



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ

CENTRO DE CIÊNCIAS

DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA

CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

RÉVILA BIANCA FERREIRA DE MELO

**INTEGRIDADE DE DNA ESPERMÁTICO DE CARNEIROS MORADA NOVA
SUBMETIDOS À INSULAÇÃO ESCROTAL**

FORTALEZA

2015

RÉVILA BIANCA FERREIRA DE MELO

**INTEGRIDADE DE DNA ESPERMÁTICO DE CARNEIROS MORADA NOVA
SUBMETIDOS À INSULAÇÃO ESCROTAL**

**Monografia apresentada ao Curso de
Ciências Biológicas do Departamento de
Biologia da Universidade Federal do
Ceará, como requisito parcial para
obtenção de Título de Bacharel em
Ciências Biológicas.**

**Orientador: Prof. Dr. Arlindo de Alencar
Noronha Moura**

FORTALEZA

2015

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca de Ciências e Tecnologia

-
- M486i Melo, Révila Bianca Ferreira de.
Integridade de DNA espermático de carneiros Morada Nova submetidos à insulação escrotal /
Révila Bianca Ferreira de Melo. – 2015.
58 f. : il., color.
- Monografia (graduação) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Departamento de
Biologia, Curso de Ciências Biológicas, Fortaleza, 2015.
Orientação: Prof. Dr. Arlindo de Alencar Noronha Moura.
1. Carneiro – Espermatozoides. 2. Cromatina. 3. Testículos. I. Título.

RÉVILA BIANCA FERREIRA DE MELO

**INTEGRIDADE DE DNA ESPERMÁTICO DE CARNEIROS MORADA NOVA
SUBMETIDOS À INSULAÇÃO ESCROTAL**

**Monografia apresentada ao Curso de
Ciências Biológicas do Departamento
de Biologia da Universidade Federal
do Ceará, como requisito parcial para
obtenção do Título de Bacharel em
Ciências Biológicas.**

Aprovada em: 16/06/15

A BANCA EXAMIÑADORA

Prof. Dr. Arlindo de Alencar Araripe Noronha Moura (Orientador)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Dra. Paula Rodriguez-Villamil
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dra. Ana de Fátima Fontenele Urano Carvalho
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Aos meus pais, Nuitane e Mekeka

AGRADECIMENTOS

À Deus.

A minha mãe, Francisca Maria Ferreira de Melo, pelo apoio incondicional para eu estar sempre alcançando as minhas metas profissionais. Essa mulher que é uma mãe guerreira e lutadora que sempre me levantou e enxugou as minhas lágrimas nos momentos difíceis da vida e que vibrou nas minhas vitórias e conquistas.

Ao meu pai, Nuitane Borges de Melo, que em vida me ensinou a perseguir os meus sonhos e nunca desistir dos mesmos. Esse homem, que para mim, é um dos maiores exemplos de luta, vitória e muita responsabilidade.

Ao meu irmão e minhas irmãs, que deram seu apoio incondicional e me fizeram rir nos momentos em que me encontrava estressada e triste.

Ao meu namorado, Ícaro Bastos Pinho Angelo, por ter dado todo o amor, carinho, compreensão e que teve bastante paciência durante a formulação desse trabalho.

Ao meu orientador, Prof. Arlindo Moura, pela oportunidade de integrar a sua equipe do Laboratório de Fisiologia Animal e também pela sua orientação e por acreditar no meu trabalho.

A minha co-orientadora, Paula Rodriguez, que me orientou e me ajudou bastante durante a realização deste trabalho, além de ter dado bons conselhos que vou levar para o resto da minha vida.

À banca examinadora, ao qual teve a disponibilidade de tempo para avaliar esse trabalho e deu sugestões para a melhoria do trabalho.

Aos integrantes do Laboratório de Fisiologia Animal, que me apoiaram nesse trabalho e que davam conselhos construtivos tanto para esse trabalho como para a minha vida profissional. Em especial, Aderson Viana, ao qual me ajudou e me ouviu minhas dúvidas para a construção desse trabalho.

Aos meus bons amigos, que entenderam minha ausência e que de longe sei que torciam para concretização desse trabalho.

A todos, o meu muito obrigada.

“O único lugar onde o sucesso vem antes do trabalho é no dicionário.” (Albert Einstein)

RESUMO

A elevação térmica testicular induz uma protaminação defeituosa do DNA espermático e conseqüentemente uma fragmentação do DNA, dano que não é identificado pelo espermograma convencional. Dessa forma, são utilizadas em laboratório técnicas como o SCD test (Sperm Chromatin Dispersion test) para detectar a fragmentação de DNA e a insulação escrotal como um meio experimental para a elevação térmica testicular. Neste trabalho, seis carneiros Morada Nova foram submetidos à insulação escrotal, atingindo temperaturas a nível testicular de 38.2 °C. O sêmen foi coletado por eletroejaculação semanalmente durante 141 dias. Cada amostra foi analisada através dos parâmetros convencionais do espermograma e através do SCD test. O SCD test identifica os espermatozoides íntegros (que apresentaram halo) e espermatozoides com fragmentação de DNA (sem halo). No experimento, houve uma diminuição significativa na integridade do DNA entre o período de pré-insulação e o dia 7 e entre o período de pré-insulação e o dia 11. A fragmentação do DNA foi ainda maior no dia 28 dado que, neste período teve uma média 0% de aparecimento de halo. Durante o período crítico, período de menor média de aparecimento de halo, não houve diferença estatística e as médias variaram entre 0 a 18,53%. Coincidentemente ao período crítico, notou-se que nesse mesmo período não houve motilidade, entretanto, o início da recuperação da motilidade foi mais rápido dando-se a partir do dia 42, antes mesmo da recuperação dos danos feitos no DNA. A fragmentação do DNA começa a diminuir a partir do dia 77 de forma progressiva e mais lenta. Entre o período de pré-insulação e o dia 120 não se demonstra diferença estatística, dessa maneira, comprova-se que o dano causado pela insulação no DNA espermático é um fato temporário e reversível.

Palavras-chave: cromatina, SCD test, temperatura testicular, espermatozoide.

ABSTRACT

The testicular thermal elevation induces a faulty protamination of the spermatid DNA and consequently a DNA fragmentation, such damage is not identified by conventional spermogram. Thus, techniques such as SCD test (Sperm Chromatin Dispersion Test) are used in laboratories to detect the DNA fragmentation and scrotal insulation as experimental methods regarding testicular thermal elevation. In this paper, six rams Morada Nova underwent scrotal insulation, reaching testicular temperature levels of 38.2 ° C. The Semen was collected by electroejaculation weekly for 141 days. Each sample was analyzed through conventional spermogram parameters and through the SCD test. The SCD test identifies the intact sperm cells (which showed halo) and sperm cells with DNA fragmentation (no halo). In the experiment, there was a decrease in DNA integrity between the pre-insulation period and day 7 and between the pre-insulation period and day 11. The DNA fragmentation reached its highest point on day 28, once that this period had a 0% average halo appearance. During the critical period, with the lowest average halo appearance, there was no statistical difference and average values ranged from 0 to 18.53%. Coincidentally to the critical period, it was noted that during this period there was no motility, however, the early recovery of motility occurred from day 42, even before the recovery of damage done to DNA. The DNA fragmentation begins to decrease from day 77 and this fragmentation decreases progressively. From the pre-insulation period to day 120 no statistical difference were shown, therefore proving that the damage caused by insulation in the spermatid DNA is a temporary and reversible fact.

Keywords: chromatin, SCD test, testicular temperature, spermatozoon.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES E GRÁFICOS

Figura 1- Aparelho genital masculino de ovino.....	17
Figura 2- Espermatogênese.....	19
Figura 3- Processo de espermiogênese.....	20
Figura 4- Ensaio TUNNEL.....	28
Figura 5- Ensaio Comet Assay.....	29
Figura 6- SCSA test.....	30
Figura 7- SCD test.....	31
Figura 8- Carneiro Morada Nova com bolsa durante período de insulação.....	35
Figura 9- Classificação dos espermatozoides quanto ao SCD test.....	37
Figura 10- Esquema da ruptura da cadeia do DNA através da via N ₂ O ₃	46
Gráfico 1- Porcentagem de espermatozoides do ejaculado de oito carneiros Morada Nova que apresentaram halo com o SCD test.	39
Gráfico 2- Média de porcentagem de motilidade de espermatozoides dos carneiros Morada Nova durante o experimento de insulação escrotal.....	40
Gráfico 3- Média de motilidade massal dos espermatozoides dos ejaculados de oito carneiros Morada Nova durante o experimento de insulação escrotal.....	41
Gráfico 4- Média de motilidade individual dos espermatozoides dos ejaculados dos carneiros Morada Nova durante experimento de insulação escrotal.....	42
Gráfico 5- Porcentagem da média de circunferência escrotal dos oito carneiros Morada Nova durante o experimento de insulação escrotal.....	43

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Características físicas seminais do ejaculado ovino..... 25

Tabela 2- Porcentagem de espermatozoides sem halo e espermatozoides sem halo e degradado dos carneiros Morada Nova..... 38

LISTA DE ABREVIATURA E SIGLAS

ACTH- Hormônio adenocorticotrófico

CBRA- Colégio Brasileiro de Reprodução Animal

CCA- Centro de Ciências Agrárias

cm³- Centímetro cúbico

DNA- Ácido Desoxirribonucleico

DZ- Departamento de Zootecnia

EDTA- Ácido etilenodiamino tetra-acético

HCl- Ácido clorídrico

LH- Hormônio lutenizante

M- molar

mL- mililitro

mm³- milímetro cúbico

N- normal

NaCl- Cloreto de sódio

NDT- Nutrientes Digestivos Totais

nm- Nanômetro

NO- Óxido nítrico

N₂O₃- Trióxido de dinitrogênio

ONOO⁻- Peroxinitrito

O₂⁻- Íon superóxido

-OH- Íon hidroxila

PBS- Salina tamponante

ROS- Espécies Reativas ao Oxigênio

SDS- Dodecilsulfato de sódio

Sptz/ml- Espermatozoides por mililitro

UFC- Universidade Federal do Ceará

μ L- microlitro

8-nitroGua- 8-nitroguanosina

8-oxiGuo- 8-oxiguanosina

LISTA DE SÍMBOLOS

°C- centígrado

%- Porcentagem

n- nano

β- beta

μ-micro

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	15
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	17
3	MATERIAL E MÉTODO.....	35
4	RESULTADOS.....	38
5	DISCUSSÃO.....	44
6	CONCLUSÃO.....	49
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	50

1 INTRODUÇÃO

Os efeitos da temperatura testicular elevada vêm sendo estudadas de forma extensiva em gados através do modelo da insulação escrotal, ao qual provoca espermatogênese anormal e prejudica a morfologia e a função espermática (THUNDATHIL *et al.*, 2012).

Segundo Santos & Simplício (2000), a insulação escrotal provoca em caprinos a diminuição da concentração, aumento dos defeitos espermáticos, redução do vigor celular, que culmina com a necrospemia, diminuição da motilidade individual progressiva e variações atípicas do volume do ejaculado.

Em outros estudos envolvendo bovinos, a insulação escrotal promoveu a redução da motilidade espermática, diminuição da concentração espermática, aumento do número de espermatozoides com cabeça solta, elevação de defeitos com peça intermediária, gota proximal e acrossoma e um aumento do número de vacúolos no espermatozoide (BRITO *et al.*, 2003).

Em estudo com ovinos (carneiros Morada Nova), a insulação escrotal induziu a diminuição da circunferência escrotal, motilidade massal, porcentagem de espermatozoides móveis, vigor espermático, porcentagem de células morfologicamente normais e aumento de defeitos relacionados com a gota proximal distal, cauda enrolada e defeitos relacionados à cabeça (ROCHA *et al.*, 2013).

Todos esses caracteres do sêmen e do espermatozoide citados acima podem ser analisados através do espermograma regulamentado pelo Manual para exame andrológico e avaliação do sêmen animal (CBRA, 1998).

No entanto, a avaliação da integridade do DNA não é utilizada como parte da rotina do exame de sêmen em laboratório clínico. Recentemente, o exame da integridade do DNA espermático vem sendo recomendado como um novo parâmetro de avaliação da qualidade do sêmen, além de que a integridade do DNA espermático é considerada como um marcador da fertilidade masculina (GHEDAN *et al.*, 2015).

Um número maior de estudos relata que danos no DNA espermático pode ser um parâmetro útil para diagnóstico para a infertilidade masculina. A utilização da integridade do DNA como critério de qualidade espermática é importante como preditor

de sucesso de tratamento, tal como sugerido por suas associações a vários pontos do processo reprodutivo, como fertilização prejudicada, interrupção do desenvolvimento do embrião no período de pré-implantação, aborto e defeitos congênitos nos filhos. Cânceres infantis vêm sido relacionados também ao dano oxidativo do DNA espermático como uma consequência do tabagismo dos pais (LEWIS *et al*,2013).

Nesse cenário, o Teste de dispersão da cromatina espermática (SCD test) é um das técnicas para determinação de fragmentação do DNA em células espermática. Esse teste é baseado na presença de halo ao redor da cabeça do espermatozoide, que indica que a célula apresenta um DNA não fragmentado, enquanto que a presença halo muito pequeno ou sem halo, aponta que o espermatozoide apresenta um DNA fragmentado (FERNÁNDEZ *et al*,2005).

Nesse contexto, o objetivo do trabalho foi avaliar a integridade do DNA espermático dos espermatozoides do ejaculado dos carneiros Morada Nova que sofreram o processo de insulação escrotal.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 ANATOMIA DO APARELHO GENITAL MASCULINO

O aparelho genital masculino (figura 1) é constituído dos seguintes órgãos: gônadas masculinas (testículos), epidídimo, ducto deferente, glândulas acessórias, pênis e prepúcio (GRANADOS *et al.*,2006).

