

Qualidade da cromatina espermática e sua implicação no desenvolvimento embrionário inicial de bovinos

Sperm DNA quality and its implication on bovine early embryo development

Resumo

Nas últimas décadas, a avaliação de rotina do sêmen bovino vem sendo estudada exaustivamente e inclui: volume seminal, padrão de motilidade retilínea, concentração e morfologia espermáticas. Tais análises têm sido utilizadas para a seleção de reprodutores e cálculo do rendimento de ejaculados de modo a melhorar a eficiência de biotécnicas como inseminação artificial e produção *in vitro* de embriões. No entanto, estes testes não apresentam resultados consistentes, principalmente para os casos de infertilidade idiopática. Assim, mesmo que a fertilidade de um indivíduo seja dependente de diversos fatores e que dificilmente um teste ou um conjunto de testes possa prever esta característica, a utilização de técnicas funcionais mais avançadas poderia, em última análise, tornar esta avaliação mais completa e consistente. A integridade da cromatina espermática é fundamental para a transmissão das informações genéticas paternas, e as alterações de DNA podem levar a falhas no processo reprodutivo. Danos na cromatina espermática podem ocorrer por diversos motivos e os mais importantes são: processos semelhantes a apoptose, deficiência de protamina e danos causados pelas espécies reativas de oxigênio (EROs). Na espécie bovina, as informações sobre a influência da integridade do DNA espermático no processo de fecundação e no desenvolvimento embrionário ainda são mais escassas. O presente trabalho tem como objetivo revisar as principais causas de dano de cromatina espermática que influenciam o desenvolvimento embrionário inicial.

Summary

The conventional evaluation of bovine semen has been studied for several decades, and it includes sperm volume, forward motility pattern, concentration and sperm morphology. These analyses have been routinely used for the selection of bulls and determination of ejaculates' yield, aiming to improve the efficiency of biotechnologies such as artificial insemination and *in vitro* embryo production. Unfortunately, inconsistent results have been obtained, especially in cases of idiopathic infertility. Therefore, despite the fact that fertility is dependent of several factors and that one test or a set of tests could hardly be able to predict fertility, the use of new functional techniques, may lead to a more complete and robust evaluation. Sperm chromatin integrity is essential for the transmission of paternal genetic information. Changes in sperm DNA can lead to failures in the reproductive process. Loss of chromatin integrity may occur due to several reasons, and the most important are apoptosis-like events, protamine deficiency and damages caused by reactive oxygen species (ROS). Information on the influence of sperm DNA integrity in the process of fertilization and embryonic development in cattle are scarce. This paper reviews the main causes of sperm chromatin damage that can influence the early embryo development.

Recebido em 19 de março de 2014 e aprovado em 30 de maio de 2014

Renata Simões¹

Adriano Felipe Perez Siqueira²

Marcilio Nichi²

José Antônio Visintin²

Mayra Elena Ortiz D'Ávila Assumpção²

Rua Santa Adélia, 166. Bairro Bangu. Santo André - SP - Brasil.
CEP 09210-170.

✉ renata.simoes@ufabc.edu.br



Palavras-chave

Espermatozoide. Bovinos. Fragmentação de DNA.
Desenvolvimento embrionário.

Keywords

Sperm. Bovine. DNA fragmentation.
Embryo development.

A avaliação seminal é muito importante para a reprodução animal. Atualmente, a análise da qualidade do sêmen é efetuada com a determinação da concentração, a motilidade e morfologia dos espermatozoides. Entretanto, tais parâmetros não são suficientes para a caracterização da fertilidade do macho (KHALIFA et al., 2008). Além disso, já foi referida a existência de baixa correlação entre as características seminais e a fertilidade (ERENPREISS et al., 2006; FOKSINSKI et al., 2007) o que indica que as causas de baixa fertilidade devam estar relacionadas a alterações registradas em outras características seminais.

Antes da criopreservação, diversos métodos têm sido usados para avaliar a viabilidade seminal, incluindo a análise da motilidade, integridade de membrana e concentração espermática (WARD et al., 2001). Quando tais análises são efetuadas por microscopia, elas apresentam interpretações subjetivas; desse modo, um mesmo material pode oferecer resultados distintos quando examinado por mais de um laboratório. Espermatozoides anormais podem não apresentar alterações de motilidade e serem capazes de fecundar o oócito e iniciar o desenvolvimento embrionário; contudo, estes espermatozoides podem induzir apoptose após as primeiras clivagens do embrião (FATEHI et al., 2006). Nasr-Esfahani et al. (2004) demonstraram que a análise seminal de rotina não é capaz de detectar danos de cromatina espermática. Neste sentido, testes alternativos devem ser introduzidos para aumentar a acurácia da avaliação da qualidade seminal.

1 Centro de Ciências Naturais e Humanas (CCNH), Universidade Federal do ABC

2 Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, Departamento de Reprodução Animal

A avaliação da qualidade do DNA espermático tem sido considerada essencial para o sucesso do desenvolvimento embrionário, principalmente quando da utilização da produção *in vitro* (PIV) de embriões, uma biotecnologia que ultrapassa diversas barreiras naturais de seleção presentes ao longo do trato reprodutivo da fêmea (SHAMSI; KUMAR; DADA, 2008). Aproximadamente 20-40% dos oócitos selecionados para maturação *in vitro* (MIV) atingem o estágio de blastocisto (PALMA; SINOWATZ, 2004). No entanto, diversos fatores, como a qualidade do oócito, o sistema de cultivo, os meios de cultura, a concentração de oxigênio, a densidade embrionária e os substratos energéticos podem afetar os índices de implantação desses embriões PIV (KHURANA; NIEMANN, 2000).

O efeito biológico de um espermatozoide com estrutura de cromatina anormal depende da capacidade do oócito de reparar os danos (EVENSON; LARSON; JOST, 2002). Oócitos e embriões em estágio inicial de desenvolvimento foram capazes de reparar danos de DNA espermático, porém esta capacidade é limitada (MENEZO; DALE; COHEN, 2010). Apesar do espermatozoide com dano de cromatina conseguir fecundar o oócito, quando o genoma paterno é ativado, algumas alterações podem ocorrer no desenvolvimento embrionário como, por exemplo, o bloqueio do desenvolvimento e a perda fetal precoce (FATEHI et al., 2006).

O espermatozoide não é apenas um vetor do DNA paterno, pois também carrega fatores citoplasmáticos essenciais para o início do desenvolvimento embrionário normal (ERENPREISS et al., 2006). Tesarik; Mendoza e Greco (2002) observaram que a influência paterna no início do desenvolvimento embrionário pode estar relacionada à deficiência de fatores de ativação oocitária oriundos do espermatozoide. As alterações nessa fase coincidem com o período de menor expressão de genes paternos. Isso pode explicar a ausência de influência da qualidade da cromatina espermática nos estágios iniciais do desenvolvimento embrionário. No entanto, com o avançar do processo, quando há a ativação do genoma embrionário os danos de DNA e as alterações de empacotamento da cromatina espermática podem afetar a expressão dos genes paternos e, consequentemente, o desenvolvimento embrionário (TESARIK, 2005).

Em seres humanos, nas clínicas de reprodução assistida, a análise de cromatina espermática passou a ser utilizada rotineiramente, para evitar a ocorrência de falhas de fecundação e perda embrionária (ESTERHUIZEN et al., 2000; ENCISO et al., 2006). Ao contrário da reprodução humana assistida, o sêmen utilizado na PIV de embriões bovinos provém de animais com genética comprovada;

entretanto, os índices de desenvolvimento embrionário ainda são inferiores aos obtidos *in vivo* e podem estar relacionados não apenas à qualidade do oócito e dos meios de cultivo, mas principalmente com fatores intrínsecos do espermatozoide (COMIZZOLI et al., 2000).

Visto que a fragmentação de DNA espermático pode não alterar os parâmetros avaliados na análise seminal de rotina, não impedindo que as células defeituosas fecundem um oócito, os testes de avaliação da integridade do DNA espermático devem ser empregados antes da utilização do sêmen, evitando-se assim a ocorrência de possíveis perdas embrionárias precoces, de desperdício do material genético da fêmea e de custos com a PIV de embriões. Além disso, na espécie bovina, pouco se sabe sobre a influência da fragmentação de DNA espermático sobre a capacidade fecundante de espermatozoides e o desenvolvimento embrionário *in vitro*.

A estrutura da cromatina espermática

A espermatogênese é o processo de produção de espermatozoides a partir da espermatogônia que, nos bovinos, apresenta a duração média de 61 dias. A espermatocitogênese e a espermiogênese são os dois principais eventos da produção de espermatozoides. A espermatocitogênese tem a duração média de 44 dias e inclui divisões mitóticas e meióticas da espermatogônia, originando os espermatócitos primários, secundários e, posteriormente, as espermátides. A espermiogênese estende-se, em média, por 17 dias e compreende as alterações morfológicas da espermátide redonda, dando origem ao espermatozoide maduro (AMANN; SCHANBACHER, 1983).

A cromatina dos espermatozoides maduros difere em composição e estrutura da cromatina das células somáticas (ROCHA et al., 2002; MCLAY; CLARKE, 2003). Durante a espermiogênese, as histonas, proteínas nucleares responsáveis pela compactação da cromatina das células somáticas, são substituídas por nucleoproteínas específicas, as protaminas. Estas proteínas constituem aproximadamente 85% das nucleoproteínas presentes no espermatozoide humano e o restante da cromatina espermática (15%) continua associado às histonas (SINGH; MULLER; BERGER, 2003).

Carrell, Emery e Hammoud (2007) observaram que a cromatina das espermátides apresenta estrutura similar à das células somáticas e que possuem alta atividade transcricional. Nos estágios iniciais da espermiogênese há o processo de substituição das histonas por protaminas (protaminação). Durante esse processo, as histonas são hiperacetiladas e os nucleossomos dissociados. O DNA é remodelado e no lugar das histonas ocorre a ligação com as proteínas de transição (PTs).

No núcleo das espermátides, diversas PTs já foram caracterizadas. Em suínos, bovinos, humanos, carneiros e ratos, esse grupo é constituído por quatro proteínas (PT 1-4), das quais PT1 e PT2 são as mais caracterizadas (WOUTERS-TYROU et al., 1998).

No final da espermiogênese, as PTs são substituídas pelas protaminas, que se ligam à curvatura menor do DNA (WOUTERS-TYROU et al., 1998). Rocha et al. (2002), constataram que, após a ligação da proteína, a cromatina espermática apresenta-se extremamente condensada e inerte, devido à neutralização do esqueleto de fosfodiéster do DNA pela interação dos resíduos amina da protamina com os grupos fosfatos das fitas do DNA. Durante a maturação espermática no epidídimo, devido à formação de pontes dissulfídicas pela conversão das pontes -SH para -S-S- das protaminas, é estabilizada a ligação da núcleo-proteína (BIANCHI et al., 1993).

Apesar de diversos mamíferos apresentarem o DNA espermático ligado às protaminas, algumas diferenças ocorrem entre espécies. A protamina 1 (P1) é expressa em todos os mamíferos (CARRELL; EMERY; HAMMOUD, 2007), enquanto que a protamina 2 (P2) só foi descrita em espermatozoides humanos e murinos. Maier et al. (1990) observaram que a P2 em bovinos e suínos não é funcional e acreditam que apenas a P1 possa ser responsável pela compactação da cromatina e que a P2 seja degradada durante as últimas etapas da espermiogênese. Mutações pontuais no gene da P2, que na espécie bovina ganha aminoácidos neutros e hidrofóbicos, diminuindo a afinidade do produto transcrito ao DNA, justificam a degradação.

