

**Anais da**

Reunião Anual da  
**ABRAA**  
Associação Brasileira de Andrologia Animal

8 e 9 de junho de 2018

**ABRAA**  
Associação Brasileira de Andrologia Animal

## Anormalidades morfológicas e danos no DNA espermático em touros bubalinos (*Bubalus bubalis*) submetidos à insulação testicular

Arnaldo Algaranhar Gonçalves<sup>1</sup>  
algaranhar.vet@gmail.com

Diego Fernando Dubeibe Marin<sup>1</sup>  
Thiago Velasco Guimarães Silva<sup>1</sup>  
Ana Júlia Mota de Lima<sup>1</sup>

Mauro Andrey Rodrigues Morais<sup>1</sup>  
Eduardo Baia de Souza<sup>1</sup>  
Dayana Neves de Melo<sup>2</sup>

Sebastião Tavares Rolim Filho<sup>2</sup>  
Alexandre Rossetto Garcia<sup>3</sup>  
Otávio Mítio Ohashi<sup>1</sup>

**Abstract:** The aim was to understand the performance of testicular thermal stress on the morphology, compaction and integrity of DNA in the different phases of the spermatogenic cycle in buffaloes, using chromomycin A3 and acridine orange respectively. Five adult bulls undergoing testicular insulation for 48 hours and semen collected once every seven days, divided into pre and post testicular insulation. The post-insulation testicular temperature increased 3.2°C ( $p < 0.05$ ) in relation to the control. There was an increase ( $p < 0.05$ ) in the deprotamination of the spermatic chromatin in the seventh week after insulation compared to the control ( $11.0 \pm 3.1$  and  $3.0 \pm 2.8$ ), but there was no difference in DNA fragmentation after insulation. However, head defects showed an increase ( $p < 0.05$ ) in the seventh week in relation to the control ( $0.7 \pm 0.2$  and  $0.13 \pm 0.16$ ). Therefore, the increase in testicular temperature in buffaloes had a negative influence on spermatogonia and primary spermatocytes on chromatin protamination.

**Keywords:** Chromatin; Fragmentation; Protamine.

**Palavras-chave:** Cromatina; Fragmentação; Protamina.

**Introdução** - As condições climáticas desfavoráveis exercidas pela elevada temperatura, associada à alta umidade relativa do ar influenciam negativamente a capacidade reprodutiva dos animais de corte ou leite [1]. Na bubalinocultura existe um diminuto entendimento quanto à ação do estresse térmico sobre o epitélio seminífero e o epidídimo, e sua consequência na morfologia espermática e alterações no seu DNA. Em bovinos [2], foi demonstrado que o aumento da temperatura testicular exerceu efeito deletério nas diferentes fases da espermatogênese, in-

<sup>1</sup> Laboratório de Fertilização *in vitro* - Universidade Federal do Pará.

<sup>2</sup> Setor de Reprodução Animal - Universidade Federal Rural da Amazônia.

<sup>3</sup> Embrapa Pecuária Sudeste

duzindo aumento na incidência de patologias espermáticas, principalmente de cabeça e, dessa forma, diminuindo a qualidade do sêmen. Esta interferência ambiental, como estresse térmico, pode também, alterar processos moleculares, aumentando as espécies reativas do oxigênio que causam apoptose e fragmentação do DNA, além de deficiências durante a troca da histona pela protamina na cromatina [3], essencial para a entrega do genoma paterno, pois além de proteger o DNA executa o *gene imprinting* e regulações epigenéticas [4]. Assim, o objetivo deste trabalho foi investigar o efeito do estresse térmico testicular sobre as características de morfologia, compactação e integridade do DNA, nas diferentes fases do ciclo espermatogênico em bubalinos.

**Material e Métodos** - Cinco touros bubalinos (*Bubalus bubalis*) adultos da raça Murrah foram utilizados no experimento. As coletas de sêmen foram realizadas a cada sete dias, divididas em quatro coletas pré e nove coletas pós insulação testicular, utilizando vagina artificial. A insulação testicular foi realizada por uma bolsa impermeável fixada na região escrotal durante 48 horas. Aferição da temperatura da pele testicular foi realizada com termômetro clínico seis vezes na pré insulação, 24 e 48 horas durante a insulação e três vezes por semana no pós insulação. A avaliação da morfologia espermática foi realizada com microscópio de contraste de fase (1000X) e classificadas de acordo com Bloom (1973). Para avaliação da deficiência de protamina, as células espermáticas foram marcadas utilizando o corante fluorescente cromomicina (CMA3) [7]. A fragmentação do DNA foi detectada utilizando a técnica de coloração por acridina laranja [8]. As lâminas foram lidas em microscópio de fluorescência. Os dados foram comparados por médias pelo teste Tukey, utilizando o programa estatístico SAS 9,0. O nível de significância adotado foi de 5%.

