

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL

MORFOMETRIA E COMPACTAÇÃO DA CROMATINA
ESPERMÁTICA DE TOUROS NELORE DE ACORDO COM A
IDADE E SUA INFLUÊNCIA NA PRODUÇÃO DE EMBRIÕES
in vitro

Bruna Helena Kipper
Médica Veterinária

2014

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**MORFOMETRIA E COMPACTAÇÃO DA CROMATINA
ESPERMÁTICA DE TOUROS NELORE DE ACORDO COM A
IDADE E SUA INFLUÊNCIA NA PRODUÇÃO DE EMBRIÕES
*in vitro***

Bruna Helena Kipper

Orientadora: Profa. Dra. Marion Burkhardt de Koivisto

**Dissertação apresentada à Faculdade de
Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp,
Câmpus de Jaboticabal, como parte das
exigências para a obtenção do título de
Mestre em Medicina Veterinária, área de
Reprodução Animal**

2014

Kipper, Bruna Helena
K57m Morfometria e compactação da cromatina espermática de touros
Nelore de acordo com a idade e sua influência na produção de
embriões *in vitro* / Bruna Helena Kipper. – – Jaboticabal, 2014
xv, 55 p. : il. ; 28 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista,
Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2014
Orientadora: Marion Burkhardt de Koivisto
Banca examinadora: Cássia Orlandi, Gisele Mingoti
Bibliografia

1. Espermatozoide-azul de toluidina. 2. Espermatozoide-
cromomicina A3. 3. Bovinos-touro Nelore. 4. Sêmen-fertilidade. I.
Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 619:612.616.2:636.2

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação –
Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - UNESP, Câmpus de Jaboticabal.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: MORFOMETRIA E COMPACTAÇÃO DA CROMATINA ESPERMÁTICA DE TOUROS NELORE DE ACORDO COM A IDADE E SUA INFLUÊNCIA NA PRODUÇÃO DE EMBRIÕES in vitro

AUTORA: BRUNA HELENA KIPPER

ORIENTADORA: Profa. Dra. MARION BURKHARDT DE KOIVISTO

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de MESTRE EM MEDICINA VETERINÁRIA, Área: REPRODUÇÃO ANIMAL, pela Comissão Examinadora:



Profa. Dra. MARION BURKHARDT DE KOIVISTO

Departamento de Clínica e Cirurgia e Reprodução Animal / Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba



Profa. Dra. GISELE ZOCCAL MINGOTI

Departamento de Apoio, Produção e Saúde Animal / Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba



Profa. Dra. CASSIA MARIA BARROSO ORLANDI

Universidade Federal de São Paulo / Diadema/SP

Data da realização: 30 de junho de 2014.

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

Bruna Helena Kipper – nascida em Blumenau-SC, no dia 09 do mês de Setembro de 1987. Concluiu o ensino médio no Colégio Bom Jesus Santo Antônio, na cidade de Blumenau-SC, em dezembro de 2005. Ingressou no curso de Graduação em Medicina Veterinária na Fundação Universidade Regional de Blumenau–FURB, na cidade de Blumenau–SC, em fevereiro de 2006. Conclui o curso superior em Medicina Veterinária em dezembro de 2010. Ingressou no curso de pós-graduação, nível de especialização em março de 2011, área de Higiene e Inspeção de Produtos de Origem Animal e Defesa Sanitária Animal, no qual obteve título de especialista em dezembro de 2013. Ingressou no curso de pós-graduação, nível de Mestrado em março de 2012, sob orientação da Professora Adjunta Marion Burkhardt de Koivisto, no Programa de Medicina Veterinária, Área de Concentração em Reprodução Animal, na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias Câmpus de Jaboticabal da Universidade Estadual Paulista – UNESP.

“O sucesso nasce do querer, da determinação e persistência em se chegar a um objetivo. Mesmo não atingindo o alvo, quem busca e vence obstáculos, no mínimo fará coisas admiráveis.”

José de Alencar

À minha família, em especial aos meus pais Renato e Roseli e à minha irmã Ana,
por todo o apoio, incentivo e compreensão. Amo vocês!

AGRADECIMENTOS

A **Deus** por me proporcionar força e coragem na realização deste projeto.

À Professora **Marion Burkhardt de Koivisto**, pela orientação do projeto, confiança e paciência, por me mostrar os benefícios da meditação e por ser um exemplo de fé. Você me acolheu e me ensinou muito ao longo destes anos. Ensinou-me a ter perseverança e mostrou que mesmo a caminhada sendo difícil ela seria recompensadora.

Aos meus pais, **Renato Roque Kipper** e **Roseli Kipper**, pelo amor, apoio e compreensão ao longo desta jornada.

Aos meus avôs e avós, presentes ou em memória, que se sentem orgulhosos pela minha formação.

À minha irmã, **Ana Caroline Kipper**, pelo incentivo e por ser minha fiel amiga. Que bom poder contar para sempre com você!

Ao meu sobrinho e afilhado **Bruno Kipper Bornhausen** por me proporcionar tanta alegria e conseguir com um doce sorriso tirar toda a minha preocupação.

Às minhas amigas queridas que conheci em Araçatuba, **Juliane Teramachi Trevizan** e **Isadora Resende Carvalho**. Vocês me ajudaram muito, foram minhas irmãs, conselheiras, incentivadoras. Levarei vocês para sempre em meu coração. Agradeço a Deus por ter as colocado no meu caminho e ter feito esta jornada mais leve. Nos momentos de angústia encontrei na nossa amizade a determinação para alcançar este resultado e o carinho necessário para superar a distância de casa.

À amiga **Janaína Torres Carreira**, não há palavra para descrever o quanto você foi importante na realização deste projeto. Desde o início muito presente e ajudando, desde o tema até a discussão. Obrigada!

À Professora **Gisele Zocal Mingoti** por ter disponibilizado seu laboratório de Fertilização *in vitro* para a realização de parte deste trabalho. Nunca esquecerei a sua ajuda, disponibilidade e dedicação para que esta etapa fosse cumprida com êxito.

Ao professor **Marcelo Emílio Beletti** pela disposição a me passar o protocolo do Azul de Toluidina e estar sempre disponível para dúvidas e discussões. O sucesso deste trabalho depende também de você.

Ao professor **Bruno Augusto Nassif Travençolo**, pela importante ajuda na informática deste trabalho, sempre disposto a tirar minhas dúvidas rapidamente.

À **Beatriz Leão, Nathália Rocha Frigoni e Priscila Chediek Dall'Acqua** pela ajuda na realização da fertilização *in vitro*, pela paciência e por terem me ensinado cada passo.

À minha amiga **Cássia Orlandi**, que desde o início quando cheguei à cidade me acolheu e gentilmente disponibilizou sua casa até que eu me hospedasse adequadamente.

Aos meus amigos que conheci ao longo desta jornada, **Melissa, Luísa, Douglas, Joana, Anirene, Ludmilla, Livia e Roberta**, pela amizade, força e companheirismo no decorrer do percurso.

Aos funcionários da FMVA, **Marta, Claudete, Silvia, Clédio e Esaú**, por terem me recepcionado muito bem na faculdade, ajudando com impressões, telefonemas e limpeza dos materiais.

À professora **Silvia Helena Venturoli Perri** pela ajuda na estatística deste experimento.

À **Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - UNESP – Câmpus de Jaboticabal** pela oportunidade da realização do Mestrado e à **Faculdade de Medicina Veterinária – UNESP – Câmpus de Araçatuba** pela disponibilidade de todo o material e laboratório.

Ao **Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)** pela concessão da Bolsa de Estudos durante a etapa inicial do mestrado e à **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)** pela concessão da bolsa.

Cada mencionado teve participação muito importante na realização desta etapa, seja com ajuda na realização do trabalho ou com palavras de carinho e afeto. Agradeço a todos, que mesmo sem saber, tornaram este sonho possível.

MUITO OBRIGADA!

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xi
LISTA DE TABELAS.....	xiii
LISTA DE FIGURAS.....	xv
RESUMO.....	xvi
ABSTRACT.....	xvii
I INTRODUÇÃO.....	1
II REVISÃO DE LITERATURA.....	4
2.1 O espermatozoide e sua estrutura.....	4
2.2 A cromatina espermática e métodos de avaliação.....	5
2.3 Morfologia espermática	7
2.4 Características seminais de touros de acordo com a idade.....	9
2.5 Produção <i>in vitro</i> de embriões bovinos.....	10
2.6 Métodos e corantes para avaliação da cromatina espermática utilizados neste estudo.....	12
2.6.1 Azul de Toluidina.....	12
2.6.2 Cromomicina A3.....	14
III HIPÓTESE.....	15
IV OBJETIVOS.....	16
4.1 Objetivo Geral.....	16
4.2 Objetivos Específicos.....	16
V MATERIAL E MÉTODOS.....	17
5.1 Seleção dos animais e preparo das amostras.....	17
5.2 Delineamento experimental.....	18
5.3 Experimento I (Análises físicas e funcionais).....	20
5.3.1 Análise de motilidade e vigor.....	20
5.3.2 Concentração espermática.....	20
5.3.3 Morfologia espermática.....	20
5.3.4 Avaliação da condensação da cromatina e morfometria da cabeça espermática com azul de toluidina.....	21
5.3.5 Avaliação da protaminação espermática pela Cromomicina A3	23

5.4 Experimento II (Produção <i>in vitro</i> de embriões).....	24
5.4.1 Obtenção e seleção dos oócitos.....	24
5.4.2 Maturação <i>in vitro</i> dos oócitos.....	25
5.4.3 Fertilização <i>in vitro</i>	25
5.4.4 Cultivo <i>in vitro</i>	27
VI ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	28
VII RESULTADOS.....	29
7.1 Experimento I.....	29
7.1.1 Análise da motilidade, vigor, concentração e morfologia espermática.....	29
7.1.2 Avaliação da condensação da cromatina e morfometria da cabeça espermática com azul de toluidina.....	32
7.1.3 Avaliação da protaminação espermática com Cromomicina A3	37
7.1.4 Resultados das correlações.....	39
7.2 Experimento II.....	40
7.2.1 Produção <i>in vitro</i> de embriões utilizando espermatozoides com e sem lesão de cromatina.....	40
VIII DISCUSSÃO.....	41
IX RESUMO DOS RESULTADOS.....	46
X CONCLUSÃO.....	47
REFERÊNCIAS.....	48

LISTA DE ABREVIATURAS

$\sqrt{\%}$ = Arcoseno

% = Porcentagem

$\pm$ = Mais ou menos

* = Asterisco

μg = Microgramas

μL = Microlitros

μm = Micrometros

< = Menor

> = Maior

$^{\circ}\text{C}$ = Graus centígrados

A = Área

ANOVA = Análise de variância

ASMA = Computer-assisted Sperm Head Morphometry Analysis

ATP = adenosina trifosfato

BEM = Aminoácidos essenciais

BSA = Albumina sérica bovina

C = Comprimento

CASMA = Computer-assisted Sperm Morphometry Analysis-fluorescence

CCPS = Centro de coleta e processamento de sêmen

CMA 3 = Cromomicina A3

CO_2 = Dióxido de carbono

COCs = Complexos *cumulus*-oócitos

CV = Coeficiente de variação (%) do grau de cinza

D7 = Dia 7

D8 = Dia 8

Dif% = Porcentagem de diferença do grau de cinza

DNA = Ácido desoxiribonucléico

E = Elispsidade

F0 = Fourier zero

F1 = Fourier um
F2 = Fourier 2
FF = Fator forma
FIV = Fertilização *in vitro*
FSH = Hormônio folículo-estimulante
hCG= Gonadotrofina coriônica humana
hpi = Horas pós-inseminação
ICSI = Injeção Intracitoplasmática de Espermatozoide
L = largura
L/C = razão largura/comprimento
MEM = Aminoácidos não-essenciais
mL = Mililitros
mM= Milimolar
mSOF =“Synthetic Oviduct Fluid” modificado
N = Nitrogênio
P = Perímetro
P1= Protamina tipo 1
P2= Protamina tipo 2
PIV = Produção *in vitro* de embriões
PBS = “Phosphate buffer solution”
PC =Computador pessoal
PHE =Hipotaurina, penicilamina e epinefrina
r =Correlação de Sperman
SAP = Simetria ântero-posterior
SAS=“Statistical Analysis System”
SCSA = “Sperm Chromatin Structure Assay”
SL = Simetria lateral
SBH = Sperm-bos-halomax assay
TALP-FIV =“Tyrode’s albumin lactate and pyruvate”
UNESP = Universidade Estadual Paulista

LISTA DE TABELAS

Páginas

Tabela 1. Distribuição dos animais por grupos experimentais determinado pela idade de touros da raça Nelore, média ($\bar{x}$) e desvio padrão (sd) das idades e idade mínima e máxima dos animais, Jaboticabal, SP, 2014.....	17
Tabela 2. Média ($\bar{x}$) e desvio padrão (sd) da motilidade (porcentagem) e do vigor (0 a 5) de touros jovens (n=27), adultos (n=52) e senis (n=34) no sêmen pós-descongelamento avaliados em microscopia de contraste de fase, Jaboticabal, SP, 2014.....	29
Tabela 3. Média ($\bar{x}$) e desvio padrão (sd) da concentração espermática ($\times 10^6$ /palheta), da porcentagem de defeitos maiores, menores e totais de touros jovens (n=27), adultos (n=52) e senis (n=34) no sêmen pós-descongelamento avaliados em microscopia de interferência diferencial (DIC, imersão em óleo, 1000x), Jaboticabal, SP, 2014.	30
Tabela 4. Média ($\bar{x}$) e desvio padrão (sd) da porcentagem das anormalidades espermáticas para os grupos de touros jovens (n=27), adultos (n=59) e senis (36) avaliados em microscopia de interferência diferencial (1000x). Contagem de 200 células para cada amostra de cada touro, Jaboticabal, SP, 2014.....	31
Tabela 5. Média ($\bar{x}$) e desvio padrão (sd) das variáveis morfométricas da cabeça de espermatozoides de touros <i>Bos taurus indicus</i> da raça Nelore jovens (n=27, C=7629), adultos (n=59, C=15186) e senis (n=36, C=8966), descompactação da cromatina e heterogeneidade da cromatina, avaliados pela técnica do Azul de Toluidina, Jaboticabal, SP, 2014.	33
Tabela 6. Média ($\bar{x}$) e desvio padrão (sd) das variáveis morfométricas da cabeça de espermatozoides de touros jovens <i>Bos taurus indicus</i> da raça Nelore (n=27) com cromatina anormal (C=180) e cromatina normal (C=7686), descompactação da cromatina e heterogeneidade da cromatina, avaliados pela técnica do Azul de Toluidina, Jaboticabal, SP, 2014.	34
Tabela 7. Média ($\bar{x}$) e desvio padrão (sd) das variáveis morfométricas da cabeça de espermatozoides de touros adultos <i>Bos taurus indicus</i> da raça Nelore (n=59) com cromatina anormal (C=255) e cromatina normal (C=14690), descompactação da cromatina e heterogeneidade da cromatina, avaliados pela técnica do Azul de Toluidina, Jaboticabal, SP, 2014.	35

- Tabela 8.** Média ($\bar{x}$) e desvio padrão (sd) das variáveis morfométricas da cabeça de espermatozoides de touros senis *Bos taurus indicus* da raça Nelore (n=36) com cromatina anormal (C=216) e cromatina normal (C=8752), descompactação da cromatina e heterogeneidade da cromatina, avaliados pela técnica do Azul de Toluidina, Jaboticabal, SP, 2014.36
- Tabela 9.** Média ($\bar{x}$) e desvio padrão (sd) da área da cabeça de todos os espermatozoides avaliados com cromatina anormal e dos espermatozoides com cromatina normal, avaliados pela técnica de Azul de Toluidina, Jaboticabal, SP, 2014.37
- Tabela 10.** Média ($\bar{x}$) e desvio padrão (sd) das porcentagens de espermatozoides com alterações na cromatina na técnica de CMA3, avaliados por citometria de fluxo para os grupos de touros jovens (n=27), adultos (n=59) e senis (n=36), Jaboticabal, SP, 2014.37
- Tabela 11.** Coeficiente de correlação e valor de P das variáveis físicas, morfométricas e de protaminação espermática em relação à idade no sêmen pós-descongelamento, Jaboticabal, SP, 2014.39
- Tabela 12.** Média ($\bar{x}$) e desvio padrão (sd) da clivagem, formação de blastocistos (BL) no D7 e no D8 do cultivo embrionário para os grupos controle (Controle), com lesão de cromatina (CL) e sem lesão de cromatina (SL), quatro repetições, Jaboticabal, SP, 2014.40