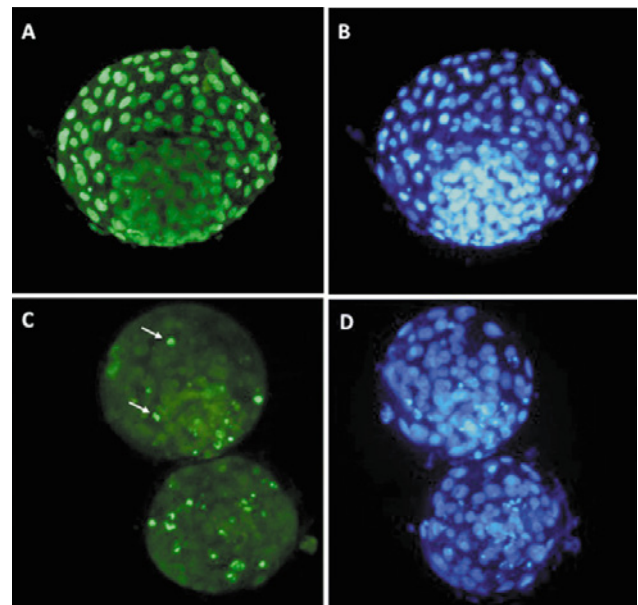
McLay e Clarke (2003) verificaram que a capacidade da protamina compactar o material genético do espermatozoide é seis vezes superior ao das histonas do DNA das células somáticas. Estas nucleoproteínas compactam, estabilizam e protegem o material genético do núcleo do espermatozoide. A compactação da cromatina espermática diminui o volume da célula, o que facilita o trajeto do espermatozoide pelo trato reprodutivo feminino. A compactação do DNA paterno pelas protaminas permite que o espermatozoide passe pelas barreiras do trato reprodutivo feminino, penetre e ative o oócito, e ainda desencadeie o início do desenvolvimento embrionário, sem que ocorram danos do DNA, permitindo que as informações genéticas se expressem corretamente (OLIVA, 2006).

Durante a protaminação, a cromatina espermática necessita da atividade das nucleases endógenas, como as topoisomerases. Durante a espermiogênese essas enzimas clivam o DNA espermático e aliviam a tensão de torção da estrutura terciária da cromatina, o que facilita o processo de protaminação. Sakkas et al. (2002),

constataram que as clivagens são evidentes em estágios específicos da espermatogênese (espermátides redonda e alongada). Contudo, as quebras de DNA são temporárias e devem ser reparadas pela própria célula, antes do final do processo de protaminação (BALHORN, 1982).

Meistrich et al. (2003), verificaram que a PT1 diminui a temperatura de desnaturação (*melting temperature - T_m*), relaxa o DNA estimulando a atividade da topoisomerase I, facilita a remoção das histonas, e ainda pode estimular o reparo de quebras de fita-simples de DNA *in vitro*. Tais características sugerem que as PTs são fundamentais para o reparo das quebras observadas durante o processo de remodelação da cromatina associado à perda das histonas. Por outro lado, a PT2 aumenta a *T_m* e compacta o DNA em nucleossomos, por isso tem sido descrita como uma proteína de condensação de cromatina.

A existência de mecanismos de reparo de DNA durante o desenvolvimento do espermatozoide tem sido observada; contudo, os mesmos são bloqueados após a espermiogênese (LEWIS; AGBAJE, 2008; GONZÁLEZ-MARÍN; GOSÁLVEZ; ROY, 2012). Desse modo, durante o trânsito e armazenamento no epidídimo ou pós-ejaculação as células em estados avançados de diferenciação não possuem um mecanismo de reparo de DNA. A despeito das células serem anormais durante o trânsito e armazenamento destas no epidídimo ou pós-ejaculação, elas podem não ser descartadas, permanecendo no ejaculado. Isso pode explicar o aparecimento de espermatozoides defeituosos mesmo em animais férteis. Contudo, o oócito



Imagens ilustrativas da avaliação de fragmentação de DNA em embriões em estágio de blastocisto (D7) pelo Ensaio de TUNEL. (A) Blastocisto controle positivo com todos os núcleos corados; (B) Blastocisto corado com Hoechst 33342 para avaliação do número total de núcleos. (C) Blastocisto com células positivas marcadas para o ensaio TUNEL (setas). (D) Blastocisto corado com Hoechst 33342 para avaliação do número total de núcleos

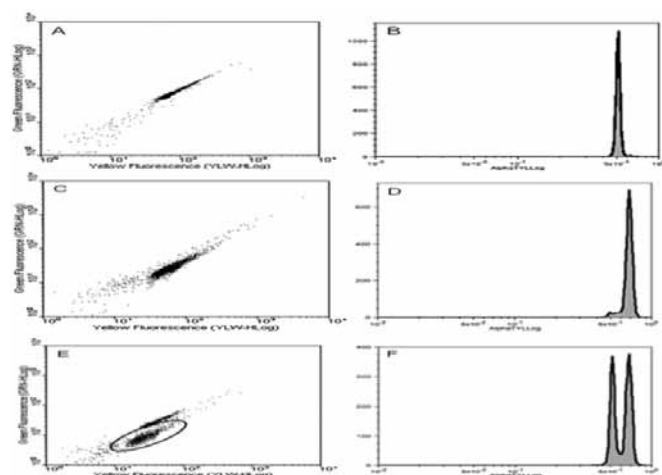
e os embriões em estágios de desenvolvimento iniciais parecem reparar alguns tipos de dano do DNA espermático (MENEZO; DALE; COHEN, 2010).

Principais causas de danos na cromatina espermática

Diversos mecanismos podem afetar a integridade do DNA espermático. Dentre as principais causas de dano da cromatina, destacam-se os processos semelhantes a apoptose, a deficiência de protamina e as EROs (BARROSO et al., 2009).

Fragmentação de DNA espermático por processo semelhante à apoptose na espermatogênese

A apoptose é um tipo de morte celular programada que ocorre em condições fisiológicas, como, por exemplo, durante o desenvolvimento embrionário normal; no entanto, pode estar presente em condições patológicas, como no desenvolvimento tumoral ou na aquisição de resistência à quimioterapia (KAUFMANN; HENGARTNER, 2001). A apoptose, em condições fisiológicas, remove células desnecessárias ou danificadas e contribui para a manutenção da homeostase do tecido. Durante a apoptose, a célula apresenta condensação e fragmentação da cromatina nuclear, compactação das organelas citoplasmáticas, dilatação do retículo endoplasmático, diminuição do volume celular e alterações na membrana plasmática (RAFF, 1998). Estágios de indução, execução e degradação assim como as vias de sinalização (intrínseca e extrínseca) estão envolvidos. Os sinais da via extrínseca são ativados por receptores da família TNF (*Tumor Necrosis Factor* – Fator de Necrose Tumoral) e os sinais da via intrínseca são ativados por fatores como estresse oxidativo e danos de DNA mitocondrial (AITKEN et al., 2011).



Exemplos de gráficos gerados pelo teste SCSA. Gráficos B, D e F - histogramas correspondentes de αT . Gráficos A e B - espermatozoides com cromatina normal; Gráficos C e D - espermatozoides com DNA fragmentado; Gráficos E e F - população com 50% dos espermatozoides com DNA fragmentado, na qual as células com fragmentação de DNA

A apoptose é um mecanismo muito conhecido de morte celular e é regulada por diversos genes e moléculas que desempenham papel importante na sua indução, como os membros das famílias BAX, BAK, PUMA, p53, c-Myc e Bcl-2, fatores pró e antiapoptóticos e que também ativam outras caspases (REED, 2006; PENA et al., 2009; AITKEN et al., 2011). A ativação das proteínas BAX/BAK1 induz a liberação do citocromo C e de outros fatores apoptóticos da mitocôndria com a formação de apoptossomo, que, por sua vez, ativa as caspases 9, 3 e 7. Durante o processo de apoptose, há a translocação de fosfatidilserina para a superfície da membrana celular, o que recruta macrófagos para a fagocitose (AITKEN et al., 2011).

O processo de morte celular programada também está presente nos testículos. Durante a puberdade, a apoptose das células germinativas, que afeta principalmente as espermatogônias e espermátocitos, parece ser essencial para o funcionamento normal da espermatogênese. Na espermatogênese de indivíduos adultos também ocorrem episódios de apoptose. Sakkas et al. (1999) verificaram que cerca de 50 a 60% das células germinativas que entram em divisão (meiose I) sofrem apoptose e são fagocitadas e eliminadas pelas células de Sertoli.

Devido à espermatogênese ser um processo contínuo, é necessário um mecanismo que controle a produção dos espermatozoides. Contudo, o processo anormal de apoptose pode resultar em alterações espermáticas (SAKKAS et al., 1999; AITKEN et al., 2011). A razão da morte celular programada de grande parte das espermatogônias acontecer durante a espermatogênese normal ainda não está totalmente esclarecida. Contudo, sabe-se que as células de Sertoli disponíveis só sustentam e promovem um ambiente favorável quando há uma quantidade limitada de células germinativas. Dessa forma, a apoptose ocorre para eliminar o excesso de células germinativas que as células de Sertoli não podem abrigar. Por outro lado, a apoptose também pode ocorrer para eliminar algumas células germinativas não detectadas por alguns pontos críticos de checagem, como, por exemplo, durante as divisões mitóticas e meióticas. A apoptose nesses pontos de checagem auxilia não apenas na eliminação do número de células germinativas em relação às células de Sertoli, mas também influencia o controle de danos irreversíveis de DNA (BAUM; ST GEORGE; MCCALL, 2005; MAKKER; AGARWAL; SHARMA, 2009). Os danos de cromatina induzidos por apoptose têm sido observados em diferentes espécies de mamíferos: humanos (SAKKAS et al., 1999; RICCI et al., 2009; RIBEIRO et al., 2013), murinos (GONG et al., 2009; RAHIMPOUR et al., 2013) e

bovinos (ANZAR et al., 2002; CHAVEIRO; SANTOS; DA SILVA, 2007; DOGAN et al., 2013). O balanço entre as células germinativas e as células de Sertoli no testículo durante a espermatogênese é mantido pela apoptose e um desequilíbrio nesse processo, conhecido como “apoptose abortiva”, pode causar a infertilidade.

A despeito de ter sido sugerido que o espermatozoide seja submetido a apoptose, até o momento nenhuma evidência indicou que esse processo realmente ocorra. Nos espermatozoides, a morte celular programada difere do processo de apoptose observado nas células somáticas. Aitken e De Iuliis (2010) verificaram que os espermatozoides são células que não apresentam transcrição e tradução das informações genéticas, pois devido ao processo de protaminação a sua cromatina possui menor quantidade de nucleossomos e, portanto, não podem apresentar as características de fragmentação de DNA verificadas nas células somáticas, e a sua arquitetura impede que as endonucleases ativadas no citoplasma ou liberadas pela mitocôndria consigam acessar o DNA espermático. Desse modo, o processo de morte celular programada das células espermáticas recebe o nome de “*apoptose-like*” ou “processo semelhante à apoptose”.

O processamento seminal, incluindo a criopreservação e os procedimentos pós-descongelamento do sêmen, podem afetar negativamente as células espermáticas. Mazur (1984) observou que a sensibilidade a temperaturas muito baixas pode variar entre touros. Durante a criopreservação, a formação de cristais de gelo e o aumento da concentração de soluto são os principais responsáveis pela redução da viabilidade espermática. Durante o processo de criopreservação, o espermatozoide passa por uma série de estresses químicos e físicos (ANZAR et al., 2002). A criopreservação altera a composição lipídica da membrana plasmática dos espermatozoides de suínos, reduz o tamanho da cabeça de espermatozoides de bovinos e transloca a fosfatidilserina da membrana plasmática de espermatozoides de seres humanos e de carneiros (BUHR; CANVIN; BAILEY, 1989; GRAVANCE et al. 1998; GLANDER; SCHALLER, 1999; MULLER et al., 1999).

Chaveiro, Santos e Da Silva (2007), utilizando o ensaio de coloração tripla anexina V-FICT/PI, verificaram, em bovinos, que a translocação da fosfatidilserina e a integridade de membrana espermática são indicadores da morte celular após o descongelamento e o processamento seminal. Os resultados obtidos mostraram que a criopreservação e/ou o descongelamento induziu a uma série de alterações espermáticas, incluindo a diminuição da motilidade e desestabilização de membrana, a capacitação

espermática e a reação acrossômica, o que indica o início do processo de apoptose. Além disso, também foi constatado que o processamento seminal (necessário para realizar a técnica de fecundação *in vitro* – FIV) pode estimular a capacitação espermática, que envolve diversas alterações bioquímicas e ultraestruturais da membrana plasmática do espermatozoide e, conseqüentemente, pode levar a translocação da fosfatidilserina, que também é um sinal precoce de apoptose.

Sakkas et al. (1999) verificaram que homens oligozoospermicos apresentavam níveis mais elevados de expressão de *Fas* (um dos receptores de morte celular) nos espermatozoides, que os indivíduos férteis. O que os levou a sugerir que a apoptose fosse um mecanismo de controle da espermatogênese; entretanto, o aumento de células marcadas com *Fas* no ejaculado de indivíduos oligozoospermicos também pode ser indicativo de falha no mecanismo de controle (apoptose abortiva). Em concordância com esse relato, Francavilla et al. (2000) acrescentaram que os indivíduos com espermatogênese reduzida podem não produzir espermatozoides suficientes para desencadear o processo de apoptose, o que pode acarretar o aumento de células marcadas para a apoptose no ejaculado.

