

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

SARA HISSAE HIRAIWA

CLASSIFICAÇÃO DAS ALTERAÇÕES CROMATÍNICAS DE ESPERMATOZOIDES
BOVINOS E SUA CORRELAÇÃO COM A EFICIÊNCIA NA PRODUÇÃO *IN VITRO* DE
EMBRIÕES.

UBERLÂNDIA
2015

SARA HISSAE HIRAIWA

CLASSIFICAÇÃO DAS ALTERAÇÕES CROMATÍNICAS DE ESPERMATOZOIDES
BOVINOS E SUA CORRELAÇÃO COM A EFICIÊNCIA NA PRODUÇÃO *IN VITRO* DE
EMBRIÕES.

Dissertação apresentado ao Programa de
Pós- Graduação em Biologia Celular e
Estrutural Aplicadas da Universidade
Federal de Uberlândia como requisito
parcial à obtenção do título de mestre.
Orientador: Prof. Dr. Marcelo Emílio
Beletti

UBERLÂNDIA
2015

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

- H668c
2015 Hiraiwa, Sara Hissae, 1991
Classificação das alterações cromatínicas de espermatozoides
bovinos e sua correlação com a eficiência na produção *in vitro* de
embriões / Sara Hissae Hiraiwa. - 2015.
70 p. : il.
- Orientador: Marcelo Emílio Beletti.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia,
Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural Aplicadas.
Inclui bibliografia.
1. Citologia - Teses. 2. Cromatina - Teses. 3. Espermatozoides -
Teses. 4. Fertilização in vitro - Teses. I. Beletti, Marcelo Emílio. II.
Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em
Biologia Celular e Estrutural Aplicadas. III. Título.

CDU: 576.3

AGRADECIMENTOS

A Universidade Federal de Uberlândia,

instituição que proporcionou meu crescimento pessoal e acadêmico. Foram seis anos de aprendizado que ficará para sempre em minha memória. Conheci professores, histórias e motivação para chegar até aqui.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES),

que proporcionou através do apoio financeiro as condições necessárias para realização dessa dissertação.

Ao prof. Dr. Marcelo Emilio Beletti,

que abriu as portas do laboratório para mim. Graças a ele vivenciei e aprendi aquilo que me deixa feliz como bióloga. Agradeço pela paciência e pelas experiências que agreguei.

Ao prof. Dr. Bruno Nassif Travençolo

que teve a paciência de me ajudar a utilizar os programas de análises de imagem nesse trabalho. Foram muitas dúvidas e medo de não conseguir entender o programa, mas com sua ajuda consegui finalizar a dissertação.

A prof. Dr. Juliana Gonzaga de Oliveira

minha ex-orientadora que me acompanhou em todos os momentos, desde minha entrada no mestrado até minha saída. Sempre será minha eterna orientadora. Agradeço pela companhia e por nossas conversas.

Ao laboratório de Biologia da Reprodução

que me fez crescer como bióloga e como pessoa. Agradeço a Aline, Paulo e Alexsandra pela companhia e ajuda nos experimentos. Nádia que sempre me incentivou nos experimentos envolvendo FIV. Talita que se tornou minha grande amiga em pouco tempo, compartilhamos alegrias, tristezas e medos, com você esses dois anos foram mais confortáveis e “tranquilos” de vivenciar. Aos alunos do professor Marcelo Silva que me fizeram companhia no laboratório e compartilhamos experiências, dificuldades, alegrias e frustrações, obrigada Daniele, Mari, Livia, Bruna, Felipe, Bruninha, Isadora e Orlando.

Ao laboratório de Reprodução Animal

que sempre me apoiou e incentivou a continuar, mesmo com os problemas enfrentados na FIV. Obrigada aos professores Jacomini e Emilio que sempre me davam dicas e se colocaram a disposição para me ajudar. Mayara que compartilhou todas minhas angustias, meus medos e indignações quanto à FIV. Deize que chegou a pouco tempo mas me ajudou de forma incrível na minha motivação com a FIV e com o mestrado. Obrigada por tudo.

Ao Frigorífico Real

que mesmo com todos os problemas enfrentados na rotina de um frigorífico, cedeu inúmeros ovários para a realização desse trabalho.

Aos amigos

que me ajudaram nessa caminhada, aos antigos e aos novos que tive o prazer de conhecer. Natalia que me entende e me aconselha sempre que preciso. Minha casa, Carol e Cintia, obrigada pela paciência e companhia durante o mestrado. Suzane que desde o pensionato compartilhou e me acompanhou todos esses anos, sou grata por tudo e por todos os momentos. Sarinha sempre presente quando precisei, não tenho palavras para agradecer tudo que passamos. Marcela que está me ajudando, me confortando e me apoiando muito nessa época tão difícil da minha vida. Carol, Mari, Aline, Ana Paula, Andressa, Anaira, Edu e Giovanna, que sempre estavam lá quando precisei, mesmo sendo só uma conversa, um abraço ou um sorvete, obrigada por esses momentos.

A minha família

que sempre me apoiou, me motivou e me fez acreditar que eu podia sempre mais. Foram anos longe de casa, mas na certeza que eu tinha um porto seguro para me aconchegar e um lugar para reunir forças e conseguir levar tudo adiante. Obrigada por me proporcionar tudo que sou hoje.

RESUMO

As alterações de cromatina, apesar de não serem avaliadas no espermograma de rotina, sabidamente influenciam a fertilidade de touros. O método de avaliação cromatínica mais utilizado é o SCSA (*Sperm Chromatin Structure Assay*), entretanto este é de alto custo. Como alternativa a esta metodologia, a coloração com azul de toluidina (AT) após hidrólise ácida associada a análises computacionais se apresenta como uma ferramenta equivalente e acessível. Além de apresentar menor custo, esta metodologia mensura a intensidade de descompactação e heterogeneidade da cromatina. No entanto, ainda não se definiu que níveis de descompactação e heterogeneidade interferem na fertilidade do touro. Este trabalho tem como objetivos definir os níveis de descompactação e heterogeneidade cromatínicas aceitáveis para que não prejudique a fertilidade do touro e o desenvolvimento embrionário, propor uma classificação das alterações cromatínicas de espermatozoides bovinos de acordo com sua localização e verificar se cada tipo de alteração influencia no processo de fecundação e de desenvolvimento embrionário inicial. Para tal, foram utilizadas amostras de sêmen de animais induzidos à subfertilidade, as quais foram utilizadas para produção *in vitro* de embriões (PIVE). Estas amostras foram avaliadas pelo método de coloração com AT e posterior análise computacional. Para caracterização da fertilidade das amostras de sêmen, foram avaliadas as taxas de clivagem no segundo dia e de blastocistos morfologicamente normais no sétimo dia de cada rotina de PIVE. Utilizando análise de imagem computacional, foi possível fazer a seguinte classificação das alterações cromatínicas: descompactação na base da cabeça (DB), na metade basal (DMB), em áreas dispersas (AD), no eixo central da cabeça (DEC) e em toda a extensão da cabeça (DT). Foi utilizado teste de correlação de Pearson ($p < 0,05$ e foi considerado uma tendência para $0,1 > p > 0,05$) para correlacionar essas alterações com a eficiência da PIVE. Em relação à clivagem, DEC e DT apresentaram correlações negativas e significativas ($p = 0,03$ e $p = 0,047$, respectivamente), DB e DMB apresentaram uma tendência para uma correlação negativa ($p = 0,06$ e $p = 0,07$, respectivamente). Em relação à formação de blastocisto, DB apresentou uma tendência para correlação negativa ($p = 0,09$). Além disso, foi testado dois níveis de anormalidade em relação à heterogeneidade (Het) e descompactação (Des) da cromatina: acima de 5% e acima de 10%. A Des apresentou correlação significativa em relação à clivagem quando utilizado níveis acima de 5 e 10% de descompactação ($p = 0,03$ e $p = 0,02$, respectivamente). Já para Het, não houve correlações significativas tampouco tendências com a eficiência da PIVE. Assim, ficou demonstrado que em PIVE, a descompactação no eixo central e total da cabeça do espermatozoide interfere intensamente no processo de fecundação. Os demais tipos de alterações também podem interferir na fecundação de forma menos intensa. A DB pode interferir na formação de blastocistos. Para a avaliação da descompactação, espermatozoides acima de 5% de Des interferem no processo de fecundação. Já a heterogeneidade, independentemente do nível considerado, não interfere em ambos os parâmetros avaliados.

Palavras-chave: Cromatina espermática, análise computacional, produção *in vitro* de embriões.

