

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

PAULO HENRIQUE MAZZUTTI ALVES

CORRELAÇÃO ENTRE ALTERAÇÕES NUCLEARES DE ESPERMATOZOIDES  
DE TOURO IDENTIFICADOS POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE  
TRANSMISSÃO E A EFICIÊNCIA NA PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES

UBERLÂNDIA  
2016

PAULO HENRIQUE MAZZUTTI ALVES

CORRELAÇÃO ENTRE ALTERAÇÕES NUCLEARES DE ESPERMATOZOIDES  
DE TOURO IDENTIFICADOS POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE  
TRANSMISSÃO E A EFICIÊNCIA NA PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES

Dissertação apresentada ao Programa de  
Pós-Graduação em Ciências Veterinárias  
da Universidade Federal de Uberlândia  
como requisito parcial à obtenção do  
título de mestre.

Área de concentração: Produção animal

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Emílio  
Beletti

UBERLÂNDIA  
2016

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)  
Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

---

- A474c  
2016      Alves, Paulo Henrique Mazzutti, 1989  
Correlação entre alterações nucleares de espermatozoides de touro identificados por microscopia eletrônica de transmissão e a eficiência na produção in vitro de embriões/ Paulo Henrique Mazzutti Alves. - 2016. 46 f. : il.
- Orientador: Marcelo Emílio Beletti.  
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias.  
Inclui bibliografia.
1. Veterinária - Teses. 2. Touro - Fecundidade - Teses. 3. Cromatina - Teses. 4. Bovino - Espermatozoides - Teses. I. Beletti, Marcelo Emílio. II. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias. III. Título.

## AGRADECIMENTOS

*A Universidade Federal de Uberlândia,*  
instituição que forneceu infraestrutura e material pessoal para execução desta pós-graduação.

*Ao prof. Dr. Marcelo Emilio Beletti,*  
por estar ao meu lado há 9 anos me orientando desde a graduação até este momento. Este é um exemplo de profissional que ama o que faz, que me inspira a pesquisar e estudar cada vez mais. Agradeço por fazer parte de mais uma etapa da minha vida.

*Ao laboratório de Biologia da Reprodução*  
que permitiu a realização da maior parte prático do projeto. Agradeço aos demais alunos, Sara e Alexsandra que participaram e colaboraram para a execução de tudo isso.

*Ao Departamento de Ciências Biomédicas da Universidade Federal do Triângulo Mineiro (UFTM),*  
através da Maria das Graças e do João Nolberto que me acolheram como um amigo e me permitiram executar parte do projeto no laboratório de microscopia eletrônica.

*Ao Frigorífico Real*  
que forneceu material para execução das rotinas de fertilização *in vitro*, sendo um parceiro fundamental para todo o projeto.

## RESUMO

Alterações de cromatina espermática tem sido estudada nas diversas espécies animais por serem consideradas um importante fator relacionado a infertilidade que prejudicam os resultados de biotécnicas reprodutivas. O objetivo ao realizar este trabalho foi verificar as alterações de cromatina de espermatozoides bovinos em microscopia eletrônica de transmissão, classificando-as e correlacionando-as com os resultados na produção *in vitro* de embriões (PIVE). Bovinos mestiços entre 30 e 36 meses de idade foram submetidos à insulação escrotal por 72 horas e ejaculados foram coletados semanalmente durante 60 dias. Amostras de sêmen dos ejaculados foram processados e as alterações de cromatina avaliadas em microscopia eletrônica de transmissão e classificadas em 5 categorias, de acordo com a intensidade da alteração. Rotinas de PIVE foram realizadas semanalmente para avaliar as taxas de clivagem e formação de blastocistos ao utilizar estes ejaculados. Os resultados das rotinas de PIVE não tiveram correlação com as alterações de cromatina avaliadas em microscopia eletrônica de transmissão. Os poucos espermatozoides encontrados com alterações mais intensas de cromatina tinham morfologia também alterada. Pequenos pontos mais claros foram encontrados com grande frequência próximo à inserção do flagelo. Conclui-se que ao avaliar entre 100 e 200 imagens de secções de cabeças de espermatozoides por ejaculado, em microscopia eletrônica de transmissão, não foi possível verificar influência das alterações de cromatina nos resultados da PIVE.

**Palavras-chave:** Touros; Integridade de Cromatina; Percoll; FIV

## **ABSTRACT**

Sperm chromatin changes has been studied in several animal species to be considered an important factor related to infertility that impair the results of reproductive biotechnologies. The aim of this work was to verify the bovine sperm chromatin changes in transmission electron microscopy, classifying and correlate them with the results of in vitro embryo production (IVP). Crossbred cattle between 30 and 36 months were subjected to scrotal insulation for 72 hours and ejaculates were collected weekly for 60 days. Semen samples of ejaculates were processed and chromatin changes evaluated in transmission electron microscopy and classified into 5 categories according to the intensity of the change. IVP routines were performed weekly to evaluate cleavage and blastocyst rates when using these ejaculates. The results of IVP routines were not correlated with the chromatin changes evaluated in transmission electron microscopy. The few spermatozoa found with more intense changes in chromatin also had morphology changed. Small light dots were found very frequently near to the insertion of the flagellum. It is concluded that when evaluating between 100 and 200 images of sections of sperm heads per ejaculate in transmission electron microscopy, it was not possible to verify the influence of chromatin changes in the results of IVP.

**Keywords:** Bulls; Chromatin Integrity; Percoll; IVF

## LISTA DE ILUSTRAÇÃO

<b>Figura 1</b> – Corte de uma cabeça de espermatozoide sem alteração nuclear .....	25
<b>Figura 2</b> – Corte de uma cabeça de espermatozoide com uma região do núcleo um pouco mais clara.....	26
<b>Figura 3</b> – Corte de uma cabeça de espermatozoide com a presença de um pequeno ponto bem claro no núcleo.....	26
<b>Figura 4</b> – Corte de uma cabeça de espermatozoide com a presença de poucos pontos bem claros no núcleo.....	27
<b>Figura 5</b> – Corte de uma cabeça de espermatozoide com a presença de algumas regiões do núcleo levemente mais claras.....	28
<b>Figura 6</b> – Corte de uma cabeça de espermatozoide com a presença de grandes áreas do núcleo levemente mais claras.....	29
<b>Figura 7</b> – Corte de uma cabeça de espermatozoide com a presença de vários pontos bem claros no núcleo.....	30
<b>Figura 8</b> – Corte de uma cabeça de espermatozoide com uma região de mais de 50% do núcleo mais clara .....	31
<b>Figura 9</b> – Corte de uma cabeça de espermatozoide com uma grande área do núcleo mais clara acompanhada de morfológica da cabeça.....	32
<b>Figura 10</b> – Corte de uma cabeça de espermatozoide com uma grande área do núcleo mais clara acompanhada de morfológica da cabeça.....	32
<b>Figura 11</b> – Corte de uma cabeça de espermatozoide com várias áreas do núcleo mais claras acompanhada de alteração morfológica da cabeça .....	33
<b>Figura 12</b> – Corte de uma cabeça de espermatozoide com pequeno ponto do núcleo claro próximo à inserção do flagelo .....	33
<b>Figura 13</b> – Corte de uma cabeça de espermatozoide com vários pequenos pontos do núcleo claros próximo à inserção do flagelo.....	34

## LISTA DE TABELAS

**Tabela 1:** Classificação dos espermatozoides avaliados na microscopia eletrônica de transmissão de acordo com os graus de alteração de cromatina de bovinos. ....24

**Tabela 2:** Resultados da PIVE utilizando sêmen de animais insulados e do animal padrão de central de sêmen.....24

**Tabela 3:** Correlação geral entre as alterações classificadas em microscopia eletrônica de transmissão com os resultados da PIVE .....25



## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<b>AT</b>	<i>Azul de toluidina</i>
<b>BSA</b>	<i>Albumina sérica bovina</i>
<b>CGP</b>	<i>Célula germinativa primordial</i>
<b>DNA</b>	<i>Ácidos desoxirribonucleico</i>
<b>FIV</b>	<i>Fertilização in vitro</i>
<b>FSH</b>	<i>Hormônio folículo estimulante</i>
<b>LH</b>	<i>Hormônio luteinizante</i>
<b>MAR</b>	<i>Região de anexação da matriz</i>
<b>MET</b>	<i>Microscópio eletrônico de transmissão</i>
<b>PIVE</b>	<i>Produção in vitro de embriões</i>
<b>ROS</b>	<i>Espécies reativas do oxigênio</i>
<b>SBH</b>	<i>Ensaio sperm-bos-halomax</i>
<b>SCSA</b>	<i>Análise da estrutura da cromatina espermática</i>
<b>SFB</b>	<i>Soro fetal bovino</i>
<b>SOF</b>	<i>Fluido sintético do oviduto</i>
<b>TALP</b>	<i>Tyrode albumina lactato piruvato</i>
<b>TCM</b>	<i>Meio de cultura de tecidos</i>

## SUMÁRIO

<b>1 - INTRODUÇÃO .....</b>	<b>10</b>
<b>2 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>12</b>
2.1 – Espermatogênese .....	12
2.2 – Alterações de cromatina.....	13
2.3 – Avaliações de cromatina.....	14
2.4 – Produção <i>in vitro</i> de embriões .....	15
<b>3 - OBJETIVOS.....</b>	<b>18</b>
3.1 – Objetivos Gerais .....	18
3.2 – Objetivos Específicos .....	18
<b>4 – MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>19</b>
4.1 – Reagentes .....	19
4.2 – Insulação escrotal e coleta de sêmen .....	19
4.3 – Produção <i>in vitro</i> de embriões .....	19
4.3.1 – Coleta de ovários, aspiração e seleção de ovócitos .....	19
4.3.2 – Maturação dos ovócitos.....	20
4.3.3 – Seleção espermática .....	20
4.3.4 – Fertilização <i>in vitro</i> .....	21
4.4 – Microscopia eletrônica de transmissão .....	21
4.5 – Delineamento experimental .....	23
4.6 – Análise dos dados .....	23
<b>5 – RESULTADOS .....</b>	<b>24</b>
<b>6 – DISCUSSÃO .....</b>	<b>35</b>
<b>7 –CONCLUSÃO.....</b>	<b>37</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>38</b>
<b>ANEXO A.....</b>	<b>46</b>

## 1 - INTRODUÇÃO

Biotecnicas reprodutivas são desenvolvidas cada vez mais buscando suprir defeitos ou dificuldades de indivíduos de se reproduzirem, no caso de humanos, e também para acelerar a seleção genética e melhorar os ganhos produtivos, no caso de animais de produção. A produção *in vitro* de embriões é uma destas biotecnicas que permite, por meio da manipulação em ambiente controlado, simular o que aconteceria naturalmente na reprodução de mamíferos, desde a seleção e maturação de ovócitos, seleção e capacitação de espermatozoides, até a fecundação e desenvolvimento inicial do embrião.

A produção do espermatozoide ocorre por um processo de transformação de células germinativas que ocorre nos túbulos seminíferos, em que após etapas de proliferação e diferenciação, uma célula com DNA muito compactado será formada e capacitada a transportá-lo de forma segura até o ovócito. (ROOSEN-RUNGE, 1977) (RUSSEL et al.; 1990; BANKS, 1992). Esta compactação ocorre pela substituição de histonas, que são proteínas nucleares ligadas ao DNA das células, por protaminas, outras proteínas específicas que se ligam ao DNA espermático garantindo-lhes uma conformação mais compacta, protegendo-o de oxidação e favorecendo o seu transporte (OLIVA, 2006). Durante a espermatogênese, alterações na compactação da cromatina podem ocorrer, de forma variada entre ejaculados, assim como a raça do animal, podendo aparecer em 0,53 a 8% dos espermatozoides de um sêmen bovino após a diluição em crioprotetores para congelamento. (DOBRINSKI et al., 1994; DUTY et al., 2002; KHALIFA et al., 2008; KRZYZOSIAK et al., 2000).