Na tentativa de diminuir as falhas de fertilização e também as conseqüências mais tardias que a apoptose espermática pode causar, Ribeiro et al. (2013) demonstraram que, com o emprego da técnica de coloração com YO-PRO-1 (capaz de identificar alterações de permeabilidade de membrana) associada à citometria de fluxo, foi possível o isolamento de espermatozoides com baixo nível de fragmentação de DNA, antes do seu emprego nas técnicas de reprodução humana assistida.

Os mecanismos da infertilidade masculina não foram exaustivamente estudados como os da infertilidade feminina e só nas últimas duas décadas é que passaram a despertar maior interesse. Ainda há lacunas significativas no conhecimento de tais mecanismos e das suas relações com a apoptose e o dano de cromatina do espermatozoide. A análise seminal de rotina não permite a previsão do sucesso reprodutivo, e é uma avaliação muito mais subjetiva do que quantitativa da fertilidade masculina (AITKEN, 2006; BROWN et al., 2013). Diversos estudos foram efetuados procurando correlacionar a fragmentação de DNA espermático com infertilidade (AITKEN; BAKER; O'BRYAN, 2004; BLUMER et al., 2008; ZORN et al., 2012); contudo, os resultados obtidos são muito controversos. De fato, os detalhes dos mecanismos responsáveis por danos de DNA bem como dos efeitos específicos dos danos de cromatina na fertilidade ainda permanecem obscuros.

A fragmentação do DNA espermático por deficiência de protamina

A protamina é a proteína responsável pela preservação da integridade do material genético do espermatozoide. O alto poder de compactação promovido por essa nucleoproteína faz com que a cromatina do espermatozoide fique inerte e protegida até o momento da fecundação. Em situações de deficiência de protaminas, o DNA espermático pode apresentar pontos susceptíveis à fragmentação por falta de compactação da cromatina.

A importância da detecção de populações de espermatozoides com defeitos de protaminação foi proposta por Bizzaro et al. (1998), ao observarem que espermatozoides com deficiência de protamina poderiam apresentar maior susceptibilidade aos danos de DNA por estresse químico e radiação.

Erenpreiss et al. (2006) verificaram que a utilização de espermatozoides com dano de DNA na PIV de embriões humanos aumentou a chance de perda embrionária e que os embriões produzidos por espermatozoide com fragmentação de DNA podem ter o seu desenvolvimento bloqueado em qualquer estágio de sua evolução. Caso não ocorra esse bloqueio, os fetos poderão chegar a termo; contudo, os recém-nascidos poderão apresentar anormalidades. Nasr-Esfahani et al. (2004) observaram que as falhas de fecundação estavam mais relacionadas a problemas no espermatozoide (59,09%), que a alterações intrínsecas do oócito (27,30%).

Desde o final da década de 80, há relatos de que a protamina exerce grande influência na fertilidade humana (BALHORN, 1982). Em humanos, já foi descrito que não é apenas o aumento (ou a diminuição) da P1 ou da P2 que pode acarretar em dano no DNA do espermatozoide. Aoki, Liu e Carrell (2005) verificaram que a relação P1/P2 também é importante para a avaliação da qualidade seminal, e que a razão 1:1 é a ideal. Oliva (2006) salientou que as alterações da razão P1/P2 podem ser consequência de falha generalizada na substituição das histonas por protaminas durante a espermiogênese.

McPherson e Longo (1992) descreveram a importância da quebra do DNA pela topoisomerase II durante a troca das histonas pelas protaminas. A presença de tais quebras de DNA em espermatozoides pode ser indicativa de maturação espermática incompleta durante a espermiogênese, o que acarreta alteração da condensação da cromatina devido à falha de protaminação.

Em camundongos, foi observado que o desequilíbrio da razão P1/P2 altera a integridade do DNA e o subsequente desenvolvimento embrionário (SUGANUMA; YANAGIMACHI; MEISTRICH, 2005). Em bovinos, pouco se sabe sobre o papel e a importância da P1 e da P2.

Por haver degradação da P2 no final da espermatogênese, a razão P1/P2 poderá ser importante apenas durante as fases iniciais do processo; contudo, são necessários novos estudos para esclarecer a influência de tais proteínas e o efeito de uma possível alteração nas mesmas sobre a fertilidade dos touros.

Nasr-Esfahani, Razavi e Mardani (2001) ressaltaram que uma das melhores técnicas para a avaliação da deficiência da protamina é a coloração com cromomicina A₃ (CMA₃). O CMA₃ é um fluorocromo que compete com as protaminas pela associação com o DNA (IRANPOUR et al. 2000). A avaliação com CMA₃ é efetuada pela diferença de fluorescência entre espermatozoides, apresentando coloração amarelo intenso (células CMA₃-positivo) e espermatozoides com coloração amarelo fraco (CMA₃-negativo). Esse procedimento é um método indireto de detecção de deficiência de protamina e pode ser um instrumento útil para a avaliação da susceptibilidade de fragmentação do DNA espermático, já que a falta de protamina faz com que a cromatina da célula fique menos compactada e, portanto, mais sujeita a danos de estrutura.

Esterhuizen et al. (2000) descreveram que, em humanos, havia uma correlação negativa entre a morfologia espermática e a coloração com CMA₃, destacando-se que, quando o número de células CMA₃-positivo aumenta, o índice de embriões PIV diminui. De acordo com tais resultados, quando o CMA₃ foi empregado para discriminar a morfologia espermática, houve uma especificidade de 65% na identificação de espermatozoides com forma alterada. Lolis et al. (1996) mostraram que a porcentagem de células CMA₃-positivo em humanos variou entre 8,62% e 77%. Essa ampla variação também foi observada por Iranpour et al. (2000), que encontraram a faixa de 6,2 a 70,2% de células CMA₃-positivo em ejaculados de pacientes humanos. A técnica de coloração por CMA₃ foi descrita pela primeira vez por Bianchi et al. (1993), ao utilizarem a microscopia de fluorescência para a avaliação de células coradas. Nos últimos anos, a técnica foi aprimorada e passou a ser avaliada por citometria de fluxo. Fathl et al. (2011) verificaram que a avaliação do CMA₃ pela citometria de fluxo apresenta como vantagens a análise de milhares de células em alguns segundos, e avaliação estatística mais precisa por ser uma técnica com maior reprodutibilidade e redução das variações entre observadores. Até o presente momento, a citometria de fluxo não foi empregada para a avaliação da deficiência de protamina em espermatozoides de bovinos.

Simões et al. (2009) avaliaram a protaminação de espermatozoides bovinos usando a coloração com CMA₃. Uma comparação entre raças e partidas de sêmen foi realizada. Quatro partidas por animal foram avaliadas para

verificar a possível influência do ambiente na qualidade seminal. A porcentagem de células CMA_3 -positivo variou entre partidas de um touro *Bos taurus indicus* (0 e 0,33%) e dois touros *Bos taurus taurus* (0,33-2% e 0,33-1,33%, respectivamente; $p < 0,05$), com uma diferença significativa de células CMA_3 -positivo entre animais ($p < 0,0167$). Os touros *Bos taurus indicus* apresentaram maior quantidade de células CMA_3 -positivo (1,16%), quando comparados com os *Bos taurus taurus* (1,08%). Analisando-se tais dados, inferiores aos descritos em humanos, pode-se presumir que, nos bovinos, deva ocorrer algum outro mecanismo além do processo de protaminação.

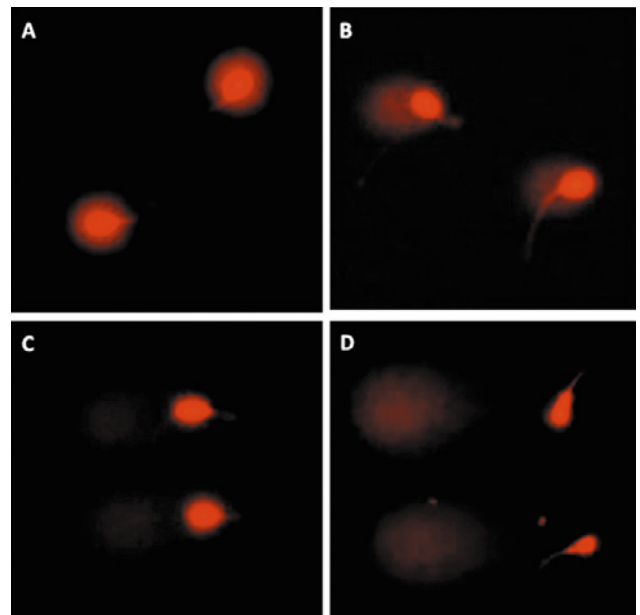
A fragmentação de DNA espermático por espécies reativas de oxigênio (EROs)

As células que vivem sob condições de aerobiose constantemente se deparam com o paradoxo do oxigênio (O_2), necessário para a vida; porém, os seus metabólitos, como as espécies reativas de oxigênio (EROs), podem alterar a função celular (STOHS, 1995; AGARWAL; SALEH; BEDAIWY, 2003). As EROs são moléculas ou átomos que contêm elétrons não pareados na sua órbita mais externa (LANZAFAME et al., 2009). Isso torna as substâncias extremamente instáveis, conferindo-lhes uma reatividade química de interação com outras moléculas. Os principais metabólitos de oxigênio produzidos pela redução de um dos elétrons são: radical superóxido (O_2^-), radical hidroxila (OH^-) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2). As EROs podem reagir com qualquer molécula que contatem, extraindo elétrons e gerando novos radicais livres citotóxicos (URREGO et al., 2008). A produção descontrolada de EROs que excede a capacidade antioxidante da célula é conhecida como estresse oxidativo (EO) (JONES, 2006).

Os espermatozoides são particularmente mais vulneráveis ao EO devido à grande quantidade de ácidos graxos poli-insaturados (PUFAs) presentes em sua membrana plasmática (JONES; MANN; SHERINS, 1979; AITKEN, 2004) contendo mais de duas duplas-ligações carbono-carbono, que são mais facilmente clivadas pelas EROs. As EROs atacam preferencialmente as ligações carbono-hidrogênio adjacentes às duplas-ligações presentes nos PUFAs e iniciam uma cascata de peroxidação lipídica que, quando não interrompida, pode afetar a integridade da cromatina espermática e aumentar a frequência de quebras no DNA (AITKEN; KRAUSZ, 2001).

Os PUFAs, essenciais para os mamíferos, pois são incapazes de sintetizá-los, contribuem para a fluidez de membrana; o que é importante para o movimento dos espermatozoides e garante uma maior resistência à criopreservação, além de favorecer a motilidade das células (BLUMER et al., 2008; NICHI, 2009). Apesar

das EROs serem essenciais para processos fisiológicos, como capacitação espermática, reação acrossômica, manutenção da capacidade fecundante e estabilização das mitocôndrias na peça intermediária do espermatozoide (AGARWAL; MAKKER; SHARMA, 2008; DESAI et al., 2009; GONÇALVES et al., 2010), elas devem ser continuamente inativadas a uma pequena quantidade necessária para a manutenção da função celular normal (AITKEN; KRAUSZ 2001; MAKKER; AGARWAL; SHARMA, 2009). Contudo, os espermatozoides possuem apenas uma limitada capacidade de resistir ao EO, pois, durante o processo de maturação, os espermatozoides expulsam uma parte de seu citoplasma, que é a maior fonte de antioxidantes (AITKEN, 1994; COCUZZA et al., 2007). Nesse sentido, a escassez de citoplasma e a grande quantidade de PUFAs na membrana plasmática fazem com que o espermatozoide seja altamente susceptível ao EO. Na membrana plasmática dos espermatozoides, o radical hidroxila inicia a oxidação dos ácidos graxos poli-insaturados, em um processo conhecido como peroxidação lipídica. Como cada ácido graxo que participa da peroxidação lipídica pode gerar um radical com potencial para produzir a peroxidação de outro ácido graxo, esse fenômeno é altamente deletério e acarreta a diminuição da fluidez de membrana e a redução da capacidade fecundante do espermatozoide (MAKKER; AGARWAL; SHARMA, 2009).



