; COUTER, G. H. Contribution of the scrotum, testes and testicular artery to scrotal testicular thermoregulation in bulls at two ambient temperatures. **Animal Reproduction Science**, v. 45, p. 255-261, 1997.

KATO, M.; MAKINO, S.; KIMURA, H.; OTA, T.; FURUHASHI, T.; NAGAMURA, Y. Evaluation of mitochondrial function and membrane integrity by dual fluorescent staining for assessment of sperm status in rats. **The Journal of Toxicological Sciences**, v. 27, n. 1, p. 11-18, 2001.

KESSOPOULO, E.; TOMLINSON, M. J.; BARRATT, C. L. R.; BOLTON, A. E.; COOKE, I. D. Origin of reactive oxygen species in human sêmen: spermatozoa or leucocytes? **Journal of Reproduction and Fertility,** v. 94, n.2, p. 463-470, 1992.

KHOSROWBEYGI, A.; ZARGHAMI, N. Levels of oxidative stress biomarkers in seminal plasma and their relationship with seminal parameters, BMC. **Journal of Clinical Pathology**, v. 7, p. 6, 2007.

KODAMA, H.; KURIBAYASHI, Y.; GAGNON, C. Effect of sperm lipid peroxidation on fertilization. **Journal of Andrology**, v. 16, p. 151-157, 1996.

KOIVISTO, M. B.; NOGUEIRA, G. P.; COSTA, M. T. A. Bos taurus taurus x Bos taurus indicus. Fluctuations of the sperm abnormalities (previous note). In: CONGRESSO PANAMERICANO DE CIÊNCIAS VETERINÁRIAS, 15º, 1996, Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brasil, **Anais...**, 1996, p. 385.

KOIVISTO, M. B.; NOGUEIRA, G. P.; COSTA, M. T. A. Seasonal variations of morphological abnormalities in bovine spermatozoa. In: SIPAR, SEMINAR ON ANIMAL REPRODUCTION AND BIOTECHNOLOGY FOR LATIN AMERICA, 1998, Belém, Pará. **Proceedings...** Uppsala: Swedish University of Agricultural Sciences, 1998.v. 2, p. 50-56.

KOIVISTO, M. B.; COSTA, M. T. A.; PERRI, S. H. V.; VICENTE, W. R. R. The effect of season on semen characteristics and freezability in Bos indicus and Bos taurus bulls in the southeastern region of Brazil. **Reproduction in Domestic Animals**, p. 01-06, 2008.

KOVÁS, A.; FOOTE, R. H. Viability and acrosome staining of bull, boar and rabbit spermatozoa. **Biotechnic and Histochemistry**, v. 67, p. 119- 124, 1992.

KRAMER, R. Y.; GARNER, D. L.; BRUNS, E. S. A.; PRINS G. S. Comparison of motility and flow citometer assessment of seminal quality in fresh, 24h extended and cryopreserved human spermatozoa. **Journal of Andrology**, v. 14, p. 374-384, 1993.

KROGENS, A.; ANDERSEN-BERG, K.; HAFNE, A. L.; ENGELAND, E. Membrane alterations in bull spermatozoa after freezing and thawing and after in vitro fertilization. **Acta veterinaria scandinavica**, v. 35, p. 17-26, 1994.

KUMI-DIAKA, J.; BADTRAM, G. Effect of storage on sperm membrane integrity and other functional characteristics of canine spermatozoa: in vitro biossay for canine semen. **Theriogenology**, v. 41, p. 1355-366, 1994.

KWENANG, A.; KROUS, M. J.; KOSTER, J. F.; VAN EIJK, H. G. Iron, ferritin and copper in seminal plasma. **Human Reproduction**, v. 2, p. 387-388, 1987.

LACKEY, B. R.; GRAY, S. L.; HENRICKS, D. M. Measurement of leptin and insulin-like growth factor-I in seminal plasma from different species. **Physiology**, v. 51, p. 309-311, 2002.

LARSON, K. L.; DEJONGE, C. J.; BARNES, A. M.; JOST, L. K.; EVENSON, D. P. Sperm chromatin structure assay parameters as predictors of failed pregnancy following assisted reproductive techniques. **Human Reproduction**, v. 15, n. 8, p. 1717-722, 2000.

LENZI, A.; PICARDO, M.; GANDINI, L.; DONDERO, F. Lipids of the sperm plasma membrane: from polyunsaturated fatty acids considered as markers of sperm function to possible scavenger therapy. **Human Reproduction Update**, v. 2, p. 246-56, 1996.

LENZI, A.; FANDINI, L.; LOMBARDO, F.; PICARDO, M.; MARESCA, V.; PANFILI, E.; TRAMER, F.; BOITANI, C.; DONDERO, F. Polyunsaturated fatty acids of germ cell membranes, glutathione and glutathione-dependent enzyme-PHGPx: from basic clinic. **Contraception**, v. 65, p. 301-304, 2002.

LEWIS, S. E. M.; BOYLE, P. M.; McKINNEY, K. A.; YOUNG, I. S.; THOMPSON, W. Total antioxidant capacity of seminal plasma is different in fertile and infertile men. **Fertility and Sterility**, v. 64, p. 868-879, 1995.

LEWIS, S. E. M.; STERLING, E. S. L.; YOUNG, I. S.; THOMPSON, W. Comparison of individual antioxidants of sperm and seminal plasma in fertile and infertile men. **Fertility and Sterility**, v. 67, n. 1, p. 142-147, 1997.