Animais com boa qualidade seminal possuem porcentagens baixas de danos de DNA (DOBRINSKI et al., 1994; SIMÕES, 2010; WATERHOUSE et al., 2010; NAJA-TRUJILLO et al., 2011), porém mesmo com o avanço da técnica de produção *in vitro* de embriões (PIVE), o índice de blastocistos formados a partir dos ovócitos inicialmente selecionados é de 35-40%, enquanto o índice de prenhez em relação ao número de embriões transferidos é de 40-60% (KANE et al, 2003; RUBIN 2006).

A avaliação de cromatina não faz parte dos parâmetros aviados em um espermograma de rotina, mas a relação negativa entre a descompactação da cromatina com a fertilidade do touro e o desenvolvimento embrionário tem sido relatada em vários trabalhos (MUKHOPADHYAY et al., 2011; WATERHOUSE et al., 2006; NAVA-TRUJILLO et al., 2011, 2012; ENCISO et al, 2011).

Para observar as alterações de cromatina, o azul de toluidina (AT) tem sido um corante catiônico de baixo custo que exhibe um fenômeno metacromico ao se ligar a grupos fosfatos do DNA, principalmente onde ele se apresenta mais descompactado (BELETTI et al., 2005; NAVA-TRUJILLO et al., 2012).

A microscopia eletrônica de transmissão (MET) é utilizada para avaliar a descompactação de cromatina por apresentar mais detalhes das alterações (WALTERS et al., 2004), que não podem ser visualizadas com microscopia comum (KHALIFA et al., 2008). A seleção de touros com baixas taxas de descompactação de cromatina de espermatozoides pode ser uma ferramenta para melhorar os índices reprodutivos das biotecnica.

## 2 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 – Espermatogênese

O processo de transformação das espermatogônias, células diploides e pouco diferenciadas em espermatozoides, células haploides altamente especializadas, é conhecido como espermatogênese. Em bovinos ela dura cerca de 61 dias seguida pela maturação dos espermatozoides no epidídimo (RAHMAN et al., 2011).

Na espermatogênese, as espermatogônias iniciam uma sequência de divisões mitóticas e as novas células passam a ser chamadas espermatogônias (AUSTIN & SHORT, 1993). Em bovinos foram identificadas espermatogônias classificadas em A0, A1, A2, A3, intermediárias, B1 e B2 (BARTH & OKO, 1989). As células intermediárias podem ser consideradas as primeiras comprometidas a seguir a diferenciação até formar o espermatozoide (GILBERT, 2003). Os espermatócitos primários de origem da última divisão mitótica das espermatogônias B permanecem unidos por pontes citoplasmáticas e iniciarão um processo de divisão meiótica, formando espermatócitos secundários. Estes iniciarão outra divisão meiótica formando as espermátides (AUSTIN & SHORT, 1993; BARTH & OKO, 1989). As espermátides passam por um processo de diferenciação em que são envolvidos três processos: a compactação da cromatina nuclear, a formação de enzimas do acrossoma pelo complexo de Golgi e o desenvolvimento do flagelo com sua implantação no núcleo (HOLSTEIN, 2003).

Em estudo prévio Goto et al. (1996) descreveu o tamanho de espermatócitos primários com diâmetro maior que 20µm, enquanto as espermátides apresentaram diâmetro variando de 9-11µm. Isto ocorre principalmente devido a substituição de proteínas histonas de células somáticas, que são envolvidas pelo DNA, inicialmente formando estruturas solenoides (McGHEE et al., 1983), pouco compactadas e que durante a espermatogênese são substituídas por histonas intermediárias, específicas do espermatozoide e, em seguida, trocadas novamente por proteínas de transição, até a última substituição por protaminas, tornando o DNA muito compactado (NEILL, 2006), e com um genoma temporariamente quiescente (BALHORN, 2011).

Existem regiões em que as histonas variantes são mantidas em pequenas proporções, sendo importantes sítios de sinalização epigenética, podendo estar relacionadas com a ativação de genes, inclusive genes *imprinted* paternos (HALES et al., 2011; BALHORN, 2011; JOHNSON et al., 2011; CARREL, 2012). Gineitis et al. (2000) e Zalenskaya et al. (2000) acreditam que as histonas podem estar associadas aos

telômeros, estruturas constituídas por fileiras repetitivas de proteínas e DNA não codificante, e aos primeiros eventos do espermatozoide que respondem aos sinais do ovócito, resultando na formação do pro-núcleo masculino.

Após a formação dos espermatozoides, eles são liberados na luz dos túbulos seminíferos e ao passarem pelo epidídimo ocorrem algumas mudanças, como o término da condensação do núcleo por meio de pontes dissulfídicas (BARTH & OKO 1989). A estrutura e organização da cromatina do espermatozoide garantem a integridade do genoma paterno e o protege durante o percurso no trato genital masculino e feminino (OLIVA, 2006; SHARMA & AGARWAL, 2011), além de facilitar o transporte devido a sua forma pequena e hidrodinâmica (BALHORN, 2011).

O processo de condensação da cromatina espermática inicia no sentido da região apical para a caudal e cada protamina é ligada a cerca de 50 mil pares de base de DNA formando estruturas denominadas toróides (OKO et al., 1996; BALHORN, 1982). Este processo exige que inicialmente as fitas de DNA sofram quebras pela ação da enzima topoisomerase II beta, para que sejam reorganizadas junto às protaminas. Ao término da protaminação, o DNA deve ser reparado, uma vez que compactado perde a capacidade de reparação e se torna quiescente (WARD, 2011). Um modelo proposto por Sotolongo (2003) sugere que entre os toróides de protamina existam alças de DNA que fixariam a cromatina à matriz nuclear em regiões de anexação da matriz (MARs). Essas alças teriam ainda regiões denominadas *DNase-sensitive-toroid-linker*, provavelmente relacionadas a fragmentação de DNA danificado evitando que seja transferido para o embrião durante a fertilização. As argininas das protaminas carregadas positivamente neutralizam os grupamentos fosfato carregados negativamente e evita que haja repulsão entre as fitas de DNA, garantindo uma organização linear como uma estrutura lamelar para compactação no menor volume possível (BALHORN, 1982).

## **2.2 – Alterações de cromatina**

A falha na compactação de cromatina torna o DNA exposto à danos que podem ser causados por quebras durante o remodelamento da cromatina, fragmentação pós-testicular induzida por espécies reativas de oxigênio, fragmentação induzida por endonucleases e caspases, quimioterapias e radioterapias, bem como fatores ambientais (BENCHAIIB et al., 2003; ALVAREZ, 2005; TAVALAEE et al., 2009; SAKKAS & ALVAREZ, 2010).

Estudos demonstram que o processo de criopreservação provoca danos ao DNA espermático de humanos (ROYERE et al., 1991; HAMMADEH et al., 2001), suínos (FRASER et al., 2011), bovinos (BALLACHEY et al., 1987; GURLER et al., 2016) e de carneiros (PERIS et al., 2004), induzidos pelo estresse oxidativo causado por espécies reativas do oxigênio (ROS) (BAUMBER et al., 2003; LEWIS E AITKEN, 2005). O aumento da concentração de peróxido de hidrogênio no sêmen é o principal fator correlacionado com o aumento ao dano do DNA espermático após a criopreservação, pela ruptura da cadeia de DNA (FRASER et al., 2011; BALL & BAUMBER, 2001). Associado a isso, mudanças osmóticas na célula e os cristais de gelo formados provocam o relaxamento da cromatina e possibilitam a fragmentação do DNA espermático por ruptura física da estrutura terciária do complexo DNA-protamina (JOHNSTON et al., 2012).

O plasma seminal possui uma capacidade antioxidante natural que varia entre touros, mas que se mantém a mesma entre ejaculados (GÜRLER et al., 2015), mas a falta de mecanismos funcionais de reparação de DNA (AHMADI & NG, 1999) torna os espermatozoides mais vulneráveis ao ataque oxidativo em relação a outras células (RATH et al., 2009).

### **2.3 – Avaliações de Cromatina**

Atualmente o azul de toluidina (AT) é o corante nuclear de eleição na avaliação de cromatina e determinação da morfometria de cabeça de espermatozoides avaliados em microscopia de luz e processados mediante o uso de sistemas computadorizados (BELETTI et al., 2005; NAVA-TRUJILLO et al., 2012; BELETTI 2013).

Existem outros métodos utilizados para detectar a fragmentação da cromatina de espermatozoides como o ensaio da estrutura da cromatina espermática (SCSA®), que avalia a susceptibilidade do DNA à desnaturação em um citômetro de fluxo pela fluorescência do corante alaranjado de acridina, e o ensaio *sperm-bos-halomax* (SBH), com base na migração do DNA de espermatozoides digeridos (PERIS et al., 2004; EVENSON, 2011; GARCÍA-MACÍAS et al., 2007; HALLAP et al., 2005).

A microscopia electrónica de transmissão também pode ser considerada como um método adequado para a avaliação da descompactação de cromatina de espermatozoides, permitindo a observação de vacuolização nuclear, decorrentes de uma condensação incompleta (WALTERS et al., 2004), que não pode ser visualizada em microscopia de contraste de fase (KHALIFA et al., 2008) ou por coloração com azul de toluidina (BELETTI e MELLO, 1996).

## **2.4 – Produção *in vitro* de embriões**

Os ovócitos primários aspirados para a produção *in vitro* de embriões estão na fase de diplóteno da prófase I (VAN DEN HURK; ZHAO, 2005). A maturação destes ovócitos com a continuação da meiose é estimulada pela simples retirada do ambiente folicular, visto que este contém substâncias que inibem a maturação (LONERGAN et al.; 2003).

Ao aspirar os folículos, os complexos cumulus-ovócito são coletados e sua integridade é importante para o processo posterior. As células do cumulus tem importante função no crescimento e maturação do ovócito. Uma série de transformações nucleares e citoplasmáticas por meio de mudanças estruturais e bioquímicas tornam o gameta maturado ou apto a fecundação e desenvolvimento embrionário (GONÇALVES et al., 2007).

Na técnica de PIVE, consideramos que o ovócito está completamente maturado quando as células dos cumulus estão expandidas, devido a ação do hormônio luteinizante (LH) (GONÇALVES, 2008; VAN DEN HURK & ZHAO, 2005). O hormônio folículo estimulante (FSH) estimula a síntese de esteroides e receptores para LH, participando como coadjuvante na maturação (MARTINS et al.; 2008).

A capacitação espermática é um processo associado a mudanças bioquímicas e fisiológicas para hiperativação e orientação da motilidade para ligação à zona pelúcida (FLORMAN et al., 2008). Na PIVE, proteínas aderidas à membrana na região do acrossoma e crioprotetores precisam ser removidos durante a capacitação (RODRIGUEZ-MARTINEZ, 2007). Este processo é feito em meios de seleção que devem isolar a maior concentração de células normais em sua estrutura e fisiologia, eliminando espermatozoides mortos e outras células como leucócitos e bactérias, e remover substâncias bioativas ou tóxicas como as espécies reativas ao oxigênio (ROS) (HENKEL & SCHILL, 2003).



Em um ambiente com condições adequadas para o metabolismo celular, os ovócitos maturados e os espermatozoides capacitados e em concentração ajustada são colocados para que ocorra a fecundação. Ocorrido a fecundação, os ovócitos maturados e em metáfase II, completam a segunda divisão meiótica, extrusam o segundo corpúsculo polar e formam o pró-núcleo feminino. Concomitantemente, a membrana nuclear espermática se rompe, a cromatina é descondensada e forma-se o pró-núcleo masculino. A fusão destes formará o núcleo diploide do zigoto, que se multiplicará até a formação de um novo indivíduo (GONÇALVES et al, 2008).

O cultivo dos embriões é realizado em meios que simulam a condição dos fluidos do útero e tuba uterina durante o início da gestação. Alterações neste ambiente podem comprometer as etapas de clivagem, ativação do genoma, formação de blastocisto (NAGAI, 2001; LONERGAN et al., 2003).