Imagens ilustrativas da avaliação da fragmentação de DNA espermático pelo Ensaio Cometa Alcalino. (A) células com halo ao redor do núcleo corado, porém sem cauda de Cometa evidente, indicando pouca fragmentação; (B) células com pequena formação de cauda de Cometa, indicando danos leves de DNA espermático; (C) células com cauda de Cometa bem evidente, porém ainda com núcleo corado, indicando dano moderado de DNA espermático; (D) células com cauda de Cometa bem evidente, porém com núcleo fracamente corado, indicando intensa fragmentação de DNA espermático

Todos os componentes celulares, incluindo lipídeos, proteínas, ácidos nucleicos e açúcares, são alvos em potencial para o EO (AGARWAL; MAKKER; SHARMA, 2008). O EO está relacionado com o desenvolvimento de diversas doenças, como câncer (HALLIWELL, 2007); doença de Parkinson, Alzheimer (VALKO et al., 2007); aterosclerose, insuficiência cardíaca (SINGH et al., 1995); infarto do miocárdio (RAMOND et al., 2011); Síndrome do cromossomo X frágil (DE DIEGO-OTERO et al., 2009); doença falciforme (AMER et al., 2006); vitiligo (ARICAN; KURUTAS, 2008) e autismo (JAMES et al., 2004). Além disso, o EO pode ser considerado como a principal causa de disfunção espermática (AITKEN; CLARKSON, 1988). Essa condição está relacionada à diminuição da fertilidade de amostras seminais durante a sua manipulação e armazenamento (criopreservação ou refrigeração), principalmente quando existe a retirada do plasma seminal (WATSON, 2000; BALL; VO, 2001; CALAMERA et al., 2001; AITKEN; BAKER, 2002). Amirat et al. (2005) verificaram a ocorrência de efeitos deletérios ao espermatozoide durante as primeiras diluições do sêmen e até mesmo durante o processo de congelamento. Sendo assim, o processo de criopreservação de sêmen pode, como consequência, causar EO no espermatozoide criopreservado e, portanto, levar à fragmentação do seu DNA.

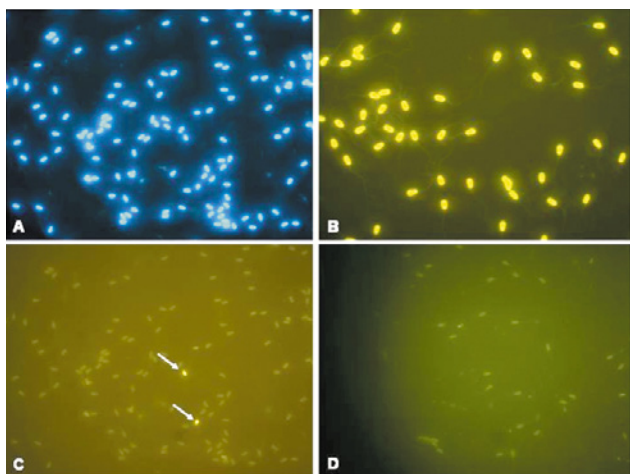
Os antioxidantes são substâncias com a capacidade de retardar ou prevenir significativamente a reação de oxidação. Para proteger os espermatozoides contra a produção excessiva de EROs, o plasma seminal possui uma série de antioxidantes enzimáticos: superóxido desmutase, sistema glutaciona peroxidase/glutaciona redutase e catalase; e não enzimáticos: ascorbato, urato, α -tocoferol,

piruvato, glutaciona, taurina e hipotaurina. Contudo, a capacidade de proteção do espermatozoide por si só é muito pequena e dependente dos antioxidantes presentes no plasma seminal. Os antioxidantes, como o α -tocoferol, têm a capacidade de quebrar a cadeia de formação das EROs, resultando na formação de produtos sem elétrons não pareados (NICHI, 2009).

No sêmen existem pelo menos duas fontes principais de EROs, o próprio espermatozoide e os leucócitos. Aitken et al. (1992) verificaram que no sêmen com espermatozoides morfologicamente anormais e leucócitos a quantidade de EROs produzida ultrapassava a produção de antioxidantes e, normalmente, o sêmen com tais características apresentava diminuição dos índices de embriões PIV associados a danos de DNA.

Os espermatozoides possuem grande quantidade de mitocôndrias, as principais fontes de EROs (ALLAMANENI et al., 2005). Makker, Agarwal e Sharma (2009) observaram que a geração de EROs pelos espermatozoides pode ocorrer via sistema nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato oxidase (NADPH) presente na membrana plasmática do espermatozoide ou pela oxidoreductase NADPH-dependente presente na membrana mitocondrial, as quais são fontes de elétrons para a produção de EROs. Espermatozoides anormais ou imóveis são exemplos de células produtoras de EROs. Os mecanismos responsáveis pela geração de EROs mitocondriais ainda não são totalmente conhecidos; entretanto, uma hipótese é que as mitocôndrias que perdem elétrons sejam as responsáveis por uma parte das EROs produzida pelos espermatozoides (ANDRABI, 2007). As alterações no funcionamento da mitocôndria podem ser um fator relacionado à infertilidade. A organela celular é a chave para a manutenção energética da motilidade espermática, um dos maiores determinantes da fertilidade do macho (RUIZ-PESINI et al., 1998). Os leucócitos, em humanos, são considerados a maior fonte produtora de EROs no plasma seminal e, quando ativados, podem produzir até 1000 vezes mais EROs que os espermatozoides (POTTS; PASQUALOTTO, 2003). Entretanto, a ação deletéria das EROs produzidas por leucócitos só ocorre na ausência dos antioxidantes (WOLFF, 1995).

O dano induzido pelo EO depende da natureza e quantidade de EROs envolvidas, da duração da exposição às EROs e também de fatores extracelulares, como temperatura, tensão de oxigênio, incluindo a composição do ambiente circundante (íons, proteínas e antioxidantes) (AGARWAL; MAKKER; SHARMA, 2008). A temperatura é um fator muito importante quando se pensa em EO. Uma explicação para a influência da temperatura nos testículos de mamíferos é a de que os mesmos



Imagens ilustrativas de células espermáticas bovinas coradas com Hoescht 33342 (A); Controle positivo da coloração de CMA₃ - protocolo de deportaminação mostrando todas as células deproteinadas (B); As setas indicam células positivas para CMA₃ (C); Controle negativo - amostra de sêmen sem células coradas com CMA₃ (D)

normalmente operariam no limite da hipóxia (BARTH; BOWMAN, 1994). Elevações na temperatura local resultam em um incremento da taxa metabólica e em um aumento correspondente da demanda de oxigênio sem a elevação da circulação sanguínea, provocando, assim, a hipóxia do tecido testicular. Nichi (2003), constatou que o estresse térmico pode determinar um quadro de estresse oxidativo pelo mecanismo de hipóxia-reperusão. Após a normalização da temperatura e a consequente reoxigenação tecidual, há um aumento na produção de EROs, mecanismo semelhante ao observado em transplante de órgãos. Dependendo da duração do estresse térmico, os danos podem atingir a cromatina espermática com alterações na informação genética da célula.

A integridade do DNA espermático pode ser afetada pela alta concentração de EROs. Urrego et al. (2008) verificaram que o radical OH⁻ desempenha um papel determinante nos danos à cromatina espermática, podendo alterar a estrutura das purinas e pirimidinas nas cadeias de ácidos nucleicos (DNA e RNA) e gerar quebras na cadeia de polinucleotídeos, alterando, assim, a informação genética da célula. Entretanto, vale ressaltar que os danos de cromatina decorrentes do aumento das EROs são os últimos a acontecer. Barros (2007) destacou que tais moléculas podem causar alterações de membrana e de organelas, como as mitocôndrias, que também podem influenciar o processo de fecundação e até mesmo o desenvolvimento embrionário. Erenpreiss et al. (2006) salientaram que as EROs modulam a atividade de genes e de proteínas vitais para a proliferação, diferenciação e fisiologia dos espermatozoides. Nos bovinos, já foi demonstrado que o estresse térmico pode promover o aumento de produção de EROs e, conseqüentemente, a diminuição da fertilidade (NICHI et al., 2006). Simões et al. (2013) destacaram que o estresse oxidativo em espermatozoides comprometeu a qualidade da cromatina das células e diminuiu a qualidade dos embriões produzidos *in vitro*.

Na espécie humana, os efeitos deletérios que o estresse oxidativo pode causar nas células espermáticas foram mais investigados do que em outras espécies animais. Já foi demonstrado que o estresse oxidativo aumenta os danos de cromatina espermática e diminuem as chances de gravidez após o uso de técnicas de reprodução assistida (SALEH et al., 2003; FOKSINSKI et al., 2007). Algumas estratégias para modular o nível de estresse oxidativo no trato reprodutivo masculino incluem o uso de compostos antioxidantes via oral, para aumentar a defesa do organismo contra os danos causados pelas EROs (TWIGG et al., 1998; GHARAGOZLOO, 2011; WIRLEITNER et al., 2012). Entretanto, os resultados obtidos ainda são controversos e a eficácia desse tipo de tratamento não foi comprovada.

Como as EROs desempenham um papel crucial na fisiologia do espermatozoide, o tratamento com substâncias antioxidantes poderá ser benéfico ou deletério, de acordo com o tipo e a quantidade de antioxidantes utilizados.

Como a meia-vida das EROs é muito curta, a mensuração do estresse oxidativo no sêmen requer técnicas bastante sensíveis (MAKKER; AGARWAL; SHARMA, 2009). Na atualidade, há mais de 30 ensaios disponíveis para a avaliação do estresse oxidativo em células espermáticas, que podem ser classificados em métodos diretos ou indiretos. Os métodos diretos avaliam o dano causado pelo excesso de radicais livres à membrana plasmática ou ao DNA do espermatozoide. Como o estresse oxidativo resulta de um desequilíbrio entre a produção de EROs e a capacidade antioxidante total (CAT), os métodos diretos refletem os efeitos biológicos desses dois tipos de fatores (TREMELLEN, 2008).

O método direto mais utilizado para a quantificação do estresse oxidativo é a avaliação dos níveis de malondialdeído (MDA) com o emprego do ensaio do ácido tiobarbitúrico (TBARS). Quando há a peroxidação lipídica dos espermatozoides, ocorre um acúmulo progressivo de hidroperóxidos lipídicos na membrana plasmática das células que posteriormente se decompõem e formam o MDA. O ensaio TBARS pode ser utilizado para medir os níveis de MDA tanto no plasma seminal quanto na própria célula espermática. Contudo, como os níveis de MDA no espermatozoide são bastante baixos (cerca de 5-10 vezes menores que no plasma seminal), essa avaliação em células espermáticas requer o uso de um equipamento de cromatografia líquida de alta pressão (HPLC – *high performance liquid chromatography*) ou de mensuração por espectrofluorometria. Por outro lado, se a avaliação for realizada no plasma seminal, a mensuração do estresse oxidativo poderá ser obtida em espectrofotômetros, equipamentos de menor custo. A avaliação do MDA tem sido descrita como um bom fator indicativo de peroxidação lipídica. De fato, em indivíduos com excesso de produção de EROs, a concentração dessa substância, tanto no espermatozoide como no plasma seminal, é mais elevada que em indivíduos normais (HSIEH; CHANG; LIN, 2006; TAVILANI, 2008; BENEDETTI et al., 2012).

Dentre os métodos indiretos empregados para a mensuração do estresse oxidativo, os ensaios de quimiluminescência são os mais utilizados para detecção da produção de EROs no sêmen. Essas sondas são bastante sensíveis e têm a vantagem de estarem, relativamente, bem estabelecidas tanto para a população fértil quanto infértil. Entretanto, esse tipo de avaliação não tem sido muito empregado, pois necessita de equipamentos de

alto custo (luminômetro), além das dificuldades para o controle da qualidade do ensaio, como tempo de incubação, contaminação por leucócitos e presença de plasma seminal (AITKEN; BAKER; O'BRYAN, 2004). Sharma et al. (2013), procurando biomarcadores para estresse oxidativo, identificaram dez proteínas superexpressas e cinco proteínas pouco expressas em pacientes do grupo “estresse oxidativo”; entretanto, mais estudos são necessários para a validação de tais marcadores.

O espermatozoide é uma célula altamente especializada, dotada apenas do necessário para os eventos relacionados à fecundação. Diante desse cenário, fica evidente que a avaliação da apoptose espermática, da deficiência de protamina e do estresse oxidativo no sêmen ejaculado é de extrema importância para minimizar as consequências da fragmentação de DNA espermático durante o desenvolvimento embrionário.

