

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

**AVALIAÇÃO DA DESCOMPACTAÇÃO DA CROMATINA DE
ESPERMATOZOIDES BOVINOS POR TRÊS DIFERENTES
MÉTODOS**

Ludmila Angélica da Fonseca

Bióloga

UBERLÂNDIA– MINAS GERAIS– BRASIL

2014

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA
PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

**AVALIAÇÃO DA DESCOMPACTAÇÃO DA CROMATINA DE
ESPERMATOZOIDES BOVINOS POR TRÊS DIFERENTES
MÉTODOS**

Ludmila Angélica da Fonseca

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Emílio Beletti

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

UBERLÂNDIA– MINAS GERAIS– BRASIL

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

F676a
2014

Fonseca, Ludmila Angélica da, 1987-
Avaliação da descompactação da cromatina de
espermatozoides bo-
vinos por três diferentes métodos / Ludmila Angélica da
Fonseca. – 2014.
49 f. : il.

Orientador: Marcelo Emílio Beletti.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de
Uberlândia, Progra-ma de Pós-Graduação em Ciências
Veterinárias.
Inclui bibliografia.

1. Veterinária - Teses. 2. Cromatina - Teses. 3. Microscopia
eletrônica
de transmissão - Teses. 4. Citometria de fluxo - Teses. I.
Beletti, Marcelo Emílio. II. Universidade Federal de
Uberlândia. Programa de Pós-Gra-duação em Ciências
Veterinárias. III. Título.
1.
CDU:
619

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

LUDMILA ANGÉLICA DA FONSECA, filha de Lucirlene Firmino da Fonseca e Miguel Alves da Silva, nasceu em Catalão – Goiás, em 3 de Dezembro de 1987. Estudou na Escola Paroquial São Bernardino de Siena, Colégio Estadual João Netto de Campos e Colégio Aprov. Em Agosto de 2011 graduou-se em Ciências Biológicas, modalidade licenciatura, na Universidade Federal de Goiás – UFG *Campus Catalão*. Após isso, em março de 2012, ingressou no programa de pós graduação em Ciências Veterinárias – área de Produção Animal, sub-área Eficiência e técnicas reprodutivas, na Universidade Federal de Uberlândia – MG sob a orientação do professor Doutor Marcelo Emílio Beletti, passando a fazer parte do laboratório de análise de imagem do Instituto de Ciências Biomédicas (ICBIM).

“Um sonho que se sonha só, é só um sonho que se sonha só, mas sonho que se sonha junto é realidade.”

-Raul Seixas

Dedico este trabalho a Deus e à minha família, pois sem estes alicerces eu teria caído e não teria conseguido chegar aqui!

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus e Nossa Senhora Aparecida, seres maiores que todos nós, que sempre me guiaram, me dando uma vida com saúde, e as oportunidades de correr atrás dos meus sonhos!!!

Agradeço aos meus pais, Miguel e Lucirlene por serem meus trampolins de sonhos, por me apoiarem nas minhas escolhas, mesmo estando longe e com a dor da saudade. Vocês são sempre meu motivo para lutar a cada dia mais por meus objetivos. Essa conquista é nossa! Obrigada, amo vocês!!!

Agradeço a minha irmã linda, Ana Júlia, pelo apoio, risadas, incentivo nas horas difíceis, pelas horas de distração que nessa luta me fizeram tão bem, e pela confiança de sempre, amo você Jú!!!

Agradeço minhas avós Júlia e Angélica, pelo amor, carinho, e orações de sempre! Vocês são eternos anjos zelando por mim! Amo muito vocês!!!!

Agradeço imensamente ao meu professor orientador Professor Dr. Marcelo Emílio Beletti pela oportunidade de ser sua aluna. Beletti, vc é um profissional como poucos, humilde, competentíssimo e humano acima de tudo. Estar ao lado de um professor tão competente e inteligente é um privilégio, obrigada por fazer parte desta etapa tão importante na minha vida, e por ter aberto as portas do seu laboratório acolhendo essa menina lá de Catalão, sem nem mesmo me conhecer!!! Obrigada por me ajudar a me tornar mestre!!

Agradeço a minha professora orientadora da graduação Professora Dra. Gleyce Alves Machado, que desde a época da Faculdade de Biologia me provou várias vezes que valia a pena continuar, e por isso, estou aqui ultrapassando mais uma barreira. Obrigada Gleyce, pela docura, calma, pelo incentivo e por ter sido a primeira a acreditar em mim desde minha vida acadêmica!

Agradeço às amigas de Catalão, que sempre manifestaram apoio na realização deste meu sonho. Em especial agradeço à Marília Sebba, Débora Minúcio Nascimento, Silvia Helena Minúcio Nascimento e família, e a todos os outros que não citei aqui. Obrigada pelo apoio!!! Amo vocês!!

Agradeço aos colegas de mestrado da UFU e de vivência em Minas que me proporcionaram risadas, ombro amigo e momentos bons, mesmo quando ficar em Uberlândia era terrível.

Especialmente agradeço ao Marcus, Rogério, Caio, Daniela, Saulo, Mayara, Lara, Julyana, Lígia, Roberta e o cãozinho mais lindo do mundo, o Sushi.

Agradeço aos alunos do professor Beletti de iniciação científica do curso de Medicina Veterinária da UFU, que me auxiliaram na realização deste trabalho nas análises e coleta de sêmen, em especial agradeço à Lays Rocha, Bruna, Muller, Lucas e Wellington. Obrigada pessoal!!

Agradeço a Dra. Aline Costa Lúcio, aluna de pós doutorado do laboratório de Biologia da reprodução pelo auxílio e conversas quando precisei. Obrigada!!

Agradeço ao laboratório de histologia do ICBIM e a todos os seus profissionais, desde as zeladoras até o coordenador, em especial aqueles que mais convivi, pela paciência e por terem me permitido realizar minhas análises e me proporcionarem chegar a realização do meu trabalho. Obrigada!!

Agradeço ao pessoal do CAPI (Centro de aquisição e processamento de imagens) da UFMG em Belo Horizonte, nas pessoas do coordenador, professor Hélio Chiarini e do técnico do laboratório de microscopia eletrônica, Diego Aquino Queiroga, pela oportunidade de analisar parte do material usando as instalações do laboratório, me auxiliando com paciência e prestatividade. A ajuda de vocês foi essencial! Muito obrigada!!!

Agradeço aos funcionários e professores do Programa de pós graduação em Ciências Veterinárias pelo auxílio prestado quando necessário.

Agradeço aos membros da banca pelo aceite e por terem a vontade e disponibilidade em lerem meu trabalho e contribuirem com suas sugestões para melhoramento do mesmo. Obrigada!!

Agradeço a Fapemig pelo apoio financeiro prestado para que o trabalho fosse realizado!

Enfim, obrigada por todos aqueles que contribuiram de alguma forma para a realização desse sonho e que não consegui citar aqui. Deixo meu sincero, muito obrigada!!!

SUMÁRIO

	Página
1. INTRODUÇÃO.....	2
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	6
2.1. Cromatina espermática.....	6
2.2. SCSA.....	10
2.3. Azul de toluidina.....	11
2.4. Análise computacional de imagem.....	12
2.5. Microscopia eletrônica de Transmissão.....	13
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	16
3.1. Obtenção das amostras de sêmen.....	16
3.2. Azul de toluidina.....	13
3.3. Análise de citometria de fluxo.....	18
3.4. Microscopia eletrônica de transmissão.....	19
3.5. Análise Estatística.....	21
4. RESULTADO E DISCUSSÃO.....	22
5. CONCLUSÕES.....	28
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	29

AVALIAÇÃO DA DESCOMPACTAÇÃO DA CROMATINA DE ESPERMATOZOIDES BOVINOS POR TRÊS DIFERENTES MÉTODOS

RESUMO-Reprodutores que possuem espermograma normal podem ser classificados como subférteis ou passarem por períodos de subfertilidade, em função de seu baixo desempenho reprodutivo. As alterações na descompactação da cromatina dos espermatozoides em bovinos são possíveis explicações encontradas para tais comportamentos. Diante disso, conduziu-se este trabalho, com o objetivo de comparar três diferentes métodos de análises cromatínicas de espermatozóides que possam ser usados em diagnósticos de fertilidade de touros. Sete amostras de sêmen de bovinos subférteis foram avaliadas utilizando-se os três métodos, sendo eles: coloração com alaranjado de acridina e análise por citometria de fuxo (Sperm Chromatin Structure Assay - SCSA), coloração por azul de toluidina (AT) e microscopia eletrônica de transmissão (MET). Nos esfregaços de sêmen corados com AT foram avaliadas a descompactação e heterogeneidade da cromatina. Com o SCSA avaliou-se a proporção de cabeças de espermatozoides coradas em vermelho (cabeças anômalas) e em verde (cabeças normais). Na MET avaliou-se as áreas das cabeças com descompactação da cromatina. Como análise estatística foi utilizado o teste Kruskal-Wallis e como pós-teste, Wilcoxon. Também foi aplicado o teste de correlação de Pearson. Obteve-se correlação positiva e significativa entre SCSA e MET, além da correlação positiva e significativa entre AT e ME. Constatou-se a correlação negativa e significativa entre descompactação e heterogeneidade por AT, entretanto não houve correlação significativa entre SCSA e AT. Concluiu-se que a MET identifica alterações semelhantes às identificadas por SCSA, além de ser mais sensível para identificação de alterações cromatínicas em espermatozoides de

touro do que o SCSA e que a análise de imagem computacional de esfregaços corados com AT não identifica as mesmas alterações identificadas pelo SCSA.