A integridade da cromatina espermática se tornou mais importante após a intensificação do uso de biotecnicas reprodutivas como a injeção intracitoplasmática de espermatozoide na produção *in vitro* de embriões (PIVE), em que o processo de seleção natural não existe, possibilitando maior transmissão de alterações genéticas (LEWIS & AITKEN, 2005; ERENPREISS et al., 2006; FATEHI et al., 2006).

Qualquer alteração na membrana, integridade acrossomal, potencial energético, oxidação celular, fragmentação de cromatina e nível de condensação pode levar a diminuição do potencial de fertilização do espermatozóide (PUGLISI et al., 2012; SELLEM et al., 2015). Para afirmar isso, Sellem et al. (2015) utilizaram sêmen em condições normais e sob estresse induzido para maximizar as diferenças entre ejaculados e melhorar a correlação com a fertilidade.

A integridade da cromatina e as dimensões da cabeça do espermatozoide estão relacionadas com o potencial reprodutivo do touro (GRAVANCE et al., 2009). Estudos recentes revelaram que existe correlação entre cromatina danificada e a largura, área e elipse dos espermatozoides (ENCISO et al., 2011; NAVA-TRUJILLO et al., 2013). Essas alterações na forma da cabeça decorrentes das alterações cromatínicas, alterariam a hidrodinâmica da célula e de acordo com a severidade do dano, poderiam reduzir a motilidade, interferir no processo de fecundação, interferir na formação de pró-núcleo masculino e no desenvolvimento embrionário ou mesmo em caso de nascimento, os neonatos poderiam ter alterações genéticas (BELETTI, 2013).

O aumento nos níveis de fragmentação do DNA estaria relacionado com baixas taxas de fertilização, implantação do embrião e altas taxas de aborto (CARRELL

et al, 2003; SELI et al, 2004; VIRRO et al, 2004; LEWIS & AITKEN , 2005; MESEGUER et al, 2008;.. AITKEN et al, 2009; SAKKAS & ALVAREZ, 2010).

Os defeitos na compactação da cromatina podem levar a um atraso na iniciação da fase S zigótica (EID et al., 1994), aumentar o comprimento da fase G2 zigótica (EID E PARRISH, 1995) e bloquear a expressão do genoma do embrião na fase de quatro a oito células levando a apoptose da célula (FATEHI et al., 2006), reduzindo o número de embriões morfologicamente normais (SMORAG et al., 2000).

Em touros, a influência da qualidade da cromatina paterna ainda é controversa, com trabalhos indicando que o desenvolvimento de embriões *in vitro* não foi influenciado pela integridade do DNA (SIMÕES, 2010), e outros concluindo que os danos de DNA não afetam a fertilização e sim o desenvolvimento embrionário (FATEHI et al., 2006).

### **3 – OBJETIVOS**

#### **3.1 - Objetivos gerais**

Classificar a presença de alterações nucleares avaliadas por MET e verificar sua influência na eficiência da fertilização *in vitro*.

#### **3.2 - Objetivos específicos**

Realizar rotinas semanais de produção *in vitro* de embriões com as partidas de sêmen de animais com alteração testicular induzida e de animais com boa qualidade seminal.

Realizar o levantamento das alterações nucleares identificadas por microscopia eletrônica de transmissão nas partidas de sêmen de animais com alteração testicular induzida.

Verificar a relação existente entre as alterações nucleares com os resultados de clivagem e formação de blastocistos das rotinas de PIVE.

## **4 - MATERIAL E MÉTODOS**

Esse projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisas da Universidade Federal de Uberlândia, segundo o parecer 031/12.

### **4.1 – Reagentes**

Os reagentes utilizados neste trabalho foram adquiridos da Sigma (Sto Louis MO, USA). Todos os meios utilizados para PIVE foram produzidos no laboratório de Biologia da Reprodução da Universidade Federal de Uberlândia.

### **4.2 – Insulação escrotal e coleta de sêmen**

O escroto com os testículos de touros mestiços selecionados aleatoriamente, com idade de 30 a 36 meses, pesando entre 500-550 Kg e com boa qualidade seminal (motilidade > 80% e patologias <30%) foram envolvidos por algodão e saco plástico durante dois dias (insulação escrotal).

Uma primeira amostra de sêmen foi coletada antes da insulação escrotal, e após isto, semanalmente foram realizadas novas coletas durante 60 dias, utilizando vagina artificial, totalizando 58 amostras. As amostras coletadas foram padronizadas a uma concentração de 40 milhões de espermatozoides móveis em diluente TRIS-gema e glicerol a 6,5% (CHACUR et al., 2012), envasadas em palhetas de 0,5 mL e congeladas automaticamente em equipamento modelo 3000 Compacta da marca TK (Uberaba, MG, Brasil). As amostras congeladas foram mantidas em botijões de nitrogênio líquido.

Amostras de sêmen de um touro normalizador, de uma central de sêmen, pré testados e com bons resultados na PIVE também foram utilizados.

### **4.3 – Produção *in vitro* de embriões**

#### **4.3.1 – Coleta de ovários, aspiração e seleção de ovócitos**

Ovários de vacas foram coletados em um frigorífico e mantidos em solução salina com antibiótico (Gentamicina 50µg/µL) à temperatura de 36 a 38°C. Eles foram

transportados até o laboratório em garrafa térmica. Ovócitos de folículos com diâmetro entre 3 e 8mm foram aspirados e mantidos a 38,5 °C em tubo de 50mL em banho maria. Estes foram transferidos para uma placa de petri descartável 100x20mm e avaliados. Aqueles com pelo menos quatro camadas de células do *cumulus* e citoplasma homogêneo, classificados como grau I e II (GONÇALVES et al., 2008), foram selecionados e lavados em meio de lavagem contendo TCM 199 com sais de Hank's (8,55mg/mL), gentamicina (50µg/µL), 10% de soro fetal bovino (SFB), HEPES ácido (2,16mg/mL), HEPES sódico (2,34mg/mL) e bicarbonato de sódio (0,38mg/mL).

#### 4.3.2 – Maturação dos ovócitos

Os ovócitos foram colocados em grupos de 20 em gotas de 100 µL de meio de maturação, composto por TCM-199 (8,55mg/mL) suplementado com 10% de SFB, bicarbonato de sódio (1,98mg/mL), gentamicina (50µg/µL), 0,5µg/µL de FSH (Folltropin-V®) e 5µg/µL de LH (Lutropin®) dispostas em placa de petri 60x30mm e cobertas com óleo mineral. A placa foi pré-incubada a temperatura 38,5 °C, 5% de CO<sub>2</sub> e umidade 95% por 22 a 24 horas.

#### 4.3.3 – Seleção espermática

As amostras de sêmen foram descongeladas a 38,5°C em banho maria por 40 segundos selecionados em gradiente de Percoll® 90% (350µL) e 45% (350µL) em microtubos de 1,5mL, centrifugados por 7 minutos a 9.000 x G. O precipitado foi transferido para outro microtubo de 1,5 mL contendo 500 µL de meio TALP-Sperm e centrifugado por 3 minutos a 9.000 x G para remoção do excesso de Percoll dos espermatozoides (FOLCHINI et al., 2012). Uma alíquota de trinta µL do precipitado foi ressuspensa em meio de fertilização (meio FIV) que consistia de TALP suplementado com PHE (2mM de penicilina, 1mM de hipotaurina, 245µM de epinefrina) e 0,6 UI/mL de heparina.

#### 4.3.4 – Fertilização *in vitro*

No dia da fertilização (D0) os ovócitos maturados foram lavados duas vezes em meio FIV, transferidos para gotas de 90 µL de meio FIV em uma placa de fertilização e posteriormente, coberta com óleo mineral. Foram colocados em torno de 20 ovócitos por gota e adicionado um volume de sêmen ajustado para  $1 \times 10^6$  espermatozoides móveis mL de meio FIV. Estes foram co-incubados a 38,5°C, 5% de CO<sub>2</sub> e umidade 95% por 18 horas.

Um dia após a fertilização (D1), para remoção mecânica das células do cumulus dos embriões foram utilizadas sucessivas pipetagens nas gotas. Estes foram lavados duas vezes em meio fluido sintético do oviduto (SOF), suplementados com solução de aminoácidos essenciais 50X (BME) e não essenciais 100X (MEM), 340µM de Tri-citrato de sódio, 2,8mM de Myo-inositol, 5mg/mL de Albumina sérica bovina (BSA) e 2,5% de SFB em placas de cultivo de quatro poços cobertas com óleo mineral. Posteriormente foram incubados a 38,5°C, 5% de CO<sub>2</sub> e 95% de umidade. No terceiro dia (D3) após a fertilização parte do meio de cultivo foi trocada e os embriões foram mantidos incubados até o sétimo dia (D7) após a fertilização.

#### 4.4 - Microscopia eletrônica de transmissão

Após a seleção dos espermatozoides durante a fertilização *in vitro*, uma parcela de cada amostra de sêmen foi colocada em um microtubo de fundo cônico de 2 mL, adicionado 500 µL de solução de glutaraldeído 2,5%, em tampão fosfato a 0,1 M pH 7,4, e 500 µL de solução de tetroxido de ósmio a 1%, permanecendo por 30 minutos. Cada microtubo foi submetido à centrifugação em microcentrifuga a 70 x g durante 5 minutos, o sobrenadante descartado e posteriormente, para remoção dos fixadores, o volume do microtubo foi recomposto com solução tampão fosfato pH 7,4, e o microtubo agitado para lavar o material. Este foi novamente submetido a centrifugação a 70 x g por 5 minutos e o sobrenadante descartado. O procedimento foi repetido por três vezes. Ao precipitado de células foi então adicionado ágar 3% a 50°C e misturado de forma a introduzir o ágar entre as células, mas mantendo-as no fundo do microtubo. Este foi levado à geladeira (4°C) até a solidificação do ágar.

Ao retirar o material incluído em ágar do microtubo, este foi partido em fragmentos de um mm<sup>3</sup>. Os fragmentos foram colocados em frascos de vidro e

desidratados por 5 minutos em banhos com solução de concentrações crescentes de álcool (50%, 70%, 80%, 90% e 95%) e depois três banhos de 10 minutos cada em álcool 100%.

Descartado o álcool da última etapa da desidratação, foi adicionado solução contendo 1 porção de álcool para 1 porção de resina Epon EMS (Electron Microscopy Sciences, Hatfield, PA, UK) e o frasco de vidro foi tampado, permanecendo assim por 12 horas. Após este período, os frascos foram destampados e colocados em estufa à temperatura de 37°C por 4 horas. Então, a solução 1:1 de álcool e resina foi retirada e uma nova solução pura de resina Epon adicionado ao frasco. Estes foram novamente colocados em estufa à temperatura de 37°C por mais 4 horas. Em seguida a resina foi novamente retirada dos frascos e cada fragmento do material colocado em um orifício de uma forma e identificado. Foi adicionado nova solução de resina Epon até completar os orifícios da forma e esta foi colocada em estufa à temperatura de 60°C por pelo menos 72 horas.

Após solidificação (polimerização) na estufa, os blocos foram retirados das formas e o material foi cortado com ultramicrotomo Reichert-Jung (Leica Microsystems Inc., Buffalo Grove, IL, EUA) e os cortes, entre 60 e 90 nm de espessura, foram colocados em telas de cobre e contrastados em acetato de uranila e citrato de chumbo conforme descrito por Bozzola e Russel (1998).

Os cortes foram avaliados em microscópio eletrônico de transmissão Zeiss EM 900 (Zeiss, Oberkochen, Alemanha) do laboratório de histologia da Universidade Federal do Triângulo Mineiro (UFTM), e cerca de 100 imagens digitais com 100 cabeças de espermatozoides foram obtidas pelo equipamento Olympus Megaview 5.

Cada cabeça de espermatozoide das imagens capturadas foi classificada em um dos cinco grupos:

- 0 – Ausência de alteração nuclear
- 1 – Presença de um pequeno ponto bem claro ou uma região levemente clara
- 2 – Presença de poucos pontos bem claros ou algumas regiões levemente mais claras
- 3 – Presença de vários pontos bem claros ou grandes áreas levemente mais claras
- 4 – Pelo menos 50% da área nuclear clara

#### 4.5 – Delineamento experimental

Foram realizadas 20 rotinas de produção *in vitro* de embriões utilizando sempre uma amostra de sêmen de animais com insulação escrotal e simultaneamente uma amostra de sêmen de um animal normalizador de central de sêmen. Ao realizar esta avaliação pareada, conseguimos eliminar as variáveis não controladas, principalmente as ambientais.