ABSTRACT

Chromatin alterations, despite not being evaluated in the spermogram routine affect the fertility of bulls. The most used method of chromatin evaluation is the SCSA (Sperm Chromatin Structure Assay). However it is a high method cost. An alternative method is the toluidine blue (TB) after acid hydrolysis associated with computer analysis – this method is presented as an equivalent and affordable tool. In addition to its lower cost, this methodology measures the intensity of decondensation and heterogeneity chromatin. However, it has not yet determined which decondensation and heterogeneity levels interfere with bull fertility. This study aims to define which levels of decondensation and heterogeneity chromatin are acceptable in order not to prejudice the bull fertility and the embryonic development. It also aims to propose a classification of cattle sperm chromatin alteration according to their location, and it also aims to verify if each type of alteration influences the process of fertilization and the early embryonic development. To this, animals semen samples induced to subfertile were used for in vitro production of embryos (IVP). These samples were evaluated using the AT method, and computer analysis. To characterize the semen fertility samples, cleavage ratio were evaluated on the second day and morphologically normal blastocysts in the seventh day of each IVF. With the use of computer image analysis it was possible to make the following classification of chromatin alterations: decondensation of the base of the head (DB), in the basal half (DBH), in scattered areas (SA), in the central axis of the head (DCA) and the entire length of the head (DT). It was used the estimation of Pearson ($p < 0,05$ and it was considered a tendency to $0,1 > p > 0,05$) in order to relate these alterations with IVP efficiency. In relation to cleavage, DCA and DT had a significant negative correlation ($p = 0,03$ and $p = 0,047$, respectively). DB and DBH showed a tendency to a negative correlation ($p = 0,06$ and $p = 0,07$, respectively). In relation to the blastocyst formation, DB showed a tendency to a negative correlation ($p = 0,09$). In addition to this, two abnormality levels were tested in relation to the Heterogeneity (Het) and Decondensation (Des) of chromatin: above 5%, and above 10%. Des presented a significant correlation related to cleavage when used levels above 5% and 10% of decondensation ($p = 0,03$ and $p = 0,02$, respectively), while Het had no significant correlations neither tendencies with the IVP. It was established that the central axis decondensation of the sperm in IVP intensely affects the fertilization process. Other types of alterations may also affects, but with less intensity. DB may affect in blastocyst formation. To evaluate the decondensation, sperm above 5% Des affect the fertilization process. Related to heterogeneity, regardless of the level considered, does not interfere in both parameters evaluated.

Keywords: Sperm chromatin, computational analysis, in vitro production of embryos.

LISTA DE ILUSTRAÇÃO

| | |
|---|----|
| Figura 1 - Esquema da duração da espermatogênese. | 17 |
| Figura 2 – Modelo de “donut-alça” da cromatina espermática.. | 18 |
| Figura 3 – Segmentação das cabeças de espermatozoides pelo <i>Octave</i> | 34 |
| Figura 4 – Delineamento das alterações cromatínicas. | 35 |
| Figura 5 - Transformação das cabeças de espermatozoides em tons de cinza.. | 36 |
| Figura 6 - Espermatozoides com artefato de técnica após seleção por Percoll. | 42 |
| Figura 7 - Cabeças de espermatozoides bovinos com alterações cromatínicas identificados por análises de imagem computacional. | 43 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|---|----|
| Tabela 1: Dados representativos da eficiência da PIVE e alterações da cromatina antes da seleção dos espermatozoides pela técnica de Percoll. | 44 |
| Tabela 2: Dados representativos da eficiência da PIVE e alterações da cromatina após a seleção dos espermatozoides pela técnica de Percoll. | 44 |
| Tabela 3: Correlação entre as alterações na cromatina e a eficiência da PIVE antes e após a seleção dos espermatozoides pela técnica de Percoll. | 45 |
| Tabela 4: Dados demonstrativos da classificação da heterogeneidade e descompactação da cromatina. | 46 |
| Tabela 5: Correlação entre a descompactação da cromatina e a eficiência da PIVE antes e após a seleção dos espermatozoides pela técnica de Percoll. | 46 |
| Tabela 6: Correlação entre as referências propostas da heterogeneidade cromatínica e a eficiência da PIVE antes e após a seleção dos espermatozoides pela técnica de Percoll. | 47 |

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

| | |
|--------------------------------|--|
| AA | <i>Alaranjado de acridina</i> |
| AKAP-4 | <i>Proteína de ancoramento quinase A</i> |
| AMPc | <i>Adenosina monofosfato cíclico</i> |
| AT | <i>Azul de toluidina</i> |
| BRL | <i>Buffalo rat liver</i> |
| BSA | <i>Albumina sérica bovina</i> |
| CASA | <i>Computer Assisted Sperm Analysis</i> |
| CV | <i>Coefficiente de variação</i> |
| COC | <i>Complexo cumulus-ovócito</i> |
| D0 | <i>Dia da fertilização</i> |
| D1 | <i>Um dia após a fertilização</i> |
| D2 | <i>Dois dias após a fertilização</i> |
| D3 | <i>Tres dias após a fertilização</i> |
| D7 | <i>Sete dias após a fertilização</i> |
| DB | <i>Descompactação na base</i> |
| DEC | <i>Descompactação no eixo central</i> |
| DES | <i>Descompactação</i> |
| DMB | <i>Descompactação na metade basal</i> |
| DT | <i>Descompactação total</i> |
| FIV | <i>Fertilização in vitro</i> |
| FOXG1B | <i>Forck head box G1B</i> |
| FSH | <i>Hormônio folículo estimulante</i> |
| GDF9 | <i>Growth differentiation factor-9</i> |
| HECM-6 | <i>Hamster embryo culture medium</i> |
| HET | <i>Heretogeneidade</i> |
| LH | <i>Hormônio luteinizante</i> |
| MPF | <i>Maturation promoting factor</i> |
| MZP | <i>Transição materno-zigótica</i> |
| PIVE | <i>Produção in vitro de embriões</i> |
| PLC- ζ | <i>Fosfolipase C-ζ</i> |
| PVP | <i>Polivinilpirrolidona</i> |
| SCSA | <i>Análise da cromatina espermática</i> |
| SFB | <i>Soro fetal bovino</i> |
| SOF | <i>Fluido sintético do oviduto</i> |
| TALP | <i>Tyrode albumin lactated pyruvate</i> |
| TCM | <i>Tissue culture medium</i> |
| TUNEL | <i>Terminal deoxynucleotidyl transferase mediated dUTP nick end labeling assay</i> |
| WNT5A | <i>Wingless-type MMTV integration 5A</i> |
| ZP | <i>Zona pelúcida</i> |

SUMÁRIO

| | |
|--|-----------|
| 1 - INTRODUÇÃO | 12 |
| 2 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA..... | 15 |
| 2.1 – Espermatogênese | 15 |
| 2.2 - Cromatina espermática..... | 17 |
| 2.3 - Insulação escrotal..... | 19 |
| 2.4 - Técnicas de análises da cromatina espermática | 20 |
| 2.5 - Análise computacional | 22 |
| 2.6 - Produção <i>in vitro</i> de embriões..... | 22 |
| 2.6.1 - Maturação <i>in vitro</i> | 23 |
| 2.6.2 - Fertilização <i>in vitro</i> | 25 |
| 2.6.3 - Cultivo <i>in vitro</i> | 27 |
| 2.7- Influências dos RNAs e epigenética espermático. | 28 |
| 3 – OBJETIVOS | 31 |
| 3.1 - Objetivos gerais..... | 31 |
| 3.2 - Objetivos específicos..... | 31 |
| 4 - MATERIAL E MÉTODOS | 31 |
| 4.1 – Reagentes | 31 |
| 4.2 - Indução das alterações cromatínicas em espermatozoides bovinos..... | 32 |
| 4.3 - Obtenção das amostras de sêmen bovino..... | 32 |
| 4.4 – Análises da cromatina espermática | 33 |
| 4.4.1 – Segmentação das cabeças dos espermatozoides. | 34 |
| 4.4.2 – Classificação quanto a localização da compactação da cromatina. | 34 |
| 4.4.3 – Classificação quanto a descompactação e heterogeneidade da cromatina. | 36 |
| 4.5- Produção <i>in vitro</i> de embriões (PIVE) | 37 |
| 4.5.1 - Obtenção dos ovários | 37 |
| 4.5.2- Aspiração folicular e rastreamento dos ovócitos..... | 37 |
| 4.5.3 - Maturação dos ovócitos..... | 37 |
| 4.5.4 - Seleção espermática e fertilização <i>in vitro</i> | 38 |
| 4.5.5 - Cultivo dos embriões <i>in vitro</i> | 39 |
| 4.5.6 - Avaliação da clivagem e desenvolvimento de blastocisto | 39 |
| 4.6 - Análise Estatística..... | 39 |
| 5 – RESULTADOS..... | 41 |
| 5.1- Classificação da descompactação da cromatina espermática conforme sua localização | 42 |

| | |
|--|-----------|
| 5.2- Análise quantitativa da descompactação (Des) e da heterogeneidade (Het) da cromatina espermática..... | 45 |
| 6 – DISCUSSÃO | 48 |
| 7 – CONCLUSÃO..... | 54 |
| REFERÊNCIAS..... | 55 |
| ANEXO A | 65 |
| ANEXO B | 66 |

1 - INTRODUÇÃO

Touros que apresentam sêmen com parâmetros andrológicos normais, como morfologia e motilidade espermática, podem se comportar como subfêrteis. Uma das possíveis causas encontradas para esse comportamento pode ser a ocorrência de alterações na compactação da cromatina espermática (BELETTI, MELLO, 1996).