LEWIS, S. E. M.; AGBAJE, I. M. Using the alkaline comet assay in prognostic tests for male infertility and assisted reproductive technology outcomes. **Mutagenesis**, v. 23, n. 3, p. 163-170, 2008.

LI, K.; SHANG, X.; CHEN, Y. High-performance liquid chromatographic detection of lipid peroxidation in human seminal plasma and its aplication to male fertility. **Clinical Chimica Acta**, v. 346, p. 199-203, 2004.

LILY-PALOMINO, T.; CAMACHO, J. S.; HUANCA, W. L.; FALCÓN, N. P. Preservation of goat semen using yolk-citrate and yolk skim milk extenders. **Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú**. v. 12, n. 1, 2001. Disponível em: <http://sisbib.unmsm.edu.pe/bvrevistas/veterinaria/v12_n1/conser_semen.htm>. Acesso em: 9 mar. 2009.

LONG, J. A.; WILDT, E. D.; WOLF, B. A.; CRISTER, J. K.; DEROSSI, R. V.; HOWRD, J. G. Sperm capacitation and the acrosome reaction are compromised in teratospermic domestic cats. **Biology of Reproduction**, v. 54, p. 638-646, 1996.

LOPES, F. F.; HANSEN, P. J. Genetic divergence in cellular resistance to heat shock in cattle: differences between breeds development I temperate versus hot climates in responses of preimplantation embryos, reproductive tract tissues and lymphosytes to increased culture temperatures. **Reproduction,** v. 2003, n. 125, p. 285-294, 2005.

LUNEC, J. Oxygen radicals: their measurement in vivo. **Analytical Proceedings**, v. 26, p. 130-131, 1989.

MARQUES, A.; ARRUDA, R. P.; CELEGHINI, E. C. C.; GOBESSO, A. A. O.; NEVES NETO, J. R. Effects of ascorbic acid and pentoxifylline on equine cryopreserved sêmen submitted to in vitro incubation. **Theriogenology,** v. 58, p. 257-260, 2002.

MC KELVEY-MARTIN, V. J.; MELIA, N.; WALSH, I. K.; JOHNSON, S. R.; HUGHES, C. M.; LEWIS, S.; TOMPSON, W. Two potential clinical applications of the alkaline single cell gel electrophoresis assay: i. Human bladder washings and transitional cell carcinoma of the bladder. ii. Human sperm and male fertility. **Mutation Research,** v. 375, p. 93-104, 1997.

MENENDEZ-BUXADERA, A.; MORALES, J. R.; PEREZ, A. P. Seasonal variation in semen production of Holstein, zebu and criollo bulls under artificial insemination conditions in Cuba. In: REPRODUCTION DES RUMINANTS EN ZONE TROPICALE, REUNION INTERNATIONALE, 1983, Pointe-a-Pitre. **Les colloques de L'INRA**. Paris: INRA, 1984 n. 20, p. 239-249.

MÉTAYER, S.; DACHEUX, J. L.; GATTI, J. L. Comparison, characterization, and identification of proteases and protease inhibitors in epididimal fluids of domestic mammals: matrix metalloproteinases are major fluid gelatinases. **Biology of Reproduction**, v. 66, p. 1219-1229, 2002.

MEYERHOEFFER, D. C.; WETTEMANN, R. P.; COLEMAN, S. W.; WELLS, M. E. Reproductive criteria of beef bulls during and after exposure to increased ambient temperature. **Journal of Animal Science**, v. 60, n. 2, p. 352-357, 1985.

MIES FILHO, A.; BARRETO, J. F. Biologia do espermatozóide. Estudo do sêmen objetivando a prática da inseminação artificial. In: _____ **Noções sobre reprodução dos animais e inseminação artificial.** Rio de Janeiro: Ministério da Agricultura, 1949. p. 162-185.

MORTIMER, S. T. A critical review of the physiological importance and analysis of sperm movement in mammals. **Human Reproduction Update,** v. 3, n. 5, pp. 403–439, 1997.

NAIR, S. J.; BRAR, A. S.; AHUJA, C. S.; SANGHA, S. P. S.; CHAUDHARY, K. C. A comparative study on lipid peroxidation, activities of antioxidant enzymes and viability of cattle and buffalo bull spermatozoa during storage at refrigeration temperature. **Animal Reproduction Science**, v. 96, n. 1 , p. 21–29, 2006.

NASCIMENTO, E. F.; SANTOS, R. L. Patologia do sistema genital masculino. In: _____ **Patologia da Reprodução dos Animais Doméstico.** 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003. p. 93-116.

NEGOESCU, A.; LORIMIER, P.; LABAT-MOLEUR, F.; DROUET, C.; ROBERT, C.; GUILLERMET, C.; BRAMBILLA, C.; BRAMBILLA, E. In situ apoptotic cell labeling by the TUNEL method: improvement and evaluation on cell preparations. **Journal of Histochemistry and Cytochemistry**, v. 44, n. 9, p. 959-968, 1996.

NEGOESCU, A.; GUILLERMET, C.; LORIMIER, P.; BRAMBILLA, E.; LABAT-MOLEUR, F. Importance of DNA fragmentation in apoptosis with regard to TUNEL specificity. **Biomedical Pharmacotherapy**, v. 52, n. 6, p. 252-258, 1998.