**Resultados e Discussão** - A temperatura testicular após a insulação, aumentou 3,2 °C ( $p < 0,05$ ) em relação à temperatura controle, desestabilizando a temperatura fisiológica para o adequado processo de espermatogênese (Tabela 1). Houve elevação significativa ( $p < 0,05$ ) para a desprotaminação da cromatina na sétima coleta de sêmen após a insulação, confirmando que as espermatogônias, no momento da insulação tiveram falhas na fase mitótica para duplicação do DNA ou na primeira meiose, onde os espermátócitos primários iniciam o processo de troca das histonas com a quebra do DNA pela enzima topoisomerase II durante a substituição das proteínas de transição não histonas (TPs) pelas protaminas [8]. Esses resultados contrastam com o Rahman et al. (2014) [7], que insularam touros bovinos de raças taurinas por 48 horas e avaliaram a desprotaminação espermática, e observaram médias mais elevadas de defeitos de cabeça na quarta semana após a insulação testicular, fase em que os espermatozoides estariam mais avançados na divisão meiótica ou até no início do processo de espermiogênese. Isso indica que as espermatogônias dos bubalinos são mais susceptíveis a dano pelo calor que em bovinos.

No teste de fragmentação do DNA, não foi verificada diferença na integridade do DNA após a insulação testicular. Estudo de Kazerooni et al. (2009) [9] não demonstrou diferença significativa quando a fragmentação do DNA foi avaliada pela técnica de acridina laranja em espermatozoides humano com baixa fertilidade e histórico de aborto nas esposas. Já ava-

liação da desprotaminação mediante CMA3 resultou diferença ( $p < 0,05$ ), concluindo que a falha na troca de histona para protamina ou o inverso tem maior relação com a concepção e abortos espontâneos.

**Tabela 1** – Média e desvio padrão de acordo com o tempo de coleta seminal de touros bubalinos submetidos a 48 horas de insulação testicular, avaliando a temperatura testicular, desprotaminação do DNA, fragmentação do DNA do espermático e a morfologia com o defeito de cabeça.

Tempo	Temperatura Testicular (°C)	CMA3 (%)	AL (%)	Defeitos de Cabeça (%)
Controle	32,0 ± 0,8 <sup>B</sup>	3,0 ± 2,8 <sup>B</sup>	3,8 ± 4,7 <sup>NS</sup>	0,13 ± 0,16 <sup>B</sup>
Insulação	35,2 ± 2,0 <sup>A</sup>	*	*	*
1º Pós Insulação	33,5 ± 0,6 <sup>ABC</sup>	2,8 ± 0,6 <sup>B</sup>	4,5 ± 4,0 <sup>NS</sup>	0,06 ± 0,08 <sup>B</sup>
2º Pós Insulação	33,7 ± 0,6 <sup>ABC</sup>	3,9 ± 4,2 <sup>AB</sup>	3,3 ± 2,6 <sup>NS</sup>	0,02 ± 0,04 <sup>B</sup>
3º Pós Insulação	33,4 ± 0,2 <sup>ABC</sup>	6,2 ± 3,9 <sup>AB</sup>	8,1 ± 7,8 <sup>NS</sup>	0,3 ± 0,3 <sup>AB</sup>
4º Pós Insulação	32,1 ± 0,4 <sup>BC</sup>	9,3 ± 8,9 <sup>AB</sup>	2,8 ± 3,7 <sup>NS</sup>	0,3 ± 0,3 <sup>AB</sup>
5º Pós Insulação	32,9 ± 0,5 <sup>BC</sup>	7,3 ± 4,0 <sup>AB</sup>	4,4 ± 3,7 <sup>NS</sup>	0,3 ± 0,1 <sup>AB</sup>
6º Pós Insulação	33,6 ± 0,5 <sup>ABC</sup>	5,6 ± 3,5 <sup>AB</sup>	8,0 ± 5,1 <sup>NS</sup>	0,2 ± 0,2 <sup>AB</sup>
7º Pós Insulação	33,5 ± 0,5 <sup>ABC</sup>	11,0 ± 3,1 <sup>A</sup>	8,1 ± 1,4 <sup>NS</sup>	0,7 ± 0,2 <sup>A</sup>
8º Pós Insulação	33,0 ± 1,0 <sup>BC</sup>	8,1 ± 4,2 <sup>AB</sup>	6,5 ± 6,4 <sup>NS</sup>	0,4 ± 0,4 <sup>AB</sup>
9º Pós Insulação	33,1 ± 1,1 <sup>C</sup>	10,7 ± 5,9 <sup>AB</sup>	7,1 ± 8,3 <sup>NS</sup>	0,3 ± 0,07 <sup>AB</sup>

