UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA

ELEVAÇÃO DA TEMPERATURA TESTICULAR E SUA INFLUÊNCIA SOBRE A COMPACTAÇÃO DA CROMATINA E MORFOMETRIA ESPERMÁTICA EM COELHOS (*Oryctolagus cuniculus*)

Cláudio Yudi Kanayama
Médico Veterinário

UBERLÂNDIA - MINAS GERAIS- BRASIL
2010

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA

ELEVAÇÃO DA TEMPERATURA TESTICULAR E SUA INFLUÊNCIA SOBRE A COMPACTAÇÃO DA CROMATINA E MORFOMETRIA ESPERMÁTICA EM COELHOS (*Oryctolagus cuniculus*)

Cláudio Yudi Kanayama

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Emílio Beletti

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina Veterinária – UFU, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Ciências Veterinárias (Produção Animal).

UBERLÂNDIA – MINAS GERAIS – BRASIL
Março de 2010

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

K16e Cláudio Yudi Kanayama de, 1976-
Elevação da temperatura testicular e sua influência sobre a compactação da cromatina e morfometria espermática em coelhos (*Oryctolagus cuniculus*) [manuscrito] / Cláudio Yudi Kanayama. – 2010.
75 f. : il.

Orientador: Marcelo Emílio Beletti
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias.
Inclui bibliografia.
1. Coelho - Reprodução- Teses. 2. Testículos - Teses. I. Beletti, Marcelo Emílio. II. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias. III. Título.

CDU: 636.92.082.4

Elaborado pelo Sistema de Bibliotecas da UFU / Setor de Catalogação e Classificação

A minha esposa Marly e minhas filhas Laura e Júlia pela paciência, dedicação, carinho e compreensão.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Marcelo Emílio Beletti, meu orientador que nunca deixou de acreditar, apoiar e confiar em mim. Hoje, sou docente graças ao seu reconhecimento e orientação. Um mestre que serve de exemplo para os futuros egressos no magistério superior.

À Universidade de Uberaba (UNIUBE), que forneceu espaço para a execução da pesquisa, bem como os colaboradores Alexandre, Carlos Antônio, Carlos Humberto, Daniel, Gabriel, Jean, Leônidas e Luiz Fernando, os quais auxiliaram na coordenação e manejo da cunicultura.

Ao Prof. Dr. Lício Velloso, diretor (1997-2007) do curso de Medicina Veterinária da UNIUBE, a Profª. Inara Barbosa Pena Elias, Pró-Reitoria de Ensino Superior (PROES) e ao Prof. Décio Bragança, que acreditaram e estimularam no meu sucesso.

Ao discente Guilherme Dias Araújo, meu monitor da disciplina de Citologia, Histologia e Embriologia Geral, que me ajudou no manejo dos coelhos.

Aos professores, secretárias e Assistente Pedagógica do Curso de Medicina Veterinária, professores e secretárias do PIME, PIAC e PAE, que acreditaram na minha caminhada.

A todos os colegas do Mestrado, em especial a Profª Francynny e Prof. Rodrigo Supranzetti, pelos ótimos encontros do Grupo de Estudo de Estatística.

A minha mãe, Idalina Stabile, e meu pai Yoku Kanayama, que está no Japão trabalhando, e aos amigos Lídia, Galvão, Helena e Luís, que estão torcendo por mais uma conquista minha.

PERANTE OS ANIMAIS

Abster-se de perseguir e aprisionar, maltratar ou sacrificar animais domésticos ou selvagens, aves e peixes, a título de recreação, em excursões periódicas aos campos, lagos e rios, ou em competições obstinadas e sanguinolentas do desportismo.

Há divertimentos que são verdadeiros delitos sob disfarce.

No contacto com os animais a que devote estima, governar os impulsos de proteção e carinho, a fim de não cair em excessos obcecantes, a pretexto de amá-los. Toda paixão cega a alma.

Esquivar-se de qualquer tirania sobre a vida animal, não agindo com exigências descabidas para a satisfação de caprichos alimentares nem com requintes condenáveis em pesquisas laboratoriais, restringindo-se tão-somente às necessidades naturais da vida e aos impositivos justos do bem.

O uso edifica, o abuso destrói.

Opor-se ao trabalho excessivo dos animais, sem lhes administrar mais ampla assistência.

A gratidão também expressa justiça.

No socorro aos animais doentes, usar os recursos terapêuticos possíveis, sem desprezar mesmo aqueles de natureza mediúnica que aplique a seu próprio favor.

A luz do bem deve fulgir em todos os planos.

Apoiar, quanto possível, os movimentos e as organizações de proteção aos animais, através de atos de generosidade cristã e humana compreensão.

Os seres da retaguarda evolutiva alinham-se conosco em posição de necessidade
perante a lei.

(LUIZ, 1998)

SUMÁRIO

Página

1 INTRODUÇÃO....1
2 REVISÃO DA LITERATURA....3
3 MATERIAL E MÉTODOS....11
4 RESULTADOS....17
4.1 Concentração, motilidade e vigor dos espermatozoides.... 17
4.2 Análise computacional da compactação da cromatina....20
4.3 Análise morfométrica computacional da cabeça da cabeça dos espermatozoides.... 24
5 DISCUSSÃO....34
5.1 Concentração, vigor e motilidade dos espermatozoides.... 34
5.2 Análise computacional da Compactação da cromatina.... 36
5.3 Análise morfométrica computacional da cabeça dos espermatozoides.... 39
6 CONCLUSÕES....43
REFERÊNCIAS....44
ANEXO A....56
ANEXO B....59

LISTA DE TABELAS

página

Tabela 1 - Variação da média aritmética e desvio padrão da porcentagem da concentração dos espermatozoides (x 10^6 espermatozoides/ml) 17

Tabela 2 - Variação da média aritmética e desvio padrão da porcentagem de espermatozoides móveis 18

Tabela 3 - Variação da média aritmética e desvio padrão da porcentagem do vigor dos espermatozoides 19

Tabela 4 - Variação da média aritmética e desvio padrão da diferença percentual da média dos valores de "pixel" entre a cabeça do espermatozoide avaliado e as cabeças padrões (Dif%). 21

Tabela 5 - Variação da média aritmética e desvio padrão do coeficiente de variação dos valores de pixel das cabeças dos espermatozoides. 22

Tabela 6 - Variação da média aritmética e desvio padrão da porcentagem de espermatozoides com cromatina anômala. 23

Tabela 7 - Variação da média e desvio padrão da área, perímetro, largura, comprimento, razão largura-comprimento da e elipsidade das cabeças dos espermatozóides. 25

Tabela 8 - Variação da média e desvio padrão do fator forma, harmônica de Fourier zero, 1 e 2, simetria lateral e simetria ântero posterior das cabeças dos espermatozoides. 26

Tabela 9 - Coeficiente de correlação entre as variáveis avaliadas na análise computacional da compactação da cromatina dos espermatozoides do grupo experimental. 27

LISTA DE FIGURAS

página

Figura 1 - Resumo ilustrativo dos períodos pré-experimento e experimental e dos procedimentos experimentais adotados. 11

Figura 2 - Desenho esquemático representando a localização do escroto. 15

Figura 3 - Desenho esquemático representando o criptorquidismo experimental 15

Figura 4 - Figura 5 - Fotografias representativas de coelho durante a realização do criptorquidismo experimental 16

Figura 6 - Diagrama representativo com base nos valores da média da concentração dos espermatozoides (x 10^6 espermatozoides/ml) (N=30) 18

Figura 7 - Diagrama representativo com base nos valores da média da motilidade dos espermatozoides (N=30). 19

Figura 8 - Diagrama representativo com base nos valores da média do vigor dos espermatozoides (N=30). 20

Figura 9 - Diagrama representativo com base nos valores da média da Dif% dos espermatozoides (N=30). 21

Figura 10 - Diagrama representativo com base nos valores da média do coeficiente de variação dos espermatozoides (N=30). 22

Figura 11 - Diagrama representativo com base nos valores da média da porcentagem de espermatozoides com cromatina anômala (N=30). 23

Figura 12 - Fotografias do esfregaço de sêmen de coelho submetido ao método da metacromasia induzida (azul de toluidina, pH 4), mostrando espermatozoides com compactação da cromatina anômalas. 24

Figura 13 - Diagrama representativo com base nos valores da média da área (µm2) dos espermatozoides (N=30) 27

Figura 14 - Diagrama representativo com base nos valores da média do perímetro (µm) dos espermatozoides (N=30). 28

Figura 15 - Diagrama representativo com base nos valores da média da largura (µm) dos espermatozoides (N=30) 28

Figura 16 - Diagrama representativo com base nos valores da média do comprimento (µm) dos espermatozoides (N=30) 29

Figura 17 - Diagrama representativo com base nos valores da média da razão largura/comprimento dos espermatozoides (N=30) 29

Figura 18 - Diagrama representativo com base nos valores da média da elipsidade dos espermatozoides (N=30) 30

Figura 19 - Diagrama representativo com base nos valores da média do fator forma dos espermatozoides (N=30) 30

Figura 20 - Diagrama representativo com base nos valores da média do descritor Fourier F0 dos espermatozoides (N=30)..... 31

Figura 21 - Diagrama representativo com base nos valores da média do descritor Fourier F1 dos espermatozoides (N=30)..... 31

Figura 22 - Diagrama representativo com base nos valores da média do descritor Fourier F2 dos espermatozoides (N=30).....32

Figura 23 - Diagrama representativo com base nos valores da média da simetria lateral dos espermatozoides (N=30).....32

Figura 24 - Diagrama representativo com base nos valores da média da simetria ântero posterior dos espermatozoides (N=30).....33

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ASMA – Automated Sperm Morphometry Analysis

Comp. – Comprimento

CEUA – Comitê de Ética na Utilização de Animais

Cr. An. – Cromatina anômala

CV – Coeficiente de variação

DNA – Ácido desoxirribonucléico

Dif% – Diferença entre o valor de referência e a média dos valores em “pixel”

E – Elipsidade

EXPERIME. – Experimental

F0– Harmônicas de Fourier zero

F1– Harmônicas de Fourier um

F2 – Harmônicas de Fourier dois

F.F. – Fator de forma

FIV – Fecundação *in vitro*

Larg. – Largura

L/C – Razão largura:comprimento

Per. – Perímetro

pH – Concentração de íons de hidrogênio

Pixel – Picture element

ROS – Reactive Oxigen Species

SCSA – Sperm chromatin structure assay

Sim. A-P – Simetria ântero posterior

Sim. Lat. – Simetria lateral

LISTA DE SÍMBOLOS

10^6 – milhões

% – por cento

$\leq$ – menor ou igual

= – igual

- – menos

cm – centímetros

ºC – graus Celsius

HCl – ácido clorídrico

mg/Kg – miligrama/quilograma

ml – milímetro

mM – milimol

N – normal

S – desvio padrão

v/v – volume/volume

µl - microlitro

µm – micrômetro

x – vezes

$\overline{X}$ – média

LISTA DE ANEXOS

ANEXO A - Montagem da vagina artificial para coelhos
ANEXO B - Parecer do Comitê de Ética na Utilização de Animais (CEUA)

ELEVAÇÃO DA TEMPERATURA TESTICULAR E SUA INFLUÊNCIA SOBRE A COMPACTAÇÃO DA CROMATINA E MORFOMETRIA ESPERMÁTICA EM COELHOS (*Oryctolagus cuniculus*)

RESUMO – Uma abordagem mais moderna sobre a elevação da temperatura foi realizada, visando detectar alterações na compactação e morfometria da cabeça do espermatozoide pela análise computacional. O objetivo do trabalho foi avaliar a compactação da cromatina e a morfometria espermática após a elevação da temperatura testicular, por meio de criptorquidismo experimental, em coelhos. Foram utilizados 30 coelhos da raça Nova Zelândia, brancos, adultos, situados no coelhário da Universidade de Uberaba, Uberaba, MG, Brasil. Os coelhos foram separados em dois grupos de 15. Ambos os grupos foram anestesiados, mas somente um deles sofreu intervenção cirúrgica, o criptorquidismo experimental. Foram coletadas amostras de sêmen durante 69 dias. Esfregaços de sêmen de todos os coelhos foram corados com azul de toluidina e, posteriormente, analisados digitalmente por meio de microcomputador para avaliar a compactação de cromatina e morfometria. A cromatina foi avaliada quanto à intensidade de compactação (Dif%), homogeneidade pelo coeficiente de variação (CV) e cromatina anômala (Cr. An.). Na análise morfométrica foram avaliados: área, perímetro (Per.), largura (Larg.), comprimento (Comp.), razão largura:comprimento (L/C), elipsidade (E), fator forma (FF), simetria lateral (Sim. Lat.), simetria ântero posterior (Sim. A-P) e descritores Fourier com amplitude de 0 a 2. A elevação da temperatura testicular influenciou negativamente a concentração, motilidade, vigor, torna-se anômala a estrutura da cromatina e a cabeça do espermatozoide tende a diminuir.

Palavras-chave: espermatozoide, cromatina, morfometria, coelho, análise computacional.

TESTICULAR TEMPERATURE RISE AND ITS INFLUENCE ON COMPACTING CHROMATIN AND SPERM MORPHOMETRY IN RABBITS (*Oryctolagus cuniculus*)

ABSTRACT – One performed a more modern approach on such heat stress to find changes out to compact morphometry in spermatozoon head by computational analysis. One aimed in this work to assess how to compact chromatin and sperm morphometry after have risen testicular temperature, by using experimental cryptorchidism in rabbits (Oryctolagus cuniculus), as well as used 30 rabbits: wild rabbit, white, adult, located in the rabbit keeping of University of Uberaba, Uberaba (city), MG (State of Minas Gerais), Brazil. One classified the rabbits into two groups of 15. Both groups were anesthetised, but only the experimental cryptorchidism one underwent a surgical operation. One gathered semen samples within a total of 69 days. One both dyed semen smear of all rabbits by using a toluidine blue dye and afterwards analysed it with a digital microcomputer to assess compacting chromatin and sperm morphometry. Chromatin varied regarding compact intensity (Diff%), homogeneity by coefficient of variation (CV) and aberrant chromatin (AbChr). By analysing morphometrically one assessed: area, perimeter (Perim.), width (w.), length (l.), ratio width:length (w./l.), ellipsity (E.), form factor (FF), lateral symmetry (LatSym), antero-posterior symmetry (A-PSym), and Fourier descriptors with amplitude from 0 to 2. Testicular temperature rise swayed the concentration, motility, and vigour adversely. Chromatin structure becomes aberrant when affected by testicular heat stress. And spermatozoon head tends to lessen.

Keywords: spermatozoon, cryptorchidism, morphometry, computational analysis.

1. INTRODUÇÃO

A elevação da temperatura testicular prejudica a função testicular acarretando processos degenerativos no parênquima deste órgão, sendo possível avaliação por meio do espermograma (MORGETALER; STAHL; YIN, 1999; SETCHELL, 1998).

O espermograma é o método tradicional utilizado na medicina veterinária para avaliar a fertilidade do macho. A concentração, vigor, motilidade e morfologia são características espermáticas rotineiramente avaliadas. Entretanto essas características não permitem conclusões exatas da funcionalidade espermática, haja visto que a estrutura interna espermática como a cromatina, composta de DNA e proteínas associadas, não podem ser analisadas pelo espermograma (BELETTI; COSTA; VIANA, 2004).

A modernização de aparelhos e equipamentos concomitantemente ao desenvolvimento de novas técnicas de análise, que utilizam imagens digitais e análises computacionais, proporciona uma interpretação mais moderna do assunto. Deste modo, é possível avaliar o efeito da elevação da temperatura testicular sobre a morfologia dos espermatozoides, cuja viabilidade são fundamentais para o desenvolvimento normal da fecundação e processos decorrentes (BELETTI; COSTA, 2003).

A utilização de métodos computacionais significa uma nova era na biologia celular, sendo muito promissora para relevar novos conceitos, quebrar paradigmas sobre a organização e função das células que não podem ser extraídas pelos métodos tradicionais de estudo (MELLMAN; MISTELI, 2003; EILS, ATHALE, 2003).

Trabalhos que analisam imagens obtidas por meio de microcomputador foram realizados para padronizar a técnica e obter imagens da morfologia normal (SCHRADER; TURNER; SIMON, 1990; DAVIS et al., 1992; MACLEOD; IRVINE, 1995) e as alterações mais comuns dos espermatozoides, em especial as alterações na cromatina. Todavia, não há estudos esclarecendo precisamente os efeitos da elevação da temperatura na morfologia da cabeça do espermatozoide e as alterações cromatínicas utilizando análises computacionais.

Ao aliar o espermograma com recentes metodologias de avaliação computacional espermática, e que o aumento da temperatura testicular afeta a espermatogênese e tal fato não foi avaliado por métodos computacionais modernos e mais precisos, permite maior acurácia na seleção de machos.

Dessa forma, os objetivo do presente trabalho avaliar a influência da elevação transitória da temperatura testicular, por meio do criptorquidismo experimental, sobre a concentração, motilidade, vigor, compactação da cromatina e morfometria espermática em coelhos (*Oryctolagus cuniculus*).

2. REVISÃO DA LITERATURA

A espermatogênese é processo complexo celular em que há transformação de espermatogônias para a formação de espermatócitos e espermatídes, que posteriormente diferenciam em espermatozoides (GRIFFIN, 1988; RUSSELL et al. 1990; RUSSELL; FRANÇA, 1995). Todo o processo de divisão, meiose e diferenciação celular está sincronizado com as mudanças morfológicas e a expressão gênica das células de Leydig e Sertoli (ANWAY, 2003).

As células espermáticas estão organizadas em estágios ordenados, marcado por evolução progressiva e sincronizada das células espermatogênicas em diferenciação do compartimento basal para o adluminal do túbulo seminífero (RUSSELL et al. 1990). Este ciclo de estágios é controlado rigidamente, existindo estágios precisos e relativamente constantes para cada espécie, não sendo alterado por fatores naturais, idade ou experimentais (RUSSELL et al, 1983). Pelo método da morfologia tubular, que consiste observação de figuras de divisões meióticas e na localização das células das células espermatogênicas, foram identificados oito estágios para cada ciclo em coelhos (SWIERSTRA, FOOTE, 1963). O número de ciclos necessários para o processo completo da espermatogênese, para que a espermatogônia tipo A se transforme em espermatozóide é de 4,75 ciclos ou 51,8 dias em coelhos (SWIERSTRA, FOOTE, 1965).

O efeito da elevação da temperatura na espermatogênese e sobre as características morfo funcionais são há muito tempo interesse dos pesquisadores. (MOORE, 1924; MOORE; OSLUND, 1924; MIES FILHO, 1956; BARNABE, 1970; PLOEN, 1972; MUCCIOLO; BARNABE; BARNABE, 1974; BEDFORD, 1978; PRABHAKAR et al., 1990). No final da década de 90, realizaram revisões sobre a elevação da temperatura testicular e os efeitos sobre as características morfológicas e estruturais durante a espermatogênese (MORGENTALER; STAHL; YIN, 1999; SETCHELL, 1998). Setchell (2006), numa revisão abrangente, descreveu os mecanismos fisiológicos da termorregulação testicular, as técnicas experimentais de elevação de temperatura e as alterações celulares e embrionárias posteriores.

Diferente das fêmeas onde os ovários permanecem na cavidade abdominal, nos machos, durante o período fetal ou após o nascimento, os testículos de muitas espécies de mamíferos migram para o escroto onde a temperatura é menor que a temperatura abdominal (SETCHELL, 2006).

Nos machos, incluindo o homem, a função testicular é dependente da temperatura. Para o funcionamento fisiológico dos testículos, a temperatura deve ficar entre dois e quatro graus Celsius abaixo da temperatura corporal (THONNEAU et al., 1998).

A termorregulação escroto testicular é mantida por vários fatores, tais como: vascularização testicular, que é mantida por meio do plexo pampiniforme e reduz a temperatura do conjunto escroto testículo pela troca de calor entre o sangue da artéria e veia testicular (MORGENTALER; STAHL; YIN, 1999; BRITO et al., 2004); túnica dartos que propicia a alteração da posição dos testículos em relação a parede corporal em função da temperatura ambiente (SETCHELL, 2006) e glândulas sudoríparas que favorecem a evaporação e acarreta também a diminuição da temperatura escrotal (MORGENTALER; STAHL; YIN, 1999).