NICHI, M. **Sistemas de proteção enzimática e níveis de peroxidação espontânea dos lipídeos seminais de touros zebuínos e taurinos criados a campo na região de Dourados, MS.** 2003, 101 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003.

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

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

NISSEN, H. P.; KREYSEL, H. W. Superoxide dismutase in human semen. **Klinische Wochenschrift**, v. 61, p. 63-65, 1983.

NISSEN, H. P.; KREYSEL, H. W. Polyunsaturated fatty acids in relation to sperm motility. **Andrologia**, v. 15, n. 3, p. 264-269, 1983.

O'CONNELL, M.; MCCLURE, N.; LEWIS, S. E. M. The effects of cryopreservation on sperm morphology, motility and mitochondrial function. **Human Reproduction**, v. 17, p. 704–709, 2002.

O'FLAHERTY, C. M.; BECONI, M.; BEORLEGUI, N. Effect of natural antioxidants, superoxide dismutase and hydrogen peroxide on capacitation of frozen-thawed bull spermatozoa. **Andrologia,** v. 29, p. 269-275, 1997.

OHASHI, O. M.; SOUSA, J. S.; RIBEIRO, H. F. L.; VALE, W. G. Distúrbios reprodutivos em touros Bos indicus, B. taurus e mestiços criados em clima amazônico**. Pesquisa Veterinária Brasileira,** v. 8, p.31-35, 1998.

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

OHYASHIKI, T.; TSUKA, T.; MOHRI, T. Increase of the molecular rigidity of the protein conformation in the intestinal brush-border membranes by lipid peroxidation. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 939, p. 383-392, 1988.

OLLERO, M.; POWERS, R. D.; ALVAREZ, J. G. Variation of docosahexanoic acid content in subsets of human spermatozoa at different stages of maturation: implications for sperm lipoperoxidative damage. **Molecular Reproduction Development**, v. 55, p. 326-334, 2000.

ONG, C. N.; SHAN, A. M.; CHIA, S. E. Biomarkers for male reproductive health hazards: Are they available? **Toxicology Letters**, v. 134, p. 17-30, 2002.

ÕURA, C.; TOSHIMORI, K. Ultrastructural studies on the fertilization of mammalian gametes. **International Review of Cytology,** v. 122, p. 105-151, 1990.

OZMEN, B.; KOUTLAKI, N.; YOUSSRY, M.; DIEDRICH, K.; AL-HASSANI, S. DNA damage of human spermatozoa in assisted reproduction: origins, diagnosis, impacts and safety. **Reproduction Biomedical**, v. 14, p. 384-395, 2007.

PARKS, J. E.; GRAHAM, J. K. Effects of cryopreservation procedures on sperm membranes. ***Theriogenology***, v. 38, p. 209-222, 1992.

PARKS, J. E.; LYNCH, D. V. Lipid composition and thermotrophic phase behavior of boar, bull, sttallion, and roosters sperm membranes. **Cryobiology,** v. 29, p. 255-266, 1992.

PARKS, J. E. Hypothermia and Mammalian gametes, In: KAROW, A. M.; CRITSER, J. K. (Ed.) **Reproduction tissue banking:** Scientific Principles. San Diego: Academic Press, 1997. p.229-261.

PASQUALOTTO, F. F.; SHARMA, R. K.; NELSON, D. R.; THOMAS, A. J.; AGARWAL, A. Relationship between oxidative stress, semen characteristics, and clinical diagnosis in men undergoing infertility investigation. **Fertility and Sterility**, v. 73, n. 3, p. 459-464, 2000.

PAUL, C.; MURRAY, A. A.; SPEARS, N.; SAUNDERS, P. T. K. A single, mild, transient, scrotal heat stress causes DNA damage, subfertility and impairs formation of blastocysts in mice. **Reproduction Research,** v. 136, p. 73-84, 2008.

PAULA-LOPES, F. F.; HANSEN, P. J. Heat shock-induced apoptosis in preimplantation bovine embryosis a developmentally regulated phenomenon. **Biology of Reproduction**, v. 66, p. 1169-1177, 2002.

PEÑA, F. J.; NÚÑEZ-MARTÍNEZ, I.; MORÁN, J. M. Semen Technologies in Dog Breeding: an Update. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 41, n. 2, p. 21-29, 2006.

PÉREZ-CRESPO, M.; PINTADO, B.; GUTIÉRREZ-ADÁN, A. Scrotal heat stress effects on sperm viability, sperm DNA integrity, and the offspring sex ratio in mice. **Molecular Reproduction and Development,** v. 75, p. 40-47, 2008.

PERIS, S. I.; BILODEAU, J. F.; DUFOUR, M.; BAILEY, J. Impact of cryopreservation and reactive oxygen species on DNA integrity, lipid peroxidation, and functional parameters in ram sperm. **Molecular Reproduction and Development**, v. 74, p. 878-892, 2007.

PESCH, S.; BERGMANN, M.; BOSTEDT, H. Dermination of some enzymes and macro- and microelements in stallion seminal plasma and their correlations to semen quality. **Theriogenology**, v. 66, n. 2, p. 307-313, 2006.

PINTADO, B.; DE LA FUENTE, J. ROLDAN, E. R. S. Permeability of boar and Bull spermatozoa to the nucleic acid stains propidium iodide or Hoechst 33258, or the eosin: accuracy in the assessment of cell viability. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 118, p. 145-151, 2000.