Palavras chave: Azul de Toluidina, Cromatina, Espermatozóide, Microscopia Eletrônica de Transmissão, Sperm Chromatin Structure Assay

EVALUATION OF CHROMATIN DESCOMPACTION OF CATTLE SPERM BY THREE DIFFERENT METHODS

ABSTRACT-Sires with a normal semen analysis can be classified as subfertile or they can have periods of subfertility because of its low reproductive performance. Changes in chromatin compaction of spermatozoa in cattle are found, and they are possible explanations for this kind of behavior. Therefore, this study was conducted with the objective to compare three different methods of analysis of sperm chromatin that can be used in the diagnosis of fertility bulls. Seven semen samples of subfertile cattle were evaluated using the three methods, which are them: flow cytometry (SCSA), toluidine blue staining (TB) and transmission electron microscopy (TEM). In samples stained with TB, semen samples were evaluated in case of decompaction and heterogeneity of chromatin. The SCSA evaluated the proportion of sperm heads stained in red (abnormal heads) and green (normal heads). In TEM evaluated the areas of heads with unpacking chromatin. As statistics evaluations were performed the Kruskal-Wallis test and as a post-test, Wilcoxon was also used. The Pearson correlation test was also conducted. There was positive and significant correlation between SCSA and TEM, besides the positive and significant correlation between TB and TEM. It was found a negative correlation between unpacking of chromatin and heterogeneity by TB, however there was no significant correlation between SCSA and TB. It was concluded that TEM identifies similar changes as in the SCSA test, and TEM is more sensitive for the identification of chromatin alterations in bull sperm than SCSA, and the computational image analysis stained with TB does not identify the same changes as in the SCSA.

Keywords: Toluidine blue, Chromatin, Sperm, Transmission Electron Microscopy, Sperm Chromatin Structure Assay

I.INTRODUÇÃO

A bovinocultura brasileira passa por uma fase onde vem ocorrendo o reconhecimento da importância da utilização de tecnologias no setor produtivo. A expectativa de retorno financeiro por meio da eficiência nos sistemas de produção pode ser intensificada com o uso de eficientes técnicas de manejo e biotecnologias aplicadas à reprodução animal. (VISHWANATH, 2003).

Dentre os diversos fatores que influenciam o sucesso na situação atual da bovinocultura, destaca-se a importância da reprodução animal, pois sem a mesma não haverá a geração de novos produtos. Dessa forma, quanto mais eficiente for o desempenho reprodutivo dos machos, maior retorno econômico positivo surgirá para a manutenção de uma bovinocultura de sucesso (RODRIGUES, 2009).

Elevados índices de produção com associação a uma alta eficiência reprodutiva, devem ser metas que norteiam alcançar uma maior produtividade e custo-benefício satisfatório na atividade. Neste sentido, a manutenção da eficiência reprodutiva é considerada um dos principais fatores que contribuem para a melhoria do desempenho produtivo e da lucratividade dos rebanhos comerciais (VASCONCELOS E MENEGHETTI, 2006)

Devido ao papel de alta responsabilidade que o macho reprodutor possui na produção animal, testes que analisam a capacidade reprodutiva são necessários para que seja possível selecionar animais que possuam características econômicas desejáveis à sua prole, como fertilidade, por exemplo (FONSECA, 2009).

De acordo ainda com RODRIGUES (2009), a biotecnologia da reprodução composta por diferentes métodos de análise que tenham a função de avaliarem a fertilidade do macho vem possibilitando um verdadeiro avanço qualitativo de caráter positivo na criação bovina, em especial por facilitar a seleção e multiplicação de animais geneticamente superiores. Diante disso, é de extrema importância que se melhore os

métodos de avaliação espermática possibilitando consequentemente um aumento na capacidade de reprodução dos machos.

No entanto a aplicação de biotecnologias da reprodução visando a disseminação do material genético de animais com alto valor zootécnico, como os bovinos, ainda possui falhas de informações específicas sobre a taxa de fertilidade do macho. (FORTES et al., 2012). Um fato exemplar que justifica essas dúvidas em relação à fertilidade do macho é quando animais considerados férteis comprovados através de resultados de espermogramas normais de rotina, mas que por motivos desconhecidos enfrentam períodos de subfertilidade inexplicáveis.

Recentemente, obteve-se um grande avanço relacionado ao conhecimento de mecanismos que detectam um espermatozoide com maior competência funcional (AITKEN, 2006).

Glendhill (1966) foi o precursor na identificação de espermatozoides com má compactação da cromatina em touros subférteis. De acordo com Britto e Mello (1988), touros com espermograma normal podem ser subférteis ou apresentar intervalos de subfertilidade inexplicáveis pelo espermograma de rotina, sendo as alterações na compactação da cromatina dos espermatozoides uma possível explicação para tal fenômeno.

Os espermatozoides possuem cromatina altamente organizada e são condutores metabólicos funcionais do genoma masculino, carreando RNAs de diferentes tipos, os quais, tanto quanto os nucleossomos, são importantes sinalizadores epigenéticos paternos e, logo, influenciam o desenvolvimento embrionário inicial (BELETTI, 2013).

Um dos componentes essenciais do espermatozoide, necessário para formação de embriões normais, é a existência de um núcleo com cromatina e matriz nuclear intacta (WARD et al., 1999). Alterações cromatínicas espermáticas também podem alterar a forma da cabeça do espermatozoide e influenciar na motilidade espermática, dificultando o processo de fertilização (BELETTI et al., 2005). Portanto, alterações cromatínicas podem não só interferir no processo de fecundação, mas ainda gerar interferências no desenvolvimento embrionário, o que reforça mais ainda a necessidade da análise cromatínica na avaliação de reprodutores machos (BELETTI, 2013).

Acontecimentos como falhas na fertilização e mortalidade embrionária têm sido reconhecidos como fontes potenciais de perda no processo reprodutivo e numerosos estudos sobre o assunto têm sidorelatados (GORDON, 1996). Um elevado nível de instabilidade na cromatina nuclear espermática do sêmen também já foi associado com a redução da eficiência de reprodução de touros (BALLACHEY et al., 1988; KARABINUS et al., 1990; DOBRINSKI et al., 1994; ANZAR et al., 2002. ; MADRID-BURY et al., 2005).

A presença de espermatozoides com instabilidade na cromatina espermática é considerado um defeito incompensável, que não pode ser tolerado em níveis maiores do que em valores de 15 a 20 % destas células (BARTH,OKO, 1989).

Dentre os vários métodos de identificação de alterações cromatínicas espermáticas sem sêmen de touros, pode-se citar a análise por citometria de fluxo utilizando o corante fluorescente alaranjado de acridina (SCSA, Sperm Chromatin Structure Assay) (EVENSON et al. 1980) e a análise de imagem computacional de esfregaços de sêmen corados com Azul de Toluidina (AT) (BELETTI et al., 2005), além da microscopia eletrônica de transmissão (MET) (ARAÚJO, 2013).

Atualmente o método mais utilizado é a análise da estrutura de cromatina de espermatozoides (SCSA), baseada numa avaliação da fluorescência por citometria de fluxo de espermatozoides corados com o corante alaranjado de acridina. Apesar disso, este método tem uma desvantagem, não permitindo a análise morfométrica concomitante com a caracterização da cromatina do espermatozoide. No entanto é um método que tem sua utilização aumentada, pois realiza uma análise com grandes quantidades celulares. O SCSA tem sido utilizado em centenas de estudos de fertilidade de touros e outras espécies e tem sido considerado como técnica de referência (SPANO et al., 1998).

Outro método usado para a avaliação da cromatina foi desenvolvido por Mello (1982). Este método utiliza o azul de toluidina, um corante catiônico que exibe metacromasia, isto é, uma alteração de cor em situações específicas, induzida por ressonância de elétrons entre várias moléculas de

corante empilhadas. Esta propriedade é útil para avaliação de anormalidades na cromatina de espermatozoides com problemas de condensação (BELETTI et al., 2005).

A análise de imagem computacional de esfregaços de sêmen corados com AT já foi utilizada em mais de uma dezena de trabalhos, principalmente para avaliação de alterações cromatínicas de espermatozoides de touro, como feito por Campos et al., (2010). No entanto, ainda não possui uma referência de valores mínimos que interfiram na fertilidade do animal.

A microscopia eletrônica de transmissão geralmente é utilizada para avaliar a ultraestrutura de espermatozoides de vertebrados e eventualmente correlacionando-se com a fertilidade (OLIVEIRA et al, 2011). Geralmente não se utiliza a microscopia eletrônica de transmissão para avaliação de alterações cromatínicas. No entanto, Araújo (2013), utilizou com bons resultados a microscopia eletrônica de transmissão para avaliar alterações de cromatina em espermatozoides de peru.

Utilizando amostras de sêmen de touro avaliadas por análise de imagem computacional de esfregaços corados com AT, analisadas por SCSAe por microscopia eletrônica de transmissão, o presente trabalho teve como objetivo comparar três diferentes metodologia de avaliação de cromatina que possam ser utilizadas em diagnósticos de fertilidade de touros.

II.REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Cromatina espermática

Falando especificamente em uma classe de animais, nesse casoos mamíferos, nas fases finais da espermatoogênese, as proteínas nucleares básicas, ricas em lisina, chamadas de histonas, são substituídas, total ou parcialmente, por estruturas nomeadas de protaminas (BELETTI, 2013).