As técnicas experimentais para estudar os efeitos da elevação da temperatura testicular são variadas. Dentre elas, destacam-se a insulação escrotal, que isola o escroto utilizando uma bolsa confeccionada com material isolante térmico, cuja função é diminuir as trocas de calor entre o testículo e o ambiente, mantida continuamente (BRITO et al., 2003; BONILLA et al., 2004; WALTERS et al., 2006) ou intermitente (ARMAN, et al., 2006), indução do criptorquidismo por meio cirúrgico de um ou ambos os testículos (BELETTI; MELLO, 1997; ZHANG et al., 2002; VIGODNER et al., 2003; REN et al., 2006;), aplicação de água aquecida sobre o escroto (SETCHELL; PLÖEM; RITZEN, 2002; BANKS et al., 2005) e exposição ao calor contínuo em câmaras climáticas (SETCHELL, 2006).

Arman e colaboradores (2006) conduziram experimentos para quantificar a motilidade e a concentração espermática em ejaculados de ovinos após a elevação da temperatura testicular. Tanto a concentração como a motilidade tiveram um decréscimo expressivo, chegando mesmo à aspermia e à perda total da motilidade em determinados períodos após a elevação da temperatura. Resultados

semelhantes foram encontrados em bovinos (VOGLER et al., 1991; BRITO et al., 2003, 2004) e coelhos (BELETTI; MELLO, 1997).

Por outro lado, outros pesquisadores enfatizaram a morfologia da cabeça e cauda dos espermatozoides na elevação da temperatura, e observaram um maior número de anormalidades estruturais (VOGLER et al., 1991; KASTELIC et al., 1996; BRITO et al., 2003, 2004) Além disso, outros pesquisadores avaliaram as alterações da integridade do DNA em espermatozoides em camundongos (SAILER et al., 1997; BANKS et al., 2005) e bovinos (KARABINUS et al., 1997).

Karabinus e colaboradores (1997) determinaram que a cromatina teve desnaturação mais elevada nos espermatozoides coletados após a elevação da temperatura realizado por 48 horas por meio da insulação escrotal em bovinos, e que os efeitos deletérios da elevação da temperatura testicular sobre a integridade da cromatina se manifestaram mais rapidamente que os efeitos sobre as características seminais convencionais analisadas.

Durante a espermatogênese, o material nuclear é condensado, o que representa um evento importante durante a espermatogênese. O DNA é compactado pela substituição das proteínas histônicas, que participam da arquitetura molecular das fibras cromatínicas e ricas em aminoácidos básicos, por protaminas ricas em arginina, resíduos de lisina e muitos pontos de ligação fosforilados (BALHORN, 2007). O DNA compactado tem forma de “donut” estabilizados pelas pontes dissulfeto entre as protaminas (WARD; COFFEY, 1991; SHAMAN; YAMAUCHI; WARD, 2007). Aproximadamente 85% do DNA do núcleo espermático está associado com as protaminas e os 15% restantes ficam ainda associados às histonas e outras proteínas (OLIVA, 2006).

Muitas funções foram propostas para as protaminas. Dentre elas, destacam-se: participação na condensação do material genético, tornando-o mais compacto e tornando o espermatozoide mais hidrodinâmico, movendo-se mais rapidamente; protege o material genético contra a ação de enzimas (proteases) ou agentes mutagênicos; exclusão de fatores transcriptores e outras proteínas durante a espermatogênese, o que implica num material genético “limpo” e desprovido de informações epigenéticas; auxilia em parte da checagem dos processos na

espermiogênese; envolvimento no “imprinting” paterno durante a espermatogênese (OLIVA, 2006).

Em mamíferos, há dois tipos de protaminas: P1 e P2. A P1 está presente em todos os mamíferos, enquanto a P2 é encontrada nos primatas, incluindo o homem, roedores (BALHORN, 2007), e não é descrita em coelhos (COURTENS; KISTLER; PLOEN, 1995).

Experimentalmente, os efeitos da elevação da temperatura acarretam o aparecimento de processos degenerativos das células da linhagem espermatogênica (ZHANG et al., 2002). Os espermatozoides que sofreram a elevação da temperatura, levando a perda da integridade do DNA (KARABINUS et al., 1997; SAILER et al., 1997; BANKS et al., 2005; PÉREZ-CRESPO; PINTADO; GUTIÉRREZ-ADAN, 2008).

A elevação da temperatura testicular aumenta o metabolismo e as necessidades suprimento de oxigênio no parênquima testicular e, se não houver um aumento correspondente de sangue oxigenado o testículo pode entrar em hipóxia. Esta condição é suficiente para comprometer a produção de espermatozoides anormais (BARTH e OKO, 1989).

A lesão do DNA espermático pode ser explicada pelo estresse oxidativo, que refere-se ao desequilíbrio entre o nível de produção espécies reativas de oxigênio (ROS, do inglês “Reactive Oxigen Species”) e o grau de mecanismos antioxidantes (ONG; SHAN; CHIA, 2002). O estresse oxidativo é considerado como uma das causas mais frequentes de lesão espermática (AITKEN et al., 1998). Considerado um dos fatores associados à baixa fertilidade de amostras de sêmen durante a manipulação e seu armazenamento, quando utilizadas técnicas que necessitam da retirada do plasma seminal (AIKEN; BAKER, 2002).

Alguns pesquisadores descrevem que o nível insuficiente de zinco no núcleo pode desestabilizar a estrutura cromatina. (KVIST et al., 1987). As protaminas que são ricas em resíduos de arginina e cisteína e formam duas pontes dissulfídicas (S-S) intramoleculares e três pontes intermoleculares (BALHORN, 1982; MAZRIMAS et al., 1986). Durante a espermiogênese, o zinco liga-se as pontes dissulfídicas das cisteínas e desta forma, auxilia a compactação das protaminas e as protege da oxidação. Assim, níveis insuficientes de zinco podem causar anormalidades diretas

no DNA, na organização da cromatina ou na matriz nuclear, acarretando alterações na morfologia nuclear espermática, diminuindo a capacidade fecundante (BEDWAL; BAHUGUNA, 1994).

Outro importante aspecto investigado é a função bioquímica reguladora do zinco na atividade espermática durante o trânsito epididimário. Embora a formação da cauda dos espermatozoides ocorra nos túbulos seminíferos, é no epidídimo que esta estrutura atinge plena função bioquímica (AMMAN et al., 1993). Os íons de zinco estão predominantemente localizados nas fibras densas da peça intermediária da cauda do espermatozoide e sua função é prevenir a oxidação dos grupamentos dissulfídricos (CALVIN et al., 1973). A medida que os espermatozóides avançam pela cauda do epidídimo, e logo após ejaculação, o conteúdo de zinco se reduz, o que ocasiona uma maior estabilização das fibras densas a partir da oxidação dos grupamentos dissulfídricos, ou seja, um maior enrijecimento dessas fibras e que é essencial para geração motilidade (HENKEL et al., 1999).

Alterações no complexo DNA protamina fazem com que a cromatina seja mais sensível à hidrólise, permitindo o uso de técnicas para estudar o fenômeno. Entre os primeiros pesquisadores destaca-se GLEDHILL (1966), que identificou, por meio da reação de Feulgen, o rompimento da ligação entre DNA e protamina pela hidrólise, o que provoca diferenças na intensidade de coloração das cabeças dos espermatozoides de touros subférteis.

Existem outras técnicas que permitem a identificação das alterações na estabilidade DNA-protamina. A eletroforese em gel de célula única (ensaio do cometa ou COMET), é uma técnica que determina os níveis de danos oxidativos ao DNA em uma célula isolada. Essa técnica permite a medida dos níveis de estresse oxidativo em espermatozoides. O tamanho da cauda que se forma reflete a extensão das rupturas das hélices de DNA (estresse oxidativo), em seguida a cauda é quantificada por métodos de intensificação de imagem e análise computacional (HAINES et al., 1998; BANKS et al., 2005).

Outra técnica bastante utilizada é a análise da estrutura da cromatina espermática conhecida com SCSA, do termo inglês “Sperm Chromatin Structure Assay”, o qual se baseia na habilidade do DNA de resistir à desnaturação pelo ácido ou calor, avaliado pela fluorescência de espermatozoides corados com alaranjado

de acridina, por meio de citômetro de fluxo. Tal metodologia também permite avaliar a cromatina (EVENSON; DARZYNKIEWICZ; MELAMED, 1980; SAILER et al., 1997; OSTERMEIER et al., 2001a; ERENPREISS et al. 2004; BANKS et al., 2005)

A utilização de alaranjado de acridina de forma mais simplificada, utilizando o microscópio óptico de fluorescência foi descrita por Beletti e Mello (1996) com resultados semelhantes aos encontrados com a utilização do citômetro de fluxo.

Além do corante alaranjado de acridina, o corante azul de toluidina também é utilizado para identificar alteração na compactação da cromatina. Mello (1982) desenvolveu o método com o uso do azul de toluidina em esfregaços de sêmen, que possui propriedades catiônicas e que exibe um fenômeno metacromático, isto é, a mudança da cor resultante da vibração dos elétrons entre as moléculas do corante. Esse método, denominado de metacromasia induzida, consta de um tratamento prévio com ácido clorídrico (4,0N a 25ºC, 15 a 30 minutos) e posterior coloração com o azul de toluidina (pH 4,0). O pH ácido do corante permite que outros sítios aniônicos não sejam ionizados. As cabeças dos espermatozoides normais coram-se em verde e aquelas com anomalias no DNA coram-se em violeta. Na compactação normal da cromatina a protamina bloqueia a ionização dos grupos fosfatos, o que não permite que o azul de toluidina se ligue ao DNA, resultando uma coloração verde a azul claro. Por outro lado, espermatozoides com a cromatina pouco compactada, a hidrólise extrairia parcialmente as protaminas e, consequentemente, haveria a interação entre o corante e os grupos fosfatos do DNA, resultando uma coloração azul escuro a magenta.

Além do corante azul de toluidina, Erenpreiss e colaboradores (2001) utilizaram azul de anilina, em que as cabeças dos espermatozoides com alteração cromatínica se apresentaram em azul, enquanto os normais ficaram incolores e concluiu que o método também é eficaz para identificação de anomalias da cromatina.

As amostras coradas com alaranjado de acridina devem ser observadas rapidamente num microscópio de fluorescência, devido a rápida perda de fluorescência do corante. Por outro lado, os esfregaços que utilizam o azul de toluidina ou azul de anilina são observados em microscópio óptico comum, tornando o processo mais simples e de custo menor (BELETTI; COSTA; VIANA, 2004).

A desvantagem de métodos que necessitam da observação do pesquisador ao microscópio é a subjetividade da interpretação quanto a cor obtida nas reações, o que influencia negativamente nos resultados (BELETTI; MELLO, 1996).

A interpretação tendenciosa é minimizada com a utilização de métodos computacionais que analisam as imagens obtidas nas reações entre o corante e o complexo DNA-protamina, eliminando a subjetividade do processo (BELETTI; COSTA; VIANA, 2004).

A análise computacional da morfologia espermática tem como característica as mensurações da área, perímetro, comprimento, largura e fatores derivados destas medidas (GARRET; BAKER, 1995). Descritores Fourier também são utilizados para determinar parâmetros multivariados quanto à forma da cabeça do espermatozoide (OSTERMEIER et al., 2001a, OSTERMEIER et al., 2001b).

Alterações na compactação da cromatina acarretam defeitos morfológicos na cabeça dos gametas, o que prejudica as propriedades hidrodinâmica, afetando a progressão uniforme e retilínea dos mesmos (BELETTI; COSTA; GUARDIEIRO, 2005).

A morfologia normal e anômala dos espermatozóides variam e, portanto, se faz necessário uma padronização da técnica para cada espécie. Em humanos, a padronização está restrita a análise morfométrica da cabeça, sendo mensurada a área, perímetro, comprimento, largura e razão largura /altura. (JAGOE; WASHBROOK; HUDSON, 1986; KATZ et al., 1986; SCHRADER; TURNER; SIMON, 1990; DAVIS et al., 1992; MACLEOD; IRVINE, 1995). Outros parâmetros morfológicos são estudados tanto para a cabeça (GARRETT; BAKER, 1995; HARR, 1997), como para a cauda (GERGELY et al., 1999; STEIGERWALD; KRAUSE, 1998).

Comparado com os humanos, os animais domésticos também estão passando por uma fase de padronização, entre as espécies destacam-se: bovino (GRAVANCE et al., 1998a; GRAVANCE et al., 1999; SAILER; JOST; EVENSON, 1996), ovino (GRAVANCE et al., 1998b; SANCHO et al., 1998), suíno (HIRAI et al., 2001), eqüino (GRAVANCE et al., 1996; GRAVANCE et al., 1997), coelho (GRAVANCE; DAVIS, 1995) e rato (HIGUCHI et al., 2001).

A utilização de azul de toluidina combinada com avaliações matemáticas mais complexas permite identificar as alterações morfológicas e de cromatina não percebidas pela análise visual do espermatozoide (BELETTI; COSTA, 2003; BELETTI; COSTA; GUARDIEIRO, 2005; BELETTI; COSTA; VIANA, 2005a, 2005b).

Os trabalhos que descrevem o aumento da temperatura testicular afetando a integridade da cromatina e os métodos utilizados para avaliar o grau de anormalidade da condensação cromatínica, não permitem uma avaliação da morfologia da cabeça mais profunda sem a subjetividade do pesquisador. Beletti e Fontoura (2003) aprimoraram e ampliaram os parâmetros analisados, tais como comprimento e largura média, simetria e coeficiente hidrodinâmico em diversas espécies (bovino, carneiro, coelho, ovelha e humano), em esfregaços de sêmen corados com azul de toluidina.

Ostermeier e colaboradores (2001b) mensuraram a morfologia das cabeças dos espermatozoides de bovinos utilizando os descritores de Fourier, que são mais precisos, entretanto os esfregaços foram corados utilizando iodeto de propidium (10 mM, 5 minutos em tampão salina), um fluorcromo que é impermeável à membrana plasmática e que se liga ao DNA quando a membrana plasmática se apresenta danificada.

O comprimento, largura, área, perímetro e razão largura/comprimento em cabeças de espermatozoides de coelhos em esfregaços corados com corante rosa-bengala e posterior análise pelo programa denominado ASMA (“Automated Sperm Morphometry Analysis”), foi desenvolvido na Universidade da Califórnia (GRAVANCE; DAVIS, 1995), entretanto parâmetros métricos mais sofisticados e utilizando o método de metacromasia induzida não foram pesquisados.

Beletti e Mello (1997) pesquisaram, após três dias de criptorquidismo experimental, as alterações cromatínicas em sêmen de coelho pelo método de metacromasia induzida e após a reação de Fuelgen, além de avaliar outros parâmetros rotineiros na prática na análise do espermograma (vigor, motilidade, concentração, alterações morfológicas). A análise computacional da morfologia da cabeça dos espermatozoides ainda não foi realizada pelo método de metacromasia induzida em coelhos.

3. MATERIAL E MÉTODO

Foram utilizados 30 coelhos (*Oryctolagus cuniculus*), da raça Nova Zelândia, adultos entre oito e 12 meses, peso entre dois e três quilogramas, provenientes do coelhário da Universidade de Uberaba, MG, mantidos no mesmo local durante todo experimento.

Na fase pré experimental os animais foram submetidos a exames (hemograma e parasitológico), para determinar a necessidade de tratamentos e, se necessário, quarentena pré-experimento. Os animais foram mantidos individualmente em gaiolas especificas de arame galvanizado (80 x 60 x 40 cm) com cocho lateral e abertura superior. Os coelhos receberam ração comercial balanceada em forma de “pelets” (Nutricoelho, Purina), uma vez ao dia de forma controlada, feno e água previamente tratada “ad libitum”.

O experimento foi dividido em três fases. Em cada fase foram realizadas coletas de sêmen de todos os animais durante 69 dias, conforme ilustrado na figura 1.

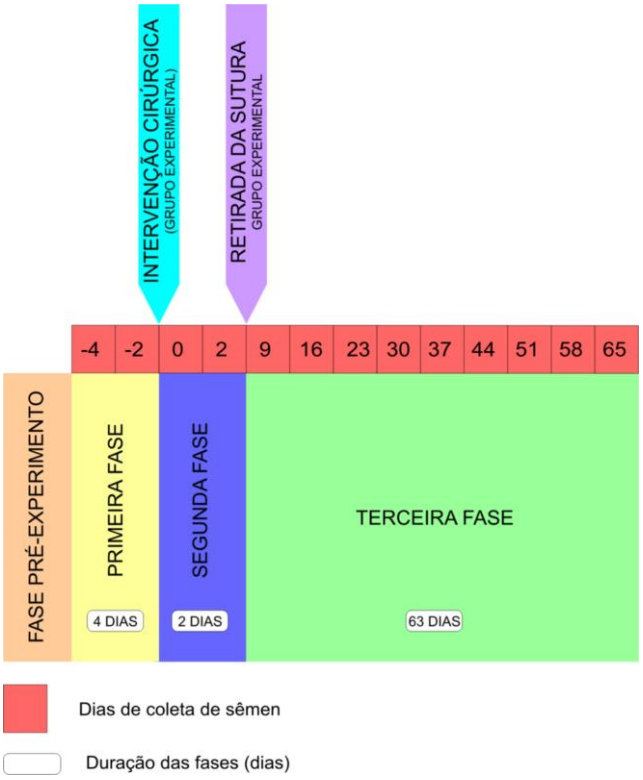

Figura 1 - Resumo ilustrativo dos períodos pré-experimento e experimental.

As coletas de sêmen foram realizadas por meio de vagina artificial (NAUGHTON; NELSON, THOMAS Jr., 2003; AMANN; FOOTE, 2004) (ANEXO A), sempre no mesmo horário (18h30).

Foram realizadas as seguintes análises após a coleta:

a) Concentração: diluição de 20 µl de sêmen em quatro ml (1:200) de solução salina com 1% de formol e contagem em câmara de Neubauer e observado em microscópio óptico com aumento de 400x (Manual, 1998);

b) Motilidade: porcentagem de espermatozoides móveis estimada por meio da visualização entre lâmina e lamínula, no máximo até 30 segundos após a coleta, e registrada em intervalos de 10 em 10% (Manual, 1998);

c) Vigor: intensidade de deslocamento da célula avaliado concomitante com a motilidade e registrado em escala de zero a cinco ((Manual, 1998);

d) Análise computacional da compactação da cromatina: determinada pela análise de 100 espermatozoides por esfregaço tratados pelo método de metacromasia induzida em que consiste em fixar o esfregaço de sêmen em etanol absoluto/ácido acético glacial na proporção 3:1 (v/v) por um minuto e posterior imersão em etanol a 70% por três minutos. Após essa etapa foi realizada a hidrólise ácida em HCl 4N a 25ºC por 15 minutos seguida de coloração com azul de toluidina em solução McIlvaine a pH 4 (BELETTI, MELLO, 1997).

Foram obtidas imagens digitais em tons de cinza de cada esfregaço, por meio do microscópio óptico (ZEISS AXIOLAB) com objetiva de 100x (imersão), acoplado a uma câmera digital (SAMSUNG CCS-212) e conectada a um microcomputador por meio de placa digitalizadora (PCMCIA “Type II Tv Tuner Card”).

As imagens digitais foram usadas para segmentar 100 cabeças de espermatozoides de cada lâmina. Após a segmentação das cabeças, foram processadas por programas desenvolvidos em ambiente SCILAB para obter a média e desvio padrão dos valores de “pixel” dentro das cabeças de cada imagem (BELETTI; COSTA, 2003; BELETTI; COSTA; VIANA, 2004; BELETTI; COSTA;

GUARDIEIRO, 2005; BELETTI; COSTA; VIANA, 2005a, 2005b; SILVA; MENDES JR; BELETTI, 2009).

Em cada esfregaço, o programa selecionou as 6 cabeças de coloração mais clara e mais homogênea, para se ter uma referência da coloração normal da cabeça do espermatozoide. A média dos valores dos “pixeis” das cabeças foi considerada como o valor de referência da coloração normal dos espermatozoides (cabeças padrões) para aquele esfregaço. Depois, para cada imagem, as diferenças entre o valor de referência e as médias dos valores de “pixeis” de cada cabeça analisada foram determinadas.