POPE, C. E.; ZHANG, Y. Z.; DRESSER, B. L. A simple staining method for evaluating acrosomal status of cat spermatozoa. **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, v. 22, n. 1, p. 87-95, 1991.

POTO, A.; PEINADO, B.; BARBA, C.; DELGADO, J. V. Congelación de sêmen porcino dae razas autóctonas em peligro de extinción. Influencia de la metodologia em bancos de germoplasma para pequeñas poblaciones. **Archivos de Zootecnia**, v. 49, p. 493-496, 2000.

QUEIROZ, V. S. **Estudo do efeito das condições de manipulação do sêmen de jaguatiricas (*Leopardus pardalis*, Linnaeus, 1758) sobre a capacitação e a integridade morfológica e funcional dos espermatozóides**. 2003. 130 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária). Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003.

REKWOT, P. I.; VOH, A. A. J. R.; OYEDIPE, E. O.; OPALUWA, G. I.; SEKONI, V. O.; DAWUDA, P. M. Influence of season on characteristics of the ejaculate from bulls in an artificial insemination centre in Nigeria. **Animal Reproduction Science,** v. 14, p. 187–194, 1987.

RIJSSELAERE, T.; VAN SOOM, A.; TANGHE, S.; CORYN, M.; MAES, D.; DE KRUIF, A. New techniques for the assessment of canine semen quality: A review. **Theriogenology**, v. 64, n. 3, p. 706-719, 2005.

RISLEY, M. S.; EINHEBER, S.; BUMCROT, D. A. Changes in DNA topology during spermatogenesis. **Chromosoma**, v. 94, p. 217-227, 1986.

RODRIGUES, M. P.; NICHI, M.; PEREZ, E. G. A.; CARDOSO, P. B. S.; VIANA, C. H. C.; BARROS, P. M. H.; BARNABE, R. C.; BARNABE, V. H. Sperm oxidative status and seminal quality in *Bos taurus taurus* and *Bos taurus indicus* bulls under tropical conditions. **Reproduction in Domestic Animals,** v. 43, n. 3, p. 161, 2008. 16 th International Congress of Animal Reproduction, 2008.

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

ROOSEN-RUNGE, E. C.; GIESEL JR., L. O. Quantitative studies on spermatogenesis in the albine rat. **American Journal Anatomic,** v. 87, p. 1-30, 1950.

ROTA, A.; FURZI, C.; PANZANI, D.; CAMILO, F. Studies on motility and fertility of cooled stallion spermatozoa. **Reproduction of Domestic Animals**, v. 39, p. 103-109, 2004.

ROYERE, D.; HAMAMAH, S.; NICOLLE, J. C.; LANSAC, J. Chromatin alterations induced by freeze-thawing influence the fertility ability of human sperm. **International Journal of Andrology,** n. 14, p. 328-332, 1991.

SAACKE, R. G.; NADIR, S.; DALTON, J.; BARNE, J.; DEJARNETTE, J.M.; DEGELOS, S.; NEBEL, R. L. Accessory sperm evaluation and bull fertility-an update. **Proceedings of the 15th Technical Conference on Artificial Insemination and Reproduction**, p. 57-67, NAAB, 1994.

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

SAKKAS, D.; TOMLINSON, M. Assessment of sperm competence. **Seminar in Reproductive Medicine**, v. 18, p. 133-139, 2000.

SALISBURY, G. W.; VANDEMARK, N. L. El sêmen y sus componentes. In: _____ **Fisiologia de la reproducción e inseminación artificial de los bóvidos.** Zaragoza (España): Editorial Acribia, 1962, p. 217-280.

SANTOS, G. C. J. **Congelabilidade do sêmen eqüino em diferentes diluidores**. 2003. 50 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2003.

SCHÖNECK, C.; BRAUM, J.; EINSPANIER, R. Sperm viability is influenced in vitro by the bovine seminal protein aSPF: Effects on motility, mitochondrial activity and lipid peroxidation. **Theriogenology,** v. 45, p. 633-642, 1996.

SEALFON, A. I.; ZORGNIOTTI, A. W. A theoretical model for testis thermoregulation. In: ZORGNIOTTI, A. W. **Temperature and environmental effects on the testis.** New York: Academic Press, 1991. p. 123-135.

SETCHELL, B. P. The scrotum and thermoregulation. In:__ **The mammalian testis**. 1. ed. Ithaca; Cornell University Press, 1978. P. 90–104.

SETCHELL, B. P. Heat and testis. **Journal os Reproduction and Fertility,** v. 144, p. 179-194, 1998.

SHARMA, P. K.; AGARWAL, A. Role of reactive oxygen species in male infertility. **Urology**, v. 48, p. 835-850, 1996.

SHEENA, E. M. L.; ISHOLA, M. A. Using the alkaline comet assay in prognostic tests for male infertility and assisted reproductive technology outcomes. A review. **Mutagenesis**, v. 23, n. 3, p. 163-170, 2008.

SHEKARRIZ, M.; SHARMA, R. K.; THOMAS JR., A. J.; AGARWAL, A. Positive myeloperoxidase staining (Endtz test) as an indicator of excessive reactive oxygen species in semen. **Journal of Assisted Reproduction & Genetics**, v. 12, p. 70-74, 1995.