A condensação da cromatina dos espermatozoides é uma etapa importante da diferenciação nuclear que ocorre durante a espermatogênese. Nessa etapa, há a substituição das histonas somáticas do DNA pelas protaminas (BLOCH, 1969), configurando-se em uma estrutura altamente compactada. Essa estrutura é chamada de toroide ou *donut* (rosca), no qual cerca de 50.000 pares de bases são enrolados firmemente pelas protaminas (HUD et al., 1993). Essa constituição é importante para proteção e manutenção da estabilidade do DNA (BALHORN, 1982), assim a informação genética pode ser entregue de forma segura para o gameta feminino.

Existem vários métodos para analisar as alterações da cromatina espermática, sendo o mais conhecido a análise da estrutura da cromatina espermática (SCSA). Essa metodologia apresenta a vantagem de analisar um grande número de espermatozoides de forma extremamente rápida, porém devido ao uso do citômetro de fluxo, essa técnica apresenta um alto custo, além disso, não analisa a morfologia e a morfometria do espermatozoide (EVENSON et al., 1980). Uma técnica de análise das alterações cromatínicas mais simples e de menor custo foi desenvolvida por Mello (1982). Essa técnica, chamada de metacromasia induzida, consiste no uso de esfregaços de sêmen que após hidrólise ácida são corados com Azul de Toluidina (AT), possibilita também a análise concomitante das alterações da cromatina espermática e da morfologia da cabeça dos espermatozoides. Moléculas do corante de AT são capazes de se ligar aos fosfatos do DNA. Espermatozoides normais exibem coloração que varia de verde a azul claro. Já os que possuem alteração de cromatina se coram em azul intenso a magenta, o que é denominado de metacromasia (o corante marca estruturas em cores diferentes da cor apresentada pelo corante originalmente). Porém, a coloração por AT por si só, identifica apenas aqueles espermatozoides com alto grau de alterações na cromatina. A metacromasia “induzida” é o aumento da sensibilidade da ligação do AT à cromatina, provocado pela hidrólise ácida. Assim, os espermatozoides que apresentam pequenas alterações na cromatina têm as protaminas parcialmente extraídas, expondo mais fosfatos ao AT, fazendo com que esses espermatozoides que antes não se apresentavam

metacromáticos, passem a ser identificados como portador de alterações cromatínicas. Os espermatozoides normais, mesmo com a hidrólise ácida, permanecem sem apresentar metacromasia e, portanto, continuam sendo assim identificados (BELETTI, 2013).

Ainda que habitual, há uma desvantagem em métodos que necessitam da análise visual do pesquisador ao microscópio, principalmente quanto à avaliação da coloração e sua intensidade (BELETTI, MELLO, 1996). Assim, pela análise de imagem computacional é possível avaliar diferenças na coloração pelos valores dos *pixels* de cada imagem e dessa forma, a análise da intensidade da coloração pode ser realizada de forma mais objetiva (BELETTI, 2013). Além disso, essa metodologia pode proporcionar uma maior repetibilidade às análises e um estudo detalhado do objeto de interesse. Beletti et al (2004a), utilizando análises computacionais, demonstraram a existência de vários tipos de alterações na cromatina de acordo com a localização, além de encontrarem variações na intensidade da descompactação na cromatina.

Alterações na cromatina podem interferir na fertilidade do touro causando impactos negativos para todo o rebanho e consequentemente, na lucratividade da criação. Por se tratar de uma técnica para análise da fertilidade, a produção *in vitro* de embriões (PIVE) bovinos se apresenta como uma ótima ferramenta em análises laboratoriais. Estabelecido os meios e as condições de cultivo, é possível analisar a capacidade fecundante do espermatozoide (taxa de clivagem) e o desenvolvimento embrionário inicial (formação de blastocistos morfológicamente normais) (SILVA et al., 2008).

Nos procedimentos de PIVE, a qualidade do espermatozoide é um dos pontos cruciais para o sucesso da fertilização *in vitro* (FIV) (HANSEN, 2006). Assim, com essa ferramenta é possível analisar as interferências das alterações cromatínicas dos espermatozoides com sua capacidade fecundante e a capacidade do embrião, gerado por esses espermatozoides, de se desenvolver até o estágio de blastocisto.

Além disso, a maioria dos protocolos de PIVE utiliza a técnica de gradiente de Percoll para a seleção espermática. A seleção consiste em obter células viáveis, com motilidade, remover o plasma seminal, o crioprotetor e debris celulares (HENKEL; SCHILL, 2003). Estudos vêm sendo realizados a fim de comparar a estrutura cromatínica antes e após a seleção por Percoll (OLIVEIRA et al., 2011; CAMPOS et al., 2012). Essa análise é realizada pelo grau de descompactação (Des) e heterogeneidade (Het) da cromatina dos espermatozoides. Todavia, não se sabe até que ponto a Des e a Het da cromatina são prejudiciais nos processos de clivagem e desenvolvimento embrionário.

Assim, com intuito de contribuir para o conhecimento científico acerca das anormalidades encontradas na cromatina de espermatozoides bovinos, o presente trabalho propõe uma classificação das alterações cromatínicas de espermatozoides bovinos corados com AT de acordo com sua localização. Cada classificação foi correlacionada com a eficiência da PIVE, possibilitando ter-se uma noção da influência dessas alterações na capacidade fecundante do espermatozoide e no desenvolvimento embrionário subsequente. Ademais, o trabalho testou dois níveis de anormalidades para a Des e para Het da cromatina em relação à eficiência da PIVE. Esses níveis de anormalidades foram testados na tentativa de se encontrar o ponto em que a Des e a Het interferem no processo de fecundação do espermatozoide e na formação de blastocistos.

2 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 – Espermatogênese

A espermatogênese é um processo complexo pelo qual células germinativas dão origem a populações de espermatozoides (ROOSEN-RUNGE, 1977). Esse processo ocorre nos túbulos seminíferos localizados no testículo dos animais.

Os túbulos seminíferos são formados pelo epitélio germinativo e pelo tecido peritubular (DAVIDOFF et al., 1990). O epitélio germinativo consiste em populações de células germinativas em diferentes estágios de desenvolvimento. Essas células germinativas são chamadas de espermatogônias, espermátócitos primário, secundário e espermátides (BANKS, 1992).

Ainda no epitélio germinativo, há as células de Sertoli. Essas células são conectadas por firmes junções de membrana, formando uma barreira hemato-testicular. Essa barreira separa o epitélio germinativo em um compartimento basal e um apical. Durante a espermatogênese, as células germinativas devem transpor essa barreira para finalizar a formação do espermatozoide no compartimento apical. Assim, no compartimento apical, os espermatozoides em formação não entram em contato com outras substâncias oriundas da difusão do sangue (HOLSTEIN, 2003).

Três fases podem ser distinguidas: 1- fase proliferativa, de multiplicação ou mitótica, 2- a meiótica ou spermatocitogênica e 3- a metamórfica, de diferenciação ou spermiogênica (RUSSEL et al.; 1990; BANKS, 1992).

A fase proliferativa se caracteriza pela multiplicação das espermatogônias. Podemos distinguir três tipos de espermatogônias: espermatogônias tipo A, intermediárias e tipo B. Estas podem apresentar outras denominações dependendo do autor e a espécie (RUSSEL et al.; 1990; BANKS, 1992).

Espermatogônias tipo A são as células fontes, a partir delas vão ocorrer as mitoses. Uma das células permanecerá como célula fonte, enquanto as outras se diferenciam em espermatogônias intermediárias. As divisões posteriores das espermatogônias intermediárias originam as espermatogônias tipo B. Essas representam o início do desenvolvimento das células germinativas (BANKS, 1992).

Após as divisões mitóticas, espermatogônias tipo B iniciam a divisão meiótica. A meiose ocorre com mudanças na configuração da cromatina no núcleo. Esses processos estão

relacionados com a condensação dos cromossomos, *crossing over*, redução do número de cromossomos e empacotamento do DNA espermático. Células em meiose são chamadas de espermatócitos. As que estão na primeira divisão meiótica são chamadas de espermatócitos primários, enquanto as que estão na segunda divisão são chamados espermatócitos secundários (HOLSTEIN, 2003).