LISTA DE FIGURAS

Páginas

- Figura 1.** Representação da cabeça espermática de acordo com a amplitude harmônica 0 – 5. A amplitude harmônica F0 afeta o tamanho geral espermático, F1 a cabeça anterior, F2 o comprimento, F3, F4 e F5 a região da cabeça posterior (adaptado de PARRISH et al., 2012).13
- Figura 2.** Delineamento experimental com as etapas: colheita do sêmen, divisão dos grupos (jovens, adultos e senis), congelamento do sêmen, realização do experimento I (análises físicas e funcionais) e experimento II (produção *in vitro* de embriões).....19
- Figura 3.** Fotomicrografia digital de espermatozoides corados com Azul de Toluidina. As setas representam espermatozoides com alteração na compactação da cromatina, corando-se em azul escuro a magenta. Os demais (sem marcação por flecha) em azul claro mostram condensação da cromatina normal, Jaboticabal, SP, 2014.....22
- Figura 4.** Fotomicrografia digital de espermatozoides corados com CMA3. As setas representam espermatozoides positivos para CMA3 com protaminação deficiente (Olympus BX61, microscopia de fluorescência, 400x), Jaboticabal, SP, 2014.....24
- Figura 5.** Fotomicrografia de blastocistos produzidos *in vitro* no D8 após a FIV. Aumento (1000x). Laboratório de Fisiologia Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária UNESP Campus Araçatuba, Araçatuba, SP, 2014. 27
- Figura 6.** Representação gráfica referente à avaliação da porcentagem de eventos positivos para CMA3. Na área em verde e indicada como CMA3+ encontram-se os espermatozoides com protaminação deficiente. A) amostra de touro do grupo Jovens; B) controle negativo (amostra “Branca” – linha laranja), o controle positivo - desprotaminação induzida (linha vermelha), e a mistura 1:1 das amostras branco e induzida (linha azul) (Attune® Software – Applied Biosystems by Life Technologies, Grand Island, EUA).38

MORFOMETRIA E COMPACTAÇÃO DA CROMATINA ESPERMÁTICA DE TOUROS NELORE DE ACORDO COM A IDADE E SUA INFLUÊNCIA NA PRODUÇÃO DE EMBRIÕES *in vitro*

RESUMO – O objetivo deste estudo foi avaliar o empacotamento da cromatina e morfometria da cabeça de espermatozoides criopreservados de touros *Bos taurus indicus* da raça Nelore de diferentes idades e a influência do grau de compactação da cromatina na produção *in vitro* de embriões (PIV). Foram utilizados 40 animais mantidos em centro de coleta e processamento de sêmen (CCPS) e distribuídos em três grupos: Grupo Jovens (entre 1,8 e 2 anos), Grupo Adultos (entre 3,5 e 7 anos) e Grupo Senis (entre 8 e 14,3 anos). Os ejaculados foram congelados de acordo com os padrões pré-estabelecidos do CCPS. Utilizou-se a coloração de azul de toluidina, que permite a avaliação simultânea da cromatina e morfometria da cabeça espermática, a cromomicina A3 (CMA3) para analisar a protaminação espermática e a PIV para o desenvolvimento embrionário. O azul de toluidina foi avaliado pela microscopia óptica e a CMA3 pelo citômetro de fluxo. Na PIV foram realizadas quatro repetições por grupo, com 25 a 30 oócitos em cada repetição. A análise seminal revelou que espermatozoides de touros jovens obtiveram maiores valores de área (A), perímetro (P) e largura (L) quando comparados a adultos e senis (Jovens: $A=1848,5\pm119,79$, $P=10,23\pm0,29$, $L=1,95\pm0,1$; Adultos: $A=1672,9\pm104,46$, $P=9,86\pm0,33$, $L=1,81\pm0,06$; Senis: $A=1723,1\pm124,41$, $P=9,97\pm0,33$, $L=1,83\pm0,09$; $P<0,0001$) e apresentaram maior deficiência de protaminação quando analisado pela CMA3 (Jovens: $1,57\pm0,76$; Adultos: $1,09\pm0,63$, Senis: $0,90\pm0,59$; $P<0,05$). Da mesma forma, variáveis de tamanho (A, P, L) e protaminação espermática, avaliado pela CMA3, obtiveram correlação negativa com a idade e positiva com a elipsidade ($P<0,05$). Espermatozoides com anormalidades na cromatina obtiveram maior área quando comparado àqueles sem alteração de cromatina ($P<0,0001$). Não houve diferença significativa na PIV quando sêmen com maior e menor parcela de alteração de cromatina foi utilizado, evidenciando que a parcela de espermatozoides com alteração na compactação da cromatina (4 a 16,15%) não interferiu no desenvolvimento embrionário inicial. Nossos resultados permitem concluir que espermatozoides de touros jovens possuem cabeça de maior tamanho quando comparado a adultos e senis devido à maior deficiência de protaminação, quando avaliado pela CMA3, e defeitos morfológicos maiores. Anormalidades na compactação da cromatina influenciam no tamanho da cabeça espermática, aumentando suas dimensões morfométricas e quando presentes na porcentagem entre 4 a 16,15% na amostra não prejudicam o desenvolvimento embrionário na PIV até D8.

Palavras-chave: Azul de toluidina, Bovinos, Cromomicina A3, Fertilidade, Sêmen

MORPHOMETRY AND CHROMATIN CONDENSATION OF NELORE BULLS SPERMATOZOA ACCORDING TO AGE AND THE INFLUENCE ON *in vitro* EMBRYO PRODUCTION

ABSTRACT - The aim of this study was to evaluate chromatin condensation and sperm head morphometry of cryopreserved semen samples from *Bos taurus indicus* bulls of different ages and the influence of the degree of chromatin condensation on *in vitro* embryo production (IVP). A total of 40 animals kept in an Artificial Insemination Centre were divided into three groups: Young Group (1.8 to 2 years), Adult Group (3.5 to 7 years) and Senile Group (8 to 14.3 years). The ejaculates were frozen in accordance with established standards of the Artificial Insemination Centre. The thawed semen samples were evaluated with toluidine blue, which analyzes the chromatin condensation and sperm head morphometry simultaneously, chromomycin A3 (CMA3) to analyze the protamination and *in vitro* embryo production to analyze the embryonic development. The toluidine blue was evaluated by optical microscopy and the CMA3 by flow cytometry. Semen analyses revealed that spermatozoa of young bulls had higher values of area (A), perimeter (P) and width (W) when compared to adults and senile (Young: $A = 1848.5 \pm 119.79$, $P = 10.23 \pm 0.29$, $W = 1.95 \pm 0.1$; Adults: $A = 1672.9 \pm 104.46$, $P = 9.86 \pm 0.33$, $W = 1.81 \pm 0.06$; Senile: $A = 1723.1 \pm 124.41$, $P = 9.97 \pm 0.33$, $W = 1.83 \pm 0.09$; $P < 0.0001$) and had higher protamination deficiency when analyzed with CMA3 (Young: 1.57 ± 0.76 , Adults: 1.09 ± 0.63 , Senile: 0.90 ± 0.59 , $P < 0.05$). Variable size (A, P, W) and sperm protamination evaluated by CMA3 showed negative correlation with age and a positive with ellipticity ($P < 0.05$). Spermatozoa with abnormal chromatin obtained larger area when compared to those with normal chromatin ($P < 0.0001$). There was no significant difference in IVP using semen with higher and lower altered chromatin condensation, evidencing that the proportion of spermatozoa with abnormal chromatin (4 to 16.15%) did not affect the embryonic development. Our results indicate that sperm head of young bulls are larger when compared to adults and senile due to increased morphological and protamination defects assessed by CMA3. Abnormalities in chromatin condensation influence the size of the sperm head, increasing its morphometric dimensions and percentages of 4 to 16.15% in the sample do not affect embryonic development in IVP until D8.

Keywords: Toluidine blue, Bovine, Chromomycin A3, Fertility, Semen

I INTRODUÇÃO

O uso de biotécnicas da reprodução tem crescido continuamente e pode ser confirmado pelo aumento da comercialização de doses de sêmen. No ano de 2013 foram comercializadas, entre nacionais e importadas, 13.024.033 doses de sêmen, um aumento de 5,54% em relação ao ano anterior (ASBIA, 2014). A realização de pesquisas buscando melhorias nestas áreas é essencial e dentre elas destaca-se a qualidade do sêmen, a fim de diminuir falhas reprodutivas (GONZALEZ, 2004).

A eficiência reprodutiva, quando analisada isoladamente, é o fator que mais afeta a produtividade e lucratividade de um rebanho. Dentre as perdas reprodutivas nos bovinos destacam-se a mortalidade pré-natal, embrionária e fetal, que se associam às falhas de fertilização, defeitos genéticos e no desenvolvimento embrionário (SANTOS et al., 2004; SARTORI, 2004). Vacas em lactação parecem ser mais suscetíveis às falhas embrionárias, em parte devido à baixa taxa de fertilização (aproximadamente 76%) e viabilidade embrionária nos primeiros dias de gestação e ainda pela morte embrionária e fetal que pode se aproximar de 60% (SANTOS et al., 2004). Em conjunto com outras causas geram um prejuízo de 350 a 850 milhões de dólares ao ano para o Brasil (ANUALPEC, 2011).

A análise do sêmen é o principal método de diagnóstico de fertilidade, analisa a motilidade e morfologia dos espermatozoides, porém, não a estrutura interna da célula espermática como, por exemplo, a cromatina (HAFEZ; HAFEZ, 2000). Alguns espermatozoides com anormalidades na cromatina podem fecundar oócitos *in vivo* e *in vitro*, mas o defeito no DNA pode persistir durante o período embrionário, induzindo à apoptose, desestruturação embrionária e ao aborto (ELLINGTON et al., 1998; TWIGG; IRVINE; AITKEN et al., 1998).

Numerosos estudos têm sido conduzidos para determinar diferenças morfométricas e alterações de cromatina em espermatozoides de bovinos (BELETTI; COSTA; GUARDIEIRO, 2005; SILVA; MENDES JÚNIOR; BELETTI, 2008; REVAY et al., 2009; CAMPOS, 2010; OLIVEIRA et al., 2011; RAHMAN et al., 2011, ENCISO et al., 2011). No entanto, tais estudos não abordam e não correlacionam estas variáveis com as diferentes faixas etárias.

A idade é fator importante no sucesso da criação de bovinos, pois a busca pela precocidade sexual é crescente, objetivando utilizar animais para reprodução mais jovens e assim favorecer o ganho econômico. O momento em que o animal é capaz de liberar gametas e de manifestar sequências de comportamento sexual completo é chamado de puberdade. A idade da puberdade é influenciada por vários fatores, dentre eles destaca-se o ambiente físico, idade, raça e peso corpóreo. Em condições normais de criação a puberdade ocorre ao redor dos 12 meses de idade em bovinos (HAFEZ; HAFEZ, 2000). Entretanto, a maturidade sexual é alcançada mais tarde, normalmente de 16 a 20 semanas após a puberdade, e é representada como a idade em que os animais apresentam no mínimo 50% de motilidade espermática progressiva, máximo 10% de defeitos espermáticos maiores e 20% de defeitos espermáticos menores (LUNSTRA; ECHTERNKAMP, 1982). Touros Nelore apresentam-se sexualmente maduros entre os 20 e 22 meses de idade (SILVEIRA et al., 2010).

Com o intuito de alcançar a precocidade sexual de forma satisfatória, com bons resultados de fertilidade e tornar a pecuária de corte mais produtiva, estudos que abordem as diferenças nas características seminais com o decorrer da idade em touros tornam-se importantes. Fortes et al. (2012) observaram aumento da concentração espermática e da porcentagem de espermatozoides morfologicamente normais com o avanço da idade em touros Nelore.

Alguns estudos determinam a relação entre a idade dos animais e a estrutura da cromatina, como em bovinos (CARREIRA, 2012; FORTES et al., 2012), coelhos (GOGOL; BOCHENEK; SMORAG, 2002), galos (RODRIGUES; ROCHA; BELETTI, 2009) e ratos (ZUBKOVA; WADE; ROBAIRE, 2005). Em geral, demonstram que animais jovens possuem baixa estabilidade da cromatina espermática. Entretanto, não encontramos trabalhos que relacionam a morfometria espermática com a idade em bovinos. Estudos com galos de diferentes idades indicam que galos jovens possuem cabeça dos espermatozoides maiores que galos mais velhos (RODRIGUES, ROCHA; BELETTI, 2009).

Visto que há poucos dados sobre a alteração de compactação da cromatina e morfometria espermática no decorrer da idade em touros e ainda o fato de que o correto empacotamento da cromatina e morfologia espermática são essenciais para

a fertilidade, o objetivo do nosso estudo foi verificar a relação entre compactação da cromatina e morfometria da cabeça espermática de touros jovens, adultos e senis e a influência do grau de compactação da cromatina na produção *in vitro* de embriões (PIV). Essas informações são importantes para o entendimento das alterações seminais nas diferentes idades, bem como na otimização de técnicas para avaliar a fertilidade de uma amostra de sêmen. Como também são essenciais aos Centros de Coleta e Processamento de Sêmen (CCPS), os quais buscam animais que produzam sêmen de alta qualidade precocemente ou ainda como modelo para outras espécies, direcionando pesquisas futuras.

II REVISÃO DE LITERATURA

2.1 O espermatozoide e sua estrutura

Os espermatozoides são células altamente diferenciadas e podem ser divididos em cabeça e cauda, podendo esta última também ser chamada de flagelo. Toda a estrutura do espermatozoide é recoberta pela membrana plasmática ou plasmalema (SUTOVSKY; MANANDHAR, 2006).

A cabeça é constituída pelo acrossoma, núcleo, algumas estruturas do citoesqueleto e citoplasma. O núcleo contém ácido desoxirribonucléico (DNA), o qual possui proteínas denominadas histonas, que são parcialmente substituídas por protaminas durante a espermiogênese. Esta conformação do DNA espermático, composto principalmente por protaminas, confere um estado de hipercondensação, tornando o espermatozoide compacto, com formato hidrodinâmico propício à motilidade e à penetração no oócito (BREWER; CORZETT; BALHORN, 2002; DADOUNE, 2003).

A cauda do espermatozoide é responsável pela motilidade da célula (SUTOVSKY; MANANDHAR, 2006). Contém um axonema central, rodeado por fibras densas externas. A parte anterior do flagelo (peça intermediária) contém mitocôndrias e a parte posterior da cauda (peça principal) é formada por uma bainha fibrosa em torno das fibras densas externas (EDDY; O'BRIEN, 1994).

As mitocôndrias espermáticas, localizadas na peça intermediária, são responsáveis pela produção de adenosina trifosfato (ATP) e servem como fonte de energia para a motilidade flagelar (HAFEZ; HAFEZ, 2000). Estas organelas possuem características funcionais específicas adaptadas para a motilidade espermática, tais como: resistência para condições hipotônicas e capacidade de usar o lactato como substrato oxidativo (OKO; CLERMONT, 1990).

Cada mitocôndria espermática carrega várias cópias do genoma mitocondrial paterno. Após a fertilização, a mitocôndria espermática sofre degradação, promovendo assim a herança materna da mitocôndria e do DNA mitocondrial em

mamíferos. A mitocôndria oocitária contribui com toda a energia e genes mitocondriais para o zigoto, estratégia que pode ser vantajosa devido ao ambiente potencialmente mutagênico que as mitocôndrias espermáticas são expostas durante a maturação do espermatozoide, inseminação e fecundação (SUTOVSKY; MANANDHAR, 2006).

A maioria dos espermatozoides de mamíferos estão inativos no testículo e maduros no fluído do epidídimo. Na cauda do epidídimo os espermatozoides adquirem motilidade e são adicionados com as secreções das glândulas acessórias. Açúcares do plasma seminal, como glucose e frutose, são as principais fontes de ATP para que a motilidade espermática seja mantida por horas (MUKAI; OKUNO, 2004; WESTHOFF; KAMP, 1997).

2.2 A cromatina espermática e métodos de avaliação

Antes da meiose, a cromatina no núcleo do espermatócito é organizada de forma difusa e semelhante estruturalmente ao núcleo de todas as células somáticas. As proteínas predominantes nesta fase são as histonas, que aumentam o volume da cromatina (BALHORN, 2011; SHARMA; AGARWAL, 2011). Quando a espermiogênese se inicia, a maioria das histonas é substituída por proteínas de transição e posteriormente por protaminas, existindo dois tipos de protamina P1 e P2, sendo a primeira encontrada no espermatozoide de todos os mamíferos (BALHORN, 2011).

As protaminas são as proteínas mais abundantes no núcleo espermático de mamíferos (WARD; COFFEY, 1991; ZINI; AGARWAL, 2011) e permitem que a cromatina seja altamente organizada, condensada e compacta. Esta organização protege o genoma paterno durante o transporte através do trato reprodutivo do macho e da fêmea, garante a chegada ao óvulo em boas condições (SHARMA; AGARWAL, 2011), a fusão dos genomas favorecendo o desenvolvimento embrionário e a correta expressão da informação genética (SASSONI-CORSI, 2002; ERENPREISS et al., 2006).

A protaminação deficiente é consequência da espermatogênese anormal, que por sua vez pode estar associada a altos índices de defeitos morfológicos do espermatozóide (ENCISO et al., 2011; OLIVA; CASTILLO, 2011). Estudos mostram que a permanência de histonas somáticas ou anormalidades nas protaminas podem ocasionar distúrbios na condensação da cromatina, que se torna frouxa, refletindo na morfologia da célula (BELETTI; MELLO, 2004) e, por sua vez, prejudicar a fertilidade *in vivo* (EVENSON; DARZYNKIEWICZ; MELAMED, 1980). Gledhill (1966) foi o primeiro a identificar espermatozoides com alterações no complexo DNA-protamina em touros subférteis.