SHEKARRIZ, M.; THOMAS JR., A. J.; AGARWAL, A. Incidence and level of seminal reactive oxygen species in normal men. **Urology**, v. 45, p. 130-107, 1995.

SHEN, H. M.; ONG, C. N. Detection of oxidative damage in human sperm and its association with sperm function and male infertility. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 28, p. 529-536, 2000.

SIDHU, R. S.; SHARMA, R. K.; THOMAS JR., A. J.; AGARWAL, A. Relationship between creatinine kinase activity and semen characteristics in sub-fertile men. **International Journal of Fertility and Women's Medicine**, v. 43, p. 192-197, 1998.

SIKKA, S. C. Oxidative stress and role of antioxidants in normal and abnormal sperm function. **Frontiers in Bioscience,** v. 1, p. 78-86, 1996.

SIKKA, S. C. Role of oxidative stress and antioxidants in Andrology and assisted reproductive technology. **Journal of Andrology,** v. 25, p. 5-18, 2004.

SILVA, J.L. **Causas da variação na quantidade e qualidade do sêmen de touros em colheita em Centrais de Inseminação Artificial.** 1981. 75 f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG. 1981.

SINGH, M.; JAISWAL, N. Oxygen-derived free radicals and circulatory shock. **Indian Journal of Pharmacology,** v. 24, p. 8-11, 1992.

SLATER, T. F. Overview of methods used for detecting lipid peroxidation. **Methods in Enzimology**, v. 105, p. 283-293, 1984.

SLIZINSKA, H.; SLIZINSKI, B. M. Cytological studies of sterile bulls with sperm head abnormality. **Journal of Agriculture Science**, v. 43, p. 253-255, 1953.

SLOWINSKA, M.; KAROL, H.; CIERESZKO, A. Comet assay of fresh and cryopreserved bull spermatozoa. Brief Communication. **Cryobiology**, v. 56, p. 100-102, 2008.

SMITH, M. F.; MORRIS, D. L.; AMOSS, M. S.; PARISH, N. R.; WILLIAMS, J. D.; WILTBANK, J. N. Relationship among fertility, scrotal circumference, seminal quality and libido in Santa Gertrudis bulls. **Theriogenology**, v. 16, p. 379, 1981.

SPINDLER, R. E.; HUANG, Y.; HOWARD, J. G.; WANG, P.; ZHANG, H.; ZHANG, G.; WILDT, D. E. Acrosomal integrity and capacitation are not influenced by sperm cryopreservation in the giant panda. **Reproduction**, v. 127, p. 546-556, 2004.

SQUIRES, E. L.; PICKETT, B. W.; GRAHAM, J. K.; VANDERWALL, D. K.; McCUE, P. M.; BRUEMMER, J. E. Principles of cryopreservation. In: COOLED AND FROZEN STALLION SEMEN, 1999, Fort Collins, Colorado: College of Veterinary Medicine and Biomedical Sciences of Colorado State University, 1999, p. 43-47.

STEFFEN, D. Genetic causes of bull infertility. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice,** v. 13, p. 243-253, 1997.

SULEIMAN, S. A.; ELAMIN ALI, M.; ZAKI, Z. M. S.; EL-MALIK, A. M. A.; NASR, M. A. Lipid peroxidation and human sperm motility: protective role of vitamin E. **Journal of Andrology**, v. 17, n. 5, p. 530-537, 1996.

TALBOT, P.; CHACON, R. S. A triple-stain technique for evaluating normal acrosome reactions of human sperm. **Journal of Experimental Zoology**, v. 215, n. 2, p. 201-208, 1981.

TARRAGÓ, O. F. B. **Efeitos da disponibilidade de sombra na pastagem sobre as características reprodutivas de touros da raça Nelore**. 2009, 91 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária). Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

TAVILANI, H.; DOOSTI, M.; SAEIDI, H. Malondialdehyde levels in sperm and seminal plasma of asthenozoospermic and its relationship with semen parameters. **Clinical Chimestry Acta,** v. 356, p. 199–203, 2005.

TAVILANI, H.; DOOSTI, M.; ABDI, K.; VAISIRAYGANI, A.; JOSHAGHANI, H. R. Decreased polyunsaturated and increased saturated fatty acid concentration in spermatozoa from asthenozoospermic males as compared with normozoospermic males. **Andrologia**, v. 38, p. 173-178, 2006.

TAVILANI, H.; DOOSTI, M.; NOURMOHAMMADI, I.; MAHJUB, H.; VAISIRAYGANI, A.; SALIMI, S.; HOSSEINIPANAH, S. M. Lipid composition of spermatozoa in normozoospermic and asthenozoospermic males. **Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids,** v. 77, p. 5–50, 2007.

THOMAS C. A.; GARNER L. D.; DEJARNETTE J. M.; MARSHALL C. E. Effect of cryopreservation on bovine sperm organelle function and viability as determined by flow cytometry. **Biology of Reproduction**, v. 58, p. 786-793, 1998.

TÖPFER-PETENSEN, E.; PETROUNKINA, A. M.; EKHLASI-HUNDRIESER, M. Oocyte-sperm interations. **Animal Reproduction Science**, v. 60, n. 1, p. 653-662, 2000.

TURNER, J. W. Genetic and biological aspects of Zebu adaptability. **Journal of animal science,** v. 50, n. 6, p. 1201-1205, 1980.