Os espermatócitos primários iniciam o estágio de prófase I no compartimento basal do epitélio germinativo. Após passar a barreira hemato-testicular, os espermatócitos primários finalizam a meiose I resultando em duas células haploides. A meiose II se inicia e agora essas células são chamadas de espermatócitos secundários. A divisão dos espermatócitos secundários vão dar origem a células haploides denominadas espermatídes (HOLSTEIN, 2003).

As espermatídes formadas precisam se diferenciar em espermatídes maduras, culminando na última etapa da espermatogênese: a fase de diferenciação ou espermiogênese. Três processos de diferenciação estão envolvidos nessa fase: compactação da cromatina nuclear, formação de enzimas do acrossoma pelo complexo de Golgi e desenvolvimento do flagelo com sua implantação no núcleo (HOLSTEIN, 2003). Na fase de diferenciação, ocorre uma importante etapa, o DNA dos espermatozoides é compactado pela substituição das histonas somáticas (proteínas nucleares básicas) por nucleoproteínas, denominadas protaminas (BLOCH, 1969). Estas serão abordadas posteriormente.

Completando a fase de diferenciação, as espermatídes são capazes de deixar o epitélio germinativo e migrar para o lúmen dos túbulos seminíferos; esse processo de migração é chamado de espermição. Normalmente, um grande número de espermatídes apresentam malformação, afetando o acrossoma, o núcleo ou o flagelo. (HOLSTEIN, 2003).

A produção diária de espermatozoides em um touro adulto é de 12 a 14 bilhões (HAFEZ; HAFEZ, 2000). A espermatogênese de touros ocorre em aproximadamente 61 dias seguido de maturação no epidídimo (RAHMAN et al., 2011), como demonstrado na figura abaixo:

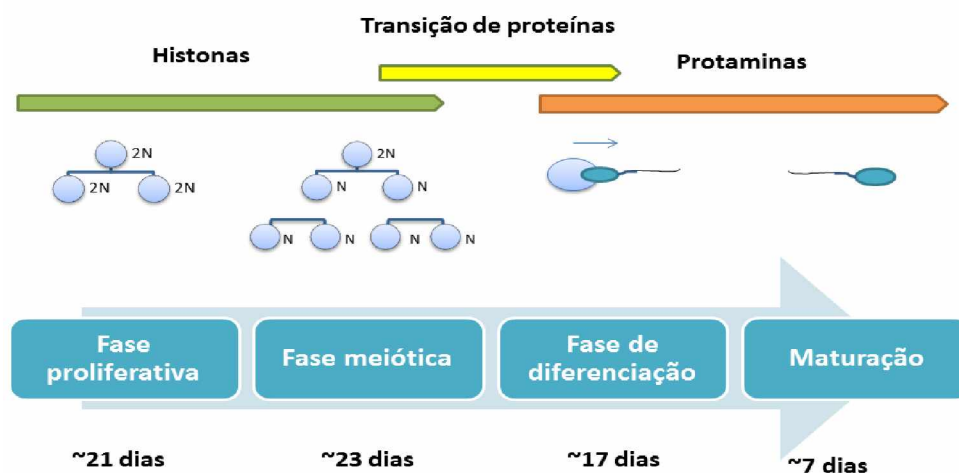


Figura 1 - Esquema da duração da espermatogênese. O processo completo da espermatogênese dura cerca de 68 dias contando com a maturação dos espermatozoides no epidídimo. Fonte: Adaptado de RAHMAN et al (2011).

2.2 - Cromatina espermática

A integridade do DNA dos espermatozoides em mamíferos tem importância vital na contribuição paterna. Por ser responsável pela condução do genoma masculino, o DNA espermático, juntamente com o DNA materno, é responsável pela formação de uma prole normal.

Espermatozoides apresentam duas regiões: a cabeça e a cauda (flagelo). A cabeça é composta pelo acrossoma e o núcleo, sendo que a maior parte da cabeça é composta pelo núcleo. A organização normal do DNA do espermatozoide é a que apresenta cromatina altamente compactada e estável, além disso, seu arranjo e composição apresentam características únicas. Possui ainda, em pequena quantidade estruturas citoesqueléticas e citoplasma (EDDY, 2006).

Como citado anteriormente, um importante evento na fase de diferenciação é a substituição das histonas somáticas (proteínas nucleares básicas) pelas protaminas. Denominadas também de proteínas queratinosas, as protaminas possuem caráter básico, são ricas em arginina e cisteína oxidada (BLOCH, 1969; BALHORN, 2007). Em ratos, cerca de 98% das histonas são substituídas pelas protaminas (BENCH et al., 1996), já em humanos essa porcentagem chega a 90-95% (OLIVA, 2006).

A protamina tem a capacidade de compactar o material genético do espermatozoide 6 vezes mais que o DNA das células somáticas (MCLAY; CLARKE, 2003). Segundo a revisão de Oliva (2006), muitas funções foram propostas para as protaminas, tais quais: condensar o

material genético, tornando-o mais compacto e hidrodinâmico para que o espermatozoide se torne mais veloz; proteção do material genético contra a ação de nucleases ou agentes mutagênicos; permite a reprogramação do material genético pelo ovócito através da exclusão de fatores transcriptores e outras proteínas durante a espermatogênese; envolvimento no *imprinting* paterno durante a espermatogênese; e podem ainda, ser pontos de checagem durante a espermatogênese.

A unidade básica da cromatina de espermatozoides é o toroide de protamina (HUD et al.; 1993), essa estrutura é formada por cerca de 50.000 pares de base de DNA firmemente enrolados pelas protaminas, formando uma estrutura em forma de donut (rosca) ou toroide. Essa constituição provavelmente é importante para a proteção e manutenção da estabilidade do DNA (BALHORN, 1982).

Outro aspecto da organização estrutural da cromatina espermática são os domínios em formato de alças (WARD, 1989). Sotolongo (2003) propôs então, o modelo “donut-alça” (Figura 2) que sugere que tanto os toroides de protamina quanto as alças estariam relacionados. Nesse modelo os domínios em forma de alça são condensados em um único toroide de protamina. As alças estariam fixadas à matriz nuclear em locais denominados de regiões de anexação da matriz (MARs). Este modelo propõe ainda que há regiões *DNase-sensitive toroid-linker* entre cada toroide. Estas regiões provavelmente seriam os locais de ligação das alças do DNA à matriz nuclear, além de ter a possível função de fragmentação do DNA prevenindo a transmissão do DNA danificado para o embrião durante a fertilização (SOTOLONGO, 2003).

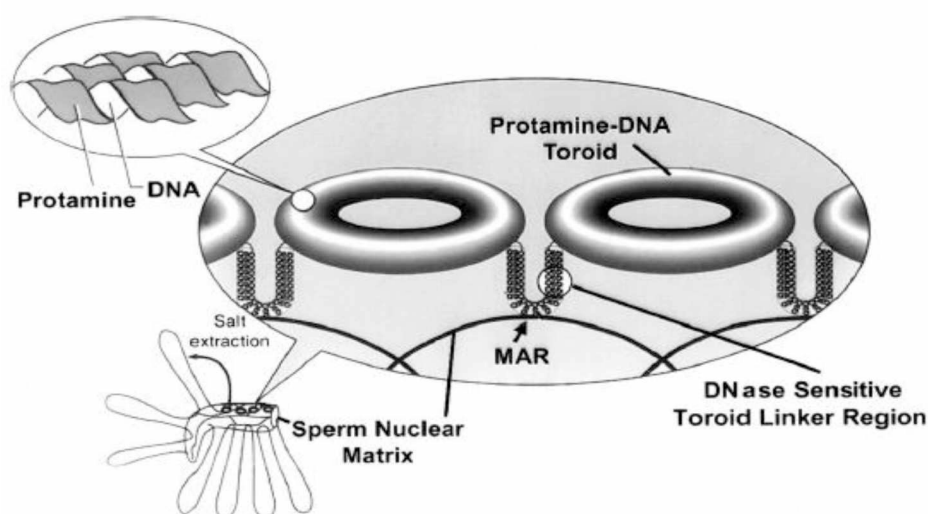


Figura 2 – Modelo de “donut-alça” da cromatina espermática. Neste modelo o DNA espermático é formado por toroides de protamina e que em cada toroide, um domínio da alça é condensada em sua estrutura. Cada alça é fixada nas regiões de anexação da matriz (MARs) (SOTOLONGO, 2003).

Outra estrutura encontrada na cabeça do espermatozoide proposta por Ward e Coffey (1989) é o ânulo nuclear. Este é um componente da matriz nuclear com estrutura proteica de forma circular, no qual o DNA permanece ancorado mesmo após a descompactação. O ânulo encaixa-se na base da cabeça do espermatozoide e todos os cromossomos se ligam nele em algum ponto (WARD; COFFEY, 1989).