A fertilização e o desenvolvimento embrionário inicial *in vitro* não são prejudicados por danos no DNA (FATEHI et al., 2006), como também pequenas variações na morfometria da cabeça e na compactação da cromatina espermática pouco influenciam a clivagem e o número de blastocistos morfollogicamente normais na PIV (SILVA et al., 2008). Entretanto, ocorre indução de apoptose após clivagens iniciais (FATEHI et al., 2006). Os índices de fertilidade, tais como a taxa de não retorno ao estro, são correlacionados a danos de DNA em espermatozoides bovinos (EVENSON, 1999; GARCÍA-MACÍAS et al., 2007).

O método mais utilizado para identificar alterações na estabilidade da cromatina espermática é a análise da estrutura da cromatina espermática (SCSA) baseado na avaliação por citometria de fluxo com a coloração de alaranjado de acridina (OSTERMEIER et al., 2001). Porém, esta técnica não permite a avaliação concomitante da morfometria espermática, sendo possível com a coloração de azul de toluidina avaliado em ambiente SCILAB (Scilab, INRIA – Institut National de Recherche en Informatique et en Automatique, Rocquencourt, França) (BELETTI; COSTA, 2003), que identifica alterações morfológicas e de cromatina que não são percebidas pela análise visual do espermograma de rotina (BELETTI; COSTA, 2003; BELETTI; COSTA; VIANA, 2004; BELETTI; COSTA; VIANA, 2005).

Outro teste que identifica dano à cromatina é a Cromomicina A3 (CMA3) utilizado para observar deficiências de protaminação, uma vez que está relacionado com a presença de histonas (SINGLETON et al., 2007). O uso desta técnica em bovinos é recente, sendo realizada primeiramente por Simões et al. (2009).

Alguns estudos determinam a relação entre a idade dos animais e a estrutura da cromatina, como em bovinos (CARREIRA, 2012), coelhos (GOGOL; BOCHENEK; SMORAG, 2002), galos (RODRIGUES; ROCHA; BELETTI, 2009) e ratos (ZUBKOVA; WADE; ROBAIRE, 2005). Em geral, demonstram que animais jovens possuem baixa estabilidade da cromatina espermática. Em contrapartida, não encontramos trabalhos que relacionam a morfometria espermática com a idade em bovinos. Estudos com galos de diferentes idades indicam que galos jovens possuem cabeça dos espermatozoides maiores que galos mais velhos, mostrando que alterações morfológicas podem variar com a idade (RODRIGUES, ROCHA; BELETTI, 2009).

2.3 Morfologia espermática

Como a cabeça dos espermatozoides de mamíferos é constituída em grande parte por cromatina, anormalidades morfológicas são esperadas quando existem alterações em sua estrutura (SAILER; JOST; EVENSON, 1996; FERRARI et al., 1998; OSTERMEIER et al., 2001; BELETTI; MELLO, 2004; ENCISO et al., 2011). Entretanto, alterações na condensação da cromatina espermática nem sempre são acompanhadas de alterações morfológicas, mostrando a importância da avaliação do DNA espermático (BELETTI; COSTA; VIANA, 2005; SOARES; BELETTI, 2006; ENCISO et al., 2011).

A morfologia espermática é um parâmetro clínico importante que tem sido tradicionalmente usado para estimar a capacidade fertilizante de ejaculados bovinos. Porém, esta avaliação geralmente é realizada de forma subjetiva (BOERSMA; BRAUN, 1999). Para aumentar a confiabilidade têm-se utilizado métodos mais objetivos, como os computadorizados. Desde 1986 já se utilizavam ferramentas para auxiliar na caracterização morfométrica de ejaculados humanos, por meio da “computer-assisted sperm head morphometry analysis” (ASMA) (KATZ et al., 1986). Atualmente a ferramenta utilizada na medicina veterinária denomina-se “computer-assisted sperm morphometry analysis-fluorescence” (CASMA-F) e diferencia

subpopulações de espermatozoides de diferentes espécies (VICENTE-FIEL et al., 2013). Outra ferramenta muito utilizada na mensuração morfométrica é a coloração de azul de toluidina avaliado em ambiente SCILAB (BELETTI; COSTA, 2003).

A análise computacional da morfologia espermática considera mensurações como área, perímetro, comprimento, largura, razão largura/comprimento, elipsidade e forma (GARRET; BAKER, 1995). Esta análise tem sido utilizada para avaliar, dentre outras características, a viabilidade e detectar alterações na integridade da membrana de espermatozoides bovinos criopreservados. Estudos recentes sugerem que espermatozoides mortos possuem tamanho espermático menor do que aqueles considerados viáveis (GARCÍA-HERREROS; LEAL, 2013). As diferenças morfométricas entre espermatozoides vivos e mortos possuem como causa mais provável a diferença osmótica após dano na membrana espermática, que pode alterar a permeabilidade desta e a constituição celular, reduzindo o volume espermático (BLÄSSE et al., 2012).

A criopreservação pode ainda influenciar nas dimensões da cabeça espermática. Sabe-se que espermatozoides frescos e criopreservados de bovinos possuem uma heterogeneidade natural nas dimensões da cabeça, identificando-se três subpopulações baseados na morfometria da célula (grande, média e pequena). Sêmen fresco possui uma maior parcela de espermatozoides com maiores dimensões e sêmen criopreservado possui maior proporção de espermatozoides menores (RUBIO-GUILLÉN et al., 2007). Outros autores identificaram quatro subpopulações distintas de espermatozoides em bovinos: grande-redonda, larga-alongada, pequena-redonda e pequena-alongada, com variabilidade entre animais (VICENTE-FIEL et al., 2013).

Diversos estudos demonstram diferenças morfológicas em espermatozoides de bovinos, porém, não esclarecem a relação destas características com o grau de compactação da cromatina. A interferência do grau de compactação da cromatina na morfologia da célula, principalmente em bovinos, ainda é obscura e deve ser melhor estudada. Resultados interessantes foram observados por Rodrigues, Rocha e Beletti (2009) que identificaram espermatozoides de maior tamanho em galos jovens comparados com velhos em virtude da maior porcentagem de alterações morfológicas. Alterações de cromatina foram mais visualizadas em galos velhos.

2.4 Características seminais de touros de acordo com a idade

A puberdade e a maturidade sexual são dois conceitos importantes que devem ser considerados para otimizar a criação de bovinos e aumentar o rendimento econômico. Do ponto de vista prático, um macho atinge a puberdade quando se torna capaz de liberar gametas e de manifestar sequências de comportamento sexual completo (HAFEZ; HAFEZ, 2000).

A puberdade é resultado de um ajuste gradativo entre o aumento da atividade gonadotrófica e a habilidade das gônadas em assumir simultaneamente a esteroidogênese e a gametogênese. Os gonócitos desenvolvem-se ao acaso nos testículos para espermatogônias A definitivas e juntamente com as células de Sertoli marcam o início da espermatogênese, e por sua vez, da puberdade (HAFEZ; HAFEZ, 2000).

Em condições normais, os bovinos alcançam a puberdade ao redor dos 12 meses de idade, sendo influenciada pelo ambiente físico, raça, nutrição, entre outros. A nutrição está intimamente relacionada com a idade à puberdade, sendo que pode ocorrer mais jovem se o crescimento for acelerado por supernutrição, ou atraso se houver subnutrição. Nesta fase, ocorre aumento da concentração, motilidade espermática progressiva, concentração da proteína seminal e porcentagem de espermatozoides com morfologia normal (HAFEZ; HAFEZ, 2000).

A maturidade sexual é mais tardia, ocorrendo normalmente de 16 a 20 semanas após a puberdade (LUNSTRA; ECHTERNKAMP, 1982). Animais de origem indiana são mais tardios, atingindo a maturidade aos 30-36 meses de idade (FONSECA et al., 1975), porém, recentemente foi observado diminuição desta idade em touros Nelore para 20 e 22 meses de idade (SILVEIRA et al., 2010). Nesta fase o animal apresenta no mínimo 50% de motilidade espermática progressiva, máximo 10% de defeitos espermáticos maiores e 20% de defeitos espermáticos menores (LUNSTRA; ECHTERNKAMP, 1982).

Diversos estudos relacionam as características seminais de touros Nelore na puberdade e maturidade sexual no decorrer da idade, evidenciando que características de motilidade espermática e morfologia normal aumentam com o

decorrer da idade (BRITO et al., 2004; FRENEAU et al., 2006; SILVEIRA et al., 2010). Entretanto, há escassez de trabalhos que abordam variáveis relacionadas com o DNA espermático (CARREIRA, 2012) e não encontramos trabalho que relacionam diferenças morfométricas e de condensação da cromatina de acordo com a idade em touros. Estas informações, juntamente com as características físicas de motilidade e morfologia espermática no decorrer da idade em touros, são importantes para otimizar a maturidade sexual e níveis de fertilidade destes animais, e conseqüentemente tornar a atividade mais lucrativa.

2.5 Produção *in vitro* de embriões bovinos

A fertilização nos mamíferos envolve a interação direta do espermatozoide e oócito, fusão das membranas celulares e união do gameta feminino e masculino (PRIMAKOFF; MYLES, 2002). O sucesso destas etapas e subsequente desenvolvimento embrionário dependem em parte da integridade do DNA espermático. Falhas podem estar relacionadas com a fragmentação do DNA, empacotamento anormal da cromatina e deficiência de protaminação, dentre outros defeitos (AHMADI; NG, 1999; CHO et al., 2003).

Danos no DNA não impedem a fertilização do oócito ou clivagens iniciais, e sim bloqueiam a formação de blastocisto por induzir a apoptose (FATEHI et al., 2006). Desta forma, altos níveis de danos no DNA diminuem a taxa de prenhez em técnicas de reprodução assistida (BENCHAIIB et al., 2003).

A avaliação do potencial fértil masculino é muito importante antes da realização de biotécnicas reprodutivas como a inseminação artificial, inseminação artificial em tempo fixo, fertilização *in vitro* (FIV) e injeção intracitoplasmática de espermatozoide (ICSI) a fim de garantir bons resultados, pois as características físicas e morfométricas do sêmen de animais interferem na fertilidade (SEKONI; GUSTAFSSON, 1987; BENCHAIIB et al., 2003; FATEHI et al., 2006). A morfologia espermática tem sido apontada como característica importante para predizer a capacidade fértil da amostra, sendo que a baixa qualidade espermática em bovinos

tem sido relacionada com a diminuição da fertilidade (SEKONI; GUSTAFSSON, 1987). Ainda, o uso de espermatozoides com anormalidades morfológicas pode gerar falhas no desenvolvimento embrionário, há evidências que esteja relacionado com alterações na morfologia da cabeça (WALTERS et al., 2005) e anormalidades da cromatina (SAILER; JOST; EVENSON, 1996). Verificou-se que espermatozoides de carneiros altamente férteis possuem características de viabilidade, área do núcleo, perímetro e comprimento de maiores valores em comparação àqueles de baixa fertilidade (VICENTE-FIEL et al., 2014).

A PIV é excelente ferramenta de pesquisa para investigar as características dos espermatozoides quanto à fecundação e desenvolvimento embrionário (THUNDATHIL et al., 2001). Esta ferramenta envolve a manipulação dos gametas e a obtenção de embriões em laboratório (DODE, 2006) e consiste em três etapas: maturação oocitária, fecundação dos oócitos e cultivo embrionário até os estádios de mórula e blastocisto, quando os embriões podem ser transferidos ou criopreservados (VARAGO; MENDONÇA; LAGARES, 2008).

Outro evento necessário para a fertilização do oócito pelo espermatozoide é a capacitação espermática, que *in vivo* é realizada por meio da passagem do espermatozoide pelo trato genital feminino e *in vitro* necessita ser induzida por agentes, tais como a heparina, que desencadeia alterações na membrana plasmática para que ocorra a reação acrossomal (YANAMAGIMASHI, 1994).

O espermatozoide, após a penetração no oócito, inicia uma série de eventos envolvendo os componentes nucleares e citoplasmáticos dos gametas masculino e feminino. Esses eventos consistem na descondensação da cromatina espermática, formação do envelope nuclear e do pró-núcleo masculino. De maneira concomitante, o oócito retoma a meiose, expulsa o segundo corpúsculo polar e forma o pró-núcleo feminino. Os pró-núcleos após serem formados se aproximam e ocorre a singamia e a formação do novo indivíduo com início das divisões meióticas (GORDON, 2003).

A taxa de fecundação após a FIV pode ser avaliada pela presença do espermatozoide no citoplasma do oócito, descondensação da cromatina, formação dos pró-núcleos e taxa de clivagem. O parâmetro mais utilizado para avaliar a fecundação em bovinos é a taxa de clivagem, uma vez que a presença do

espermatozoide no citoplasma e a formação dos pró-núcleos não são visíveis sem técnicas auxiliares (GORDON, 2003).

2.6 Métodos e corantes para avaliação da cromatina espermática utilizados neste estudo

2.6.1 Azul de Toluidina

A técnica do azul de toluidina para avaliação da cromatina foi desenvolvida por Mello (1982). Consiste num corante catiônico com fenômeno de metacromasia, ou seja, ocorre alteração de cor induzida pela ressonância de elétrons entre as moléculas do corante. O pH do corante 4,0 garante uma ligação deste aos grupos fosfatos ionizados do DNA. Os espermatozoides normais, por terem seus grupos fosfatos bloqueados por protaminas, permitem que somente poucas moléculas do corante se liguem ao seu DNA, corando-se em azul claro. Entretanto, aqueles espermatozoides com alteração de compactação da cromatina possuem mais ligações com as moléculas do corante, resultando numa coloração de azul escuro a magenta.

No protocolo é necessário realizar a hidrólise antes da coloração, a fim de aumentar a sensibilidade, consistindo em tratamento ácido com HCl 4N seguido da coloração com azul de toluidina a pH 4,0. Desta forma espermatozoides normais, com cromatina altamente compactada, são pouco afetados pela hidrólise, corando-se em azul claro e aqueles espermatozoides com baixo grau de alteração de cromatina têm as protaminas parcialmente extraídas, resultando em ligações do corante com os grupos fosfatos do DNA (MELLO, 1982).

A análise morfométrica é outra variável que pode ser mensurada com esta técnica, avaliado por programas desenvolvidos no SCILAB, e consiste em: área (A), perímetro (P), largura (L), comprimento (C), razão largura/comprimento (L/C), elipsidade (E), fator forma (FF), descritores Fourier com amplitude de 0 a 2 (F0, F1 e

F2), simetria lateral (SL) e simetria ântero-posterior (SAP) (OSTERMEIER et al., 2001; BELETTI; COSTA, 2003).

L/C e elipsidade são derivados das mensurações básicas (A, P, L e C). A elipsidade é descrita como uma medida de alongamento do contorno da cabeça espermática, variando de $-1 < a < 1$. Fator forma é outra medida obtida das mensurações básicas e é indicação do desvio do contorno da cabeça espermática (BELETTI; COSTA, 2003).

A SL da cabeça espermática identifica assimetrias ao longo do eixo principal, as quais podem implicar negativamente na hidrodinâmica da célula. A SAP identifica assimetrias ao longo do eixo secundário e pode revelar alterações específicas como cabeça piriforme e estreita na base (BELETTI; COSTA; GUARDIEIRO, 2005).

A análise de amplitude harmônica (descritores Fourier) consiste na pesquisa potencial para avaliar o perímetro de curvatura espermática, e juntamente com as variáveis básicas (área, perímetro, largura e comprimento) reflete mais eficazmente as variações de tamanho e, principalmente, de forma (OSTERMEIER et al., 2001).

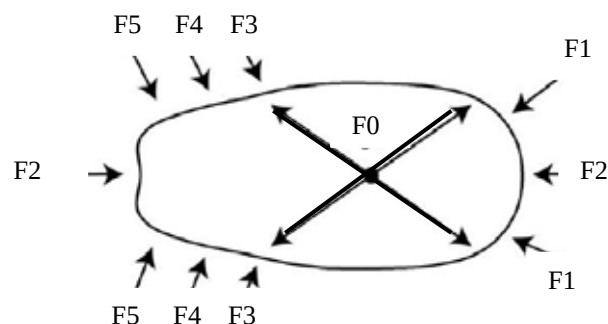


Figura 1. Representação da cabeça espermática de acordo com a amplitude harmônica 0 – 5. A amplitude harmônica F0 afeta o tamanho geral espermático, F1 a cabeça anterior, F2 o comprimento, F3, F4 e F5 a região da cabeça posterior (adaptado de PARRISH et al., 2012).

A descompactação e heterogeneidade da cromatina espermática, variáveis avaliadas pelo Azul de Toluidina, são obtidas por programas computacionais. Cabeças espermáticas com porcentagem de descompactação da cromatina maior que 2,0 e/ou heterogeneidade da cromatina maior que 5,0 são consideradas como anormalidades na cromatina (BELETTI; COSTA; GUARDIEIRO, 2005).