TURNER, R. M. Tales from the tail: What do we really know about sperm motility?. **Journal of Andrology,** v. 24, n. 6, p. 790-803, 2003.

TURNER, R. M. Moving to the beat: a review of mammaliam sperm motility regulation. **Reproduction, Fertility and development,** v. 18, p. 25-38, 2006.

TWIGG, J. P.; FULTON, N.; GOMEZ, E.; IRVINE, D. S.; AITKEN, R. J. Analysis of the impact of intracellular reactive oxygen species generation on the structural and functional integrity of human spermatozoa: lipid peroxidation, DNA fragmentation and effectiveness of antioxidants. **Human Reproduction**, v. 13, p. 1429-1436, 1998.

TWIGG, J. P.; IRVINE, D. S.; AITKEN, J. Oxidative damage to DNA in human spermatozoa does not preclude pronucleus formation at intracytoplasmic sperm injection. **Human Reproduction**, v. 13, p. 1864-1871, 1998.

VALCÁRCEL, A.; DE LAS HERAS, M. A.; PEREZ, L. MOSES, D.F.; BALDASSARRE, H. Fluorescent sataining as a method of assessing membrane damage and post-thaw survival of RAM spermatozoa. **Theriogelology**, v.41, p. 438-89, 1994.

VAN CAMP, S. D. Common causes of infertility in the bull. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, v. 13, p. 203-230, 1997.

VANDEMARK, N. L.; FREE, M. J. Temperature effects. In: JOHNSON, A. D.; GOMES, W. R., VENDEMARK, N. L. **The testis**. New York: Academic Press, 1970. v. 3, p. 233-331.

VERNET, P.; AITKEN, R. J.; DREVET, J. R. Antioxidant strategies in the epididymis. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 216, p. 31-39, 2004.

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

VETTER, C. M.; MILLER, J. E.; CROWFORD, L. M.; ARMSTRONG, M. J.; CLAIR, J. H.; CONNER, M. W.; WISE, L. D.; SKOPEK, T. R. Comparison of motility and membrane integrity to assess rat sperm viability. **Reproductive Toxicology**, v. 12, p. 105-114, 1998.

VOGLER, C. J.; BAME, J.; DEJARNETTE, J. M.; MCGILLIARD, M. L.; SAACKE, R. G. Effects of elevated testicular temperature on morphology characteristics of ejaculated spermatozoa in the bovine. **Theriogenology**, v. 40, p. 1207-1219, 1993.

WAITES, G. M. H.; VOGLMAYR, J. K. The functional activity and control of the apocrine sweat glands of scrotum on the ram. **Australian Journal of Agriculture Research,** v. 13, p. 839-851, 1963.

WAITES, G. M. H. Temperature regulation and testis. In: JOHNSON, A. D., GOMES, W. R.; VENDEMARK, N. L. **The testis**. New York: Academic Press, 1970. V.1, p. 241 – 279.

WALLACE M, S. Canine reproduction: infertility in the male dog. **Problems in Veterinary Medicine,** v. 4, p. 531-544, 1992.

WARD, W. S.; KIMURA, Y.; YANAGIMACHI, R. An intact sperm nuclear matrix may be necessary for the mouse paternal genome to participate in embryonic development. **Biology of Reproduction**, v. 60, p. 702–706, 1999.

WATSON, P. F. The roles of lipid and protein in the protection of ram spermatozoa at 5 degrees C by egg-yolk lipoprotein. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 62, p. 483-492, 1981.

WATSON, P. F.; MORRIS, G. J. Cold shock injury in animal cell. **Symposium of Society Experimental Biology,** v. 41, p. 311-340, 1987.

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

WATSON, P. F.; The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. **Animal Reproduction Science**, v. 60-61, p. 481-492, 2000.

WHO. World Health Organization. **WHO laboratory manual for the examination of human semen and semen - cervical mucus interaction**. Cambridge: The Press Syndicate of the University of Cambridge, 1992. p. 120.

WHO. World Health Organization. **WHO laboratory manual for the examination of human semen and semen - cervical mucus interaction**. Cambridge: The Press Syndicate of the University of Cambridge, 1999. p. 138.

WOELDERS, H. Overview of *in vitro* methods for evaluation of semen quality. **Reproduction in Domestic Animals,** v. 1, p. 145-164, 1991. Supplement

WOLFENSON, D.; ROTH, Z.; MEIDAN, R. Impaired reproduction in heat-stressed cattle: basic and applied aspects. **Animal Reproduction Science**, v. 60/61, p. 535–547, 2000.

WOOLLEY, D. M. Striations in the peripheral fibers of rat and mouse spermatozoa. **Journal Cellular Biology,** v. 49, n. 3, p. 936-939, 1971.

YANAGIMACHI, R. Mammalian fertilization. In: KNOBIL, E.; NEILL, J. D. **The physiology of Reproduction.** 2. ed. New york: Raven Press, 1994. p. 189-317.

YOSHIDA, M. Conservation of sperms: current status and new trends. **Animal Reproduction Science,** v. 60-61, p. 349-355, 2000.

ZABLUDOVSKY, N.; ELTES, F.; GEVA, E.; BRKOVITZ, E.; AMIT, A.; BARAK, Y.; HAR-EVEN, D.; BARTOOV, B. Relationshit between human sperm lipid peroxidation, comprehensive quality parameter and IVF outcome. **Andrology,** v. 31, p. 91-98, 1999.

