

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA**  
**FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA**

**CORRELAÇÃO DA MORFOMETRIA E DA  
COMPACTAÇÃO DA CROMATINA DE  
ESPERMATOZÓIDES DE TOURO ZEBUÍNO SOBRE  
A TAXA DE CLIVAGEM E FORMAÇÃO DE  
BLASTOCISTOS EM PROGRAMAS DE PRODUÇÃO  
"IN VITRO"**

**Ricardo Tomaz da Silva**  
Médico Veterinário

UBERLÂNDIA - MINAS GERAIS - BRASIL  
2006

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA**  
**FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA**

**CORRELAÇÃO DA MORFOMETRIA E DA  
COMPACTAÇÃO DA CROMATINA DE  
ESPERMATOZÓIDES DE TOURO ZEBUÍNO SOBRE  
A TAXA DE CLIVAGEM E FORMAÇÃO DE  
BLASTOCISTOS EM PROGRAMAS DE PRODUÇÃO  
"IN VITRO"**

Ricardo Tomaz da Silva

**Orientador: Prof. Dr. Marcelo Emílio Beletti**

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

UBERLÂNDIA - MG  
dezembro de 2006

## DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a meus pais João e Lueide, por terem me ensinado o valor de cada passo trilhado; à minha esposa, Daniela, por sua compreensão, carinho e doação a todo instante e, principalmente, pelo presente maior, meu filho, João Gabriel.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a DEUS, por ter permitido que chegássemos aos nossos objetivos.

Agradeço, de forma especial, meu orientador Prof. Dr. Marcelo Emílio Beletti, por ter acreditado e ter feito tudo acontecer.

A Diogo Bicca Ardais e José Olavo Borges Mendes Júnior, por fornecerem os dados e informações que permitiram a construção deste material.

Agradeço a meus familiares, que prestaram inestimável e inesquecível apoio moral durante mais esta caminhada.

E a todos aqueles que contribuíram direta ou indiretamente para que este trabalho fosse concluído.

## SUMÁRIO

<b>Seções</b>	<b>Páginas</b>
<b>RESUMO.....</b>	<b>6</b>
<b>SUMMARY.....</b>	<b>7</b>
<b>I. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>8</b>
<b>II. REVISÃO DA LITERATURA.....</b>	<b>10</b>
<b>III. MATERIAL E MÉTODO.....</b>	<b>17</b>
<b>IV. RESULTADOS.....</b>	<b>20</b>
<b>V. DISCUSSÃO.....</b>	<b>26</b>
<b>VI. CONCLUSÕES.....</b>	<b>29</b>
<b>VII. REFERÊNCIAS.....</b>	<b>30</b>

## **CORRELAÇÃO DA MORFOMETRIA E DA COMPACTAÇÃO DA CROMATINA DE ESPERMATOZÓIDES DE TOURO ZEBUÍNO SOBRE A TAXA DE CLIVAGEM E FORMAÇÃO DE BLASTOCISTOS EM PROGRAMAS DE PRODUÇÃO "IN VITRO"**

**RESUMO** – Foram utilizados os dados de 38 programações de produção “in vitro” de embriões (PIV), realizadas em dois laboratórios da cidade de Uberaba-MG-Brasil, com o objetivo de se avaliar a correlação entre compactação da cromatina e morfometria da cabeça de espermatozóides com a taxa de clivagem e formação de blastocisto utilizando sêmen de touros zebuínos com testes de rotina normais para fertilidade. Foram utilizados esfregaços de sêmen corados com Azul de Toluidina e análise de imagem por computador para avaliar a morfometria e a compactação de cromatina. Na análise morfométrica foram avaliados: área (A), perímetro (P), largura (L), comprimento (C), razão largura:comprimento (L/C), elipsidade (E), fator forma (FF), simetria lateral (SL), simetria ântero-posterior (SAP) e descritores Fourier com amplitude de 0 a 2 (F0, F1, F2). A cromatina foi avaliada quanto à intensidade de compactação e homogeneidade. Os resultados permitiram concluir que é discreta a influência de pequenas variações observadas na morfometria da cabeça e na compactação da cromatina espermática sobre a clivagem e número de blastocistos morfológicamente normais na PIV.

**Palavras-Chave:** azul de toluidina, bovino, cromatina, espermatozóides, produção “in vitro”

## RELATIONSHIP OF MORFOMETRY AND CHROMATIN CONDENSATION OF THE ZEBU BULL SPERMATOZOA ON THE CLEAVAGE AND BLASTOCYST FORMATION RATE IN PROGRAMS OF "IN VITRO" PRODUCTION

**SUMMARY** - 38 PIVs carried through in two laboratories of the Uberaba – MG-BRASIL had been used in this work with the objective to evaluate the relationship between condensation chromatin and head morphometry of spermatozoa and cleavages and blastocyst formation rates using semen of zebu bulls with normal routine tests of fertility. Smears of semen stained with of Toluidine Blue and computer image analysis had been used to evaluate the morphometry and chromatin condensation. Area (A), perimeter (P), width (L), length (C), width:length ratio (L/C), ellipticity (E), shape factor (FF), side symmetry (SL), anterior-posterior symmetry (SAP) and the three first Fourier values (F0, F1, F2) had been evaluated in the morphometric analysis. The chromatin was evaluated in relation to intensity of condensation and homogeneity. The results allowed concluding that the influence of light variations in the sperm head morphometry and the chromatin condensation on the cleavage and number of normal morfologic blastocyst in the PIV is small.

**Key-Words:** toluidine blue, bovine, chromatin, spermatozoa, "in vitro" production

## I. INTRODUÇÃO

A aplicação de biotecnologias em reprodução tais como injeção intracitoplasmática de espermatozóides (ICSI), produção “in vitro” (PIV), transferência de embriões (TE) e inseminação artificial (IA) vem sendo cada vez mais utilizadas em reprodução animal com o objetivo de aproveitar o alto potencial genético de animais de elite, produzindo maior número de descendentes durante sua vida útil melhorando os índices de aproveitamento reprodutivo em diversas espécies (MALCEUIT et al., 2006; SQUIRES, 2005; WANG et al., 2006; JIANG; TSANG, 2004; NAGAI et al., 2006; MOLNAROVA et al., 2006; MORTON et al., 2006; JELLERETTE et al., 2006; ZHENG et al., 2004; KANE, 2003).

A aplicação de biotecnologias em reprodução, visando à multiplicação do material genético de animais com alto valor zootécnico, sofre ainda com a falta de informações mais específicas quanto aos índices de fertilidade dos machos (KANE, 2003; MORTON et al., 2006).

O espermograma é o principal método de diagnóstico de fertilidade do macho utilizado na rotina veterinária. Dentre várias características espermáticas avaliadas no espermograma de rotina, estão a motilidade e morfologia dos espermatozóides. Estas análises podem não ser suficientes, uma vez que não avaliam a estrutura interna da célula espermática como, por exemplo, a cromatina (DNA e proteínas específicas), que pode indicar melhor o “status” funcional dos espermatozóides, habilidade de fecundação e desenvolvimento embrionário (BELETTI; COSTA; VIANA, 2004). As avaliações de rotina, por serem realizadas pela análise visual do examinador, possuem certo grau de subjetividade e mesmo tendenciosidade. Na tentativa de se diminuir as falhas do examinador e aumentar a repetibilidade entre examinadores tem sido proposto o uso de análise de imagem por computador para a avaliação da motilidade e morfologia dos espermatozóides (GARRETT; BAKER, 1995, BELETTI; COSTA, 2003; BELETTI; COSTA; GUARDIEIRO, 2005; BELETTI; COSTA; VIANA, 2005a, 2005b).

Hoje existem programas de computador que avaliam a motilidade com precisão, sendo muito superiores à estimativa visual realizada pelo examinador nas técnicas de rotina (VERSTEGEN; IGUER-OUADA; ONCLIN, 2002). O grupo de pesquisa "Cybernetic Vision" do Instituto de Física de São Carlos - USP em



colaboração com o grupo Análise de Imagem Biológica do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade Federal de Uberlândia (UFU) criaram programas em ambiente "Scilab", para análise morfológica de espermatozóides, independente da espécie (BELETTI; COSTA, 2003; BELETTI; COSTA; VIANA, 2004; BELETTI; COSTA; GUARDIEIRO, 2005; BELETTI; COSTA; VIANA, 2005a, 2005b). Estes programas avaliam detalhadamente a morfologia da cabeça e a estabilidade da cromatina, utilizando esfregaços corados com azul de toluidina. Já está demonstrado que estes programas identificam alterações morfológicas e de cromatina não percebidas pela análise visual do espermograma de rotina (BELETTI; COSTA, 2003; BELETTI; COSTA; VIANA, 2004; BELETTI; COSTA; GUARDIEIRO, 2005; BELETTI; COSTA; VIANA, 2005a).