2.6.2 Cromomicina A3

Como já discutido anteriormente, o DNA espermático se diferencia do DNA das outras células somáticas em virtude de sua constituição protéica. Durante a espermiogênese a maioria das histonas é substituída por proteínas de transição e em seguida por protaminas (BALHORN, 2011), que conferem um alto grau de compactação, importante para proteção do genoma paterno durante o transporte através do trato reprodutivo do macho e da fêmea, entre outros aspectos (SHARMA; AGARWAL, 2011). Desta forma, danos no empacotamento da cromatina podem gerar falhas no desenvolvimento embrionário (FATEHI et al., 2006).

A CMA3 é outro teste utilizado para avaliação da compactação da cromatina espermática. Este fluorocromo é isolado da bactéria *Streptomyces griseus* e identifica deficiências de protaminação (BIANCHI et al 1996). Seu modo de ação consiste na ligação às histonas no DNA espermático (SINGLETON et al., 2007) e está relacionado a baixa proporção de protaminas e, por sua vez, com a baixa compactação da cromatina espermática (IRANPOUR et al., 2000).

O uso desta técnica em bovinos é recente, sendo realizada primeiramente por Simões et al. (2009), que investigaram deficiência de protaminação em espermatozoides de touros *Bos taurus indicus* Nelore. Dois dos 14 touros analisados apresentaram alta porcentagem de deficiência de protaminação, demonstrando que a técnica de CMA3 foi eficiente para detecção de alterações de compactação de cromatina na espécie bovina.

III HIPÓTESE

Espermatozoides de touros jovens possuem cabeça de maior tamanho quando comparado a adultos e senis devido à maior deficiência de protaminação. O grau de compactação da cromatina espermática prejudica a produção *in vitro* de embriões.

IV OBJETIVOS

4.1 Objetivo Geral

O objetivo geral deste trabalho foi avaliar e comparar o empacotamento da cromatina e morfometria da cabeça de espermatozoides de touros jovens, adultos e senis *Bos taurus indicus* da raça Nelore, e a influência do grau de compactação da cromatina espermática na produção *in vitro* de embriões.

4.2 Objetivos Específicos

Os objetivos específicos para a análise de sêmen congelado foram:

- Avaliar motilidade (%), vigor (0-5), concentração (espermatozoides/mL) e morfologia espermática;
- Analisar a condensação da cromatina e morfometria da cabeça dos espermatozoides pela técnica do azul de toluidina;
- Investigar a qualidade do empacotamento da cromatina espermática pela substituição de histonas por protaminas com CMA3;
- Comparar a técnica de azul de toluidina com CMA3 quanto à avaliação de compactação da cromatina;
- Observar as taxas de clivagem e desenvolvimento embrionário *in vitro* com o uso de sêmen de touros com e sem alterações de cromatina;
- Correlacionar as variáveis analisadas de acordo com a idade dos touros.

V MATERIAL E MÉTODOS

5.1 Seleção dos animais e preparo das amostras

Neste estudo casualizado foram utilizados 40 animais hípidos *Bos taurus indicus* da raça Nelore, mantidos em regime semi-extensivo de um mesmo CCPS. As colheitas foram realizadas duas vezes por semana pelo método da vagina artificial, completando três colheitas por animal. Os ejaculados foram congelados de acordo com os padrões pré-estabelecidos do CCPS. O sêmen congelado em palhetas de 0,25 mL, contendo meio Tris-gema, foi acondicionado em raques e estocado em nitrogênio líquido a uma temperatura de -196°C aguardando a avaliação.

Os animais foram divididos em três grupos de acordo com a idade na ocasião da colheita: Grupo Jovens (entre 1,8 e 2 anos), Grupo Adultos (entre 3,5 e 7 anos) e Grupo Senis (entre 8 e 14,3 anos) (Tabela 1). As avaliações foram realizadas nas dependências da Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba – UNESP.

Tabela 1. Distribuição dos animais por grupos experimentais determinado pela idade de touros da raça Nelore, média ($\bar{x}$) e desvio padrão (sd) das idades e idade mínima e máxima dos animais, Jaboticabal, SP, 2014.

Grupo	Nºpartidas (Nºtouros)	Idade (anos)		
		Média ($\bar{x} \pm \text{sd}$)	Mínima	Máxima
Jovens	27(9)	1,9 $\pm$ 0,1	1,8	2,0
Adultos	52(19)	4,7 $\pm$ 1,0	3,5	7,0
Senis	34(12)	10,1 $\pm$ 2,0	8,0	14,3

5.2 Delineamento experimental

O estudo foi dividido em dois experimentos (Figura 2). No experimento I foram realizadas as análises de motilidade, vigor, concentração, morfologia, morfometria e condensação da cromatina espermática pelo azul de toluidina e CMA3. No experimento II foi realizada a PIV com dois grupos de estudo (grupo com lesão de cromatina e grupo sem lesão de cromatina) de acordo com os resultados do grau de compactação da cromatina espermática pelo azul de toluidina.

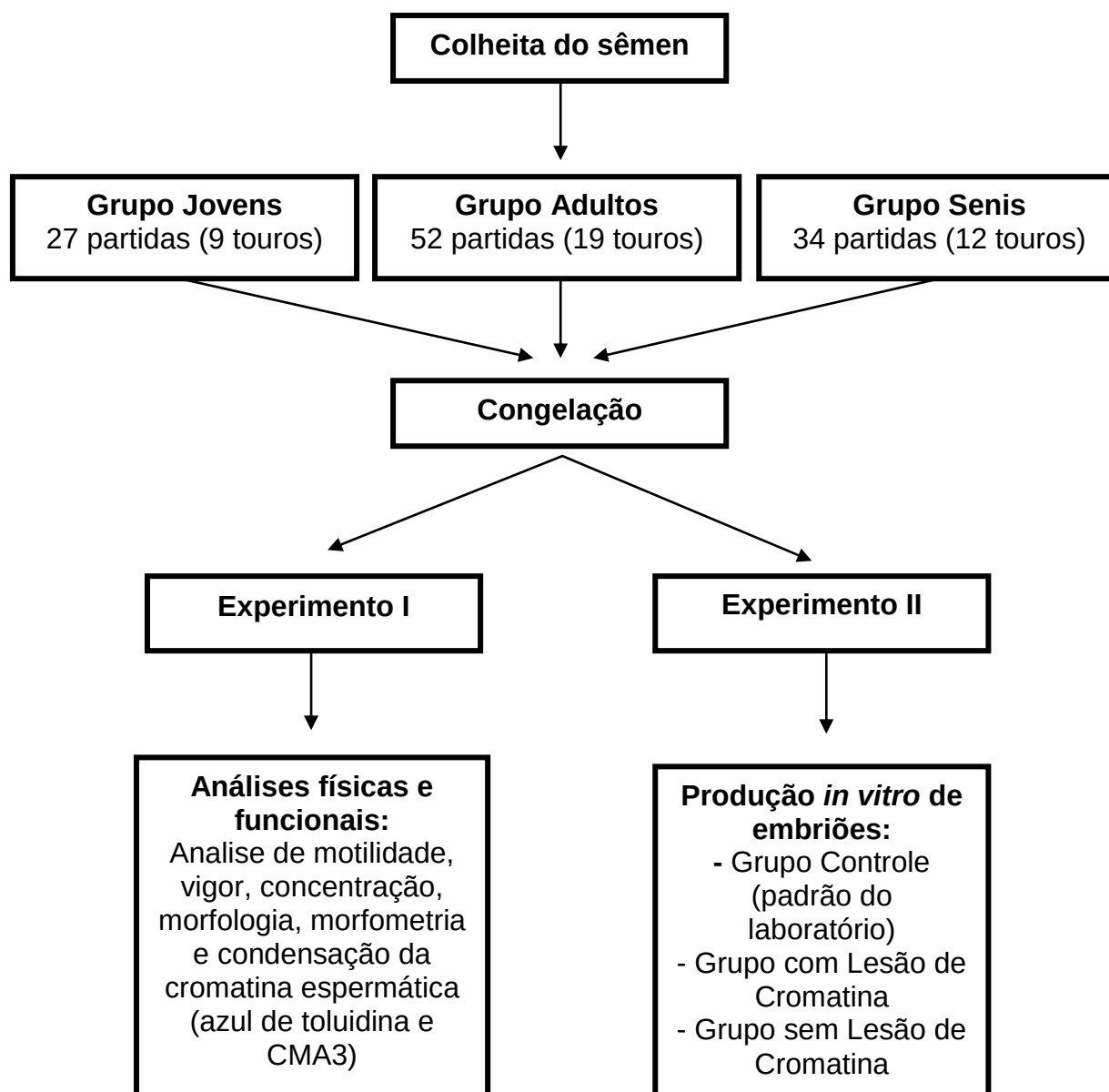


Figura 2. Delineamento experimental com as etapas: colheita do sêmen, divisão dos grupos (jovens, adultos e senis), congelação do sêmen, realização do experimento I (análises físicas e funcionais) e experimento II (produção *in vitro* de embriões).

5.3 Experimento I (Análises físicas e funcionais)

5.3.1 Análise de motilidade e vigor

A motilidade (%) e o vigor (0-5) foram avaliados imediatamente após a descongelação. Uma gota de sêmen foi colocada em lâmina coberta por lamínula pré-aquecidas a 37°C, e observada em microscópio de contraste de fase (Olympus BX61, 200x). A motilidade foi determinada pela estimativa visual da porcentagem de células em movimento. O vigor foi avaliado de acordo com a velocidade do movimento progressivo dos espermatozoides, e classificado de 0 a 5, sendo 0 o mais lento e 5 o mais rápido (FONSECA et al., 1992).

5.3.2 Concentração espermática

Realizou-se contagem das células em câmara de Neubauer à microscopia de contraste de fase (Olympus BX61, 200x). Para tanto, foram diluídos 20µL de sêmen em 1mL de solução formol-salina (FONSECA et al., 1992).

5.3.3 Morfologia espermática

Para a contagem das anormalidades espermáticas foi utilizada a técnica de câmara úmida, onde uma gota de sêmen diluído em solução de KCl (13,05g KCl, 14,7g citrato de sódio, 500mL água destilada) foi depositada em lâmina coberta por lamínula. Foram contadas 200 células em microscopia de interferência diferencial de fase – DIC (Olympus BX61, 1000X). O número de anormalidades morfológicas foi expresso em porcentagem de acordo com a classificação de BLOM (1973).

5.3.4 Avaliação da condensação da cromatina e morfometria da cabeça espermática com azul de toluidina

Para avaliação da morfometria da cabeça do espermatozoide e condensação da cromatina utilizou-se o corante azul de toluidina, segundo o protocolo estabelecido por Beletti e Costa (2003). O protocolo para leitura em microscopia segue sucintamente descrito a seguir.

Após o descongelamento do sêmen (35°C/20 segundos) realizou-se esfregaço, fixando em solução de etanol e ácido acético (3:1) por 1 minuto e em seguida etanol 70% por 3 minutos. Os esfregaços foram secos ao ar e, em seguida, hidrolisados por 25 minutos em ácido clorídrico 4 N, lavados em água destilada e secos à temperatura ambiente. Em seguida adicionou-se uma gota de azul de toluidina (Merck KGaA, Darmstadt, Alemanha) a 0,025% em tampão McIlvaine (citrato de sódio-fosfato), pH 4 e coberto com lâmina (BELETTI; COSTA, 2003).

Após a coloração, analisaram-se fotos de no mínimo 100 cabeças de espermatozoides por lâmina em microscópio óptico Olympus BX61 com aumento de 1000x, acoplado a uma câmera DP71 (Olympus, Tokyo, Japan – Processo FAPESP nº 2006/03537-1) e conectado a microcomputador PC (computador pessoal). As imagens digitais foram usadas para segmentar as cabeças dos espermatozoides de cada lâmina, para em seguida serem processadas por programas desenvolvidos em ambiente SCILAB para obter a média e desvio-padrão dos valores de pixel dentro das cabeças de cada imagem (BELETTI; COSTA, 2003).

A referência da coloração normal dos espermatozoides foi realizada por meio de seleção automática de seis cabeças em cada esfregaço e considerada a média dos valores de pixel destas cabeças. Foram selecionadas cabeças com as maiores médias de valores de pixel e as mais homogêneas. Em seguida, determinou-se para cada imagem a diferença entre o valor médio das cabeças-padrão e o valor médio de cada cabeça analisada. Ao final, calculou-se o coeficiente de variação (%) do grau de cinza (CV) e a porcentagem de diferença do grau de cinza (Dif%). Cabeças espermáticas com Dif% maior que 2,0 e/ou CV do grau de cinza maior que 5,0 foram

consideradas com anormalidades na cromatina (BELETTI; COSTA; GUARDIEIRO, 2005).

As variáveis morfométricas avaliadas por esta técnica por programas desenvolvidos no SCILAB foram: área (A), perímetro (P), largura (L), comprimento (C), razão largura/comprimento (L/C), elipsidade (E), fator forma (FF), descritores Fourier com amplitude de 0 a 2 (F0, F1 e F2), simetria lateral (SL) e simetria ântero-posterior (SAP) (OSTERMEIER et al., 2001; BELETTI; COSTA, 2003).

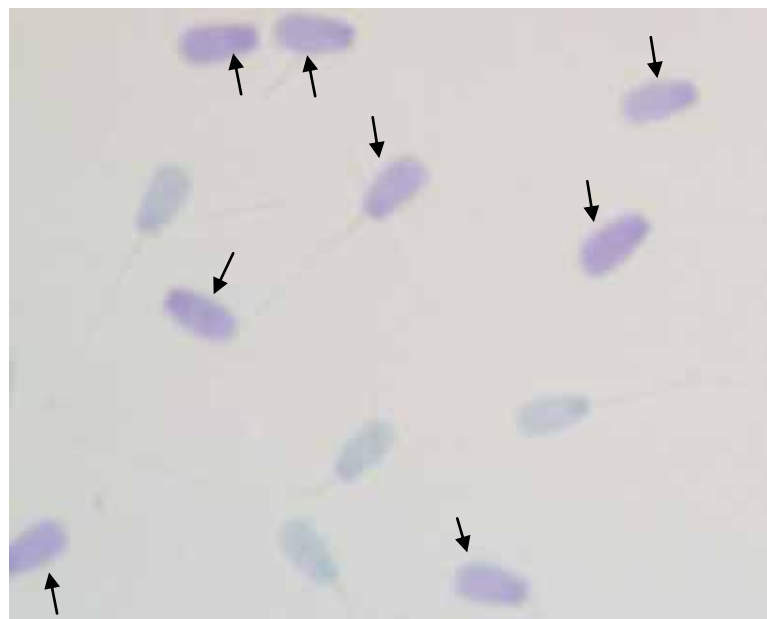


Figura 3. Fotomicrografia digital de espermatozoides corados com Azul de Toluidina. As setas representam espermatozoides com alteração na compactação da cromatina, corando-se em azul escuro a magenta. Os demais (sem marcação por flecha) em azul claro mostram condensação da cromatina normal, Jaboticabal, SP, 2014.

5.3.5 Avaliação da protaminação espermática pela Cromomicina A3

Para avaliação da protaminação espermática utilizou-se o corante fluorescente CMA3 (Sigma, St. Louis, MO, E.U.A). O protocolo de coloração para citometria de fluxo foi desenvolvido segundo Tavalae et al. (2010) e para o controle positivo utilizou-se o protocolo descrito por Simões et al. (2009), que consiste na indução da quebra das pontes dissulfídicas entre as cadeias de protamina e permeabilização da membrana plasmática das amostras de sêmen.

Para análise por citometria de fluxo os espermatozoides foram diluídos em 200µL de tampão Mc Ilvaine's (2×10^6 espermatozoides) e centrifugados a 500g por 5 minutos. Após desprezar o sobrenadante, a amostra foi ressuspensa em 200µL de solução Carnoy (3 partes de metanol e 1 parte de ácido acético) e mantidas a 4°C por 5 minutos. Após lavar duas vezes com PBS as amostras foram incubadas por 60 minutos a temperatura ambiente com a solução de coloração de CMA3 (0,25mg/mL de CMA3 em tampão Mc Ilvaine's) (TAVALAEE et al., 2010). Após 60 minutos, as amostras foram lavadas e ressuspensas em 1mL de PBS e lidas no citômetro de fluxo Attune® (Applied Biosystems by Life Technologies, Grand Island, EUA), equipado com laser de 488nm e filtro BL2 (575/24 nm), 10.000 eventos correspondentes a espermatozoides foram avaliados por amostra.

No protocolo de indução para o controle positivo as amostras de sêmen descongeladas foram centrifugadas em meio Mc Ilvaine's a 500g por cinco minutos, ressuspensas e incubadas por 15 minutos a 37°C em PBS contendo 5mM de ditioneitol (DTT) e triton X-100, para quebrar as pontes dissulfídicas entre as cadeias de protamina e permeabilizar a membrana plasmática. Após duas lavagens para remover a solução de detergente e o DTT, os espermatozoides foram fixados por 45 minutos em solução de Carnoy (SIMÕES et al., 2009). Após o protocolo de coloração, a leitura foi realizada pela citometria de fluxo, onde 10.000 eventos correspondentes a espermatozoides foram excitados pelo laser de argônio de 488nm e lidas no filtro BL1 (530/30nm) por amostra.