ZALATA, A. A.; CHRISTOPHE, A. B.; DEPUYDT, E.; SCHONJANS, F.; COMHAIRE, F. H. The fatty acid composition of phospholipids of spermatozoa from infertile patients. **Molecular Human Reproduction**, v. 4, p. 111–118, 1998.

ZÜGUE, R. M. **Morfologia testicular e espermática e testes funcionais de sêmen de touros das raças Nelore e Simental, mantidos a campo, em Dourados, Mato Grosso do Sul.** 2002, 110 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2002.

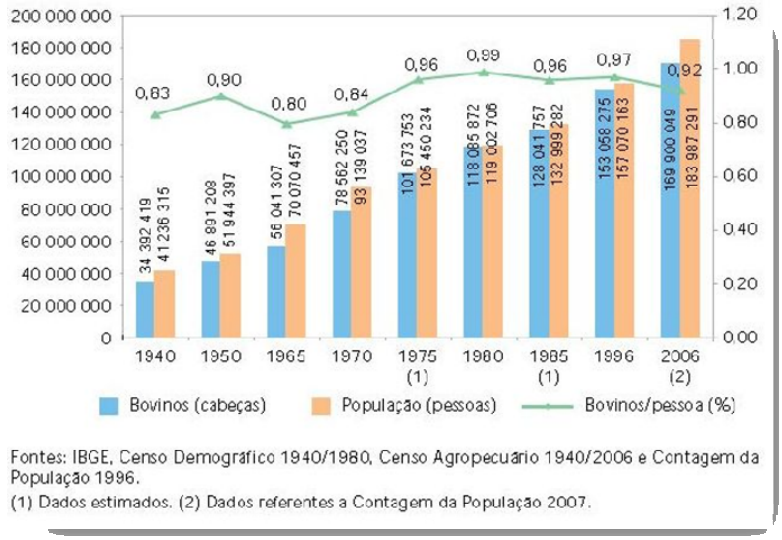
ANEXOS

ANEXOS

ANEXO A

a. Razão entre população humana e efetivo de bovinos. Brasil – 1940/2006.

4

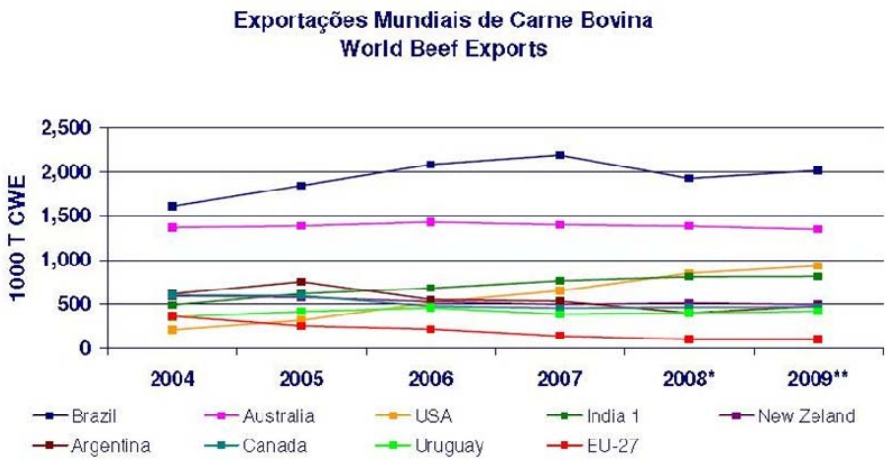


Fontes: IBGE, Censo Demográfico 1940/1980, Censo Agropecuário 1940/2006 e Contagem da População 1996.
(1) Dados estimados. (2) Dados referentes a Contagem da População 2007.

b. Mercado mundial de carne bovina 2004/2009

Fonte/Source: USDA,*Preliminar/Prelimirary, ** Projeção/Forecast

5



[1] - Inclui carne de Búfalo/Includes bufalos

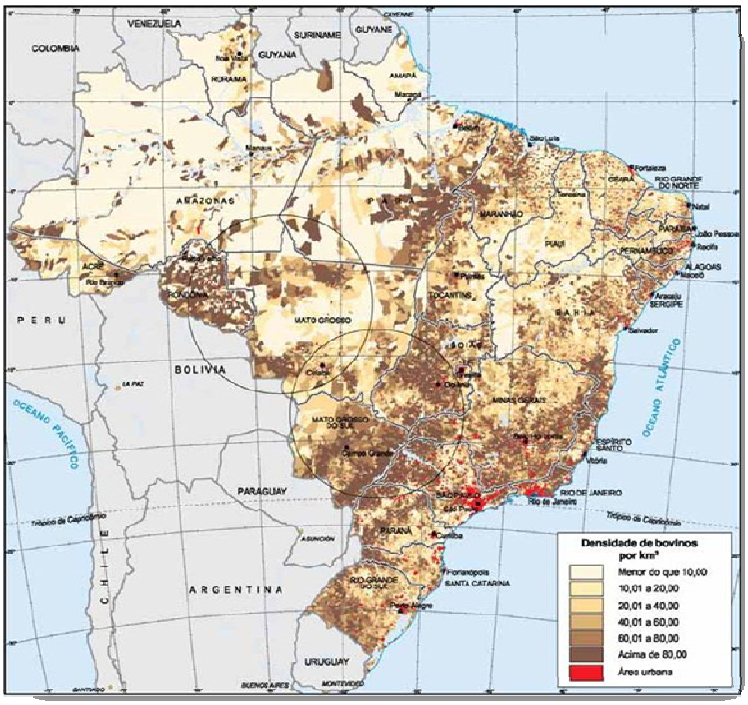
[4] Fonte: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), 2007. Disponível em: <www.ibge.gov.br>. Acesso em: 23 abr. 2009.