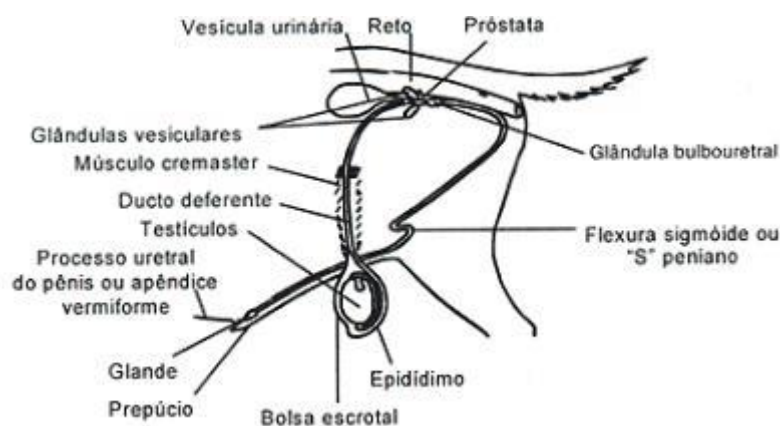


Figura 1 – Aparelho genital masculino de ovino

Fonte da figura: Capacitação dos técnicos e produtores do Nordeste e Noroeste Fluminense de Caprinos e Ovinos (Granados *et al.*,2006).

Os testículos são os principais constituintes do aparelho genital masculino (FILHO, 1987). Nos ovinos, os testículos se apresentam em número de dois, com forma ovalada os quais estão alojados em uma bolsa escrotal, em posição vertical, simétricos e de consistência firme. Suas principais funções são a produção de espermatozoides e síntese de hormônios (GRANADOS *et al.*,2006).

Os testículos em ruminantes são localizados fora do abdômen e de maneira pendular envoltos por escroto (HAFEZ & HAFEZ, 2004). A estrutura pendular dos testículos juntamente com a vascularização testicular que, através do plexo pampiniforme, diminui a temperatura escrotal pela troca de calor entre o sangue circulante na artéria e na veia testicular (COOK, COULTER E KASTELIC,1994).

Outra região do aparelho genital masculino é o epidídimo, ao qual serve como transporte e reservatório de espermatozoides (GRANADOS *et al.*, 2006) e é dividido em três componentes anatômicos: cabeça, corpo e cauda (HAFEZ & HAFEZ,2004).

O ducto deferente é uma região do aparelho genital masculino responsável pelo transporte dos espermatozoides no momento da ejaculação (GRANADOS *et al.*,2006).

As glândulas acessórias são constituídas pelas glândulas seminais, bulbo-uretrais, uretrais e próstata (FILHO,1987). Essas glândulas fornecem o veículo líquido para o transporte dos espermatozoides (HAFEZ & HAFEZ, 2004). No entanto, a função das glândulas acessórias é pouco conhecida, embora já se conheça muito sobre os agentes químicos específicos com que essas glândulas contribuem para o ejaculado (SPRING- MILLS & HAFEZ, 1979; SPRING- MILLS & HAFEZ, 1980).

O pênis é um órgão longo, que se localiza a partir da arcada isquiática e que termina um pouco atrás do umbigo (FILHO, 1987). O pênis é um órgão copulador o qual é formado por raízes da verga, corpo e uma extremidade livre (prepúcio) (FILHO, 1987). O mesmo apresenta na sua extremidade um processo uretral ou apêndice vermiforme que facilita a disseminação do ejaculado dentro do trato reprodutivo da fêmea (HAFEZ & HAFEZ, 2004).

Outra região do trato reprodutor masculino é o prepúcio, o qual está localizado na extremidade livre do pênis (FILHO, 1987) e é uma camada de pele (GRANADOS *et al.*, 2006) que tem a finalidade de proteção do pênis (HAFEZ & HAFEZ,2004).

2.2 ESPERMATOGÊNESE

A espermatogênese (figura 2) é um processo sincrônico e regular de diferenciação celular, em que a espermatogônia tronco é gradativamente diferenciada em uma célula haplóide altamente especializada, o espermatozoide. O processo de espermatogênese ocorre nos túbulos seminíferos (região localizada no interior dos testículos) (FRANÇA & RUSSELL, 1998; JOHNSON, 1991).

Essa diferenciação envolve três classes de células germinativas: espermatogônia, espermatócito (1^a e 2^a ordem) e espermátida (FILHO, 1987). Nos adultos, a espermatogênese é um processo contínuo (COUROUT *et al.*, 1970) e segundo HAFEZ & HAFEZ, 2004 a espermatogênese pode ser dividida em três processos distintos: espermatocitogênese, espermiogênese e espermiação.

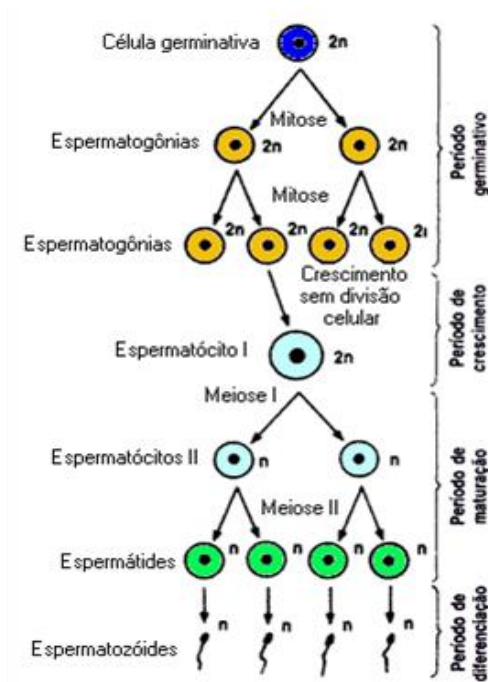


Figura 2- Espermatogênese

Fonte da figura: Texto sobre Reprodução Humana e Gametogênese do blog da escola Prof. João Bento da Costa (julho/2014)

2.2.1 ESPERMATOCITOGÊNESE

A espermatocitogênese abrange os tipos celulares de espermatogônia à espermátida (FILHO,1987).

Nessa fase da espermatocitogênese, as células tronco (A_0) dão origem a duas outras células, uma das células irá servir para a renovação da população de células tronco e a outra célula vai entrar no processo de espermatogênese. Esta última, por sua vez, vai dá origem a espermatogônia intermediária, e a mesma vai se dividir para formar as espermatogônias B (RUSSELL, 1980).

Após a formação da espermatogônia tipo B, a esta divide-se pelo menos uma vez e provavelmente duas vezes para formar os espermatócitos primários. Estes espermatócitos duplicam o seu DNA e passam por progressivas modificações nucleares da prófase meióticas, conhecidas como preleptóteno, leptóteno, zigóteno, paquíteno e diplóteno, antes da divisão para a formação dos espermatócitos secundários. Sem nova síntese de DNA, os espermatócitos secundários resultantes dividem-se novamente formar para as células haploides, denominadas espermátidas (HAFEZ & HAFEZ, 2004).

As divisões que ocorreram durante a espermatocitogênese são consideradas incompletas, pois pequenas pontes citoplasmáticas ficam retidas entre uma série ou

entre os “clones” de células germinativas em desenvolvimento. Acredita-se que essas pontes sejam importantes para coordenar o desenvolvimento simultâneo de células germinativas como um grupo (HAFEZ & HAFEZ, 2004).

2.2.2 ESPERMIOGÊNESE

Na fase de espermiogênese (figura 3), as espermátides resultantes das divisões de maturação sofrem uma metamorfose que leva a formação de espermatozoides. Os principais eventos morfogênicos dessa fase são: condensação do núcleo, aparecimento da estrutura denominada manchete, alongamento celular, surgimento de uma bainha fibrosa, migração caudal do anel e a formação da bainha mitocondrial na peça intermediária, desenvolvimento da cauda a partir do flagelo (VALDEOLIVAS,2003).

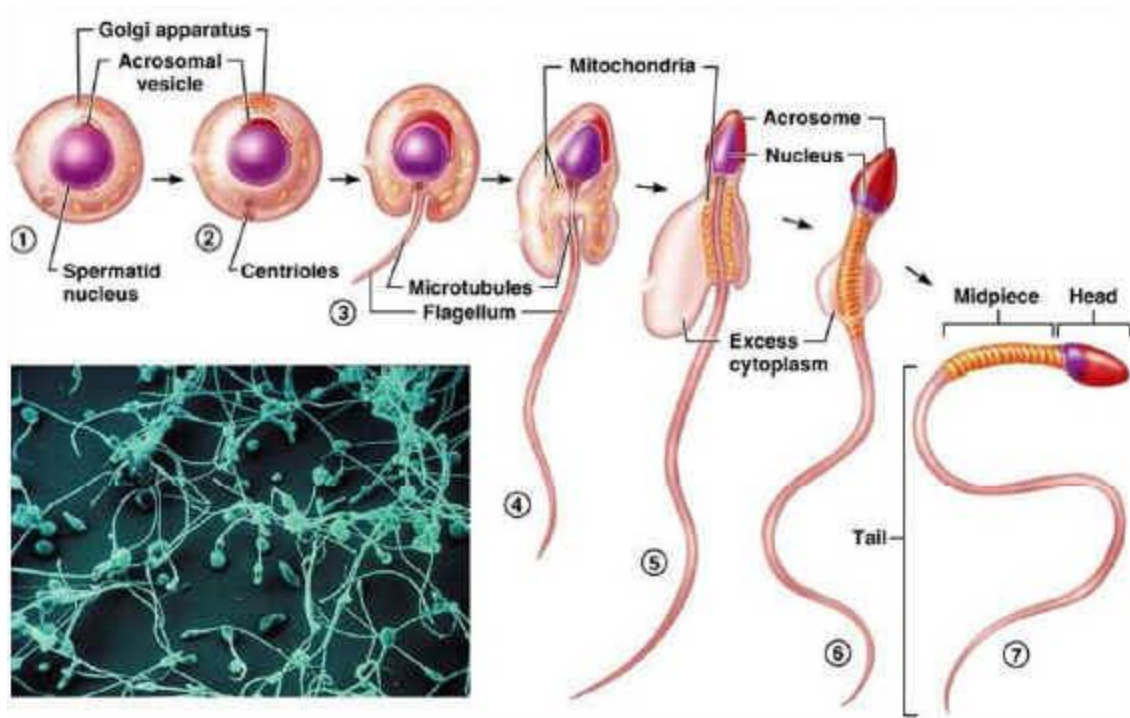


Figura 3- Processo de espermiogênese

Fonte da figura: Texto Espermatogênese do site eu Achei.
<<http://www.euachei.com.br/educacao/biologia/espermatogênese/4/>>.

Segundo HAFEZ & HAFEZ (2004), essas modificações citadas ocorrem durante os seguintes estágios da espermiogênese:

A) FASE DE GOLGI

A fase de Golgi é caracterizada pela formação de grânulos proacrossomáticos no interior do Aparelho de Golgi, com a coalescência dos grânulos dentro de um único acrossomático e a aderência deste ao envelope

nuclear, e os estágios iniciais do desenvolvimento da cauda no pólo oposto àquele de aderência do grânulo acrossomático. O centríolo proximal migra em íntima aposição ao núcleo onde julga-se que forme uma base para fixação da cauda á cabeça.

B) FASE DO CAPUCHÃO

Essa fase é caracterizada por uma distribuição dos núcleos acrossomáticos aderentes sobre a superfície dos núcleos das espermátidas. Esse processo continua até que aproximadamente dois terços da porção anterior de cada núcleo de cada espermátida fiquem cobertos por um fino saco membranoso de parede dupla que se adere intimamente ao envelope nuclear. Durante essa fase, os componentes da cauda axonema em desenvolvimento, que são formados por elementos do centríolo distal, alongam-se bem além da periferia do citoplasma da célula. Durante o desenvolvimento inicial, o axonema assemelha-se muito à estrutura de um cílio, já que ele consiste de dois túbulos centrais circundados perifericamente por nove pares de túbulos.

C) FASE DO ACROSSOMO

A fase do acrossomo é caracterizada pelas maiores modificações nos núcleos, nos acrossomos, nas caudas das espermátidas em desenvolvimento. As modificações características dessa fase é facilitada pela a rotação de cada espermátida, de maneira que o acrossomo é dirigido em direção ao embasamento ou parede externa do túbulo seminífero, e a cauda em direção ao lúmen. As modificações nuclares incluem a condesação da cromatina dentro dos densos grânulos e mudança da forma esferoidal do núcleo para uma estrutura achatada e alongada. Nesse ponto do desenvolvimento, as histonas nucleares são progressivamente substituídas por proteínas transitórias. O acrossomo, que se encontra firmemente aderido ao núcleo, também se condensa e se alonga para corresponder à forma do núcleo. Essas modificações na forma do núcleo e no acrossoma parecem ser “moldadas” pelas células de Sertoli circundantes.

As modificações na morfologia nuclear são acompanhadas pelo deslocamento do citoplasma no sentido caudal do núcleo onde ele circunscreve a porção proximal da cauda em desenvolvimento. No interior do citoplasma, microtúbulos se associam para formar uma capa cilíndrica temporária

denominada manchete, que se projeta posteriormente da borda caudal do acrossomo onde ela circunda frouxamente o axonema. Dentro da manchete, uma estrutura citoplasmática especializada chamada corpo cromatoide condensa-se ao redor do axonema e forma uma estrutura semelhante a um anel, nomeada de *annulus*. A estrutura *annulus* forma-se primeiro próximo ao centríolo proximal e durante o desenvolvimento subsequente, migra posteriormente ao longo da cauda. As mitocôndrias, previamente distribuídas através do citoplasma da espermatída, começam a se concentrar próximas ao axonema, onde formam uma bainha que caracteriza a peça intermediária da cauda.

D) FASE DA MATURAÇÃO

A fase de maturação está caracterizada pela transformação final das espermatídas alongadas em células a serem liberadas dentro do lúmen dos túbulos seminíferos. A transformação da forma do núcleo e do acrossoma de cada espermatída, iniciada na fase anterior, produz espermatozoides. Dentro do núcleo, os grânulos de cromatina passam por uma condensação primitiva à medida que as proteínas transitórias são substituídas por protaminas, formando um material fino e homogêneo que preenche uniformemente todo o núcleo do espermatozoide.

Durante a fase de maturação, uma bainha fibrosa e as novas fibras grossas subjacentes são formadas ao redor do axonema. As fibras grossas parecem estar associadas individualmente com os nove pares de microtúbulos do axonema e estão em continuidade com colunas no colo da peça de conexão a espermatída. A bainha fibrosa cobre o axonema desde colo até o início da peça terminal. O *annulus* migra distalmente de sua posição, adjacente ao núcleo, ao longo da cauda até um ponto aonde irá se separar subsequentemente a peça intermediária da peça principal da cauda. As mitocôndrias permanecem compactamente comprimidas dentro de uma bainha que se estende do colo ao *annulus*.