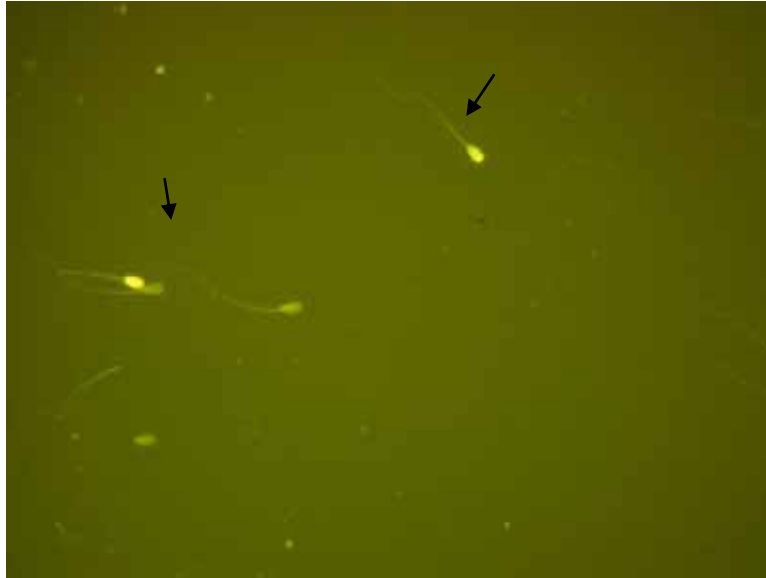


Figura 4. Fotomicrografia digital de espermatozoides corados com CMA3. As setas representam espermatozoides positivos para CMA3 com protaminação deficiente (Olympus BX61, microscopia de fluorescência, 400x), Jaboticabal, SP, 2014.

5.4 Experimento II (Produção *in vitro* de embriões)

Para a avaliação da fertilidade, utilizou-se a produção *in vitro* de embriões de acordo com o protocolo descrito por Rocha-Frigoni et al. (2013). Realizaram-se quatro repetições por grupo de estudo, com 25 a 30 oócitos em cada repetição.

Os reagentes foram obtidos da Sigma Chemical Co (Sigma, St. Louis, MO, E.U.A), exceto quando especificado.

5.4.1 Obtenção e seleção de oócitos

Ovários de vacas abatidas em frigoríficos foram transportados até o laboratório a uma temperatura entre 30-35°C. As punções foliculares foram

realizadas com seringa acoplada a uma agulha 18-G. O material aspirado foi transferido para tubos de 50 mL e decantado por 15 minutos para posterior seleção dos oócitos. Somente complexos *cumulus*-oócitos (COCs) circundados com pelo menos quatro camadas de células do *cumulus* compactas e com citoplasma contendo granulação homogênea foram selecionados para o cultivo de maturação.

5.4.2 Maturação *in vitro* dos oócitos

Os oócitos selecionados foram lavados duas vezes em meio de lavagem H-199 (TCM-199 [Gibco[®], Invitrogen Co., Grand Island, NY, USA] suplementado com 0,2 mM de piruvato, 20 mM de HEPES, 5mM de Bicarbonato de sódio e 75 µg/mL de amicacina) e uma vez em meio de maturação B-199 (TCM199 suplementado com 0,2mM de piruvato, 25mM de Bicarbonato de sódio, 75 µg/mL de amicacina, 0,5 µg/mL de FSH [Pluset R[®]; Hertape Calier, Juatuba, MG, Brazil], 100 UI/mL de hCG [Vetecor[®], Hertape Calier] e 6 mg/mL de BSA). Foram transferidas 25 a 30 estruturas para cada gota, contendo 100 µL de meio de maturação. O cultivo de maturação foi realizado em atmosfera de 5% CO₂ em ar e com máxima umidade, durante 22-24 horas.

5.4.3 Fertilização *in vitro*

Ao término da maturação *in vitro*, os oócitos foram submetidos à FIV. Baseado nos resultados da avaliação da cromatina espermática pela técnica de azul de toluidina foi selecionado um “pool” de touros com alterações de compactação de cromatina (grupo CL – com lesão de cromatina) e um “pool” de touros sem alterações de compactação de cromatina (grupo SL – sem lesão de cromatina). Foi utilizado um grupo controle (padrão do laboratório).

O grupo CL foi representado por três touros com alteração de cromatina espermática variando entre 4 e 16,15%, e o grupo SL foi representado por 3 touros com zero espermatozoides com alteração de compactação de cromatina, cada touro foi representado por uma partida/palheta. Ambos foram analisados pela técnica de azul de toluidina e desconsiderou-se a faixa etária.

Para a obtenção do sêmen, as palhetas foram descongeladas em banho-maria a 36°C, durante 30 segundos. Em seguida, o sêmen foi centrifugado duas vezes a 750 rpm por 5 minutos em meio “Tyrode’s albumin lactate and pyruvate” (TALP-FIV) acrescido de 5 µL/mL de antibiótico e 2 µL/mL de piruvato, a pH 7,4. O sedimento recuperado foi avaliado quanto ao volume, concentração e motilidade espermática. A concentração espermática foi ajustada para 25×10^6 espermatozoides/mL de meio de fecundação (TALP-FIV) suplementado com 4 µL/mL solução PHE (1 Mm hipotaurina, 2 mM penicilamina e 250 µM epinefrina) e 10 µg/mL heparina. Aproximadamente 100×10^3 espermatozoides foram adicionados a cada gota de 100 µL de meio de fecundação. Foram adicionados em média 25 oócitos/gota, onde permaneceram em atmosfera de 5% de CO₂ em ar a 38,5°C durante 18-22 horas.

A metodologia da FIV utilizada no presente estudo preconizou a lavagem do sêmen com TALP-FIV e posterior centrifugação ao invés do Percoll®, a fim de manter as características originais da amostra e não reduzir ou aumentar a porcentagem de espermatozoides com alteração de cromatina. Relatos indicam que o Percoll® aumenta a descondensação da cromatina e as alterações morfológicas (OLIVEIRA et al., 2011) e outros afirmam que pode selecionar espermatozoides com baixa proporção de fragmentação de DNA (DONNELLY et al., 2000).

5.4.4 Cultivo *in vitro*

O cultivo embrionário foi realizado em gotas contendo 100 μ L de meio “Synthetic Oviduct Fluid” modificado (mSOF) suplementado 0,2 mM de L-glutamina, 0,34 mM de citrato de sódio, 2,8 mM de myo-inositol, 2% de BEM aminoácidos essenciais, 1% de MEM aminoácidos não essenciais, 2,5% de SFB e 0,5 BSA. O cultivo foi conduzido em incubadora (Forma, Thermo, USA) com atmosfera de 5% de CO₂ em ar, em temperatura de 38,5°C por até oito dias. Após 48 e 96 horas de cultivo, 50% do meio de cultivo foi renovado. A clivagem foi avaliada 48 horas pós-inseminação (hpi), e o desenvolvimento embrionário às 168 hpi (D7) e 192 hpi (D8).

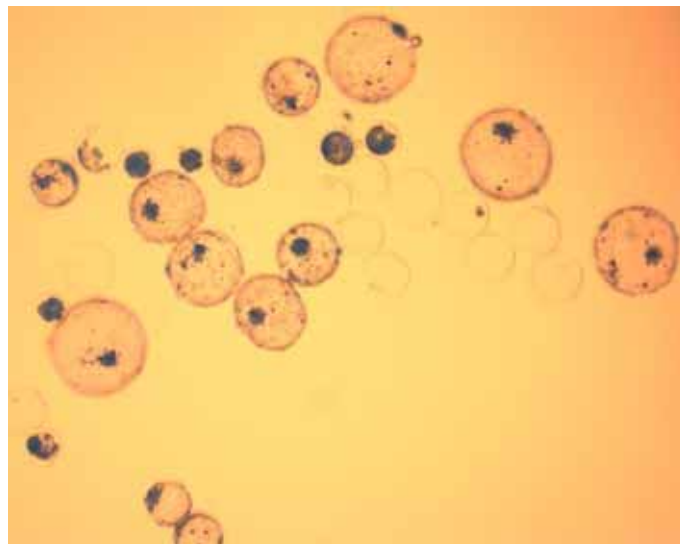


Figura 5. Fotomicrografia de blastocistos produzidos *in vitro* no D8 após a FIV. Aumento (1000x). Laboratório de Fisiologia Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária UNESP Campus Araçatuba, Araçatuba, SP, 2014.

VI ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para investigar as diferenças nas variáveis analisadas (motilidade, vigor, concentração, morfologia, morfometria, compactação da cromatina espermática, PIV) em relação aos grupos (jovens, adultos e senis) foi utilizada a análise de variância (ANOVA) e as médias foram comparadas por meio do Teste de Tukey. Os dados de formação de blastocisto (D7 e D8) foram transformados em $\arcseno\sqrt{\%}$ para obter a distribuição normal e fazer análise de variância. O coeficiente de correlação de Spearman (r) foi calculado para as variáveis selecionadas. A significância dos testes foi determinada para valores de $P < 0,05$ e as análises efetuadas com o programa SAS (Statistical Analysis System, SAS Institute, Cary, NC, USA, 2008) versão 9.2.

VII RESULTADOS

7.1 Experimento I

7.1.1 Análise da motilidade, vigor, concentração e morfologia espermática

Esp ermatozoides de touros jovens e adultos mostraram maiores valores de motilidade do que os senis, sendo que os resultados de vigor não diferiram estatisticamente (Tabela 2).

Tabela 2. Média ($\bar{x}$) e desvio padrão (sd) da motilidade (porcentagem) e do vigor (0 a 5) de touros jovens (n=27), adultos (n=52) e senis (n=34) no sêmen pós-descongelação avaliados em microscopia de contraste de fase, Jaboticabal, SP, 2014.

Grupo	Motilidade% ($\bar{x} \pm sd$)	Vigor ($\bar{x} \pm sd$)
Jovens	38,9±10,9 ^a	3,7±0,7
Adultos	38,2±8,8 ^{ab}	3,6±0,6
Senis	33,7±6,1 ^b	3,5±0,4

^{a,b}Médias seguidas de letras distintas na coluna diferem entre si pelo teste de Tukey (P<0,05).

A concentração espermática foi maior em touros jovens, seguido dos animais senis e adultos (Tabela 3). Quanto à morfologia espermática, touros jovens apresentaram maior porcentagem de defeitos maiores do que as outras faixas etárias e não houve diferença significativa quanto aos defeitos menores e totais (Tabela 3).

Tabela 3. Média ($\bar{x}$) e desvio padrão (sd) da concentração espermática ($\times 10^6$ /palheta), da porcentagem de defeitos maiores, menores e totais de touros jovens (n=27), adultos (n=52) e senis (n=34) no sêmen pós-descongelamento avaliados em microscopia de interferência diferencial (DIC, imersão em óleo, 1000x), Jaboticabal, SP, 2014.

Grupo	Concentração ($\times 10^6$/palheta) ($\bar{x} \pm \text{sd}$)	Defeitos Maiores ($\bar{x} \pm \text{sd}$)	Defeitos Menores ($\bar{x} \pm \text{sd}$)	Defeitos Totais ($\bar{x} \pm \text{sd}$)
Jovens	28,6 $\pm$ 8,7 ^a	13,7 $\pm$ 5,0 ^a	5,1 $\pm$ 3,3	18,8 $\pm$ 7,0
Adultos	21,0 $\pm$ 3,3 ^c	9,3 $\pm$ 5,7 ^b	6,3 $\pm$ 3,9	14,5 $\pm$ 7,8
Senis	24,5 $\pm$ 4,7 ^b	9,2 $\pm$ 4,7 ^b	6,3 $\pm$ 5,0	15,1 $\pm$ 6,4

^{a,b} Médias seguidas de letras distintas na coluna diferem entre si pelo teste de Tukey (P<0,05).

A porcentagem de anormalidades espermáticas para os grupos estudados de acordo com a classificação de Blom (1973) estão descritos na Tabela 4.

Tabela 4. Média ($\bar{x}$) e desvio padrão (sd) da porcentagem das anormalidades espermáticas para os grupos de touros jovens (n=27), adultos (n=59) e senis (36) avaliados em microscopia de interferência diferencial (1000x). Contagem de 200 células para cada amostra de cada touro, Jaboticabal, SP, 2014.

Defeito		Jovens ($\bar{x} \pm sd$)	Adultos ($\bar{x} \pm sd$)	Senis ($\bar{x} \pm sd$)
Defeitos Maiores	Acrossoma	2,5±1,6	1,4±1,3	2,4±2,0
	Gota citoplasmática proximal	0,8±0,9	0,6±0,7	0,7±0,8
	Subdesenvolvida	0,1±0,3	0,0±0,0	0,1±0,4
	Enrolada na cabeça	0,1±0,3	0,4±0,6	0,4±0,6
	Isolada patológica	0,1±0,3	0,1±0,3	0,3±0,5
	Estreita na base	0,6±1,7	0,2±0,3	0,1±0,3
	Piriforme	0,1±0,4	0,1±0,2	0,1±0,4
	Pequena anormal	0,1±0,2	0,0±0,1	0,0±0,1
	Contorno anormal	0,8±0,8	0,3±0,7	0,3±0,5
	“Pouch formation”	0,1±0,2	0,1±0,3	0,2±0,5
	Formas duplas	0,1±0,3	0,0±0,1	0,2±0,4
	Defeitos de membrana	1,0±1,2	1,4±1,5	0,8±0,8
	Peça intermediária	3,6±2,7	1,9±1,5	1,4±1,0
	Cauda fortemente enrolada	3,8±3,7	3,3±3,4	1,7±1,6
Total de defeitos maiores		13,7±5,0	9,7±5,8	8,2±4,4
Defeitos Menores	Pequena, delgada, gigante	0,3±0,5	0,0±0,1	0,1±0,1
	Decaptação	2,4±2,0	3,7±3,2	3,1±3,2
	Peça intermediária abaxial	1,1±2,1	1,0±1,7	0,6±0,5
	Cauda dobrada	0,5±0,9	0,6±1,0	0,5±1,0
	Gota citoplasmática distal	0,2±0,5	0,7±1,0	1,6±2,7
	Cauda dobrada com gota	0,5±1,1	0,5±0,6	1,1±1,9
Total de defeitos menores		5,1±3,3	6,4±4,3	6,2±5,3
Total geral		18,8±7,0	16,1±8,5	15,0±7,1

7.1.2 Avaliação da condensação da cromatina e morfometria da cabeça espermática com azul de toluidina

Espermatozoides de touros jovens apresentaram maiores valores de área, perímetro e largura e menor elipsidade do que adultos e senis. Ao analisar a harmônica de Fourier 2, que foi maior para touros jovens, confirma-se o fato de que espermatozoides deste grupo apresentaram macrocefalia, uma vez que esta harmônica relaciona-se com o comprimento da cabeça espermática, indicando macro ou microcefalia. O grau de compactação da cromatina não obteve diferenças significativas nos grupos de estudo quando avaliado pelo azul de toluidina. Porém, a porcentagem de espermatozoides com anormalidades na cromatina, definido quando as cabeças espermáticas obtiveram porcentagem de descompactação da cromatina maior que 2,0 e/ou heterogeneidade da cromatina maior que 5,0, variou de zero a 16,15% nas amostras (Tabela 5).

Tabela 5. Média ($\bar{x}$) e desvio padrão (sd) das variáveis morfométricas da cabeça de espermatozoides de touros *Bos taurus indicus* da raça Nelore jovens (n=27, C=7629), adultos (n=59, C=15186) e senis (n=36, C=8966), descompactação da cromatina e heterogeneidade da cromatina, avaliados pela técnica do Azul de Toluidina, Jaboticabal, SP, 2014.

	Grupo Jovens ($\bar{x} \pm sd$)	Grupo Adultos ($\bar{x} \pm sd$)	Grupo Senis ($\bar{x} \pm sd$)
Área	1848,5 $\pm$ 119,79 ^a	1672,9 $\pm$ 104,46 ^b	1723,1 $\pm$ 124,41 ^b
Perímetro	10,23 $\pm$ 0,29 ^a	9,86 $\pm$ 0,33 ^b	9,97 $\pm$ 0,33 ^b
Largura	1,95 $\pm$ 0,1 ^a	1,81 $\pm$ 0,061 ^b	1,83 $\pm$ 0,09 ^b
Comprimento	3,89 $\pm$ 0,11	3,81 $\pm$ 0,14	3,86 $\pm$ 0,13
Largura/comprimento	0,5 $\pm$ 0,03 ^a	0,48 $\pm$ 0,02 ^b	0,47 $\pm$ 0,02 ^b
Elipsidade	0,33 $\pm$ 0,02 ^a	0,36 $\pm$ 0,02 ^b	0,36 $\pm$ 0,02 ^b
Fator forma	0,92 $\pm$ 0,02 ^a	0,91 $\pm$ 0,01 ^b	0,9 $\pm$ 0,01 ^b
Fourier 0	2784,9 $\pm$ 212,01	2751,4 $\pm$ 272,4	2810,0 $\pm$ 2226,24
Fourier 1	293,14 $\pm$ 59,94	281,32 $\pm$ 44,88	274,62 $\pm$ 50,6
Fourier 2	200,07 $\pm$ 17,53 ^a	181,64 $\pm$ 14,56 ^b	186,24 $\pm$ 19,42 ^b
Simetria Lateral	0,961 $\pm$ 0,005 ^a	0,958 $\pm$ 0,003 ^b	0,958 $\pm$ 0,004 ^b
Simetria ântero-posterior	0,93 $\pm$ 0,01	0,93 $\pm$ 0,01	0,93 $\pm$ 0,01
Descompactação da cromatina	1,13 $\pm$ 0,22	1,06 $\pm$ 0,34	1,04 $\pm$ 0,29
Heterogeneidade da cromatina	0,91 $\pm$ 0,17	0,83 $\pm$ 0,15	0,86 $\pm$ 0,15

^{a,b} Médias seguidas de letras distintas na linha diferem entre si pelo teste de Tukey (P<0,05). **n** - número de animais, **C** - número de cabeças espermáticas.