As alterações morfológicas dos espermatozóides identificadas no espermograma de rotina comprovadamente interferem na taxa de fertilização da PIV (SALLAM et al., 2003; WALTERS et al., 2004; JEDRZEJCZAK et al., 2005; KAWAI et al., 2006). Entretanto, não se sabe a verdadeira influência de pequenas alterações identificadas somente por análise de imagem computadorizada.

O objetivo deste trabalho foi verificar a correlação entre compactação da cromatina e morfometria da cabeça de espermatozóides com a taxa de clivagem e formação de blastocisto em PIV utilizando sêmen de touros zebuínos com testes de fertilidade de rotina normais.

## II. REVISÃO DA LITERATURA

A genética e a reprodução formam juntas, as bases para o sucesso no acasalamento animal e na produção. Conseqüentemente, estas são as áreas de maior pesquisa em sistemas de produção animal. No momento da fertilização, ambos os gametas, paterno e materno, contribuem morfológicamente e bioquimicamente para o desenvolvimento dos componentes nucleares e citoplasmáticos do embrião. Assim como o desenvolvimento progride, o genoma embrionário começa a ser expresso regulando o seu próprio desenvolvimento. Portanto, já está claramente estabelecido que a completa contribuição dos genes, a partir do genoma maternal e paternal, é requerida não somente pela transmissão de características como também para o desenvolvimento embrionário normal (MARSON; PREVIERO; FERRAZ, 2003).

Várias são as técnicas utilizadas visando à multiplicação do material genético de animais com alto valor zootécnico, tais como injeção intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI), produção “in vitro” (PIV), transferência de embriões (TE), inseminação artificial (IA) (MALCEUIT et al., 2006; SQUIRES, 2005; WANG et al., 2006; JIANG; TSANG, 2004; NAGAI et al., 2006; MOLNAROVA et al., 2006; MORTON et al., 2006; JELLERETTE et al., 2006; ZHENG et al., 2004; KANE, 2003).

Há mais de um século, foi observada pela primeira vez, a fecundação de um óvulo de ouriço do mar com a posterior formação da primeira célula do futuro embrião. Os primeiros trabalhos experimentais em embriologia de mamíferos foram realizados com coelhos, tendo em vista suas características biológicas favoráveis, como o tamanho relativamente grande do óvulo, o que facilita a manipulação, e a ovulação induzida pelo acasalamento, fato de elevada conveniência para determinação precisa da idade dos embriões (GALUPPO, 2005).

Chang (1959) foi o primeiro a relatar o nascimento de um mamífero (coelho) gerado a partir da PIV. Em 1968 Whittingham obteve sucesso trabalhando com camundongos e, alguns anos mais tarde Toyoda e Chang (1974) estabeleceram a PIV para ratos. Em 1978 Steptoe e Edwards conseguiram gerar o primeiro “bebê de proveta”, que na realidade foi a primeira PIV em humano. Serbian, Scanlon e Gordon (1968) foram os primeiros a publicarem a realização de FIV em bovinos, no entanto, Brackett et al. (1982) foram os primeiros a descreverem o nascimento de um bezerro

sadio produzido por PIV. A partir de então, a PIV de bovinos recebeu grande impulso por ter sido verificado que poderia ser integralmente viabilizada sob condições artificiais. Além de poder ser fonte de embriões para pesquisas básicas de biologia e fisiologia do desenvolvimento, a produção *in vitro* de embriões possui bom potencial para a aplicação no melhoramento genético de rebanhos, bem como na produção de clones e animais transgênicos (BERNARDI, 2005).

Por todo o potencial de aplicação que a FIV representa para as espécies, humana e animal, como pela sua expressividade tanto para a ciência básica quanto para a aplicada, vem sendo muito difundida e utilizada em diversos países, inclusive de forma destacada no Brasil, a partir da década de 90. Atualmente o Brasil possui o maior rebanho bovino comercial do mundo, com mais de 190 milhões de animais, e apresenta-se em posição de destaque na produção mundial de embriões, particularmente pela expansão no uso da produção *in vitro* em bovinos (GALUPPO, 2005).

A produção *in vitro* (PIV) de embriões envolve a obtenção dos ovócitos, maturação (MIV) e fecundação ou fertilização (FIV) dos ovócitos, bem como o cultivo de zigotos e embriões (GORDON, 1994).

Em bovinos, a punção de folículos ovarianos (imaturos) tem sido utilizada na recuperação de ovócitos destinados a produção de embriões *in vitro*. Na área da pesquisa, objetivando a redução de custos e disponibilidade de material, os ovócitos são obtidos por aspiração folicular direta de ovários oriundos de abatedouro (GALUPPO, 2005).

A maturação do ovócito envolve transformação nuclear e citoplasmática, estando ligada a uma série de mudanças estruturais e bioquímicas, tornando o gameta feminino apto a ser fecundado e a ter desenvolvimento embrionário subsequente. *In vivo* esse processo inicia-se com o pico pré-ovulatório de hormônio luteinizante (LH) durante o estro, *in vitro* a simples retirada do ovócito do folículo desencadeia a quebra da vesícula germinativa. A maturação do ovócito bovino engloba a progressão do estágio de diplóteno da primeira prófase meiótica até a fase de metáfase II (GONÇALVES et al., 2002). Concomitante à maturação nuclear, ocorre à maturação citoplasmática essencial à fecundação monospérmica e subsequente desenvolvimento embrionário (GORDON, 1994).

Após a maturação dos ovócitos e a separação dos espermatozóides viáveis, por gradiente de percoll (VINCENT; NADEAU, 1984), deve se proporcionar ambiente

adequado para que ocorra a capacitação espermática e a fecundação. A concentração espermática e o tempo de fecundação são fatores importantes para o sucesso da biotecnologia sendo a melhor concentração  $1 \times 10^6$  /ml de espermatozóides e o tempo ideal para o co-cultivo sêmen-ovócito é de 18 horas (CAMARGO et al., 2002). Após, inicia-se o cultivo dos zigotos, considerado o Dia 0 o dia da fecundação. Após a formação do zigoto começa o desenvolvimento de um organismo multicelular com outro potencial genético, que irá passar por várias divisões mitóticas, por meio das quais o zigoto irá atingir o estágio de blastocisto. O período para se atingir o estágio de blastocisto na espécie bovina é de 7 dias (GONÇALVES et al., 2002).

A capacitação espermática é necessária para que haja a fecundação. *In vivo* a passagem do espermatozóide pelo trato genital feminino, desencadeia a capacitação espermática. *In vitro* precisa ser induzida por agentes capacitores, desencadeando alterações bioquímicas da membrana plasmática dos espermatozóides e propiciando condições para que ocorra reação acrossomal, assim como *in vivo*. (YANAMAGIMASHI, 1994). Em bovinos o agente capacitor mais empregado é a heparina, na concentração de  $100 \mu\text{g}/\text{ml}$  (ASSUMPÇÃO et al., 1999).

Sêmen de boa qualidade é essencial para o sucesso da FIV, sendo realizadas muitas vezes a separação dos espermatozóides viáveis por gradiente de Percoll. A avaliação do sêmen a ser utilizado em FIV segue os mesmos padrões do espermograma de rotina (VINCENT; NADEAU, 1984) e geralmente não se avalia a integridade cromatínica.

A condensação do material nuclear da célula representa um importante evento para núcleos espermáticos durante a espermatogênese. Em mamíferos, o DNA é compactado pela substituição de histonas nucleares, que são proteínas nucleares básicas, por protaminas específicas de espermatozóides, que possuem características mais básicas e são ricas em arginina e cisteína oxidada. O DNA compactado tem forma de “donut”, preso aos anéis de cromatina pelas pontes dissulfeto, formadas pela oxidação de grupos sulfidril presentes nas protaminas (WARD; COFFEY, 1991). A maioria dos mamíferos possui dois tipos de protaminas (P1/P2), porém, o espermatozóide de touro tem somente um tipo (GAGNON, 1999).