Durante a espermiogênese, a manchete desaparece e a célula de Sertoli dá forma ao citoplasma remanescente, após o alongamento da espermatída em um lóbulo esferoide denominado corpo residual. Esse lóbulo de citoplasma que permanece ligado a espermatída alongada a um filamento delgado de citoplasma, também é interligado com outros corpos residuais por pontes

intercelulares, resultantes das divisões incompletas das células germinativas durante a espermatocitogênese. A síntese de corpos residuais completa a maturação final e as espermatídeos alongadas se encontram prontas para liberação de espermatozoides.

2.2.3 ESPERMIAÇÃO

Segundo vários autores (LEBLOND & CLEMORT (1993) e SWENSON & REECE (1996)), afirmam que a espermição é o processo de eliminação de espermatozoides para o lume tubular dos túbulos seminíferos.

Nesse estágio da espermatogênese, as espermatídeos alongadas se encontram perpendicularmente orientadas para a parede tubular, são gradualmente expelidas para dentro do lúmen do túbulo. Os lóbulos de citoplasma residual, pelos quais os grupos de espermatídeos estão ligadas por pontes intercelulares, permanecem engastadas no epitélio. A extrusão dos componentes espermáticos continua até que apenas um delgado tronco de citoplasma ligue o colo da espermatídeo ao corpo residual. A ruptura do tronco resulta na formação da gota citoplasmática na região do colo do espermatozoide liberado (gota proximal) e na retenção de corpos residuais interligados. Após a liberação dos espermatozoides, os corpos residuais são fagocitados pelas células de Sertoli para reciclar os componentes protoplasmáticos (HAFEZ & HAFEZ, 2004).

2.3 CROMATINA ESPERMÁTICA

A cromatina é um complexo de DNA com proteínas histonas, que dá estrutura aos cromossomos eucarióticos (PIERCE,2011).

A cromatina das células somáticas se encontram empacotadas com histonas (H3,H4,H1,H2A e H2B) e as histonas organizam o DNA em unidades estruturais denominadas nucleossomos (NELSON& COX,2011).

No entanto, a cromatina que se encontra no interior do núcleo espermático é muito diferente da cromatina que se localiza nas células somáticas (FUENTES-MASCORRO *et al.*,2000).

Nas células espermáticas, a cromatina espermática é constituída de subunidades repetitivas (nucleossomos), junto com segmentos de DNA, o que dá aparência de “contas de rosário”. Cada nucleossomo (unidade repetitiva) tem aproximadamente 200 pares de base de DNA, com aproximadamente 11 nm de comprimento e, apresentando duas cópias de quatro tipos de classes de histonas (H2A,H2B, H3 e H4). Finalmente,

forma-se um ôctamero de histonas nucleossômicas, em volta do qual a hélice do DNA de fita dupla é enrolado duas vezes (FUENTES-MASCORRO *et al.*,2000).

As histonas são proteínas com peso molecular variando entre 11.000 e 21.000 e são muito ricas em aminoácidos básicos arginina e lisina (NELSON & COX, 2011).

A carga positiva das histonas as auxilia a se ligarem ao DNA, o qual apresenta uma carga negativa (FUENTES-MASCORRO *et al.*,2000).

Tudo começa mudar na cromatina espermática durante a espermiogênese, nesse momento a cromatina das espermátides sofre um profundo rearranjo e, o DNA torna-se condensado e irá apresentar um volume bem inferior aquele das células precursoras. Basicamente, dois processos são identificados nessa etapa da espermatogênese. O primeiro processo é a reconfiguração da matriz nuclear. O núcleo das espermátides muda de formato esférico para alongado. O segundo processo envolve a substituição gradativa das histonas em protaminas. As protaminas são proteínas ricas em resíduos de cisteína e arginina (BALHORN,1982; MAZRIMAS *et al.*,1986).

As protaminas promovem uma maior condensação e maior compactação da cromatina espermática quando comparada à cromatina das células somáticas (WARD & COFFEY,1991).

A presença das protaminas na cromatina espermática faz com que a unidade básica da cromatina de espermatozoides de mamíferos seja o toroide de protamina (HUD *et al.*,1993). Nessa unidade básica, aproximadamente 50.000 pb de DNA são firmemente enrolados pelas protaminas, dando origem a uma estrutura de forma de rosca ou toroide. Essa constituição é importante para a proteção e a manutenção da estabilidade do DNA, e isso possibilita que todo o DNA a ser transportado pelo espermatozóide ocupe um volume bem inferior do que estivesse na forma de nucleossomos (BALHORN,1982).

2.4 ESPERMOGRAMA EM OVINOS

O espermograma é um exame paraclínico e de baixo custo ao qual fornece uma visão abrangente da capacidade reprodutiva masculina (VASQUEZ & ECHEVERRI, 2007). Segundo CBRA (1998), nesse exame são avaliados características físicas do sêmen (volume da dose, motilidade progressiva, vigor, concentração espermática, número total de espermatozoides com motilidade progressiva por dose de sêmen),características morfológicas do sêmen (classificação de anormalidades do

espermatozóide através de esfregaços corados e preparações úmidas) além da citação de elementos presentes na amostra de sêmen.

2.4.1 CARACTERÍSTICAS FÍSICAS DO EJACULADO EM OVINOS

A) *VOLUME*

O volume do sêmen coletado é medido em mililitros. O valor do volume espermático é relativo devido ao método de coleta de sêmen. Não existe um limite mínimo ou máximo para o volume ejaculado, pois o volume varia dependendo da espécie. Entretanto, apesar dessas variações que podem ser amplas, o reprodutor não deve fugir muito da média estabelecida para a sua espécie (CBRA,1998). Em carneiros, o volume de sêmen deve ter um mínimo de 0,5 ml e um máximo de 3,0 ml (FILHO,1987).

B) *MOTILIDADE PROGRESSIVA*

Segundo o CBRA (1998) a motilidade é expressa em percentagem (%) conforme a proporção de espermatozoides móveis da amostra de sêmen. Essa avaliação é subjetiva, ou seja, a variação dessa avaliação está sujeita do treinamento do técnico responsável desta avaliação. (TABELA 1).

C) *VIGOR*

O vigor é força de movimento que influencia a força a velocidade com que os espermatozoides se movimentam. O vigor da amostra de sêmen pode receber notas de 0 a 5, em que: 0 é a ausência de movimento de espermatozoides; 1 representa espermatozoides que somente apresentam movimentos oscilatórios associados a grande número de espermatozoides imóveis; 2 representa metade dos espermatozoides com movimento progressivo e oscilatório e a outra metade de espermatozoides se apresentam imóveis; 3 representa que maioria dos espermatozoides tem movimentos progressivos; 4 representa que maioria dos espermatozoides apresentam enérgicos movimentos progressivos retilíneos e 5, representa que todos ou quase todos espermatozoides apresentam movimento enérgicos movimentos progressivos retilíneos. Em ovinos, apresentam um média de vigor 3 (TABELA 1) (CBRA,1998).

D) CONCENTRAÇÃO ESPERMÁTICA

A concentração espermática é o número de espermatozoides por milímetro (mm^3) ou centímetro cúbico ($\text{cm}^3=\text{ml}$). O procedimento comum para se avaliar a concentração espermática é a contagem de espermatozoides na câmara de Neubauer. Entretanto, para avaliar a concentração espermática também pode se utilizar a espectrofotometria e o *micro cell- counter*. A concentração espermática pode sofrer variações devido a fatores extrínsecos, (método de coleta, frequência da atividade do reprodutor e o seu condicionamento) e fatores intrínsecos (idade, tamanho e estado de higidez testicular). Em estado normal, a concentração média espermática é de 3×10^9 espermatozoide/ml. (TABELA 1) (CBRA, 1998).

TABELA 1- CARACTERÍSTICAS FÍSICAS SEMINAIS DO EJACULADO DE OVINO

Variável	Valores médios
Volume (mL)	1,0
Movimento de massa (0-5)	3
Vigor (0-5)	3
Número total de espermatozoides (sptz/ml)	3×10^9
Motilidade espermática (%)	75
Espermatozoides normais (%)	90
Ejaculados/semana	6-24

FONTE: CBRA,1998 (Adaptado de Morrow,1986)

2.4.2 CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS DO EJACULADO DE OVINO

A avaliação de características morfológicas dos espermatozoides do ejaculado de ovinos como também de outras espécies de animais pode ser realizada através de esfregaços corados ou preparação úmida em microscópio de contraste de fase ou de interferência diferencial, associados ou não. Através de esfregaços corados e preparações úmidas se classificam os espermatozoides como normais (sem anomalias morfológicas) e espermatozoides anormais. Em relação aos espermatozoides anormais, estes se classificam suas anomalias em relação a normalidades na cabeça, na cauda e em relação a cauda. A quantidade de espermatozoides normais e anormais é dada em percentagem (CBRA,1998).

2.4.3 EXAMES COMPLEMENTARES

Os exames complementares não são considerados obrigatórios. Esses exames serão adotados a critério do técnico responsável a fim de ressaltar alguma característica e/ou qualidade do sêmen. Os testes aos que são sugeridos pelo CBRA são os testes de termo-resistência, microbiológicos e sorológicos (CBRA,1998).

2.5 TESTES DE ANÁLISE DE FRAGMENTAÇÃO DE DNA DE SÊMEN

A preservação das funções da membrana do espermatozóide e a sua motilidade são parâmetros importantes para determinar a qualidade do sêmen. No entanto, essas funções não revelam mudanças associadas com a integridade do DNA espermático, o qual vem se mostrando como um importante parâmetro útil para avaliação da qualidade do esperma (ARAVINDAN *et al.*,1997).

O DNA fragmentado espermático vem se tornado um bom bioindicador da fertilidade masculina, porque a fragmentação do DNA está associada a defeitos do desenvolvimento embrionário e esses defeitos podem dá origem a abortos em estágios precoces da gravidez e também o DNA fragmentado está relacionado com problemas com o desenvolvimento fetal (EVENSON *et al.*,1999; CARELL *et al.*,2003; LEWIS & SIMON, 2010). Além disso, uma elevada fragmentação do DNA também está associada a causas de abortos recorrentes e uma maior dificuldade de se obter uma gravidez (COOKE *et al.*,2003; AITKEN *et al.*,2009; BRAHEM *et al.*,2011; ZINI ,2011; ABSALAN *et al.*,2012).

Dessa forma, a fragmentação do DNA deve ser considerada um importante parâmetro para se avaliar conjuntamente com o espermograma clássico (URBANO *et al.*,2013).

Diversas abordagens têm sido desenvolvidas para avaliar a fragmentação do DNA espermático, e a maioria têm sido aplicados para finalidades clínicas afim de estabelecer valores de corte para predição de gravidez, e monitoramento de sua sensibilidade (EVENSON *et al.*,2002;SERGERIE *et al.*,2005;VELEZ DE LA CALLE *et al.*,2008; NIJS *et al.*,2009; SHARMA *et al.*,2010; SIMON *et al.*,2011; VENKATESH *et al.*,2011).

2.5.1 TIPOS DE TESTES PARA AVALIAÇÃO DE FRAGMENTAÇÃO DE DNA ESPERMÁTICO

A) TUNEL ASSAY

O ensaio TUNEL (figura 4) quantifica a incorporação de trifosfato de desoxiuridina (dUTP) em quebras de fitas de DNA em uma reação catalisada por enzima independente de molde, chamada de terminal de desoxinucleotidil transferase (TdT). O dUTP incorporado é marcado de maneira que as quebras no DNA podem ser quantificado através de citometria de fluxo, microscopia de fluorescência ou microscopia de luz (EVENSON *et al.*,2002). No entanto, o ensaio TUNEL utilizando a citometria de fluxo é o método que fornece resultados clinicamente mais significativos (SAILER *et al.*,1995). Nessa metodologia, diferentes tamanhos de cortes do DNA são utilizados para avaliar o estado de fertilidade do macho (SERGERIE *et al.*,2005; SHARMA *et al.*, 2010).

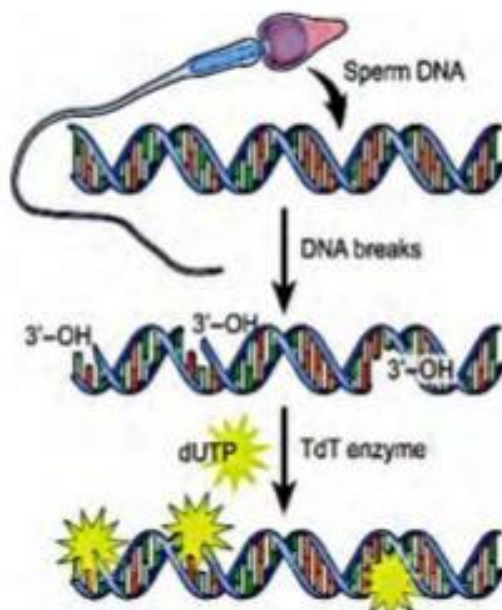


Fig.4- Ensaio TUNNEL

Fonte da figura: Seminário “Sperm DNA Fragmentation in Male Infertility” (Esteves,2014).

B) COMET ASSAY

O ensaio do cometa é um método simples para medir quebras na fita de DNA em células eucarióticas (COLLINS,2004).

Nesse ensaio, os espermatozoides são embebidos em agarose, depois, são depositados em uma lâmina de microscopia e logo após, as células são lisadas com um detergente e em seguida, os espermatozoides são sujeitos ao processo

de eletroforese e finalmente, corados com um corante fluorescente que se liga ao DNA (COLLINS,2004; HAINES *et al.*,1998).

As quebras na estrutura do DNA promovem o desenrolamento do DNA e isso permite a migração do DNA fragmentado em direção do ânodo, durante o processo de eletroforese (HAINES *et al.*,1998).

No final do Comet Assay (figura 5), parte do DNA fragmentado permanece intacto na cabeça do espermatozóide, enquanto que os outros pedaços menores do DNA fragmentado migram para fora (EVENSON & WIXON,2005).