Ao analisar espermatozoides com ou sem alteração de cromatina em cada grupo de estudo, observou-se que o grau de compactação da cromatina reflete a morfometria do espermatozoide. Área, perímetro, largura, comprimento e razão largura/comprimento foram maiores em espermatozoides com anormalidades de cromatina e mostraram menor elipsidade. Estes resultados foram semelhantes em todos os grupos estudados (Tabela 6, 7 e 8).

Tabela 6. Média ($\bar{x}$) e desvio padrão (sd) das variáveis morfométricas da cabeça de espermatozoides de touros jovens *Bos taurus indicus* da raça Nelore (n=27) com cromatina anormal (C=180) e cromatina normal (C=7686), descompactação da cromatina e heterogeneidade da cromatina, avaliados pela técnica do Azul de Toluidina, Jaboticabal, SP, 2014.

	Grupo Jovens	
	Cromatina anormal (C=180) ($\bar{x} \pm sd$)	Cromatina Normal (C=7686) ($\bar{x} \pm sd$)
Área	2212,0 $\pm$ 465,99 ^a	1825,7 $\pm$ 317,44 ^b
Perímetro	10,82 $\pm$ 1,2 ^a	10,18 $\pm$ 0,76 ^b
Largura	2,24 $\pm$ 0,31 ^a	1,92 $\pm$ 0,23 ^b
Comprimento	4,03 $\pm$ 0,48 ^a	3,89 $\pm$ 0,28 ^b
Largura/comprimento	0,56 $\pm$ 0,078 ^a	0,49 $\pm$ 0,046 ^b
Elipsidade	0,28 $\pm$ 0,06 ^a	0,34 $\pm$ 0,04 ^b
Fator forma	0,92 $\pm$ 0,03 ^a	0,91 $\pm$ 0,03 ^b
Fourier 0	2709,0 $\pm$ 818,97	2797,2 $\pm$ 429,62
Fourier 1	311,05 $\pm$ 156,78	285,88 $\pm$ 121,14
Fourier 2	297,19 $\pm$ 147,13 ^a	198,98 $\pm$ 94,59 ^b
Simetria Lateral	0,95 $\pm$ 0,10 ^a	0,96 $\pm$ 0,02 ^b
Simetria ântero-posterior	0,93 $\pm$ 0,08	0,93 $\pm$ 0,02
Descompactação da cromatina	4,93 $\pm$ 2,99 ^a	1,0 $\pm$ 0,6 ^b
Heterogeneidade da cromatina	3,63 $\pm$ 2,35 ^a	0,84 $\pm$ 0,29 ^b

^{a,b} Médias seguidas de letras distintas na linha diferem entre si pelo teste de Tukey (P<0,05). n - número de animais, C - número de cabeças espermáticas.

Tabela 7. Média ($\bar{x}$) e desvio padrão (sd) das variáveis morfométricas da cabeça de espermatozoides de touros adultos *Bos taurus indicus* da raça Nelore (n=59) com cromatina anormal (C=255) e cromatina normal (C=14690), descompactação da cromatina e heterogeneidade da cromatina, avaliados pela técnica do Azul de Toluidina, Jaboticabal, SP, 2014.

	Grupo Adultos	
	Cromatina anormal (C=255) ($\bar{x} \pm sd$)	Cromatina Normal (C=14690) ($\bar{x} \pm sd$)
Área	2108,8 $\pm$ 467,18 ^a	1667,1 $\pm$ 344,36 ^b
Perímetro	10,49 $\pm$ 1,3 ^a	9,85 $\pm$ 0,85 ^b
Largura	2,2 $\pm$ 0,3 ^a	1,8 $\pm$ 0,25 ^b
Comprimento	3,93 $\pm$ 0,52 ^a	3,82 $\pm$ 0,31 ^b
Largura/comprimento	0,57 $\pm$ 0,08 ^a	0,47 $\pm$ 0,05 ^b
Elipsidade	0,28 $\pm$ 0,06 ^a	0,36 $\pm$ 0,04 ^b
Fator forma	0,914 $\pm$ 0,03 ^a	0,906 $\pm$ 0,03 ^b
Fourier 0	2530,5 $\pm$ 905,3 ^a	2770,9 $\pm$ 454,96 ^b
Fourier 1	320,82 $\pm$ 178,38 ^a	271,28 $\pm$ 112,34 ^b
Fourier 2	284,54 $\pm$ 121,84 ^a	176,26 $\pm$ 83,15 ^b
Simetria Lateral	0,97 $\pm$ 0,02 ^a	0,97 $\pm$ 0,02 ^b
Simetria ântero-posterior	0,93 $\pm$ 0,03	0,93 $\pm$ 0,03
Descompactação da cromatina	5,27 $\pm$ 2,8 ^a	1,04 $\pm$ 0,67 ^b
Heterogeneidade da cromatina	3,73 $\pm$ 2,25 ^a	0,78 $\pm$ 0,26 ^b

^{a,b} Médias seguidas de letras distintas na linha diferem entre si pelo teste de Tukey (P<0,05). n - número de animais, C - número de cabeças espermáticas.

Tabela 8. Média ($\bar{x}$) e desvio padrão (sd) das variáveis morfométricas da cabeça de espermatozoides de touros senis *Bos taurus indicus* da raça Nelore (n=36) com cromatina anormal (C=216) e cromatina normal (C=8752), descompactação da cromatina e heterogeneidade da cromatina, avaliados pela técnica do Azul de Toluidina, Jaboticabal, SP, 2014.

	Grupo Senis	
	Cromatina anormal (C=216) ($\bar{x} \pm sd$)	Cromatina Normal (C=8752) ($\bar{x} \pm sd$)
Área	2274,8 $\pm$ 582,99 ^a	1710,2 $\pm$ 329,35 ^b
Perímetro	10,95 $\pm$ 1,65 ^a	9,93 $\pm$ 0,82 ^b
Largura	2,24 $\pm$ 0,32 ^a	1,82 $\pm$ 0,23 ^b
Comprimento	4,12 $\pm$ 0,66 ^a	3,85 $\pm$ 0,3 ^b
Largura/comprimento	0,55 $\pm$ 0,08 ^a	0,47 $\pm$ 0,04 ^b
Elipsidade	0,29 $\pm$ 0,06 ^a	0,36 $\pm$ 0,04 ^b
Fator forma	0,91 $\pm$ 0,03 ^a	0,90 $\pm$ 0,03 ^b
Fourier 0	2930,2 $\pm$ 999,1	2792,3 $\pm$ 435,52
Fourier 1	341,76 $\pm$ 183,72 ^a	268,68 $\pm$ 121,29 ^b
Fourier 2	292,04 $\pm$ 141,9 ^a	185,3 $\pm$ 85,17 ^b
Simetria Lateral	0,9643 $\pm$ 0,02 ^a	0,959 $\pm$ 0,02 ^b
Simetria ântero-posterior	0,94 $\pm$ 0,03	0,93 $\pm$ 0,03
Descompactação da cromatina	4,48 $\pm$ 1,89 ^a	1,02 $\pm$ 0,65 ^b
Heterogeneidade da cromatina	3,1 $\pm$ 1,52 ^a	0,84 $\pm$ 0,27 ^b

^{a,b} Médias seguidas de letras distintas na linha diferem entre si pelo teste de Tukey (P<0,05). n - número de animais, C - número de cabeças espermáticas.

Quando analisada a morfometria de espermatozoides com e sem alteração na cromatina observamos que espermatozoides com anormalidades na cromatina obtiveram maior área (Tabela 9).

Tabela 9. Média ($\bar{x}$) e desvio padrão (sd) da área da cabeça de todos os espermatozoides avaliados com cromatina anormal e dos espermatozoides com cromatina normal, avaliados pela técnica de Azul de Toluidina, Jaboticabal, SP, 2014.

Grupo	C	Área ($\bar{x} \pm sd$)
Cromatina anormal	650	2194,8 $\pm$ 509,08 ^a
Cromatina normal	10000	1792,1 $\pm$ 324,28 ^b

^{a,b} Médias seguidas de letras distintas na coluna diferem entre si pelo teste de Tukey (P<0,0001). C - número de cabeças espermáticas.

7.1.3 Avaliação da protaminação espermática com Cromomicina A3

Quanto à avaliação da protaminação espermática com CMA3, analisado por citometria de fluxo, observamos que espermatozoides de touros jovens possuíam maior deficiência de protaminação (Tabela 10).

Tabela 10. Média ($\bar{x}$) e desvio padrão (sd) das porcentagens de espermatozoides com alterações na cromatina na técnica de CMA3, avaliados por citometria de fluxo para os grupos de touros jovens (n=27), adultos (n=59) e senis (n=36), Jaboticabal, SP, 2014.

Grupo (n)	CMA3 ($\bar{x} \pm sd$)
Jovens (n=27)	1,57 $\pm$ 0,76 ^a
Adultos (n= 59)	1,09 $\pm$ 0,63 ^b
Senis (n=36)	0,90 $\pm$ 0,59 ^b

^{a,b} Médias seguidas de letras distintas na coluna diferem entre si pelo teste de Tukey (P<0,05).

A Figura 6 ilustra os gráficos obtidos pela citometria de fluxo de focalização acústica Attune® (Applied Biosystems by Life Technologies, Grand Island, EUA), equipado com lasers de 488nm e de 405nm, filtros de emissão BL1 530/30nm “bandpass” (BP), BL2575/24nm BP, BL3 640nm “longpass” (LP) e VL1 450/40nm BP, VL2522/30nm BP e VL3 603/48nm BP.

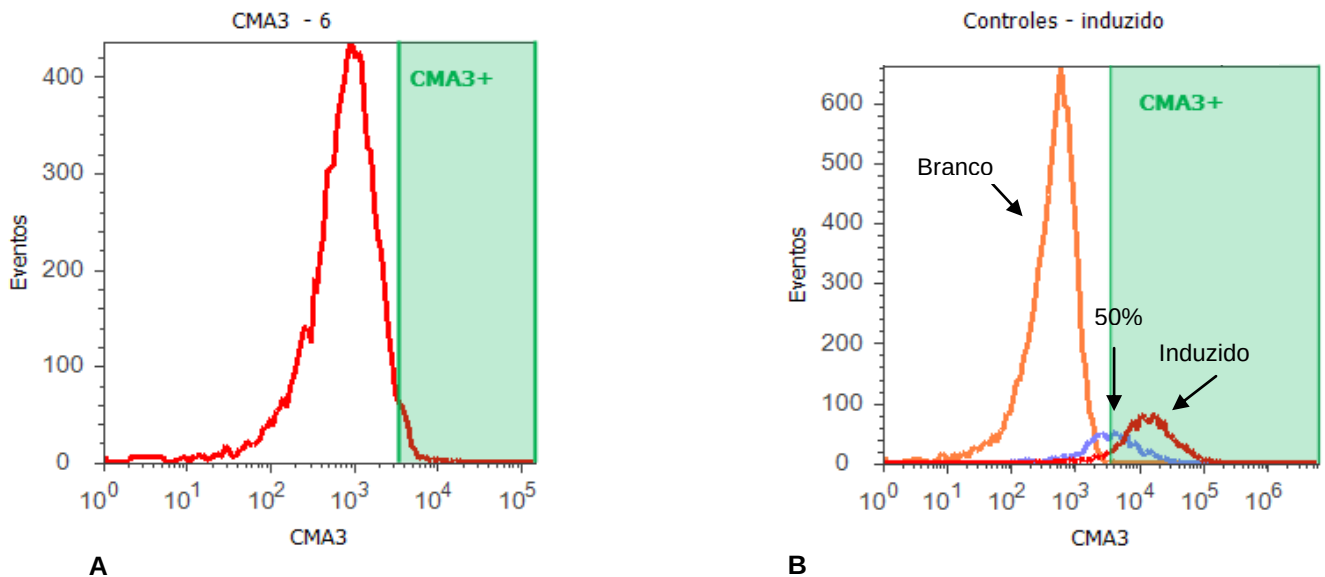


Figura 6. Representação gráfica referente à avaliação da porcentagem de eventos positivos para CMA3. Na área em verde e indicada como CMA3+ encontram-se os espermatozoides com protaminação deficiente. A) amostra de touro do grupo Jovens; B) controle negativo (amostra “Branca” – linha laranja), o controle positivo - desprotaminação induzida (linha vermelha), e a mistura 1:1 das amostras branco e induzida (linha azul) (Attune® Software – Applied Biosystems by Life Technologies, Grand Island, EUA).

7.1.4 Resultados das correlações

Área, perímetro, largura, razão largura/comprimento, fator forma e deficiência de protaminação espermática (CMA3) correlacionaram-se negativamente com a idade, demonstrando que as variáveis morfométricas e as alterações na cromatina espermática diminuem com o avanço da idade. Por outro lado, a elipsidade possui correlação positiva com a idade, ou seja, os espermatozoides de touros jovens são menos elípticos do que de touros senis (Tabela 11).

Tabela 11. Coeficiente de correlação e valor de P das variáveis físicas, morfométricas e de protaminação espermática em relação à idade no sêmen pós-descongelação, Jaboticabal, SP, 2014.

Variáveis	Correlação	P
Motilidade	-0,16972	0,0805
Vigor	-0,07290	0,4556
Concentração	-0,09349	0,3382
Total maiores	-0,16511	0,0892
Total menores	0,09142	0,3490
Total geral	-0,05997	0,5318
CMA3	-0,33502	0,0003
Área	-0,27228	0,0034
Perímetro	-0,24080	0,0099
Largura	-0,28817	0,0019
Comprimento	-0,06773	0,4740
Largura/Comprimento	-0,26735	0,0040
Elipsidade	0,27173	0,0034
Fator forma	-0,30648	0,0009
Fourier 0	0,04115	0,6637
Fourier 1	-0,03156	0,7389
Fourier 2	-0,14657	0,1197
Simetria lateral	-0,16181	0,0854
Simetria anteroposterior	-0,09023	0,3397
CV	-0,15367	0,1026
Dif%	0,00736	0,9381

CV – coeficiente de variação (%) do grau de cinza, **Dif%** - porcentagem de diferença do grau de cinza.

7.2 Experimento II

7.2.1 Produção *in vitro* de embriões utilizando espermatozoides com e sem lesões de cromatina

Quanto à PIV não houve diferenças significativas entre os grupos controle, com lesão de cromatina (CL) e sem lesão de cromatina (SL) na clivagem, total de blastocistos no D7 e D8 (Tabela 12). O grupo CL apresentou 4 a 16,15% de espermatozoides com deficiência de compactação da cromatina, avaliado pelo azul de toluidina, enquanto o grupo SL não apresentou espermatozoides com tal deficiência.

Tabela 12. Média ($\bar{x}$) e desvio padrão (sd) da clivagem, formação de blastocistos (BL) no D7 e no D8 do cultivo embrionário para os grupos controle (Controle), com lesão de cromatina (CL) e sem lesão de cromatina (SL), quatro repetições, Jaboticabal, SP, 2014.

Grupo	Nº de oócitos	Clivagem ($\bar{x} \pm sd$)	BL 168h (D7) ($\bar{x} \pm sd$)	BL 192h (D8) ($\bar{x} \pm sd$)
Controle	158	81,09±9,79	49,74±30,58	48,15±28,04
CL	158	78,76±9,24	46,05±25,55	45,35±28,65
SL	164	76,58±4,84	36,73±19,72	37,84±21,35

VIII DISCUSSÃO

No presente estudo observamos que touros jovens apresentaram cabeça espermática com maiores valores de área, perímetro e largura do que touros adultos e senis. Tal achado pode ser justificado pela presença do maior índice de deficiência de protaminação neste grupo, quando analisado com a coloração CMA3, uma vez que alterações na estrutura da cromatina refletem na morfologia da célula (OSTERMEIER et al., 2001; ENCISO et al., 2011). Outra hipótese para explicar esse evento seria a maior porcentagem de defeitos morfológicos maiores observados nesta faixa etária.