A diferença foi transformada em porcentagem (Dif%) do valor da média dos valores de “pixel” das cabeças padrões. Os coeficientes de variação (CV) dos valores dos “pixeis” (níveis de cinza) de cada cabeça também foram calculados;

Os espermatozoides que visualmente possuem coloração alterada em seu núcleo, foram selecionados por meio computacional aqueles que possuíam Dif% maior ou igual a 8 e/ou CV maior ou igual a 10, e foram considerados como espermatozoides com cromatina anômala.

e) Análise morfométrica computacional da cabeça: A área, perímetro (Per.), largura (Larg.), comprimento (Comp.), razão largura-comprimento (L/C), elipsidade (E) e fator forma (F.F.) de todas as cabeças foram determinados pelo uso de programas desenvolvidos no SCILAB (BELETTI; COSTA, 2003).

Descritores Fourier com amplitude de 0 a 2 (F0, F1 e F2) foram também considerados para caracterização e análise da forma (OSTERMEIER et al., 2001a; 2001b; BELETTI; COSTA, 2003). A simetria da cabeça espermática também foi considerada. A simetria lateral (Sim. Lat.) foi medida para identificação de assimetria ao longo do eixo principal do espermatozoide, que pode implicar em alterações nas propriedades hidrodinâmicas da célula. A mensuração da simetria ântero posterior (Sim. A-P) foi realizada para identificação de assimetrias ao longo do segundo eixo espermático. As simetrias consideradas foram calculadas por meio do procedimento descrito por Beletti e Costa (2003), que envolve **“**dobramento**”** do objeto ao longo do eixo maior (ou menor) e depois identifica a área de sobreposição entre as áreas original e dobrada (COSTA; CESAR JR, 2009).

Na primeira fase do experimento foram coletadas duas amostras de sêmen em dias alternados (dias -4, -2) de todos os animais.

Na segunda fase os coelhos foram divididos em dois grupos de 15. Os grupos: grupo experimental e grupo controle, foram submetidos à anestesia com associação das drogas cloridrato de cetamina e cloridrato de xilazina na dose 30 mg/Kg e 3 mg/Kg respectivamente, via intramuscular (CARPENTER, 2005).

Com o primeiro plano cirúrgico do estágio III alcançado na anestesia, foi realizado o criptorquidismo para obter a elevação da temperatura testicular no grupo experimental. A intervenção consiste em deslocar ambos os testículos para dentro da cavidade pélvica, invertendo-se completamente o escroto por meio do anel inguinal. Feito isso, foi realizada a sutura com fio de algodão para o fechamento do anel inguinal, utilizando a sutura tipo oclusiva ou “bolsa de fumo”, num único ponto percutâneo, o que impede o retorno do escroto para posição anatômica (Figuras 2, 3, 4 e 5). A cirurgia foi realizada no mesmo dia da terceira coleta de sêmen (dia 0), correspondente a fase dois. Após dois dias da intervenção (dia 2), a sutura foi retirada, o que permite o retorno do escroto e dos testículos à posição normal.

O outro grupo de 15 coelhos (controle) foram anestesiados, mas não sofreram intervenção cirúrgica. Assim como o grupo experimental, foram coletadas duas amostras se sêmen (dias 0 e 2) do grupo controle.

Após a aplicação desta metodologia, foram coletadas amostras de sêmen a cada sete dias, de ambos os grupos, durante 63 dias pós-criptorquidismo, que correspondeu à terceira fase.

Toda a metodologia está de acordo com princípios éticos de experimentação animal do Comitê de Ética na Utilização de Animais (CEUA), da Universidade Federal de Uberlândia, protocolo 030/08 (ANEXO B).

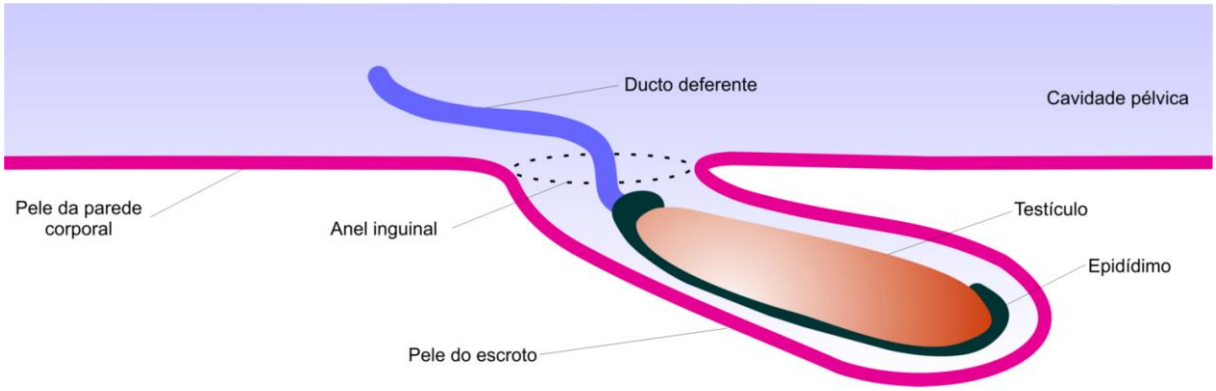

Figura 2 - Desenho esquemático representando a localização do escroto. Observe o anel inguinal que é a passagem da cavidade pélvica para o exterior do organismo.

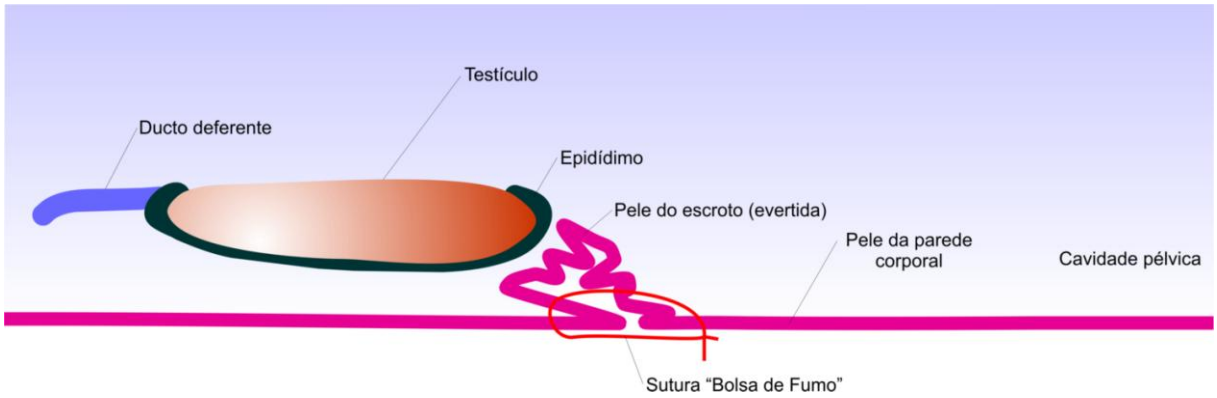

Figura 3 - Desenho esquemático representando o criptorquidismo experimental. Notam-se os testículos, epidídimo e ducto deferente bem como a pele do escroto presentes na cavidade pélvica. O anel inguinal está fechado por meio da sutura tipo "bolsa de fumo", impedindo o retorno do escroto e testículo na posição anatômica normal.

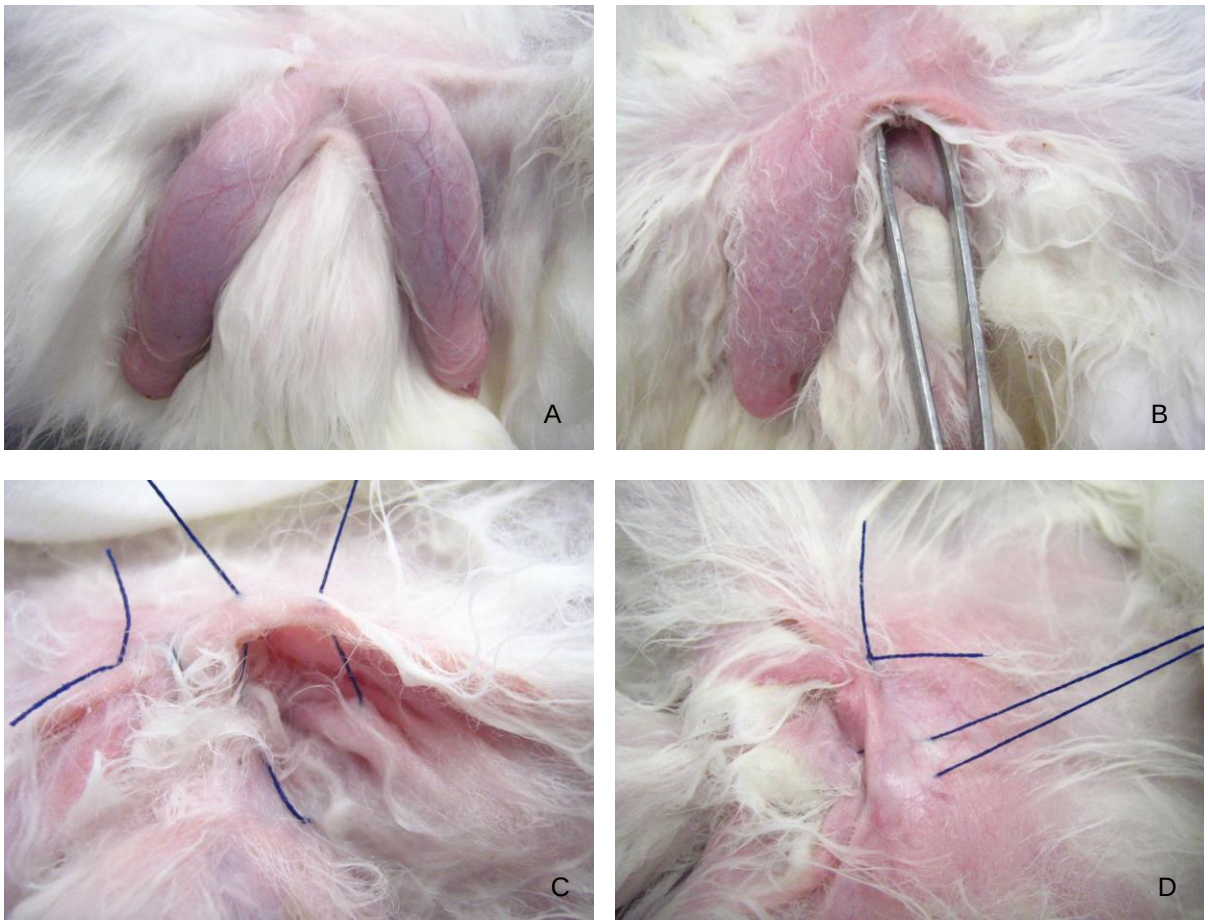

Figura 4 - Fotografias representativas de coelho durante a realização do criptorquidismo experimental, após a anti sepsia (A), introdução de pinça cirúrgica para verificação do anel e canal inguinal (B), com o testículo esquerdo e pele do escroto já introduzido na cavidade pélvica e linha para sutura tipo “bolsa de fumo” inserida na pele (C), sutura realizada do testículo direito tipo “bolsa de fumo” e fechamento do testículo esquerdo sendo realizada (D).

Os resultados foram submetidos ao teste de Kolmogorov Smirnov para verificar se a distribuição dos dados era normal e confirmado esta característica, foi aplicado o teste “t” para verificar diferenças estatísticas entre o grupo controle e o que sofreu criptorquidismo, em cada dia de coleta de sêmen. As variáveis motilidade e vigor não apresentaram distribuição normal, sendo então utilizado o teste não paramétrico de Wilcoxon.

4. RESULTADOS

4.1 – Concentração, vigor e motilidade dos espermatozoides

As mensurações quanto à concentração, motilidade e vigor de cada grupo estão representadas nas Tabelas 1 a 3 e nas Figuras 6 a 8.

Os animais experimentais sofreram alterações quanto às características de concentração, vigor e motilidade e de espermatozoides do sêmen. As alterações se acentuaram com o avanço do tempo após a interrupção do criptorquidismo, chegando-se a valores muitos baixos com 21 dias pós-criptorquidismo.

O início da recuperação aconteceu com 28 dias, voltando aos níveis anteriores à cirurgia com 58 dias para o vigor e motilidade, entretanto os níveis da concentração espermática ainda não haviam retornado aos valores iniciais ao final do período experimental.

Tabela 1 – Variação da média aritmética e desvio padrão da porcentagem da concentração dos espermatozoides (x 10^6 espermatozoides /ml).

Dia	EXPERIMENTAL		CONTROLE	
	$\overline{X}$	S	$\overline{X}$	S
-4	472,0	315,8	456,7	246,1
-2	267,3	160,9	279,3	198,3
0	295,3	228,0	222,7	111,3
2	374,2**	213,9	206,7**	109,9
9	244,0	245,7	321,3	271,5
16	95,3**	93,0	402,7**	290,5
23	58,0**	73,0	294,0**	237,9
30	73,3**	102,2	437,3**	383,5
37	97,3**	165,0	365,3**	345,2
44	104,7**	98,6	273,3**	134,3
51	199,3	143,8	215,3	141,5
58	196,0	190,8	106,7	82,2
65	252,0	138,7	248,0	126,0

Dia 0: início do criptorquidismo para os coelhos experimentais.
Dia 2: final do criptorquidismo paras os coelhos experimentais.
*diferença estatística entre os grupos com $p \leq 0,10$
** diferença estatística entre os grupos com $p \leq 0,05$

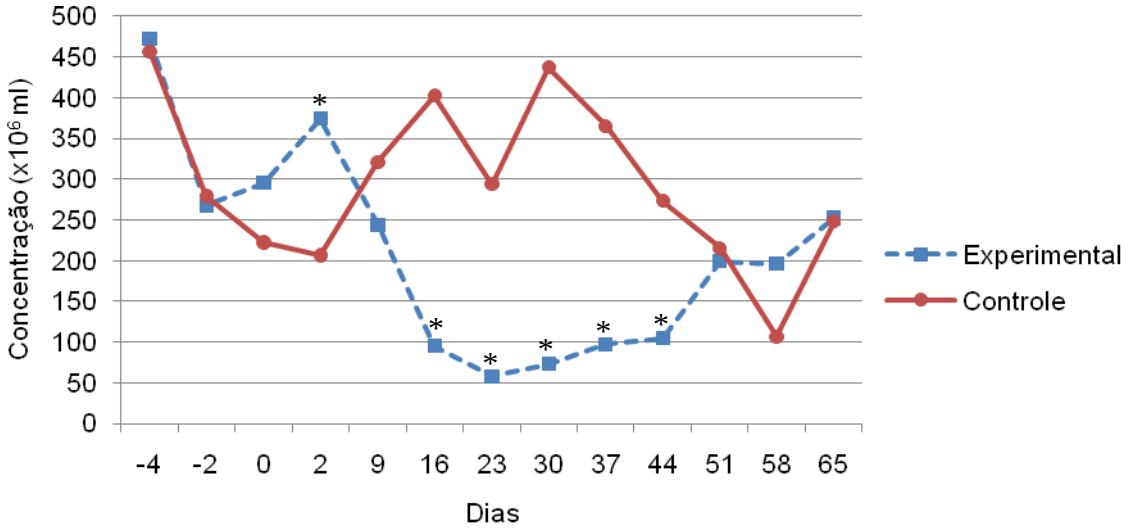

Figura 6 - Diagrama representativo com base nos valores da média da concentração dos espermatozoides (x 10^6 espermatozoides/ml) (N=30).

Tabela 2 – Variação da média aritmética e desvio padrão da porcentagem de espermatozoides móveis.

Dia	EXPERIMENTAL		CONTROLE	
	$\overline{X}$	S	$\overline{X}$	S
-4	91,3	13,0	92,7	9,6
-2	92,0	11,5	91,3	14,1
0	95,3	6,4	89,3	11,0
2	90,0	11,3	94,0	9,1
9	83,3*	16,8	92,7*	10,3
16	58,0**	24,8	88,0**	10,8
23	43,3**	28,5	88,0**	13,2
30	44,0**	27,2	82,0**	17,0
37	54,0**	29,5	84,7**	18,8
44	62,0**	24,0	90,7**	7,0
51	76,0	18,8	84,7	11,9
58	87,3	13,9	78,7	16,8
65	87,1	12,7	85,3	9,9

Dia 0: início do criptorquidismo para os coelhos experimentais.
Dia 2: final do criptorquidismo paras os coelhos experimentais.
** diferença estatística entre os grupos com p≤0,05
* diferença estatística entre os grupos com p≤0,10

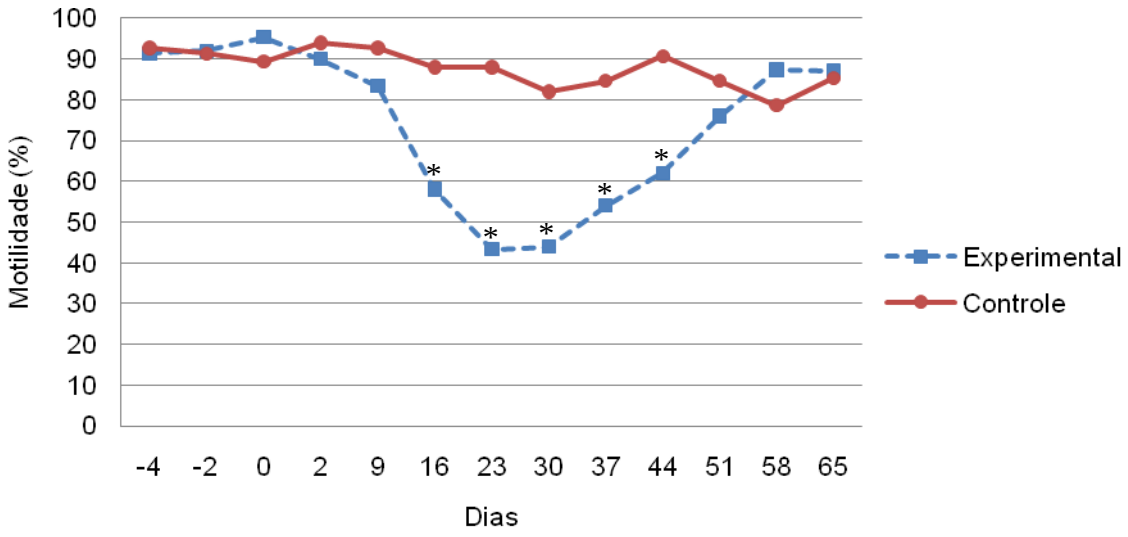

Figura 7 - Diagrama representativo com base nos valores da média da motilidade dos espermatozoides (N=30).

Tabela 3 – Variação da média aritmética e desvio padrão da porcentagem do vigor dos espermatozoides.

Dia	EXPERIMENTAL		CONTROLE	
	$\overline{X}$	S	$\overline{X}$	S
-4	4,4	0,8	4,3	0,8
-2	4,3	0,7	4,2	1,1
0	4,5	0,6	4,3	0,9
2	4,5	0,6	4,4	0,8
9	4,0	1,0	4,5	0,8
16	2,5**	1,1	3,9**	1,1
23	1,9**	1,1	4,1**	1,0
30	2,1**	1,3	3,9**	1,3
37	2,3**	1,2	4,2**	1,0
44	2,8**	1,2	4,5**	0,8
51	3,5**	0,9	4,3**	1,0
58	4,5	0,8	3,9	1,0
65	4,0	1,3	4,1	1,0

Dia 0: início do criptorquidismo para os coelhos experimentais.
Dia 2: final do criptorquidismo paras os coelhos experimentais.
** diferença estatística entre os grupos com $p \leq 0,05$

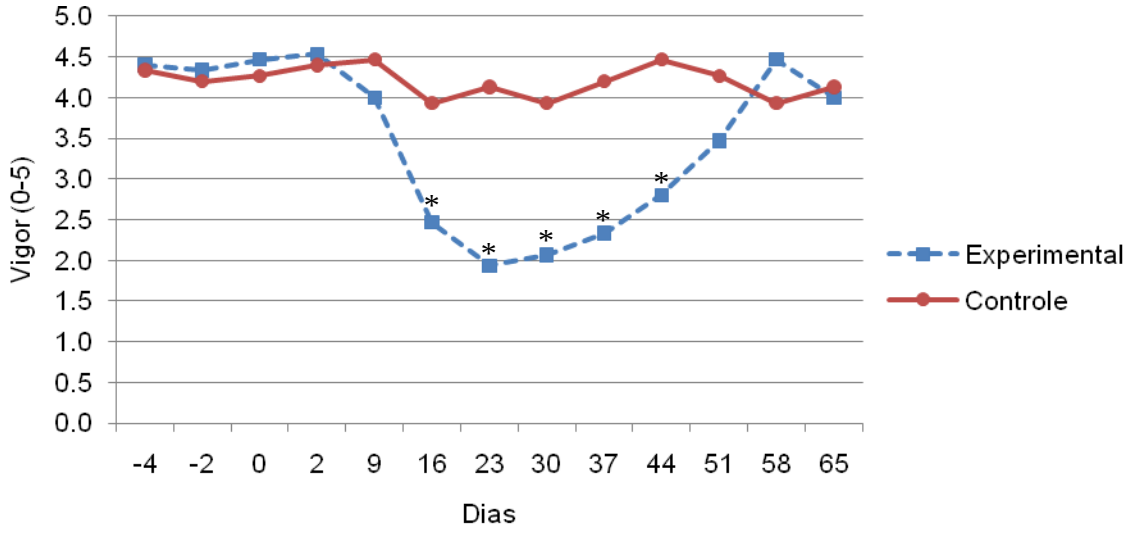

Figura 8 - Diagrama representativo com base nos valores da média do vigor dos espermatozoides (N=30).