Estudos mostram que alterações na proporção relativa das protaminas 1 e 2 em espermatozóides humanos podem influenciar na condensação da cromatina espermática, refletindo na fertilidade (GAGNON, 1999). Apesar de possuir somente

um tipo de protamina, anormalidades na condensação da cromatina espermática podem ser encontradas em touros. A baixa condensação da cromatina espermática pode levar à defeitos no DNA. Esta susceptibilidade pode ser correlacionada à presença de fitas de DNA quebradiças, que podem ser devidos em parte, ao estresse oxidativo e, possivelmente, ao mecanismo apoptótico. Alguns espermatozoides com anormalidades na cromatina podem fecundar ovócitos *in vivo* e *in vitro*, porém o defeito no DNA pode persistir durante todo o período embrionário, induzindo a apoptose, desestruturação embrionária e ao aborto (ELLINGTON et al., 1998; TWIGG; IRVINE; AITKEN, 1998).

Gledhill (1966) identificou pela primeira vez espermatozoides com complexo DNA-proteína anômalo em touros subférteis pela reação de Feulgen. Inicialmente, coloração mais intensa nas cabeças destes espermatozoides foi associada à alta densidade do DNA. Entretanto, o uso do microscópio de ultravioleta indicou que as variações de intensidade observadas na reação de Feulgen são de fato, conseqüências da alteração da cinética hidrolítica do DNA. Este fenômeno, em geral, é causado por alterações no complexo DNA-protamina, que fazem a cromatina ficar menos compactada e mais sensível à hidrólise.

Grande número de metodologias para identificação de alterações na estabilidade da cromatina espermática são pesquisados. Um dos mais usados é a análise da estrutura da cromatina (SCSA), baseado na avaliação da fluorescência de espermatozoides corados com alaranjado de acridina, através de citômetro de fluxo (ALVAREZ et al., 2002; BOCHENEK; SMORAG; PILCH, 2001; EVENSON; DARZYNKIEWICZ; MELAMED, 1980; OSTERMEIER et al., 2001a). Na maioria dos casos, estes trabalhos usaram SCSA para avaliação da cromatina, não permitindo uma avaliação concomitante da cromatina e da morfologia do espermatozoide, já que a cromatina foi avaliada por citômetro de fluxo e a morfologia foi avaliada em esfregaço de sêmen.

Mello (1982) desenvolveu um método para avaliação da cromatina, através do uso do azul de toluidina, um corante catiônico que exhibe fenômeno metacromático, isto é, a alteração na cor é induzida pela ressonância de elétrons entre as moléculas do corante. A ligação de moléculas do corante azul de toluidina (pH 4,0) aos grupos fosfatos ionizados do DNA é importante para avaliação de alterações na cromatina espermática. O pH 4,0 garante que outros sítios (ânions) não sejam ionizados. Os espermatozoides normais se coram em verde, mas aqueles com anomalias no

complexo DNA-proteína se coram em violeta. Isto se deve, ao fato de que, em cromatina normal de espermatozóides, a maioria dos grupos fosfatos está bloqueada por protaminas, e conseqüentemente, poucas moléculas do corante se ligam ao DNA, resultando em uma coloração de verde a azul claro. Já para aqueles espermatozóides com cromatina pouco compactada, haveria mais ligações com as moléculas do corante, resultando numa coloração de azul escuro a magenta. Porém, somente um alto grau de alteração cromatínica seria identificado por este método.

A sensibilidade deste processo pode ser aumentada pela hidrólise antes da coloração, ou seja, de acordo com o seguinte protocolo: tratamento ácido (HCl 4 N a 25°C, 15 a 20 min.) seguido de coloração com azul de toluidina (pH 4,0), então, espermatozóides normais, que são caracterizados por cromatina altamente compactada, seriam pouco afetados pela hidrólise e conseqüentemente, coram-se em azul claro. Por outro lado, cromatina espermática com baixo grau de alterações poderia ter as protaminas parcialmente extraídas, promovendo assim ligações das moléculas do corante com os grupos fosfatos do DNA.

A análise computacional da morfologia espermática geralmente considera mensurações básicas como área, perímetro, comprimento, largura, bem como fatores derivados destas medidas, tal como: razão largura: comprimento, elipsidade, fator forma e outros (GARRETT; BAKER, 1995). Em adição a estas mensurações básicas, descritores Fourier também são usados (OSTERMEIER et al., 2001a; 2001b).

Outra aplicação para análise de imagem é a caracterização da cromatina de espermatozóides, corada com azul de toluidina, que vem sendo concomitantemente usada com a análise morfométrica. Estudos (FERRARI et al., 1998; OSTERMEIER et al., 2001a; SAILER; JOST; EVENSON, 1996) descreveram uma correlação significativa entre anomalias cromatínicas e alterações morfológicas. Entretanto, a maioria destes trabalhos usou SCSA para avaliar cromatina, e predizendo uma respectiva avaliação morfológica. Ferrari *et al.* (1998) usaram análise visual para avaliar a morfologia e citometria de esfregaços tratados com reação de Feulgen para avaliar a cromatina, e identificaram correlações entre pescoço estreito e cabeças em forma de pêra com alterações cromatínicas, mas correlações similares não foram observadas para outras alterações morfológicas.

O primeiro parâmetro seminal estudado por análise de imagem foi a motilidade (DOTT, 1975; JECHT; RUSSO, 1973). Hoje, existem programas de

computador que avaliam a motilidade com precisão, sendo muito superior a estimativa visual realizada pelo examinador nas técnicas de rotina (VERSTEGEN; IGUER-OUADA; ONCLIN, 2002). Estes programas permitem análises mais completas, muito além do que a determinação da porcentagem de espermatozóides viáveis. O “CASA” (Computer-Aided Semen Analysis) permite a avaliação da concentração, porcentagem de espermatozóides móveis, velocidade curvilínea, velocidade linear, velocidade média, amplitude do deslocamento lateral da cabeça, etc (WIJCHMAN et al., 2001).

Ao contrário da motilidade, as morfologias, normal e anômala, dos espermatozóides, variam e, portanto, se faz necessário uma padronização da técnica para cada espécie. A maioria das técnicas até agora padronizadas para determinar alterações morfológicas de espermatozóides são restritas à análise morfométrica da cabeça de espermatozóides humanos, sendo mensuradas apenas a área, perímetro, comprimento, largura e razão largura/altura (JAGOE; WASHBROOK; HUDSON, 1986; KATZ et al., 1986; SCHRADER; TURNER; SIMON, 1990; DAVIS et al., 1992; MACLEOD; IRVINE, 1995). Apesar da simplicidade deste tipo de análise, Macleod e Irvine (1995) demonstraram que esta técnica é mais eficaz que a análise visual realizada pelo técnico para identificar problemas de fertilidade. Mais recentemente, a avaliação de outros parâmetros morfológicos da cabeça (GARRETT; BAKER, 1995; HARR, 1997) e até mesmo da cauda (GERGELY, 1999; STEIGERWALD; KRAUSE, 1998) estão sendo pesquisados.

Na medicina veterinária, a análise de imagem, como técnica para avaliação de sêmen, está passando por uma fase de padronização para cada espécie, tal como bovino (GRAVANCE et al., 1998a; GRAVANCE et al., 1999; SAILER; JOST; EVENSON, 1996), ovino (GRAVANCE et al., 1998b; SANCHO et al., 1998), suíno (HIRAI et al., 2001), eqüino (GRAVANCE et al., 1996; GRAVANCE et al., 1997), coelho (GRAVANCE; DAVIS, 1995), rato (HIGUCHI et al., 2001) e para macaco (GAGO et al., 1998). Porém, quase todos se restringem às mensurações básicas da cabeça do espermatozóide, ou seja, área, perímetro, altura, largura e razão largura/altura.

Os resultados até agora obtidos para bovinos (GRAVANCE et al., 1998a, 1998b; GRAVANCE et al., 1999; SAILER; JOST; EVENSON, 1996) demonstram que o uso da análise de imagem na avaliação do sêmen é promissor, principalmente nas centrais de inseminação artificial.