Sabe-se que as mudanças seminais após a puberdade em touros Nelore são caracterizadas pelo aumento da motilidade e proporção de espermatozoides normais, além da diminuição na proporção de defeitos espermáticos maiores (BRITO et al., 2004). Fortes et al. (2012) ao analisarem touros jovens das raças Belmont Red, Charbray, Santa Gertrudis e Senepol, aos 13, 18 e 24 meses também encontraram um aumento na porcentagem de espermatozoides normais com o avanço da idade.

Freneau et al. (2006) observaram uma correlação positiva entre idade de touros Nelore criados a pasto no Brasil e as características de crescimento corporal, testicular e aspectos físicos dos ejaculados, demonstrando que as características seminais melhoram com o decorrer da puberdade e avanço da idade. Observaram também, assim como no nosso estudo, que os defeitos espermáticos diminuem com a idade em touros. Estes autores trabalharam com 23 touros Nelore entre 10 e 20 meses de idade.

Quanto à morfometria espermática, não há relatos de variações que contemple toda a faixa etária reprodutiva em touros. Entretanto, um estudo em galos observou que jovens apresentaram maior tamanho espermático do que velhos em virtude do maior número de alterações morfológicas (RODRIGUES; ROCHA; BELETTI, 2009).

A morfometria espermática pode sofrer alterações em consequência do processo de criopreservação (GRAVANCE et al., 1998; RUBIO-GUILLÉN et al., 2007), já outros estudos afirmam que a estrutura da cromatina espermática de

touros não se altera com este processo (VAN DER SCHANS et al., 2000; SLOWINSKA; KAROL; CIERESZKO, 2008). No nosso estudo, embora valores morfométricos apresentaram-se superiores para uma única categoria (touros jovens) quando comparados a adultos e senis, a avaliação do efeito da criopreservação sobre a morfometria não foi abordado, podendo-se apenas sugerir que os touros jovens podem ter sofrido efeitos deletérios na morfometria em virtude da criopreservação, sendo mais suscetíveis do que as demais categorias. No entanto, nosso delineamento não contemplou a avaliação do sêmen antes da criopreservação, não sendo possível prever os efeitos da mesma sobre a morfometria.

A variável morfométrica F2, que mede o comprimento da cabeça do espermatozoide, indicando macro ou microcefalia (OSTERMEIER et al., 2001), foi significativamente maior nos touros jovens. A análise de Fourier auxilia na identificação de alterações no formato da cabeça, uma vez que existe variação substancial no formato da cabeça dos espermatozoides considerados normais (PARRISH et al., 2012). Já foi identificado que touros com fertilidade reduzida possuem núcleo espermático de maior comprimento (F2). A identificação de infertilidade masculina utilizando esta análise possui acurácia maior que 95% para touros, assim o descarte de touros com fertilidade reduzida por meio desta técnica se torna possível sem grandes custos laboratoriais (PARRISH et al., 2012).

Quando avaliada a morfometria de espermatozoides com e sem anormalidades de cromatina, observamos que espermatozoides com alteração de cromatina apresentaram macrocefalia em relação àqueles considerados normais e ainda cabeça com formato menos elíptico. Estes resultados foram semelhantes em todas as faixas etárias estudadas.

Já é sabido que alterações na estrutura da cromatina espermática são comumente acompanhadas de anormalidades morfológicas, tais como formas duplas, cabeça piriforme, estreita na base, solta anormal, cabeça gigante e estreita, cauda enrolada na porção terminal e “dag defect” (ENCISO et al., 2011) e que a condensação do DNA espermático, além de proteger o material genético, determina a forma e o tamanho da célula (BALHORN, 2011; SHARMA; AGARWAL, 2011). A composição protéica do DNA espermático é adquirida durante a espermatogênese (ZINI et al., 2009) e a compactação final da cromatina ocorre no epidídimo, onde se

originam os defeitos secundários, assim as causas de defeitos morfológicos podem interferir com a compactação da cromatina espermática (BELETTI; MELLO, 2004).

De acordo com nossos resultados podemos sugerir que anormalidades na compactação da cromatina espermática refletem na morfologia da célula, aumentando suas dimensões. Entretanto, anormalidades na cromatina nem sempre são acompanhadas de alterações morfológicas evidentes, tornando-se extremamente importante a análise do DNA espermático, tais como análises de compactação da cromatina, a fim de aperfeiçoar as biotécnicas de reprodução (BELETTI, COSTA; GUARDIEIRO, 2005; ENCISO et al., 2011).

No presente estudo touros jovens apresentaram maior porcentagem de deficiência de protaminação, avaliado por CMA3, possivelmente decorrente da imaturidade reprodutiva. Resultados semelhantes foram observados em ratos jovens em comparação a idosos, submetidos a mesma avaliação de CMA3 (ZUBKOVA; ROBAIRE; WADE, 2005). Porém, Fortes et al. (2012) não encontraram correlação entre idade de touros e integridade da cromatina espermática, avaliado por Sperm-bos-halomax (SBH) e SCSA, e afirmam que o “efeito individual” de cada touro é mais relevante para a fragmentação da cromatina espermática do que a “idade”. No entanto, estes autores trabalharam com touros de 13, 18 e 24 meses com índices de descondensação de cromatina variando entre 21,35% a 21,50%, avaliado por SBH. No presente estudo a idade variou de 20 meses a 14,3 anos e o índice de deficiência de protaminação avaliado pelo azul de toluidina foi menor (de zero a 16,15%) do que o encontrado por Fortes et al. (2012), o que pode ser justificado por serem animais altamente selecionados de CCPS.

Embora os resultados do CMA3 tenham evidenciado que touros jovens obtiveram maior porcentagem de deficiência de protaminação, o mesmo não foi possível afirmar com o uso da coloração azul de toluidina, uma vez que os resultados não foram significativos. Isto pode ser justificado pelo fato da técnica do azul de toluidina avaliar número menor de espermatozoides (100 células/amostra) quando comparado ao CMA3 (10000 células/amostra), que utiliza citometria de fluxo.

Os resultados da PIV permitiram inferir que a parcela de espermatozoides com alteração de cromatina na amostra (4 a 16,15%) não influenciou o desenvolvimento embrionário inicial, pois não houve diferenças significativas na clivagem, total de blastocistos no D7 e D8. Uma hipótese para este achado seria a

presença de um maior número de espermatozoides normais na amostra frente àqueles com cromatina alterada. Sabe-se que sob condições normais, baixos níveis de danos no DNA espermático são reparados pelo oócito (MATSUDA et al., 1989; GENESCA et al., 1992), mas quando severos podem induzir à apoptose, fragmentação precoce do embrião ou morbidade tardia (JI et al., 1997; SUN; JURISICOVA; CASPER,1997; YANG et al., 1998).

Ainda, danos no DNA espermático de touros não impedem a fertilização do oócito ou a realização das primeiras 2 a 3 clivagens, mas bloqueiam a formação do blastocisto por induzir a apoptose (FATEHI et al., 2006). No presente estudo, porém, a parcela de alteração da cromatina não interferiu na formação do blastocisto. Sugerimos a realização de pesquisas que englobem um período gestacional superior, uma vez que a apoptose pode ocorrer nos estágios mais avançados do desenvolvimento embrionário.

Segundo revisão organizada por Zini et al. (2011), com 28 estudos que avaliaram a relação entre dano de DNA espermático e qualidade embrionária por FIV e ICSI, 11 desses estudos (1/8 FIV, 5/12 ICSI e 5/8 FIV + ICSI) afirmam que o dano de DNA espermático associa-se com a qualidade e/ou desenvolvimento embrionário, enquanto o restante dos 17 estudos mostram que não existe esta relação. Assim, observamos que não há dados consistentes entre dano de DNA e desenvolvimento embrionário, sendo ainda questão controversa e que deve ser melhor estudada. Estes dados sugerem que a influência do dano no DNA espermático na qualidade e/ou desenvolvimento embrionário pode ser mais significativa quando utilizado a ICSI em comparação à FIV.

A influência da morfometria da cabeça espermática na PIV também é controversa. Silva, Mendes Júnior e Beletti (2008) não encontraram diferenças significativas entre variações na morfometria espermática, taxa de clivagem e número de blastocistos morfolologicamente normais na PIV, concluindo que pequenas variações na morfometria da cabeça e compactação da cromatina espermática pouco influenciam a PIV. Entretanto, Hirai et al. (2001) mostraram que varrões altamente férteis (analisado por meio de taxa de não retorno ao estro) possuem cabeça espermática significativamente menor e menos alongada do que varrões menos férteis. Da mesma forma, garanhões férteis apresentam valores significativamente menores de comprimento, área, largura da cabeça e perímetro do

que os subférteis (CASEY et al.,1997). Por outro lado, espermatozoides de carneiros altamente férteis possuem área do núcleo, perímetro e comprimento de maiores valores em comparação àqueles de baixa fertilidade (VICENTE-FIEL et al., 2014). Entretanto, o objetivo do presente trabalho foi avaliar a influência da compactação da cromatina na PIV e não das variações morfométricas.

De acordo com a motilidade espermática, no presente estudo touros jovens e adultos obtiveram maiores valores do que senis. Resultados semelhantes foram encontrados por outros autores que associaram a diminuição da motilidade com o aumento da idade (BRITO et al., 2002) e com a diminuição da produção de antioxidantes (KELSO et al., 1997). Em contrapartida, o vigor não sofreu alterações nos diferentes grupos avaliados, mostrando que o vigor se mantém ao decorrer da idade em touros.

A motilidade espermática está relacionada com as mitocôndrias, uma vez que para haver motilidade é necessária a produção de ATP por estas organelas (COSSON, 1996). Nossos resultados permitem inferir que a motilidade diminui com o avanço da idade e uma provável hipótese para explicar esse evento seria a disfunção da atividade mitocondrial, causada por lesões de espécies reativas de oxigênio ou por mutações.

A nossa pesquisa demonstrou a importância da análise morfológica seguida de análise de DNA em espermograma de rotina. Sugere-se evitar o uso de espermatozoides morfológicamente maiores nas técnicas de reprodução, a fim de evitar falhas no desenvolvimento embrionário, uma vez que se demonstrou que espermatozoides com alteração de cromatina são maiores do que aqueles considerados normais. A pesquisa serve de auxílio aos CCPS na seleção de animais doadores de sêmen de alto padrão, minimizando falhas na fertilização.

Sugere-se também que touros jovens devem ser melhor estudados quando selecionados para colheita de sêmen, uma vez que nossos resultados indicam que esta faixa etária possui mais alterações de cromatina espermática. Estes animais poderiam aguardar para entrar nas colheitas para comercialização.

IX RESUMO DOS RESULTADOS

- Touros jovens apresentaram espermatozoides com motilidade e índices de defeitos morfológicos mais altos sendo que o vigor não diferiu estatisticamente entre os grupos avaliados.
- Espermatozoides com anormalidades na cromatina obtiveram maior área quando comparado àqueles sem alteração de cromatina.
- Touros jovens possuíram tamanho da cabeça espermática maior decorrente de uma maior parcela de defeitos morfológicos e maior índice de protaminação deficiente, avaliado pelo CMA3, mostrando que touros desta faixa etária devem ser melhor estudados quando selecionados como animais doadores de sêmen.
- Considerando a disponibilidade de um citômetro de fluxo, o CMA3 demonstrou ser o melhor teste para avaliar alterações de protaminação espermática, uma vez que avalia número maior de células. O teste azul de toluidina mostrou-se de grande utilidade para avaliar a morfometria espermática, uma vez que identifica defeitos morfológicos imperceptíveis na análise visual, além de ser uma técnica de baixo custo.
- A parcela de espermatozoides com defeitos de cromatina (4 a 16,15%) não interferiu no número de blastocistos morfolologicamente normais na PIV. Sugere-se a realização de pesquisas que contemplem período gestacional mais avançado, a fim de esclarecer a influência da cromatina espermática no desenvolvimento embrionário, observando perdas embrionárias tardias.

X CONCLUSÃO

Nossos resultados permitiram concluir que espermatozoides de touros jovens possuem cabeça de maior tamanho quando comparado a adultos e senis devido à maior deficiência de protaminação, quando avaliado pela CMA3, e defeitos morfológicos maiores. Anormalidades na compactação da cromatina influenciam no tamanho da cabeça espermática, aumentando suas dimensões morfométricas e quando presentes em 4 a 16,15% na amostra não prejudicam o desenvolvimento embrionário na PIV até D8.

REFERÊNCIAS

- AHMADI, A.; NG, S. C. Fertilizing ability of DNA-damaged spermatozoa. **Journal of Experimental Zoology**, v.284, n.6, p.696-704. 1999.
- ANUALPEC (**Anuário da Pecuária Brasileira**). Informa Economics – FNP, 18^a ed, São Paulo, 2011.
- ASBIA (**Associação Brasileira de Inseminação Artificial**). Disponível em: <www.asbia.org.br>. Acesso em: <10 de maio de 2014>.
- BALHORN, R. Sperm Chromatin: an overview. In: ZINI, A. & AGARWAL, A. **Sperm Chromatin: Biological and Clinical Applications in Male Infertility and Assisted Reproduction**. 1^a ed., USA, Springer, 2011. Cap. 1, p. 3-18.
- BELETTI, M. E.; COSTA, L. F. A systematic approach to multi-species sperm morphometrical characterization. **Analytical & Quantitative Cytology & Histology**, v. 25, n. 2, p. 97-107, 2003.
- BELETTI, M. E.; COSTA, L. F.; GUARDIEIRO, M. M. Morphometric features and chromatin condensation abnormalities evaluated by toluidine blue staining in bull spermatozoa. **Brazilian Journal of Morphological Science**, v. 22, n. 2, p. 85-90, 2005.
- BELETTI, M. E.; COSTA, L. F.; VIANA, M. P. A computational approach to the characterization of bovine sperm chromatin alterations. **Biotechnic & Histochemistry**, v. 79, n. 1, p. 17-23, 2004.
- _____. A comparison of morphometric characteristics of sperm from fertile *Bos taurus* and *Bos indicus* bulls in Brazil. **Animal Reproduction Science**, v. 85, n. 1-2, p. 105-116, 2005.
- BELETTI, M. E.; MELLO, M. L. S. Comparison between the toluidine blue stain and the Feulgen reaction for evaluation of rabbit sperm chromatin condensation and their relationship with sperm morphology. **Theriogenology**. v. 62, p. 398-402, 2004.
- BENCHAI, M.; BRAUN, V.; LORNAGE, J.; HADJ, S.; SALLE, B.; LEJEUNE, H.; GUERIN, J. F. Sperm DNA fragmentation decreases pregnancy rate in an assisted reproductive technique. **Human Reproduction**, v.18, n. 5, p. 1023-1028, 2003.
- BIANCHI, P. G.; MANICARDI, G. C.; URNER, F. Chromatin package: Relationship with sperm morphology, sperm-zona pellucida binding. **Molecular Human Reproduction**, v. 2, p. 139–144, 1996.
- 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, p. 127-132, 1998.

BLÄSSE, A. K.; OLDENHOF, H.; EKHLASI-HUNDRIESER M.; WOLKERS, W. F.; SIEME, H.; BOLLWEIN, H. Osmotic tolerance and intracellular ion concentrations of bovine sperm are affected by cryopreservation. **Theriogenology**, v. 78, p. 1312-1320, 2012.

BOERSMA, A. BRAUN, J. Computer-assisted analysis of sperm morphology in veterinary medicine. **Berliner und Munchener Tierarztliche Wochenschrift**, v. 112, n. 3, p. 81-85, 1999.

BREWER, L.; CORZETT, M.; BALHORN, R. Condensation of DNA by spermatid basic nuclear proteins. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, p. 38895-38900, 2002

BRITO, L. F. C.; SILVA, A. E. D. F; RODRIGUES, L. H.; VIEIRA, F. V.; DERAGON, L. A. G; KASTELIC, J. P. Effect of age and genetic group on characteristics of the scrotum, testes and testicular vascular cones, and on sperm production and semen quality in AI bulls in Brazil. **Theriogenology**, v. 58, p. 1175-1186, 2002.

CAMPOS, M. N. G. **Compactação da cromatina e morfometria de espermatozoides bovinos selecionados e capacitados**. Uberlândia: Universidade Federal de Uberlândia, 2010, 55p. Dissertação de mestrado, Pós-graduação em Ciências Veterinárias – Produção Animal, Uberlândia, setembro 2010.

CARREIRA, J. T. **Qualidade espermática e danos de DNA em espermatozoides criopreservados de touros Nelore jovens, adultos e senis**. Jaboticabal: Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, 2011, 59p. Tese de Doutorado, Pós-graduação em Medicina Veterinária – Reprodução Animal, Jaboticabal, março 2012.

CASEY, P. J.; GRAVANCE, C. G.; DAVIS, R. O.; CHABOT, D. D.; LIU, I. K. M. Morphometric differences in sperm head dimensions of fertile and subfertile stallions. **Theriogenology**, v. 47, p. 575-582, 1997.

CHO, C.; JUNG-HA, H.; WILLIS, W. D.; GOULDING, E. H.; STEIN, P.; XU, Z.; SCHULTZ, R. M.;HECHT, N. B.;EDDY, E. M. Protamine 2 deficiency leads to sperm DNA damage and embryo death in mice. **Biology of Reproduction**, v.69, n.1, p.211-217. 2003.