4.2. Análise computacional da compactação da cromatina

As Tabelas 4 a 6 representam as médias e desvios padrão das análises computacionais da compactação da cromatina do grupo experimental e controle.

Durante a captura das imagens foi possível perceber a presença de espermatozoides com cromatina anômala entre espermatozoides aparentemente normais (Figura 12).

Houve alteração nos parâmetros avaliados quanto à compactação da cromatina imediatamente pós-criptorquidismo, tornando-a mais frouxa, sendo a recuperação aos valores inicias da compactação se deu no dia 23 (Tabela 4 e 6).

As Figuras 9 a 11 representam de maneira geral a média dos grupos experimental e controle, para vários parâmetros Dif%, CV e cromatina anômala respectivamente.

Tabela 4 – Variação da média aritmética e desvio padrão da diferença percentual da média dos valores de “pixel” entre a cabeça do espermatozoide avaliado e as cabeças padrões (Dif%).

Dia	EXPERIMENTAL		CONTROLE	
	$\overline{X}$	S	$\overline{X}$	S
-4	3,4	1,5	3,5	1,5
-2	3,1	1,6	3,3	1,7
0	3,5	1,9	3,3	1,5
2	3,4	1,6	3,5	1,5
9	4,8*	2,2	3,3*	1,4
16	5,1*	2,3	3,3*	1,4
23	4,7	2,5	3,4	1,3
30	4,2	2,1	4,1	1,6
37	4,2	2,3	4,6	1,8
44	4,3	2,3	4,0	1,7
51	3,9	1,7	3,9	1,6
58	3,8	1,6	4,1	1,6
65	3,4	1,7	3,9	1,3

Dia 0: início do criptorquidismo para os coelhos experimentais.
Dia 2: final do criptorquidismo paras os coelhos experimentais.
*diferença estatística entre os grupos com p≤0,10

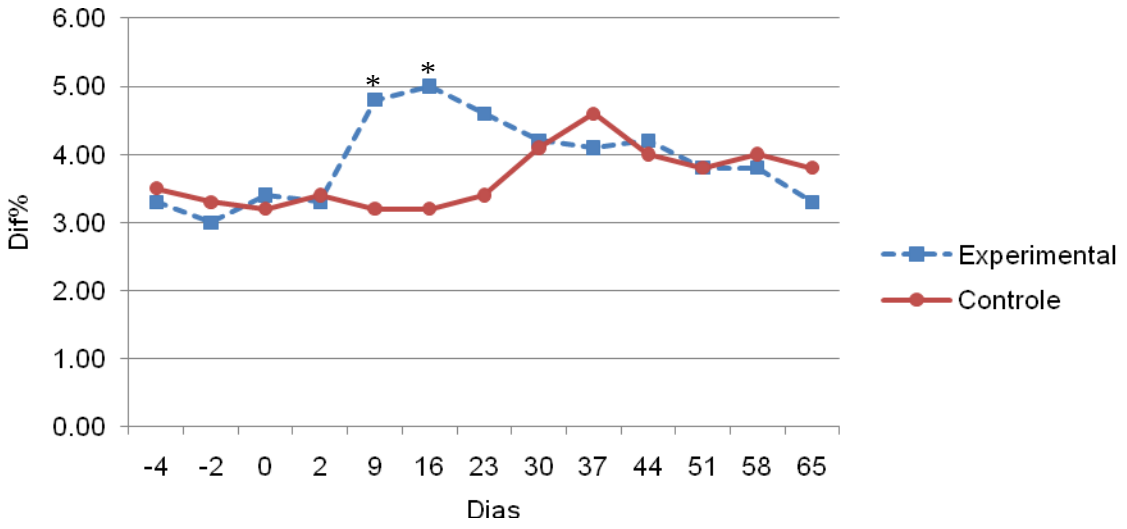

Figura 09 - Diagrama representativo com base nos valores da média da Dif% dos espermatozoides (N=30). *: significa estatística entre os grupos.

Tabela 5 – Variação da média aritmética e desvio padrão do coeficiente de variação dos valores de pixel das cabeças dos espermatozoides.

Dia	EXPERIMENTAL		CONTROLE	
	$\overline{X}$	S	$\overline{X}$	S
-4	5,8	0,9	5,7	0,9
-2	6,3	0,9	5,9	1,0
0	3,4	1,1	5,4	0,9
2	3,7	0,9	5,4	0,8
9	5,6	1,2	5,1	0,9
16	6,8	1,2	5,8	0,9
23	6,1	1,4	5,7	0,6
30	6,6	1,3	6,0	0,8
37	6,1	1,5	6,6	0,9
44	6,3	1,4	7,2	1,0
51	6,4	1,0	6,5	0,8
58	6,6	0,9	6,2	0,9
65	7,3	1,0	5,6	0,7

Dia 0: início do criptorquidismo para os coelhos experimentais.
Dia 2: final do criptorquidismo paras os coelhos experimentais.
Não houve diferença estatística entre os grupos

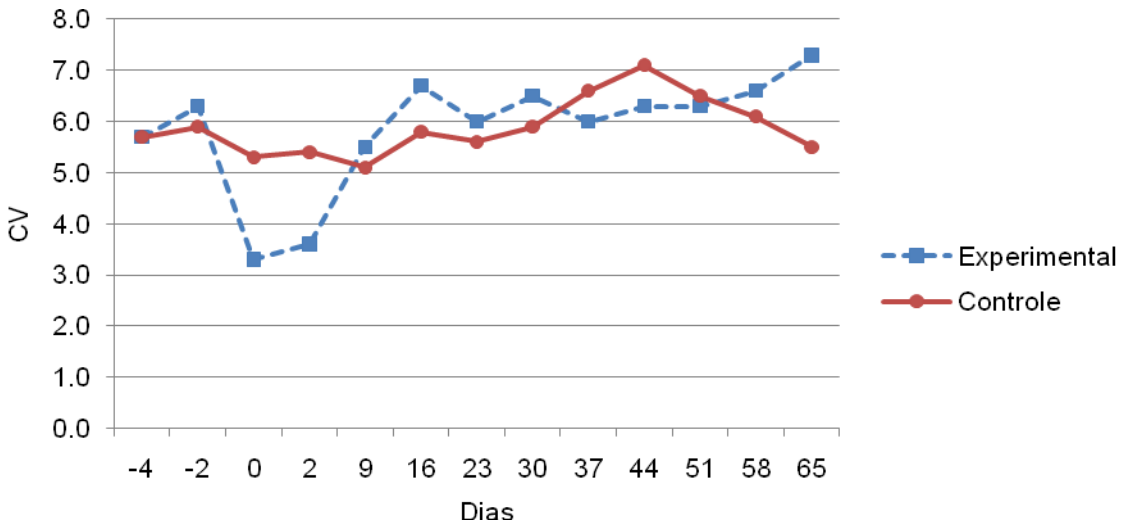

Figura 10 - Diagrama representativo com base nos valores da média do coeficiente de variação dos espermatozoides (N=30).

Tabela 6 – Variação da média aritmética e desvio padrão da porcentagem de espermatozoides com cromatina anômala.

Dia	EXPERIMENTAL		CONTROLE	
	$\overline{X}$	S	$\overline{X}$	S
-4	8,1	8,0	5,7	6,0
-2	10,4	6,1	8,8	10,6
0	8,9	6,4	7,2	8,2
2	8	6,1	6,6	8,5
9	5,8	6,3	9,6	11,0
16	8,1	5,3	4,9	4,4
23	9,7	5,4	5,8	9,0
30	8,5	6,3	5,2	8,1
37	14,8**	14,0	4,5**	4,6
44	11,4	8,8	6,0	7,2
51	8,9	7,2	5,6	8,0
58	7,3	7,2	4,9	6,4
65	8,6	6,6	3,8	6,6

Dia 0: início do criptorquidismo para os coelhos experimentais.
Dia 2: final do criptorquidismo paras os coelhos experimentais.
** diferença estatística entre os grupos com p≤0,05

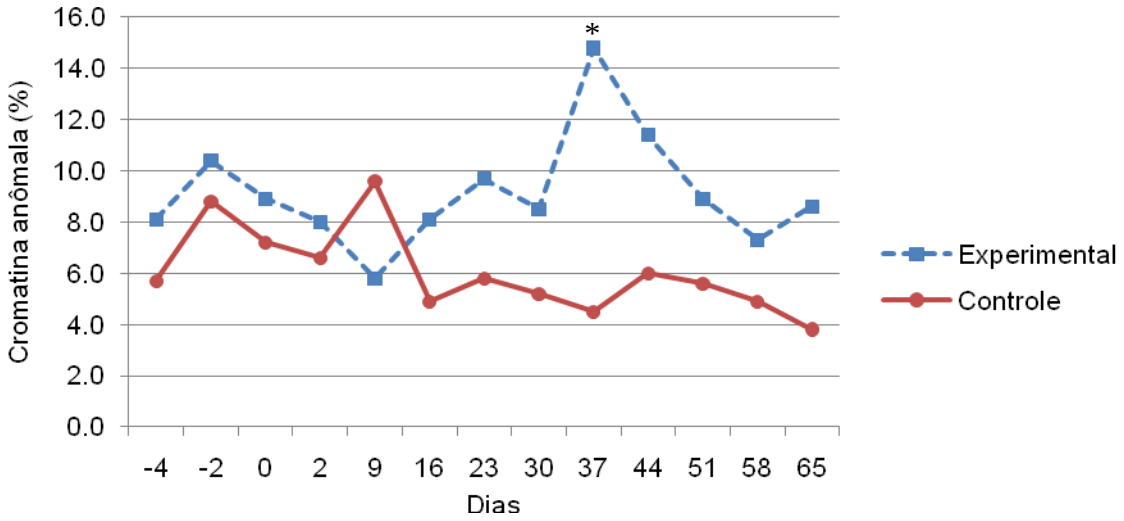

Figura 11 - Diagrama representativo com base nos valores da média da porcentagem de espermatozoides com cromatina anômala (N=30). *: significa estatística entre os grupos.

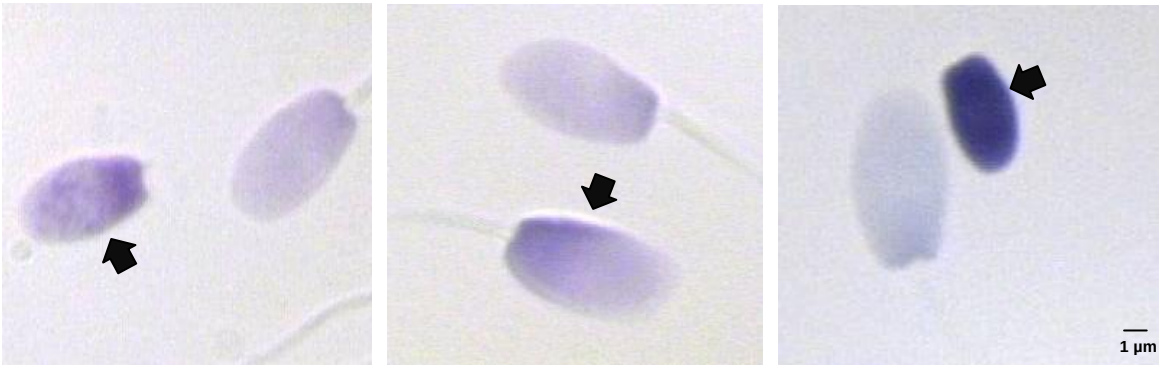

Figura 12 - Fotografias do esfregaço de sêmen de coelho submetido ao método da metacromasia induzida (azul de toluidina, pH 4), mostrando espermatozoides com compactação da cromatina anômalas (setas).

4.3. Análise morfométrica computacional da cabeça da cabeça dos espermatozoides

As Tabelas 7 e 8 representam as médias e desvio padrão das características morfométricas da cabeça dos espermatozoides do grupo experimental e controle.

A Tabela 9 representa os coeficientes de correlação entre as variáveis analisadas referentes ao tamanho da cabeça e a compactação de cromatina do grupo controle.

De maneira geral, houve alteração nos parâmetros avaliados da cabeça dos espermatozoides, dos animais experimentais após o criptorquidismo (Tabelas 7 e 8). A tendência das cabeças ficarem menores, finas, elípticas e com a simetria comprometida, já detectada imediatamente pós-cirúrgica.

A recuperação da forma da cabeça se dá 28 dias após o criptorquidismo, retornando até os níveis semelhantes antes da cirurgia.

As figuras 13 a 24 representam de maneira geral a média dos grupos experimental e controle, para vários parâmetros da análise morfométrica da cabeça do espermatozoide.

Tabela 7 – Variação da média e desvio padrão da área, perímetro, largura, comprimento, razão largura-comprimento da e elipsidade das cabeças dos espermatozóides.

	Área (μm^2)				Per. (µm)				Larg. (µm)				Comp. (µm)				L/C				E			
Dias	EXPERIME.		CONTROLE		EXPERIME.		CONTROLE		EXPERIME.		CONTROLE		EXPERIME.		CONTROLE		EXPERIME.		CONTROLE		EXPERIME.		CONTROLE	
	$\overline{x}$	S	$\overline{x}$	S	$\overline{x}$	S	$\overline{x}$	S	$\overline{x}$	S	$\overline{x}$	S	$\overline{x}$	S	$\overline{x}$	S	$\overline{x}$	S	$\overline{x}$	S	$\overline{x}$	S	$\overline{x}$	S
-4	35,52	5,7	35,32	6,9	20,9	0,2	21	0,55	4,2	0,047	4,2	0,039	7,6	0,057	7,6	0,067	0,555	0,006	0,548	0,004	0,287	0,004	0,293	0,003
-2	35,18	5,7	35,72	4,9	21,2	1,1	21	0,28	4,2	0,031	4,2	0,025	7,5	0,041	7,7	0,65	0,558	0,004	0,547	0,004	0,285	0,003	0,294	0,003
0	35,1	5,2	35,62	4,6	21,6	2,9	20,9	0,16	4,2	0,036	4,2	0,031	7,5	0,047	7,7	0,045	0,558	0,005	0,552	0,003	0,285	0,004	0,289	0,003
2	34,03	4,3	34,89	6	21	1,8	20,7	0,3	4,1	0,051	4,1	0,041	7,3*	0,051	7,6*	0,56	0,567*	0,007	0,553*	0,003	0,277*	0,004	0,289*	0,003
9	33,79	4,7	34,57	7,9	20,4	0,6	20,6	0,28	4,1	0,032	4,2	0,043	7,4	0,037	7,5	0,067	0,558	0,006	0,561	0,005	0,285	0,004	0,282	0,004
16	33,16**	8,4	35,37**	6	20,5	1,4	20,8	0,18	4,1**	0,067	4,3**	0,038	7,4**	0,104	7,6**	0,067	0,557	0,008	0,561	0,003	0,286	0,006	0,282	0,003
23	32,89**	7,5	34,82**	6,2	20,3	0,7	20,6	0,15	4,1	0,038	4,2	0,039	7,4**	0,08	7,6**	0,045	0,555	0,008	0,557	0,004	0,287	0,006	0,285	0,003
30	31,95**	16,2	34,91**	4,7	19,8**	0,6	20,7**	0,12	4,0**	0,13	4,2**	0,033	7,3**	0,229	7,6**	0,049	0,549	0,019	0,559	0,005	0,293	0,016	0,284	0,004
37	30,89**	9,6	35,43**	5,6	19,8**	1,1	20,8**	0,27	3,9**	0,079	4,3**	0,041	7,2**	0,138	7,6**	0,044	0,547*	0,011	0,564*	0,004	0,294*	0,01	0,280*	0,003
44	33,76*	6,3	35,49*	5,6	20,6	0,5	21	0,22	4,1**	0,044	4,3**	0,032	7,5	0,069	7,6	0,05	0,542*	0,007	0,559*	0,003	0,298*	0,005	0,284*	0,002
51	33,99*	8,4	35,56*	7,6	20,7	1	20,9	0,2	4,1**	0,062	4,3**	0,04	7,5	0,097	7,6	0,082	0,543*	0,008	0,560*	0,006	0,298*	0,006	0,283*	0,004
58	34,62	5	35,91	5,5	20,7	0,3	21,1	0,25	4,2	0,037	4,2	0,036	7,5	0,074	7,6	0,048	0,559	0,006	0,557	0,004	0,284	0,005	0,285	0,003
65	35,53	6,1	35,17	6,4	21,1	0,2	21,3	0,74	4,2	0,036	4,2	0,059	7,6	0,043	7,6	0,06	0,557	0,004	0,555	0,008	0,286	0,004	0,287	0,005

EXPERIME.: experimental; Per.: perímetro; Larg.: largura; Comp.: comprimento; L/C: razão largura-comprimento;E: elipsidade. Valores com letras diferentes, na mesma linha, diferem significativamente entre grupos em um determinado dia $p \leq 0,05$.

*diferença estatística entre os grupos com $p \leq 0,10$, ** diferença estatística entre os grupos com $p \leq 0,05$

Tabela 8 – Variação da média e desvio padrão do fator forma, harmônica de Fourier zero, 1 e 2, simetria lateral e simetria ântero posterior das cabeças dos espermatozoides.