Danos na cromatina espermática *versus* desenvolvimento embrionário

A relação entre alteração na fertilidade do macho com anormalidades morfológicas do espermatozoide ou diferenças do padrão funcional espermático, como a motilidade e a integridade de acrossomo, tem sido investigada (JANUSKAUSKAS et al., 2000; BRITO et al., 2003; TARTAGLIONE; RITTA, 2004; RODRIGUEZ-MARTINEZ, 2007). Já foi sugerido que a diferença na fertilidade entre indivíduos depende de fatores intrínsecos dos espermatozoides que não são selecionados pelo trato reprodutivo feminino. Esses espermatozoides, mesmo defeituosos, podem penetrar no oócito, mas não conseguem dar início à sequência de eventos do desenvolvimento embrionário normal (EID; LORTON; PARRISH, 1994).

Antigamente, acreditava-se que o espermatozoide fosse apenas um carreador (ou vetor) que transferia o seu DNA para o oócito. Entretanto, hoje já se sabe que existe um diálogo bem estabelecido entre o espermatozoide e o oócito, que culmina com a ativação do gameta feminino e a descondensação da cabeça do espermatozoide. Esses eventos são seguidos pela formação dos pronúcleos masculino e feminino, singamia e das primeiras divisões embrionárias. Diversas estruturas, organelas e moléculas presentes no espermatozoide parecem ser críticas para o sucesso da fertilização e, conseqüentemente, do desenvolvimento embrionário normal (BARROSO et al., 2009).

Apesar do oócito conseguir reparar os danos no DNA espermático que tenham ocorrido antes da fecundação, esse reparo é limitado (FATEHI et al., 2006; DERIJCK et al., 2008) e, quanto maior é o dano do material genético do espermatozoide, menor é a chance de gestação (VIRRO; LARSON-COOK; EVENSON, 2004).

Adicionalmente, essa capacidade pode ser diferente entre oócitos do mesmo ou de diferentes indivíduos e depende do tipo e extensão do dano presente no DNA do espermatozoide (SAKKAS; ALVAREZ, 2010). Ahmadi e Ng (1999) verificaram, em camundongos, que o desenvolvimento embrionário e fetal está relacionado com o grau de dano de DNA, e que o oócito pode reparar o DNA espermático quando o dano é inferior a 8%. A forma como os zigotos de mamíferos respondem ao dano de cromatina ainda não está clara. Foi demonstrado que os embriões de mamíferos não têm os pontos de checagem tradicionais do ciclo celular (G1/S ou G2/M); o que sugere a existência de um outro mecanismo que preserva a integridade do genoma durante o desenvolvimento embrionário (SHIMURA et al., 2002; BAART et al., 2004; GAWECKA et al., 2013).

O espermatozoide que fecunda o oócito contribui, essencialmente, com pelo menos três componentes: o genoma paterno haploide, o sinal para iniciar a ativação metabólica do oócito e o centríolo, que direciona a formação dos microtúbulos, levando à formação dos fusos mitóticos durante o início do desenvolvimento do zigoto. Evidências clínicas do uso de técnicas de reprodução assistida indicam que a contribuição de um espermatozoide anormal pode se estender além da fecundação, salientando-se o fato de que os efeitos paternos precoces e tardios podem ser os fatores determinantes para o desenvolvimento embrionário anormal (BARROSO et al., 2009).

Tesarik, Greco e Mendoza (2004) demonstraram que a fragmentação do DNA espermático pode ocorrer tanto nos estágios iniciais como nos estágios tardios do desenvolvimento embrionário. O diagnóstico de um efeito paterno precoce assenta-se nas alterações morfológicas do zigoto e do embrião durante as suas primeiras clivagens, baixa velocidade de divisão celular, e não está associado à fragmentação do DNA espermático. Barroso et al. (2009) observaram que o efeito paterno precoce parece ser mediado por disfunções relacionadas à ativação do oócito e por aberrações do citoesqueleto. Por outro lado, os efeitos tardios parecem envolver alterações de cromatina espermática e talvez disfunção ou alteração de RNA mitocondrial. Destacaram ainda que das alterações relacionadas às anomalias de *imprinting* genômico resultem provavelmente tanto de efeitos precoces como de efeitos paternos tardios.

Gawecka et al. (2013) verificaram que os zigotos respondem ao dano de cromatina espermática com um mecanismo que diminui a replicação do DNA paterno e conseqüentemente leva ao bloqueio do desenvolvimento embrionário. Observaram que ambos os pronúcleos (PN) de zigotos oriundos de espermatozoides com dano de

DNA moderado replicaram-se normalmente; contudo, os zigotos com dano de cromatina severo apresentaram atraso de mais de 12 horas na replicação do PN masculino, mesmo quando nenhum atraso foi observado no PN feminino. Constataram também que os cromossomos dos embriões com dano de cromatina moderado ou severo apresentaram degradação do DNA paterno após a fase S do ciclo celular, enquanto o PN materno formou cromossomos normais. Ressaltaram ainda que o atraso na replicação causou atraso na progressão para o estágio de duas células, e a maioria dos embriões teve o seu desenvolvimento bloqueado na fase G2/M do ciclo celular, demonstrando que esse é um ponto importante para a checagem do desenvolvimento embrionário. Os embriões que passaram pela fase G2/M do ciclo celular morreram em estágios mais avançados do desenvolvimento embrionário e nenhum dos embriões produzidos conseguiu chegar ao estágio de blastocisto.

Dependendo do nível de fragmentação da cromatina espermática, três situações podem ser esperadas. Em alguns casos, o oócito não consegue reparar o dano de DNA e o embrião não consegue continuar o seu desenvolvimento, não consegue se implantar no útero ou pode ser abortado naturalmente em estágios mais avançados (defeitos não compensáveis de dano de cromatina espermática). Em outros casos, o oócito repara os danos de DNA antes do início das primeiras clivagens, e o espermatozoide pode gerar um indivíduo normal (defeitos compensáveis de dano de cromatina espermática). Entretanto, existe um último e o pior cenário em que, devido ao reparo parcial do oócito, as deleções ou os erros de sequência podem ser introduzidos no novo indivíduo, resultando em uma prole anormal (defeitos parcialmente compensáveis de dano de cromatina espermática), ressaltando-se que cerca de 80% das aberrações de estrutura de cromossomos em humanos tem origem paterna (FERNÁNDEZ-GONZALEZ et al., 2008). De forma geral, os danos da fita simples de DNA têm melhor prognóstico e são mais facilmente reparados que os danos da fita dupla (SAKKAS; ALVAREZ, 2010).

Marchetti e Wyrobek (2005) observaram que as anormalidades cromossômicas constitutivas ocorrem em cerca de 20-50% de todos os conceitos humanos, dos quais 30 a 50% são abortados antes do reconhecimento da gestação, e cerca de 20% de todas as gestações não chegam a termo. Ressaltaram ainda que em torno de 0,6% de todas as crianças nascidas vivas apresentam alterações cromossômicas, e mais de 80% de tais alterações são originárias das células germinativas masculinas. Marchetti e Wyrobek (2005) verificaram também, em camundongos, que os danos de cromatina espermática

devem ser avaliados antes das células serem usadas na reprodução assistida para a produção de embriões. Fernández-Gonzales et al. (2008) destacaram que as consequências da fragmentação de DNA espermático não reparada (ou com reparo parcial) pelo oócito só aparecem mais tarde na vida do indivíduo, como crescimento anormal, envelhecimento precoce, alterações de comportamento e tumores mesenquimais.

Na reprodução de bovinos, os animais utilizados em programas de inseminação artificial (IA) e de produção *in vitro* (PIV) de embriões são selecionados geneticamente e têm a fertilidade comprovada. Contudo, os resultados de PIV de embriões em bovinos variam entre touros e muitas vezes não correspondem à fertilidade a campo.

O sucesso da PIV de embriões está relacionado à eficiência da separação de uma quantidade adequada de espermatozoides móveis e com acrossomo e DNA intactos. Em uma amostra de sêmen congelado, a técnica de centrifugação em gradiente de Percoll tem sido a mais utilizada para a recuperação da população de espermatozoides (RECKOVA et al., 2008). Para Parrish, Krogenaes e Susko-Parrish (1995), esse é o método que consegue separar uma maior quantidade de espermatozoides móveis para a PIV de embriões. Entretanto, apesar da população separada apresentar alta proporção de espermatozoides viáveis com acrossomo intacto, o DNA das suas células pode estar alterado, uma vez que os espermatozoides de alguns touros podem ser muito sensíveis a esse processo (ALOMAR et al., 2006). Adicionalmente, já foi descrito que a centrifugação por si só pode aumentar as espécies reativas de oxigênio (EROs) que aumentam as chances de dano de DNA espermático (AITKEN; CLARKSON, 1988).

As práticas convencionais utilizadas na PIV de embriões bovinos para selecionar oócitos e espermatozoides são bastante simplistas e subjetivas, existindo a possibilidade de que os gametas selecionados contenham alterações dos mais diversos tipos e origens e, conseqüentemente, de apresentarem um desenvolvimento alterado. As células embrionárias anormais são removidas por apoptose, que é um processo fisiológico no embrião. Apenas um excesso ou falta de apoptose pode levar à morte embrionária ou a alterações de desenvolvimento. Condições de cultura subótimas, sem dúvida, também contribuem para a apoptose embrionária indevida (VAN SOOM et al., 2007).

O sucesso da fecundação depende da capacidade do espermatozoide sofrer reação acrossômica. Para estimular essa condição *in vitro*, os meios de cultivo são suplementados com agentes capacitores. Para a espécie bovina, o mais comumente utilizado é a heparina, que auxilia na remoção dos fatores incapacitantes presentes na membrana do espermatozoide (PEREIRA et al., 2000).

Entretanto, mesmo dentro das condições padrões de capacitação espermática *in vitro*, a proporção de espermatozoides que apresenta a reação acrossômica pode ser muito variável, pois depende da raça do animal e das características individuais.

Em bovinos, já foi sugerido que a redução dos índices de fecundação *in vitro* pode estar relacionada a alterações da integridade de DNA espermático, observadas durante o processo de separação do sêmen ou durante a reação acrossômica (BOE-HANSEN et al., 2005).

Em seres humanos, já foi descrita a ocorrência de fragmentação de DNA espermático em momentos específicos. Agarwal e Allamaneni (2005) relataram que as causas de fragmentação de DNA em humanos podem ser condições transitórias e estar relacionadas com doenças, uso de drogas, febre alta, aumento da temperatura testicular, poluição do ar, fumo e idade avançada. Extrapolando-se tais situações para a reprodução em bovinos, pode-se deduzir que algumas dessas condições também podem influenciar o sêmen dos animais,

mesmo em indivíduos dotados de alto potencial genético, uma vez que os touros também estão sujeitos a estresse térmico, insulação testicular, alteração de alimentação, doenças e idade avançada. Dessa forma, diferentes partidas de sêmen podem apresentar diferença de potencial de fertilidade, ou seja, baixa fertilidade esporádica.