As protaminas são proteínas específicas dos espermatozoides, as quais possuem um caráter mais básico em razão da riqueza em arginina (BLOCH, 1969; HOFMANN, HILSCHER, 1991). Assim, forma-se uma cromatina (complexo DNA-protamina), bem condensada, em função da neutralização do esqueleto fosfodiéster do DNA ocorrida pela interação dos grupos fosfatos provenientes da fita de DNA e amina vinda das proteínas (BALHORN, 1982; BELETTI, MELLO, 1996).

Acreditava-se que em sua fase madura, os espermatozoides possuíam uma cromatina não funcional, entretanto, elestêm sido reconhecidos como sendo bem organizados e ainda possuírem a condução metabólica funcional do genoma masculino (BELETTI, 2013).

A unidade básica da cromatina de espermatozoides em mamíferos,denominada de toroide de protamina, teve sua primeira descrição feita por Balhorn e colaboradores (1982), onde relataram que 50kb de DNA aproximadamente é enrolado firmemente pelas protaminas, formando uma estrutura em forma de “donut” ou (rosca). (ALLEN et al., 1992; HUD et al., 1993). A organização estrutural do DNA em domínios no formato de alças de 20 a 50kb compõe outro arranjo da cromatina (RISLEYet al., 1986; WARDet al., 1989; KRAMER, KRAWETZ, 1996).

O modelo“donut-alça” foi proposto recentemente para a estrutura da cromatina espermática, sugerindo que ambos os níveis organizacionais são relacionados (SOTOLONGOet al., 2003). De acordo com este modelo, cada domínio em forma de alça do DNA é condensado em um único toroide de

protamina. Cada domínio em forma de ‘donut’ são fixados à matriz nuclear proteica em locais chamados de regiões de anexação da matriz (MARs)(SHAMAN et. al., 2007).

Segundo Lemos (2013) a cromatina é composta organizacionalmente por DNA e uma rede proteica, a qual recebe o nome de matriz nuclear. Quando se isola tal estrutura, a mesma assemelha-se a uma arquitetura fibrosa do citoesqueleto. É vasta a lista de proteínas que compreendem a matriz nuclear, e até certo grau é do tipo célula dependente. Também de acordo com Lemos (2013) a matriz nuclear é importante para a replicação do DNA, sugerindo que essa matriz nuclear espermática forneça um pouco da composição do pro núcleo do zigoto recém- fertilizado.

Diante da falta de conhecimento em relação à formação da matriz nuclear há evidências de que alguns de seus componentes sejam topoisomerases IIB (SHAMAN et al., 2006), actina, miosina, citoqueratinas e spectrina (OCAMPO et al., 2005), possivelmente carbamoil sintetase fosfato glutamino dependente, transcarbamilaespartato, dihidroorotase (CAD) (CARREY et al., 2002; OCAMPO et al., 2005) e transcriptase reversa (GIORDANO et al., 2000). Sabe-se que aporção hipersensitiva à nuclease que se liga a uma estrutura típica nucleossomal, conecta cada toroide e anexa as alças à matriz nuclear. Isso acontece, potencialmente através da TOP2B (BELETTI, 2013).

Há relatos que as regiões sensitivas à nuclease estão próximas às regiões de matriz e ainda estão associadas aos domínios das alças no DNA espermático humano, tornando-se similar à cromatina potencializada à transcrição nas células somáticas (BELETTI, 2013).

Além de protaminas e histonas espermáticas específicas, tem sido demonstrado que a cromatina possui proteínas com potencial ativo incluindo alguns fatores de transcrição (PITTOGGI et al. 2001). A cromatina pode possuir também uma organização específica; alguns telômeros (ZALENSKAYA et al., 2000) e centrômeros (YARON et al. 1998) que parecem estar localizados em áreas específicas do núcleo espermático.

Há evidências de que o processo de condensação do DNA pode estar incompleto, diante disso, poderá haver menor estabilidade nuclear e ocorrer

aumento da susceptibilidade para desnaturação do complexo DNA-proteína. Tais fatores tem sido associados com a infertilidade em vários animais e também no homem. A instabilidade nuclear gerada poderia acarretar problemas no DNA, onde os mesmos poderiam continuar se perpetuando durante o desenvolvimento embrionário, causando uma indução à apoptose e também à fragmentação do embrião que não se desenvolveria (BELETTI, 2013).

Em relatos sobre humanos e eqüinos, nota-se uma correlação negativa entre os fatores fertilidade e integridade de DNA (MORRELL et al., 2008) . Dessa forma, a concepção depende, dentre outros fatores, da habilidade da cromatina espermática previamente condensada em se descondensar e formar o pro núcleo masculino durante a interação com o ovócito (MADRID-BURY et al., 2005).

Gledhill (1966) foi o pioneiro ao identificar pela primeira vez espermatozoides com cromatina defeituosa ou anômala, em touros subférteis, utilizando reação de Feulgen. Inicialmente, a coloração mais intensa nas cabeças destes espermatozoides foi relacionada com a alta densidade do DNA. Entretanto, com o uso do microscópio de luzultravioleta, o qual dispensa coloração para quantificação de DNA, ficou claro que as variações de intensidade observadas na reação de Feulgen são de fato, consequências da alteração da cinética hidrolítico DNA. Este fenômeno, geralmente é causado por alterações no complexo DNA-protamina, que fazem a cromatina ficar menos compactada e consequentemente mais sensível à hidrólise.

Há dados onde Campos et al.(2013) demonstraram que a seleção espermática por Percoll ou por “swimup” não consegue excluir a maioria dos espermatozoides com alterações na cromatina. Ainda mais recentemente, existem outros dados obtidos por D’Occhio et al.(2013) mostrando que a insulação escrotal em touros induz a produção de espermatozoides com alterações cromatínicas. Dessa forma, a avaliação laboratorial do sêmen deve incluir testes que analisem a maioria dos atributos relevantes dos espermatozoides como a avaliação da integridade genômica, a favor da fecundação e do desenvolvimento embrionário (EVENSON, WIXON, 2006).

2.2 SCSA(Sperm Chromatin Structure Assay)

Atualmente há um grande número de metodologias utilizadas para identificação de alterações na estabilidade da cromatina espermática. Uma das mais usadas é a análise da estrutura da cromatina (SCSA)(Sperm Chromatin Structure Assay), por ter sua eficiência comprovada. A técnica é baseada na avaliação da fluorescência de espermatozoides corados com o corante fluorescente, alaranjado de acridina (AA), através de análise em citômetro de fluxo. Com a utilização de desnaturação ácida ou térmica e posterior coloração com (AA) realizando a análise em citofotômetro de fluxo com comprimento de onda de ultravioleta (UV), os espermatozoides com cromatina normal coram-se em verde e os com possíveis alterações, coram-se com a cor vermelha/alaranjada(EVENSON et al., 1980).

A citometria de fluxo é um método que possibilita a contagem, classificação e isolamento da célula espermática que, após serem marcadas com um corante fluorescente específico, são individualmente movidas através de um sistema com detector óptico em fluxo laminar e então, são contadas (EVENSON, 1999). Desse modo, pode-se diminuir a subjetividade e aumentar a repetibilidade para uma maior precisão nas análises de sêmen. Assim, uma série de características da célula espermática como integridade das membranas plasmática e acrossomal, viabilidade e a função celular podem ser avaliadas utilizando-se a citometria de fluxo (GILLIAN et al., 2005)

O uso de SCSA para avaliar a cromatina, não permite uma análise concomitante entre a mesma e os aspectos morfológicos do espermatozoide, já que a cromatina é avaliada por citômetro de fluxo e a morfologia deve ser avaliada pelo esfregaço de sêmen. O SCSA apenas quantifica os espermatozoides normais e aqueles com alteração de cromatina, não permitindo dessa forma, perceber diferentes tipos de alterações (BELETTI et al., 2005).

Tejada et al. (1984), modificaram o método de Evenson et al. (1980) usando a coloração com AA em esfregaços de sêmen humano, obtendo bons resultados na diferenciação de espermatozoides normais e anômalos.

No Brasil as alterações cromatínicas dos espermatozoides são geralmente negligenciadas nas avaliações de fertilidade de touros. Isso porque o SCSA(**Sperm Chromatin Structure Assay**) que é o método mais utilizado no mundo e que já possui parâmetros bem definidos utiliza a citometria de fluxo, com altíssimo custo, inviabilizando seu uso rotineiro por profissionais da área. Entretanto, sabe-se que o SCSA é um método capaz de analisar uma quantidade de células imensamente maior que em outros métodos.

2.3Método de coloração por Azul de toluidina

O método da "metacromasia induzida" desenvolvido por Mello (1982)utiliza o corante catiônico Azul de Toluidina, (AT) em pH 4,0, após hidrólise ácida.

No método de coloração por AT, a ligação entre as moléculas do corante usado (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 estejam ionizados e o AT se ligue de forma inespecífica e não no DNA. 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 espermatozoides com cromatina normal, a maioria dos grupos fosfatos estão bloqueados por protaminas, e consequentemente, poucas moléculas do corante se ligam ao DNA, resultando em uma coloração de verde a azul claro. Já para aquelas células com cromatina pouco compactada, haveria mais ligações com as moléculas do corante, obtendo-se uma coloração de azul escuro a magenta (BELETTI, MELLO, 1996; BELETTI, 2013).