	F.F.				F0				F1				F2				Sim. Lat.				Sim. A-P			
Dias	EXPERIME.		CONTROLE		EXPERIME.		CONTROLE		EXPERIME.		CONTROLE.		EXPERIME.		CONTROLE		EXPERIME.		CONTROLE		EXPERIME.		CONTROLE	
	$\overline{X}$	S	$\overline{X}$	S	$\overline{X}$	S	$\overline{X}$	S	$\overline{X}$	S	$\overline{X}$	S	$\overline{X}$	S	$\overline{X}$	S	$\overline{X}$	S	$\overline{X}$	S	$\overline{X}$	S	$\overline{X}$	S
-4	0,94	0,017	0,95	0,063	1983,1	41,1	2028,5	34,0	146,7	30,6	156,4	18,3	191,9	16,3	188,8	11,8	0,955	0,002	0,957	0,002	0,953	0,005	0,952	0,005
-2	0,99	0,164	0,94	0,026	1953,5	39,6	2064,9	45,2	140,7	6,3	161,5	14,9	187,3	13,1	194,7	11,9	0,956	0,002	0,956	0,002	0,953	0,003	0,95	0,005
0	1,0	0,832	0,94	0,014	1961,4	71,5	2000,0	35,3	154,8	60,1	160,0	14,7	182,3	16,4	188,9	9,2	0,955	0,002	0,957	0,002	0,952	0,005	0,951	0,005
2	1,0	0,318	0,94	0,031	1836,2*	57,8	1958,4*	37,3	146,2	35,1	147,4	14,1	184,2	15,3	181,3	10,2	0,955*	0,002	0,957*	0,002	0,952	0,004	0,952	0,005
9	0,95	0,094	0,95	0,032	1861,9	20,3	1886,4	34,2	135,1	11,3	148,2	10,7	185,4	13,0	184,5	8,6	0,955	0,001	0,957	0,001	0,952	0,004	0,952	0,005
16	1,0	0,261	0,94	0,006	1855,4	61,2	1934,7	23,5	139,4	29,3	148,9	14,4	189,6	12,1	182,8	10,5	0,955	0,004	0,956	0,002	0,953	0,006	0,951	0,005
23	0,96	0,108	0,94	0,013	1831,9*	45,9	1936,3*	26,8	143,5	15,2	147,6	11,1	181,1	13,9	185,8	11,9	0,954*	0,003	0,956*	0,002	0,95	0,006	0,951	0,004
30	0,94	0,027	0,94	0,003	1839,8	115,2	1920,2	33,1	143,1	15,2	145,8	9,7	179,0	11,7	180,2	7,8	0,953	0,009	0,956	0,002	0,948	0,009	0,952	0,004
37	0,98	0,232	0,95	0,031	1775,9**	75,9	1912,4**	24,9	141,2	19,5	146,8	12,0	170,0**	15,1	184,0**	12,1	0,955	0,005	0,957	0,002	0,949*	0,006	0,952*	0,004
44	0,95	0,086	0,95	0,027	1974,2	46,2	1955,3	40,7	141,8	9,5	147,7	13,3	184,7	13,3	191,9	10,0	0,956	0,003	0,956	0,002	0,951	0,005	0,951	0,004
51	0,96	0,181	0,94	0,004	1984,7	65,2	1959,2	50,1	149,1	18,3	156,8	12,5	183,1	12,4	188,1	11,2	0,955	0,002	0,955	0,002	0,95	0,005	0,95	0,004
58	0,95	0,048	0,95	0,038	1924,7	39,5	1983,2	28,2	142,6	10,0	151,2	15,6	188,2	13,6	193,6	10,7	0,956	0,002	0,957	0,002	0,95	0,004	0,951	0,005
65	0,96	0,037	1,0	0,100	1969,5	32,5	1969,0	40,8	141,1	11,1	155,3	28,6	191,8	12,8	182,0	8,8	0,956	0,003	0,956	0,002	0,953	0,003	0,951	0,005

EXPERIME.: experimental; F.F.: fator de forma; F0,F1 e F2: Harmônicas de Fourier zero, 1 e 2;Sim. Lat.: simetria lateral; Sim. A-P: simetria ântero posterior.
Valores com letras diferentes, na mesma linha, diferem significativamente entre grupos em um determinado dia $p \leq 0,05$.
*diferença estatística entre os grupos com $p \leq 0,10$, ** diferença estatística entre os grupos com $p \leq 0,05$

Tabela 9 – Coeficiente de correlação entre as variáveis avaliadas na análise computacional da compactação da cromatina dos espermatozoides do grupo experimental.

	Dif%	CV	Cromatina Anômala
Área (µm^2)	-0,63*	-0,15	-0,51*
Per. (µm)	-0,64*	-0,45	-0,31
Larg. (µm)	-0,59*	-0,24	-0,57*
Comp. (µm)	-0,59*	0,00	-0,38
L/C	-0,27	-0,44*	-0,53*
E	0,27	0,46*	0,51*
F.F.	-0,25	-0,77*	0,07
F0	-0,53*	0,08	-0,22
F1	-0,49*	-0,59*	0,04
F2	-0,24	0,19	-0,66*
Sim. Lat.	-0,38	0,11	0,08
Sim. A-P	-0,29	-0,16	-0,34

Per.: perímetro; Larg.: largura; Comp.: comprimento; L/C: razão largura-comprimento; E: elipsidade, F.F.: fator de forma; F0,F1 e F2: Harmônicas de Fourier zero, 1 e 2; Sim. Lat.: simetria lateral; Sim. A-P: simetria ântero posterior; Dif%: diferença percentual da média dos valores de "pixel; CV: coeficiente da variação
*:coeficiente de correlação significativo estatisticamente (α≤0,05)

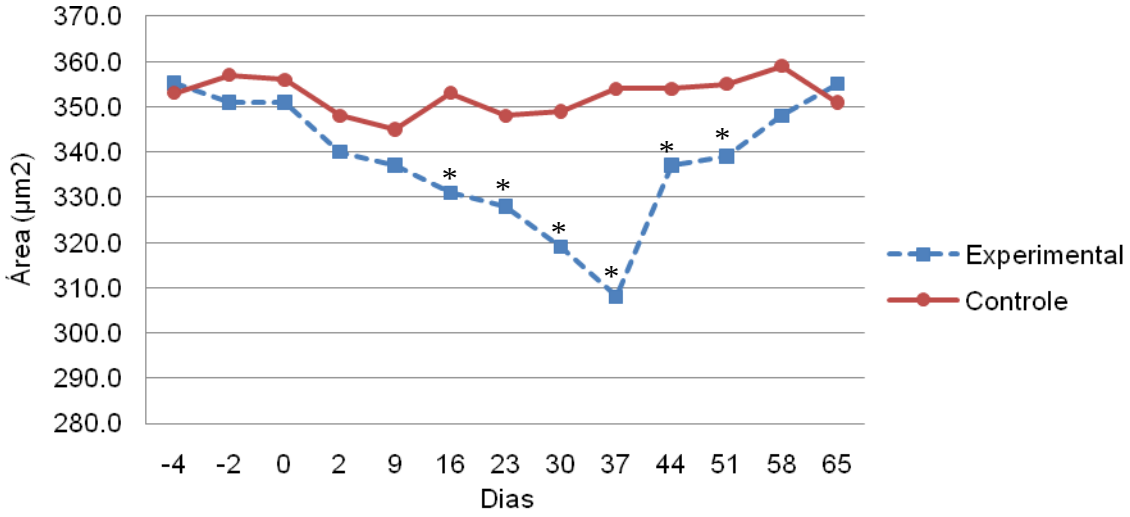

Figura 13 - Diagrama representativo com base nos valores da média da área (µm^2) dos espermatozoides (N=30). *: significa estatística entre os grupos.

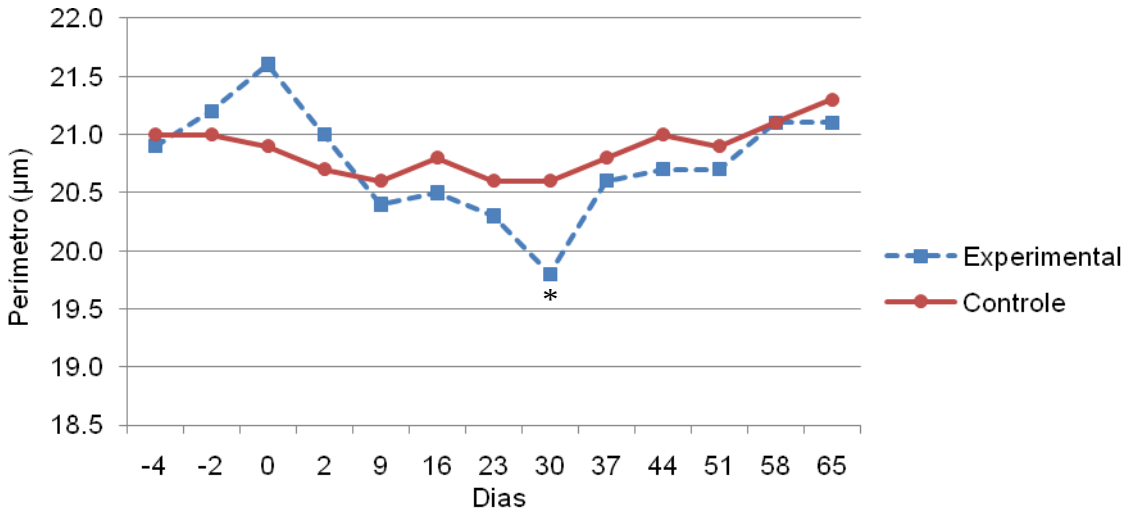

Figura 14 - Diagrama representativo com base nos valores da média do perímetro (µm) dos espermatozoides (N=30). *: significa estatística entre os grupos.

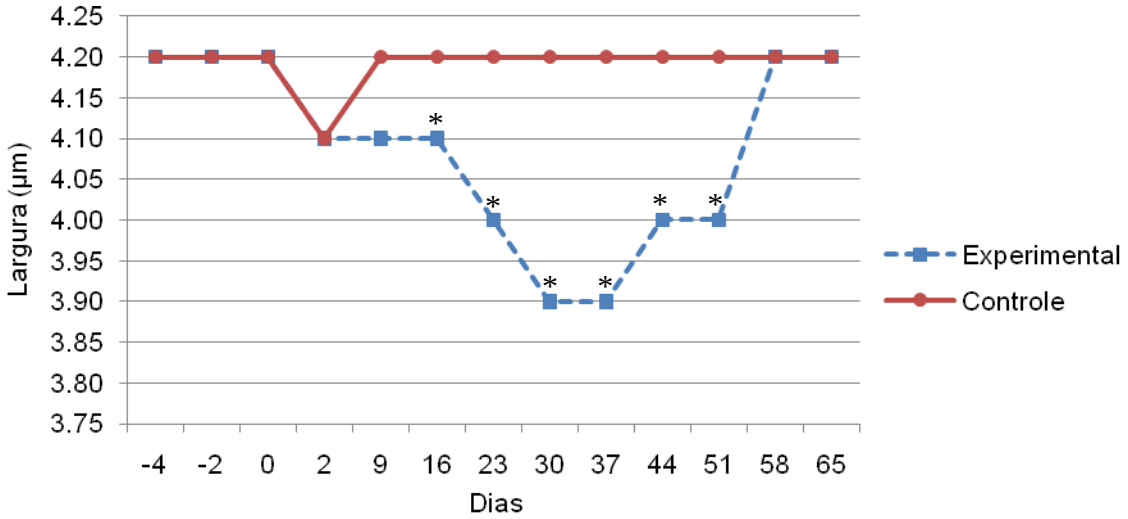

Figura 15 - Diagrama representativo com base nos valores da média da largura (µm) dos espermatozoides (N=30). *: significa estatística entre os grupos.

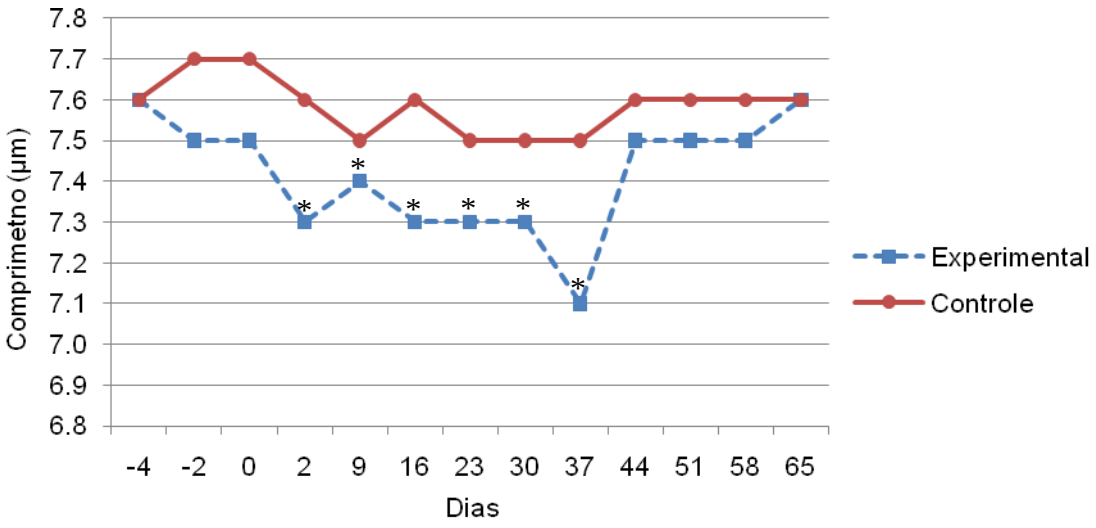

Figura 16 - Diagrama representativo com base nos valores da média do comprimento (µm) dos espermatozoides (N=30). *: significa estatística entre os grupos.

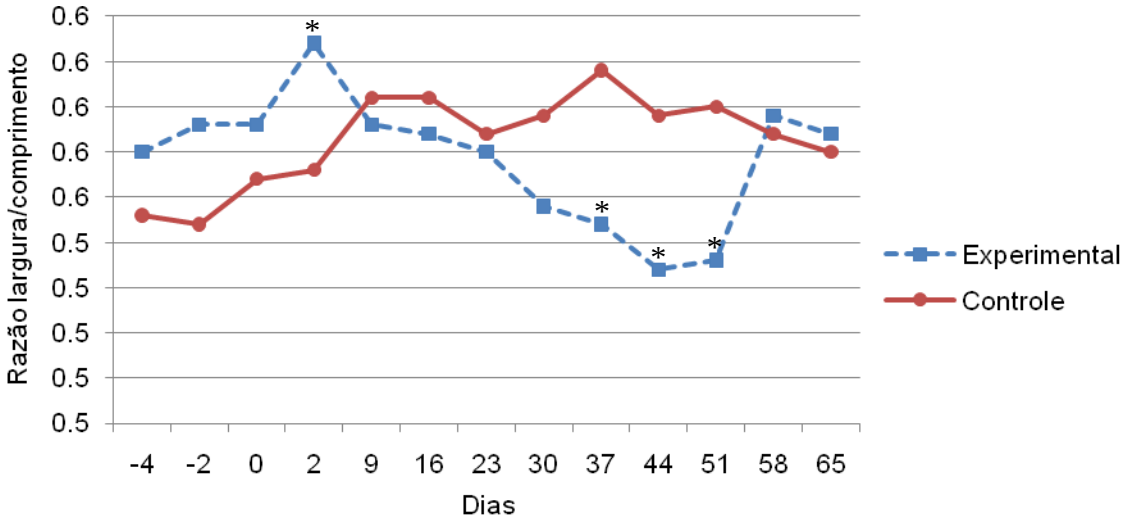

Figura 17 - Diagrama representativo com base nos valores da média da razão largura/comprimento dos espermatozoides (N=30). *: significa estatística entre os grupos.

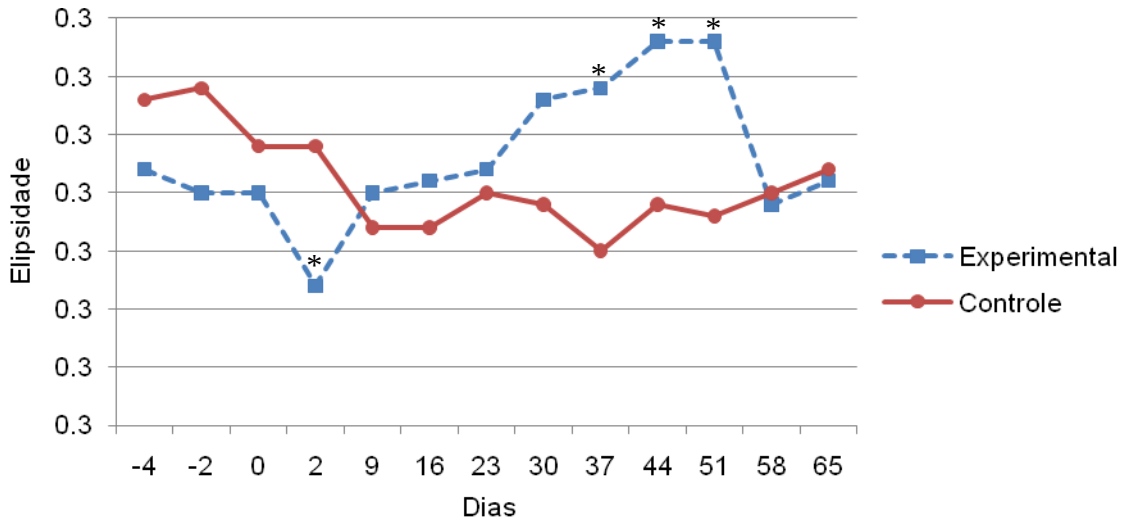

Figura 18 - Diagrama representativo com base nos valores da média da elipsidade dos espermatozoides (N=30). *: significa estatística entre os grupos.

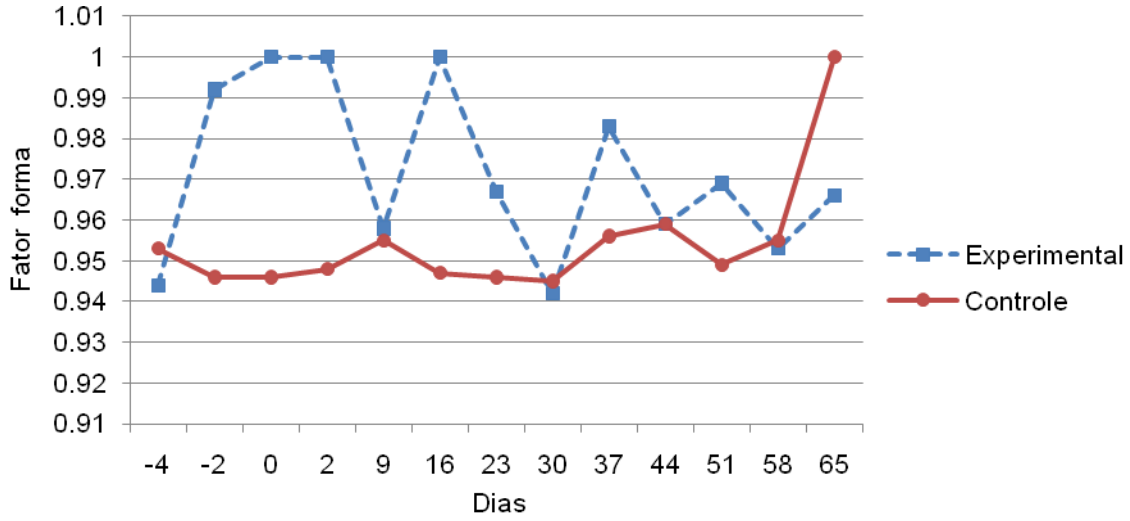

Figura 19 - Diagrama representativo com base nos valores da média do fator forma dos espermatozoides (N=30).

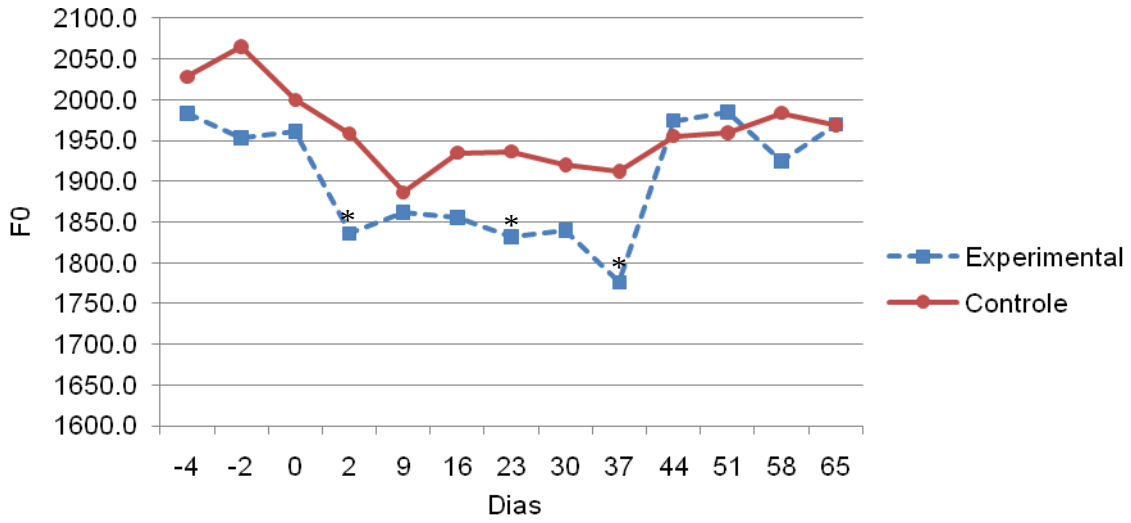

Figura 20 - Diagrama representativo com base nos valores da média do descritor Fourier F0 dos espermatozoides (N=30). *: significa estatística entre os grupos.