Recentemente, novos métodos de avaliação morfológica da cabeça dos espermatozoides vêm sendo propostos. Estes utilizam avaliações matemáticas mais elaboradas da forma da cabeça do espermatozoide e da intensidade de compactação da cromatina a partir de imagens obtidas de esfregaços de sêmen corados com azul de toluidina. Já está demonstrado que estes métodos identificam alterações morfológicas e de cromatina não percebidas pela análise visual do espermograma de rotina (BELETTI; COSTA, 2003; BELETTI; COSTA; GUARDIEIRO, 2005; BELETTI; COSTA; VIANA, 2005a, 2005b).

Vários autores já demonstraram que alterações morfológicas do sêmen diminuem a taxa de fertilização (SALLAM et al., 2003; WALTERS et al., 2004; JEDRZEJCZAK et al., 2005; KAWAI et al., 2006), porém não são conclusivos quanto à influência sobre a qualidade do embrião. Ainda mais controversa é a influência de alterações na cromatina (DNA) sobre a taxa de fertilização, taxa de clivagem, qualidade do embrião e taxa de prenhes. Alguns trabalhos demonstram que na PIV (VICENT et al., 2006; ZINI; LIBMAN, 2006) e na ICSI (LOUTRADI et al., 2006; CEBESYOY; AYDOS; UNLU, 2006; ZINI; LIBMAN, 2006) existe uma correlação negativa entre taxa de fertilização e alterações na cromatina. Outros autores não encontraram relação entre alterações de cromatina e taxa de fertilização, tanto na PIV (FATEHI et al., 2006; ZINI; LIBMAN, 2006) como na ICSI (ZINI et al., 2005; ZINI; LIBMAN, 2006). Alterações na cromatina também poderiam levar à baixas taxas de clivagem, prenhes e qualidade do embrião na PIV (BUNGUM et al., 2004; BOE-HANSEN et al., 2006; FATEHI et al., 2006; ZINI; LIBMAN, 2006) e na ICSI (BUNGUM et al., 2004; BOE-HANSEN et al., 2006; CEBESYOY; AYDOS; UNLU, 2006; ZINI; LIBMAN, 2006). Também existem autores que encontraram resultados conflitantes, sem influência das alterações de cromatina dos espermatozoides nestas taxas (ZINI et al., 2005; ZINI; LIBMAN, 2006).



### III. MATERIAL E MÉTODO

O experimento foi desenvolvido à partir de material fornecido por dois laboratórios de biotecnologia da cidade de Uberaba, aqui denominados de Laboratório 1 e Laboratório 2.

No Laboratório 1 foram estudados 20 programas de produção “*in vitro*” de embriões, avaliando-se a porcentagem de zigotos que iniciaram o processo de clivagem e a porcentagem de ovócitos que formaram blastocistos morfolologicamente normais. Em cada PIV utilizou-se no mínimo 7 e no máximo 175 ovócitos viáveis.

No Laboratório 2 foram estudadas 18 PIV, sendo avaliada apenas a porcentagem de ovócitos que formaram blastocistos morfolologicamente normais. Cada PIV utilizou no mínimo 5 e no máximo 118 ovócitos viáveis.

Os ovócitos foram colhidos pela aspiração de ovários de fêmeas bovinas de raças zebuínas. Após seleção e maturação *in vitro* dos ovócitos (ROBERTSON; NELSON, 1999), estes foram submetidos à produção (PIV).

Todas as doses de sêmen utilizadas para a produção *in vitro* eram congeladas, fornecidas por empresas idôneas, e oriundas de touros zebus possuindo espermograma considerados normais. Após o descongelamento do sêmen, foi retirada pequena alíquota para realização de esfregaço das amostras 1, 3, 5, 6, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 e 20 do laboratório 1 e em seguida o sêmen foi centrifugado em gradiente de Percoll para separação dos espermatozóides vivos e mortos. O sedimento era então ressuspensão e a concentração de espermatozóides corrigida para  $1 \times 10^6$  espermatozóides por ml do meio de fecundação. As avaliações de todas as amostras de sêmen utilizadas no Laboratório 2 e das amostras 2, 4, 7, 8, 9 e 10 utilizadas no Laboratório 1 foram realizadas em esfregaços feitos após esta etapa. Os ovócitos maturados eram lavados e mantidos em estufa com 5% de CO<sub>2</sub> em ar, 39°C e alta umidade em meio de fecundação acrescido de agentes capacitadores e espermatozóides.

No Laboratório 1, após 48 horas, os ovócitos foram avaliados para determinar quantos haviam iniciado clivagem. Após 6 a 7 dias, tanto no Laboratório 1 como no 2, verificou-se quantos dos ovócitos chegaram a formar blastocistos morfolologicamente normais.

Os esfregaços das doses de sêmen foram fixados em solução de etanol e ácido acético (3:1) por 1 minuto, seguido de um banho de etanol 70% por 3 minutos. Após secagem ao ar, os esfregaços foram hidrolisados por 25 minutos, em ácido clorídrico 4 N, lavados em água destilada e secos à temperatura ambiente. Então, foi colocada uma gota de azul de toluidina a 0,025% em tampão McIlvaine (citrato de sódio-fosfato) pH 4 e cobriu-se com lamínula (BELETTI; COSTA, 2003).

Foram obtidas 50 imagens digitais em tons de cinza de cada lâmina, usando-se microscópio Olympus BX40 com objetiva de 100x (imersão), acoplado a uma câmera Olympus OLY-200 e conectada a um microcomputador PC através de placa digitalizadora Data Translation 3153.

As imagens digitais foram usadas para segmentar (COSTA; CESAR, 2001) 100 cabeças de espermatozóides de cada lâmina. Após a segmentação das cabeças, estas foram processadas por programas desenvolvidos em ambiente SCILAB para obter a média e desvio padrão dos valores de pixel dentro das cabeças de cada imagem.

Para se ter uma referência da coloração normal da cabeça do espermatozóide, foram selecionadas visualmente 10 cabeças de espermatozóides em cada esfregaço. A média dos valores de píxel destas cabeças foi considerada como o valor de referência da coloração normal dos espermatozóides (cabeças padrões). Depois, para cada imagem, as diferenças entre os valores de média de cabeças padrões e valores de média de cada cabeça analisada foram determinadas. Esta diferença foi transformada em porcentagem (Dif%) do valor de média de cabeça padronizada. O coeficiente de variação (CV) dos níveis de cinza foi calculado.

A área (A), perímetro (P), largura (L), comprimento (C), razão largura:comprimento (L/C), elipsidade (E) e fator forma (FF) de todas as cabeças foram determinados pelo uso de programas desenvolvidos no SCILAB (BELETTI; COSTA, 2003). Descritores Fourier com amplitude de 0 a 2 (F0, F1, F2) foram também considerados para caracterização e análise da forma (BELETTI; COSTA, 2003; OSTERMEIER et al., 2001a; 2001b). A simetria da cabeça espermática também foi considerada. A simetria lateral (SL) foi medida para identificação de assimetria ao longo do eixo principal do espermatozóide, que pode implicar em alterações nas propriedades hidrodinâmicas da célula. A mensuração da simetria ântero-posterior (SAP) foi considerada para identificação de assimetrias ao longo do

segundo eixo espermático. Através desta medida é possível encontrar algumas alterações específicas como cabeça piriforme e pescoço estreito, entre outras. As simetrias consideradas foram calculadas através do procedimento descrito por Beletti e Costa (2003), que envolve “dobramento” do objeto ao longo do eixo maior (ou menor) e depois identifica a área de sobreposição entre as áreas original e dobrada (COSTA; CESAR, 2001).

Para se verificar a influência das características seminais analisadas sobre a taxa de clivagem e formação de embriões morfológicamente normais foi realizado o teste de correlação de Pearson ( $\alpha=0,05$ ).

#### IV. RESULTADOS

A média das mensurações realizadas para cada amostra de sêmen estão demonstradas nas Tabelas 1 e 2, bem como a correlação entre as características seminais analisadas e a taxa de clivagem e formação de embriões morfológicamente normais em cada laboratório pode ser vista na Tabela 3.