A avaliação da clivagem (número de embriões clivados/número de ovócitos submetidos à maturação) foi realizada no dia 2 (D2) após a fertilização. Já a avaliação do desenvolvimento dos embriões até o estágio de blastocisto (número de blastocistos/número de embriões clivados) foi analisada 7 dias após a fertilização (D7). Antes da aplicação dos testes estatísticos, como forma de neutralizar parcialmente os efeitos das variáveis não controláveis na PIVE, foi realizada a normalização dos dados obtidos com sêmen de animais insulados, tendo como referência os resultados obtidos com o animal normalizador, previamente testado em nossos laboratórios. Para isso, as taxas de clivagem e de blastocistos das amostras de touros insulados foram transformadas em porcentagem das taxas de clivagem e blastocistos obtidas com o sêmen do touro normalizador em uma mesma rotina de PIVE, conforme as equações:

$$\text{Taxa de clivagem normalizada} = \frac{\text{Taxa de clivagem insulados}}{\text{Taxa de clivagem normalizador}}$$

$$\text{Taxa de blastocistos normalizada} = \frac{\text{Taxa de blastocistos insulados}}{\text{Taxa de blastocistos normalizador}}$$

#### 4.6 – Análise dos dados

Utilizou-se a correlação de Pearson para verificar a associação entre as variáveis. Diferenças significativas foram consideradas quando  $p < 0,05$ . Todas as avaliações estatísticas foram realizadas com o programa Action Stat (Estatcamp, 2014, São Carlos, SP, Brasil).



## 5 – RESULTADOS

Foram avaliadas pela microscopia eletrônica de transmissão 17 partidas de sêmen com média de 145 cortes de cabeças de espermatozoides por partida, totalizando 2473 cabeças analisadas. As classificações quanto aos graus de alteração de cromatina estão apresentadas na Tabela 1.

**Tabela 1: Classificação dos espermatozoides avaliados na microscopia eletrônica de transmissão de acordo com os graus de alteração de cromatina de bovinos**

	Classificação					Total
	0	1	2	3	4	
<b>Cortes de Cabeças</b>	1801	392	199	71	10	2473
<b>%</b>	72,83%	15,85%	8,05%	2,87%	0,40%	100%

0 – Ausência de alteração nuclear; 1 – Presença de um pequeno ponto bem claro ou uma região levemente clara; 2 – Presença de poucos pontos bem claros ou algumas regiões levemente mais claras; 3 – Presença de vários pontos bem claros ou grandes áreas levemente mais claras; 4 – Pelo menos 50% da área nuclear clara

Foram realizadas rotinas de PIVE para cada partida avaliada na MET. Nestas mesmas rotinas foram utilizadas simultaneamente amostras de sêmen de um animal normalizador, de forma a comparar o resultado das amostras dos animais submetidos à insulação escrotal com ele, eliminando o erro por influências de fatores externos. Os resultados médios das rotinas de PIVE são apresentados na Tabela 2.

**Tabela 2: Resultados da PIVE utilizando sêmen de animais insulados e do animal normalizador de central de sêmen**

	Total de ovócitos	Clivagem		Blastocistos	
	n	n	%	n	%
<b>Animais insulados</b>	920	391	42,50%	41	10,49%
<b>Animal normalizador</b>	841	615	73,13%	275	44,72%
<b>Total</b>	1761	1006	57,13%	316	31,41%

Clivagem: número de embriões clivados/número de ovócitos submetidos à maturação; e blastocistos: número de blastocistos/número de embriões clivados.

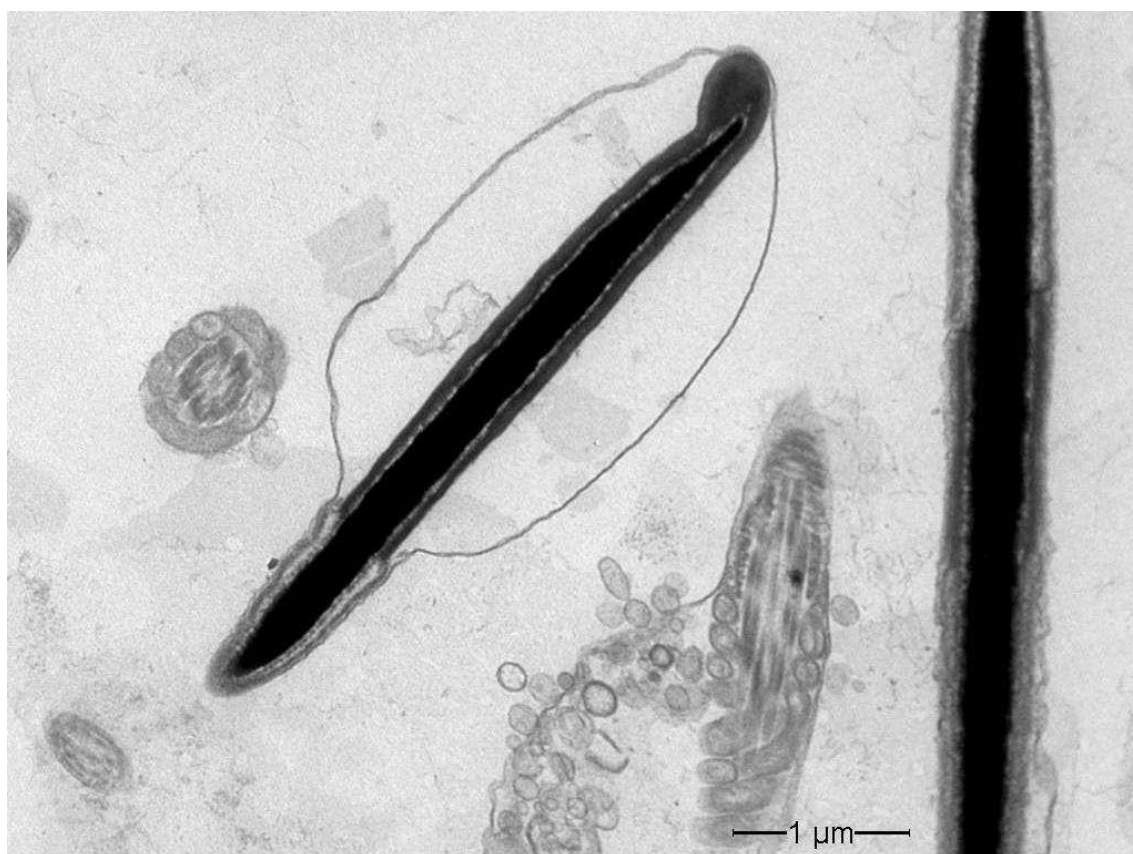
Ao correlacionar os resultados quanto à taxa de clivagem e a taxa de formação de blastocistos com os graus de alteração da cromatina na avaliação por microscopia eletrônica de transmissão, verificamos a inexistência de correlação significativa entre todos os fatores (Tabela 3).

**Tabela 3: Correlação geral entre as alterações classificadas em microscopia eletrônica de transmissão com os resultados da PIVE**

Classificação	Clivagem		Blastocisto	
	r	p-valor	r	p-valor
<b>0</b>	0,04	0,87	-0,11	0,66
<b>1</b>	0,05	0,84	0,10	0,69
<b>2</b>	-0,15	0,57	0,02	0,93
<b>3</b>	-0,02	0,95	0,16	0,54
<b>4</b>	-0,05	0,84	0,09	0,72

0 – Ausência de alteração nuclear; 1 – Presença de um pequeno ponto bem claro ou uma região levemente clara; 2 – Presença de poucos pontos bem claros ou algumas regiões levemente mais claras; 3 – Presença de vários pontos bem claros ou grandes áreas levemente mais claras; 4 – Pelo menos 50% da área nuclear clara

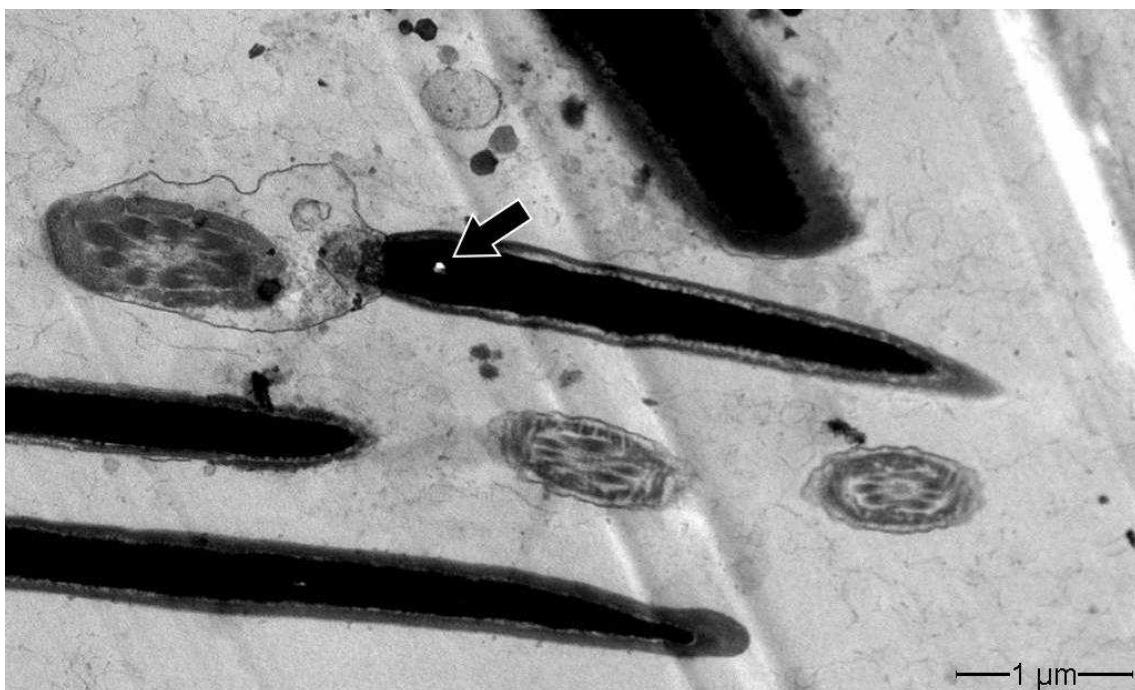
As figuras 1 a 8 mostram exemplos de cada uma das alterações nucleares encontradas na avaliação pela microscopia eletrônica de transmissão.



**Figura 1** – Corte de uma cabeça de espermatozoide sem alteração nuclear, classificado no grupo 0.



**Figura 2** – Corte de uma cabeça de espermatozoide com uma região do núcleo um pouco mais clara (seta), classificado no grupo 1.



**Figura 3** – Corte de uma cabeça de espermatozoide com a presença de um pequeno ponto bem claro (seta) no núcleo, classificado no grupo 1.



**Figura 4** – Corte de uma cabeça de espermatozoide com a presença de poucos pontos bem claros (setas) no núcleo, classificado no grupo 1.



**Figura 5** – Corte de uma cabeça de espermatozoide com a presença de algumas regiões do núcleo levemente mais claras (setas), classificado no grupo 2.