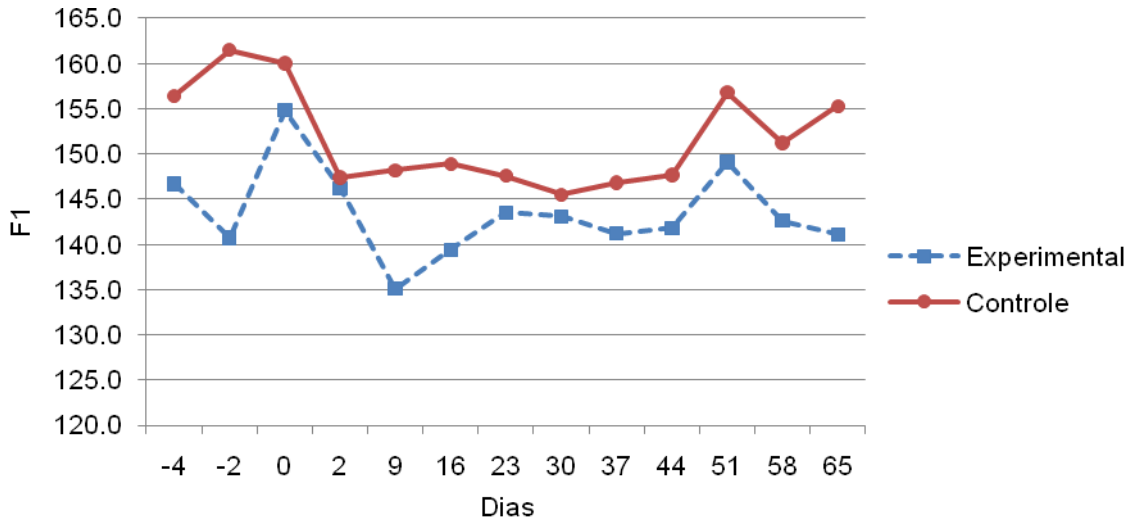

Figura 21 - Diagrama representativo com base nos valores da média do descritor Fourier F1 dos espermatozoides (N=30).

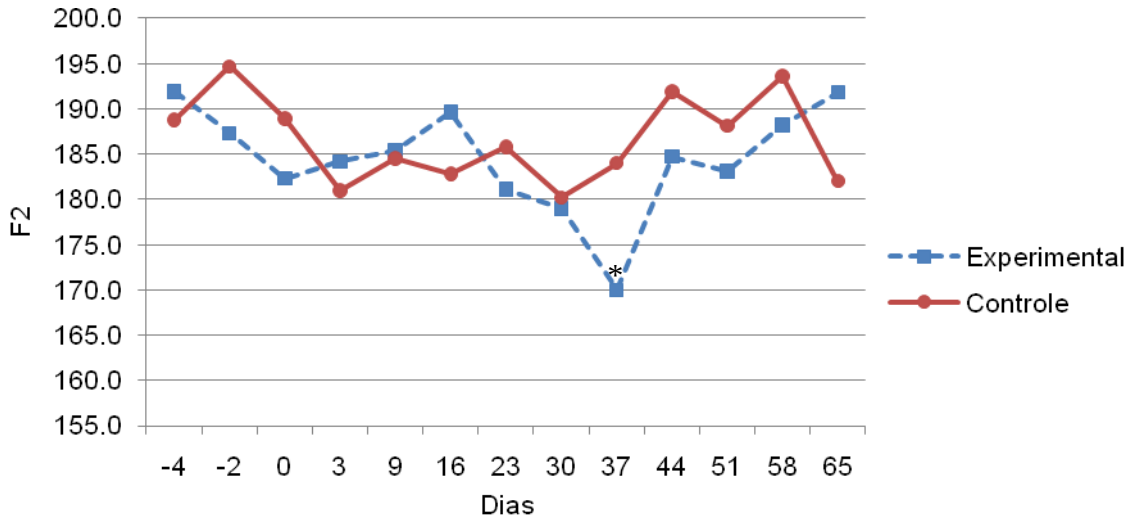

Figura 22 - Diagrama representativo com base nos valores da média do descritor Fourier F2 dos espermatozoides (N=30). *: significa estatística entre os grupos.

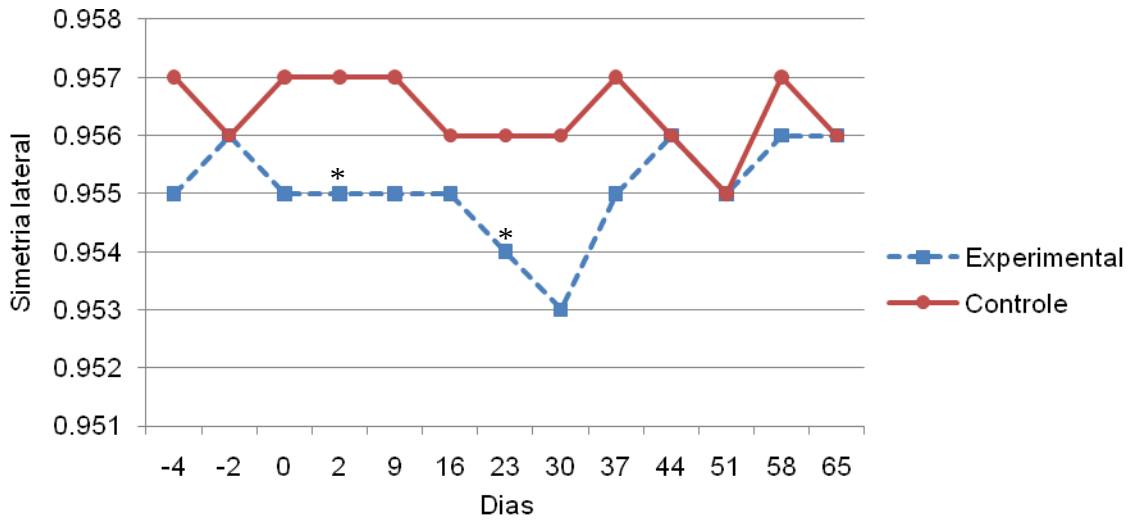

Figura 23 - Diagrama representativo com base nos valores da média da simetria lateral dos espermatozoides (N=30). *: significa estatística entre os grupos.

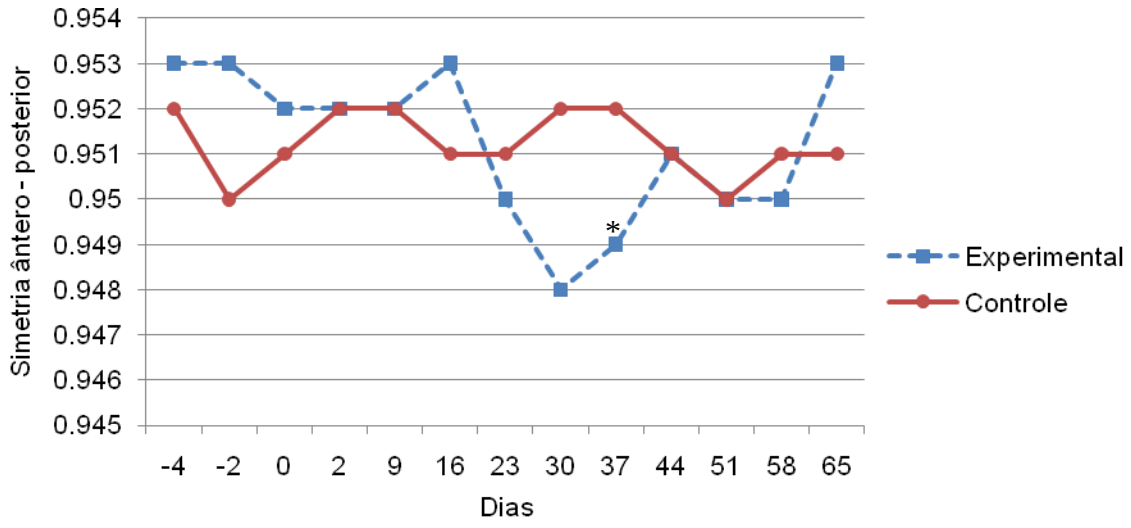

Figura 24 - Diagrama representativo com base nos valores da média da simetria ântero posterior dos espermatozoides (N=30). *: significa estatística entre os grupos.

5. DISCUSSÃO

5.1 – Concentração, motilidade e vigor dos espermatozoides

Os valores considerados até o tempo zero, tanto para os animais controle e experimentais, são considerados normais em termos de concentração, vigor e motilidade do sêmen, conforme Laing (1979), Hafez e Hafez (2000) e Mitchell e Doak (2003).

Os dados do trabalho indicam que o criptorquidismo experimental de dois dias induz alterações na qualidade do sêmen em coelhos, no que diz respeito ao decréscimo da concentração, vigor e motilidade.

Para um tempo de observação de 63 dias após interrupção do criptorquidismo, o vigor e a motilidade retornaram a valores próximos ao normal, o que não aconteceu com a concentração espermática. Provavelmente, para que a concentração retornasse a valores normais seria necessário um período de recuperação maior que o utilizado no trabalho. Semelhantes resultados foram encontrados por Beletti e Mello (1997), analisando sêmen de coelho nas mesmas condições, porém com três dias de criptorquidismo.

Moreira, Moura e Araujo (2001) ao pesquisar em carneiros Santa Inês, submetidos à insulação escrotal por sete dias, verificaram a redução significativa na concentração espermática oito dias após a retirada da bolsa de insulação. Somente 79 dias após o final da elevação da temperatura a concentração espermática voltou a apresentar valores semelhantes àqueles observados antes do procedimento. Provavelmente, a demora do retorno aos valores normais deva ser por ter havido um período de sete dias de insulação, três vezes maior que o utilizado no presente estudo.

Pezzini e colaboradores (2006), ao efetuarem o estudo em touros Curraleiros e Holandeses, encontraram diminuição na concentração espermática, a partir de cinco a nove dias até 37 a 44 dias após 48 horas de insulação escrotal. Já Mucciolo, Barnabe e Barnabe (1974), efetuando o mesmo tipo de estudo em ovinos, obteram

queda da concentração espermática logo no 10º dia após insulação escrotal de quatro dias e início da recuperação por volta do 20º dia. Já Vogler, Saacke e Bame (1993), após insulação escrotal de 48 horas de insulação em touros não chegaram a obter redução significativa da concentração de espermatozoides. Os coelhos demonstram que são mais lentos na recuperação da concentração de espermatozoides quando comparados com carneiros e touros, submetidos em até quatro dias de elevação da temperatura escrotal.

Beletti (1998), após três dias de criptorquidismo experimental, verificou em coelhos, degeneração de espermatócitos e espermátides, mas não de espermatogônias, o que provavelmente também deva ter ocorrido no presente trabalho, já que foi utilizado apenas dois dias de criptorquidismo.

Considera-se ainda que, mesmo não sendo originário diretamente dos espermatozoides, as células de Sertoli participam do suporte metabólico e físico das células da linhagem espermatogênica. Lesões nos túbulos seminíferos podem afetar as células de Sertoli e diminuir drasticamente a capacidade de produção de gametas, não por perda de tecido germinativo, mas sim devido à menor capacidade de suporte para a espermatogênese (SHARPE et al., 2003).

A diminuição da motilidade espermática, decorrente da elevação da testicular por diminuição da capacidade de termorregulação local, foi observada por diversos autores (KUMI-DIAKA; NAGARATNAM; RWUAAN, 1981, MEYERHOEFFER et al., 1985; RAO, 1967; VOGLER; SAACKE; BAME,1993).

O tempo decorrido entre o aumento de temperatura testicular e a detecção no ejaculado de redução da motilidade espermática descritos na literatura são variáveis, com intervalos de 10 a 15 dias (RAO, 1967, VOGLER et al., 1991), 15 a 20 dias (BRITO et al., 2003, VOGLER; SAACKE; BAME,1993), 28 dias (ARMAN et al., 2006, MEYERHOEFFER et al., 1985), ou imediatamente após a insulação (BONILLA et al., 2004). No presente trabalho, a redução da motilidade foi detectada já na primeira coleta após o criptorquidismo, com dois dias após a retirada da sutura. O mínimo valor de motilidade para o grupo experimental ocorreu entre 21 e 28 dias após o término do criptorquidismo, e elevou-se gradativamente até níveis normais no final do experimento. Beletti e Mello (1997), também observaram em coelhos a queda na

motilidade após a volta dos testículos ao escroto, entretanto a retomada do aumento só acorreu com 46 dias pós-criptorquidismo.

A queda de motilidade no grupo experimental deixa claro o efeito negativo do criptorquidismo sobre o número de células móveis nos ejaculados dos animais experimentais. A ascendência da curva de motilidade, demonstrada pelo grupo experimental 28 dias após o término do criptorquidismo, demonstra retomada nos níveis de motilidade, os quais tenderam a se aproximar aos níveis da fase um.

O vigor espermático sofreu redução significativa, demonstrando que não somente o número de espermatozoides é diminuído tão logo se estabeleça um processo degenerativo testicular. Apesar de ser um parâmetro subjetivo, constatou-se que o vigor foi mais baixo entre sete a 21 dias para os animais experimentais e é concordante com trabalho de Bonilla e colaboradores (2004) que relataram diminuição do vigor sete dias após insulação escrotal em bovinos.

5.2. Análise computacional da compactação da cromatina

Quando foram avaliados os espermatozoides como um todo, sem diferenciar aqueles com cromatina normal ou anômala, percebe-se que logo após e mesmo durante o criptorquidismo, os espermatozoides apresentaram, na média, cromatina mais frouxa, como observado na Dif%, tendo início no dia 9, com pico no dia 16, tendendo a retornar aos valores iniciais a partir do dia 23. Resultados semelhantes foram detectados por Beletti e Mello (1997), mas somente após 61 dias pós-criptorquidismo os níveis iniciais haviam sido recuperados. Nesse caso a metodologia foi a observação visual da resposta da metacromasia induzida, o que permite a identificação somente de alterações mais intensas.

Em touros, Barth (1993) ao utilizar a reação de Feulgen, também por meio da observação visual, descreveu que a utilização da insulação escrotal tem revelado variação significativa na compactação da cromatina, com aumento da taxa a partir do dia 16 após o início do tratamento, tendo o pico no dia 24, normalizando no dia 30 após a insulação. Recentemente, Fernandes e colaboradores (2008), também

utilizaram a reação de Feulgen em touros zebuínos com 5 dias de insulação escrotal, observaram aumento da anormalidade da cromatina entre 14 e 21 dias após o início do tratamento.

A análise computacional de esfregaços de sêmen de coelho corados com azul de toluidina permitiu uma avaliação menos subjetiva e mais sensível da cromatina dos espermatozoides. Vários estudos (BELETTI; COSTA; GUARDIEIRO, 2005; BELETTI, COSTA; VIANA, 2004; BELETTI, COSTA; VIANA, 2005a) concordam que a avaliação computacional pode encontrar alterações que não seriam percebidas pelas análises da concentração, vigor, motilidade e morfologia espermática.

Pela análise estrutural da cromatina espermática (SCSA) por meio de citômetro de fluxo, Karabinus e colaboradores (1997) verificaram ao estudar em touros, após 48 horas de insulação escrotal, que na primeira coleta pós-tratamento (dia 3) existe a susceptibilidade da cromatina à desnaturação, tendo o pico no dia 18. Ainda Paul e colaboradores (2008), ao aplicar água aquecida a 42ºC por 30 minutos no escroto de camundongos, observaram desnaturação significativa na cromatina após 24 horas de tratamento, com pico no dia 7 após a elevação da temperatura, tendendo a retornar aos valores inicias a partir do dia 28. Resultados semelhantes foram encontrados por Sailer e colaboradores (1997) ao aplicarem a mesma técnica em camundongos, porém observaram o retorno ao nível anterior do experimento a partir do dia 35.

Tejada e outros (1984) ressaltam que a técnica SCSA pode ser aplicada para controlar a qualidade do sêmen, controlar melhor certos tipos de fertilidades em humanos e animais, verificar a condição do sêmen usado na FIV e para auxiliar no diagnóstico de indivíduos que apresentem espermogramas normais e fertilidade reduzida. Porém, a utilização da técnica SCSA avalia o estado da cromatina, não permitindo uma avaliação simultânea entre a cromatina e a morfologia do espermatozoide, já que a SCSA utiliza o citômetro de fluxo e análise computacional respectivamente e a morfologia é avaliada em esfregaço de sêmen.

Por meio da análise computacional, buscou-se identificar os espermatozoides com cromatina anômala, ou seja, foram consideradas as cabeças que pela análise visual claramente possuem coloração alterada. Assim, na Figura 11, é facilmente observado um aumento no número de espermatozoides com cromatina anômala

entre os dias 16 e 51, com pico no dia 37. Estas alterações não foram identificadas nas figuras 9 e 10 que consideram todos os espermatozoides, porque além da quantidade de espermatozoides com estas anomalias ser pequena (14,8% do tratado, frente a 4,5% do controle, dia 37), provavelmente a cromatina dos demais espermatozoides já não apresente aquela pequena descompactação observada no início do experimento.

Silva, Mendes Jr e Beletti (2009) observaram que pequenas alterações na cromatina não interferem na FIV ou na evolução dos embriões até a fase de blastocisto. Por outro lado, trabalho com camundongos que tiveram aumento da temperatura testicular, por meio de água aquecida a 42ºC por 20 minutos, obtiveram diminuição da taxa de FIV e prenhez (JANNES et al., 1998; PAUL et al., 2008) e em ratos utilizando a mesma técnica houve redução da taxa de prenhez (SETCHELL et al., 1988). Assim, provavelmente as alterações da cromatina percebidas logo após o criptorquidismo poderiam interferir na capacidade fecundante dos espermatozoides.

O espermatozoide pode ter cromatina mais frouxa sem ser detectado por outras técnicas. Entretanto, o método de avaliação computacional pode identificar pequenas alterações na cromatina, mesmo quando não interfere na fertilidade. Portanto, se todos os espermatozoides estiverem com a cromatina um pouco mais frouxa, a média ficará alterada, conforme identificado no início dos gráficos de Dif%. Os espermatozóides que estão sendo eliminados entre os dias 9 e 16 após o criptorquidismo estavam na fase final da espermatogênese (SWIERSTRA, FOOTE, 1965) quando da elevação da temperatura e tiveram de maneira geral pequenas alterações de cromatina. Já aqueles eliminados nos dias 37 e 44, estavam em fase mais inicial da espermatogênese (espermatócito I) (SWIERSTRA, FOOTE, 1965) e apenas alguns espermatozóides tiveram sua cromatina alterada, mas de forma drástica, com certeza interferindo em sua capacidade de fecundação (BELETTI; MELLO, 2004).

5.3. Análise morfométrica computacional da cabeça dos espermatozoides

Ao utilizar o programa ASMA, Gravance e Davis (1995) descreveram em esfregaços de coelhos corados com rosa de Bengala e outros com hematoxilina, que as cabeças de espermatozoides em área, perímetro, largura e comprimento, são menores em todos os parâmetros, quando comparados com os resultados obtidos no presente trabalho. Mesmo utilizando programas computacionais, uma possível diferença é a metodologia empregada. Apesar da diferença, como no presente trabalho, estão sendo comparados dois grupos utilizando-se a mesma metodologia, o verdadeiro tamanho das cabeças é de pouca importância.

Já Beletti, Costa e Viana (2005a) ao estudar em esfregaços de touros de raças zebuínas e taurinas, em que foi utilizada a mesma metodologia do presente trabalho, constataram que as cabeças são maiores nos parâmetros área, razão largura e comprimento, fator forma, harmônicas de Fourier 0 e 2 e simetria ântero posterior e foram menores nos parâmetros perímetro, largura, comprimento, elipsidade, harmônica de Fourier 1 e simetria lateral.

As variáveis referentes ao tamanho da cabeça do espermatozoide (área, perímetro, largura e comprimento) apresentaram tendência a diminuir desde logo após o criptorquidismo, atingindo o ápice entre os dias 30 e 37, e tenderam a retornar ao normal após este período.

Como todos os espermatozoides foram considerados para medir o tamanho da cabeça, independentemente das alterações da cromatina, percebe-se que a leve descompactação que ocorreu logo após o criptorquidismo, pouco interferiu no tamanho da cabeça dos espermatozoides. Contudo, as grandes alterações na cromatina coincidem com o período onde a média das variáveis relacionadas a tamanho foi menor. A figura 12 mostra claramente que os espermatozoides com alterações mais intensas são realmente menores que os normais.
utilizada no presente trabalho em que foi possível avaliar a compactação da cromatina e a morfometria num mesmo esfregaço.