Resumindo, os fatores envolvidos com a capacidade de o embrião responder e reparar o dano de DNA ainda não são totalmente compreendidos. Muitas lacunas existem no que se refere aos papéis específicos e tempo de expressão de diversos genes de reparo de DNA nos estágios iniciais do desenvolvimento embrionário. González-Marín, Gosálvez e Roy (2012), ressaltaram que, mesmo que o oócito tenha sido fecundado por um espermatozoide que apresente dano de DNA no seu genoma, o gameta feminino, o zigoto ou até mesmo o blastocisto poderão reparar esse dano. Além disso, os testes atualmente disponíveis para a avaliação da fragmentação de DNA ainda não conseguem fornecer informações sobre o reparo do dano de DNA espermático. &

Referências

- AGARWAL, A.; ALLAMANENI, S. S. Sperm DNA damage assessment: a test whose time has come. **Fertility and Sterility**, v. 84, n. 4, p. 850-853, 2005.
- AGARWAL, A.; MAKKER, K.; SHARMA, R. Clinical relevance of oxidative stress in male factor infertility: an update. **American Journal of Reproductive Immunology**, v. 59, n. 1, p. 2-11, 2008.
- AGARWAL, A.; SALEH, R. A.; BEDAIWY, M. A. Role of reactive oxygen species in the pathophysiology of human reproduction. **Fertility and Sterility**, v. 79, n. 4, p. 829-843, 2003.
- AHMADI, A.; NG, S. C. Fertilizing ability of DNA-damaged spermatozoa. **Journal of Experimental Zoology**, v. 284, n. 6, p. 696-704, 1999.
- AITKEN, R. J. A free radical theory of male infertility. **Reproduction, Fertility, and Development**, v. 6, n. 1, p. 19-23, 1994.
- AITKEN, R. J. Founders' Lecture. Human spermatozoa: fruits of creation, seeds of doubt. **Reproduction, Fertility, and Development**, v. 16, n. 7, p. 655-664, 2004.
- AITKEN, R. J. Sperm function tests and fertility. **International Journal of Andrology**, v. 29, n. 1, p. 69-75, 2006.
- AITKEN, R. J.; BAKER, M. A. Reactive oxygen species generation by human spermatozoa: a continuing enigma. **International Journal of Andrology**, v. 25, n. 4, p. 191-194, 2002.
- AITKEN, R. J.; BAKER, M. A.; O'BRYAN, M. Shedding light on chemiluminescence: the application of chemiluminescence in diagnostic andrology. **Journal of Andrology**, v. 25, n. 4, p. 455-465, 2004.
- AITKEN, R. J.; BUCKINGHAM, D.; WEST, K.; WU, F. C.; ZIKOPOULOS, K.; RICHARDSON, D. W. Differential contribution of leucocytes and spermatozoa to the generation of reactive oxygen species in the ejaculates of oligozoospermic patients and fertile donors. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 94, n. 2, p. 451-462, 1992.
- AITKEN, R. J.; CLARKSON, J. S. Significance of reactive oxygen species and antioxidants in defining the efficacy of sperm preparation techniques. **Journal of Andrology**, v. 9, n. 6, p. 367-376, 1988.
- AITKEN, R. J.; DE IULIIS, G. N. On the possible origins of DNA damage in human spermatozoa. **Molecular Human Reproduction**, v. 16, n. 1, p. 3-13, 2010.
- AITKEN, R. J.; FINDLAY, J. K.; HUTT, K. J.; KERR, J. B. Apoptosis in the germ line. **Reproduction**, v. 141, n. 2, p. 139-150, 2011.
- AITKEN, R. J.; KRAUSZ, C. Oxidative stress, DNA damage and the Y chromosome. **Reproduction**, v. 122, n. 4, p. 497-506, 2001.
- ALLAMANENI, S. S.; AGARWAL, A.; NALLELLA, K. P.; SHARMA, R. K.; THOMAS JUNIOR, A. J.; SIKKA, S. C. Characterization of oxidative stress status by evaluation of reactive oxygen species levels in whole semen and isolated spermatozoa. **Fertility and Sterility**, v. 83, n. 3, p. 800-803, 2005.
- ALOMAR, M.; MAHIEU J.; VERHAEGHE, B.; DEFOIN, L.; DONNAY, I. Assessment of sperm quality parameters of six bulls showing different abilities to promote embryo development in vitro. **Reproduction, Fertility, and Development**, v. 18, n. 3, p. 395-402, 2006.
- AMANN, R. P.; SCHANBACHER, B. D. Physiology of male reproduction. **Journal of Animal Science**, v. 57, Suppl 2, p. 380-403, 1983.
- AMER, J.; GHOTI, H.; RACHMILEWITZ, E.; KOREN, A.; LEVIN, C.; FIBACH, E. Red blood cells, platelets and polymorphonuclear neutrophils of patients with sickle cell disease exhibit oxidative stress that can be ameliorated by antioxidants. **British Journal of Haematology**, v. 132, n. 1, p. 108-113, 2006.
- AMIRAT, L.; ANTON, M.; TAINTURIER, D.; CHATAGNON, G.; BATTUT, I.; COURTENS, J. L. Modifications of bull spermatozoa induced by three extenders: Biociphos, low density lipoprotein and Triladyl, before, during and after freezing and thawing. **Reproduction**, v. 129, n. 4, p. 535-543, 2005.
- ANDRABI, S. M. Mammalian sperm chromatin structure and assessment of DNA fragmentation. **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**, v. 24, n. 12, p. 561-569, 2007.
- ANZAR, M.; HE, L.; BUHR, M. M.; KROETSCH, T. G.; PAULS, K. P. Sperm apoptosis in fresh and cryopreserved bull semen detected by flow cytometry and its relationship with fertility. **Biology of Reproduction**, v. 66, n. 2, p. 354-360, 2002.
- AOKI, V. W.; LIU, L.; CARRELL, D. T. Identification and evaluation of a novel sperm protamine abnormality in a population of infertile males. **Human Reproduction**, v. 20, n. 5, p. 1298-1306, 2005.
- ARICAN, O.; KURUTAS, E. B. Oxidative stress in the blood of patients with active localized vitiligo. **Acta Dermatovenereologica Alpina, Pannonica, et Adriatica**, v. 17, n. 1, p. 12-16, 2008.
- BAART, E. B.; VAN DER HEIJDEN, G. W.; VAN DER HOEVEN, F. A.; BAKKER, R.; COOPER, T. G.; DE BOER, P. Reduced oocyte activation and first cleavage rate after ICSI with spermatozoa from a sterile mouse chromosome mutant. **Human Reproduction**, v. 19, n. 5, p. 1140-1147, 2004.
- BALHORN, R. A model for the structure of chromatin in mammalian sperm. **The Journal of Cell Biology**, v. 93, n. 2, p. 298-305, 1982.
- BALL, B. A.; VO, A. Osmotic tolerance of equine spermatozoa and the effects of soluble cryoprotectants on equine sperm motility, viability, and mitochondrial membrane potential. **Journal of Andrology**, v. 22, n. 6, p. 1061-1069, 2001.
- BARROS, P. M. H. **Estresse oxidativo e integridade do DNA em sêmen resfriado de gato-do-mato-pequeno (Leopardus tigrinus, SCHREBER, 1775)**. 2007. Tese (Doutorado em Ciências) - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.
- BARROSO, G.; VALDESPIN, C.; VEJA, E.; KERSHENOVICH, R.; AVILA R.; AVENDAÑO, C.; OEHNINGER, S. Developmental sperm contributions: fertilization and beyond. **Fertility and Sterility**, v. 92, n. 3, p. 835-848, 2009.
- BARTH, A. D.; BOWMAN, P. A. The sequential appearance of sperm abnormalities after scrotal insulation or dexamethasone treatment in bulls. **The Canadian Veterinary Journal**, v. 35, n. 2, p. 93-102, 1994.
- BAUM, J. S.; ST GEORGE, J. P.; MCCALL, K. Programmed cell death in the germline. **Seminars in Cell & Developmental Biology**, v. 16, n. 2, p. 245-259, 2005.
- BENEDETTI, S.; TAGLIAMONTE, M. C.; CATALANI, S.; PRIMITERRA, M.; CANESTRARI, F.; DE STEFANI, S.; PALINI, S.; BULLETTI, C. Differences in blood and semen oxidative status in fertile and infertile men, and their relationship with sperm quality. **Reproductive Biomedicine Online**, v. 25, n. 3, p. 300-306, 2012.
- BIANCHI, P. G.; MANICARDI, G. C.; BIZZARO, D.; BIANCHI, U.; SAKKAS, D. Effect of deoxyribonucleic acid protamination on fluorochrome staining and in situ nick-translation of murine and human mature spermatozoa. **Biology of Reproduction**, v. 49, n. 5, p. 1083-1088, 1993.
- BIZZARO, D.; MANICARDI, G. C.; BIANCHI, P. G.; BIANCHI, U.; MARIETHOZ, E.; SAKKAS, D. In-situ competition between protamine and fluorochromes for sperm DNA. **Molecular Human Reproduction**, v. 4, n. 2, p. 127-132, 1998.
- BLUMER, C. G.; FARELLO, R. M.; RESTELLI, A. E.; SPAINE, D. M.; BERTOLLA, R. P.; CEDENHO, A. P. Sperm nuclear DNA fragmentation and mitochondrial activity in men with varicocele. **Fertility and Sterility**, v. 90, n. 5, p. 1716-1722, 2008.