A Tabela 4 mostra a correlação entre características do sêmen e porcentagem de ovócitos que chegaram a blastocistos morfológicamente normais, quando o sêmen foi avaliado antes e depois da seleção com Percoll, considerando-se os resultados de ambos os laboratórios. Já a Tabela 5 mostra a correlação entre características do sêmen e a porcentagem de ovócitos que iniciaram clivagem e porcentagem de ovócitos que chegaram a blastocisto morfológicamente normal quando o sêmen foi avaliado antes e depois da seleção com Percoll, considerando somente as PIV realizadas no Laboratório 1.

Tabela 1: Média das características morfométricas da cabeça dos espermatozoides, número de ovócitos, porcentagem de ovócitos que iniciaram clivagem e porcentagem de ovócitos que chegaram a blastocisto morfologicamente normal nas PIV realizadas no Laboratório 1.

Am.	Área ( $\mu\text{m}^2$ )	Per. ( $\mu\text{m}$ )	Larg. ( $\mu\text{m}$ )	Comp ( $\mu\text{m}$ )	L/C	E	F.F.	F0	F1	F2	Sim. Lat.	Sim. A-P	Dif%	CV	Número ovócitos	% Cliv.	% Blast.
1	36,2	24,5	4,9	9,1	0,54	0,30	0,93	1687,6	272,4	149,8	0,96	0,91	2,13	13,29	105	73	12
2	34,6	23,8	4,8	8,8	0,55	0,30	0,92	1578,4	232,0	145,0	0,97	0,92	2,65	13,60	105	73	12
3	33,3	23,9	4,5	9,1	0,50	0,34	0,91	1747,1	226,5	144,7	0,96	0,92	0,91	6,94	175	38	0
4	35,3	24,4	4,7	9,3	0,51	0,33	0,91	1794,0	238,1	160,9	0,96	0,92	0,68	6,44	175	38	0
5	35,6	24,6	4,6	9,4	0,50	0,34	0,90	1841,3	169,5	152,4	0,97	0,94	2,50	8,17	119	38	0
6	32,0	23,4	4,5	8,8	0,51	0,33	0,92	1656,2	202,2	134,9	0,96	0,92	0,92	11,43	119	38	0
7	31,8	23,0	4,5	8,6	0,53	0,31	0,91	1499,0	187,1	137,5	0,96	0,93	1,10	8,00	7	57	14
8	33,9	23,6	4,8	8,8	0,55	0,30	0,93	1528,7	264,4	145,9	0,96	0,90	3,34	13,52	7	57	14
9	35,4	24,1	4,9	9,0	0,55	0,30	0,92	1584,3	236,4	162,3	0,97	0,92	0,96	16,00	103	63	17
10	34,3	23,8	4,8	8,8	0,54	0,30	0,93	1532,9	209,8	155,5	0,97	0,93	0,68	7,15	140	30	6
11	33,5	23,5	4,7	8,6	0,54	0,30	0,92	1519,1	203,3	155,8	0,97	0,93	0,90	7,44	140	30	6
12	34,6	23,5	5,1	8,5	0,60	0,25	0,95	1352,4	286,1	140,4	0,97	0,90	1,08	11,21	172	73	26
13	34,8	24,1	4,7	9,1	0,52	0,32	0,90	1709,4	231,7	156,1	0,97	0,92	1,24	8,88	172	73	26
14	34,5	23,6	5,0	8,7	0,57	0,28	0,93	1453,3	230,4	142,7	0,96	0,92	1,49	21,63	153	73	38
15	34,5	23,7	4,8	8,8	0,55	0,29	0,92	1530,5	218,3	155,1	0,97	0,92	0,80	12,01	153	73	38
16	34,5	23,4	4,9	8,5	0,58	0,27	0,92	1365,2	165,8	151,4	0,96	0,94	0,88	11,14	16	69	50
17	32,0	23,0	4,6	8,6	0,54	0,30	0,92	1492,5	202,7	122,2	0,96	0,92	0,82	13,84	90	49	9
18	34,2	23,7	4,7	8,8	0,53	0,30	0,91	1584,6	199,5	151,0	0,97	0,93	1,04	11,34	45	80	33
19	31,4	22,7	4,6	8,5	0,54	0,30	0,92	1425,2	213,2	142,2	0,96	0,92	1,50	10,74	25	92	44
20	37,8	25,1	4,8	9,6	0,50	0,33	0,89	1896,1	201,8	145,0	0,97	0,94	1,57	11,09	19	100	42

Am.: número da amostra; Per.: perímetro; Larg.: largura; Comp.: comprimento; L/C: razão largura-comprimento; E: elipsidade; F.F.: fator de forma; F0, F1 e F2: Harmônicas de Fourier zero, 1 e 2; Sim. Lat.: simetria lateral; Sim. A-P: simetria antero-posterior; Dif%: diferença percentual da média dos valores de píxel entre a cabeça testada e as cabeças padrões; CV: coeficiente de variação dos valores de píxel; % Cliv.: Porcentagem de ovócitos que iniciaram clivagem; % Blast.: porcentagem de ovócitos que formaram blastocistos morfologicamente normais

Tabela 2: Média das características morfométricas da cabeça dos espermatozoides, número de ovócitos e porcentagem de ovócitos que chegaram a blastocisto morfológicamente normal nas PIV realizadas no Laboratório 2.

<i>Am.</i>	<i>Área</i> <i>((<math>\mu\text{m}^2</math>)</i>	<i>Per.</i> <i>(<math>\mu\text{m}</math>)</i>	<i>Larg.</i> <i>(<math>\mu\text{m}</math>)</i>	<i>Comp.</i> <i>(<math>\mu\text{m}</math>)</i>	<i>L/C</i>	<i>E</i>	<i>F. F.</i>	<i>F0</i>	<i>F1</i>	<i>F2</i>	<i>Sim.</i> <i>Lat.</i>	<i>Sim.</i> <i>A-P</i>	<i>Dif%</i>	<i>CV</i>	<i>Número</i> <i>ovócitos</i>	<i>%</i> <i>Blast.</i>
1	34,22	23,6	4,8	8,7	0,55	0,29	0,92	1524.1	211.2	136.0	0.962	0.93	1.1	16.7	51	41
2	34,14	23,9	4,7	8,9	0,53	0,31	0,91	1665.5	215.1	134.9	0.967	0.92	5.1	17.6	70	26
3	34,00	23,4	4,9	8,5	0,58	0,27	0,94	1364.4	233.4	150.6	0.963	0.92	0.9	15.5	66	24
4	33,59	23,7	4,7	8,8	0,54	0,30	0,93	1600.8	266.6	141.9	0.960	0.91	1.5	16.9	32	28
5	33,99	23,5	4,7	8,8	0,54	0,30	0,91	1531.2	191.6	129.7	0.962	0.93	1.7	16.3	101	41
6	32,94	23,4	4,6	8,8	0,53	0,31	0,91	1559.1	225.1	147.7	0.963	0.92	1.4	17,0	47	40
7	33,42	23,2	4,7	8,5	0,56	0,28	0,92	1426.9	195.6	140.4	0.973	0.93	1.9	16.9	48	40
8	34,17	23,6	4,7	8,8	0,53	0,31	0,90	1564.1	175.9	145.4	0.966	0.94	0.7	9.5	67	39
9	32,90	23,4	4,7	8,8	0,53	0,30	0,92	1590.2	260.9	138.2	0.965	0.91	0.7	8.2	78	36
10	32,75	23,3	4,5	8,8	0,51	0,32	0,90	1609.6	178.3	145.9	0.964	0.94	1.5	8.4	12	25
11	30,97	22,8	4,4	8,6	0,51	0,32	0,90	1544.5	212.3	134.9	0.969	0.92	1.2	8.7	59	42
12	31,73	22,9	4,6	8,6	0,53	0,30	0,92	1521.3	267.7	142.2	0.965	0.90	1.6	8.6	98	14
13	32,73	23,4	4,6	8,8	0,53	0,31	0,91	1595.1	254.4	137.6	0.968	0.91	3.7	10.4	77	17
14	33,27	23,3	4,7	8,7	0,54	0,30	0,91	1519.3	188.8	146.6	0.964	0.93	0.9	10.8	5	60
15	30,26	23,4	4,4	8,4	0,53	0,31	0,91	1428.4	210.7	128.9	0.967	0.92	1,0	11.8	80	33
16	30,88	22,8	4,5	8,6	0,53	0,31	0,93	1490.1	253.8	135.1	0.964	0.90	1.5	11.9	70	19
17	32,26	23,1	4,6	8,7	0,52	0,31	0,90	1529.6	193.8	145.6	0.964	0.93	2.6	8.0	42	21
18	32,31	23,0	4,7	8,6	0,55	0,29	0,92	1465.0	234.6	153.5	0.966	0.91	4.1	9.7	118	36

Am.: número da amostra; Per.: perímetro; Larg.: largura; Comp.: comprimento; L/C: razão largura-comprimento; E: elipsidade; F.F.: fator de forma; F0, F1 e F2: Harmônicas de Fourier zero, 1 e 2; Sim. Lat.: simetria lateral; Sim. A-P: simetria antero-posterior; Dif%: diferença percentual da média dos valores de pixel entre a cabeça testada e as cabeças padrões; CV: coeficiente de variação dos valores de pixel; % Blast.: porcentagem de ovócitos que formaram blastocistos morfológicamente normais

Tabela 3: Coeficiente de correlação entre características do sêmen e porcentagem de ovócitos que iniciaram clivagem e porcentagem de ovócitos que chegaram a blastocistos morfologicamente normais.