A sensibilidade deste processo pode ser aumentada pela hidrólise antes da coloração, ou seja, tratamento ácido (HCl 4 N a 25°C, 15 a 20 min.)

seguido de coloração com azul de toluidina (pH 4,0). Dessa forma, espermatozoides normais, que são caracterizados por possuírem cromatina altamente compactada, são pouco afetados pela hidrólise e consequentemente, coram-se em azul claro. Por outro lado, a cromatina espermática com baixo grau de descompactação, identificados como normais sem a hidrólise, tem as protaminas parcialmente extraídas, promovendo assim ligações das moléculas do corante com os grupos fosfatos do DNA, fazendo com que estes espermatozoides se corem como anômalos. Mesmo com o tratamento ácido prévio, a avaliação de alterações da cromatina espermática ainda continua possuindo um caráter subjetivo, podendo ocorrer variações na interpretação entre diferentes examinadores (BELETTI, MELLO, 1996).

2.4 Análise computacional de imagem

Nota-se que a avaliação visual de esfregaços de sêmen é de certa forma subjetiva. Na tentativa de se excluir falhas entre os examinadores e ainda aumentar a repetitividade entre os mesmos, tem sido proposto o uso de análise de imagem por computador para avaliação de motilidade, morfologia dos espermatozoides e compactação da cromatina. (BELETTI; COSTA; GUARDIEIRO, 2005; BELETTI; COSTA; VIANA, 2005). A análise computacional da morfologia espermática considera usualmente 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).

Para diminuir a subjetividade, Beletti et al. (2004 e 2005), utilizaram análise de imagem computacional de esfregaços de sêmen corado com azul de toluidina, previamente tratados com HCl 4N. Desta forma, as cores são diferenciadas pelos seus valores de pixels, diminuindo a subjetividade e permitindo a graduação e diferenciação das alterações. Além da diminuição dessa subjetividade, a metodologia permite uma avaliação simultânea da morfometria e da cromatina de cada espermatozoide,

permitindo uma correlação entre estas duas características (BELETTI et al, 2005; SILVA et al, 2008; KANAYAMA e BELETTI, 2011).

Com o uso desta metodologia, Beletti (2004) demonstraram a existência de diversos tipos de alterações de cromatina, existindo variações na localização e na intensidade de descompactação na cromatina. Tais pesquisadores sugeriram uma relação da localização dessas alterações cromatínicas com a matriz nuclear. Esses diferentes tipos de alterações podem possuir diferentes etiologias e consequências sobre a fertilidade do macho (BELETTI et al, 2004).

Apesar das vantagens desta metodologia, como baixo custo e avaliação célula a célula, permitindo a correlação entre morfologia e cromatina, ainda não existem parâmetros bem definidos que permitam indicar os valores em que as alterações identificáveis por essa metodologia começam a interferir na fertilidade do touro.

2.5 Microscopia eletrônica de Transmissão (MET)

Quando os defeitos morfológicos se expressam por alterações em escalas nanométricas(nm), ocorrem falhas nos métodos tradicionais de avaliação, havendo a necessidade do emprego da microscopia eletrônica (JOSHI et al., 2001).

Geralmente, os espermatozoides humanos são espécimes analisados, fixados e corados pela microscopia óptica, que fornece informações valiosas sobre a morfologia e as correspondentes características patológicas destas células. Se as alterações são diferentes no tamanho na fração de um micrôn, então, a aplicação deste método é adequada e útil (WHO, 1992). No entanto, se os defeitos morfológicos pertencem à ordem de alguns nanômetros (nm), o método de microscopia óptica tem de ser substituído pela microscopia eletrônica de transmissão ou de varredura. Zamboni (1987) aplicou esta técnica para estudar a patologia de espermatozoides e avaliar a sua qualidade.

A Microscopia de força atômica tem sido utilizada para investigação de mudanças na membrana plasmática que recobre a região da cabeça dos

espermatozoides de mamíferos como (touro, javali, carneiro, cabra, garanhão, rato e macaco) durante o desenvolvimento pós-testicular, após a ejaculação, e depois de exocitose da vesícula acrossomal (ELLIS, 2002). Ainda de acordo com Ellis (2002) em ejaculados de animais como carneiro, touro, javali ou cabra, os espermatozoides possuem a membrana plasmática pós acrossomal com uma superfície mais irregular do que a que recobre o acrossoma (ELLIS, 2002). A ultra-estrutura dos espermatozoides de vertebrados e invertebrados tem sido intensivamente estudada ao longo de muitos anos, especialmente por microscopia eletrônica de transmissão (MET), (ELLIS et al., 2002; JOSHI et al., 2001).

De acordo com Joshi (2000) a popularização das técnicas de MET na avaliação da infertilidade masculina humana e animal proporcionam a formação de uma base sólida para o melhor entendimento dos processos fisiopatológicos envolvidos e para uma melhor adequação das condutas terapêuticas a serem seguidas. Para a aplicação da técnica de microscopia eletrônica é necessário que o pesquisador conte com o aparato de materiais de laboratório para a preparação das amostras que serão posteriormente analisadas, e também da posse de um microscópio eletrônico de transmissão para análise.

Muitos aspectos relacionados à infertilidade do macho continuam obscuros até o presente, especialmente no que se refere à expressão gênica diferencial da espermatogênese, base inicial dos diversos quadros de infertilidade (JOSHI, 2000). No entanto, com uso da técnica de microscopia eletrônica associada a outras metodologias eficazes poderá ser possível analisar e encontrar possíveis respostas às perguntas relacionadas com problemas de fertilidade do macho, incluindo alterações na ultraestrutura cromatínica. Neste sentido, Araújo (2013) utilizou com bons resultados a microscopia eletrônica de transmissão para avaliar alterações de cromatina em espermatozoides de Peru, obtendo correlação negativa entre número de alterações cromatínicas e a capacidade fecundante do espermatozoide, bem como entre essas alterações e a evolução embrionária.

III. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Obtenção das amostras de sêmen

Foram utilizados sete ejaculados de touros subférteis pertencentes à fazenda experimental da Universidade Federal de Uberlândia- Campus Glória, município de Uberlândia-MG. A coleta de sêmen foi realizada por meio de vagina artificial e após a avaliação da concentração de espermatozoides por contagem em câmara de Neubauer, foi realizada diluição em meio de congelamento tris-gema para obter a concentração de 100×10^6 de espermatozoides por ml. Imediatamente após a diluição o sêmen foi acondicionado em paletas de 0,5 ml e congelado no equipamento TK200, utilizando-se a curva “padrão 1” (40 minutos da temperatura ambiente até 5°C, permanecendo nesta temperatura por uma hora e rápida diminuição de cinco para -120 °C em 10 minutos). As amostras congeladas foram mantidas em container de nitrogênio líquido até sua preparação para análise.

3.2 Avaliação do Sêmen por coloração de azul de toluidina (A.T)

As análises por coloração de azul de toluidina (A.T) foram realizadas no laboratório de Biologia da Reprodução- Instituto de Ciências Biomédicas-UFU. As amostras foram descongeladas em banho-maria 37° C por um minuto. Os esfregaços foram fixados com etanol-ácido acético (3:1, V/V) por um minuto e posterior imersos em etanol a 70% por três minutos. Após esta etapa, foi realizada a hidrólise ácida em HCl 4N a 25°C por 15 minutos, seguido de lavagem em água destilada. Após a secagem da lâmina em temperatura ambiente foi colocado uma gota de azul de toluidina 0,025% em tampão McIlvaine pH 4 (citrato-fosfato sódio) sobre a lâmina e coberta com lamínula (BELETTI, MELLO, 2004). Após três minutos foram obtidas 100 imagens digitais de cada esfregaço, por meio de microscópio óptico Leica

DM500 acoplado a câmera Leica ICC50, utilizando-se objetiva de 100x (imersão) (BELETTI, COSTA, 2003). As imagens foram capturadas digitalmente em tons de cinza.

Utilizando-se algoritmo desenvolvido em ambiente de programação matemática Scilab foram segmentadas de forma semiautomática 100 cabeças de cada amostra.

Para a avaliação da cromatina, após a segmentação das cabeças, estas foram processadas por algoritmos também desenvolvidos em ambiente SCILAB para se obter a média dos valores de pixel que compõem cada uma das cabeças (Silva et al., 2008). Para se ter uma referência da coloração normal da cabeça do espermatozoide, o programa selecionou automaticamente dentre as cabeças de cada esfregaço, as seis mais claras e com coloração mais homogênea. A média dos valores de pixel destas cabeças foi considerada como o valor de referência da coloração normal dos espermatozoides (cabeças padrões) no respectivo esfregaço. Depois, as diferenças entre os valores das cabeças padrões e a média dos valores dos pixel de cada cabeça analisada foram determinadas. Esta diferença foi transformada em porcentagem do valor das cabeças padrões do esfregaço da qual a cabeça foi segmentada. Esta variável quantifica a descompactação da cromatina.

O coeficiente de variação dos níveis de cinza (valores dos pixels) de cada cabeça também foi calculado (SILVAet al., 2008), sendo que esta variável quantifica a heterogeneidade da cromatina no interior da cabeça.

3.3 Análise de citometria de fluxo

Para tal análise foi utilizada uma alíquota de 0,20 mL de amostra diluída foi misturada a 0,40 ml de solução ácida detergente (0,08 M de HCl, 0,15 M NaCl, 0,1% de Triton X-100, pH 1,2). Após 30 segundos, foi adicionado 1,2 mL de solução corante de alaranjado de acridina (AA) contendo 6 µg de AO por ml de solução tampão (0,037 M ácido cítrico , 0,126 M de Na₂HPO₄, 0,0011 M de EDTA di-sódico, 0,15 M de NaCl, pH 6,0) (LEITE et al., 2010).