Danos no DNA do espermatozoide podem causar impactos negativos para o desenvolvimento fetal (EVENSON; JOST, 2000). Espermatozoides que apresentam graves alterações cromatínicas podem apresentar alterações na forma da cabeça e, conseqüentemente, na sua hidrodinâmica, isso acaba por interferir na motilidade e no processo de fecundação. Alterações menos graves podem até não interferir na motilidade, porém os danos no DNA impossibilitariam a união dos pró-núcleos masculinos e femininos, inviabilizando o zigoto. Aqueles com alterações mais leves podem não interferir no processo de fecundação e no desenvolvimento embrionário inicial, entretanto, as etapas posteriores do desenvolvimento embrionário podem se apresentar comprometidas. Menos frequente, a gestação pode até chegar a termo, porém os neonatos apresentariam alterações genéticas de diversos tipos (BELETTI, 2013).

2.3 - Insulação escrotal

A insulação escrotal é um método que mimetiza os efeitos do estresse térmico ambiental sobre as células da espermatogênese em condições controladas. Há um aumento de 2 a 3°C no escroto dos animais insulados (SETCHELL, 1998). Tem sido freqüentemente usada para estudar a dinâmica de defeitos de espermatozoides no espermograma de touros, tendo como base a gravidade e duração da lesão térmica, além do intervalo entre isolamento e coleta de sêmen (FERNANDES et al.; 2008).

Essa técnica vem sendo utilizada convenientemente em ovinos (BYERS; GLOVER, 1984; MIEUSSET et al.; 1992; ARMAN et al.; 2006), bovinos (KARABINUS et al, 1997; FERNANDES et al.; 2008) e equinos (FRIEDMAN et al.; 1991; MAWYER et al.; 2012). Touros submetidos a insulação escrotal por três ou quatro dias apresentam diferentes quantidades e alterações espermáticas conforme evolui a degeneração e regeneração testicular (DUARTE, 2010).

Segundo Setchell (1998) há uma gama de efeitos causados pela insulação escrotal, podendo ser citados: alterações no peso do testículo, mudanças histológicas (degeneração do epitélio germinativo), fisiológicas, bioquímicas e endócrinas. Além disso, a elevação da

temperatura pode resultar em redução da motilidade e concentração dos espermatozoides, aumento de patologias espermáticas e alterações do plasma seminal.

As células germinativas dos testículos apresentam graus de sensibilidade diferentes à elevação da temperatura escrotal. Espermátócitos e espermátides são mais sensíveis, enquanto que as espermatogônias são mais resistentes. Sobre o mecanismo pelo qual esse método leva à formação de espermatozoides anormais, o autor sugere que o aumento do metabolismo na ausência do acréscimo do fluxo sanguíneo testicular pode levar à hipoxia e a formação de oxigênio reativo. Consequentemente, ocorre a formação de anormalidades espermáticas (SETCHELL, 1998)

2.4 - Técnicas de análises da cromatina espermática

Hoje existem muitas técnicas com a finalidade de identificar alterações na cromatina espermática. Gledhill (1966) foi o primeiro a diferenciar espermatozoides normais daqueles com complexo DNA-proteína anômalo (cromatina anômala). Isso foi possível graças à técnica de Feulgen. Nessa técnica, espermatozoides com alterações no DNA apresentam respostas mais intensas à reação e se coram de forma mais acentuada. Após essa descoberta, várias técnicas surgiram para identificar alterações na cromatina dos espermatozoides.

Atualmente, uma das técnicas mais utilizadas para a identificação de alterações na cromatina espermática é a Análise da Estrutura da Cromatina Espermática (SCSA). Esse método se baseia na avaliação da suscetibilidade do DNA à desnaturação pelo ácido ou calor (EVENSON et al., 1980). Com espermatozoides corados com alaranjado de acridina (AA) e com o auxílio do citômetro de fluxo, é possível quantificar os espermatozoides de acordo com a fluorescência emitida pela reação do corante com o DNA. Assim espermatozoides com cromatina normal emitem fluorescência verde e aqueles com cromatina anormal, fluorescência vermelha.

Outras técnicas também são utilizadas para identificação de alterações na cromatina em esfregaços de espermatozoides, como: a coloração por AA sem o uso do citômetro de fluxo (TEJADA et al., 1984), coloração com azul de toluidina (AT) (MELLO, 1982; BELETTI; MELLO, 1996), coloração com azul de anilina (HAMMADEH et al., 2001, ERENPREISS et al., 2001), técnica de TUNEL (*Terminal deoxynucleotidyl transferase mediated dUTP nick end labeling assay*) (MARTINS et al., 2007), teste de dispersão de cromatina espermática e Esperma-Sus-Halomax (ALKIMN et al., 2013).

O citômetro de fluxo, além de apresentar um alto custo, não permite uma avaliação concomitante da cromatina e da morfologia do espermatozoide, uma vez que a cromatina é avaliada pelo citômetro e a morfologia em esfregaço de sêmen. Assim, a análise de imagem computacional por microscopia de luz de esfregaços de espermatozoides corados com AT vem sendo usada para suprir esses atributos (BELETTI et al.; 2005).

As moléculas do corante do AT se ligam aos fosfatos de DNA. Desse modo, quando essa reação é realizada em espermatozoides, os que apresentam a cromatina extremamente compactada, são corados com tonalidades que variam de verde a azul claro, já que a maioria dos fosfatos estão bloqueados pelas protaminas. Nos espermatozoides com cromatina pouco compactada, as moléculas do corante se ligam facilmente ao DNA. Entretanto, a técnica de coloração com AT identifica apenas cromatina com alto grau de alteração. Assim, Mello (1982) propôs a metacromasia induzida, que nada mais é que o aumento da sensibilidade da reação por hidrólise ácida antes da coloração. Dessa forma os espermatozoides são hidrolisados e as proteínas nucleares são parcialmente extraídas, resultando na exposição dos fosfatos de DNA. Aqueles com a cromatina normal, ou seja, altamente compactada, são pouco afetados pela hidrólise e continuam apresentando uma coloração azul claro. Os que apresentam alterações na cromatina são mais susceptíveis à hidrólise e consequentemente permite que o AT se ligue aos fosfatos de DNA de forma mais intensa, resultando em um azul escuro para magenta.

Estudos relacionados à técnica de AT foram desenvolvidos a fim de demonstrar sua capacidade de detecção de alterações na cromatina. Naves et al (2004) avaliaram a cromatina espermática em equinos com AT e AA. Foram analisados 20 garanhões considerados férteis. Mil espermatozoides de cada garanhão foram analisados por AT e igual número foi analisado por AA. A incidência das alterações da cromatina foi maior nas amostras coradas com AT, demonstrando que para equinos, a técnica de AT é mais eficiente que a AA na detecção das alterações na cromatina. Beletti e Mello (2004b) compararam as técnicas de Feulgen e AT em espermatozoides de coelho. Neste estudo, foi utilizado 700 ejaculados de coelho e avaliado 1.000 espermatozoides por ejaculado. A proporção de espermatozoides com alteração na cromatina identificado por AT foi semelhante à encontrada na reação de Feulgen. Assim ambas as técnicas apresentam eficácia similar na identificação de alterações na cromatina.

Ainda que habitual, há uma desvantagem em métodos que necessitam da análise visual do pesquisador ao microscópio, principalmente quanto à avaliação da coloração e sua intensidade (BELETTI; MELLO, 1996). Podem ocorrer influências externas e internas na

interpretação dos resultados, que podem caracterizar em um alto grau de subjetividade, levando a conclusões duvidosas.

2.5 - Análise computacional

O uso da análise de imagens computacionais se tornou uma importante ferramenta no âmbito das pesquisas. Algumas vantagens que surgiram a partir dessa ferramenta foram: aumento da objetividade, capacidade de reprodução da imagem e detecção de mudanças não aparentes pelo método convencional (HAMILTON; ALLEN, 1995).

Na área da reprodução, muitos sistemas que utilizam análises de imagens computadorizada com a finalidade de avaliar a função espermática vem sendo desenvolvidas (ARRUDA, 2000; MATOS et al., 2008; CELEGHINI et al., 2010). As pesquisas apontam para o desenvolvimento de técnicas com intuito de avaliar o potencial de fertilidade do sêmen, dessa forma, as Universidades e Centro de Pesquisas equipam seus laboratórios com técnicas e sistemas que oferecem maior objetividade às análises (ARRUDA et al., 2011). Contudo, a maioria desses programas estão relacionados a análises da motilidade e morfologia espermática, como por exemplo o sistema automatizado CASA (*Computer Assisted Sperm Analysis*).

As análises computacionais permitem avaliar os espermatozoides um por um no esfregaço de sêmen. Isso possibilita uma análise detalhada do estudo das alterações da cromatina espermática. Vários estudos utilizando análises computacionais de imagens vêm sendo realizado no laboratório de Biologia da Reprodução da UFU a fim de analisar a cromatina espermática (BELETTI et al., 2004; NAVES et al., 2004; BELETTI et al., 2005; SILVA et al., 2008; RODRIGUES et al., 2009; OLIVEIRA et al., 2011; KANAYAMA; BELETTI, 2011; CAMPOS et al., 2012;).