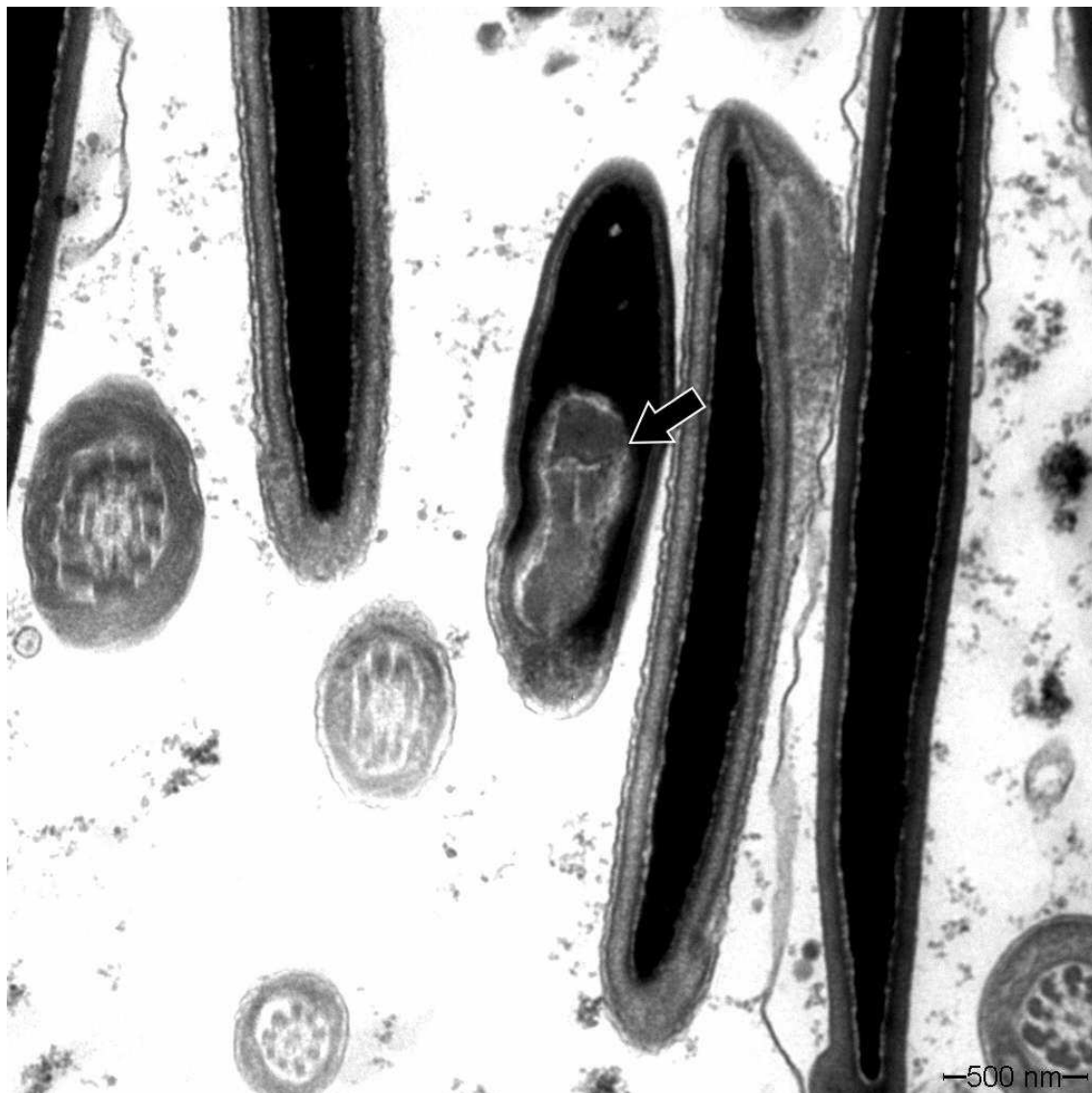


**Figura 6** – Corte de uma cabeça de espermatozoide com a presença de grandes áreas do núcleo levemente mais claras (setas), classificado no grupo 3.



**Figura 7** – Corte de uma cabeça de espermatozoide com a presença de vários pontos bem claros (setas) no núcleo, classificado no grupo 3.

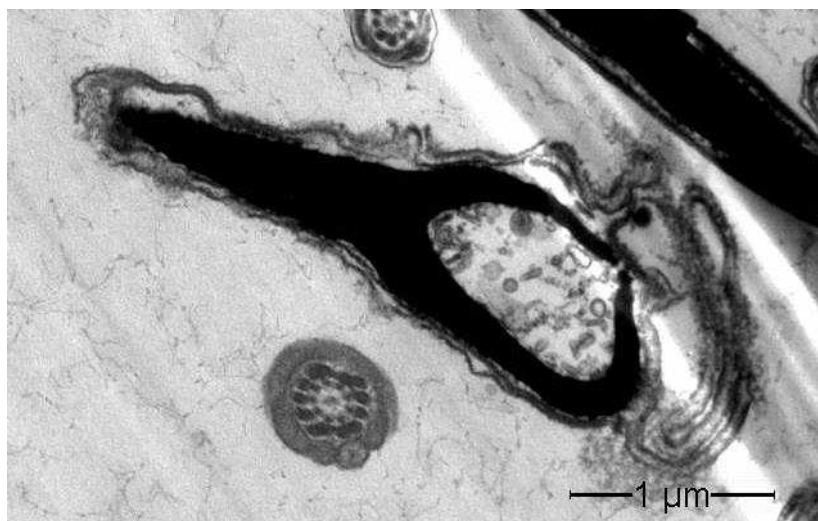




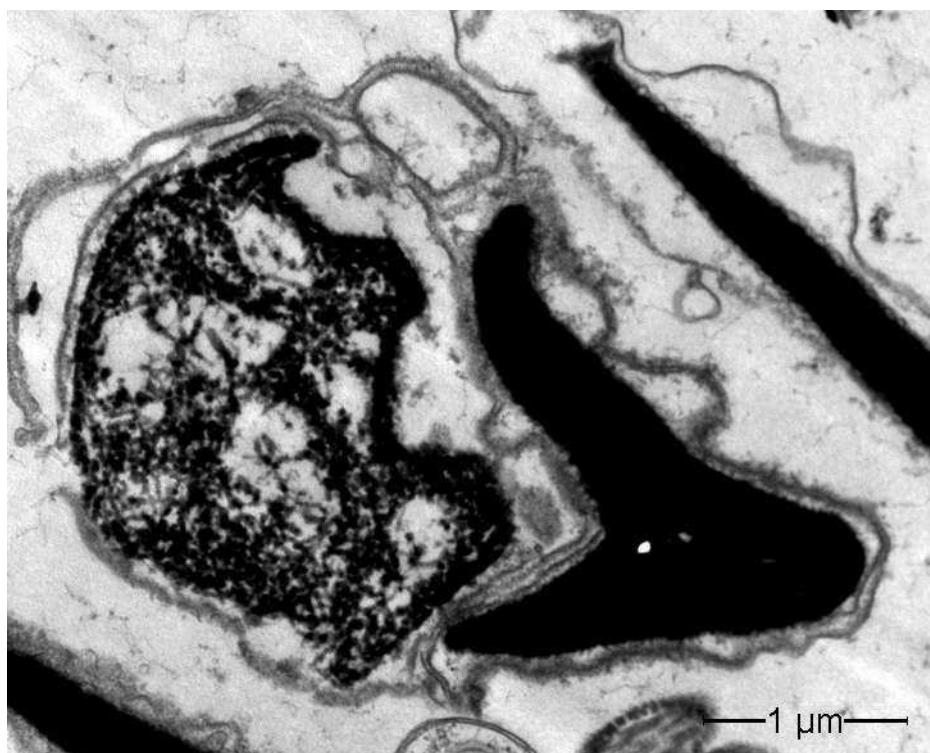
**Figura 8** – Corte de uma cabeça de espermatozoide com uma região de mais de 50% do núcleo mais clara (seta), classificado no grupo 4.

Foi possível verificar que espermatozoides com alterações nucleares mais graves, que não foram eliminados durante a seleção espermática na PIVE também tinham alterações morfológicas severas, conforme Figuras 9 a 11.

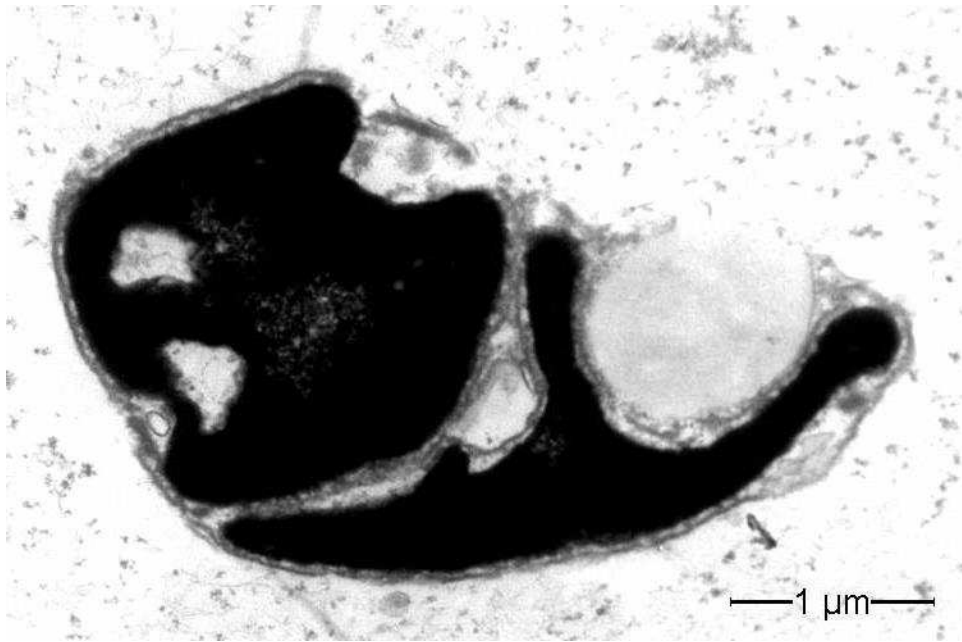




**Figura 9** – Corte de uma cabeça de espermatozoide com uma grande área do núcleo mais clara acompanhada de morfológica da cabeça.

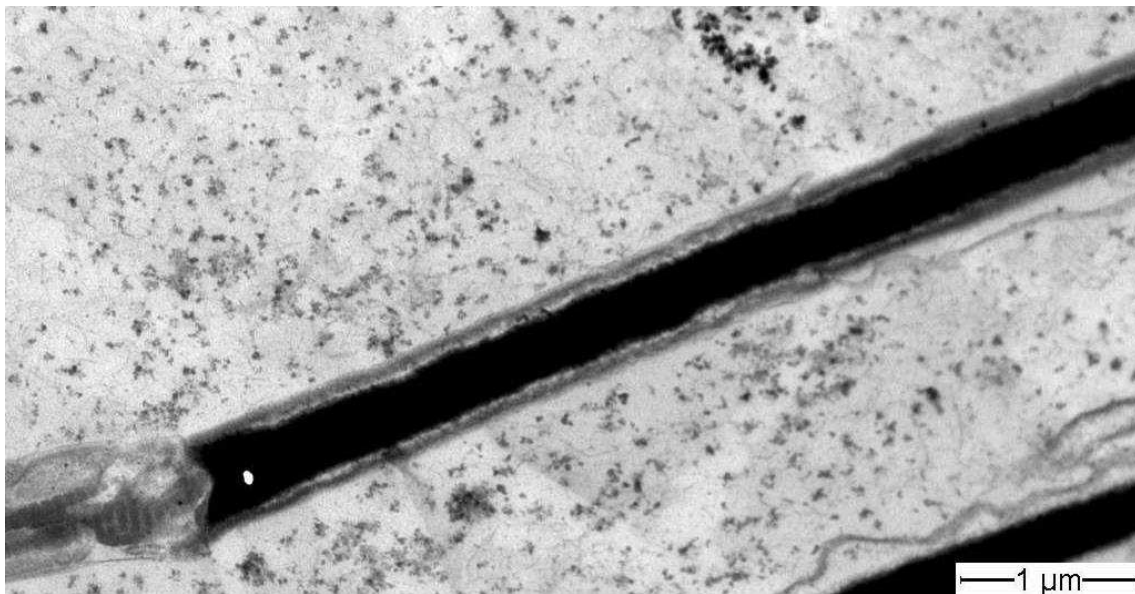


**Figura 10** – Corte de uma cabeça de espermatozoide com uma grande área do núcleo mais clara acompanhada de morfológica da cabeça.