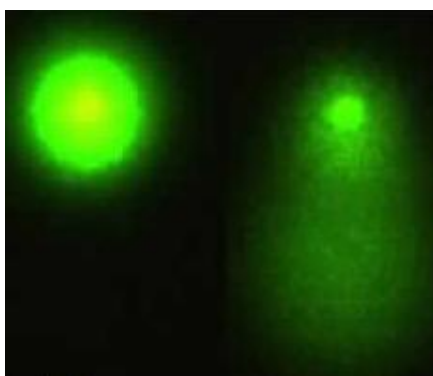


Fig.5- Comet Assay: no lado esquerdo é uma célula com DNA não fragmentado e o lado direito é uma célula com DNA fragmentado

Fonte da figura: Site do Massey University – Institute of molecular Biosciences
<http://www.massey.ac.nz/~imbs/genetic_damage_humans.htm> (março,2008).

C) SCSA

O SCSA (Sperm Chromatin Structure Assay) foi o primeiro método para avaliação de medidas de desnaturação do DNA de espermatozoides (EVENSON *et al.*,1980).

Essa metodologia requer uma grande atenção de detalhes. No protocolo requer um descongelamento da amostra de sêmen para a temperatura de 37°C, em seguida, o sêmen é diluído com o tampão TNE para uma concentração de 1 milhão de espermatozóide/ml. Logo após, a amostra de sêmen é tratada com um tampão de pH 1.2 e em seguida, a amostra é corada com laranja de acridina. Posteriormente, a amostra é colocada em um citometro de fluxo, e então, em torno de 5000 a 10.000 espermatozoides são medidos a uma velocidade de 200 rotações/segundo (EVENSON & WIXON,2005).

O corante de acridina utilizado nessa metodologia é um corante o qual se intercala entre as bases da cadeia dupla do DNA (ds DNA) e também entre as

pilhas de DNA de cadeia simples (ss DNA). Quando o DNA espermático entra em colapso, ou seja se transforma de DNA de fita dupla para fita simples, ocorre uma mudança metacromática em que a fluorescência do DNA que estava verde se transforma para vermelho. Isso ocorre quando as amostras de sêmen são expostas a uma luz laser de 488 nm do citômetro de fluxo (EVENSON & WIXON,2005).

No SCSA, os espermatozoides são avaliados e divididos em quatro populações: porcentagem de esperma sem fragmentação de DNA, porcentagem de esperma com índice de fragmentação moderada, porcentagem de esperma com índice de fragmentação de DNA alta e porcentagem de espermatozoides imaturos (EVENSON & WIXON,2006).

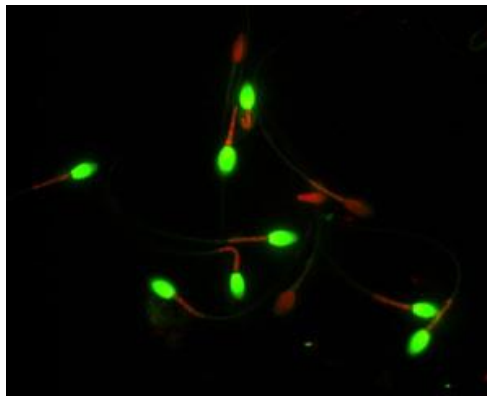


Fig.6- SCSA test

Fonte da figura: Site Veterinary Medical Teaching Hospital- Texas A&M University
<<http://vethospital.tamu.edu/large-animal-hospital/equine-theriogenology/stallion-services>>.

D) SCD test

O Sperm Chromatin Dispersion test (SCD test) (figura 7) é um teste para avaliação de fragmentação do DNA no esperma (Fernández *et al.*,2003).

Esse ensaio é baseado no princípio que o espermatozoide com DNA fragmentado não consegue produzir um halo característico de um DNA não fragmentado (CHOHAN *et al.*,2006).

Resumidamente, no SCD test os espermatozoides intactos são imersos numa matriz de agarose sobre uma lâmina, depois, a lâmina é tratada com uma solução de ácido para desnaturar o DNA, em seguida, trata-se a lâmina com tampão de lise com a finalidade de remover membranas e proteínas do DNA e do espermatozoide (FERNÁNDEZ,*et al.*,2005).

A matriz de agarose permite trabalhar com o espermatozoide não fixado em uma lâmina em um ambiente de suspensão. A remoção de proteínas nucleares do DNA resulta em estrutura de formato nucleóide com um núcleo central e um halo periférico de lacetes de DNA disperso (FERNÁNDEZ, *et al.*, 2005).

Posteriormente, utilizando uma coloração fluorescente ou corante “normais” pode se observar que os espermatozoides com DNA não fragmentado produzem grandes halos, enquanto que os espermatozoides com DNA fragmentado podem apresentar pequenos ou nenhum halo (FERNÁNDEZ, *et al.*, 2005).

Dentre todas as metodologias utilizadas para avaliar a integridade do DNA (TUNEL, SCSA, Comet assay, SCD test e dentre outras), o SCD test é um dos métodos mais simples, pois não utiliza métodos complicados nem utiliza equipamentos específicos, como por exemplo o citômetro de fluxo (FERNÁNDEZ *et al.*, 2003).

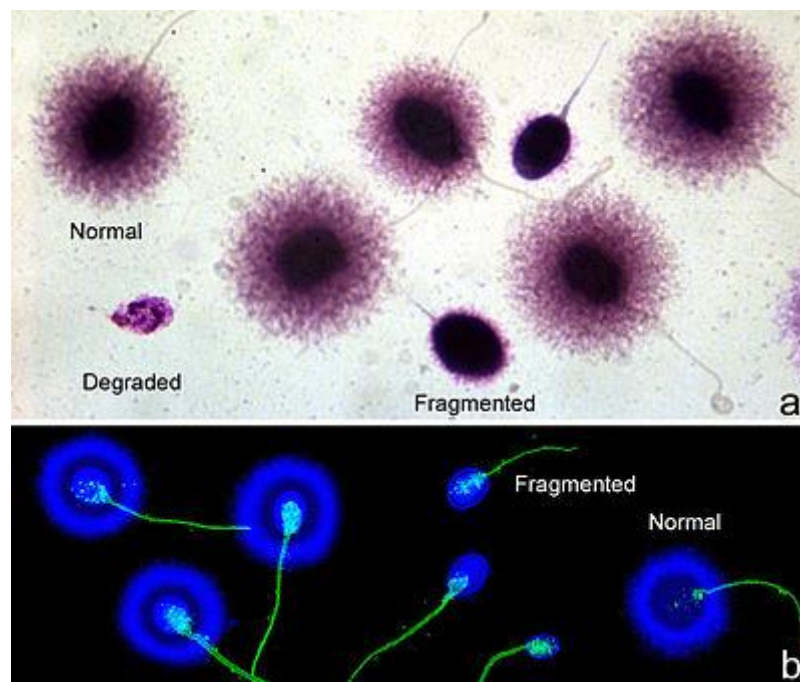


Fig.7- SCD test: a- microscopia de campo claro; b- microscopia de fluorescência

Fonte da figura: Texto “Test de dispersión de la cromatina espermática” no site wikipédia
<http://es.wikipedia.org/wiki/Test_de_dispersi%C3%B3n_de_la_cromatina_esperm%C3%A1tica>
(junho, 2006).

2.6 EFEITO DA TEMPERATURA NOS TESTÍCULOS

Existem diversas técnicas para o estudo dos efeitos do calor nos testículos e na espermatogênese: exposição dos animais a ambientes com elevadas temperaturas, insulação escrotal total ou insulação pescoço escrotal, intervenção cirúrgica fazendo

com que se reintroduzam os testículos à cavidade abdominal simulando o estado de criptorquidismo, imersão testicular em água quente e exposição testicular a ondas de microirradiação (SETCHELL, 2006).

Dentre essas técnicas, a insulação escrotal é um método simples e tem uma facilidade de controle experimental (MUCCILO *et al.*,1974) em que pode determinar os efeitos da temperatura testicular na síntese espermática e na qualidade do sêmen e promove patologias e defeitos espermáticos específicos (BRITO *et al.*,2003).

O aumento da temperatura testicular ,ocasionada pela técnica citada acima, propicia a degeneração testicular (VOGLER *et al.*,1991) e está relacionada com a diminuição da fertilidade do macho (HULET *et al.*,1956) causando mudanças na síntese de proteínas e expressão de genes nas células germinativas e células de Sertoli (IKEDA *et al.*,1999; GUO *et al.*,1999; KUMAGAI *et al.*,2000).

Em estudo realizado com bovinos, as primeiras consequências promovidas pelo o calor no testículo foram observadas em exame clínico externo, tais como mudanças anatômicas relacionadas ao tamanho, ao peso e a textura do testículo. A elevação da temperatura no testículo provoca efeitos fisiológicos e metabólicos, incluindo alterações no fluxo sanguíneo e linfático, tensão do oxigênio, fluidos testiculares e vias metabólicas específicas do sistema enzimático (COSTA,2007).

As mudanças citadas acima afetam o estado endocrinológico, comprometendo a síntese de testosterona (COSTA, 2007). Estudos realizados com touros com bolsa escrotal insulada demonstraram que ocorreu queda na concentração plasmática de testosterona em 48, 72 e 96 horas depois do início da insulação (GABALDI,2000). Já em estudos com carneiros, foi observado que as concentrações de testosterona foram reduzidas no plasma após os animais serem submetidos a elevadas temperaturas ambientais de 32°C durante duas semanas (RODRIGUES.,2004).

Em outro estudo de insulação escrotal realizado com carneiros da raça Morada Nova foi demonstrado que durante a insulação, os animais sofreram diminuição da sua temperatura retal, elevação da biometria testicular e tiveram sua consistência testicular reduzida. O sêmen desses ovinos teve diminuição da motilidade massal, da percentagem de espermatozoides moveis e do vigor espermático, além de defeitos de morfologia de espermatozoides que surgiram como por exemplo gota citoplasmática distal, cauda enrolada e cabeça solta normal (ROCHA,2013).

O estresse térmico provoca também um aumento na secreção de ACTH, e esse hormônio inibe a secreção de LH no macho, e conseqüentemente, inibe a secreção

de testosterona, dessa forma, desfavorece a espermatogênese e a libido do macho (COSTA, 2007).

A redução de níveis de testosterona promove a apoptose de células germinativas testiculares, especialmente as células haploides (TROIANO *et al.*, 1994).

A morte devido ao estresse térmico se processa através da necrose e apoptose. O processo apoptótico induz as células sintetizarem espécies de oxigênio reativo (ROS), além de reduzir a presença da enzima catalase (SETCHELL, 2006).

As ROS (ânion superóxido, peróxido de hidrogênio e radicais hidroxil), assim como a peroxidação de ácidos graxos sintetizados pelo ataque de ROS aos fosfolípidos das membranas celulares, estão associadas com baixa motilidade e baixa capacidade de fusão do espermatozóide de mamíferos ao oócito. Além disso, a degradação produzida pela peroxidação de lipídios é muito tóxica para os espermatozoides e pode ocasionar perda irreversível de motilidade (BHARDWAJ *et al.*, 2000).

Em estado normal, as ROS desempenham função importante, no entanto, o desequilíbrio entre síntese e degradação ocasiona efeitos adversos no espermatozóide (BALL *et al.*, 2001).

Dessa forma, acredita-se que a síntese de ROS pode ser benéfica ou prejudicial para a função espermática. Sendo considerada benéfica pelo fato de que a peroxidação promova a capacitação e a ativação espermática, atuando como interruptor na tirosinase e determinando a hipermotilidade induzida pelo ânion O_2^- . O aumento excessivo de ROS é prejudicial quando a peroxidação resulta em dano espermático (GADELLA *et al.*, 2001).

Um dos danos que o excesso de ROS pode causar é a interação entre o radical -OH com o material genético, essa interação promove modificações no DNA, e isso pode determinar mutação e depreciação da molécula. Os radicais livres também vêm sendo associados a outros processos como a indução de apoptose neuronal por dano oxidativo *in vitro* e *in vivo* (AL-ABDULLA; MARTIN, 1998)

Outras patologias do espermatozóide associadas a alta síntese de ROS são: excesso de citoplasma residual na peça intermediária, cabeça anormal, defeitos de acrossoma, de peça intermediária e de cauda, além de danos ao DNA (COSTA, 2007).

No entanto, a função espermática pode se recuperar. Essa regeneração da função espermática após o dano pelo calor depende da temperatura, da duração do insulto e da idade do animal. Na maior parte dos casos, dificilmente se pode determinar se a lesão é transitória ou permanente, pois é necessário aguardar o período espermático e a

passagem de espermatozoides pelo epidídimo, sendo o intervalo de término da injúria até a restauração de espermatozoides normais no ejaculado correspondente ao período do início da diferenciação na espermatogênese até o momento da ejaculação (COSTA,2007).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Animais experimentais

O procedimento experimental foi conduzido no Setor de Digestibilidade do Departamento de Zootecnia (DZ/CCA/UFC), durante o período de 5 de agosto de 2014 a 10 de fevereiro de 2015. Foram utilizados seis carneiros da raça Morada Nova, variedade vermelha, com peso médio de $47,4 \pm 3,3$ kg, e com 26 meses de idade, alojados em baias individuais com 6 m^2 e alimentados com feno de capim Tifton e ração contendo com 16% de proteína bruta, 66% de NDT (nutrientes digestivos totais) e água *ad libitum*. Foram realizadas coletas de adaptação (coletas de sêmen com finalidade de o animal se acostumar com a técnica de eletroeletroejaculação) até atingirem os parâmetros recomendados pelo CBRA para ,então, dar início a insulação escrotal.

3.2 Insulação escrotal

A insulação escrotal foi realizada durante o período de 11 de novembro a 15 de novembro de 2014, durante o período noturno, das 18:00 às 6:00h. Para a insulação foram utilizados bolsas de manta acrílica revestidos por plástico (figura 8).



Fig.8- Carneiro Morada Nova com bolsa durante período de insulação

Fonte figura: Aderson Viana

3.3 Coleta e avaliação de parâmetros espermáticos

A coleta de sêmen foi realizada semanalmente durante o período de 141 dias por meio de eletroejaculação Neovet autojac[®] (Neovet,Uberaba,Brasil). Após coletado, o sêmen foi avaliado quanto ao seu volume, aspecto,cor,concentração espermática, motilidade massal, motilidade individual progressiva e percentual de espermatozoides móveis por microscopia (CBRA,1998).