2.6 - Produção *in vitro* de embriões

A Produção *in vitro* de embriões (PIVE) de mamíferos é uma biotécnica muito utilizada como alternativa para acelerar a multiplicação de animais com alto potencial genético. Além de ser uma ferramenta de pesquisa sobre fisiologia e biologia do desenvolvimento, a PIVE possui alto potencial na produção de clones e animais transgênicos (BERNARDI, 2005).

A primeira observação de uma fertilização *in vitro* (FIV) foi em ovócito de estrela do mar com a formação da primeira célula embrionária no final dos anos de 1870 (HERMANN, 1879). A partir disso, muitos estudos relacionados à reprodução começaram a ser desenvolvidos a fim de estabelecer metodologias para manipular e potencializar a produção de embriões.

Em meados dos anos de 1900, os experimentos envolvendo a PIVE começaram a ser desenvolvidos em coelhos (LEWIS; GREGORY, 1929; PINCUS; ENZMANN, 1935). E nessa época, o conhecimento sobre os seus processos e a produção dos meios eram escassas. Com o passar dos anos, foi-se aprimorando os meios de cultivo e a técnica de PIVE até que em 1959, Chang relatou o primeiro animal (coelho) gerado a partir dessa técnica. A partir desse marco, foram estabelecidas metodologias para camundongos (WHITTEN, 1968), ratos (TOYODA; CHANG, 1974) e inclusive para humanos. Louise Brown foi o primeiro bebê nascido de PIVE em 1978 (STEPTOE; EDWARDS, 1978).

Em 1982, Bracket e colaboradores anunciaram o nascimento do primeiro bezerro produzido por PIVE. A partir de então, a PIVE começa a ter grande impulso nas pesquisas. Há o interesse tanto científico, para as ciências básicas e aplicadas, como há o interesse econômico para a pecuária nacional (GONÇALVES, 2008).

Os conhecimentos das etapas da PIVE são essenciais para o seu sucesso. Cada laboratório possui sua forma de conduzir suas rotinas, produzem seus próprios meios de cultivo e estabelecem formas e tempos diferentes para cada etapa. Mesmo com o desenvolvimento da técnica e o grande número de pesquisas, os índices de blastocistos variam entre 30-45% do total de ovócitos submetidos a essa técnica. E desses blastocistos inovulados, os índices de prenhez variam de 40-60% (KANE et al, 2003; RUBIN 2006).

Muitos fatores podem comprometer o sucesso da produção *in vitro* de embriões. O processo como um todo consiste em etapas interdependentes como a maturação *in vitro*, fertilização *in vitro* e o cultivo *in vitro*. O pH, a osmolaridade do meio, temperatura e a tensão de O₂ podem afetar o sucesso de uma ou mais etapas da PIVE (NAGAI, 2001). Além disso, a qualidade dos ovócitos (LONERGAN; FAIR, 2008), os espermatozoides utilizados para fertilização (HANSEN, 2006) e as condições de cultivo (LONERGAN; FAIR, 2008) são os principais requisitos para o sucesso da PIVE.

2.6.1 - Maturação *in vitro*

Na maioria dos mamíferos, o início da formação dos ovócitos se dá na vida fetal. Primeiramente, as células germinativas primordiais diferenciam-se em oogônias, e essas se multiplicam por mitose. Após o período de multiplicação, as oogônias entram em meiose, sendo agora denominados ovócitos primários. Os ovócitos primários permanecem na prófase I na fase de diplóteno (VAN DEN HURK; ZHAO, 2005).

A continuação da meiose é promovida por vários fatores. *In vitro*, a simples retirada do ovócito imaturo do ambiente folicular é capaz de retomar a meiose e iniciar a maturação, pois o líquido folicular possui substâncias inibitórias que impedem a maturação; e com a sua privação, o ovócito pode retomar a meiose (LONERGAN et al.; 2003). Assim, subsequentes reações envolvendo alterações de fosforilação de proteínas, alteração no nível de adenosina monofosfato cíclico (AMPc) e níveis de cálcio ocorrem no ovócito até que ele atinja a maturação (VAN DEN HURK; ZHAO, 2005).

Além disso, com o rompimento da vesícula germinativa, há a ativação da proteína chamada *maturation promoting factor* (MPF). A MPF é responsável pelo desencadeamento da maturação do ovócito. Essa proteína controla os processos celulares por uma cascata de eventos de fosforilação e desfosforilação. A MPF ativa é capaz de fosforilar proteínas que formam o envelope nuclear e proteínas envolvidas na condensação da cromatina, além de promover uma reorganização do citoesqueleto (VAN DEN HURK & ZHAO, 2005).

Na fase de maturação, os ovócitos primários se preparam para três tipos de maturação: a maturação citoplasmática, que consiste em uma reorganização da posição das organelas, redução do tamanho do complexo de Golgi e compactação do nucléolo; maturação nuclear, caracterizado pelo rompimento do envoltório nuclear, condensação de cromossomos e retomada da meiose de prófase I para metáfase II com a extrusão do primeiro corpúsculo polar; e maturação molecular, que se refere ao aumento da quantidade de lipídeos e a síntese e acúmulo de RNAs de origem materna (SIRARD et al 2006, DODE 2006, GONÇALVES 2008).

Em bovinos, o embrião adquire a capacidade de síntese de RNAs após o quarto ciclo celular, entre os estágios de 8 a 16 células. Até então, o embrião necessita de RNAs de origem materna. Devido a isso a maturação molecular apresenta uma importante função no desenvolvimento inicial do embrião, possibilitando as primeiras divisões do embrião (GANDOLFI; GANDOLFI, 2001; DODE, 2006; SIRARD et al., 2006). Essa transição do consumo de RNA materno para a ativação do genoma do embrião e síntese de RNA é chamada de transição materno-zigótica (MZT).

Durante o desenvolvimento do ovócito, há também a formação das junções gap; essas são projeções que comunicam as células da granulosa ao seu interior. Essas projeções são responsáveis por transportar aminoácidos, metabólitos e moléculas sinalizadoras para o crescimento e desenvolvimento do ovócito (GILCHRIST et al., 2008).

In vitro, podemos notar visualmente que o ovócito está maturado devido a expansão das células do *cumulus* (GONÇALVES, 2008). As células do *cumulus*, quando estimulados pelo hormônio luteinizante (LH) ativa o *growth differentiation factor-9* (GDF9) que induz a secreção do ácido hialurônico, o qual se deposita entre as células do *cumulus* dando um aspecto muco-elástico causando a expansão das células. Esse aspecto muco-elástico é importante nos eventos de captura do ovócito pelas fimbrias do oviduto da fêmea, além de ser uma barreira seletiva para espermatozoides (VAN DEN HURK & ZHAO, 2005).

Outro componente importante para a maturação do ovócito é o hormônio folículo estimulante (FSH). Ele atua nas células da granulosa e resulta na estimulação da proliferação celular, síntese de esteróides e expressão de receptores para LH (MARTINS et al., 2008).

Ovócitos de mamíferos possuem uma espessa membrana transparente chamada Zona Pelúcida (ZP), a qual está envolvida em muitos processos da fertilização. Em bovinos, a ZP é composta por três glicoproteínas: ZP1, ZP2, ZP3. Essas glicoproteínas são receptores responsáveis pela ligação do espermatozoide ao ovócito (JOVINE et al., 2005).

A maturação *in vitro* ainda se apresenta ineficiente, pois os índices de blastocistos são de cerca de 30-45% do total de ovócitos submetidos a essa técnica (KANE et al., 2003). Porém, muitos fatores estão envolvidos para uma rotina de sucesso de PIVE, como por exemplo: tamanho e qualidade do folículo (RODRIGUEZ; FARIN, 2004; NAGANO et al., 2006), qualidade das células do *cumulus*, aparência do citoplasma (NAGANO et al., 2006), além da qualidade dos meios utilizados na PIVE.

2.6.2 - Fertilização *in vitro*

O processo de fertilização do ovócito envolve várias etapas complexas. O espermatozoide deve possuir motilidade para se aproximar do ovócito e deve sofrer o processo de capacitação e subsequente reação acrossômica (RA). Somente espermatozoides capacitados são capazes de se ligarem à zona pelúcida (receptor ZP3). Essa ligação induz a RA e os espermatozoides conseguem se ligar ao receptor ZP2. Assim, a fertilização só ocorre

após a liberação de enzimas derivadas da RA que digerem a zona pelúcida (RODRIGUEZ-MARTINEZ, 2007; GONÇALVES 2008).

A capacitação do espermatozoide é um evento gradual e essencial para a fertilização. Está associada a mudanças bioquímicas, fisiológicas e envolve alterações na propriedade celular do espermatozoide. Como resultado, há a hiperativação e orientação da motilidade, assim o espermatozoide é capaz de se ligar à zona pelúcida (FLORMAN et al., 2008).