- BOE-HANSEN, G. B.; MORRIS, I. D.; ERSBØLL, A. K.; GREVE, T.; CHRISTENSEN, P. DNA integrity in sexed bull sperm assessed by neutral Comet assay and sperm chromatin structure assay. **Theriogenology**, v. 63, n. 6, p. 1789-1802, 2005.
- BRITO, L. F.; BARTH, A. D.; BILODEAU-GOESEELS, S.; PANICH, P. L.; KASTELIC, J. P. Comparison of methods to evaluate the plasmalemma of bovine sperm and their relationship with in vitro fertilization rate. **Theriogenology**, v. 60, n. 8, p. 1539-1551, 2003.
- BROWN, D. B.; MERRYMAN, D. C.; RIVNAY, B.; HOUSERMAN, V. L.; LONG, C. A.; HONEA, K. L. Evaluating a novel panel of sperm function tests for utility in predicting intracytoplasmic sperm injection (ICSI) outcome. **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**, v. 30, n. 4, p. 461-477, 2013.
- BUHR, M. M.; CANVIN, A. T.; BAILEY, J. L. Effects of semen preservation on boar spermatozoa head membranes. **Gamete Research**, v. 23, n. 4, p. 441-449, 1989.
- CALAMERA, J. C.; FERNANDEZ, P. J.; BUFFONE, M. G.; ACOSTA, A. A.; DONCEL, G. F. Effects of long-term in vitro incubation of human spermatozoa: functional parameters and catalase effect. **Andrologia**, v. 33, n. 2, p. 79-86, 2001.
- CARRELL, D. T.; EMERY, B. R.; HAMMOUD, S. Altered protamine expression and diminished spermatogenesis: what is the link? **Human Reproduction Update**, v. 13, n. 3, p. 313-327, 2007.
- CHAVEIRO, A.; SANTOS, P.; DA SILVA, F. M. Assessment of sperm apoptosis in cryopreserved bull semen after swim-up treatment: a flow cytometric study. **Reproduction in domestic animals = Zuchthygiene**, v. 42, n. 1, p. 17-21, 2007.
- COCUZZA, M.; SIKKA, S. C.; ATHAYDE, K. S.; AGARWAL, A. Clinical relevance of oxidative stress and sperm chromatin damage in male infertility: an evidence based analysis. **International Brazilian Journal of Urology**, v. 33, n. 5, p. 603-621, 2007.
- COMIZZOLI, P.; MARQUANT-LE GUIENNE, B.; HEYMAN, Y.; RENARD, J. P. Onset of the first S-phase is determined by a paternal effect during the G1-phase in bovine zygotes. **Biology of Reproduction**, v. 62, n. 6, p. 1677-1684, 2000.
- DE DIEGO-OTERO, Y.; ROMERO-ZERBO, Y.; EL BEKAY, R.; DECARA, J.; SANCHEZ, L.; RODRIGUEZ-DE FONSECA, F.; DEL ARCO-HERRERA, I. Alpha-tocopherol protects against oxidative stress in the fragile X knockout mouse: an experimental therapeutic approach for the Fmr1 deficiency. **Neuropsychopharmacology**, v. 34, n. 4, p. 1011-1026, 2009.
- DERIJCK, A.; VAN DER HEIJDEN, G.; GIELE, M.; PHILIPPENS, M.; DE BOER, P. DNA double-strand break repair in parental chromatin of mouse zygotes, the first cell cycle as an origin of de novo mutation. **Human Molecular Genetics**, v. 17, n. 13, p. 1922-1937, 2008.
- DESAI, N.; SHARMA, R.; MAKKER, K.; SABANEKH, E.; AGARWAL, A. Physiologic and pathologic levels of reactive oxygen species in neat semen of infertile men. **Fertility and Sterility**, v. 92, n. 5, p. 1626-1631, 2009.
- DOGAN, S.; MASON, M. C.; GOVINDARAJU, A.; BELSER, L.; KAYA, A.; STOKES, J.; ROWE, D.; MEMILI, E. Interrelationships Between Apoptosis and Fertility in Bull Sperm. **Journal of Reproduction and Development**, v. 59, n. 1, p. 18-26, 2013.
- EID, L. N.; LORTON, S. P.; PARRISH, J. J. Paternal influence on S-phase in the first cell cycle of the bovine embryo. **Biology of Reproduction**, v. 51, n. 6, p. 1232-1237, 1994.
- ENCISO, M.; LÓPEZ-FERNÁNDEZ, C.; FERNÁNDEZ, J. L.; GARCÍA, P.; GOSÁLBEZ, A.; GOSÁLVEZ, J. A new method to analyze boar sperm DNA fragmentation under bright-field or fluorescence microscopy. **Theriogenology**, v. 65, n. 2, p. 308-316, 2006.
- ERENPREISS, J.; SPANO, M.; ERENPREISA, J.; BUNGUM, M.; GIWERCMAN, A. Sperm chromatin structure and male fertility: biological and clinical aspects. **Asian Journal of Andrology**, v. 8, n. 1, p. 11-29, 2006.
- ESTERHUIZEN, A. D.; FRANKEN, D. R.; LOURENS, J. G.; PRINSLOO, E.; VAN ROOYEN, L. H. Sperm chromatin packaging as an indicator of in-vitro fertilization rates. **Human Reproduction**, v. 15, n. 3, p. 657-661, 2000.
- EVENSON, D. P.; LARSON, K. L.; JOST, L. K. Sperm chromatin structure assay: its clinical use for detecting sperm DNA fragmentation in male infertility and comparisons with other techniques. **Journal of Andrology**, v. 23, n. 1, p. 25-43, 2002.
- FATEHI, A. N.; BEVERS, M. M.; SCHOEVEERS, E.; ROELEN, B. A.; COLENBRANDER, B.; GADELLA, B. M. DNA damage in bovine sperm does not block fertilization and early embryonic development but induces apoptosis after the first cleavages. **Journal of Andrology**, v. 27, n. 2, p. 176-188, 2006.
- FATHL, Z.; TAVALAEE, M.; KIANI, A.; DEEMEH, M. R.; MODARESI, M.; NASR-ESFAHANI, M. H. Flow Cytometry: A Novel Approach for Indirect Assessment of Protamine Deficiency by CMA3 Staining, Taking into Account the Presence of M540 or Apoptotic Bodies. **International Journal of Fertility and Sterility**, v. 5, n. 3, p. 128-133, 2011.
- FERNÁNDEZ-GONZALEZ, R.; MOREIRA, P. N.; PÉREZ-CRESPO, M.; SÁNCHEZ-MARTÍN, M.; RAMIREZ, M. A.; PERICUESTA, E.; BILBAO, A.; BERMEJO-ALVAREZ, P.; DE DIOS HOURCADE, J.; DE FONSECA, F. R.; GUTIÉRREZ-ADÁN, A. Long-term effects of mouse intracytoplasmic sperm injection with DNA-fragmented sperm on health and behavior of adult offspring. **Biology of Reproduction**, v. 78, n. 4, p. 761-772, 2008.
- FOKSINSKI, M.; GACKOWSKI, D.; ROZALSKI, R.; SIOMEK, A.; GUZ, J.; SZPILA, A.; DZIAMAN, T.; OLINSKI, R. Effects of basal level of antioxidants on oxidative DNA damage in humans. **European Journal of Nutrition**, v. 46, n. 3, p. 174-180, 2007.
- FRANCAVILLA, S.; D'ABRIZIO, P.; RUCCI, N.; SILVANO, G.; PROPERZI, G.; STRAFACE, E.; CORDESCHI, G.; NECOZIONE, S.; GNESSI, L.; ARIZZI, M.; ULISSE, S. Fas and Fas ligand expression in fetal and adult human testis with normal or deranged spermatogenesis. **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 85, n. 8, p. 2692-2700, 2000.
- GAWECKA, J. E.; MARH, J.; ORTEGA, M.; YAMAUCHI, Y.; WARD, M. A.; WARD, W. S. Mouse zygotes respond to severe sperm DNA damage by delaying paternal DNA replication and embryonic development. **PLoS One**, v. 8, n. 2, p. e56385, 2013.
- GHARAGOZLOO, P.; AITKEN, R. J. The role of sperm oxidative stress in male infertility and the significance of oral antioxidant therapy. **Human Reproduction**, v. 26, n. 7, p. 1628-1640, 2011.
- GLANDER, H. J.; SCHALLER, J. Binding of annexin V to plasma membranes of human spermatozoa: a rapid assay for detection of membrane changes after cryostorage. **Molecular Human Reproduction**, v. 5, n. 2, p. 109-115, 1999.
- GONÇALVES, F. S.; BARRETTO, L. S.; ARRUDA, R. P.; PERRI, S. H.; MINGOTI, G. Z. Effect of antioxidants during bovine in vitro fertilization procedures on spermatozoa and embryo development. **Reproduction in domestic animals = Zuchthygiene**, v. 45, n. 1, p. 129-135, 2010.
- GONG, Y.; WU, J.; HUANG, Y.; SHEN, S.; HAN, X. Nonylphenol induces apoptosis in rat testicular Sertoli cells via endoplasmic reticulum stress. **Toxicology Letters**, v. 186, n. 2, p. 84-95, 2009.
- GONZÁLEZ-MARÍN, C.; GOSÁLVEZ, J.; ROY, R. Types, causes, detection and repair of DNA fragmentation in animal and human sperm cells. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 13, n. 11, p. 14026-14052, 2012.
- GRAVANCE, C. G.; VISHWANATH, R.; PITT, C.; GARNER, D. L.; CASEY, P. J. Effects of Cryopreservation on Bull Sperm Head Morphometry. **Journal of Andrology**, v. 19, n. 6, p. 704-709, 1998.
- HALLIWELL, B. Oxidative stress and cancer: have we moved forward? **The Biochemical Journal**, v. 401, n. 1, p. 1-11, 2007.
- HSIEH, Y. Y.; CHANG, C. C.; LIN, C. S. Seminal malondialdehyde concentration but not glutathione peroxidase activity is negatively correlated with seminal concentration and motility. **International Journal of Biological Sciences**, v. 2, n. 1, p. 23-29, 2006.
- IRANPOUR, F. G.; NASR-ESFAHANI, M. H.; VALOJERDI, M. R.; AL-TARAIHI, T. M. Chromomycin A3 staining as a useful tool for evaluation of male fertility. **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**, v. 17, n. 1, p. 60-66, 2000.

- JAMES, S. J.; CUTLER, P.; MELNYK, S.; JERNIGAN, S.; JANAK, L.; GAYLOR, D. W.; NEUBRANDER, J. A. Metabolic biomarkers of increased oxidative stress and impaired methylation capacity in children with autism. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 80, n. 6, p. 1611-1617, 2004.
- JANUSKAUSKAS, A.; JOHANNISSON, A.; SÖDERQUIST, L.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Assessment of sperm characteristics post-thaw and response to calcium ionophore in relation to fertility in Swedish dairy AI bulls. **Theriogenology**, v. 53, n. 4, p. 859-875, 2000.
- JONES, D. P. Redefining oxidative stress. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 8, n. 9/10, p.1865-1879, 2006.
- JONES, R.; MANN, T.; SHERINS, R. Peroxidative breakdown of phospholipids in human spermatozoa, spermicidal properties of fatty acid peroxides, and protective action of seminal plasma. **Fertility and Sterility**, v. 31, n. 5, p. 531-537, 1979.
- KHALIFA, T.A.A; REKKAS, C.A.; LYMBERPOULOS, A.G.; SIOGA, A.; DIMITRIADIS, I.; PAPANIKOLAOU, Th. Factors affecting chromatin stability of bovine spermatozoa. **Animal Reproduction Science**, v. 104, p. 143-163, 2008.
- KAUFMANN, S. H.; HENGARTNER, M. O. Programmed cell death: alive and well in the new millennium. **Trends in Cell Biology**, v. 11, n. 12, p. 526-534, 2001.
- KHURANA, N. K.; NIEMANN, H. Effects of oocyte quality, oxygen tension, embryo density, cumulus cells and energy substrates on cleavage and morula/blastocyst formation of bovine embryos. **Theriogenology**, v. 54, n. 5, p. 741-756, 2000.
- LANZAFAME, F. M.; LA VIGNERA, S.; VICARI, E.; CALOGERO, A. E. Oxidative stress and medical antioxidant treatment in male infertility. **Reproductive Biomedicine Online**, v. 19, n. 5, p. 638-659, 2009.
- LEWIS, S. E. M.; AGBAJE, I. M. Using the alkaline comet assay in prognostic tests for male infertility and assisted reproductive technology outcomes. **Mutagenesis**, v. 23, n. 3, p. 163-170, 2008.
- LOLIS, D.; GEORGIOU, I.; ZIKOPOULOS, K.; KONSTANTELLI, M.; MESSINIS, I. Chromomycin A3-staining as an indicator of protamine deficiency and fertilization. **International Journal of Andrology**, v. 19, n. 1, p. 23-27, 1996.
- MAIER, W. M.; NUSSBAUM, G.; DOMENJOU, L.; KLEMM, U.; ENGEL, W. The lack of protamine 2 (P2) in boar and bull spermatozoa is due to mutations within the P2 gene. **Nucleic Acids Research**, v. 18, n. 5, p. 1249-1254, 1990.
- MAKKER, K.; AGARWAL, A.; SHARMA, R. Oxidative stress & male infertility. **The Indian Journal of Medical Research**, v. 129, n. 4, p. 357-367, 2009.
- MARCHETTI, F.; WYROBEK, A. J. Mechanisms and consequences of paternally-transmitted chromosomal abnormalities. **Birth Defects Research. Part C, Embryo Today: Reviews**, v. 75, n. 2, p. 112-129, 2005.
- MAZUR, P. Freezing of living cells: mechanisms and implications. **The American Journal of Physiology**, v. 247, n. 3, pt. 1, p. C125-142, 1984.
- MCLAY, D. W.; CLARKE, H. J. Remodelling the paternal chromatin at fertilization in mammals. **Reproduction**, v.125, n. 5, p. 625-633, 2003.
- MCPHERSON, S. M.; LONGO, F. J. Localization of DNase I-hypersensitive regions during rat spermatogenesis: stage-dependent patterns and unique sensitivity of elongating spermatids. **Molecular Reproduction and Development**, v. 31, n. 4, p. 268-279, 1992.
- MEISTRICH, M. L.; MOHAPATRA, B.; SHIRLEY, C. R.; ZHAO, M. Roles of transition nuclear proteins in spermiogenesis. **Chromosoma**, v. 111, n. 8, p. 483-488, 2003.
- MENEZO, Y.; DALE, B.; COHEN, M. DNA damage and repair in human oocytes and embryos: a review. **Zygote**, v. 18, n. 4, p. 357-365, 2010.
- MULLER, K.; POMORSKI, T.; MÜLLER, P.; HERRMANN, A. Stability of transbilayer phospholipid asymmetry in viable ram sperm cells after cryotreatment. **Journal of Cell Science**, v. 112, n. 1, p. 11-20, 1999.
- NASR-ESFAHANI, M. H.; RAZAVI, S.; MARDANI, M. Relation between different human sperm nuclear maturity tests and in vitro fertilization. **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**, v. 18, n. 4, p. 219-225, 2001.
- NASR-ESFAHANI, M. H.; RAZAVI, S.; MOZDARANI, H.; MARDANI, M.; AZVAGI, H. Relationship between protamine deficiency with fertilization rate and incidence of sperm premature chromosomal condensation post-ICSI. **Andrologia**, v. 36, n. 3, p. 95-100, 2004.
- NICHI, M. **Sistemas de proteção enzimática e níveis de peroxidação espontânea dos lipídios seminais de touros zebuínos e taurinos criados a campo na região de Dourados, MS**. 2003. Dissertação (Mestrado em Reprodução Animal) - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003.
- NICHI, M. **Efeito do tratamento com antioxidantes e ácidos graxos poli-insaturados em amostras espermáticas epididimárias de touros**. 2009. Tese (Doutorado em Ciências) - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.
- NICHI, M.; BOLS, P. E.; ZÜGE, R. M.; BARNABE, V. H.; GOOVAERTS, I. G.; BARNABE, R. C.; CORTADA, C. N. Seasonal variation in semen quality in *Bos indicus* and *Bos taurus* bulls raised under tropical conditions. **Theriogenology**, v. 66, n. 4, p. 822-828, 2006.
- OLIVA, R. Protamines and male infertility. **Human Reproduction Update**, v. 12, n. 4, p. 417-435, 2006.
- PALMA, G. A.; SINOWATZ, F. Male and female effects on the in vitro production of bovine embryos. **Anatomia, Histologia, Embryologia**, v. 33, n. 5, p. 257-262, 2004.
- PARRISH, J. J.; KROGENAES, A.; SUSKO-PARRISH, J. L. Effect of bovine sperm separation by either swim-up or Percoll method on success of in vitro fertilization and early embryonic development. **Theriogenology**, v. 44, n. 6, p. 859-869, 1995.
- PENA, F. J.; RODRIGUEZ MARTINEZ, H.; TAPIA, J. A.; ORTEGA FERRUSOLA, C.; GONZÁLEZ FERNÁNDEZ, L.; MACÍAS GARCÍA, B. Mitochondria in mammalian sperm physiology and pathology: a review. **Reproduction in Domestic Animals = Zuchtthygiene**, v. 44, n. 2, p. 345-349, 2009.
- PEREIRA, R. J.; TULI, R. K.; WALLENHORST, S.; HOLTZ, W. The effect of heparin, caffeine and calcium ionophore A23187 on in vitro induction of the acrosome reaction in frozen-thawed bovine and caprine spermatozoa. **Theriogenology**, v. 54, n. 2, p. 185-192, 2000.
- POTTS, J. M.; PASQUALOTTO, F. F. Seminal oxidative stress in patients with chronic prostatitis. **Andrologia**, v. 35, n. 5, p. 304-308, 2003.
- RAFF, M. Cell suicide for beginners. **Nature**, v. 396, n. 6707, p. 119-122, 1998.
- RAHIMPOUR, M.; TALEBI, A. R.; ANVARI, M.; SARCHESHMEH, A. A.; OMIDI, M. Effects of different doses of ethanol on sperm parameters, chromatin structure and apoptosis in adult mice. **European Journal of Obstetrics, Gynecology, and Reproductive Biology**, v. 170, n. 2, p. 423-428, 2013.
- RAMOND, A.; GODIN-RIBUOT, D.; RIBUOT, C.; TOTOSON, P.; KORITCHNEVA, I.; CACHOT, S.; LEVY, P.; JOYEUX-FAURE, M. Oxidative stress mediates cardiac infarction aggravation induced by intermittent hypoxia. **Fundamental & Clinical Pharmacology**, v. 27, n. 3, p. 252-61, 2011.
- RECKOVA, Z.; MACHATKOVA, M.; RYBAR, R.; HORAKOVA, J.; HULINSKA, P.; MACHAL, L. Evaluation of chromatin integrity of motile bovine spermatozoa capacitated in vitro. **Zygote**, v. 16, n. 3, p. 195-202, 2008.
- REED, J. C. Proapoptotic multidomain Bcl-2/Bax-family proteins: mechanisms, physiological roles, and therapeutic opportunities. **Cell Death and Differentiation**, v. 13, n. 8, p. 1378-1386, 2006.
- RIBEIRO, S. C.; SARTORIUS, G.; PLETSCHER, F.; DE GEYTER, M.; ZHANG, H.; DE GEYTER, C. Isolation of spermatozoa with low levels of fragmented DNA with the use of flow cytometry and sorting. **Fertility and Sterility**, v. 100, n. 3, p. 686-694, 2013.