3.4 Reagentes utilizados durante o experimento

Os reagentes utilizados durante todo o experimento foram fornecidos pelas empresas GE healthcare, Sigma Aldrich, Vetec, Synth, Dinâmica e New Prov.

3.5 Preparação de lâminas para SCD test

As lâminas utilizadas para o SCD test foram lâminas foscas não lapidadas. As lâminas receberam 10 alíquotas de 2 μ L de 0,65% de agarose NA. Em seguida, deixou-se o agarose secar durante 1 minuto e subseqüentemente, escorreu o excesso de agarose NA. Este procedimento deve ser realizado cinco vezes.

3.6 SCD test

Primeiro, a solução de agarose de baixo peso molecular (10 mg/ml) foi fervida durante 5 minutos, e posteriormente, a solução foi colocada em banho-maria a 37°C também durante 5 minutos. As alíquotas de 5 μ L das amostras de sêmen foram diluídas em 1,5 mL de PBS 1X (pH 7,4). Em seguida, 25 μ L do sêmen diluído foram adicionados em 50 μ L de agarose de baixo peso molecular, e gentilmente, foram misturados. Alíquotas de 2 μ L foram adicionadas 10 vezes sobre lâminas que foram brevemente tratadas com 0,65% Agarose NA e em cima das alíquotas foram colocadas, cuidadosamente, as lâminulas. Posteriormente, as lâminas foram depositadas no refrigerador a 4°C durante 5 minutos. Após a solidificação da agarose de baixo peso molecular, as lamínulas foram retiradas gentilmente. Logo após, as lâminas foram mergulhadas em solução de 0,08 N de HCl durante 7 minutos no escuro. Posteriormente, as lâminas foram mergulhadas em solução de lise, no qual continha 2 M de NaCl, 0,5% de SDS, 0,3% de Triton-X, 0,02 M de EDTA, 2M de β -mercaptoetanol e 0,2 M de Tris-Cl, durante 25 minutos. Depois, as lâminas foram colocadas em água destilada em um período de 5 minutos, e em seguida, a lâmina foi banhada por uma

sequência de etanol 70, 90 e 95%. Em cada concentração de etanol, deixou-se a lâmina mergulhada durante 2 minutos. No final, as lâminas secaram a temperatura ambiente.

3.7 Coloração

Após o procedimento do SCD test, as lâminas foram coradas utilizando o kit Instant-Prov[®](New Prov, Pinhais, Brasil). A primeira etapa é mergulhar a lâmina na solução de ciclohexaenios a 0,1% durante 10 segundos. Logo em seguida, mergulha a lâmina na solução de azobenzenosulfônico a 0,1% durante 20 segundos e posteriormente, mergulha a lâmina na solução de fenotiazinas a 0,1% também durante o período de 20 segundos. No final, deixar a lâmina secar a temperatura ambiente.

Com auxílio da microscopia de campo claro, contaram-se 500 espermatozoides de cada lâmina confeccionada. Os espermatozoides foram classificados segundo Fernández (2003):



Fig.9- Classificação de Fernández (2003) quanto ao tipo de espermatozóide: A) Espermatozoide com halo-sem fragmentação de DNA; B) Espermatozoide sem halo-com fragmentação de DNA; C) Espermatozoide degradado sem halo-com fragmentação de DNA (Aumento das imagens: 720X).

3.8 Estatística

Os dados coletados foram analisados com Statistical Analysis System (SAS[®]), através do método da análise de variância (ANOVA) por meio do LSD Fisher.

4 RESULTADOS

No SCD test, segundo gráfico 1, houve diferença estatística significativa no surgimento de halo nos espermatozoides entre os dias da coleta ($p < 0,0001$). Também se apresentou diferença estatística de surgimento de halo nos espermatozoides entre o período de pré-insulação e o dia 7 e entre o período de pré-insulação e o dia 11 ($p < 0,005$). Entretanto, não houve diferença estatística no surgimento de halo nos espermatozoides durante o período crítico, período no qual o aparecimento de halo é menor, que começa do dia 11 e termina no dia 63, esse período tem uma média que varia de 0 a 18,53%. Depois do período crítico, começa a se observar uma recuperação progressiva (aumento de número de espermatozoides com halo) a partir do dia 77, dia em que apresentou uma média de 39,6 %, e termina no dia 120, dia em que apresentou uma média de surgimento de halo de 80,37%. À medida que se tem uma recuperação do aparecimento do halo nos espermatozoides (gráfico 1), há uma diminuição na média de espermatozoides sem halo e sem halo degradado (tabela 2). Também não existe uma diferença estatística entre o período de pré-insulação e o dia 120 ($p < 0,18$), demonstrando que há uma recuperação no surgimento de halo nos espermatozoides dos carneiros Morada Nova após a insulação escrotal.

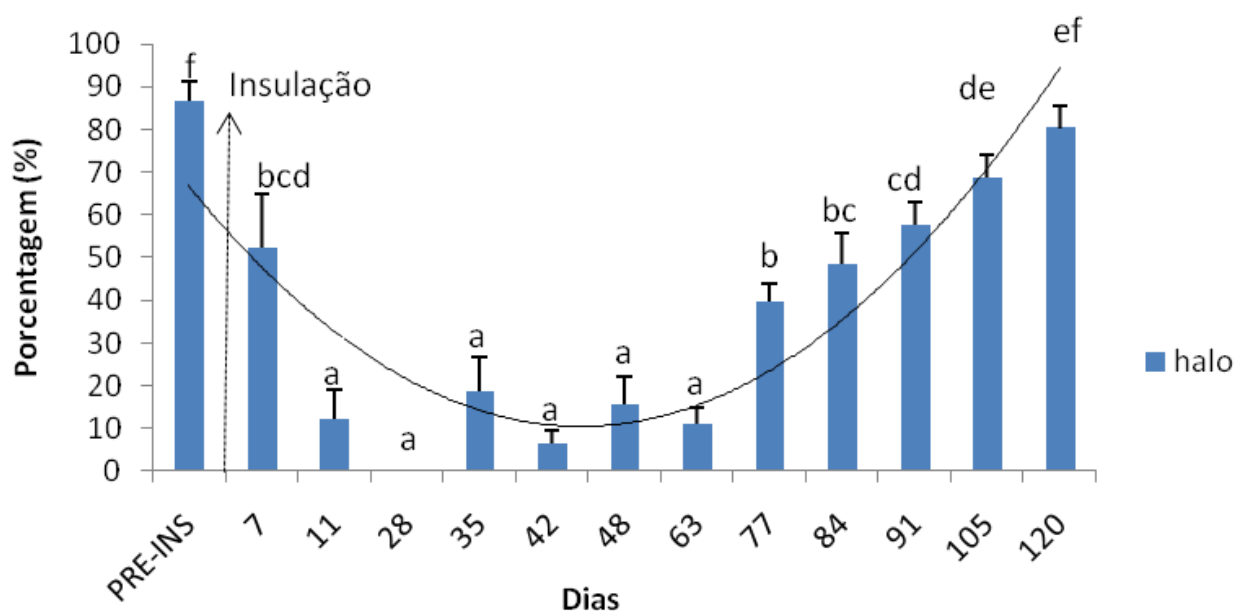


Gráfico 1: Porcentagem de espermatozoides do ejaculado de oito carneiros Morada Nova que apresentaram halo com o SCD test.

^{a-f}: superíndices das porcentagens que diferiram significativamente

TABELA 2- PORCENTAGEM DE ESPERMATOZOIDES SEM HALO E ESPERMATOZOIDES SEM HALO DEGRADADO DO EJACULADO DE OITO CARNEIROS MORADA NOVA DURANTE EXPERIMENTO COM SCD TEST.

Dia	Epermatozoides sem halo (%)	Epermatozoides sem halo e degradado (%)
Pré-Insulação	13,23 ± 4,75	0,27± 0,23
7	30,77± 9,04	16,9± 16,62
11	64,72± 10,29	23,08± 14,04
28	57,48± 21,54	42,52± 21,54
35	78,5± 8,2	2,97± 1,16
42	46,6± 18,17	46,77± 20,84
48	67,6± 10,76	16,67± 10,62
63	83,23± 4,68	5,7± 2,58
77	52,77± 6,23	7,63± 2,72
84	44,6± 7,52	6,77± 3,1
91	31,7± 4,09	10,53± 3,44
105	26,9± 4,5	4,4± 2,06
120	17± 4,53	2,63± 1,86

Para análise do parâmetro motilidade, notou-se que durante o período entre os dias 23 a 28 não teve motilidade (porcentagem de 0%) tanto nos critérios de porcentagem de espermatozoides móveis, motilidade total e motilidade individual (gráficos 2,3 e 4). Esse período coincide com o período crítico citado acima, no qual se observou um menor número de espermatozoides com halo e houve um maior número de espermatozoides sem halo e sem halo degradado (gráfico 1). No entanto, em todos os critérios relacionados com a motilidade, observou-se que aconteceu uma melhora progressiva da motilidade espermática antes da recuperação da integridade do DNA. Essa recuperação se inicia a partir do dia 35 (gráfico 2, 3, e 4).

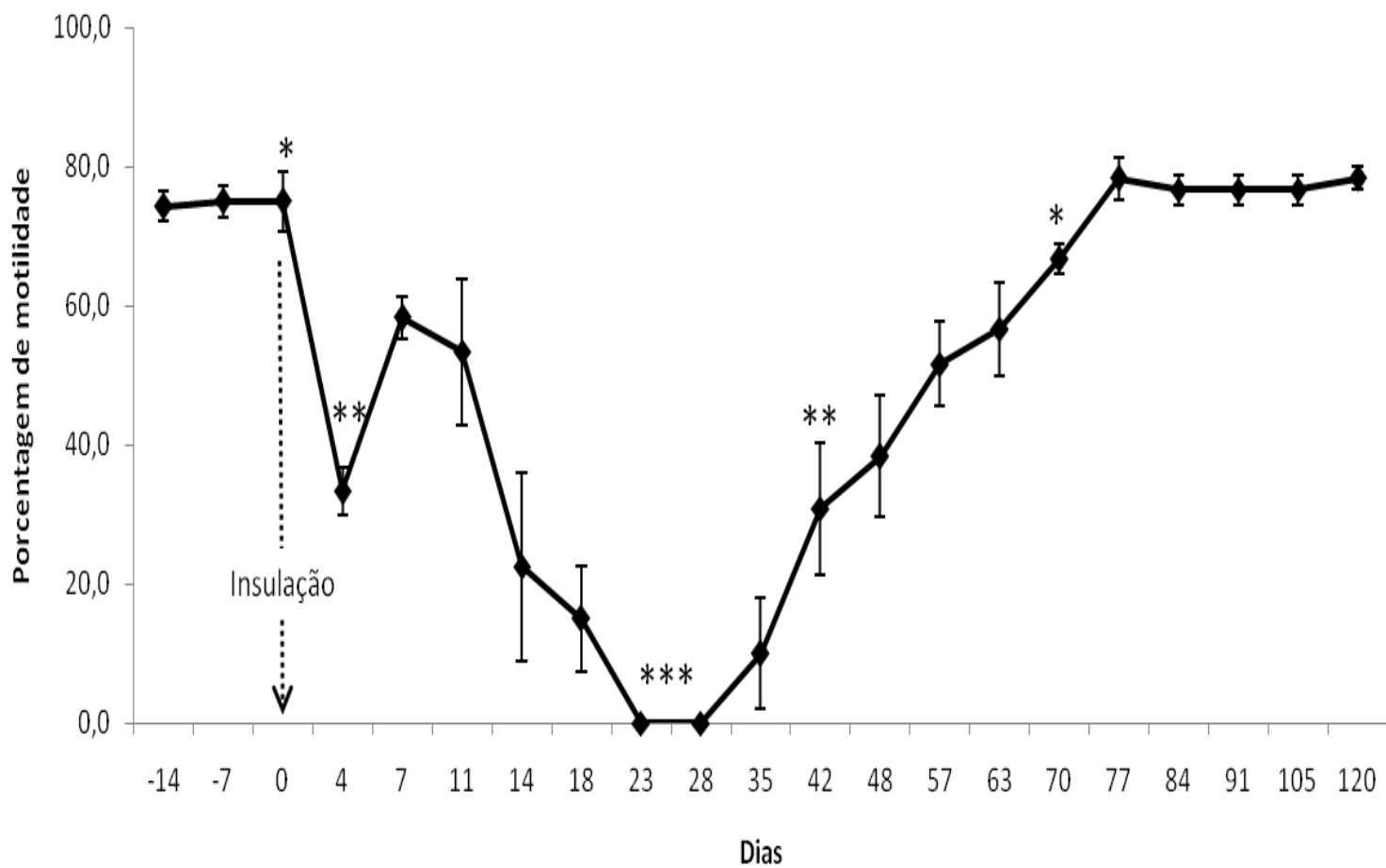


Gráfico 2- Média de porcentagem de motilidade de espermatozoides dos carneiros Morada Nova durante o experimento de insulação escrotal.