Após isso, as amostras diluídas em TNE, quando da realização dos esfregaços de sêmen, foram analisadas em citômetro de fluxo BD FACS Canto II, com modelo de software FACSDIVA.

Após 3 minutos do procedimento de coloração, foi realizada a leitura no citômetro de fluxo, avaliando-se a fluorescência de 10.000 estruturas por amostra (EVENSON et al., 1999). Os dados foram exportados para o programa *FlowJo*, o qual gerou gráfico bidimensional com a intensidade de fluorescências verdeno eixo Y e fluorescência vermelhano eixo X. Cada estrutura analisada foi identificada no gráfico como um ponto, geralmente sendo possível visualizar três populações: espermatozoides vermelhos (células anormais), espermatozoides verdes (células normais) e debris celulares (fragmentos de espermatozoides, caudas isoladas, etc). De forma interativa, foram desenhados “gates” (polígonos circundando os pontos), separando cada população e o programa calculou automaticamente a porcentagem de estruturas existente em cada um. Para avaliação da fertilidade foi recalculado a porcentagem de espermatozoides vermelhos dentro do total dos espermatozoides, excluindo-se os debris celulares.

3.4 Microscopia eletrônica de transmissão

Parte de todas as amostras coletadas foram fixadas por imersão em glutaraldeído a 3%, em tampão fosfato a 0,1 M pH 7,4. Posteriormente, para a retirada do fixador, o material foi lavado em tampão fosfato pH 7,4, utilizando-se três ciclos de centrifugação por 5 min a 70 x g, em microtubos de 2 mL, com descarte do sobrenadante e recomposição do volume com a solução tampão. Após a terceira centrifugação, o volume foi recomposto com tetróxido de ósmio 1%. O material permaneceu nesta solução por 30 minutos e mais 30 minutos em tetróxido de ósmio 1% e ferrocianeto de potássio 1,25%. Novamente foi realizada centrifugação e o sobrenadante descartado. Em seguida, foi acrescentado aos microtubos, sobre os pellets, ágar 3% a 50 °C, e foram levados à geladeira (4 °C) por no mínimo um dia.

Com a solidificação do ágar, o material foi retirado dos microtubos obtendo-se uma peça de ágar contendo os espermatozoides, a qual sua extremidade foi dividida em fragmentos de aproximadamente 1 mm³. Estes fragmentos foram desidratados por 5 minutos em banhos de soluções com concentrações crescentes de acetona (50%, 70%, 80%, 90%, 95%) e depois em banhos de 10 minutos cada de óxido de propileno 100%.

Posteriormente, os fragmentos desidratados foram incluídos em resina Epon 812. Para tal, o material foi colocado em microtubo contendo mistura 1:1 de resina e óxido de propileno e os mesmos foram deixados lacrados “overnight” em temperatura ambiente. Em seguida, os microtubos foram abertos e colocados em estufa de 37 °C por quatro horas, posteriormente a mistura de óxido de propileno e resina foi descartada e acrescentada resina Epon 812 nova e pura, deixada por mais duas a quatro horas na estufa 37 °C. Após esse período, os fragmentos foram separados para serem incluídos em formas próprias de inclusão. As formas contendo os fragmentos foram deixadas em estufa a 60 °C por mais três dias, até que a resina polimerizasse totalmente. A partir dos blocos de resina foram obtidos emultramicrótomo cortes ultrafinos (60 a 90 nm), os quais foram contrastados em acetato de uranila e citrato de chumbo conforme descrito por Bozzola e Russel (1998).

As avaliações dos cortes foram realizadas em microscópio eletrônico de transmissão Zeiss EM 109 do laboratório de histologia do ICBIM-UFG.

sendo realizada documentação por imagens digitais obtidas pelo equipamento Megaview5. Foram obtidas de 50 a 100 imagens de cabeças de espermatozoides que foram classificadas como contendo cromatina normal, com alterações leves de cromatina e com alterações intensas de cromatina.

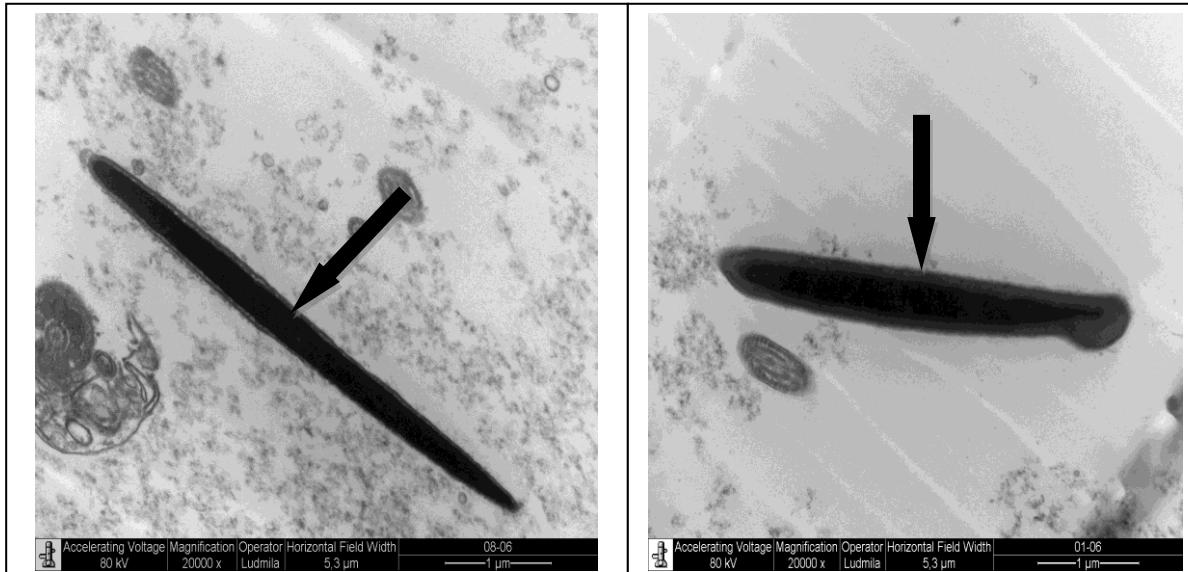
3.5 Análise Estatística

Todas as avaliações estatísticas foram realizadas com o programa S-plus (MathSoft, Inc., 2000), utilizando-se o nível de significância de 5%.

Inicialmente, foi utilizado o teste de Kolmogorov-Smirnov para verificar se os dados possuíam distribuição normal. Como não se obteve distribuição normal, foi utilizado o teste Kruskal-Wallis e como pós-teste, Wilcoxon. Também foi realizado o teste de correlação de Pearson.

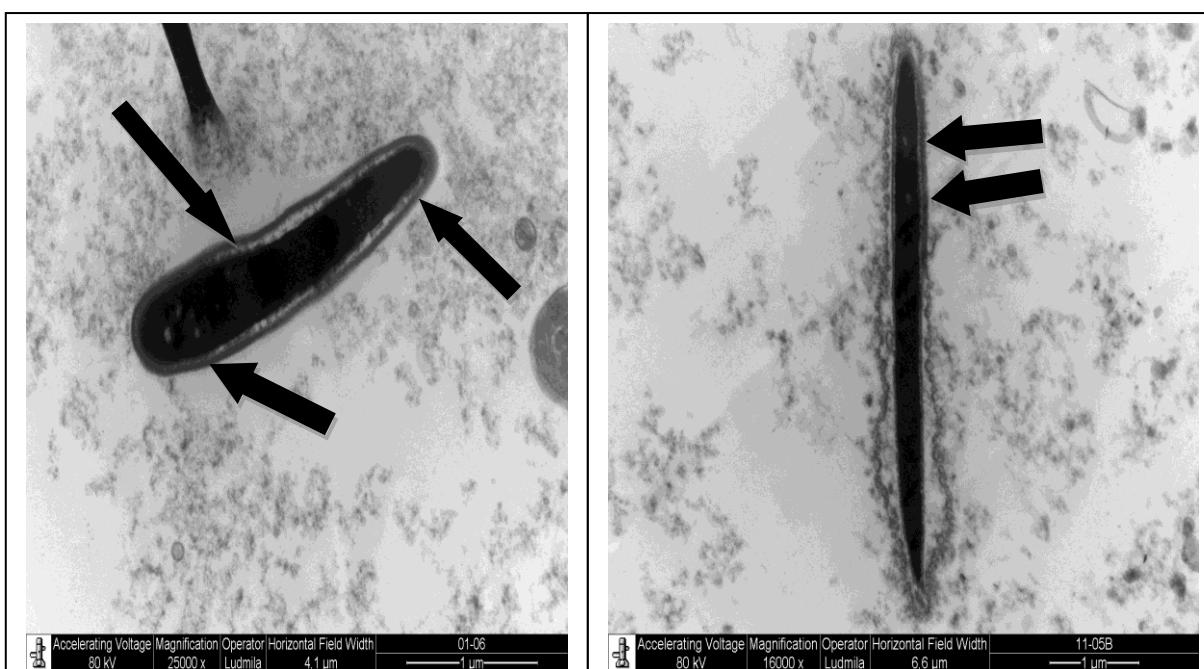
IV.RESULTADO E DISCUSSÃO

Foram consideradas como cabeças normais aquelas com cromatina homogeneamente eletrodensa (negra) (figuras 1.0 e 1.1).