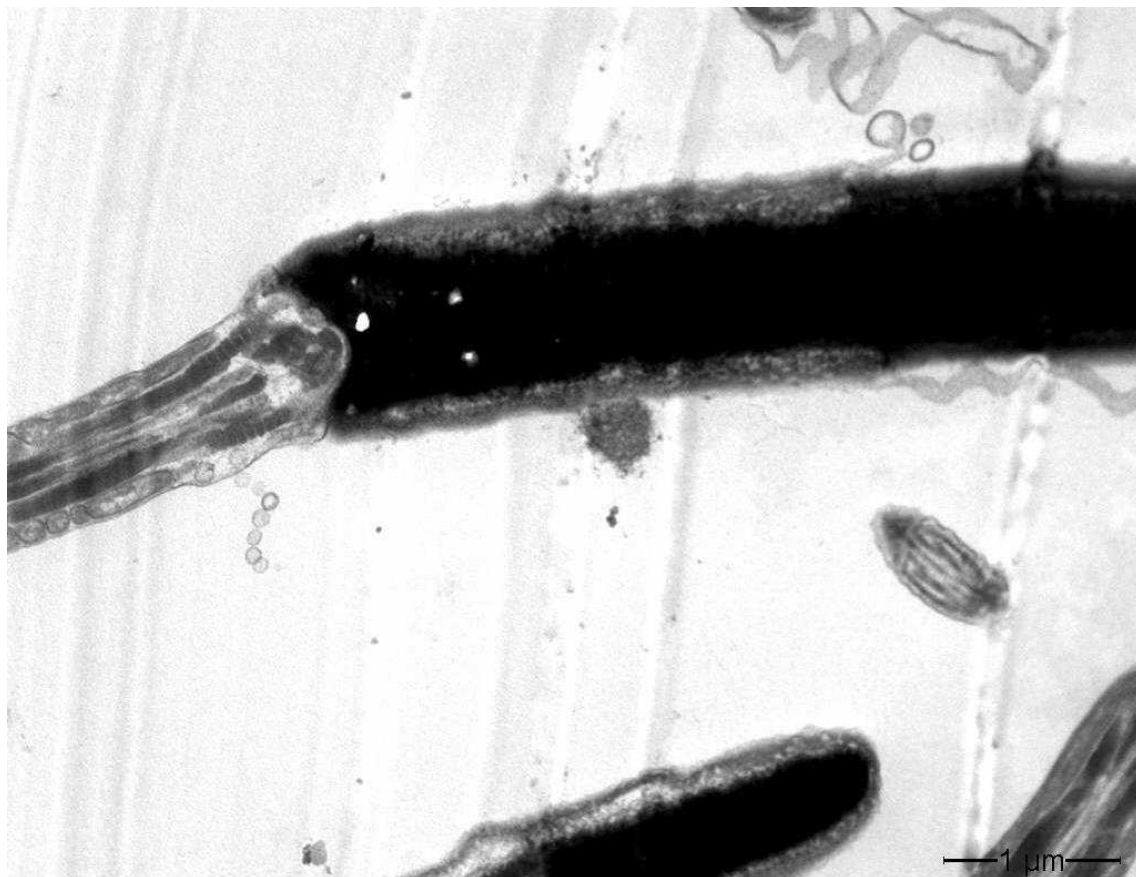


**Figura 11** – Corte de uma cabeça de espermatozoide com várias áreas do núcleo mais claras acompanhada de alteração morfológica da cabeça.

Verificou-se ainda que muitos dos pontos claros estavam localizados na porção mais caudal da cabeça, próximo a inserção do flagelo (Figuras 12 e 13).



**Figura 12** – Corte de uma cabeça de espermatozoide com pequeno ponto do núcleo claro próximo à inserção do flagelo.



**Figura 13** – Corte de uma cabeça de espermatozoide com vários pequenos pontos do núcleo claros próximo à inserção do flagelo.

## 6 – DISCUSSÃO

Alterações de cromatina avaliadas por microscopia eletrônica de transmissão aparecem como pontos ou regiões menos eletrodensas, devido à menor concentração de DNA pela baixa compactação da cromatina. Estas alterações podem estar ligadas a problemas durante a espermatogênese (ENCISO et al., 2011). A descompactação da cromatina observada em microscopia eletrônica de transmissão parece ter pouca relação com a fecundação do ovócito, mas espermatozoides com estas alterações provavelmente prejudicam o desenvolvimento embrionário (BELETTI, 2013). Eles se ligam a zona pelúcida, mas reduzem a taxa de penetração nos ovócitos e formação de pró-núcleos masculinos e, conseqüentemente, diminuem a taxa de produção *in vitro* de embriões (WALTERS et al., 2004). Neste estudo, não verificamos correlação significativa entre nenhum tipo de alteração de cromatina tanto com os resultados de clivagem como na formação de blastocistos, corroborando com os resultados de Simões (2010) que ao avaliar a relação entre os resultados de fragmentação de DNA avaliados por SCSA com taxa de clivagem e formação de blastocistos não verificou correlação significativa.

Ao avaliar a presença de grandes alterações nucleares em espermatozoides de humanos utilizando microscópio confocal, Perdrix et al. (2011) verificaram que a presença de vacúolos com tamanho superior a 13% da área total da cabeça não tem correlação com a fragmentação do DNA, que foi avaliada por meio de imunomarcção. Eles poderiam estar associados a anomalias de acrossoma (PERDRIX et al., 2011;.. KACEM et al., 2010; LAVOLPE et al., 2015). Por outro lado, estes vacúolos, especialmente quando ocupam mais de 50% da superfície nuclear, tem sido associado a aumento na fragmentação e desnaturação de DNA (FRANCO et al., 2008, 2011; GAROLLA et al., 2008) e também com baixa eficiência nas técnicas de reprodução assistida (BERKOVITZ et al., 2006). Estes resultados colaboram com o encontrado neste trabalho, pois nenhuma das alterações apresentou correlação com a eficiência na PIVE, além disso vacúolos nucleares ocupando área maior que 50% foram escassos, aparecendo apenas em 0,40% do total de cortes de cabeças de espermatozoides analisadas.

Em uma das etapas da PIVE, em que é feita a seleção por Percoll grande parte dos espermatozoides defeituosos são eliminados e apenas aqueles que apresentem boa motilidade são selecionados. As alterações de cromatina estão geralmente associadas a alterações morfológicas, e conseqüentemente de motilidade (ENCISO et al., 2011). Esta associação pode ser confirmada pelas Figuras 9, 10 e 11. Ao fazer a seleção por Percoll,

a maioria dos espermatozoides com alterações de cromatina mais graves são eliminados e, por isso, não participam da PIVE e das análises na microscopia eletrônica de transmissão.

Alterações de grau 1 e 2, que se referem a presença de pontos claros ou pequenas áreas levemente mais claras apareceram em quantidade expressiva, mas não pareceram ter correlação significativa com os resultados da PIVE. Na avaliação das imagens, verificou-se que pontos claros apareciam frequentemente na porção mais caudal da cabeça, próximo a inserção do flagelo (Figuras 12 e 13).

A avaliação nuclear do espermatozoide por meio da microscopia eletrônica de transmissão é feita apenas em uma secção da cabeça, uma vez que o corte feito na amostra possui entre 50 e 100 nm, enquanto uma cabeça de espermatozoide possui dimensão aproximada de 14 $\mu$ m em seu diâmetro maior e 7 $\mu$ m em seu diâmetro menor (CIFTCI & ZULKADIR, 2010). Enfim, a microscopia eletrônica de transmissão é uma ferramenta muito útil para avaliação de células com grande aumento e resolução, permitindo visualizar detalhes não vistos em outras técnicas. Apesar disso, em alguns casos como na avaliação da cromatina nuclear de espermatozoides, por limitar a visualização apenas a uma secção da cabeça, faz-se necessário a utilização de uma grande amostra para tornar a avaliação confiável.

## **7 – CONCLUSÃO**

Alterações nucleares avaliadas por microscopia eletrônica de transmissão em 100 a 200 cortes de cabeças de espermatozoides por amostra não possuem relação com a eficiência nas rotinas de PIVE.

## REFERÊNCIAS

- AHMADI, A.; NG, S.C. Fertilizing ability of DNA-damaged spermatozoa. **Journal of Experimental Zoology**, v.284, n.6, p.696–704, 1999.
- AITKEN, R.J.; DE IULIIS, G.N.; MCLACHLAN, R.I. Biological and clinical significance of DNA damage in the male germ line. **International Journal of Andrology**, v.32, n.1, p.46-56, 2009.
- ALVAREZ, J.G. The predictive value of sperm chromatin assay. **Human reproduction**, v.20, n.8, p.2365-2367, 2005.
- AUSTIN, C.R.; SHORT, R.V. *Reproduction in mammals: germ cells and fertilization*. Segunda edição. Grã Bretanha: Editora da Universidade de Cambridge, 1993. Volume 1.
- BALHORN, R. A model for the structure of chromatin structure in mammalian sperm. **Journal of Cell Biology**, v.93, n.2, p.298-305, 1982.
- BALHORN, R. Sperm Chromatin: an overview. In: ZINI, A.; AGARWAL, A. (editores) *Sperm Chromatin: Biological and Clinical Applications in Male Infertility and Assisted Reproduction*. USA: Springer, 2011. p.3-18.
- BALL, B.A.; VO, A.T.; BAUMBER J. Generation of reactive oxygen species by equine spermatozoa. **American Journal of Veterinary Research**, v.62, n.4, p.508–15, 2001.
- BALLACHEY, B.E.; HOHENBOKEN, W.D.; EVENSON, D.P. Heterogeneity of sperm nuclear chromatin structure and its relationship to bull fertility. **Biology of Reproduction**, v.36, p.915–25, 1987.
- BANKS, W. J. Sistema reprodutor masculino. In: BANKS, W. J. *Histologia Veterinária Aplicada*. São Paulo: Manole, 1992, p.546-564.
- BARTH, A. D.; OKO, R. J. *Abnormal Morphology of Bovine Spermatozoa*. Primeira Edição, Ames: Iowa State University Press, 1989. 285p.
- BAUMBER, J.; BALL, B.A.; LINFOR, J.J.; MEYERS, S.A. Reactive oxygen species and cryopreservation promote DNA fragmentation in equine spermatozoa. **Journal of Andrology**, v.24, p.621–8, 2003.
- BELETTI, M.E.; MELLO, M.L.S. Methodological variants contributing to detection of abnormal DNA-protein complexes in bull spermatozoa. **Brazilian Journal of Genetics**, v.19, p.97-103, 1996.
- BELETTI, M.E. Cromatina espermática: quebrando paradigmas. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 37, n.2, p.92-96, 2013.
- 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**, v.22, n.2, p.85-90, 2005.
- 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**, v.22, n.2, p.85-90, 2005.

BENCHAIB, M.; BRAUN, V.; LORNAGE, J.; HADJ, S.; SALLE, B.; LEJEUNE, H.; GUERIN, J.F. Sperm DNA fragmentation decreases pregnancy rate in an assisted reproductive technique. **Human Reproduction**, v.18, n.5, p.1023-1028, 2003.

BERKOVITZ, A.; ELTES, F.; LEDERMAN, H.; PEER, S.; ELLENBOGEN, A.; FELDBERG, B.; BARTOOV, B. How to improve IVF-ICSI outcome by sperm selection. **Reproductive Biomedicine Online**, v.12, n.5, p.634–638, 2006.

BOZZOLA, J.J.; RUSSEL, L.D. Electron Microscopy. Principles and Techniques for Biologists. 2nd ed. Sudbury: Jones and Barlett Learnig, 1998. 670p.

CARRELL, D.T.; LIU L.; PETERSON, C.M.; JONES, K.P.; HATASAKA, H.H.; ERICKSON, L.; CAMPBELL, B. Sperm DNA fragmentation is increased in couples with unexplained recurrent pregnancy loss. **Archives of Andrology**, v.49, p.49-55, 2003.