*dias nos quais houve uma maior diferença de motilidade durante o experimento

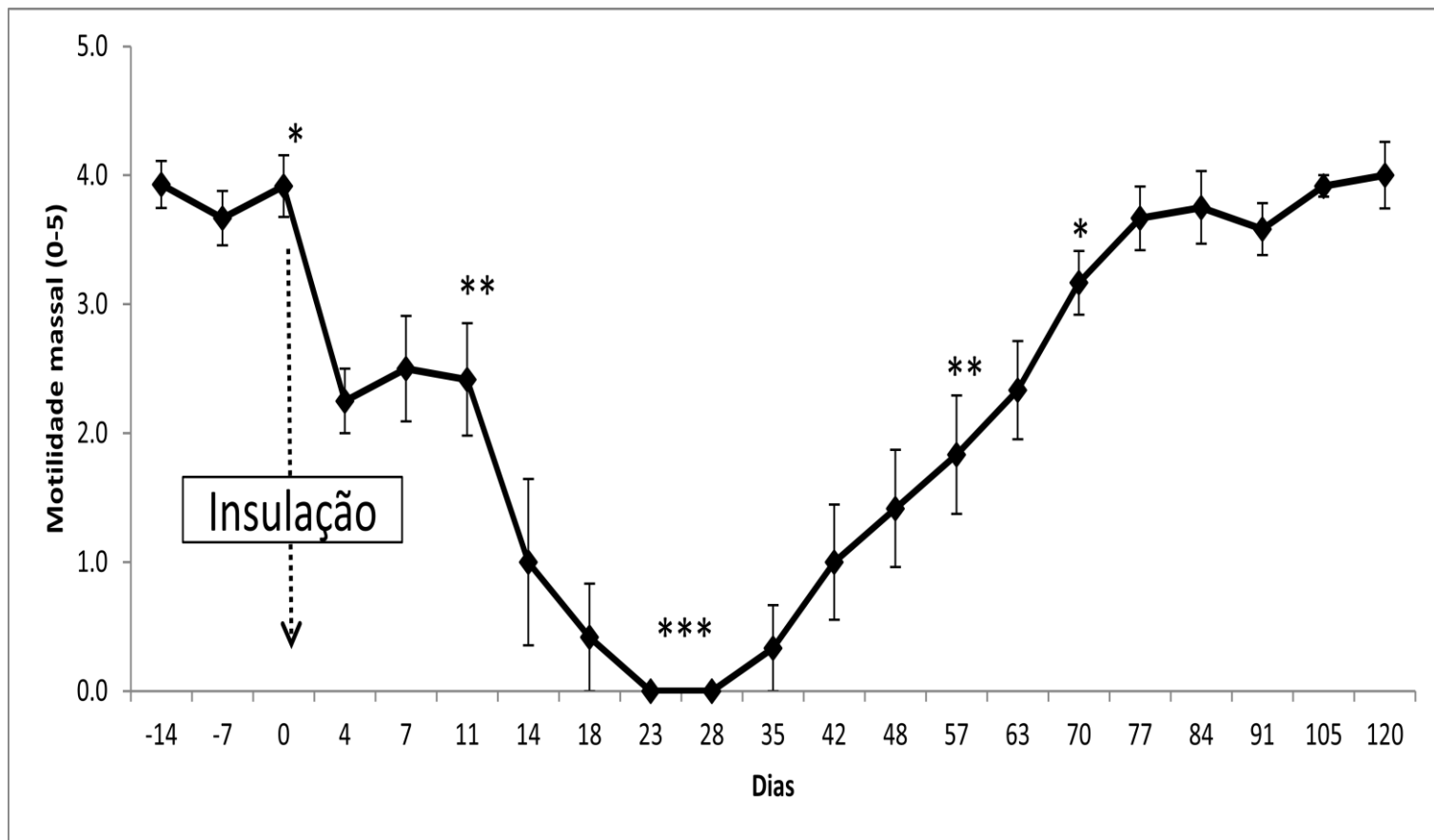


Gráfico 3- Média de motilidade massal dos espermatozoides dos ejaculados de oito carneiros Morada Nova durante o experimento de insulação escrotal.

*dias nos quais houve uma maior diferença de motilidade durante o experimento

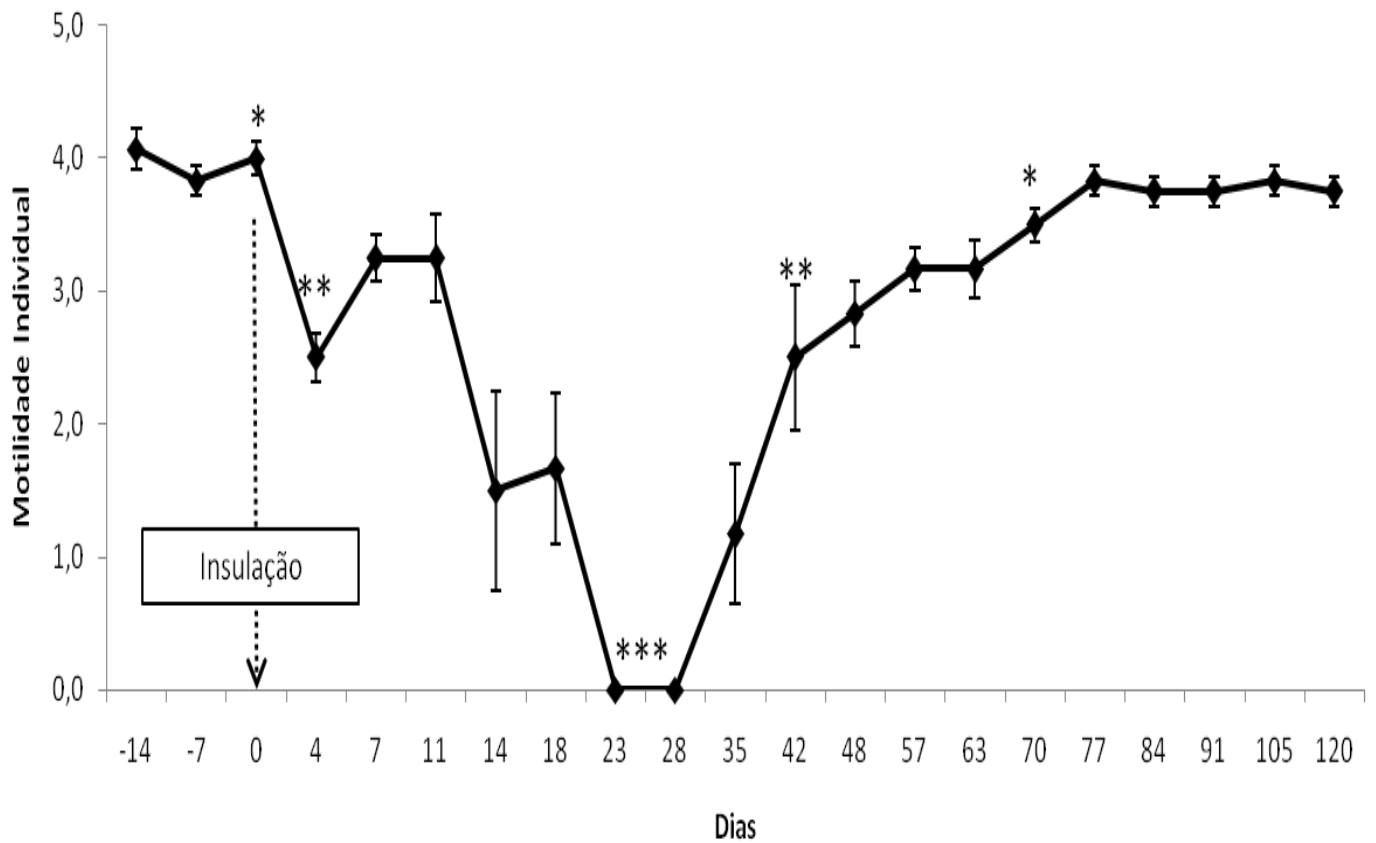


Gráfico 4- Média de motilidade individual dos espermatozoides dos ejaculados dos carneiros Morada Nova durante experimento de insulação escrotal.

*dias nos quais houve uma maior diferença de motilidade durante o experimento

Para análise da circunferência escrotal dos carneiros Morada Nova, notou-se que houve uma elevação da média da circunferência escrotal logo após a técnica de insulação escrotal, mas a partir do dia 7 houve uma diminuição da circunferência escrotal. No entanto, a partir do dia 42 observa-se uma recuperação da circunferência escrotal.

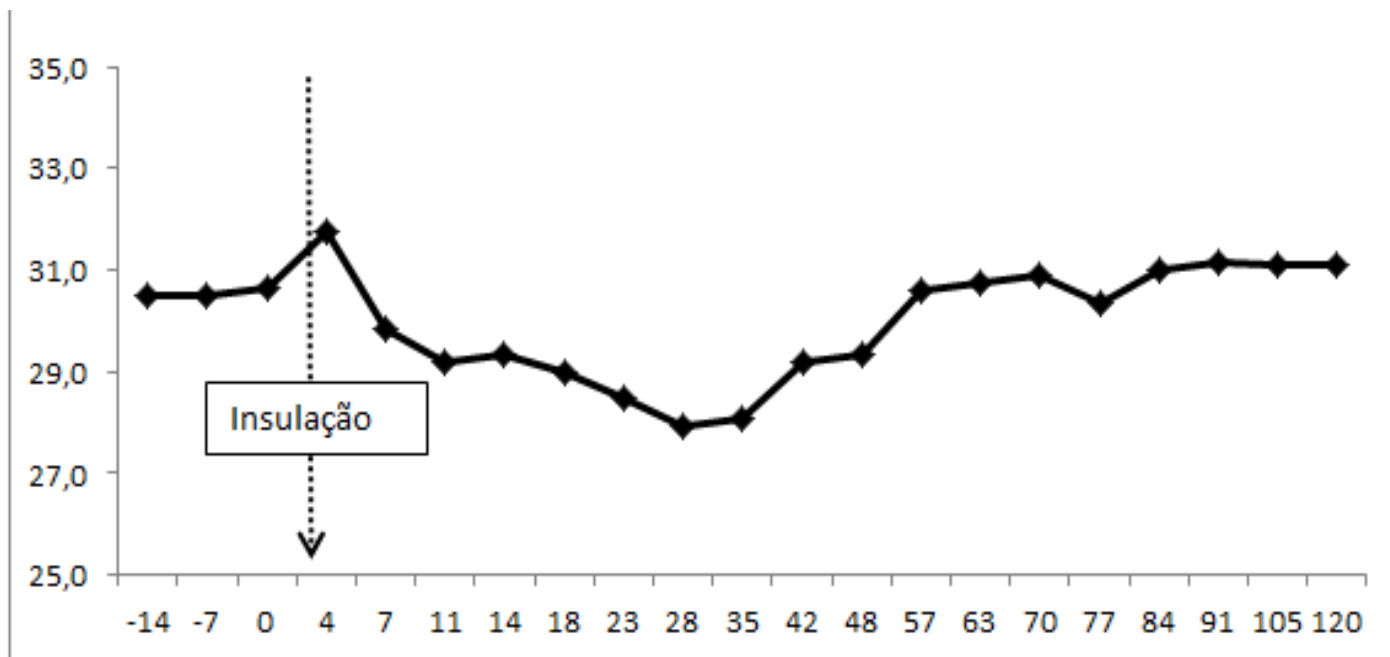


Gráfico 5- Porcentagem da média de circunferência escrotal dos oito carneiros Morada Nova durante o experimento de insulação escrotal.

5 DISCUSSÃO

A insulação escrotal é um dos métodos utilizados para simular os efeitos do estresse térmico ambiental nas células espermatogênicas sob condições controladas (RAHMAN *et al.*,2011). Dentre os danos induzidos pelo estresse térmico em células espermatogênicas se encontra o estresse oxidativo, o mesmo estresse pode causar defeito na protaminação da cromatina (AGARWAL & ALLAMANENI, 2005) e em último caso, pode levar a apoptose e a fragmentação do DNA dos espermatozoides (PAUL *et al.*,2008a;2008b;2009).

Durante o estresse oxidativo há formação de radicais livres (ROS) e/ou espécies reativas não radicais do metabolismo do oxigênio (BARBOSA *et al.*,2010).

Dentre as espécies reativas ao oxigênio encontra-se o NO (óxido nítrico), essa molécula é sintetizada por macrófagos como agente citotóxico durante a resposta imune ou inflamatória (MONCADA *et al.*,1991;FELDMAN *et al.*,1993;MARLLETA *et al.*,1988; MARLLETA *et al.*,1988 e HIBBS *et al.*,1989).

Sugere-se que o NO pode ter sido a molécula responsável pela fragmentação do DNA espermático. Durante o experimento foi observado uma leve diminuição da circunferência escrotal dos carneiros Morada Nova (gráfico 5), e essa redução de tamanho e volume de testículos é uma das características que indica processo de degeneração testicular (DOMINGOS & SALOMÃO,2011), principal sintoma do estresse oxidativo.

Essa degeneração testicular tem como uma das suas etiologias as alterações térmicas (DOMINGOS & SALOMÃO,2011). Vários estudos sugerem que o envolvimento do estresse oxidativo como indutor dos danos provocados pelo estresse térmico testicular (NICHI *et al.*,2006;XAVIER *et al.*,2008; PAUL *et al.*,2009). Dessa forma, como citado anteriormente, durante o estresse oxidativo há síntese de ROS, e um dos ROS é o NO. Portanto, essa produção excessiva de NO, pode ser a possível causa do dano a integridade do DNA.

Uma das vias que o NO pode causar danos ao DNA é através da via do N₂O₃ (trióxido de dinitrogênio). Nessa via, o N₂O₃ ataca diretamente o DNA o que conduz a uma desaminação do DNA através da formação de íons diazônio. A hidrólise dos íons

diazônio completa a desaminação no DNA, e o resultado dessa reação é a substituição do grupo amino no DNA por um grupo hidroxil (BURNEY *et al.*,1999).

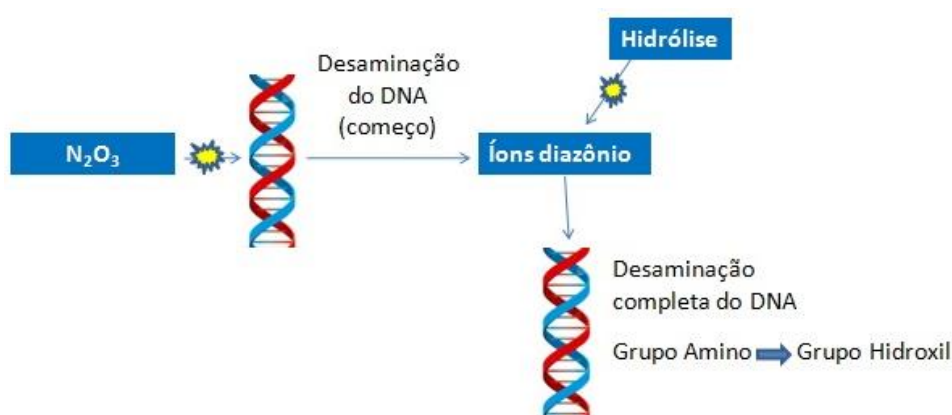


Fig.10: Esquema da ruptura da cadeia do DNA através da via N_2O_3 .

As consequências da reação de desaminação podem variar de nucleosídeo para nucleosídeo. Dessa forma, as bases adenina, citosina, citosina-5-metil podem sofrer a reação de desaminação para formar a hipoxantina, uracila, timina e xantina, respectivamente (BURNEY *et al.*,1999).