O acrossoma é uma vesícula secretora limitada à região frontal da cabeça do espermatozoide. Em resposta aos estímulos, a membrana do acrossoma se funde à membrana plasmática do espermatozoide. Isso gera uma exposição do conteúdo acrossomal para o ambiente extracelular por exocitose (YANAGIMACHI, 1994). Seu conteúdo é formado por enzimas que digerem a zona pelúcida, como por exemplo: a hialuronidase (BABA et al.; 2002) e acrosina (BARROS et al.; 1992, BERMUDEZ et al.; 1994).

In vivo, a capacitação ocorre durante o transporte dos espermatozoides no trato genital feminino (YANAGIMACHI, 1994). *In vitro*, o que possibilita a capacitação do espermatozoide é a adição de um glicosaminoglicano, a heparina. O mecanismo pelo qual a heparina atua na capacitação não é totalmente conhecido, mas parece estar envolvido no desencadeamento de mudanças bioquímicas na membrana do espermatozoide (GONÇALVES, 2008).

Ademais, espermatozoides ejaculados e criopreservados necessitam de um pré-tratamento antes da PIVE. Algumas proteínas aderidas na membrana do espermatozoide, particularmente na região do acrossoma, devem ser removidas, além da remoção do crioprotetor. Centrifugação por gradiente de densidade (Percoll) e lavagens do esperma são suficientes para essa remoção (RODRIGUEZ-MARTINEZ, 2007).

O Percoll é composto por partículas de sílica coloidal (15 a 30 nm de diâmetro) cobertas com polivinilpirrolidona (PVP) (AVERY; GREVE, 1995). Na seleção espermática pela técnica de Percoll, o sêmen é centrifugado e submetido à passagem por diferentes gradientes (90% e 45%) de Percoll, assim a separação é baseada na densidade das células. Espermatozoides normais e anormais possuem densidades diferentes, os viáveis apresentam densidade 1,10g/mL, enquanto nos anormais a densidade varia de 1,06 a 1,09g/mL. Dessa forma, após a centrifugação, leucócitos, *debris* celulares e espermatozoides anormais se encontram na interface 45% e 90%, enquanto aqueles viáveis com motilidade e morfologia normal se encontram no pellet do tubo (BEYDOLA et al., 2013). Após a seleção, os espermatozoides são co-cultivados com o ovócito para que ocorra o processo de fecundação.

A fusão do espermatozoide com a ovócito ocorre no espaço perivitelíneo. O ovócito responde com a despolarização da membrana plasmática, aumento das oscilações intracelulares de cálcio, exocitose dos grânulos corticais e síntese de proteínas (GONÇALVES et al, 2008). Oscilações de Ca^{2+} são necessárias para o desenvolvimento embrionário normal (STRICKER, 1999). Um dos sinais que inicia essas oscilações parece ser ativada pela fosfolipase C- ζ (PLC- ζ) (SAUNDERS, 2002). A PLC- ζ está presente nos espermatozoides, e ao fecundar o ovócito, contribui para a sua ativação e formação do pró-núcleo (BOERKE et al., 2007)

Após a fertilização, os ovócitos, que estavam em metáfase II, completam a segunda divisão meiótica com a extrusão do segundo corpúsculo polar. Surge então o pró-núcleo feminino, cromossomos envolvidos por uma membrana nuclear. Ao mesmo tempo, a membrana nuclear dos espermatozoides se desintegra, a cromatina descondensa e há a formação de uma nova membrana nuclear que envolve os cromossomos, formando o pró-núcleo masculino. Os pró-núcleos se fundem ocorrendo a singamia e a formação de um núcleo diploide que originará um novo animal (GONÇALVES et al, 2008).

2.6.3 - Cultivo *in vitro*

Após a fertilização, os prováveis zigotos são desnudados e transferidos para o meio de cultivo, que deve permanecer até o estágio de blastocisto, isso é, 7 dias após a fertilização. O meio de cultivo é crucial para o desenvolvimento e qualidade dos blastocistos. Passos importantes devem ocorrer no cultivo como: as primeiras clivagens, ativação do genoma embrionário após a MPZ, compactação da mórula e formação do blastocisto. Qualquer alteração no ambiente de cultivo (PH, CO_2 , temperatura, nutrientes) pode comprometer uma ou todas as etapas do cultivo (NAGAI, 2001; LONERGAN et al., 2003).

O meio de cultivo mais comum é o meio SOF (fluido sintético do oviduto). O SOF é considerado um meio simples, uma mistura de sais que mimetizam o ambiente uterino, e seu uso é direcionado para a produção de embriões. Além disso, outros meios de cultivo também podem ser utilizados, como o *tissue culture médium* (TCM 199) (WRENZYCHI et al., 2001), meio Ham's F-10 e *hamster embryo culture medium* (HECM-6) (AVERY, GREVE, 1995).

Um tipo de cultivo que auxiliou em melhores índices foi o sistema de co-cultivo com células somáticas (GORDON, 1994). Diferentes tipos de células somáticas podem ser usadas, as mais comuns são: células do oviduto, células VERO (linhagens celulares estabelecidas

para cultivo), células BRL (*buffalo rat liver*), células do *cumulus* e células da granulosa (LUCIANO et al., 2005). Um dos motivos para se utilizar o sistema de co-cultivo é a capacidade das células somáticas retirarem embriotoxinas do meio de cultivo e produzirem substâncias embriotróficas, as quais auxiliam no desenvolvimento dos embriões em cultivo (BAVISTER et al., 1992). Além disso, as células do co-cultivo protegem os ovócitos e embriões contra o estresse oxidativo ocasionado pelo cultivo *in vitro* (FATEHI et al., 2005).

Outro tipo de cultivo utilizado é o cultivo em baixa tensão de oxigênio. É uma técnica que eleva os custos do laboratório, pois necessita de uma mistura de gases com 5% de O₂, 5% de CO₂ e 90% de N. O oxigênio geralmente é tóxico para a maioria dos tipos celulares, pois aumenta a produção de radicais livres. Autores afirmam que a qualidade dos embriões em cultivo em baixa tensão são melhores que os cultivados em alta tensão (YUAN et al., 2003; KITAGAWA et al., 2004). Outros afirmam que se cultivado em alta tensão utilizando o co-cultivo, não há diferenças estatísticas na produção e qualidade dos embriões (KHURANA; NIEMANN, 2000; CORRÊA, 2006).

2.7- Influências dos RNAs e epigenética espermático.

Até recentemente acreditava-se que o espermatozoide era simplesmente uma célula de veículo do material genético masculino. A descoberta da presença de RNAs no núcleo espermático mudou essa concepção (MILLER et al., 2005). O estudo dos RNAs presentes no espermatozoide tem grande importância para compreendermos os mecanismos que levam a formação da prole. Trabalhos apontam que o espermatozoide apresenta RNAs essenciais para os processos de fertilização e desenvolvimento embrionário (OSTERMEIER, 2002). Em humanos, Ostermeier et al (2004) por meio da técnica de PCR, encontrou transcritos de genes em espermatozoides que não constavam em ovócitos não fertilizados: Clusterin, AKAP-4 e Protamina-2. Além disso, foi encontrado RNAs presentes no espermatozoide que não se encontram nos ovócitos e que são responsáveis pela embriogênese e morfogênese: FOXG1B e WNT5A.

A protamina-2, encontrada em humanos, mas não em bovinos, são proteínas que se ligam a ácidos nucleicos e tem grande expressão durante a compactação do DNA na fase de espermátide. Sua expressão no ovócito fertilizado provavelmente é deletéria, assim o RNA é degradado ao entrar no ovócito (OSTERMEIER et al., 2004; BOERKE et al., 2007).

Os RNAs mensageiros que codificam a Clusterin e AKAP-4 provavelmente são os RNAs que participam dos eventos da fertilização do ovócito. A clusterin (glicoproteína

sulfatada 2 ou PEC-2) tem papel importante no desenvolvimento embrionário, está relacionado às interações célula-célula e célula-substrato, aumento da taxa de fertilidade, transporte lipídico, reciclagem da membrana, estabilização das proteínas de estresse e promoção ou inibição da apoptose (OSTERMEIER et al, 2004; TROUGAKOS, GONOS, 2002). O RNAm que traduz o AKAP-4 (proteína de ancoramento quinase A) está intimamente relacionado às cascatas de sinalizações importantes para a ativação inicial do oócito após a fertilização. É uma proteína predominante nas fibras densas do flagelo, além de ser reguladora da motilidade em condições de fertilização. Provavelmente está relacionada com o RNAm que codifica PLC- ζ , responsável pela ativação do ovócito (KIYOSHI et al., 2002; BOERKE et al., 2007).