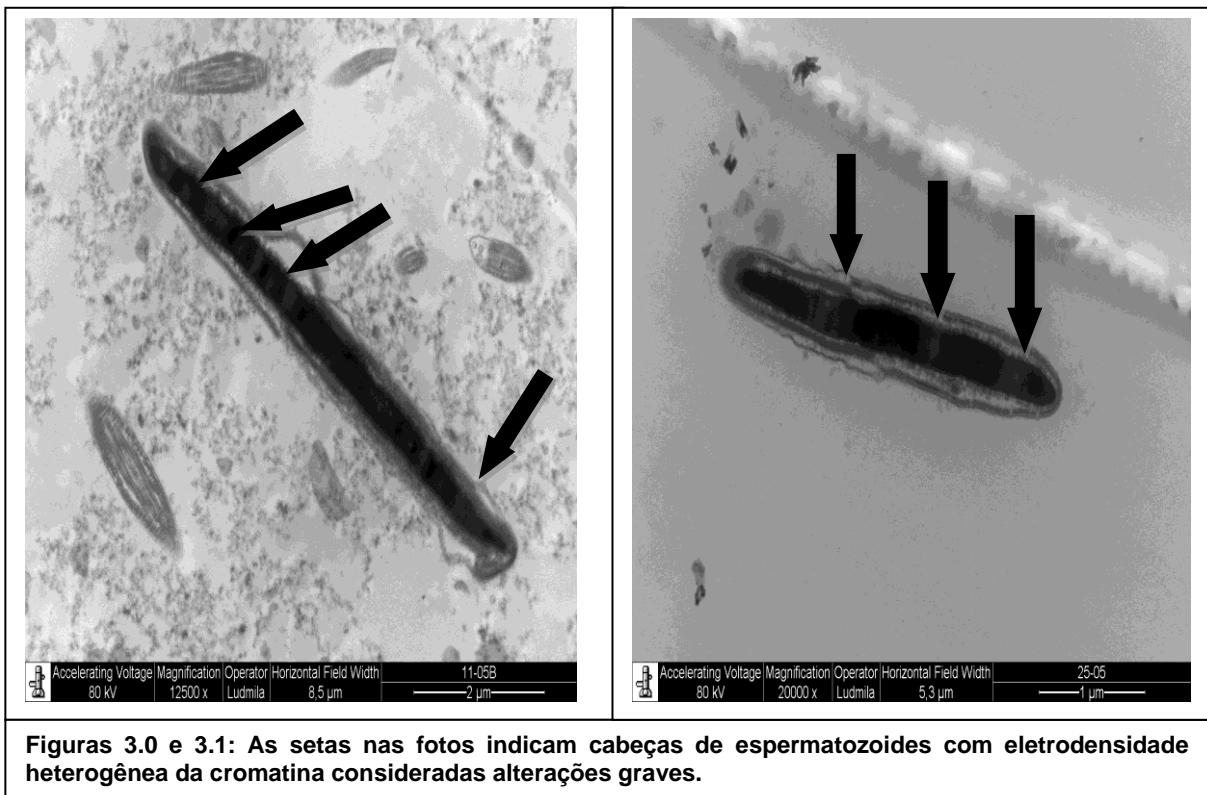
Figuras 1.0 e 1.1: As setas nas fotos indicam as cabeças de espermatozoides bovinos normais com cromatina homogeneamente eletrodensa.

Aquelas cabeças contendo pequenas manchas eletrolúcidas (claras) foram consideradas com alterações leves (figuras 2.0 e 2.1)



Figuras 2.0 e 2.1: As setas nas fotos indicam cabeças de espermatozoides com manchas eletrolúcidas na cromatina consideradas alterações leves.

Já aquelas com grandes manchas eletrolúcidas por toda a cabeça, foram consideradas com alterações cromatínicas graves (figuras 3.0 e 3.1).



As médias e desvios padrão das avaliações das amostras de sêmen por análise de imagem computacional de esfregaços corados com AT, por SCSA e por microscopia eletrônica de transmissão estão demonstrados na Tabela 1.

*Letras diferentes na mesma linha significam diferença estatística entre as médias

	SCSA	Descompactação por AT (%)	Heterogeneidade por AT (%)	ME fraca (%)	ME intensa (%)	ME total (%)
Média	10,09 ^a	4,19 ^{b,f}	6,07 ^{a,f}	30,24 ^{c,g}	44,77 ^{d,g}	75,01 ^e
Desvio Padrão	5,89	1,70	2,43	13,24	21,99	25,63

Tabela 1: Média e desvio padrão das avaliações das amostras de sêmen por análise de imagem computacional de esfregaços corados com AT, por SCSA e por microscopia eletrônica de transmissão.

De acordo com a tabela 1 é possível afirmar que as quantidades de alterações cromatínicas identificadas por microscopia eletrônica de transmissão é maior do que as identificadas SCSA. No entanto, não se pode afirmar o mesmo em relação à avaliação por AT, visto que a microscopia eletrônica verifica a porcentagem de espermatozoides com alterações cromatínicas e as avaliações com

AT tem como resultado a descompactação e a heterogeneidade médias dos espermatozoides que compõem a amostra.

Os coeficientes de correlação entre as alterações cromatínicas identificadas por análise de imagem computacional de esfregaços corados com AT, por SCSA e por microscopia eletrônica de transmissão estão apresentados na Tabela 2.

Os valores marcados com * são estatisticamente significativos

	SCSA (adimensional)	Descompactação por AT (%)	Heterogeneidade por AT (%)	ME fraca (%)	ME intensa (%)
SCSA	1,00				
Descompactação por AT (%)	0,13	1,00			
Heterogeneidade por AT (%)	-0,09	-0,78*	1,00		
ME fraca	0,59*	0,43*	0,02	1,00	
ME intensa	0,57*	-0,12	-0,35	-0,01	1,00
ME total	0,79*	0,13	-0,29	0,51*	0,86*

Tabela 2: Correlação entre as alterações cromatínicas identificadas por análise de imagem computacional de esfregaços corados com AT, por SCSA e por microscopia eletrônica de transmissão
A figura 4 demonstra os dados gerados por citometria de fluxo avaliados pelo software FlowJo, conforme a avaliação realizada pelo SCSA para uma das amostras de sêmen avaliada.

Figura 4. Ensaio da estrutura da cromatina espermática (SCSA) da amostra 2: Citograma, onde os pontos representam cada estrutura avaliada quanto a cor e intensidade da fluorescência e os polígonos (“gates”) demonstram as regiões de espermatozoides verdes (DNA normal), vermelhos (DNA descompactado), e no canto inferior esquerdo restos celulares. Fluorescência com AO, 10.000 estruturas avaliadas.

Já a alta correlação positiva e significativa entre o SCSA e as avaliações por ME, mostram que essas técnicas identificam alterações semelhantes. Contudo, o MET é mais sensível, pois identifica maior número de espermatozoides alterados, apesar do SCSA fazer a leitura de um número maior de células.

A alta correlação positiva e significativa entre a descompactação identificada por AT e as alterações fracas identificadas por MET, mostram que essas técnicas identificam alterações semelhantes. Contudo, não se pode afirmar que o MET seja mais sensível, pois o valor da descompactação por AT é a média da

descompactação das cabeças da amostra e a do SCSA é o número de cabeças alteradas.

Já a alta correlação negativa e significativa entre a descompactação e a heterogeneidade identificadas por AT, demonstra que provavelmente as cabeças são geralmente descompactadas de forma homogênea e que as cabeças com cromatina heterogênea geralmente não coexistem com alterações de descompactação homogênea, sugerindo que ambas possuam etiologias diferentes.

A inexistência de correlação significativa entre o SCSA e a análise de imagem computacional de esfregaços corados com AT, demonstra que as alterações identificadas por estes métodos não são semelhantes.

Como citado por Darrenet al., (2002) a ultraestrutura deespermatozoides em vertebrados e invertebrados tem sido investigada extensivamente ao longo de muitos anos, principalmente por MET. O presente trabalho mostra que, apesar de seu alto custo e complexidade de execução, o uso me microscopia eletrônica de transmissão pode ser muito útil na avaliação de alterações cromatínicas em espermatozoides bovinos.

Apesar dos valores da descompactação identificada por AT serem menores do que por SCSA, não se deve afirmar que possuam diferentes sensibilidades, pois o valor da descompactação por AT é a média da descompactação das cabeças analisadas, ressaltando que a avaliação computacional de esfregaços corados com AT, necessita de etapas metodológicas mais trabalhosas, com maior demanda de tempo e são avaliadas apenas 100 cabeças de espermatozoides por amostra, diminuindo comparativamente sua acurácia.

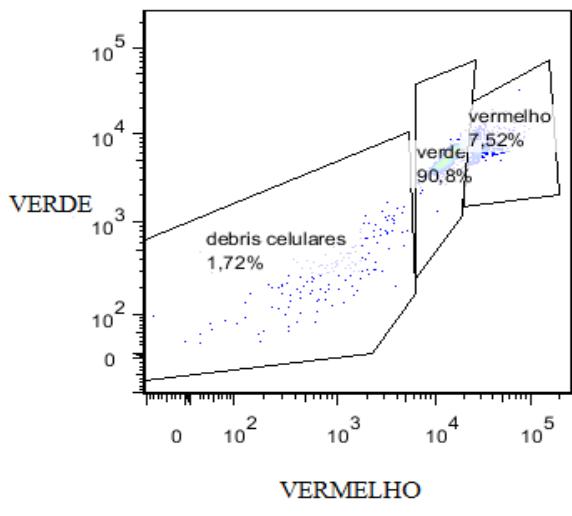
A análise de imagem, como técnica de avaliação de sêmen, tem sido usada inclusive, em diferentes espécies por diferentes pesquisadores, como Gravance et al., (1999) que avaliou também sêmen bovino, Sancho et al., (1998) em ovinos, Kondrachi et al., (2005) em suínos, Arruda et al., (2002) em eqüinos, Gravance e Davis (1995) em coelhos e Higuchi et al., (2001) em ratos. No entanto, essas avaliações foram apenas morfológicas e não foram relacionadas às alterações cromatínicas. Já Beletti et al. (2004), Beletti et al (2005), Silva et al. (2008) avaliando sêmen de touros e Kanayama e Beletti (2011) avaliando sêmen de coelhos, avaliaram alterações cromatínicas utilizando técnica semelhante a utilizada a do presente trabalho.