A desaminação da guanina promove a formação da xantina. A molécula xantina é instável no DNA e facilmente essa molécula se depurina para formar um sítio abásico (LOEB & PRESTON,1986). Esse sítio abásico pode ser clivado por endonucleases, dessa maneira, resulta em quebras de cadeia simples do DNA (LINDAHL & ANDERSSON, 1972).

Devido a esse evento, se pode entender a razão pela qual logo após a insulação escrotal houve um aumento de espermatozoides sem halo e sem halo e degradado e diminuição de espermatozoides com halo (gráfico 1 e tabela 2), pois os espermatozoides estavam fragmentados através da via N_2O_3 .

Outra observação que se deve ser feita em relação a via N_2O_3 é que a guanina e as demais bases sofrem o processo de pareamento incorreto, e isso pode resultar em mutações transversais (LOEB & PRESTON, 1986; DOMENA *et al.*, 1988; BURNEY *et al.*,1999).

Outra via que o NO pode causar danos ao DNA é via do $ONOO^-$ (peroxinitrito) (BURNEY *et al.*,1999). Nessa via, há reação do NO com O_2^- (íon superóxido) que

forma o ONOO⁻ (BECKMAN *et al.*,1990;BECKMAN *et al.*,1996). Diferente do NO, o qual está envolvido na reação de desaminação do DNA, o ONOO⁻ está envolvido na oxidação do DNA. O ONOO⁻ leva a danos muito complexos ao DNA, devido que o ONOO⁻ ser muito mais reativo que o próprio NO (BURNEY *et al.*,1999).

O ONOO⁻ provoca danos do DNA de diversas maneiras, dentre elas estão modificações no açúcar do DNA, oxidação e nitração da molécula do DNA (BURNEY *et al.*,1999).

O dano causado pelo ONOO⁻ através de dano ao do açúcar do DNA ocorre da seguinte forma: ONOO⁻ reage diretamente com uma porção do açúcar do DNA, e isso leva a uma fragmentação do açúcar e consequentemente uma ruptura na cadeia de DNA. Esse mecanismo de dano ao açúcar do DNA ainda é incerto, no entanto, acredita-se que envolve uma abstração de hidrogênio que leva a formação de um radical açúcar que pode, em seguida, ser submetido a outras reações subsequentes (SZABO & OSSHIMA, 1997).

Outra maneira que o ONOO⁻ pode causar danos ao DNA é através da nitração e oxidação com a desoxiguanosina (BECKMAN,1996). Essas reações resultam, respectivamente, em 8-nitroGua (YERMILOV *et al.*,1995) e 8-oxoGuo (KENNEDY *et al.*,1997).

O dano causado através do 8-nitroGua é que o 8-nitroGua induz a formação de sítios abásicos que podem ser clivados por endonucleases e dessa forma, leva a formação de rupturas de filamentos do DNA. (BURNEY *et al.*,1999).

Já o 8-oxoGuo é um produto final estável oriundo da oxidação do ONOO⁻ com desoxiguanosina e o 8-oxoGuo é um melhor substrato de ataque do ONOO⁻ do que a própria desoxiguanosina. O dano causado pelo 8-oxoGuo ocorre por meio de uma segunda oxidação no 8-oxoGuo que conduz a uma rápida destruição do 8-oxoGuo por meio de um elétron de oxidação fotoquímica e do oxigênio atômico, a partir dessa reação, se formam vários produtos que levam à ruptura de cadeia do DNA(BURNEY *et al.*,1999).

Devido às esses danos que são causados ao DNA também se sugere que o ONOO⁻ pode ser uma explicação da presença de espermatozoides sem halo ou sem halo e degradado logo após a insulação escrotal (tabela 2).

Observa-se que durante o experimento houve uma recuperação da porcentagem dos espermatozoides com halo a partir do dia 77 (gráfico 1). Isso pode ser explicado porque houve uma nova espermatogênese. Em carneiros a espermatogênese juntamente com o trânsito do espermatozóide no epidídimo tem uma duração de aproximadamente de 60 a 70 dias (CUNNINGHAM & KLEIN,2008). A espermatogênese é um conjunto de transformações que passam os elementos da linhagem seminal até se construir um novo espermatozóide (MIES FILHO,1982) Dessa maneira, pode se concluir que a recuperação dos danos que afetaram o DNA demora um pouco mais que um ciclo de espermatogênese.

Também durante esse experimento foi observado que antes que os carneiros fossem submetidos à insulação escrotal, os mesmos tinham relação negativa entre porcentagem de fragmentação de DNA e aos parâmetros relacionados à motilidade (porcentagem de espermatozoides móveis, motilidade total e motilidade individual), ou seja, os parâmetros relacionado a motilidade apresentam valores altos enquanto que valores de fragmentação de DNA eram considerados mais baixos.

No entanto, essa situação muda após a insulação escrotal, mais precisamente entre os dias 23 e 28, em que os critérios relacionados à motilidade chegam a zero. E esse valor zero dos parâmetros relacionados com a motilidade coincide com o período em que há maior porcentagem de espermatozoides fragmentados (maior número de espermatozoides sem ou sem halo e fragmentado-tabela 2).

Contudo, mesmo como mudança de situação após a insulação, ainda se conserva a relação negativa. A situação volta a mudar a partir do dia 42, pois foi notada a recuperação dos critérios relacionados, começam a se recuperar e aumentar os seus valores, mas a porcentagem de espermatozoides com halo ainda é considerada alta.

Entretanto, com o andamento do experimento foi observada a volta de uma relação negativa, pois a partir do dia 77 começa a diminuir a porcentagem de espermatozoides com DNA fragmentado e ainda continuam altas os parâmetros relacionados à motilidade.

Essa mesma relação negativa foi obtida entre valores de motilidade e fragmentação de DNA em estudos com homens da população grega e argeliana (EVGENI *et al.*,2015; BOUSHABA & BELAALOU,2015).

No entanto, existe um estudo em que afirma que não há uma correlação entre os parâmetros seminais (incluindo motilidade) e anormalidades do DNA tanto em homens férteis e inférteis. Entretanto, vale salientar que nesse estudo não foi utilizada a técnica SCD test para analisar a fragmentação do DNA espermático (KHALILI *et al.*, 2006).

Essa discrepância de resultados pode ser originada de diversos fatores, como: variabilidade de métodos usados para análise de integridade de DNA, que determinam diferentes aspectos de danos ao DNA, que nem sempre oferece resultados comparáveis; variabilidade de metodologias e critérios para estudo dos parâmetros seminais, por exemplo, em diferentes trabalhos podem ser aplicados diferentes técnicas para contagem de espermatozoides e para análise de morfologia (utilização de diferentes corantes), isso pode influenciar na exatidão dos resultados; presença de regime de controle de qualidade com objetivo de assegurar precisão dos resultados e ter redução da subjetividade dos dados e a ausência de uniformidade de critério de seleção de grupos da população estudada, pois os resultados oriundos de subgrupos diferentes não podem ser sempre comparáveis (EVGENI *et al.*,2014).

No entanto, os estudos relacionados citados acima realizados em humanos afirmam que as falhas em suas cromatinas espermáticas são falhas permanentes e específicas á cromatina espermática.

Entretanto, no presente trabalho os defeitos da cromatina espermática e os demais outros parâmetros seminais dos carneiros Morada Novos foram induzida e temporária através do método de insulação escrotal.

Isso é comprovado também através do trabalho de Rocha (2013) em que insulou seis carneiros Morada Nova durante oito dias, e logo após a insulação apresentaram altos índices de defeitos na morfologia e chegaram a ter 0% em vigor, motilidade massal e porcentagem de espermatozoides móveis no oitavo dia após a insulação escrotal, porém a situação se altera após o 71º dia de insulação, quando a partir desse ponto começa a recuperação dos parâmetros seminais dos carneiros.

6 CONCLUSÃO

Através dos experimentos de insulação escrotal se pode concluir que a elevação da temperatura testicular provoca fragmentação do DNA espermático. No entanto, o dano da fragmentação espermática é dano reversível e que com a duração de dois ciclos espermáticos (120 dias) para o retorno da integridade do DNA espermático.

Outra conclusão é que se sugere que o NO é um fator importante para o processo de fragmentação do DNA.

Esse trabalho abre outros questionamentos a serem resolvidos futuramente, dentre os quais são: Quanto tempo é necessário para que ocorra mutação nas bases do DNA? Devido à fragmentação do DNA, como fica a estrutura das protaminas e sua ligação com o DNA?

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABSALAN, F. *et al.* Value of sperm chromatin dispersion test in couples with unexplained recurrent abortion. *J. Assist. Reprod. Genet.*,v. 29,n.1,p. 11-14, Jan 2012.

AGARWALL,A.; ALLAMANENI,S.S.R. Sperm DNA damage assessment: a test whose time has come. *Fert. Steril.*,v.84,n.4,p.850-853, Oct 2005.

ALABDULLA,A.N;LEE,L.J.Apoptosis of retrogradely degenerating neurons occurs in association with the accumulation of perikaryalmitochondria and oxidative damage to the nucleus. *Am. J. Pathol.*,v.153,n.2,p.447-456,Aug 1998.

AITKEN,R.J. *et al.* Biological and clinical significance of DNA damage in the male germ line. *Int. J. Androl.*,v.32,n.1,p. 46-56, Feb 2009.

ARAVIDAN, G.R. *et al.* Susceptibility of human sperm to in situ DNA desnaturation is strongly correlated with DNA strand breaks identified by single-cell electrophoresis. *Experimental Cell Research*,v. 236,n.1, p.231-237, Oct 1997.

BALL,B.A; BAUMBER,J. Generation of reactive oxygen species by equine spermatozoa. *Am. J. Vet. Res.*, v. 62, n. 4, p.508-515, Apr 2001.

BALHORN R. A model for structure of chromatinin mammalian sperm.*J Cell Biol*, v.93,n.2,p.298-305, May 1982.

BARBOSA,K.B.F. *et al.* Oxidative stress: concept, implications and modulating factors. *Rev. Nutr.*,v.23,n.4,p.629-643,Jul/Ago 2010.

BECKMAN,J.S. *et al.* Apparent hydroxl radical production by peroxinitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. *Proc. Natl. Acad. Sci.*,n.87,v.4,p.1620-1624,Feb 1990.

BECKMAN,J.S. Oxidative damage and tyrosine nitration by peroxynitrite. *Chem. Res. Toxicol.*,n.9,v.5,p.836-844,Jul-Aug 1996.

BHARDWAJ,A. *et al.* Status of vitamin E and reduced glutathione in semen of oligozoospermic and azoospermic patients. *Asian J Androl.*,v.2,n.3,p.225-228, Sep 2000.

BOUSHABA,S.;BELAALLOUI. Sperm DNA fragmentation and standard semen parameters in algerian infertile male partners. *World J. Mens Health*, v.33, n.1,p.1-7, Apr 2015.

BRAHEM, S. *et al.* Semen parameters and sperm DNA fragmentation as causes of recurrent pregnancy loss. *Urology*, v.78, n.4, p.792-798, Oct 2011.

BRITO,L.F.C. *et al.* Effects of scrotal insulation on sperm production, sêmen quality, and testicular echotexture in *Bos indicus* and *Bos indicus* x *Bos taurus* bulls. *Anim. Reprod. Sci.*, v.79,n.1-2,p.1-15,Nov 2003.

BURNEY,S. *et al.* The chemistry of DNA damage from nitric oxide and peroxy nitrite. *Mutat. Res.*, v.424,n.1-2,p.37-49, Mar 1999.

CARRELL, D.T. *et al.* Sperm fragmentation is increased in couples with unexplained recurrent pregnancy loss. *Arch Androl.*,v. 49,n. 1, p.49-55, Jan-Feb 2003.

CHOHAN,K.R. *et al.* Comparison of Chromatin Assays for DNA Fragmentation Evaluation in Human Sperm. *J. Androl.*,v.27,n.1,p.53-59,Jan-Feb 2006.

COLÉGIO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL (CBRA). Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal. Belo Horizonte: CBRA, 1998.

COLLINS,R.A. The comet assay for DNA damage and repair principles,applications, and limitations. *Mol. Biotechnol.*,v.26,n.3,p.249-61, Mar 2004.

COOK, R. B.; COULTER, G. H.; KASTELIC, J. P. The testicular vascular cone, scrotal thermoregulation, and their relationship to sperm production and seminal quality in beef bulls. *Theriogenology*, v.41, n.3 p.653-671, Feb 1994

COOKE, M.S. *et al.* Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation and disease. *FASEB J.*, v. 17, n. 10, p. 1195-1214, Jul 2003.

COSTA, F.Q. Degeneração térmica testicular-ocorrência, análise e solução para garantir eficiência reprodutiva de touros. 2007. 63f. Monografia (Especialização *latu sensu*)-Universidade Castelo Branco, Rio de Janeiro, 2007.

COUROT, M.; HOCHEREAU-DE-REVIERS, M. T.; ORTAVANT, R. Spermatogenesis. In: JOHNSON, A. D.; GOMES, W. R.; VANDEMARK, N. L. (Ed.). *The testis*. New York: Academic Press, 1970. v. 1, cap. 6, p. 339-432

CUNNINGHAM, J.G.; KLEIN, B.G. *Tratado de fisiologia veterinária*. 4 ed., Rio de Janeiro: Elsevier, 2008, 720 p.

DOMENA, J.D. *et al.* Purification and properties of mitochondrial uracil-DNA glycosylase from rat liver. *Biochem.*, v. 27, n. 18, p. 6742-6751, Sep 1988.

DOMINGOS, T.C.S.; SALOMÃO, M.C. Meios de diagnóstico das principais afecções testiculares em cães: revisão de literatura. *Rev. Bras. Anim.*, v. 35, n. 4, p. 393-399, Out/Dez 2011.

EVENSON, D.P. *et al.* Utility of the sperm chromatin structure assay (SCSA) as a diagnostic and prognostic tool in the human fertility clinic. *Hum. Reprod.*, v. 14, n. 4, p. 1039-1049, Apr 1999.