CARRELL, D.T. Epigenetics of the male gamete. **Fertility and Sterility**, v. 97, n. 2, p. 267-74, 2012.

CHACUR, M.G.M.; DIAS, H.S.; PAPA, F.O.; LOUVISON, B.A.; CALESCO, M.M.; PAPA, P.M. Efeito de meios diluentes na viabilidade de sêmen congelado bovino. **Veterinária e Zootecnia**, v.19, n.3, p.346-355, 2012.

CIFTCI, H. B.; ZULKADIR, U. The correlation between bull sperm head dimensions and mitochondrial helix length. **Journal of Animal and Veterinary Advances**, v.9, n.7, p.1169-1172, 2010.

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. **Journal of Reproduction and Infertility**, v.101, n.3, p.531-538, 1994.

DUTY, S.M.; SINGH, N.P.; RYAN, L.; CHEN, Z.; LEWIS, C.; HUANG, T.; HAUSER, R. Reliability of the comet assay in cryopreserved human sperm. **Human Reproduction**, v. 17, n. 5, p. 1274-80, 2002.

EID, L.N.; LORTON, S.P.; PARRISH, J.J. Paternal influence on S-phase in the first cell cycle of the bovine embryo. **Biology of Reproduction**, v.51, n.6, p.1232-1237, 1994.

EID, L.N.; PARRISH, J.J. Duration of G2-phase and onset of M-phase during the first cell cycle of the bovine embryo is dependent on bull in vivo fertility. **Theriogenology**, v.43, p.205, 1995.

ENCISO, M.; CISALE, H.; JOHNSTON, S.D.; SARASA, J.; FERNANDEZ, J.L.; GOSÁLVEZ, J. Major morphological sperm abnormalities in the bull are related to sperm DNA damage. **Theriogenology**, v.76, n.1, p.23-32, 2011.

ENCISO, M.; CISALE, H.; JOHNSTON, S.D.; SARASA, J.; FERNANDEZ, J.L.; GOSÁLVEZ, J. Major morphological sperm abnormalities in the bull are related to sperm DNA damage. **Theriogenology**, v.76, n.1, p.23-32, 2011.

ERENPREISS, J.; BARS, J.; LIPATNIKOVA, V.; ERENPREISA, J.; ZALKALNS, J. Comparative study of cytochemical tests for sperm chromatin integrity. **Journal of Andrology**, v.22, n.1, p.4-53, 2001.



EVENSON, D.P.; JOST, L.K.; MARSHALL, D.; ZINAMAN, M.J.; CLEGG, E.; PURVIS, K.; DE ANGELIS, P.; CLAUSSEN, O.P. Utility of the sperm chromatin structure assay as a diagnostic and prognostic tool in the human fertility clinic. **Human Reproduction**, v.14, n.4, p.1039–1049, 1999.

EVENSON, D. Sperm Chromatin Structure Assay (SCSA): 30 Years of Experience with the SCSA. In: ZINI, A.; AGARWAL, A. (editors). *Sperm Chromatin*. New York: Springer Science, 2011, p. 125-149.

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

FATEHI, A.N.; BEVERS, M.M.; SCHOEVERS, E.; ROELEN, B.A.J.; COLENBRANDER, B.; GADELLA, B. M. DNA damage in bovine sperm does not block fertilization and early embryonic development but induces apoptosis after the first cleavages. **Journal of Andrology**, v.27, n.2, p.176-88, 2006.

FLORMAN, H.M.; JUNGNIKKEL, M.K.; SUTTON, K.A. Regulating the acrosome reaction. **International Journal of Developmental Biology**, v.52, n.5-6, p.503-510, 2008.

FOLCHINI, N.P.; LEIVAS, F.G.; SANTOS, F.W.; SCHWENGBER, E.B.; MARTIN, D.M.; SPIAZZI, C.C.; BRUM, D.S. Uso de mini-Percoll modificado para seleção e redução da formação de espécies reativas de oxigênio (ROS) em espermatozoides bovinos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.36, p.239-244, 2012.

FRANCO JR, J.G., BARUFFI, R.L.; MAURI, A.L.; PETERSEN, C.G.; OLIVEIRA, J.B.; VAGNINI, L. Significance of large nuclear vacuoles in human spermatozoa: implications for ICSI. **Reproductive Biomedicine Online**, v.17, p.42-5, 2008.

FRANCO, J.G.Jr.; MAURI, A.L.; PETERSEN, C.G.; MASSARO, F.C.; SILVA, L.F.I.; FELIPE, V.; CAVAGNA, M.; PONTES, A.; BARUFFI, R.L.R.; OLIVEIRA, J.B.A.; VAGNINI, L.D. Large nuclear vacuoles are indicative of abnormal chromatin packaging in human spermatozoa. **International Journal of Andrology**, v.35, n.1, p.46-51, 2011.

FRASER, L.; STRZEZEK, J.; KORDAN, W. Effect of freezing on sperm nuclear DNA. **Reproduction in Domestic Animals**, v.46, p.14–7, 2011.

GARCIA-MACIAS, V.; DE PAZ, P.; MARTINEZ-PASTOR, F.; ALVAREZ, M.; GOMES-ALVES, S.; BERNARDO, J.; ANEL, E.; ANEL, L. DNA fragmentation assessment by flow cytometry and Sperm-Bos-Halomax (bright-field microscopy and fluorescence microscopy) in bull sperm. **International Journal of Andrology**, v.30, n.2, p.88-98, 2007.

GAROLLA, A.; FORTINI, D.; MENEGAZZO, M.; DE TONI, L.; NICOLETTI, V.; MORETTI, A.; SELICE, R.; ENGL, B.; FORESTA, C. High-power microscopy for selecting spermatozoa for ICSI by physiological status. **Reproductive Biomedicine Online**, v.17, n.5, p.610–616, 2008.

GILBERT, S.F. *Biologia do Desenvolvimento*. Quinta edição. Ribeirão Preto: Editora Funpec. 2003.

GINEITIS, A.A.; ZALENSKAYA, I.A.; YAU, P.M.; BRADBURY, E.M.; ZALENSKY, A.O. Human sperm telomere-binding complex involves histone H2B and secures telomere membrane attachment. **Journal of Cell Biology**, v.151, n.7, p.1591–1598, 2000.

GONÇALVES, P.B.D. et al. Produção *in vitro* de embriões. In: GONÇALVES, P. B. D.; FIGUEIREDO, J. R.; FREITAS, V. J. F. *Biotécnicas aplicadas à reprodução animal*. 2 ed. São Paulo: Editora Roca LTDA. 2007. p.195-224.

GONÇALVES, P.B.D.; VISINTIN, J.A.; OLIVEIRA, M.A.L.; MONTANGER, M.M.; COSTA, L.F.S. Produção *in vitro* de embriões. In: *Biotécnicas Aplicadas à Reprodução Animal*. 1 ed. São Paulo: Livraria Varela, 2008, p.195-226.

GOTO, K.; KINOSHITA, A.; NAKANISHI, Y.; OGAWA, K. Blastocyst formation following intracytoplasmic injection of in-vitro derived spermatids into bovine oocytes. **Human reproduction**, v.11, n.4, p.824-829, 1996.

GRAVANCE, C.G.; CASEY, M.E.; CASEY, P.J. Pre-freeze bull sperm head morphometry related to post-thaw fertility. **Animal Reproduction Science**, v.114, n.1-3, p.81-88, 2009.

GÜRLER, H.; CALISICI, O.; BOLLWEIN, H. Inter- and intra-individual variability of total antioxidant capacity of bovine seminal plasma and relationships with sperm quality before and after cryopreservation. **Animal Reproduction Science**, v.155, p.99–105, 2015.

GURLER, H.; MALAMA, E.; HEPPELMANN, M.; CALISICI, O.; LEIDING, C.; KASTELIC, J. P.; BOLLWEIN, H. Effects of cryopreservation on sperm viability, synthesis of reactive oxygen species, and DNA damage of bovine sperm. **Theriogenology**, v.86, p.562-571, 2016.

HALES, B.F.; GRENIER, L.; LALANCETTE, C.; ROBAIRE, B.; Epigenetic programming: from gametes to blastocyst. **Clinical and Molecular Teratology**, v.91, p.652-665, 2011.

HALLAP, T.; NAGY, S.; HAARD, M.; JAAKMA, U.; JOHANNISSON, A.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Sperm chromatin stability in frozen-thawed semen is maintained over age in AI bulls. **Theriogenology**, v.63, n.6, p.1752-63, 2005.

HAMMADEH, M.E.; STREHLER, E.; ZEGINIADOV, T.; ROSENBAUM, P.; SCHMIDT, W. Chromatin decondensation of human sperm in vitro and its relation to fertilization rate after icsi. **Archives of Andrology**, v.47, p.83–7, 2001.

HAMMADEH, M.E.; ZEGINIADOV, T.; ROSENBAUM, P.; GEORG, T.; SCHMIDT, W.; STREHLER, E. Predictive value of sperm chromatin condensation (aniline blue staining) in the assessment of male fertility. **Archives of Andrology**, v.46, n.2, p.99-104, 2001.

HENKEL, R.; SCHILL, W.B. Sperm preparation for ART. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v.1, p.108, 2003.

HOLSTEIN, A.F.; SCHULZE, W.; DAVIDOFF, M. Understanding spermatogenesis is a prerequisite for treatment. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v.1, p.107, 2003.

JOHNSON, G.D.; LALANCETTE, C.; LINNEMANN, A.K.; LEDUC, F.; BOISSONNEAULT, G.; KRAWETZ, S.A.; The sperm nucleus: chromatin, RNA, and the nuclear matrix. **Reproduction**, v.141, n.1, p.21-36, 2011.

JOHNSTON, S.D.; SATAKE, N.; ZEE, Y.; LOPEZ-FERNANDEZ, C.; HOLT, W.V.; GOSALVEZ, J. Osmotic stress and cryoinjury of koala sperm: an integrative study of the plasma membrane, chromatin stability and mitochondrial function. **Reproduction**, v.143, p.787–97, 2012.

KACEM, O.; SIFER, C.; BARRAUD-LANGE, V.; DUCOT, B.; DE ZIEGLER, D.; POIROT, C.; WOLF, J. Sperm nuclear vacuoles, as assessed by motile sperm organellar morphological examination, are mostly of acrosomal origin. **Reproductive Biomedicine Online**, v.20, p.132-7, 2010.

KANE, M.T. A review of in vitro gamete maturation and embryo culture and potencial impact on future animal biotechnology. **Animal Reproduction Science**, v.79, n.3-4, p.171-190, 2003.

KHALIFA, T. A.; REKKAS, C. A.; LYMBEROPOULOS, A. G.; SIOGA, A.; DIMITRIADIS, I.; PAPANIKOLAOU, T. H. Factors affecting chromatin stability of bovine spermatozoa. **Animal Reproduction Science**, v. 104, n. 2-4, p. 143-63, 2008.

NEILL, J.D. *Physiology of Reproduction*. Terceira edição. Estados Unidos: Editora Elsevier Academic Press Publications, 2006, 3296 p.

KRZYZOSIAK, J.; EVENSON, D.; PITT, C.; JOST, L.; MOLAN, P.; VISHWANATH, R. Changes in susceptibility of bovine sperm to in situ DNA denaturation during prolonged incubation at ambient temperature under conditions of exposure to reactive oxygen species and nuclease inhibitor. **Reproduction, Fertility and Development**, v.12, n.5-6, p.251-261, 2000.

LAVOLPE, M.; LORENZI, D.; GRECO, E.; NODAR, F.; SEDÓ, C. A. Relationship Between Sperm DNA Fragmentation and Nuclear Vacuoles. **JBRA Assisted Reproduction**, v.19, n.2, p.70-74, 2015.

LEWIS, S.E.; AITKEN, R.J. DNA damage to spermatozoa has impacts on fertilization and pregnancy. **Cell and Tissue Research**, v.322, p.33–41, 2005.

LONERGAN, P.; RIZOS, D.; GUTIERREZ-ADAN, A.; FAIR, T.; BOLAND, M.P. Oocytes and embryo quality: effect of origin, culture condionts and gene expression patterns. **Reproduction of Domestic Animal**, v.38, n.1782, p.259-267, 2003.