Valores com letras maiúsculas diferentes sobrescritas na mesma coluna diferem significativamente (A-C,  $P < 0,05$ ). CMA3: Técnica de Cromomicina A3, avaliar desprotaminação do DNA espermático; AL: Técnica de Acridina laranja, avaliar fragmentação do DNA espermático; NS: não significativo; \*: ausentes.

O estresse térmico testicular também provocou um aumento gradativo nos defeitos de cabeça espermática, sendo que na sétima semana após a insulação houve diferença ( $p < 0,05$ ) comparada ao controle. Esta influência foi decorrente principalmente no aumento das patologias de cabeça piriforme e cabeça grande, curta ou longa. Segundo Enciso et al. (2011) [3], os estudos realizados que exploram a relação entre morfologia espermática e parâmetros de danos no DNA ainda são controversos, no entanto afirmam que falhas no processo de reparos durante as quebras das torções do DNA, para a troca das proteínas nucleares, resultam em morfologias espermáticas anormais. Dessa forma, é possível inferir que o estresse térmico não ocasionou altos danos na morfologia dos espermatozoides, porém foi capaz de causar danos nas proteínas nucleares da cromatina espermática.

**Considerações Finais** – Aumento na temperatura testicular em búfalos influenciou negativamente no desenvolvimento das espermatogônias e dos espermatócitos primários, tanto na morfologia quanto na protaminação da cromatina. São necessários estudos complementares para esclarecer a relação da fragmentação do DNA com a morfologia espermática.

#### Referências Bibliográficas

[1] GARCIA, A. R. Conforto térmico na reprodução de bubalinos criados em condições tropicais. *Rev. Bras. Reprod. Anim.*, v.37, n.2, p.121-130, 2013.

[2] GABALDI, S. H.; WOLF, A. A importância da termorregulação testicular na qualidade do sêmen em touros. **Ciê. Agr. Saúde.**, v.2, n.2, p.66-70, 2002.

[3] ENCISO, M.; CISALE, H.; JOHNSTON, S. D.; SARASA, J. Major morphological sperm abnormalities in the bull are related to sperm DNA damage. **Theriogenology**, v.76, p. 23-32, 2011.

[4] HUTCHISON, J. M.; RAU, D. C.; DEROUCHÉY, J. E. Role of disulfide bonds on DNA packaging forces in bull sperm chromatin. **Biophys. J.**, v.113, n.7, p. 1925-1933, 2017.

[5] SIMÕES, R.; FEITOSA, W. B.; MENDES, C. M.; MARQUES, M. G.; NICACIO, A. C.; DE BARROS, F. R. O.; VISINTIN, J. A.; ASSUMPÇÃO, M. E. O. A. Use of chromomycin A3 staining in bovine sperm cells for detection of protamine deficiency. **Biotechnic & Histochemistry**. v. 84, n. 3, p. 79-83, 2009.

[6] UNANIAN, M. M. **Integridade da cromatina: método complementar para avaliação da qualidade do sêmen bovino**. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2000. 21p. (Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Documentos, 56).

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

[8] RAHMAN, M. B.; KAMAL, M. M.; RIJSSELAERE, T.; VANDAELE, L.; SCHAMSUDDIN, M.; VAN SOOM, A. Altered chromatin condensation of heat-stresses spermatozoa perturbs the dynamics of DNA methylation reprogramming in the paternal genome after in vitro fertilisation in cattle. **Reprod Fertil Dev**. v. 26, n.8, p. 1107-16, 2014.

[9] KAZEROONI, T.; ASADI, N.; JADID, L.; KAZEROONI, M.; GHANADI, A. Evaluation os sperm chromatin quality with acridine orange test, chromomycin A3 and aniline blue staining in couples with unexplained recurrent abortion. **J Assist Reprod Genet**. v. 26, p. 591-596, 2009.

**Agradecimentos:** À CAPES pela concessão de bolsa de estudos. O CNPq pelo projeto nº 480100/2013-6 para o financiamento dos reagentes.