	<i>% Clivagem</i>	<i>% Embriões</i>	<i>% Embriões</i>
	<i>Laboratório 1</i>	<i>Laboratório 1</i>	<i>Laboratório 2</i>
Área	-0,27	-0,23	0,49*
Perímetro	-0,45*	-0,43	0,49*
Largura	0,10	0,17	0,25
Comprimento	-0,53*	-0,51	0,48*
Largura/comprimento	0,41	0,46*	-0,03
Elipsidade	-0,42	-0,46*	0,02
Fator de forma	0,30	0,29	-0,27
Fourier 0	-0,51*	-0,54*	0,29
Fourier 1	-0,10	-0,06	-0,28
Fourier 2	-0,42	-0,19	0,07
Simetria lateral	-0,23	-0,05	-0,01
Simetria antero-posterior	0,06	0,03	0,36
Descompactação de cromatina	-0,04	-0,28	0,18
Heterogeneidade de cromatina	0,04	-0,02	0,17

\*: Coeficiente de correlação significativo estatisticamente

Tabela 4: Coeficiente de correlação entre características do sêmen e a porcentagem de ovócitos que chegaram a blastocisto morfológicamente normal quando o sêmen foi avaliado antes e depois da seleção com Percoll.

	<i>% Embriões <b>sem</b></i>	<i>% Embriões <b>com</b></i>
	<i>percoll</i>	<i>percoll</i>
Área	-0,22	-0,07
Perímetro	-0,45	-0,15
Largura	0,24	-0,09
Comprimento	-0,52	-0,19
Largura/comprimento	0,49	0,04
Elipsidade	-0,49	-0,05
Fator de forma	0,31	-0,23
Fourier 0	-0,55	-0,16
Fourier 1	0,05	-0,29
Fourier 2	-0,04	-0,35
Simetria lateral	-0,07	0,13
Simetria antero-posterior	-0,11	0,28
Descompactação de cromatina	-0,50	0,20
Heterogeneidade de cromatina	-0,04	0,20

\*: Coeficiente de correlação significativo estatisticamente



Tabela 5: Coeficiente de correlação entre características do sêmen e a porcentagem de ovócitos que iniciaram clivagem e porcentagem de ovócitos que chegaram a blastocisto morfológicamente normal quando o sêmen foi avaliado antes e depois da seleção com Percoll no Laboratório 1.

	<i>% Clivagem sem percoll</i>	<i>% Clivagem com percoll</i>	<i>% Embriões sem percoll</i>	<i>% Embriões com percoll</i>
Área	-0,26	-0,39	-0,22	-0,43
Perímetro	-0,47	-0,49	-0,45	-0,55
Largura	0,18	-0,14	0,24	-0,06
Comprimento	-0,54	-0,65	-0,52	-0,78
Largura/comprimento	0,46	0,43	0,49	0,61
Elipsidade	-0,46	-0,46	-0,49	-0,63
Fator de forma	0,34	0,35	0,31	0,60
Fourier 0	-0,54	-0,54	-0,55	-0,77
Fourier 1	0,00	-0,18	0,05	-0,27
Fourier 2	-0,28	-0,61	-0,04	-0,40
Simetria lateral	-0,30	-0,10	-0,07	-0,13
Simetria antero-posterior	-0,07	0,18	-0,11	0,23
Descompactação de cromatina	-0,32	0,46	-0,50	0,19
Heterogeneidade de cromatina	0,09	-0,15	-0,04	-0,12

\*: Coeficiente de correlação significativo estatisticamente

## V. DISCUSSÃO

Observando os coeficientes de correlação entre as características morfométricas da cabeça do espermatozóide e a taxa de clivagem (Tabela 3), percebe-se um comportamento diferente entre os dois Laboratórios. Enquanto no Laboratório 1 houve uma tendência a existir correlação negativa entre medidas de tamanho (área, perímetro, largura e comprimento) e a taxa de clivagem e de embriões morfológicamente normais, no Laboratório 2 houve uma tendência positiva. Como as diferenças morfométricas entre as amostras de sêmen são muito pequenas (Tabelas 1 e 2), provavelmente existe outra ou outras variáveis não identificadas que diferem nos laboratórios testados e que influenciam a PIV muito mais intensamente que estas pequenas variações morfométricas.

A influência negativa das alterações morfológicas da cabeça do espermatozóide identificadas no espermograma sobre a fertilização “in vivo” e “in vitro” já é conhecida. No entanto, a influência destas alterações sobre a evolução embrionária ainda é controversa (HAFEZ; HAFEZ, 2000; SALLAM et al., 2003; WALTERS et al., 2004; JEDRZEJCZAK et al., 2005; KAWAI et al., 2006). Ainda mais questionável é a influência da morfometria da cabeça sobre a fertilidade. Sabe-se que alterações intensas têm influência semelhante às alterações morfológicas identificadas no espermograma de rotina (KATZ et al., 1986; JAGOE; WASHBROOK; HUDSON, 1986; SCHRADER; TURNER; SIMON, 1990; DAVIS et al., 1992; DAVIS; GRAVANCE, 1993; MACLEOD; IRVINE, 1995). Já em relação a influência de pequenas variações nas medidas das cabeças dos espermatozoides sobre a FIV ou produção “in vivo” nada se sabe (BELETTI; COSTA, 2003; BELETTI; COSTA; GUARDIEIRO, 2005; BELETTI; COSTA; VIANA, 2005a e 2005b).

O presente trabalho demonstrou que, apesar de existir influência de pequenas variações da morfometria da cabeça espermática sobre a fertilização e mesmo evolução dos embriões após PIV, outras variáveis como qualidade dos ovócitos, habilidade do técnico, meios de cultivo, métodos de maturação dos ovócitos e espermatozoides entre outras, podem influenciar mais intensamente o sucesso da PIV.

A utilização do Percoll seria para separar espermatozóides vivos e com movimento normal daqueles com movimento anormal ou mortos. Isto seria semelhante à ação da tuba uterina durante a passagem dos espermatozóides até a ampola, onde ocorre a fertilização “in vivo” (VINCENT; NADEAU, 1984; ZINI; LIBMAN, 2006).

No presente trabalho foi verificado se o momento da coleta do material para análise do sêmen (antes ou depois da seleção com percoll) influenciaria as correlações entre as características seminais e o sucesso da PIV. Apesar de nenhum dos coeficientes de correlação, neste caso, ser significativo estatisticamente, houve uma intensificação da influencia das dimensões da cabeça sobre as taxas de clivagem e evolução do embrião. Isto deve ocorrer porque quando se faz a padronização da concentração de espermatozóides, já foi utilizado percoll, ou seja, estes são realmente os espermatozóides que participarão do processo de fertilização. Já quando avaliamos o sêmen antes do uso do percoll, muitos dos espermatozóides avaliados não farão parte da PIV, ou seja, não influenciarão o processo.

Beletti; Costa; Viana (2005a) verificaram que as cabeças de espermatozóides de zebu, altamente férteis, tendem a ser menores. Esta característica é compatível com os resultados do Laboratório 1, onde houve uma correlação negativa entre tamanho da cabeça e o sucesso da PIV. Ostermeier et al. (2001a; 2001b) propuseram o uso do descritor de Fourier para avaliar a fertilidade de touros. Os resultados do Laboratório 2 demonstraram que a primeira harmônica do descritor de Fourier possui correlação negativa significativa com as taxas de clivagem e evolução do embrião. A forma da cabeça também influenciou significativamente o sucesso da PIV no Laboratório 1, pois quanto mais elíptica a cabeça menores foram as taxas de clivagem e de evolução do embrião.