MARTINS, F.S.; VIANA, J.R.S.; RODRIGUES, A.P.R.; FIGUEIREDO, J.R. Fatores reguladores da foliculogênese em mamíferos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.32, p.36-49, 2008.

McGHEE, J.D.; NICKEL, J.M.; FELSENFELD, G.; FTAU, D.C. Higher Order Structure of Chromatin: Orientation of Nucleosomes within the 30 nm Chromatin Solenoid Is Independent of Species and Spacer Length. **Cell**, v.33, p.831-841, 1983.

MESEGUER, M.; MARTÍNEZ-CONJERO, J.A.; O'CONNOR, J.E.; PELLICER, A.; REMOHÍ, J.; GARRIDO N. The significance of sperm DNA oxidation in embryo development and reproductive outcome in an oocyte donation program: a new model to study a male infertility prognostic factor. **Fertility and Sterility**, v.89, p.1191-9, 2008.

MUKHOPADHYAY, C. S.; GUPTA, A. K.; YADAV, B. R.; CHAUHAN, I. S.; GUPTA, A.; MOHANTY, T. K.; RAINA, V. S. Effect of cryopreservation on sperm chromatin integrity and fertilizing potential in bovine semen. **Livestock Science**, v.136, n.2-3, p.114 –121, 2011.

NADALINI, M.; TAROZZI, N.; DISTRATIS, V.; SCARAVELLI, G.; BORINI, A. Impact of intracytoplasmic morphologically selected sperm injection on assisted reproduction outcome: a review. **Reproduction Biomedicine Online**, v.19, p.45-55, 2009.

NAGAI, T. The improvement of in vitro maturation system for bovine and porcine oocyte. **Theriogenology**, v.55, n.6, p.1291-1301, 2001.

NAVA-TRUJILLO, H.; HERNÁNDEZ-FERNÁNDEZ, A.; QUINTERO-MORENO, A. Integridad de la cromatina y forma de la cabeza del espermatozoide de toro: evaluación simultánea con la tinción de azul de toluidina. **Revista Científica**, v.22, n.3, p.211-216, 2012.

NAVA-TRUJILLO, H.; QUINTERO-MORENO, A.; FINOL-PARRA, G.; VILCHEZ-SIU, V.; OSORIO-MELENDEZ, C.; RUBIO-GUILLEN, J.; VALERIS-CHACIN, R. Relationship among damaged chromatin, motility and viability in cryopreserved spermatozoa from Brahman bulls. **Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias**, v.24, n.2, p.116-122, 2011.

NAVA-TRUJILLO, H.; QUINTERO-MORENO, A.; HERNÁNDEZ-FERNÁNDEZ, A.; SIU, V. V.; MELÉNDEZ, C. O.; GUILLÉN, J. R.; VILLALOBOS, D. G.; PARRA, G. F. Efecto de la integridad de la cromatina sobre la morfometría de la cabeza del espermatozoide de toro. **Revista Científica**, v.23, n.1, p.67-72, 2013.

OKO, R.J.; JANDO, V.; WAGNER, C.L.; KISTLER, W.S.; HERMO, L.S. Chromatin reorganization in rat spermatids during the disappearance of testis-specific histone, H1t, and the appearance of transition proteins TP1 and TP2. **Biology of Reproduction**, v.54, p.1141-1157, 1996.

OLIVA, R. Protamines and male infertility. **Human Reproduction Update**, v.13, n.4, p.417-435, 2006.

OLIVEIRA, J.B.; MASSARO, F.C.; BARUFFI, R.L.; MAURI, A.L.; PETERSEN, C.G.; SILVA, L.F.; VAGNINI, L.D.; FRANCO JR, J.G. Correlation between semen analysis by motile sperm organelle morphology examination and sperm DNA damage. **Fertility and Sterility**, v.94, p.1937-40, 2010.

PERDRIX, A.; TRAVERS, A.; CHELLI, M.H.; ESCALIER, D.; DO REGO, J.L.; MILAZZO, J.P.; MOUSSET-SIMÉON, N.; MACÉ, B.; RIVES, N. Assessment of acrosome and nuclear abnormalities in human spermatozoa with large vacuoles. **Human Reproduction**, v.26, p.47-58, 2011.

PERIS, S.I.; MORRIER, A.; DUFOUR, M.; BAILEY, J.L. Cryopreservation of ram semen facilitates sperm DNA damage: relationship between sperm andrological parameters and the sperm chromatin structure assay. **Journal of Andrology**, v.25, n.2, p.224-233, 2004.

PUGLISI, R.; POZZI, A.; FOGLIO, L.; SPANO, M.; ELEUTERI, P.; GROLLINO, M. G.; BONGIONI, G.; GALLI, A. The usefulness of combining traditional sperm assessments with in vitro heterospermic insemination to identify bulls of low fertility as estimated in vivo. **Animal Reproduction Science**, n.132, p.17-28, 2012.

RAHMAN, M.B.; VANDAELE, L.; RIJSSELAERE, T.; MAES, D.; HOOGWEIJS, M.; FRIJTERS, A.; NOORDMAN, J.; GRANADOS, A.; DERNELLE, E.; SHAMSUDDIN, M.; PARRISH, J. J.; VAN SOOM, A. Scrotal insulation and its relationship to abnormal morphology, chromatin protamination and nuclear shape of spermatozoa in Holstein-Friesian and Belgian Blue bulls. **Theriogenology**, v.76, n.7, p.1246-57, 2011.

RATH, D.; BATHGATE, R.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H.; ROCA, J.; STRZEZEK, J.; WABERSKI, D. Recent advances in boar semen cryopreservation. **Society for Reproduction and Fertility Supplement**, v.66, p.51-66, 2009.

RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Role of the oviduct in sperm capacitation. **Theriogenology**, v.1, p. 138-146, 2007.

ROOSEN-RUNGE, E. C. *The process of spermatogenesis in animals*. Cambridge: Cambridge University Press, 1977, 272 p.

ROYERE, D.; HAMAMAH, S.; NICOLLE, J.C.; LANSAC, J. Chromatin alterations induced by freeze-thawing influence the fertilizing ability of human sperm. **International Journal of Andrology**, v.14, p.328–32, 1991.

RUBIN, K., C., P. Particularidades reprodutivas da raça Nelore na produção *in vitro* de embriões (PIVE). 2006. 53f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Universidade Estadual de Londrina. Londrina, 2006.

RUSSEL, L. D.; ETTLIN, R. A.; SINHA HIKIM, A. P.; CLEGG, E. D. *Evaluation of the Testis*. Clearwater: Cache River, 1990, 286p.

SAKKAS, D.; ALVAREZ, J.G. Sperm DNA fragmentation: mechanisms of origin, impact on reproductive outcome, and analysis. **Fertility and Sterility**, v.93, p.1027-36, 2010.

SELI, E.; GARDNER, D.K.; SCHOOLCRAFT, W.B.; MOFFATT, O.; SAKKAS, D. Extent of nuclear DNA damage in ejaculated spermatozoa impacts on blastocyst development after in vitro fertilization. **Fertility and Sterility**, v.82, p.378-83, 2004.

SELLEM, E.; BROEKHUIJSE, M. L.; CHEVRIER, L.; CAMUGLI, S.; SCHMITT, E.; SCHIBLER, L.; KOENEN, E. P. Use of combinations of in vitro quality assessments to predict fertility of bovine semen. **Theriogenology**, n.84, v.9, p.1447-1454, 2015.

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

SIMÕES, R. Influencia da Fragmentação de DNA espermático na produção *in vitro* de embriões bovinos. 2010 105f, tese de doutorado – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

SMORAG, Z.; BOCHENEK, M.; WOJDAN, Z.; SLONIEWSKI, K.; REKLEWSKI, Z.; The effect of sperm chromatin structure on quality of embryos derived from superovulated heifers. **Theriogenology**, v.53, n.1, p.206, 2000.

SOTOLONGO, B.; LINO, E. AND WARD, W. S. Ability of Hamster Spermatozoa to Digest Their Own DNA. **Biology of Reproduction**, v.69, n.6, p. 2029–2035, 2003.

TAVALAEE, M.; RAZAVI, S.; NASR-ESFAHANI, M. H. Influence of sperm chromatin anomalies on assisted reproductive technology outcome. **Fertility and sterility**, v.91, p.1119-1126, 2009.

VAN DEN HURK, R.; ZHAO, J. Formation of mammalian oocytes and their growth, differentiation and maturation within ovarian follicles. **Theriogenology**, v.63, n.6, p.1717-1751, 2005.

VIRRO, M.R.; LARSON-COOK, K.L.; EVENSON, D.P. Sperm chromatin structure assay (SCSA) parameters are related to fertilization, blastocyst development, and ongoing pregnancy in in vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection cycles. **Fertility and Sterility**, v.81, p.1289-95, 2004.

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**, v.25, n.4, p.554-563, 2004.

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**, v.25, n.4, p.554-563, 2004.

WARD, W.S. Regulating DNA Supercoiling: Sperm Points the Way. **Biology of Reproduction**, v.84, p.841-843, 2011.

WATERHOUSE, K.E.; HAUGAN, T.; KOMMISRUUD, E.; TVERDAL, A.; FLATBERG, G.; FARSTAD, W.; EVENSON, D.P.; DE ANGELIS, P.M. Sperm DNA damage is related to field fertility of semen from young Norwegian Red bulls. **Reproduction, Fertility and Development**, v.18, n.7, p.781-788, 2006.

WATERHOUSE, K.E.; GJELDNE, A.; TVERDAL, A.; DE ANGELIS, P.M.; FARSTAD, W.; HÅRDE, M.; KOMMISRUUD, E. Alterations of sperm DNA integrity during cryopreservation procedure and in vitro incubation of bull semen. **Animal Reproduction Science**, v.117, p.34-42, 2010.

ZALENSKAYA, I.A.; BRADBURY, E.M.; ZALENSKY, A.O. Chromatin structure of telomere domain in human sperm. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.279, n.1, p.213-218, 2000.

**ANEXO A**

Aprovação do projeto pelo comitê de ética



Universidade Federal de Uberlândia  
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação  
Comissão de Ética na Utilização de Animais (CEUA)  
Avenida João Naves de Ávila, nº. 2160 - Bloco A - Campus Santa Mônica -  
Uberlândia-MG –  
CEP 38400-089 - FONE/FAX (34) 3239-4131; e-mail: ceuaufu@yahoo.com.br;  
[www.comissoes.propp.ufu.br](http://www.comissoes.propp.ufu.br)

**ANÁLISE FINAL Nº 031/12 DA COMISSÃO DE ÉTICA NA UTILIZAÇÃO DE  
ANIMAIS PARA O PROTOCOLO REGISTRO CEUA/UFU 017/12**

Projeto Pesquisa: "Classificação das alterações cromatinicas de  
espermatozoides bovinos e sua correlação com a eficiência da produção "in  
vitro".

Pesquisador Responsável: Prof. Marcelo Emilio Beletti

O protocolo não apresenta problemas de ética nas condutas de pesquisa com  
animais nos limites da redação e da metodologia apresentadas. Obs: A entrega  
do certificado está condicionada a entregar a autorização do uso das  
dependências do frigorífico para a coleta de ovócitos e não apenas um  
documento solicitando tal autorização

**SITUAÇÃO: PROTOCOLO DE PESQUISA APROVADO.**

**OBS: O CEUA/UFU LEMBRA QUE QUALQUER MUDANÇA NO PROTOCOLO  
DEVE SER INFORMADA IMEDIATAMENTE AO CEUA PARA FINS DE  
ANÁLISE E APROVAÇÃO DA MESMA.**

**AO FINAL DA PESQUISA DEVE SER ENTREGUE À CEUA UM RELATÓRIO.  
O MODELO DESTES ESTÁ NO SITE.**

Uberlândia, 11 de Abril de 2012

Prof. Dr. Evandro de Abreu Fernandes  
Presidente da CEUA/UFU