Sabe-se que a estrutura anormal da cromatina é devido a redução na quantidade de protamina P2, o que reflete na proporção P1/P2 interferindo

significativamente na condensação do material genético, ou seja, cabeças anômalas que possuem cromatina mais frouxa constituem cabeças maiores (YEBRA et al., 1998). No entanto, coelho possui apenas uma protamina compondo a cromatina espermática (COURTENS; KISTLER; PLOEN, 1995).

Cortes na estrutura cromatínica são provavelmente gerados durante a espermiogênese, quando as histonas são substituídas transitoriamente por proteína de transição e posteriormente por protaminas, podendo a protaminação não ocorrer de forma correta gerando distúrbios de condensação da cromatina dos espermatozóides e a persistência dessas aberrações no espermatozoide pode interferir no mecanismo normal de reparo (SOTOLONGO et al., 2005). No presente trabalho, uma possível aberração foi o aparecimento de cabeças menores associado à cromatina anômala. Pode-se pressupor que, com a elevação da temperatura testicular, houve a retirada total das histonas, mas sem ser acompanhada por reposição total de protaminas, permitindo um maior acesso do azul de toluidina, sem aumentar o volume da cabeça, o que favoreceria a fragmentação do DNA.

A razão largura-comprimento e a elipsidade tenderam a diminuir e aumentar a partir do dia 30, respectivamente. Essas variáveis tiveram pico máximo aos 44 dias e tenderam a retornar ao normal a partir do dia 51. Comparando com a cromatina, essas alterações coincidem com o aumento do número de espermatozoides portadores de grandes alterações cromatínicas, levando-nos a imaginar que os espermatozoides possuem morfologia mais alongada.

Fator de forma mostra um comportamento muito instável no grupo experimental ao contrário do controle, antes mesmo do criptorquidismo, demonstrando que isso provavelmente não tenha relação com a elevação da temperatura e não houve diferença estatística.

A transformada de Fourier é uma integral que gera infinitas harmônicas, sendo as três primeiras frequentemente utilizadas para descrever matematicamente formas geométricas, inclusive a forma da cabeça de espermatozoides (OSTERMEIER et al., 2001b). A primeira harmônica (F0) está mais relacionada ao tamanho; a segunda (F1) e terceira (F2) são mais relacionadas com a forma propriamente dita. Os resultados demonstraram que as harmônicas da transformada

de Fourier obtiveram, no geral, uma tendência de queda nos valores após o criptorquidismo, sendo que a F0 e F2 atingiram seu pico no dia 37 e a F1 no dia 9.

Como esperado, a F0 coincide com as medidas menores de tamanho da cabeça. No entanto, F2 também demonstrou um pico em torno do dia 37, talvez não devido à diminuição do tamanho, mas devido às alterações observadas nas medidas de simetria, já que F2 está mais relacionada à forma.

Apesar de não haver diferença estatística, o pico da F1 é coincidente com o pico das alterações leves da cromatina. Talvez, essa variável tenha identificado uma leve alteração de forma provocada pela menor compactação da cromatina e que não tenha sido identificada pelas demais variáveis, as quais não são sensíveis o suficiente para isto.

As harmônicas da transformada de Fourier não se correlacionam com uma forma ou alteração de forma específica, apenas demonstra por meio de valores alterações inespecífica da forma.

Em relação à simetria lateral e ântero posterior, houve uma tendência à diminuição após o criptorquidismo, com pico no dia 30. Isso ocorreu imediatamente anterior ao aumento no número de espermatozoides com grandes alterações na cromatina, não nos permitindo correlacioná-la com as alterações de cromatina. De qualquer forma, a diminuição da simetria demonstra deficiência na espermiogênese e diminui a capacidade de fertilização do espermatozoide por interferir na hidrodinâmica e consequentemente no seu deslocamento progressivo e retilíneo (BELETTI e COSTA, 2003).

Quanto à correlação entre as variáveis avaliadas na análise computacinal da compactação da cromatina dos espermatozoides do grupo experimental (Tabela 9), percebe-se que as variáveis morfométricas área, perímetro, largura e comprimento são correlacionadas negativamente para a Dif%, a área e largura para cromatina anômala e somente o perímetro para CV, ou seja, espermatozoides com cabeças com cromatina mais frouxa tendem a ser menores.

Os coeficientes de correlação entre L/C e as variáveis relacionadas à compactação de cromatina foram negativas para CV e cromatina anômala. Contrariamente ao que foi observado em relação à elipsidade (e) para as mesmas

variáveis. Ambos os casos demonstram que espermatozóides com cromatina mais heterogênea tendem a possuir cabeça mais alongada.

Já o fator de forma teve correlação significativa com heterogeneidade, assim como para descompactação da cromatina, porém não significativamente. Cromatina anômala associada à cabeça menor de espermatozoide também foi observado por Beletti, Costa e Guardieiro (2005). Em galos não foi observada correlação estatisticamente significativa em espermatozoides entre as variáveis analisadas referentes ao tamanho da cabeça e a compactação de cromatina (RODRIGUES; ROCHA; BELETTI, 2009). Ferrari e colaboradores (1998) combinaram a análise visual para avaliação em esfregaços da forma da cabeça do espermatozoide de bovinos tratados pela reação de Feulgen. Entre os achados está a correlação entre pescoço estreito e cabeça piriforme com as alterações cromatínicas. Os trabalhos de Ostermeier et al. (2001a) e Sailer, Jost e Evenson (1996) descreveram que há correlação significativa entre anomalias na cromatina e alterações na morfologia da cabeça do espermatozoide, por meio da técnica SCSA. Essa metodologia não avalia simultaneamente os dois parâmetros (morfologia da cabeça e cromatina) num mesmo espermatozoide do esfregaço para ser utilizado para avaliar a correlação, diferente da metodologia utilizada no presente trabalho.

Quando comparados com os espermatozóides de touros, as harmônicas de Fourier zero e 2 geralmente possuem correlação negativa, e Fourier 1, positiva em relação a CV e Dif% (BELETTI; COSTA; GUARDIEIRO, 2005). Entretanto no presente estudo observou-se o oposto para CV e correlação negativa entre Fourier 1 e Dif%.

Quanto à simetria lateral e ântero posterior não foi possível observar correlação estatisticamente significativa, não sendo possível fazer qualquer inferência sobre a influência da compactação da cromatina sobre a forma da cabeça do espermatozoide.

6. CONCLUSÕES

1) A concentração espermática, motilidade e o vigor foram influenciados negativamente pela elevação da temperatura testicular transitório, mas uma vez cessada a fonte do estresse existe uma lenta recuperação dos valores.

2) A estrutura da cromatina foi influenciada negativamente pela elevação da temperatura testicular transitória, no entanto dois dias de criptorquidismo experimental em coelhos não foram suficientes para gerar grande quantidade de espermatozóides com alterações intensas na cromatina espermática.

3) O tamanho da cabeça do espermatozoide possui tendência a diminuir quando o testículo sofre elevação da temperatura testicular transitório, podendo ser acompanhada por alterações na forma.

REFERÊNCIAS

AMANN, R. P.; HAMMERSTEDT, R. H.; VEERAMACHANENI, D. N. R. The epididymis and sperm maturation: a Perspective. **Reproduction, fertility, and development**. East Melbourne, v. 5, n. 4, p. 361-381, 1993.

AMMANN, R. P.; FOOTE, R. H. Artificial Vagina for Rabbits, **Journal of Andrology**, Lawrence, v. 25, n. 2, p. 184-185, 2004.

ANWAY, M.D.; LI, Y.; RAVINDRANATH, N.; DYM M.; GRISWOLD M. D. Expression of testicular germ cell genes identified by differential display analysis. **Journal of Andrology**, Lawrence, v. 24, n. 2, p. 173-184, 2003.

ARMAN, C.; CASARES, P. I.; SANCHEZ-PARTIDA, L. G.; SETCHELL, B. P. Ram sperm motility after intermittent scrotal insulation evaluated by manual and computer-assisted methods. **Asian Journal of Andrology**, Shanghai, v. 8, n. 4, p. 411-478, 2006.

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

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

BALHORN, R. A model for the structure of chromatin in mammalian sperm. **The Journal of cell biology**. New York, v. 93, n. 2, p. 298-305, 1982.

BALHORN, R. The protamine family of sperm nuclear proteins. **Genome biology**, London, v. 8, n. 9, p. 227-235, 2007.

BANKS, S.; KING, S. A.; IRVINE, D. S.; SAUNDERS, P. T. K. Impact of a mild scrotal heat stress on DNA integrity in murine spermatozoa. **Society for Reproduction and Fertility**, Nottingham, v. 129, n. 4, p. 505-514, 2005.

BARNABE, R. C. Degeneração testicular experimental em reprodutores da espécie suína. **Revista da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo**, v. 8, n. 2, p. 499-507, 1970.

BARTH, A. D. Insights to the pathogenesis of sperm abnormalities in bulls. In: Congresso Brasileiro de Reprodução Animal, 10., 1993, Belo Horizonte. **Anais**. Belo Horizonte: Colégio Brasileiro de Reprodução Animal, 1993. p.1-14.

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

BEDFORD, J. M. Influence, of abdominal temperature on epididymal function in the rat and rabbit. **The American Journal of Anatomy**, New York, v. 152, p. 509-522, 1978.

BEDWAL, R. S.; BAHUGUNA, A. Zinc, copper and selenium in reproduction. **Experientia**. Basel, Birkhäuser Verlag, v. 50, p. 626-640, 1994.

BELETTI, M. E.; COSTA, L. F. A systematic approach to multi-species sperm morphometrical characterization. **Analytical and Quantitative Cytology and Histology**, St Louis, v. 25, n. 2, p. 97-107, 2003.

BELETTI, M. E.; COSTA, L. F.; GUARDIEIRO, M. M. Morphometric features and chromatin condensation abnormalities evaluated by toluidine blue staining in bull spermatozoa. **Brazilian Journal of Morphological Sciences**, Campinas, v. 22, n. 2, p. 85-90, 2005.

BELETTI, M. E.; COSTA, L. F.; VIANA, M. P. A computational approach to the characterization of bovine sperm chromatin alterations. **Biotechnic and Histochemistry**, Louisville, v. 79, n. 1, p. 17-23, 2004.

BELETTI, M. E.; COSTA, L. F.; VIANA, M. P. A comparison of morphometric characteristics of sperm from fertile *Bos taurus* and *Bos indicus* bulls in Brazil. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 85, n. 1-2, p. 105-116, 2005a.

BELETTI, M. E.; COSTA, L. F.; VIANA, M. P. A spectral framework for sperm shape characterization. **Computers in Biology and Medicine**, Washington, v. 35, n. 6, p. 463-473, 2005b.

BELETTI, M. E.; FONTOURA, L. C. A systematic approach to multi-species sperm morphometrical characterization. **Analytical and Quantitative Cytology and Histology**, St Louis, v. 25, n. 2, p. 97-107, 2003.

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

BELETTI, M. E.; MELLO, M. L. S. Testicular and semen alteration after three days of experimental cryptorchidism in rabbit. In: I Encontro Nacional de Pós-Graduação em Áreas da Biologia Estrutural, 1997, Campinas. **Brazilian Journal of Morphological Sciences**, 1997. v. 14. p. 88.

BONILLA, L.; GUIMARÃES, J. D.; SANTOS, A. Q.; BORGES, J. C.; GURZONI, W. S.; ZAMPELINI, B. Effects of scrotal insulation on the physical and morphologics characteristics of bovine semen. In: INTERNATIONAL CONGRESS ON ANIMAL REPRODUCTION, 15., Porto Seguro. **Abstracts…** Belo Horizonte: CBRA, 2004. p. 237.

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**, Stoneham, v. 61, n. 2/3, p. 511-528, 2004.

BRITO, L. F. C.; SILVA, A. E. D. F.; BARBOSA, R. T.; UNANIAN, M. M.; KASTELIC, J; P. Effects of scrotal insulation on sperm production, semen quality, and testicular echotexture in *Bos indicus* and *Bos indicus* × *Bos taurus* bulls **Theriogenology**, Stoneham, v. 79, n. 1/2, p. 1-15, 2003.

CALVIN, H.I.; YU, C.C.; BEDFORD, J.M. Effects of epididymal maturation, zinc (II) and copper (II) on the reative sufhydryl content of structural elements in rat spermatozoa. **Experimental cell research**, New York, v. 81, p. 333-341, 1973.

CARPENTER, J. W. Chemical restraint / anesthesic / analgesic agents used in rabbits. In:_____. **Exotic animal formulary**, St. Louis: Elsevier, 3th ed., 2005. p.419-424.

COSTA, L. F.; CESAR Jr, R. M. **Shape classification and analysis: theory and practice**, Boca Raton, CRC, 2009. 662p.

COURTENS J.L.; KISTLER, W.S.; PLOEN, L. Ultrastructural immunolocalisation of histones (H2B, H3, H4), transition protein (TP1) and protamine in rabbit spermatids and spermatozoa nuclei. Relation to condensation of the chromatin. **Reproduction, nutrition, development**, Paris, v. 35, n. 5, p. 565-582, 1995.

DAVIS, R.O.; BAIN, D.E.; SIEMERS, R.J.; THAL, D.M.; ANDREW, J.B.;GRAVANCE, C.G. Accuracy and precision of the CellForm-Human automated sperm morphometry instrument. **Fertility and Sterility**, Birmingham, v. 58, n. 4, p. 763-769, 1992.

EILS, R; ATHALE, C. Computational cell biology. **The Journal of Cell Biology**, New York, v. 161, n. 3, p. 477-481, 2003.

ERENPREISS, J.; BARS, J.; LIPATNIKOVA, V.; ERENPREISA, J.; ZALKALNS, J. Comparative study of cytochemical tests for sperm chromatin integrity. **Journal of Andrology**, Lawrence, v. 22, n. 1, p. 45-53, Jan/Fev. 2001.

ERENPREISS, J.; JEPSON, K.; GIWERCMAN, A.; TSAREV, I.; ERENPREISA, J.; SPANO, M. Toluidine blue cytometry test for sperm DNA conformation: comparison with the flow cytometric sperm chromatin structure and TUNEL assays. **Human Reproduction**, Oxford, v. 19, n. 10, p. 2277-2282, 2004.

EVENSON, D. P.; DARZYNKIEWICZ, Z.; MELAMED, M. R. Relation of mammalian sperm chromatin heterogeneity to fertility. **Science**, Washington, v. 210, n. 4474, p. 1131-1133, 1980.

FERNANDES C. E.; DODE, M. A.; PEREIRA.; D, SILVA, A. E. Effects of scrotal insulation in Nellore bulls (*Bos taurus indicus*) on seminal quality and its relationship with in vitro fertilizing ability. **Theriogenology,** Stoneham, v. 70, n. 9, P. 1560-1568, 2008.

FERRARI, M. R.; SPIRITO, S. E.; GIULIANO, S. M.; FERNÁNDEZ, H. Á. Chromatin cytophotometric analysis of normal bovine espermatozoa. **Andrologia**, Berlin, v. 30, n. 2, p. 85-89, 1998.

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

GARRETT, C.; BAKER, H. W. A new fully automated system for the morphometric analysis of human sperm heads. **Fertility and Sterility**, Birmingham, v. 63, n. 6, p. 1306-1317, 1995.

GERGELY, A.; KOVANCI, E.; SENTURK, L.; COSMI, E.; VIGUE, L.; HUSZAR, G. Morphometric assessment of mature and diminished-maturity human spermatozoa: sperm regions that reflect differences in maturity. **Human Reproduction**, Oxford, v. 14, n. 8, p. 2007-2014, 1999.

GLEDHILL, B. L. Studies on the DNA content, dry mass and optical even of morphologically normal and abnormal bull spermatozoa heads. **Acta Veterinaria Scandinavica**, Gardermoen, v. 7, n. 1, p. 1-20, 1966.

GRAVANCE, C. G.; CHAMPION, Z. J.; SAX-GRAVANCE, S. K.; CASEY, P. J. Percentage of normal sperm heads is significantly increased by Percoll separation of semen. **International Journal of Andrology**, Lawrence, v. 21, n. 2, p. 116-119, 1998a.

GRAVANCE, C. G.; CHAMPION, Z.; LIU, I. K.; CASEY, P. J. Sperm head morphometry analysis of ejaculate and dismount stallion semen samples**. Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 47, n. 1-2, p. 149-155, 1997.

GRAVANCE, C. G.; GARNER, D. L.; PITT, C.; VISHWANATH, R.; SAXGRAVANCE, S. K.; CASEY, P. J. Replicate and technician variation associated with computer aided bull sperm head morphometry analysis (ASMA). **International Journal of Andrology**, Lawrence, v. 22, n. 2, p. 77-82, 1999.

GRAVANCE, C. G.; LIU, I. K.; DAVIS, R. O.; HUGHES, J. P.; CASEY, P. J. Quantification of normal head morphometry of stallion spermatozoa. **Journal of Reproduction and Fertility**, Cambridge, v. 108, n. 1, p. 41-46, 1996.

GRAVANCE, C. G.; VISHWANATH, R.; PITT, C.; GARNER, D. L.; CASEY, P. J. Effects of cryopreservation on bull sperm head morphometry. **Journal of Andrology**, Lawrence, v. 19, n. 6, p. 704-709, 1998b.

GRAVANCE, C.G.; DAVIS, R.O. Automated sperm morphometry analysis (ASMA) in the rabbit. **Journal of Andrology**, Lawrence, v. 16, n. 1, p. 88-93, 1995.

GRIFFIN, J.E. **Male reproductive function**. In: GRIFFIN, J.E.; OJEDA, S.R (Eds.). Textbook of endocrine physiology. New York: Oxford University Press, 1988. p.165-185

HAFEZ, B., HAFEZ, E.S.E. **Reproduction in farm animals**, Lippincoff: Williams & Wilkins, 2000. 512 p.

HAINES, G.; MARPLES, B.; DANIEL, P.; MORRIS I. DNA damage in human and mouse spermatozoa after *in vitro*-irradiation assessed by the comet assay. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, New York, v. 444, n. 1, p. 79-91, 1998.

HARR, R. Characterization of spermatozoa by planar morphometry**. Clinical Laboratory Science**, Washington, v. 10, n. 4, p. 190-196, 1997.

HENKEL, R.; BITTNER, J.; WEBER, R.; HUTHER, F.; MISKA, W. Relevance ofzinc in human sperm flagella and its relation to motility. **Fertility Sterility**, New York, v.71,n.6. p.1138-1143, 1999.

HIGUCHI, H.; NAKAOKA, M.; KAWAMURA, S.; KAMITA, Y.; KOHDA, A.; SEKI, T.; Application of computer-assisted sperm analysis system to elucidate lack of effects of cyclophosphamide on rat epididymal sperm motion. **Toxicological Sciences**, Orlando, v. 26, n. 2, p. 75-83, 2001.

HIRAI, M.; BOERSMA, A.; HOEFLICH, A.; WOLF, E.; FOLL, J.; AUMULLER, T. R.; BRAUN, J.; Objectively measured sperm motility and sperm head morphometry in boars (*Sus scrofa*): relation to fertility and seminal plasma growth factors. **Journal of Andrology**, Lawrence, v. 22, n. 1, p.104-110, 2001.

JAGOE, J.R.; WASHBROOK, N.P.; HUDSON, E.A. Morphometry of spermatozoausing semiautomatic image analisys. **Journal of Clinical Pathology**, London, v. 39, n. 12, p. 1347-1352, 1986.

JANNES, P.; SPIESSENS, C.; VAN der AUWERA , I.; HOOGHE, T. D.; VERHOEVEN, G.; .VANDERSCHUEREN, D. Male subfertility induced by acute scrotal heating affects embryo quality in normal female mice. **Human Reproduction**, Oxford, v. 13, n. 2, p. 372-375, 1998.

KARABINUS, D. S., VOGLER, C. J.; SAACKE, R. G.; EVENSON, D. P. Chromatin structural changes in sperm after scrotal insulation of holstein bulls. **Journal of Andrology**, Lawrence, v. 18, n. 5, p. 549-555, Sep/Oct.1997.

KASTELIC, J. P.; COOK, R. B.; COULTER, G. H.; SAACKE, R. G. Insulating the scrotal neck affects semen quality and scrotal/testicular temperatures in the bull. **Theriogenology**, Stoneham, v. 45, n.5, p. 935-942, 1996.