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

DADOUNE, J. P. Expression of mammalian spermatozoal nucleoproteins. **Microscopy Research and Technique**, v. 61, p. 56–75, 2003.

DODE, M. Avanços na maturação ovocitária em bovinos. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 4, p. 115-130, 2006.

DONNELLY, E.T.; O'CONNELL, M.; MCCLURE, N.; LEWIS, S.E. Differences in nuclear DNA fragmentation and mitochondrial integrity of semen and prepared human spermatozoa. **Human Reproduction**, v. 15, p. 1552-1561, 2000.

EDDY, E. M.; O'BRIEN, D. A. The spermatozoon. In: KNOBIL, E.; NEILL, J. D. **The Physiology of Reproduction**. v. 1. New York: Raven Press, 1994, p. 29-77.

ELLINGTON, J. E.; EVENSON, D. P.; FLEMING, J. E.; BRISBOIS, R. S.; HISS, G. A.; BRODER, S. J.; WRIGHT, R. W. Coculture of human sperm with bovine oviduct epithelial cells decreases sperm chromatin structural changes seen during culture in media alone. **Fertility and Sterility**, v. 69, n. 4, p. 643-649, 1998.

ENCISO, M.; CISALE, H.; JOHNSTON, S. D.; SARASA, J.; FERNÁNDEZ, J. L.; GONSÁLVEZ, J. Major morphological abnormalities in the Bull are related to sperm DNA damage. **Theriogenology**, v. 26, p. 23-32, 2011.

ERENPREISS, J.; SPANO, M.; EREMPREISA, J.; BUNGUM, M.; GIWEREMAN, A. Sperm chromatin structure and male fertility: biological and clinical aspects. **Asian Journal of Andrology**, v.8, p. 11-29, 2006.

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

EVENSON, D.P. Loss of livestock breeding efficiency due to uncompensable sperm nuclear defects. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 11, p. 1-15, 1999.

FATEHI, A. N.; BEVERS, M. M.; SCHOEVERS, E.; ROELEN, B. A. J.; 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, p. 176-188, 2006.

FERRARI, M. R.; SPIRITO, S. E.; GIULIANO, S. M.; FERNÁNDEZ, H. A. Chromatin cytophotometric analysis of abnormal bovine spermatozoa. **Andrologia**, v. 30, p. 85-89, 1998.

FONSECA, V.O.; CHOW, L.A.; ABREU, J.J. et al. Alguns aspectos físicos e morfológicos de sêmen de touros púberes da raça Nelore. **Arquivo da Escola de Veterinária da UFMG**, v.27, p.269-75, 1975.

FORTES, M.R.S; HOLROYD, R. G; REVERTER, A; VENUS, B.K; SATAKE, N; BOEHANSEN, G. B. The integrity of sperm chromatin in young tropical composite bulls. **Theriogenology**. v. 78, 326-333, 2012.

GARCÍA-HERREROS, M.; LEAL, C. L. V. Sperm morphometry: a tool for detecting biophysical changes associated with viability in cryopreserved bovine spermatozoa. **Andrologia**, v. 20, p. 1-3, 2013.

FRENEAU, G. E., VALE FILHO, V. R; MARQUES JR., A. P.; MARIA, W. S. Puberdade em touros Nelore criados em pasto no Brasil: características corporais testiculares e seminais e de índice de capacidade andrológica por pontos. **Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia** v.58, p.1107-1115, 2006.

GARCÍA-MACÍAS, V.; PAZ, P.; MARTINEZ-PASTOR, F.; ALVAREZ, M.; GOMES-ALVES, S.; BERNARDO, J.; ANEL, E.; ANEL, L. DNA fragmentation assessment by flow cytometry and Sperm-Bos-Halomax (bright-field microscopy and fluorescence microscopy) in bull semen. **International Journal of Andrology**, v. 30, p. 88-98, 2007.

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

GENESCA, A.; CABALLÍN, M. R.; MIRÓ, R.; BENET, J.; GERMÀ, J. R.; EGOZCUE, J. Repair of human spermchromosome aberrations in the hamster egg. **Human Genetics**, v. 89, p. 181–186, 1992.

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

GOGOL, P.; BOCHENEK, M.; SMORAG, Z. Effect of rabbit age on sperm chromatin structure. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 37, p. 92-95, 2002.

GONZALEZ, R. A. F. **Efeito da criopreservação utilizando diferentes técnicas de congelação e crioprotetores sobre parâmetros espermáticos e integridade de membranas do espermatozóide bovino.** Tese de doutorado. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - Universidade de São Paulo. Pirassununga. 2004. 94p.

GORDON, I. Laboratory Production of Cattle Embryos. In: GORDON, I. (eds). Oxon: CABI Publishing: 2003, 548p.

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, p. 704-709, 1998.

HAFEZ, B.; HAFEZ, E. S. E. Reproduction in Farm Animals. Lippincott, Philadelphia, Williams & Wilkins, 2000.

HIRAI, M.; BOERSMA, A.; HOEFELICH, A.; WOLF, E.; FÖLL, J.; AUMÜLLER, R.; BRAUN, J. Objectively measured sperm motility and sperm head morphometry in Boars (*Sus scrofa*): Relation to fertility and seminal plasma growth factors. **Journal of Andrology**, v. 22, n. 1, 2001.

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, p.60–66, 2000.

JI, B. T.; SHU, X. O.; LINET, M. S.; ZHENG, W.; WACHOLDER, S.; GAO, Y. T.; YING, D. M.; JIN, F. Paternal cigarette smoking and the risk of childhood cancer among offspring of nonsmoking mothers. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 89, n. 3, p. 238–244, 1997.

KATZ, D. F.; OVERSTREET, J. W.; SAMUELS, S. J.; NISWANDER, P. W.; BLOOM, T. D.; LEWIS, E. L. Morphometric analysis of spermatozoa in the assessment of human male fertility. **Journal of Andrology**, v. 7, p. 203–210, 1986.

KELSO, K. A.; REDPATH, A.; NOBLE, R. C.; SPEAKE, B. K. Lipid and antioxidant changes in spermatozoa and seminal plasma throughout the reproductive period of bulls. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 109, p. 1-6, 1997.

LUNSTRA, D.D.; ECHTERNKAMP, S.A. Puberty in beef bulls: acrossome morphology and semen quality in bulls of different breeds. **Journal of Animal Science**, v.55, p.638-648, 1982.

MATSUDA, Y.; SEKI, N.; UTSUGI-TAKEUCHI, T.; TOBARI, I. X-ray- and mitomycin C (MMC)-induced chromosome aberrations in spermiogenic germ cells and the repair capacity of mouse eggs for the X-ray and MMC damage. **Mutation Research**, v. 211, p. 65-75, 1989.

MELLO, M. L. Induced metachromasia in bull spermatozoa. *Histochemistry*, Smithville, v. 74, n. 3, p. 387-392, 1982.

MUKAI, C.; OKUNO, M. Glycolysis plays a major role for adenosine triphosphate supplementation in mouse sperm flagellar movement. **Biology of Reproduction**, v. 71, p. 540–547, 2004.

OKO, R.; CLERMONT, Y. Mammalian spermatozoa: structure and assembly of the tail. In: **Controls of Sperm Motility: Biological and Clinical Aspects**. Boca Raton, FL: Gagnon, 1990, p. 3-28.

OLIVA, R.; CASTILLO, J. Sperm Nucleoproteins. In: ZINI, A.; AGARWAL, A. **Sperm Chromatin: Biological and Clinical Applications in Male Infertility and Assisted Reproduction**. 1^a ed., USA, Springer, 2011. Cap. 3, p. 45-60.

OLIVEIRA, L. Z.; SANTOS, R. M.; LIMA, V. F. M. H.; ARRUDA, R. P.; ANDRADE, A. F. C.; GUIMARÃES JUNIOR, V.; BELETTI, M. E. Chromatin and morphometry alterations of bovine sperm head after Percolltm density gradient centrifugation. **Livestock Science**, v. 141, p. 267-271, 2011.

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

PARRISH, J. J.; SCHINDLER, J.; WILLENBURG, K.; ENWALL, L. Quantitative sperm shape analysis: what can this tell us about male fertility. **Proceedings of the 24th Technical Conference on Artificial Insemination & Reproduction**, p. 74-80, 2012.

PRIMAKOFF, P.; MYLES, D. G. Penetration, Adhesion, and Fusion in Mammalian Sperm-Egg Interaction. **Science**, v.296, n.5576, p.2183-2185. 2002.

RAHMAN, M. B.; VANDAELE, L.; RIJSSELAERE, T.; MAES, D.; HOOGEWIJS, M.; FRIJTERS, A.; NOORDMAN, J.; GRANADOS, A.; DERNELLE, E.; SHAMSUDDIN, M.; PARRISH, J. J.; SOOM, A.V. 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.

REVAY, T.; NAGY, S.; KOPP, C.; FLYCKT, A.; RENS, W.; RATH, D.; HIDAS, A.; KOVACS, A.; JOHANNISSON, A.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H.; ANDERSSON, M. Macrocephaly in bull spermatozoa is associated with nuclear vacuoles, diploidy and alteration of chromatin condensation. **Cytogenetic and Genome Research**, v. 196, p. 202-209, 2009.

ROCHA-FRIGONI, N. A. S.; LEÃO, B. C. S.; NOGUEIRA, E.; ACCORSI, M. F.; MINGOTI, G. Z. Effects of gaseous atmosphere and antioxidants on the development and cryotolerance of bovine embryos at different periods of in vitro culture. **Zygote**, p. 1-10, 2013.

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

RUBIO-GUILLÉN, J.; GONZÁLEZ, D.; GARDE, J. J.; ESTESO, M. C.; FERNÁNDEZ-SANTOS, M. R.; RODRÍGUEZ-GIL, J. E.; MADRID-BURY, N.; QUINTERO-MORENO, A. Effects of Cryopreservation on Bull Spermatozoa Distribution in Morphometrically Distinct Subpopulations. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 42, p. 354-357, 2007.

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

SANTOS, J. E. P.; THATCHER, W. W.; CHEBEL, R. C.; CERRI, R. L. A.; GALVÃO, K. N. The effect of embryonic death rates in cattle on the efficacy of estrous synchronization programs. **Animal Reproduction Science**, v. 82-83, p. 513-535, 2004.

SARTORI, R. Fertilização e morte embrionária em bovinos. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 32, p. 35-50, 2004.

SASSONI-CORSI, P. Unique chromatin remodeling and transcriptional regulation in spermatogenesis. **Science**, v. 296, p. 2176-2178, 2002.

SEKONI, V. O.; GUSTAFSSON, B. K. Seasonal variations in the incidence of sperm morphological abnormalities in dairy bulls regularly used for artificial insemination. **Brazilian Veterinary Journal**, v. 143, n. 4, p. 312-317, 1987.

SHARMA, R.; AGARWAL, A. Spermatogenesis: an overview. In: ZINI, A.; AGARWAL, A. **Sperm Chromatin: Biological and Clinical Applications in Male Infertility and Assisted Reproduction**. 1^a ed., USA, Springer, 2011. Cap. 2, p. 19-44.

SILVA, R. T.; MENDES JÚNIOR, J. O. B.; BELETTI, M. E. Compactação da cromatina e morfometria da cabeça de espermatozoides na produção de embriões *in vitro* utilizando touros zebuínos. **Acta Scientiarum Animal Sciences**, v. 30, n. 4, p. 473-478, 2008.

SILVEIRA, T. S.; SIQUEIRA, J. B.; GUIMARÃES, S. E. F.; PAULA, T. A. R.; NETO, T. M.; GUIMARÃES, J. D. Maturação sexual e parâmetros reprodutivos em touros da raça Nelore criados em sistema extensivo. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 39, n. 3, p. 503-511, 2010.

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 satining in bovine sperm cells for detection of protamine deficiency. **Biotechnic and Histochemistry**, v. 84, p. 73-79, 2009.

SINGLETON, S.; ZALENSKY, A.; DONCEL, G. F.; MORSHEDI, M.; ZALENSKAYA, I. A. Testis/sperm-specific histone 2B in the sperm of donors and subfertile patients: variability and relation to chromatin packaging. **Human Reproduction**, v. 22, p. 743-750, 2007.

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

SOARES, J. M.; BELETTI, M. E. Avaliação da integridade cromatínica de espermatozoides de galos (*Gallusgallus*, Linnaeus, 1758) de linhagem pesada de duas idades. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 42, n. 4, p. 543-553, 2006.

SUN, J. G.; JURISICOVA, A.; CASPER, R.F. Detection of deoxyribonucleic acid fragmentation in human sperm: Correlation with fertilization in vitro. **Biology of Reproduction**, v. 56, p. 602–607, 1997.

SUTOVSKY, P.; MANANDHAR, G. Mammalian spermatogenesis and sperm structure: anatomical and compartmental analysis. In: DE JONGE, C. J.; BARRATT, C. L. R. **The Sperm Cell: Production, Maturation, Fertilization, Regeneration**. New York: Cambridge University Press, 2006, cap. 1, p. 1-30.

TAVALAEE, M.; KIANI, A.; ARBABIAN, M.; DEEMEH, M. R.; ESFAHANI, MOHAMMAD, H. N. Flow Cytometry: A New Approach for Indirect Assessment of Sperm Protamine Deficiency. **International Journal of Fertility and Sterility**, v. 3, p. 177-184, 2010.

THUNDATHIL, J.; PALASZ, A.T.; BARTH, A.D.; MAPLETOFT, R.J. The use of in vitro fertilization techniques to investigate the fertilizing ability of bovine sperm with proximal cytoplasmic droplets. **Journal of Animal Reproduction Science**. v. 65, p. 181–192, 2001.

TWIGG, J. P.; IRVINE, D. S.; AITKEN, R. J. Oxidative damage to DNA in human spermatozoa does not preclude pronucleus formation at intracytoplasmic sperm injection. **Human Reproduction**, v. 13, n. 7, p. 1864-1871, 1998.

VAN DER SCHANS, G. P.; HARING, R.; VAN DIJK-KNIJNENBURG, H. C.; BRUIJNZEEL, P. L.; DEN DAAS, N. H. An immunochemical assay to detect DNA damage in bovine sperm. **Journal of Andrology**, v. 21, p. 250-257, 2000.

VARAGO, F. C.; MENDONÇA, L. F.; LAGARES, M. A. Produção *in vitro* de embriões bovinos: estado da arte e perspectiva de uma técnica em constante evolução. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v.32, n.2, p.100-109, 2008.

VICENTE-FIEL, S.; PALACÍN, I.; SANTOLARIA, P.; FANTOVAN, E.; WUINTÍN-CASORRÁN, F. J.; SEVILLA-MURC, E.; YÁÑIZ, J. L. In vitro assessment of sperm quality from rams of high and low field fertility. **Animal Reproduction Science**, v. 146, p. 15-20, 2014.

VICENTE-FIEL, S.; PALACÍN, I.; SANTOLARIA, P.; YÁÑIZ, J. L. A comparative study of sperm morphometric subpopulations in cattle, goat, sheep and pigs using a computer-assisted fluorescence method (CASMA-F). **Animal Reproduction Science**, v. 139, p. 182-189, 2013.

WALTERS, A.H.; EYESTONE, W.E.; SAACKE, R.G.; PEARSON, R.E.; GWAZDAUSKAS, F.C. Bovine embryo development after IVF with spermatozoa having abnormal morphology. **Theriogenology**, v.63, p.1925–1937, 2005.

WARD, W. S.; COFFEY, D. S. DNA Packaging and Organization in mammalian spermatozoa: Comparison with somatic cells. **Biology of Reproduction**, v. 44, p. 569-574, 1991.

WESTHOFF, D.; KAMP, G. Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase is bound to the fibrous sheath of mammalian spermatozoa. **Journal of Cell Science**, v. 110, p. 1821-1829, 1997.

YANAMAGIMASHI, R. Mammalian fertilization. In: KNOBIL, E.; NEILL, J. **The physiology of reproduction**, New York, Raven Press, 1994, p. 189-317.

YANG, H. W.; HWANG, K. J.; KWON, H. C.; KIM, H. S.; CHOI, K. W.; OH, K. S. Detection of reactive oxygen species (ROS) and apoptosis in human fragmented embryos. **Human Reproduction**, v. 13, n. 4, p. 998-1002, 1998.

ZINI, A.; AGARWAL, A. **Sperm chromatin: Biological and Clinical Applications in Male Infertility and Assisted Reproduction**. London: Springer Science, 2011. 535p.

ZINI, A.; JAMAL, W.; COWANS, L.; HATHAL, N. A. Is sperm DNA damage associated with IVF embryo quality? A systematic review. **Journal of Assisted Reproduction Genetics**, v. 28, p. 391-397, 2011.

ZUBKOVA, E. V.; WADE, M.; ROBAIRE, B. Changes in spermatozoa chromatin packaging and susceptibility to oxidative challenge during aging. **Fertility and Sterility**, v.84, n.2, p.1191-1198, 2005.