Este método dispensa o uso de equipamentos de alto custo, viabilizando seu uso como método de rotina na medicina veterinária. Antes da possibilidade da avaliação computacional, o uso do AT também tinha como desvantagem sua subjetividade, porém com o desenvolvimento de algoritmos em Scilabpor Beletti et al. (2005), hoje esta avaliação possui tanta objetividade quanto o SCSA.

O método do SCSA fornece o resultado do número de cabeças alteradas em milhares de cabeças analisadas, realiza uma avaliação rápida, com um diagnóstico facilmente obtido e uma medida de qualidade do sêmen. Como relatado por Evenonet al., (2002) em estudos preliminares em humanos, a integridade da cromatina dos espermatozoides medida pelo método é definida pela susceptibilidade à desnaturação do DNA *in situ*.

Já a técnica de microscopia eletrônica de transmissão é um método trabalhoso e que requer um protocolo complexo e caro. No entanto, a mesma é capaz de fornecer informações relativas à descompactação da cromatina nos espermatozoides, pela visualização de áreas de coloração mais claras que ocorrem devido às falhas na compactação da cromatina espermática.

Apesar deste trabalho não ter avaliado a real influência destas alterações cromatínicas identificadas por microscopia eletrônica de transmissão na fertilidade do macho, baseado nos bons resultados obtidos por Araújo (2013), o qual avaliando sêmen de peru encontrou correlação negativa com a capacidade fecundante dos espermatozoides e com o desenvolvimento embrionário, e baseado na alta correlação entre SCSA e ME obtida no presente trabalho, pode-se inferir que provavelmente a microscopia eletrônica de transmissão seja eficaz na identificação de anomalias de cromatina que interfiram na fertilidade de touros.



V. CONCLUSÕES

É possível concluir que a técnica mais eficiente em detectar alterações cromatínicas é a MET.

A MET identifica alterações semelhantes às identificadas por SCSA. Além disso, a microscopia eletrônica de transmissão é mais sensível para identificação de alterações cromatínicas em espermatozoides de touro do que o SCSA.

As cabeças com cromatina heterogênea não coexistem com alterações de descompactação homogênea, sugerindo que ambas possuam etiologias diferentes.

A análise de imagem computacional de esfregaços corados com AT não identifica as mesmas alterações identificadas pelo SCSA.

VII. REFERÊNCIAS

AITKEN, R.J.; Sperm function tests and fertility. **International Journal of Andrology.**, v.29, p.69-75, 2006.

ALLEN, M.J.; HUD, N.V.; BALOOCH, M.; TENCH, R.J. SIEKHAUS, W. J. AND BALHORN, R. Tip-radius-induced artifacts in AFM images of protamine-complexed DNA fibers. **Ultramicroscopy.**, v.42–44, p.1095–1100, 1992.

ANZAR, M.; H.E.; L, BUHR, M.M.; KROETSCH, T.G.; PAULS, K.P. Sperm apoptosis in fresh and cryopreserved bull semen detected by flowcytometry and its relationship with fertility. **Biol. Reprod.**, v.66, p. 354–360, 2002.

ARAÚJO, D.S. Avaliação de alterações cromatínicas em espermatozoides de perus. 2013. 58f. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Estrutural Aplicadas) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2013.

ARRUDA, R. P.; BALL, B. A.; GRAVANCE, C. G.; GARCIA, A. R.; LIU, I. K. M. Effects of extenders and cryoprotectants on stallion sperm head morphometry. **Theriogenology**, v.58, p.253-256, 2002.

BALHORN, R. A model for the structure of chromatin in mammalian sperm. **J. Cell Biol.**, v.93, p.298-305, 1982.

BALLACHEY, B.E.; EVENSON, D.P.; SAACKE, R.G. The sperm chromatin structure assay. Relationship with alternate tests of semen quality and heterospermic performance of bulls. **J. Androl.**, v.9, p. 109–115, 1988.

BARTH, A.D.; OKO, R.J. Abnormal Morphology of Bovine Spermatozoa, **Iowa State University Press, Ames**, USA, 1989.

BELETTI, M.E.; COSTA, L.F.; GUARDIEIRO, M. M. Morphometric features and chromatin condensation abnormalities evaluated by toluidine blue staining in bull spermatozoa. **Braz. Jour. of Morpho.Scie.**, 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. **Biot.andHistoCh.**, Louisville, v. 79, n. 1, p. 17-23, 2004.

BELETTI, M.E.; MELLO M,L, S.,Methodological variants contributing to detection of abnormal DNA-protein complexes in bull spermatozoa. **Braz. J. Genet.**, v 19, p.97–103, 1996.

BELETTI, M.E.; MELLO, M.L.S. Comparison between the toluidina 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.

BELETTI, M.E.; COSTA, L.F.; GUARDIEIRO, M.M. Morphometric features and chromatin condensation abnormalities evaluated by toluidine blue staining in bull spermatozoa. **Braz. J. Morph. Scie.**, v.22, n.2, p.85-90, 2005.

BELETTI, M. E. Cromatina espermática: quebrando paradigmas. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, Belo Horizonte, v.37, n.2, p.92-96, 2013.

BLOCH, D.P. A catalog of sperm histones. **Genetics. Austin.** v.61, n.1, p.93-111, 1969.

BOZZOLA, J.J.; RUSSELL, L.D. Electron microscopy: principles and techniques for biologists. **Sudbury: Jones and Bartlett Publishers.**, p.670, 1998.

BRITTO, C.M.C.; MELLO, M.L. Induced nuclear metachromasy evaluated in spermatozoa of “ péduro” bulls. **Braz. J. Gen.**, v.11, n.3, p.349-354, 1988.

BURY,N.M.,GUTIÉRREZ,J.F.P.;GARNELO,S.P.; MOREIRA,P.;SANJUANBENIT.O.B .P.; ADÁN, A.G.;MARTÍNEZ, J.F.Relationship between non-return rate and

chromatin condensation of deep frozen bull spermatozoa. **Theriogenology.**, v. 64, p. 232–241, 2004.

CAMPOS,M.N.G., Compactação da cromatina e morfometria de espermatozoides bovinos selecionados e capacitados. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2010.

CAMPOS, M.N.G.; JACOMINI, J.O.; SAMPAIO, G.S.L.; PINTO, D.A.; ALVES, B.G.; LEMOS, M.S.; BELETTI, M.E. Chromatin condensation and morphometry of the bovine sperm head after in vitro sperm selection and capacitation. **Journal of Applied Animal Research.**, v.41, n.1, p.87-92, 2013.

CARREY, E.A.; DIETZ, C.; GLUBB, D. M.; LOFFLER, M.; LUCOCQ, J.M.; WATSON, P.F. Detection and location of the enzymes of de novo pyrimidine biosynthesis in mammalian spermatozoa. **Reproduction.**, v.123, p.757–768, 2002.

CHANG, K.S.; FAN, Y.H.; ANDREEFF, M.; LIU, J.; MU, Z.M. The PML gene encodes a phosphoprotein associated with the nuclear matrix. **Blood.**, v.85, p.3646–3653, 1995.

COCKERILL, P.N.; GARRARD, W.T. Chromosomal loop anchorage of the kappa immunoglobulin gene occurs next to the enhancer in a region containing topoisomerase II sites. **Cell.**, v.44, p.273–282, 1986.

DARREN, J. E.; SADAF S.; PETER, S. J.; ROBERT, M. H.; J. MICHAEL, E.; AMANDA, H. ROY, J. Post-testicular development of a novel membrane substructure within the equatorial segment of ram, bull, boar, and goat spermatozoa as viewed by atomic force microscopy. **J.Stru.Biol.**, v. 138, p. 187–198, 2002.

DOBRINSKI, I.; HUGHES, H.P.; BARTH, A.D. Flow cytometric and microscopic evaluation and effect on fertility of abnormal chromatin condensation in bovine sperm nuclei. **J. Reprod. Ferti.**, v.101, p.531–538, 1994.

D'OCCHIO, M.J.; HENGSTBERGER, K.J.; TUTT, D.; HOLROYD, R.G.; FORDYCE, G.; BOE-HANSEN, G.B.; JOHNSTON, S.D. Spermchromatin in beef bulls in tropical environments. **Theriogenology**, v.79, n.6, p.946-952, 2013.

ELLIS, D.J.; SHADAN, S.; JAMES, P.S.; HENDERSON, R.M. Post-testicular development of a novel membrane substructure within the equatorial segment of ram,bull, boar and goat spermatozoa as viewed by atomic forcemicroscopy. **Journal of Structural Biology**, v.138, p.187-198, 2002.

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

EVENSON D. P.; WIXONR.Clinical aspects of sperm DNA fragmentationdetection and male infertility. **Theriogenology**, v.65, p. 979-991, 2006

EVENSON, D. P.; LARSON, K. L.; JOST, L. K. Sperm chromatin structure assay: its clinical use for detecting sperm DNA fragmentation in male infertility and comparisons with other techniques. **J. Androl.**, v. 23, p.25-43, 2002.