[5] Fonte: Associação Brasileira das Indústrias Exportadoras de Carne (ABIEC), 2009. Disponível em: <www.abiac.org.br/estatísticas>. Acesso em: 24 abr. 2009.

c. Pecuária – Bovinos em 31.12.2006

Densidade de bovinos por Km^2 de área territorial – 2006.

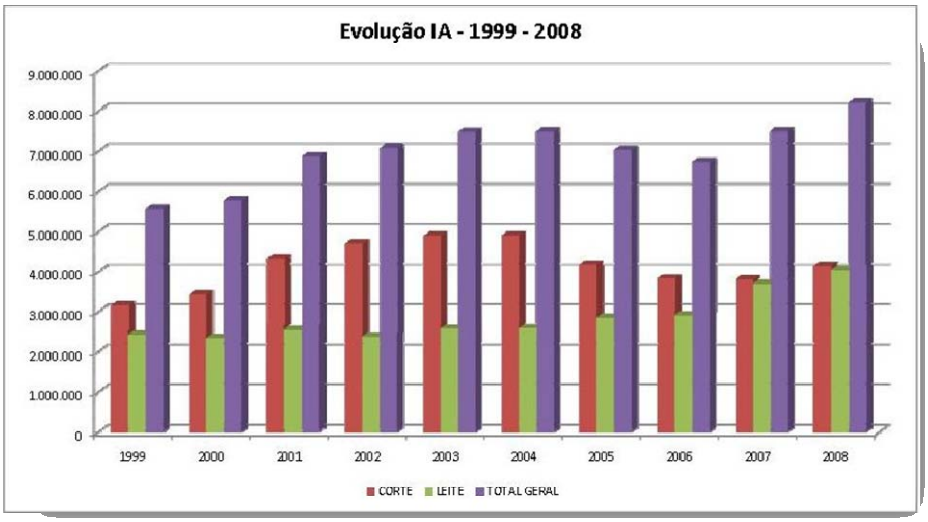
6



Fonte: IBGE, Censo Agropecuário 2006.

d. Evolução da Inseminação Artificial nos últimos 10 anos.
Corte e Leite

7



Fonte: ASBIA, 2009.

[6] Fonte: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), 2007. Disponível em: <www.ibge.gov.br>. Acesso em: 23 abr. 2009

[7] Fonte: Associação Brasileira de Inseminação Artificial (ASBIA), 2008. Disponível em: <www.asbia.org.br>. Acesso em: 23.abr.2009.

ANEXO B

- Meio de Congelação Tris.

Fração A

D-Frutose	1,0 g
Tris	2,422 g
Penicilina	100 UI
Estreptomicina	100 UI
Gema de Ovo	20 ml
Ácido Cítrico	1,36 g
H_20	qsp 100ml

Fração B

D-Frutose	1,0 g
Tris	2,422 g
Penicilina	100 UI
Estreptomicina	100 UI
Gema de Ovo	20 ml
Ácido Cítrico	1,36 g
Glicerol	14 ml
H_20	qsp 100ml

ANEXO C

- Solução de Eosina-Nigrosina para avaliação de integridade de membrana plasmática.

Eosina Y	0,1 g
H_20	10 ml
Nigrosina	1g

- Solução da coloração simples de POPE para avaliação de integridade de membrana acrossomal.

Solução Tampão

Fosfato dibásico	0,2 M
Ácido Cítrico	0,1 M
H_20	qsp

Solução Corante

Álcool Etílico	8 ml
Solução Tampão	12 ml
Rosa Bengala	200 mg
Fast Green	200 mg

ANEXO D

- Solução da coloração 3,3 diaminobenzidina (DAB) para avaliação da atividade citoquímica mitocondrial.

3'3 Diaminobenzidina	1 mg/ml
Tampão Fosfato de Sódio	0,15 M
H_20	qsp
pH	7,2

- Soluções do Ensaio Cometa (EC) para avaliação da integridade do DNA espermático.

TBE

Tris	0,089 M
Ácido Bórico	0,089 M
EDTA	0,002 M
H_20	qsp

Solução de Lise Estoque

Na_2 – EDTA	100 mM
Tris	10 mM
NaCl	2,5 M
H_20	qsp
pH	11,0

Solução de Lise I

Proteinase K 20 µg/µl	1 µl/ml
Solução de Lise Estoque	qsp

Solução de Lise II

Triton X-100	2%
DTT	40 mM

Solução de Eletroforese

NaOH	300 mM
Na_2-EDTA	1 mM
pH	>13

Solução Corante

EtBr 10mg/ml	1 µl/ml
TBE	qsp

ANEXO E

- Soluções do teste de TBARS para avaliação do índice de resistência ao estresse oxidativo.

Solução 1

Ácido Ascórbico	20 mM
Sulfato de Ferro	4 mM
H_20	qsp

Solução 2

TCA	10%
H_20	qsp

Solução 3

TBA	1%
NaOH	0,05 M
H_20	qsp