A intensidade de compactação e a homogeneidade da cromatina dos espermatozóides tiveram pouca influência sobre a PIV. Em todas as situações avaliadas não foi observado coeficiente de correlação estatisticamente significativo. Mesmo desconsiderando a falta de significância, não houve tendência em comum entre os Laboratórios. Assim como neste trabalho, os resultados encontrados na literatura são bastante controversos (BUNGUM et al., 2004; ZINI et al., 2005;

FATEHI et al., 2006; BOE-HANSEN et al., 2006; SELI et al., 2006; VICENT et al., 2006; ZINI; LIBMAN, 2006).

É interessante notar que após a seleção com percoll (Tabela 4) ocorreu uma inversão da tendência da influência do grau de compactação da cromatina sobre a PIV. Enquanto antes do percoll a tendência era existir correlação negativa, após o uso de percoll passou a ser positiva. Isto pode ser porque o percoll influenciaria no grau de compactação da cromatina diretamente ou pela seleção de espermatozóide com diferentes tipos de cromatina. Não se pode descartar a influência do percoll nos métodos de avaliação da cromatina utilizados neste experimento.

Foram utilizadas amostras de sêmen de touros de centrais de inseminação, com avaliações de fertilidade de rotina normais. Provavelmente, o uso de touros com problemas de fertilidade levaria à resultados diferentes, contudo, o intuito do presente trabalho foi verificar a influência de pequenas alterações, geralmente não identificadas, nestas avaliações de fertilidade.

## **VI. CONCLUSÕES**

A influência de pequenas variações na morfometria da cabeça espermática sobre a clivagem e número de blastocistos morfolologicamente normais na PIV, é pequena.

A compactação da cromatina em PIV realizada com sêmen de touro considerado fértil pelos testes de avaliação de fertilidade de rotina não influenciou a clivagem e o número de blastocistos morfolologicamente normais.

## VII. REFERÊNCIAS

ALVAREZ, J. G.; SHARMA, R. K.; OLLERO, M.; SALEH, R. A.; LOPEZ, M. C.; THOMAS, A. J. Jr, EVENSON, D. P.; AGARWAL, A. Increased DNA damage in sperm from leukocytospermic semen samples as determined by the sperm chromatin structure assay. **Fertility and Sterility**, Birmingham, v. 78, n. 2, p. 319-329, 2002.

ASSUMPÇÃO, M. E. O. A.; BURATINI Jr, J.; HAIPEK, K.; LIMA, A. S.; MELLO, M. R. B.; OLIVEIRA, V. P.; TAVARES, L. M. T.; VISINTIN, J. A. Capacitação espermática in vitro com heparina e cálcio ionóforo em bovinos, **Arquivos da Faculdade de Veterinária da UFRGS**, Porto Alegre, v. 27, n. 1, p. 202, 1999.

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

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

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

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

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

BERNARDI, ML. Produção *in vitro* de embriões ovinos, **Acta Scientiae Veterinariae**, Porto Alegre, v. 33, n. 1, p. 1- 16, 2005.

BOCHENEK, M.; SMORAG, Z.; PILCH, J. Sperm chromatin structure assay of bulls qualified for artificial insemination. **Theriogenology**, Stoneham, v. 56, n. 4, p. 557-567, 2001.

BOE-HANSEN, G. B.; FEDDER, J.; ERSBOLL, A. K.; CHRISTENSEN, P. The sperm chromatin structure assay as a diagnostic tool in the human fertility clinic. **Human Reproduction**, Oxford, v. 2, n. 6, p. 1576–1582, 2006.

BRACKETT, B.G.; BOUSQUET, D.; BOICE, M.L.; DONAWICK, W.J.; EVANS, J.F. DRESSEL, M.A. Normal development following *in vitro* fertilization in the cow. **Biology of Reproduction**, Madison, v. 27, p. 147-158, 1982.

BUNGUM, M.; HUMAIDAN, P.; SPANO, M.; JEPSON, K.; BUNGUM, L.; GIWERCMAN, A. The predictive value of sperm chromatin structure assay (SCSA) parameters for the outcome of intrauterine insemination, IVF and ICSI. **Human Reproduction**, Oxford, v. 19, n. 6, p. 1401-1408, 2004.

CAMARGO, L. S. A.; SÁ, W. F.; FERREIRA, A. M.; VIANA, J. H. ; ARAUJO, M. C. C.; Efeito da concentração espermática e período de incubação oócito-espermatozóide na fecundação *in vitro* em bovinos da raça Gir. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília , v. 37, n. 5, p. 709- 715. 2002.

CEBESOV, F. B.; AYDOS, K.; UNLU, C. Effect of sperm chromatin damage on fertilization ratio and embryo quality post-ICSI. **Archives of Andrology**, Oxfordshire, v. 52, n. 5, p. 397-402, Sep-Oct 2006.

CHANG, M.C. Fertilization of rabbit ova *in vitro*. **Nature**, London, v. 184, p. 466-467, 1959.

COSTA, L. F.; CESAR Jr, R. M. **Shape analysis and classification: theory and practice**, Boca Raton, CRC, 2001. 680p.

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

DOTT, H.M. The estimation of the proportion of motile bull spermatozoa in various diluents and a comparison with the proportion eosinophilic. **Journal of Reproduction and Fertility**, Cambridge, v. 45, n. 1, p. 47-55, 1975.

ELLINGTON, J. E.; EVENSON, D. P.; FLEMING, J. E.; BRISBOIS, R. S.; HISS, G. A.; BRODER, S. J.; WRIGHT, R. W. Jr. Co-culture of human sperm with bovine oviduct epithelial cells decreases sperm chromatin structural changes seen during culture in media alone. **Fertility and Sterility**, Birmingham, v. 69, n. 4, p. 643-49, 1998.

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

FATEHI, A. N.; BEVERS, M. M.; SCHOEVERS, E.; ROELEN, B.; 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**, Lawrence, v. 27, n. 2, p. 176-188, Mar.-Apr., 2006.

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

GAGNON, C. **The male gamete: from basic science to clinical applications**, Vienna: Cache River, 1999. 516p.

GAGO, C.; PEREZ-SANCHEZ, F.; YEUNG, C. H.; TABLADO, L.; COOPER, T. G.; SOLER, C. Standardization of sampling and staining methods for the morphometric evaluation of sperm heads in the Cynomolgus monkey (*Macaca Fascicularis*) using computer-assisted image analysis. **International Journal of Andrology**, Lawrence, v. 21, n. 3, p. 169-176, 1998.

GALLUPO, A. G. Avaliação da sensibilidade de zigotos murinos a *Brucella abortus* para o estabelecimento de um modelo experimental em estudos de interações embriões-patógenos [Mestrado em Epidemiologia Experimental Aplicada Às Zoonoses]. São Paulo: Universidade de São Paulo, (USP), 2005.

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

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

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

GONÇALVES, P. B. D.; VISINTIN, J. A.; OLIVEIRA, M. A. L.; MONTAGNER, M. M.; COSTA, L. F. S.; Produção *in vitro* de embriões. In: GONÇALVES, P. B. D.; FIGUEIREDO, J. R.; FREITAS, V. J. F. **Biotécnicas aplicadas à reprodução animal**, São Paulo: Varela, 2002. p. 195-226.

GORDON, I. Laboratory production of cattle embryos. **London: CAB International**, 1994. 640p.

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

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



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

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

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

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

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

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

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

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

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

JECHT, E.W.; RUSSO, J.J. A system for the quantitative analysis of human sperm  
motility. **Andrologie**, Paris, v. 5, n. 3, p 215-221, 1973.

JEDRZEJCZAK, P.; PAWELCZYK, L.; TASZAREK-HAUKE, G.; KOTWICKA, M.;  
WARCHOL, W.; KURPISZ, M. Predictive value of selected sperm parameters for  
classical in vitro fertilization procedure of oocyte fertilization. **Andrologia**, Berlin, v.  
37, n. 2-3, p. 72-82, Jun. 2005.