KATZ, D. F.; OVERSTREET, J. W.; SAMUELS, S. J.; NISWANDER, P. W.; BLOOM,T. D.; LEWIS, E. L. Morphometric analysis of spermatozoa in the

assessment of human male fertility. **Journal of Andrology**, Lawrence, v. 7, n. 4, p. 203-210, 1986.

KUMI-DIAKA, J.; NAGARATNAM, V.; RWUAAN, J. S. Seasonal and age-related changes in semen quality and testicular morphology of bulls in a tropical environment. **The Veterinary Record**, v. 108, n. 3, p. 13-15, 1981

KVIST, U.; BJORNDHAL, L.; KJELLBERG, L. Sperm nuclear zinc, chromatinstability and male fertility. **Scanning Microscopy**, Chicago, v. I, p. 1241-1247,1987.

LAING, J. A. (Org.). **Fertility and infertility in domestic animals**, 3. ed. London: Baillière Tindall, 1979. 272 p.

LOVE, C. C.; KENNEY, R. M. Scrotal heat stress induces altered sperm chromatin structure associated with a decrease in protamine disulfide bonding in the. **Biology of reproduction**, Madison, v. 60, n. 3, p. 615-620, 1999.

Luiz, André (Espírito) **Conduta espírita.** Ditado pelo espírito André Luiz; [psicografado por] Waldo Vieira. 21. ed. Rio de Janeiro: Federação Espírita Brasileira, 1998. 58 p.

MACLEOD, I.C.; IRVINE, D.S. The predictive value of computer-assisted analysis in the context of a donor insemination programme. **Human Reproduction**, Oxford, v. 10, n. 3, p. 580-586, 1995.

MANUAL para exame andrológico e avaliação de sêmen animal / Colégio Brasileiro de Reprodução Animal. 2.ed. Belo Horizonte: CBRA, 49 p. 1998.

MAZRIMAS, J.A.; CORZETT, M.; CAMPOS, C.; BALHORN, R. A corrected primary sequence for bull protamine. **Biochimica et biophysica acta.** Amsterdam, v.872,n.1-2, p.11-5, 1986.

MELLMAN, I; MISTELI, T. Computational cell biology. **The Journal of Cell Biology**, New York, v. 161, n. 3, p. 463-464, 2003.

MELLO, M. L.; Induced metachromasia in bull spermatozoa. **Histochemistry**, Smithville, v. 74, n. 3, p. 387-92, 1982.

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

MIES FILHO, A. Alguns aspectos da esterilidade ovina. **Boletim da Sociedade Paulista de Medicina Veterinária**, v. 9, p. 119-138, 1956.

MITCHELL, M. S.; DOAK, G. A. **Artificial insemination and embryo transfer of dairy and beef cattle including information pertaining to goats, sheep, horses, swine and other animals: a handbook and laboratoty manual for students operators, and persons involved in genetic improvement**. 9. ed. New Jersey: Prentice Hall, 2003. 416 p.

MOORE, C. R. Heat application and testicular degeneration: the function of escrotum. **The American Journal of Anatomy**, New York, v. 34, 337-358, 1924.

MOORE, C. R.; OSLUND, R. Experiments on the sheep testis-cryptorchidism, vasectomy and scrotal insulation. **The American journal of physiology**. Washington, v. 67, p. 595-607, 1924.

MOREIRA, E. P.; MOURA, A. A. A.; ARAUJO, A. A. Efeitos da insulação escrotal sobre a biometria testicular e parâmetros seminais em carneiros da raça Santa Inês criados no estado do Ceará. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, vol. 30, n.6, p. 1704-1711, 2001.

MORGENTALER, A.; STAHL, B. C.; YIN, Y. Testis and temperature: an historical, clinical, and research perspective. **Journal of Andrology**, Lawrence, v. 20, n. 2, p. 189-195, 1999.

MUCCIOLO, R. G.; BARNABE, R. C.;BARBABE, V. H. Variações no quadro espermático de carneiros submetidos à degeneração testicular experimental. **Revista da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo**, v. 11, p. 155-177, 1974.

NAUGHTON, C. K.; NELSON, D. R.; THOMAS Jr, A. J. Development of an inexpensive artificial vagina for semen collection from rabbits. **Journal of Andrology**, Lawrence, v. 24, n. 5, p. 712-715, 2003.

OLIVA, R. Protamines and male infertility. **Human Reproduction Update**, Oxford, v. 13, n. 4, p. 417-435, 2006.

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.

OSTERMEIER, G. C.; SARGEANT, G. A.; YANDELL B. S.; EVENSON, D. P.; PARRISH, J. J. Relationship of bull fertility to sperm nuclear shape. **Journal of Andrology**, Lawrence, v. 22, n. 4, p. 595-603, 2001a.

OSTERMEIER, G. C.; SARGEANT, G. A.; YANDELL, T. B. S.; PARRISH, J. J. Measurement of bovine sperm nuclear shape using Fourier harmonic amplitudes. **Journal of Andrology**, Lawrence, v. 22, n. 4, p. 584-594, 2001b.

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**, Bristol, v. 136, p. 73-84, 2008.

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**, New York, v. 75, n. 1, p. 40-47, 2008.

PEZZINI, T. G. ; SARTORI, R ; SILVA, T. A. S. ; MACMANUS, C. ; MARIANTE, A. da S. Características seminais de touros Curraleiros e Holandeses submetidos a insulação escrotal. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 41, p. 863-868, 2006.

PLOEN, L. An electron microscope study of the immediate effects on spermateleosis of short-time experimental cryptorchidism in the rabbit. **Virchows Archiv. B, Cell pathology including molecular pathology**, Berlin, v. 10, p. 293-309, 1972.

PRABHAKAR, J.; CHIMBOMBI, J.; MALMGREN, L.; FREDRIKSSON, G.; MADEJ, A. Effects on testosterone and LH concentrations of induced testicular degeneration in bulls. **Acta Veterinaria Scandinavica**, Gardermoen, v. 31, n. 4, p. 505-507, 1990.

RAO, A. R. Experimental testicular degeneration in a bull. **The Indian Veterinary Journal**, v. 44, n. 12, p. 1022-1024, 1967.

REN, L.; MEDAN, M. S.; OZU, M.; LI, C.; WATANABE, G.; TAYA, K. Effects of experimental cryptorchidism on sperm motility and testicular endocrinology in adult male rats. **Journal of Reproduction and Development**, Tokyo, v. 52, n. 2, p. 580-586, 2006.

RODRIGUES, A. C. N.; ROCHA, J. V.; BELETTI, M. E. Análise computacional da compactação da cromatina de espermatozoides de galo. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte , v. 61, n. 6, p. 1302-1307, 2009.

RUSSEL, L.D.; ETTLIN, R.A.; HIKIN, A. P. S. CLEGG, E. D. **Histological and histopathological evaluation of the testis**. Bolesta: Cache River Press, 1990. 289 p.

RUSSEL, L.D.; FRANÇA, L.R. Building a testis. **Tissue & Cell**. Edinburgh, v. 27, n. 2, p. 129-146, 1995.

RUSSELL, L. D.; LEE,I. P.; ETTLIN, R.; MALONE, J. P. Morphological pattern of response after administration of procarbazine: alteration of specific cell associations during the cycle of the seminiferous epithelium of the rat. **Tissue & Cell**, Edinburgh, v. 15, n. 3, p. 391-404, 1983.

SAILER, B. L.; JOST, L. K; EVENSON, D. P. Bull sperm morphometry related to abnormal chromatin structure and fertility. **Cytometry**, New York, v. 24, n. 2, p. 167-173, 1996.

SAILER, B. L.; SARKAR, L. J.; BJORDAHL, J. A.; JOST, L. K.; EVENSON, D. P. Effects of Heat Stress on Mouse Testicular Cells and Sperm Chromatin Structure. **Journal of Andrology**, Lawrence, v. 18, n. 3, p. 294-301, May/Jun. 1997

SANCHO, M.; PEREZ-SANCHEZ, F.; TABLADO, L.; DE MONSERRAT, J. J.; SOLER, C. Computer assisted morphometric analysis of ram sperm heads: evaluation of different fixative techniques. **Theriogenology**, Stoneham, v. 50, n. 1, p. 27-37, 1998.

SARAVIA, F.; NÚÑEZ-MARTÍNEZ, I.; MORÁN,J. M.; SOLER, C.; MURIEL, A.; RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, H.; PEÑA F. J. Differences in boar sperm head shape and dimensions recorded by computer-assisted sperm morphometry are not related to chromatin integrity. **Theriogenology**, Stoneham, v. 68, n.2, p. 196-203, 2007.

SCHRADER, S.M.; TURNER, T.W.; SIMON, S.D. Longitudinal study of semen quality of unexposed workers: sperm head morphometry. **Journal of Andrology**, Lawrence, v. 11, n. 1, p. 32-39, 1990.

SETCHELL, B. P. The Parkes lecture. Heat and the testis. **Journal of Reproduction and Fertility.** Bimonthly, v. 114, n. 2. p. 179-194, 1998.

SETCHELL, B. P. The effects of heat on the testes of mammals. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 3, n. 2. p. 81-91, 2006.

SETCHELL, B. P.; PLÖEN, L.; RITZEN, E. M. Effect of local heating of rat testes after suppression of spermatogenesis by pretreatment with a GnRH agonist and an anti-androgen. **Reproduction**, Bristol, v. 124, n. 1. p. 133-140, 2002.

SETCHELL, B. P; D'OCCHIO, M. J.; HALL, M. J.; LAURIE, M. S.; TUCKER, M. J.; Zuppis, J. L. Embryonic mortality increased in normal female rats mated to subfertile males? **Journal of Reproduction and Fertility**, Cambridge v. 82, n. 2. p. 567-574, 1988.

SHAMAN, J. A.; YAMAUCHI, Y.; WARD, W. S. Function of the sperm nuclear matrix. **Archives of Andrology: Journal of Reproduction Systems**, London, v. 53, n. 3. p. 135-140, 2007.

SHARPE, R.M; MCKINNELL, C; KIVLIN, C; FISHER, J.S. Proliferation and functional maturation of Sertoli cells, and their relevance to disorders of testis function in adulthood. **Reproduction**, Bristol, v. 125, p. 769-784, 2003.

SOTOLONGO, B.; HUANG, T.T.F.; ISENBERGER,E.; WARD, S. An endogenous nuclease in hamster, mouse and human spermatozoa cleaves DNA into loop-sized fragments. **Journal of Andrology**, Lawrence, v.26, n.2, 2005.

STEIGERWALD, P.; KRAUSE, W. Estimation of sperm morphology using a new CASA system**. Andrologia**, Berlin, v. 30, n. 1, p. 23-27, 1998.

SWIERSTRA, E. E.; FOOTE, R. H. Cytology and kinetics of spermatogenesis in the rabbit. **Journal of Reproduction and Fertility**, Cambridge, v. 5, p. 309-322, 1963.

SWIERSTRA, E. E.; FOOTE, R. H. Duration of spermatogenesis and spermatozoan transport in the rabbit based on cytological changes, DNA synthesis and labeling with tritiated thymidine. **The American Journal of Anatomy**, New York, v. 116, n. 2 p. 401-411, 1965.

TEJADA, R. I.; MITCHELL, J. C.; NORMAN, A.; MARIK, J. J.; FRIEDMAN, S. A test for the practical evaluation of male fertility by acridine orange (AO) fluorescence. **Fertility and sterility**, New York, v. 42, n. 1. p. 87-91, 1984.

THONNEAU, P.; BUJAN, L.; MULTIGNER, L.; MIEUSSET, R. Occupational heat and male fertility: a review. **Human Reproduction**, Oxford, v. 13, n. 8. p. 2122-2125, 1998.

VIGODNER, M.; LEWIN, L. M.; SHOCHAT, L.; OSCHRY, I.; LOTAN, G.; KLEEN, B.; GOLAN, R. Evaluation of damage to the testicular cells of golden hamsters caused by experimental cryptorchidism using flow cytometry and confocal microscopy. **International Journal of Andrology**, Oxford, v. 26, n. 2. p. 84-90, 2003.

VOGLER, C. J.; SAACKE, R. G.; BAME, J. H. Effects of elevated testicular temperature on morphology characteristics of ejaculated spermatozoa in the bovine. **Theriogenology**, v. 40, n. 6, p. 1207-1219, 1993.

VOGLER, C. J.; SAACKE, R. G.; BAME, J. H.; DEJARNETTE, J. M. MCGILLIARD, M. L. Effects of scrotal insulation on viability characteristics of cryopreserved bovine semen. **Journal of Dairy Science**, Lancaster, v. 74, n. 2. p. 3827-3835, 1991.

WALTERS, A. H.; SAACKE, R. G.; PEARSON, R. E.; GWAZDAUSKAS, F. C. Assessment of pronuclear formation following in vitro fertilization with bovine spermatozoa obtained after thermal insulation of the testis. **Theriogenology**, Stoneham, v. 65, n. 6, p. 1016-1028, 2006.

WARD, W. S.; COFFEY, D. S. DNA Packaging and organization in mammalian spermatozoa: comparison with somatic cells. **Biology of reproduction**, Madison, v. 44, n. 4, p. 569-574, 1991.

YAERAM, J; SETCHELL, B. P; MADDOCKS S. Effect of heat stress on the fertility of male mice in vivo and in vitro. **Reproduction, fertility, and development**, East Melbourne, v. 18, n. 6. p. 647-653, 2006.

YEBRA, L.; BALLESCÁ, J; L.; CORZETT, M.; BALHORN, R.; OLIVA, R. Detection of P2 precursors in the sperm cells of infertile patients who have reduced protamine P2 levels. **Fertility and sterility**, New York, v. 69, n. 4, p. 755-759, 1998.

ZHANG, R. D.; WEN, X. H.; KONG, L. S.; DENG, X. Z.; PENG, B.; HUANG, A. P.; WAN, Y.; YANG, W. A quantitative (stereological) study of the effects of experimental unilateral cryptorchidism and subsequent orchiopexy on spermatogenesis in adult rabbit testis. **Reproduction**, Bristol, v. 124, n. 1. p. 95-105, 2002.

ANEXO A

MONTAGEM DA VAGINA ARTIFICIAL PARA COELHOS

1) Materiais necessários:

- um preservativo não lubrificado, largura nominal 52 mm;
- um tubo plástico de PVC, 2,5 cm (1 polegada) de diâmetro e 10 cm de comprimento;
- dois anéis de borracha, 2,2 cm de diâmetro;
- um tubo de vidro, 5ml, tipo “vacutainer”;
- um frasco de vaselina sólida
- uma caixa de isopor 10 litros;
- um ebulidor de metal de água elétrico, 1000W (110 ou 220v);
- um termômetro para água
- lixa d’água 100
- uma tesoura pequena

2) Montagem da vagina artificial

a) lixe as extremidades do tubo plástico com a lixa d’água até que fiquem arredondadas, para evitar que o preservativo fure ao introduzi-lo no tubo (Figura 1);

b) corte a extremidade da camisinha com a tesoura (Figura 2);

c) introduza a camisinha no tubo plástico (Figura 3);

d) coloque o anel de borracha em uma das extremidades a fim de prender o preservativo no tubo plástico (Figura 4);

e) aqueça a água a 50º C utilizando o ebulidor elétrico e a conserve na caixa de isopor

f) adicione a água aquecida pelo outro lado aberto do tubo plástico, entre o preservativo e a parede do tubo, até a borda (Figura 5);

g) coloque o outro anel de borracha para vedar o tubo com o preservativo (Figura 6);

h) introduza o tubo de vidro na extremidade até o meio do tubo plástico, isso fará com que a outra extremidade se dilate, o que imita o formato da vagina da coelha (Figuras 7, 8 e 9);

i) passe uma camada fina de vaselina sólida na extremidade dilatada da vagina;
i) utilize a vagina artificial imediatamente para coleta de sêmen.

3) Utilização da vagina artificial

Para o procedimento, utilize uma coelha adulta como manequim.
a) introduza a coelha adulta à gaiola do macho e nunca ao contrário;
b) com a vagina previamente pronta, coloque-a abaixo da fêmea, próximo a sua vulva, bloqueando essa para evitar a cópula;
c) segure firme a vagina artificial, pois o macho, em movimentos rápidos de flexão dos membros pélvicos, tentará introduzir pênis na vulva da coelha (Figura 10);
d) introduza o pênis do macho dentro da vagina artificial, imediatamente o mesmo ejaculará e o sêmen será depositado no tubo de vidro (Figura 11).
e) descarte o preservativo e monte novamente a vagina artificial. É possível lavar com soro fisiológico o preservativo para reutilização.

Figura 1

Figura 3

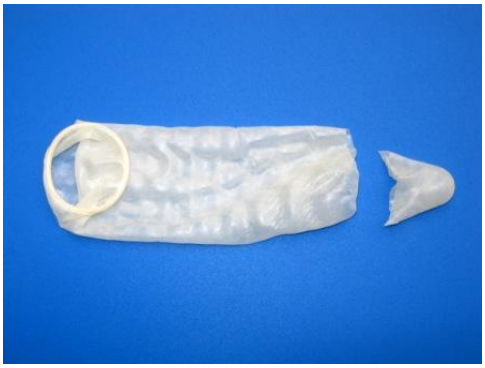

Figura 2

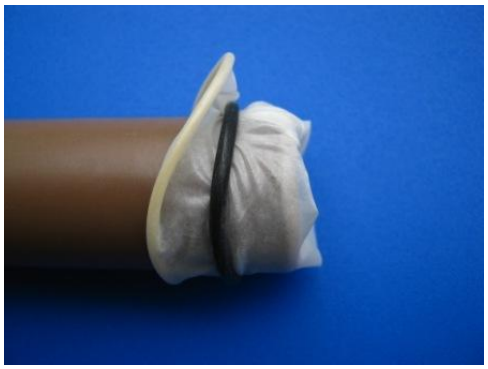

Figura 4

Figura 5

Figura 6

Figura 7

Figura 8

Figura 9

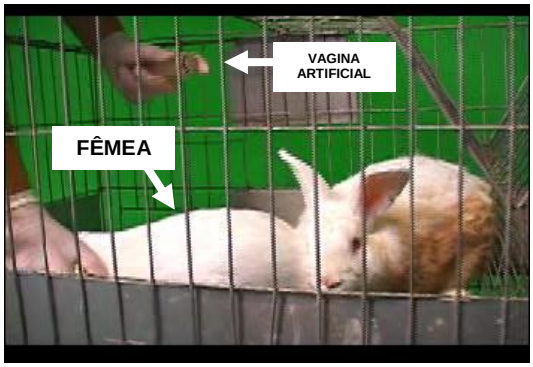

Figura 10

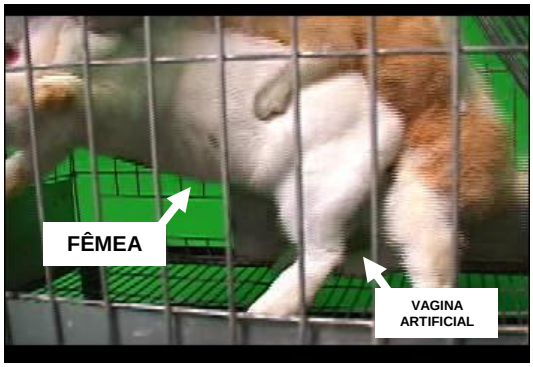

Figura 11

ANEXO B

Parecer do Comitê de Ética na Utilização de Animais (CEUA)

Universidade Federal de Uberlândia
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação
Comitê de Ética na Utilização de Animais (CEUA)
Campus Santa Mônica, Bloco 1J
www.comissoes.propp.ufu.br
Telefone: 3239.4531

Protocolo 030/08

Título: Elevação da temperatura testicular e sua influência sobre a compactação da cromatina e morfometria espermática em coelhos.

Objetivo – Avaliara a influência da elevação da temperatura testicular, por meio do criptorquidismo experimental, sobre a compactação da cromatina e morfometria espermática em coelhos.

Espécie animal – Coelhos

Anestésico – xilazina mais cetamina em doses adequadas para o procedimento.

Procedimento: sutura em bolsa de fumo no anel inguinal

Coleta de sêmen com vagina artificial.

Não existes danos significativos aos animais.

Parecer: **aprovado**

10 de Agosto de 2008

Prof. Dr. Alcino Eduardo Bonella
Coordenador CEUA - UFU