EVENSON, D. P.; JOST, L. K.; MARSHALL, D.; ZINAMAN, M. J.; CLEGG, E.; PURVIS, K.; ANGELIS, P.; CLAUSSEN, O. P.Utility of the sperm chromatin structure assay as a diagnostic and prognostic tool in the human fertility clinic. **Europ.Soc.ofHum.Reprod. andEmbr.**, v.4, p.1039-49, 1999.

FONSECA, V.O. Avaliação reprodutiva de touros para a monta a campo: análise crítica. **Rev. Bras. Repr.** An., suppl.6, p. 36-41, 2009.

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

GARRET, C.; BAKER, H.; W.; G.A new fully automated system for the morphometric analysis of human sperm heads. **Fertil.Steril.**, v.63, p.1306- 1317, 1995.

GILLIAN L.; EVANS G.; MAXWELL W.M.C. Flow cytometric evaluation of sperm parameters in relation to fertility potential. **Theriogenology**., v.63, p.445-457, 2005.

GIORDANO, R.; MAGNANO, A.R.; ZACCAGNINI, G.; PITTOGGI, C.; MOSCUFO, N.; LORENZINI, R.; SPADAFORA, C. Reverse transcriptase activity in mature spermatozoa of mouse. **J Cell Biol.**, v.148, p.1107–1113, 2000.

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

GORDON, I. Reproduction in Cattle and Buffaloes. Controlled Reproduction in Farm Animals Series, **CAB International**, v.1, 1996.

HIGUCHI, H. NAKAOKA, M.; KAWAMURA, S.; KAMIRA, 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**., v.26, n.2, p-75-83, 2001.

HUD, N.V.; ALLEN, M.J.; DOWNING, K.H., LEE, J.; BALHORN, R. Identification of the elemental packing unit of DNA in mammalian sperm cells by atomic force microscopy. **Biochem.Biophys.Res.Commun.**, v.193, p.1347–1354, 1993.

JULIE, B.; BARRY, A, B.; CURTIS G, G.; VICTOR, M.; MINA, C, G.; DAVIES, M. The Effect of Reactive Oxygen Species on Equine Sperm Motility, Viability, Acrosomal Integrity, Mitochondrial Membrane Potential, and Membrane Lipid Peroxidation. **J. Androl.**, v. 21, p.805-902, 2000.

GRAVANCE, C. G.; DAVIS, R. O. Automated sperm morphometry analysis (AS MA) in the rabbit. **J.Androl.**, v.15, n.1, p.88-93, 1995.

HOFMANN,N.;HILSCHER,B.Use of aniline blue to assess chromatincondensation in morphologically normal spermatozoa in normal and infertile men. **Hum. Reprod.**,v.6, p.979 – 982, 1991.

JOSHI N.; MEDINA, H.; CRÚZ, I.; OSUNA, J. Determination of the ultrastructural pathology of human sperm by atomic force microscopy.**Fertility and Sterility.**, v.75, n.5, p.961-66, 2001.

JOSHI N.; MEDINA H.; COLASANTE C.; OSUNA A. Ultrastructural investigation of human spermatozoon by using atomic force microscope. **ArchAndrol.**, v. 44, p.51–7, 2000.

KANAYAMA, C.Y.; BELETTI, M.E .Avaliação computacional da compactação da cromatina e de características morfométricas da cabeça de espermatozoides de coelho (*Oryctolaguscuniculus*). **ArqBras.deMed.Vet. Zootec.**, v. 63, p. 94-99, 2011.

KARABINUS, D.S.; EVENSON, D.P.; JOST, L.K.; BAER, R.K.; KAPROTH, M.T. Comparison of semen quality in young and mature Holstein bulls measured by light microscopy and flowcytometry. **J. Dairy Sci.**,v.73, p. 2364–2371, 1990.

KRAMER,J.A.; KRAWETZ,S.A. Nuclear matrix interactions within the development. sperm genome. **J. Biol. Chem.**, v. 271, p. 11619–11622, 1996.

KONDRACKI S.; BANASZEWSKA, D.; MIELNICKA, C. The effect of age on the morphometric sperm traits of domestic pigs.**Cell.Mol.Biol.**, v. 10, p. 313, **2005**.

LEMOS, M.S. Caracterização morfológica e bioquímica do ânulo nuclear de espermatozoide bovino. 2013.46f. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Estrutural Aplicadas) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2013.

MADRID-BURY, N.; PÉREZ-GUTIÉRREZ J.P.; PÉREZ-GARNELO S.; MOREIRA P.; SANJUANBENITO B.P.; GUTIÉRREZ-ADÁN A.; MARTÍNEZ J.F. Relationship between non-return and chromatin condensation of deep frozen bulls spermatozoa. **Theriogenology**, v.64, p.232-241, 2005.

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

MORREL J.M.; JOHANNISSON A.; DALIN A.M.; HAMMAR L.; SANDEBERT T.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Sperm morphology and chromatin integrity in Swedish warmblood stallions and their relationship to pregnancy rates. **Acta. Vet .Scand.**, v.50, 2008.

OCAMPO, J.; MONDRAGON, R.; ROA-ESPIA, A. L.; CHIQUETE-FELIX, N.; SALGADO, Z.O.; MUJICA, A. Actin, myosin, cytokeratins and spectrin are components of the guinea pig sperm nuclear matrix. **TissueCell.**, v.37, p.293–308, 2005.

OLIVEIRA, L.Z.;HOSSEPIAN DE LIMA, V.F.M.; LEVENHAGEN, M.A.; SANTOS, R.M.; ASSUMPÇÃO, T.I.; JACOMINI, J.O.; ANDRADE, A.F.; ARRUDA, R.P.; BELETTI, M.E. Transmission electron microscopy for characterization of acrosomal damage after Percoll gradient centrifugation of cryopreserved bovine spermatozoa. **Jour. of Veter. Scie.**, v. 12, p. 267-272, 2011.

PITTOGGI, C.; MAGNANO, A.R.; SCIAMANNA, I.; GIORDANO, R.; LORENZINI, R.; SPADAFORA, C. Specific localization of transcription factors in the chromatin of mouse mature spermatozoa. **Mol. Reprod.Dev.**, v.60, p.97–106, 2001.

RISLEY, M.S.; EINHEBER, S.; BUMCROT, D.A. Changes in DNA topology during spermatogenesis. **Chromosoma.**, v.94, p.217–227, 1986.

RODRIGUES, M.P. Perfil oxidativo e avaliação funcional de sêmen criopreservado de touros (*Bos taurus taurus* e *Bos taurus indicus*) criados em clima tropical. Dissertação (Mestrado em Reprodução animal) Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

SPANO M.; KOLSTAD A.H.; LARSEN S.B. The applicability of the flow cytometric sperm chromatin structure assay in epidemiological studies. **Asclepios. Hum. Reprod.**, v.13, p. 2495-505, 1998.

SHAMAN, J.A., PRISZTOKA, R.; WARD, W.S. Topoisomerase IIB and an extracellular nuclease interact to digest sperm DNA in an apoptotic-like manner. **Biol. Reprod.**, v.75, p.741–74, 2006.

SHAMAN, J.A.; YAMAUCHI, Y.; WARD, W.S. Function of the sperm nuclear Matrix. **Arch.of Androl.**, v.53, p.135-140, 2007.

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. **ActaSciAnim Sci.**, v.30, p.473-478, 2008.

SOTOLONGO, B.; LINO, E.; WARD, W. S. Ability of Hamster Spermatozoa to Digest Their Own DNA. **Biol. Reprod.**, v.69, p. 2029–2035, 2003.

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. **Hum. Reprod.**, v.13, p.1864-1871, 1998.

TEJADA, R.I.; MITCHEL, J.C.; NORMAN, A.; MARIK, J.J.; FRIEDMAN, S.A teste for the practical evaluaton of male fertility by Acridine (AO) fluorescence. **Fertility and Sterility.**, v.42, n.1, p.87-91, 1984.

VISHWANATH, R. Artificial insemination: the state of the art. **Theriogenology**, v.59, p.571-584, 2003.

WARD, W.S.; PARTIN, A.W.; COFFEY, D. S. DNA loop domains in mammalian spermatozoa. **Chromosoma.**, v.98, p.153–159, 1989.

WARD, W.S.; KIMURA, Y.; YANAGIMACHI, R. An intact sperm nuclear matrix may be necessary for the mouse paternal genome to participate in embryonic development. **Biol. Reprod.**, v. 60, p.702–706, 1999.

World Health Organization.WHO laboratory manual for the examination of human semen and sperm cervical mucus interaction.Cambridge: **Cambridge University Press**, 1992.

YARON, Y.; KRAMER, J.A.; GYI, K.; EBRAHIM, S.A.; EVANS, M.I.; JOHNSON, M.P.;KRAWETZ, S.A. Centromere sequences localize to the nuclear halo of human spermatozoa. **Int. J.Androl.**, v.21, p.13–18, 1998.

ZALENSKAYA, I.A.; BRADBURY, E.M.;ZALENSKY, A.O. Chromatin structure of telomere domain in human sperm. **Biochem. Biophys.Res.Commun.**, v.279, p.213–218, 2000.

ZAMBONI,L. The ultrastructural pathology of the spermatozoon as a cause of infertility: the role of electron microscopy in the evaluation of semen quality **Fertil. Steril**, v. 48, p. 711–34, 1987.