JELLERETTE, T.; MELICAN, D.; BUTLER, R.; NIMS, S.; ZIOMEK, C.; FISSORE, R;  
GAVIN. W. Characterization of calcium oscillation patterns in caprine oocytes  
induced by IVF or an activation technique used in nuclear transfer. **Theriogenology**,  
Stoneham, v. 65, n. 8, p. 1575-86, May. 2006.

JIANG, J.Y.; TSANG, B.K. Optimal conditions for successful in vitro fertilization and subsequent embryonic development in Sprague-Dawley rats. **Biology Reproduction**, Madison, v. 71, n. 6, p. 1974-9, Dec. 2004.

KANE, M. T. A review of in vitro gamete maturation and embryo culture and potential impact on future animal biotechnology. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 15, n. 79(3-4), p. 171-90. Dec. 2003.

KATZ, D. F.; OVERSTREET, J. W.; SAMUELS, S. J.; NISWANDER, P. W.; BLOOM, T. D.; LEWIS, E. L. Morphometric analysis of spermatozoa in the assessment of human male fertility. **Journal of Andrology**. Lawrence, v. 7, n. 4, p. 203-210, 1986.

KAWAI, Y.; HATA, T.; SUZUKI, O.; MATSUDA, J. The relationship between sperm morphology and in vitro fertilization ability in mice. **Journal of Reproduction Development**, Tokyo, v. 52, n. 4, p. 561-8, Aug. 2006.

LOUTRADI, K. E., TARLATZIS.; BASIL, C.; GOULIS, D. G.; ZEPIRIDS, L.; PAGOU, T.; CHATZIOANNOU, E.; GRIMBIZIS, G.; PAPADIMAS, L.; BONTIS, L. The effects of sperm quality on embryo development after intracytoplasmic sperm injection. **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**, New York, v. 23, n. 2, Feb. 2006.

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

MALCUIT, C.; MASERATI, M.; TAKAHASHI Y.; PAGE, R.; FISSORE, R.A. Intracytoplasmic sperm injection in the bovine induces abnormal [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> responses and oocyte activation. **Reproduction Fertility Development**, Collingwood, v. 18, n.1-2, p. 39-51, 2006.

MARSON, E. P.; PREVIERO, T.; FERRAZ, J. B. S. As biotecnologias aplicadas à reprodução e melhoramento animal: Inseminação artificial, transferência de embriões, fertilização in vitro e clonagem. 2003. Parte 1. Disponível em: <<http://www.beefpoint.com.br/>>. Acesso em: 7 fev. 2006.

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

MOLNAROVA, Z.; MACHATKOVA, M.; MACHAL, L.; HORAKOVA, J.; HANZALOVA, K. A potential relationship between the acrosome response characteristics of bovine spermatozoa and their in vitro fertilizing ability. **Zygote**, Cambridge, v. 14, n. 1, p. 63-9, Feb. 2006.

MORTON, K.M.; ROWE, A.M.; CHIS MAXWELL, W.M.; EVANS, G. In vitro and in vivo survival of bisected sheep embryos derived from frozen-thawed unsorted, and frozen-thawed sex-sorted and refrozen-thawed ram spermatozoa. **Theriogenology**, Stoneham, v. 15; n. 65(7), p. 1333-45, Apr. 2006.

NAGAI, T.; FUNAHASHI, H.; YOSHIOKA, K.; KIKUCHI, K. Up date of in vitro production of porcine embryos. **Front Bioscience**, Albertson, v. 1, n. 11, p. 2565-73. Sep. 2006.

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

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

ROBERTSON, I., NELSON, R.E, Certificação e Identificação de Embriões. In : STRINGFELLOW, D. A. , SEIDEL, S (Eds), **Manual da Sociedade Brasileira de transferência de Embriões** São Paulo: Sociedade Brasileira de Transferência de Embriões ,1999. p.47-56.

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

SALLAM, H. N.; EZZELDIN, F.; SALLAM, A.; AGAMEYA, A. F.; FARRAG, A. Sperm velocity and morphology, female characteristics, and the hypo-osmotic swelling test as predictors of fertilization potential: experience from the IVF model. *International Journal of Fertility and Women's Medicine*, New York, v. 48, n. 2, p. 88-95, Mar.-Apr. 2003.

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

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

SERBIAN J.M., SCANLON P.F. & GORDON I. Culture of fertilized cattle eggs. **Journal of Agriculture Science**, v. 70, p. 183-185. 1968.

SQUIRES, E.L. Integration of future biotechnologies into the equine industry. **Anim Reprod Sci**, v. 89, n. 1-4, p. 187-98. Oct. 2005.

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

STEPTOE, P.C. & EDWARDS, R.G. Birth after the preimplantation of a human embryo. **Lancet**, v. 2, p. 366, 1978.

TOYODA, Y.; CHANG, M. C. Fertilization of rat eggs in vitro by epididymal spermatozoa and the development of eggs following transfer. **J Reprod Fertil**, v. 36, n. 1, p. 9-22, Jan. 1974.

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**, Oxford, v. 13, n. 7, p. 1864-1871, 1998.

VERSTEGEN, J.; IGUER-OUADA, M.; ONCLIN, K. Computer assisted semen analyzers in andrology research and veterinary practice. **Theriogenology**, Stoneham, v. 57, n. 1, p. 149-179, 2002.

VERSTEGEN, J.; IGUER-OUADA, M.; ONCLIN, K. Computer assisted semen analyzers in andrology research and veterinary practice. **Theriogenology**, Stoneham, v. 57, n. 1, p. 149-179, 2002.

VINCENT, R.; NADEAU, D.; Adjustment of the osmolality of percoll for the isopycnic separation of the cells and cell organelles. **Analytical Biochemistry**, Betscheda, v. 141, p. 322-328, 1984.

VINCENT, W.; AOKI, B. S. LIHUA LIU.; M.D. JONES K. P.; HATASAKA, H. H.; GIBSON, M.; MATTHEW, P.; CARRELL, D. T. Sperm protamine 1/protamine 2 ratios are related to in vitro fertilization pregnancy rates and predictive of fertilization ability. **Fertility and Sterility**, Birmingham, v. 86, n. 5, p. 1408-1416, 2006.

WALTERS, A.H.; EYESTONE, W. E.; SAACKE, R. G.; PEARSON, R. E.; GWAZDAUSKAS, F. C. Sperm morphology and preparation method affect bovine embryonic development. **Journal of Andrology**, Lawrence, v. 25, n. 4, p. 554-63, Jul.-Aug. 2004.

WANG, Y.; OCK S.A.; CHIAN, R.C. Effect of gonadotrophin stimulation on mouse oocyte quality and subsequent embryonic development in vitro. **Reprod Biomed Online**. Cambridge, v. 12, n. 3, p. 304-14; Mar. 2006.

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

WHITTINGHAM, D. G. Fertilization of mouse eggs in vitro. **Nature**, v. 220, n. 5167, p. 592-3, Nov. 1968.

WIJCHMAN JG, de WOLF BT, GRAAFE R, ARTS EG.. Variation in semen parameters derived from computer-aided semen analysis, within donors and between donors. **Journal of Andrology**. Lawrence, v. 22, n. 5, p. 773-780, 2001.

YANAMAGIMASHI, R. Mamalian fertilization. In: KNOBIL, E.; NEILL, J. (Eds), **The Physiology of Reproduction**, New York: Raven Press, 1994. p. 189-317.

ZHENG, Y.L.; JIANG, M. X.; ZHANG, Y. L.; SUN, Q. Y.; CHEN, D.Y. Effects of oocyte age, cumulus cells and injection methods on in vitro development of intracytoplasmic sperm injection rabbit embryos. **Zygote**, Cambridge, v. 12, n. 1, p. 75-80, Feb. 2004.

ZINI, A.; LIBMAN, J. Sperm DNA damage: clinical significance in the era of assisted reproduction. **Canadian Medical Association Journal**, Ottawa, v. 175, n. 5, p. 495-500, 2006.

ZINI, A.; MERIANO, J.; KADER, K.; JARVI, K.; LASKIN, C. A.; CADESKY, K. Potential adverse effect of sperm DNA damage on embryo quality after ICSI. **Human Reproduction**, Oxford, v. 20, n. 12, p. 3476–3480, 2005.