EVENSON, D.P. *et al.* Sperm chromatin structure assay: its clinical use for detecting sperm DNA fragmentation in male infertility and comparisons with other techniques. *J. Androl.*, v. 23, n. 1, p. 25-43, Jan-Feb 2002.

EVENSON, D.P.; WIXON, R. Environmental toxicants cause sperm DNA fragmentation as detected by the Sperm Chromatin Structure Assay (SCSA®). *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, v. 207, n. 2, p. 532-537, Sept 2005.

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

EVGENI, E. *et al.* Conventional semen parameters and DNA fragmentation in relation to fertility status in a Greek population. *Eur. J. Obst. Gynecol. Reprod. Biol.*, v. 188, p. 17-23, May 2015.

EVGENIE,E. Human Sperm DNA fragmentation and its correlation with conventional semen parameters. J. Reprod.Infert.,n.15,v.1,p.2-14,2014.

FELDMAN,P.L.;GRIFFITH,O.W.;STUEHR,D.J. The surprising life of nitric oxide. C&EM.,v.71,n.51,p.26-38,Dec 1993.

FERNÁNDEZ,J.L. *et al.* The Sperm Chromatin Dispersion Test: A Simple Method for the determination of Sperm DNA Fragmentation. J. Androl., v.24, n.1,p.59-66, Jan-Feb 2003.

FERNÁNDEZ,J.L. *et al.* Simple determination of human sperm DNA fragmentation with an improved sperm chromatin dispersion test. Fertil. Steril., v. 84, n.4, p.833-842, Oct 2005.

FILHO, M. A. Reprodução dos animais. 6ª ed. Porto Alegre: Sulina, 1987. 314 p.

FRANÇA, L. R.; RUSSELL, L. D. The testis of domestic animals. In:Regadera, J.; Martinez-Garcia (ed.). Male reproduction:a multidisciplinary overview. Churchill Livingstone: Madrid, 1998. p. 197-219

FUENTES-MASCORRO G., Serrano H, Rosado, A. Sperm chromatin. Arch Androl.,v.45,n.3,p.215-225, Nov-Dec 2000.

GADELLA,B.M. *et al.* Capacitation and the acrosome reaction in equine sperm. Ani. Reprod. Sci.,v.68,n.3-4,p.249-265,Dec 2001.

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

GHEDAN,M.H. *et al.* Sperm DNA fragmentation in saudi infertile men with normal standard semen parameters. Andrology,v.4,n.1,p.1-4, Jan 2015.

GRANADOS,L.B.C; DIAS,A.J.B & SALES, M.P.2006.Aspectos gerais da reprodução de caprinos e ovinos.Campo dos Goytacazes: Projeto PROEX/UENF, 2006.54p.

GUO,C.X. *et al.* Cloning of novel temperature-related expressed sequence tags in rat testis during spermatogenesis. *Biochem. Biophys. Res. Com.*,v.258,n.2,p.401-406, May 1999.

HAFEZ,B.;HAFEZ, E.S.E. *Reprodução Animal*. 7ªed. Barueri: Manole,2004. 513p.

HAINES,G. *et al.* DNA damage in human and mouse spermatozoa after in vitro-irradiation assessed by the COMET assay. *Adv. Exp. Med. Biol.*,v.444,p.79-91,1998.

HIBBS,J.B. *et al.* Nitric oxide: a cytotoxic activated macrophage effector molecule. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*,v.158,n.2,p.87-94, Jan 1989.

HUD,N.V *et al.* Identification of the elemental packing unit of DNA in mammalian sperm cells by atomic force microscopy. *Biochem Biophys Res Commun*, v.193,n.2,p.1347-1354, Jun 1993.

HUGHES,C. *et al.* A comparison of baseline and induced DNA damage in human spermatozoa from fertile and infertile men, using a modified comet assay. *Mol. Hum. Reprod.*v.2,n.8,p.613-619,Aug 1996.

HULET,C.V.;VOIGTLANDER,H.P.; POPE, A.L. The nature of early season infertility in sheep. *J. Anim. Sci.*,v.15,n.3, p.607-616,1956.

IKEDA,M. *et al.* Role of radical oxygen species in rat testicular germ cells apoptosis induced by heat stress. *Biol. Reprod.* 1999,v.61,n.2,p.393-399, Aug 1999.

JOHNSON, L. *Spermatogenesis*. In: *Reproduction in Domestic Animals*. New York: Academic Press. 1991. p 173-219.

KENNEDY,L.J. *et al.* Quantitation of 8-oxoguanine and strand breaks produced four oxidizing agents. *Chem. Res. Toxicol.*,n.10,v.4,p.386-392, Apr 1997.

KHALILI,M.A. *et al.* Sperm Nuclear DNA in ejaculates of fertile and infertile men: correlation with semen parameters. *Urol.J. (Tehran)*,v.3,n.3,p.154-159,2006

KUMAGAI,J.*et al.* Germ cell- specific shock protein 105 binds to p53 in a temperature sensitive manner in rat testis. *Eur.J.Biochem.*,v.267,n.10,p.3073-3078, May 2000.

LEWIS,S.E; SIMON,L. Clinical implications of sperm DNA damage. *Hum. Fertil. (Camb.)*,v.13,n.4,p.201-207,Dec 2010.

LEWIS,S.E.M. *et al.* The impact of DNA damage in assisted conception and beyond: recent advances in diagnosis and treatment. *Reprod. Biomed. Online*, v.27,n.4,p.325-337, Oct 2013.

LOEB,L.A.;PRESTON,B.D. Mutagenesis by apurinic/apyrimidic sites. *Annu.Rev. Genet.*,v.20,p.201-230,1986.

LINDAHL,T.; ANDERSSON,A. Rate of chain breakage at apurinic site in double-stranded deoxyribonucleic acid. *Biochem.*,n.11,v.19,p.3618-3623, Sep 1972.

MARLLETA,M.A. *et al.* Macrophage oxidation of L-arginine to nitrite and nitrate: nitric oxide is an intermediate. *Biochem.*,v.27,n.24,p.8706-8711, Nov 1988.

MARLLETA,M.A. Mammalian synthesis of nitrite,nitrate,nitric oxide, and N-nitrosating agents. *Chem. Res. Toxicol.*,n.1,v.5,p.249-257,Sep-Oct 1988.

MAZRIMAS,J.A, *et al.* A corrected primary sequences for bull protamine. *Biochem. Biophys. Acta.*,v.872,v.1-2, July 1986.

MONCADA,S.;PALMER,R.M.J.;HIGGS,E.A. Nitric oxide: physiology,pathophysiology, and pharmacology. *Pharma. Rev.*,n.43,v.2, p.109-142, Jun 1991.

MUCCIOLO,R.G; BARNABE,R.C; BARNABE,V.H. Variações no quadro espermático de carneiros submetidos a degeneração testicular experimental. *Rev. Fac. Med. Vet. Zootec.*,v.11,p.155-177, 1974.

NELSON,D.L; COX,M.M.. *Princípios de Bioquímica de Lehninger*. 5^a ed.Porto Alegre: Artmed, 2011. 1274p.

NICHI,M. *et al.* Seasonal variation in semen quality in *Bos indicus* and *Bos taurus* bulls raised under tropical conditions. *Theriogenology*,v.66,n.4,p.822-826, Sep 2006.

NIJS,M. *et al.* Chromomycin A3 staining, sperm chromatin structure assay and hyaluronic acid binding assay as predictors for assisted reproductive outcome. *Reprod. Biomed. Online*,v.19,n.5,p. 671-684, Nov 2009.

PAUL,C.;MELTON,D.W.;SAUNDERS,P.T.K. Do heat stress and deficits in DNA repair pathways have a negative impact on male fertility ? *Mol. Hum. Reprod.*,n.14,v.1,p.1-8, Jan 2008.

PAUL,C. *et al.* A single, mild, transient scrotal heat stress causes DNA damage, subfertility and impairs formation of blastocysts in mice. *Reproduction*, v.136,n.1,p.73-84, Jul 2008.

PAUL,C., TENG,S.,SAUNDERS,P.T.K. A single, mild, transient scrotal heat stress causes DNA damage, subfertility and impairs formation of blastocysts in mice. *Reproduction*,v.136,n.1,p.73-84, Jul 2008.

PAUL.,M.;TENG,S.;SAUNDERS,P.T.K. A single, mild, transient scrotal heat stress causes hypoxia and oxidative stress in mouse testis, which causes germ cell death. *Biology of Reproduction*,v.80,n.5,p.913-919,May 2009

PIERCE,B.A. *Genética um enfoque conceitual*. 3^a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan,2011,774p.

RAHMAN,M.B. *et al.* Scrotal insulation its relationship to abnormal morphology, chromatin protamination and nuclear shape of spermatozoa in Holstein-Friesian and Belgian Blue bulls. *Theriogenology*, n.76, v.7,p.1246-1257, Oct 2011.

ROCHA, D. R. *Biometria testicular, parâmetros seminais e proteoma do plasma seminal de carneiros Morada Nova, variedade branca, submetidos à insulação escrotal*. 2013. 144f. Tese (Doutorado)- Departamento de Zootecnia, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza,2013.

RODRIGUES,A.L.R. *Avaliação do testículo e da cauda do epidídimo de carneiros na pré-puberdade, na maturidade sexual no criptorquidismo e na insulação escrotal: concentrações de testosterona plasmática e tecidual, histamina, fator de necrose tumoral-alfa e óxido nítrico*. 2004. 122p. Tese (Doutorado). Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia,Universidade Estadual Paulista, Botucatu,2004.

RUSSEL, L.D. Sertoli-germ cell interrelations:a review. *Gamete Res.*, v. 3,n.2, p. 179-202, 1980.

RUSSELL, L. D.; GRISWOLD, M. D. (Ed) *The Sertoli cell*. Florida: Cache River Press, 1993. p. 1-37.

SAILER B.L. , JOST, L.K., EVENSON, D.P. Mammalian sperm DNA susceptibility to in situ denaturation associated with the presence of DNA strand breaks as measured by the terminal deoxynucleotidyl transferase assay. *J. Androl.*,v.16,n.1,p.80-87, Jan-Feb 1995.

SANTOS,D.O.;SIMPLÍCIO,A.A. Parâmetros escroto-testiculares e de sêmen em caprinos adultos submetidos à insulação escrotal. *Pesq.Agrop.Bras.*,v.35,n.9,p.1835-1841, Set 2000.

SERGERIE,M. *et al.* 2005. Sperm DNA fragmentation: threshold value in male fertility . *Hum. Reprod.*,v.20,n.12,p. 3446-3451, Dec 2005.

SETCHELL,B.P. The effects of heat on the testes of mammals. *Anim. Reprod.*, v.3,n.2,p.81-91, Apr/Jun 2006.

SHARMA, R.K. *et al.* TUNNEL as test for sperm DNA damage in the evaluation of male infertility. *Urology*,v. 76,n.6,p. 1380-1386, Dec 2010.

SIMON,L. *et al.* Sperm damage measured by the alkaline Comet assay as an independent predictor of male infertility and in vitro fertilization success. *Fertil. Steril.*,v.97,n.6,p.652-657, Jun 2012.

SINGH,N.P.; STEPHENS,R.E. X-ray induced double-strand breaks in human sperm. *Mutagenesis*, v.13,n.1,p.75-79, Jan 1998.

SPRING-MILLS,E.; HAFEZ,E.S.E. *Accessory glands of the male reproductive tract*. Ann Arbor: Ann Arbor Science Pubs, 1979 .p 139.

SPRING-MILLS,E.; HAFEZ,E.S.E. *Male accessory organs*. New York: Elsevier, 1980.

SWENSON.M.J; REECE,W.O. *Dukes Fisiologia dos Animais Domésticos.*, In: _____Cap.38, 11 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1996. Cap.38, p.623-625.

SZABÓ,C; OHSHIMA,H. DNA damage induced by peroxynitrite: subsequent biological effects. *Nitric Oxide: Biology and Chemistry*,v.1,n.5,p.373-385, Oct 1997.

THUNDATHIL, J.C. *et al.* The effects testicular temperature on testis-specific isoform of Na⁺/K⁺-ATPase in sperm and its role in spermatogenesis and sperm function. *Reprod. Dom. Anim.*, v.47 (Suppl.4), p.170-177, Aug 2012.

TROIANO, L. *et al.* Apoptosis and spermatogenesis: evidence from an in vivo model of testosterone withdrawal in the adult rat. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, v.202, n.3, p.1315-1321, Aug 1994.

URBANO, M. *et al.* Effect of cryopreservation and single layer centrifugation on canine sperm DNA fragmentation assessed by the sperm chromatin dispersion test. *Anim. Reprod. Sci.*, v.143, n.1-4, p.118-125, Dec 2013.

.VALDEOLIVAS, S.M.M. Análise morfofuncional testicular, com ênfase na avaliação do processo espermatogênico normal e anormal. São Paulo: UNIFESP, 2003.

VASQUEZ, F.R.; ECHEVERRI, D.V. Espermograma y su utilidad clínica. *Rev. Científica Salud Uninorte*, v.23, n.º2, Sep 2007.

VELEZ DE LA CALLE, J.F. *et al.* Sperm deoxyribonucleic acid fragmentation as assessed by the sperm chromatin dispersion test in assisted reproductive technology programs: results of large prospective multicenter study. *Fertil. Steril.*, v.90, n.5, p.1792-1799, Nov 2008.

VENKATESH, S. *et al.* Clinical significance of sperm DNA damage threshold value in the assessment of male infertility. *Reprod. Sci.*, v.18, n.10, p.1005-1013, Oct 2011.

VOGLER, C.J. *et al.* Effects of scrotal insulation on viability characteristics of cryopreservation bovine semen. *J. Dairy Sci.*, v.74, n.11, p.3827-3835, Nov 1991.

YERMILOV, V. *et al.* Formation of 8-nitroguanine by the reaction of guanine with peroxy nitrite in vitro. *Carcinogenesis*, v.16, n.9, p.2045-2050, Sep 1995.

XAVIER, G.C. *et al.* Suplementação dietética com Selênio e Vitamina E nos parâmetros seminais de caprinos induzidos à insulação escrotal. *Acta Scien. Anim. Scien.*, v.30, n.1, p.103-111, 2008.

ZINI,A. Are sperm chromatin and DNA defects relevant in the clinic ? Syst. Biol. Reprod. Med.,v.57,n.1-2,p.78-85, Feb 2011.