- RICCI, G.; PERTICARARI, S.; BOSCOLO, R.; MONTICO, M.; GUASCHINO, S.; PRESANI, G. Semen preparation methods and sperm apoptosis: swim-up versus gradient-density centrifugation technique. **Fertility and Sterility**, v. 91, n. 2, p. 632-638, 2009.
- ROCHA, H. L. O. G.; BELETTI, M. E.; MARCOLINI, T. T.; AMORIN, D. A. Z. Uso de laranja de acridina e azul de toluidina na avaliação da fertilidade masculina. **Bioscience Journal**, v. 18, n. 1, p. 65-77, 2002.
- RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. State of the art in farm animal sperm evaluation. **Reproduction, Fertility, and Development**, v. 19, n. 1, p. 91-101, 2007.
- RUIZ-PESINI, E.; DIEZ, C.; LAPEÑA, A. C.; PÉREZ-MARTOS, A.; MONTOYA, J.; ALVAREZ, E.; ARENAS, J.; LÓPEZ-PÉREZ, M. J. Correlation of sperm motility with mitochondrial enzymatic activities. **Clinical Chemistry**, v. 44, n. 8, pt. 1, p. 1616-1620, 1998.
- SAKKAS, D.; ALVAREZ, J. G. Sperm DNA fragmentation: mechanisms of origin, impact on reproductive outcome, and analysis. **Fertility and Sterility**, v. 93, n. 4, p. 1027-1036, 2010.
- SAKKAS, D.; MARIETHOZ, E.; MANICARDI, G.; BIZZARO, D.; BIANCHI, P. G.; BIANCHI, U. Origin of DNA damage in ejaculated human spermatozoa. **Reviews of Reproduction**, v. 4, n. 1, p. 31-37, 1999.
- SAKKAS, D.; MOFFATT, O.; MANICARDI, G. C.; MARIETHOZ, E.; TAROZZI, N.; BIZZARO, D. Nature of DNA damage in ejaculated human spermatozoa and the possible involvement of apoptosis. **Biology of Reproduction**, v. 66, n. 4, p. 1061-1067, 2002.
- SALEH, R. A.; AGARWAL, A.; NADA, E. A.; EL-TONSY, M. H.; SHARMA, R. K.; MEYER, A.; NELSON, D. R.; THOMAS, A. J. Negative effects of increased sperm DNA damage in relation to seminal oxidative stress in men with idiopathic and male factor infertility. **Fertility and Sterility**, v. 79, Suppl 3, p. 1597-1605, 2003.
- SHAMSI, M. B.; KUMAR, R.; DADA, R. Evaluation of nuclear DNA damage in human spermatozoa in men opting for assisted reproduction. **The Indian Journal of Medical Research**, v. 127, n. 2, p. 115-123, 2008.
- SHARMA, R.; AGARWAL, A.; MOHANTY, G.; HAMADA, A. J.; GOPALAN, B.; WILLARD, B.; YADAV, S.; DU PLESSIS, S. Proteomic analysis of human spermatozoa proteins with oxidative stress. **Reproductive Biology and Endocrinology: RB&E**, v. 11, n. 48, 2013.
- SHIMURA, T.; INOUE, M.; TAGA, M.; SHIRAIISHI, K.; UEMATSU, N.; TAKEI, N.; YUAN, Z. M.; SHINOHARA, T.; NIWA, O. p53-dependent S-phase damage checkpoint and pronuclear cross talk in mouse zygotes with X-irradiated sperm. **Molecular and Cellular Biology**, v. 22, n. 7, p. 2220-2228, 2002.
- SIMÕES, R.; FEITOSA, W. B.; MENDES, C. M.; MARQUES, M. G.; NICACIO, A. C.; DE BARROS, F. R.; VISINTIN, J. A.; ASSUMPÇÃO, M. E. Use of chromomycin A3 staining in bovine sperm cells for detection of protamine deficiency. **Biotechnic & Histochemistry**, v. 84, n. 3, p. 79-83, 2009.
- SIMÕES, R.; FEITOSA, W. B.; SIQUEIRA, A. F.; NICHI, M.; PAULA-LOPES, F. F.; MARQUES, M. G.; PERES, M. A.; BARNABE, V. H.; VISINTIN, J. A.; ASSUMPÇÃO, M. E. Influence of bovine sperm DNA fragmentation and oxidative stress on early embryo in vitro development outcome. **Reproduction**, v. 146, n. 5, p. 433-441, 2013.
- SINGH, N.; DHALLA, A. K.; SENEVIRATNE, C.; SINGAL, P. K. Oxidative stress and heart failure. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 147, n. 1/2, p. 77-81, 1995.
- SINGH, N. P.; MULLER, C. H.; BERGER, R. E. Effects of age on DNA double-strand breaks and apoptosis in human sperm. **Fertility and Sterility**, v. 80, n. 6, p. 1420-1430, 2003.
- STOHS, S. J. The role of free radicals in toxicity and disease. **Journal of Basic and Clinical Physiology and Pharmacology**, v. 6, n. 3/4, p. 205-228, 1995.
- SUGANUMA, R.; YANAGIMACHI, R.; MEISTRICH, M. L. Decline in fertility of mouse sperm with abnormal chromatin during epididymal passage as revealed by ICSI. **Human Reproduction**, v. 20, n. 11, p. 3101-3108, 2005.
- TARTAGLIONE, C. M.; RITTA, M. N. Prognostic value of spermatological parameters as predictors of in vitro fertility of frozen-thawed bull semen. **Theriogenology**, v. 62, n. 7, p. 1245-1252, 2004.
- TAVILANI, H.; GOODARZI, M. T.; VAISI-RAYGANI, A.; SALIMI, S.; HASSANZADEH, T. Activity of antioxidant enzymes in seminal plasma and their relationship with lipid peroxidation of spermatozoa. **International Brazilian Journal of Urology**, v. 34, n. 4, p. 485-491, 2008.
- TESARIK, J. Paternal effects on cell division in the human preimplantation embryo. **Reproductive Biomedicine Online**, v. 10, n. 3, p. 370-375, 2005.
- TESARIK, J.; GRECO, E.; MENDOZA, C. Late, but not early, paternal effect on human embryo development is related to sperm DNA fragmentation. **Human Reproduction**, v. 19, n. 3, p. 611-615, 2004.
- TESARIK, J.; MENDOZA, C.; GRECO, E. Paternal effects acting during the first cell cycle of human preimplantation development after ICSI. **Human Reproduction**, v. 17, n. 1, p. 184-189, 2002.
- TREMELLEN, K. Oxidative stress and male infertility--a clinical perspective. **Human Reproduction Update**, v. 14, n. 3, p. 243-258, 2008.
- TWIGG, J.; FULTON, N.; GOMEZ, E.; IRVINE, D. S.; AITKEN, R. J. Analysis of the impact of intracellular reactive oxygen species generation on the structural and functional integrity of human spermatozoa: lipid peroxidation, DNA fragmentation and effectiveness of antioxidants. **Human Reproduction**, v. 13, n. 6, p. 1429-1436, 1998.
- URREGO, R.; RÍOS, A.; MARTHA, O. A.; OMAR, C. Efecto de la centrifugación sobre la membrana plasmática y el ADN de espermatozoides bovinos. **Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias**, v. 21, p. 19-26, 2008.
- VALKO, M.; LEIBFRITZ, D.; MONCOL, J.; CRONIN, M. T.; MAZUR, M.; TELSER, J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 39, n. 1, p. 44-84, 2007.
- VAN SOOM, A.; VANDAELE, L.; GOOSSENS, K.; DE KRUIF, A.; PEELMAN, L. Gamete origin in relation to early embryo development. **Theriogenology**, v. 68, Suppl 1, p. 131-137, 2007.
- VIRRO, M. R.; LARSON-COOK, K. L.; EVENSON, D. P. Sperm chromatin structure assay (SCSA) parameters are related to fertilization, blastocyst development, and ongoing pregnancy in in vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection cycles. **Fertility and Sterility**, v. 81, n. 5, p. 1289-1295, 2004.
- WARD, F.; RIZOS, D.; CORRIDAN, D.; QUINN, K.; BOLAND, M.; LONERGAN, P. Paternal influence on the time of first embryonic cleavage post insemination and the implications for subsequent bovine embryo development in vitro and fertility in vivo. **Molecular Reproduction and Development**, v. 60, n. 1, p. 47-55, 2001.
- WATSON, P. F. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. **Animal Reproduction Science**, v. 60-61, p. 481-492, 2000.
- WIRLEITNER, B.; VANDERZWALMEN, P.; STECHER, A.; SPITZER, D.; SCHUFF, M.; SCHWERDA, D.; BACH, M.; SCHECHINGER, B.; HERBERT ZECH, N. Dietary supplementation of antioxidants improves semen quality of IVF patients in terms of motility, sperm count, and nuclear vacuolization. **International Journal for Vitamin and Nutrition Research**, v. 82, n. 6, p. 391-398, 2012.
- WOLFF, H. The biologic significance of white blood cells in semen. **Fertility and Sterility**, v. 63, n. 6, p. 1143-1157, 1995.
- WOUTERS-TYROU, D.; MARTINAGE, A.; CHEVAILLIER, P.; SAUTIÈRE, P. Nuclear basic proteins in spermiogenesis. **Biochimie**, v. 80, n. 2, p. 117-128, 1998.
- ZORN, B.; GOLOB, B.; IHAN, A.; KOPITAR, A.; KOLBEZEN, M. Apoptotic sperm biomarkers and their correlation with conventional sperm parameters and male fertility potential. **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**, v. 29, n. 4, p. 357-364, 2012.