FOXG1B (*fork head box G1B*) e WNT5A (*wingless-type MMTV integration 5A*) possuem grande influência no desenvolvimento embrionário. FOXG1B é importante para a padronização morfológica inicial do embrião. Enquanto que a molécula sinalizadora WNT5A está envolvida na diferenciação celular associada com os padrões morfométricos do embrião (BOERKE et al., 2007).

Outro importante tipo de RNA presente no espermatozoide de mamíferos são os microRNAs (miRNAs) (DADOUNE, 2009). Muitas famílias de miRNAs foram identificados no testículo de mamíferos, todavia apenas uma pequena parte é retida nos espermatozoides maduros (MASHIMA et al., 2008; KRAWETZ et al., 2011). Esses miRNAs vem sendo associados com eventos de fertilização e desenvolvimento embrionário pela regulação da expressão de vários genes (KUMAR et al., 2013). O estudo de LIU et al (2012) demonstrou que o microRNA-34c, transmitido pelo espermatozoide, é necessário para a primeira divisão do zigoto em ratos, além disso, outros 16 miRNAs foram encontrados no zigoto; provavelmente esses miRNAs apresentam um importante papel nos primeiros eventos do desenvolvimento embrionário.

Analisando os eventos acerca dos mecanismos que tornam o espermatozoide uma célula única, como a transcrição do RNA espermático, a metilação do DNA e modificações das histonas, fica evidente um papel nos eventos epigenéticos que levam ao desenvolvimento embrionário (MILLER, et al., 2005; KUMAR et al., 2013). Entender as contribuições epigenéticas herdadas dos espermatozoides para o embrião pode aumentar as chances de sobrevivência de embriões produzidos *in vitro* e ainda aumentar a estabilidade de gravidez (YAMAUCHI et al., 2011).

A etapa de metilação do DNA espermática é de suma importância na formação do espermatozoide. Essa etapa consiste na adição de um grupamento metil à posição C5 do anel

da citosina, essa reação é catalisada por enzimas DNA metiltransferases (KLOSE; BIRD, 2006; FAN et al., 2009). Esse processo de metilação exerce várias funções no desenvolvimento embrionário normal, como na regulação gênica, na inativação do cromossomo X, no *imprinting* genômico e nas modificações da cromatina (BIRD, 2002).

Outro importante fator epigenético é a presença de histonas no DNA espermático. As histonas são importantes sítios de sinalização epigenética e podem estar relacionadas com a herança epigenética paterna (JOHNSON et al.; 2011; CARREL, 2012). Em humanos, acredita-se que as regiões remanescentes de histonas possam ter importantes funções no processo de fertilização e desenvolvimento embrionário. Gineitis et al (2000) e Zalenskaya et al (2000) acreditam que as histonas podem estar associadas aos telômeros e aos primeiros eventos do espermatozoide que respondem aos sinais do ovócito, resultando na formação do pro-núcleo masculino.

3 – OBJETIVOS

3.1 - Objetivos gerais

O presente trabalho pretende propor uma classificação das alterações cromatínicas de espermatozoides bovino de acordo com a localização da descompactação e correlaciona-las com a eficiência da produção *in vitro* de embriões; e verificar a influência da heterogeneidade e descompactação da cromatina quanto à eficiência da PIVE.

3.2 - Objetivos específicos

- Criar uma classificação das alterações cromatínicas de espermatozoides de touro identificadas em esfregaços corados com AT, baseado na localização da descompactação da cromatina.

- Correlacionar as alterações da cromatina dos espermatozoides, encontradas antes e após a seleção espermática por Percoll, com a taxa de clivagem e índices de blastocistos na PIVE.

- Avaliar dois níveis de descompactação e heterogeneidade na cromatina antes e após a seleção por Percoll, correlacionando-as com a taxa de clivagem e índices de blastocistos na PIVE.

4 - MATERIAL E MÉTODOS

Esse estudo foi devidamente aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisas da Universidade Federal de Uberlândia, segundo o parecer 031/12 (Anexo A)

4.1 – Reagentes

Ao menos que indicado, os reagentes utilizados neste trabalho foram adquiridos da Sigma (Sto Louis MO, USA). Todos os meios utilizados para PIVE bovinos como meio de lavagem, meio de maturação, meio de fertilização, meio TALP (*Tyrode albumin lactated*

pyruvate)-SPERM, gradiente de Percoll e meio SOF (Anexo B) foram produzidos no laboratório de Biologia da Reprodução da Universidade Federal de Uberlândia.

4.2 - Indução das alterações cromatínicas em espermatozoides bovinos

Foram utilizados quatro touros mestiços (*Bos taurus* x *Bos indicus*), entre 30 e 36 meses de idade, pesando entre 500-550 kg e com boa qualidade seminal (motilidade > 80% e patologias <30%). Os touros foram mantidos em semiconfinamento na fazenda do Glória da UFU.

A bolsa escrotal destes animais foi envolvida por dois dias em uma manta de algodão envolvida com dois sacos plásticos mantidos aderidos ao escroto com fita adesiva (insulação escrotal).

4.3 - Obtenção das amostras de sêmen bovino

As coletas de sêmen foram realizadas por meio de vagina artificial, sendo que a primeira coleta de cada touro foi realizada antes de se iniciar a insulação. Ao fim da insulação, a manta foi retirada e foi coletado ejaculados semanalmente durante 60 dias, totalizando 58 amostras de sêmen.

Todas as amostras tiveram a concentração padronizada em 40 milhões de espermatozoides móveis em diluente TRIS-gema e glicerol 6,5%, posteriormente foram envasadas em palhetas de 0,5 ml e congeladas. O meio TRIS-gema utilizado possuía a seguinte formulação, solução mãe: TRIS 12,11g, ácido cítrico 6,8g, frutose (2,5g) + lactose (2,5g), água destilada (completar até 68mL), glicerina (completar até 100mL), garamicina (1:10.000) 0,7mL; diluidor TRIS para uso imediato: solução mãe 10mL, água destilada 30mL e gema de ovo 10mL (CHACUR et al., 2012). O congelamento foi realizado em máquina automática da marca TK equipamentos (Uberaba MG, Brasil), modelo 3.000 compacta, utilizando-se a opção 1 para congelamento de sêmen de touro (diminuição da temperatura ambiente para 5°C, com velocidade de 0,25°C por minuto e posterior diminuição da temperatura de 5°C para -120°C, com velocidade de 20°C por minuto).

Todas as amostras de sêmen congeladas foram mantidas em botijões de nitrogênio líquido. Foram utilizadas também amostras de sêmen de um touro adquiridas em Central de

Inseminação, pré-testadas em nossos laboratórios e com bons resultados na PIVE. Todas as amostras de sêmens coletadas foram submetidas à análise da cromatina espermática assim como na técnica de PIVE.

4.4 – Análises da cromatina espermática

Uma gota de cada amostra de sêmen foi utilizada para se obter os esfregaços. Foram obtidos dois esfregaços em tempos diferentes, sendo que o primeiro esfregaço foi realizado com uma gota do sêmen recém descongelado a 37°C e outro esfregaço foi obtido após a seleção por gradiente de Percoll.

O gradiente de Percoll foi realizado utilizando Percoll 90% (350µL) e 45% (350µL) em microtubos de 1,5mL de fundo cônico, centrifugados por 7 minutos a 9.000 x G. O pellet formado foi transferido em microtubo de 1,5 mL contendo 500 µL de meio TALP próprio para o espermatozoide (TALP-SPERM), homogeneizado e centrifugado por 3 minutos a 9.000 xG, para retirar o excesso do Percoll dos espermatozoides (FOLCHINI et al., 2012).

Todos os esfregaços foram fixados em etanol-ácido acético 3:1 (v/v) por um minuto e posteriormente em etanol 70% por três minutos. Após a fixação, as amostras foram secas em temperatura ambiente.

Estes esfregaços passaram por hidrólise ácida em ácido clorídrico 4N por 20 minutos e lavados em água destilada. Após secagem, os esfregaços foram corados colocando-se uma gota de solução de Azul de Toluidina (AT) 0,025%, em tampão ácido cítrico-fosfato (tampão McIlvaine) pH 4,0. Imediatamente após foi colocada a lamínula sobre a lâmina, esperou-se 3 minutos para que ocorresse a penetração do corante e foram capturadas imagens digitais totalizando pelo menos 100 espermatozoides por lâmina. Para isso utilizou-se microscópio luz Leica DM500 acoplado a câmera Leica ICC50 (Leica Microsystems Inc., Buffalo Grove, IL, EUA), utilizando-se objetiva de 100x (imersão).

As análises de imagens computadorizadas foram divididas em três etapas: segmentação das cabeças, classificação das alterações cromatínicas e análise quantitativa da descompactação e heterogeneidade cromatínica de cada cabeça.

Para a segmentação das cabeças e classificação das alterações cromatínicas segundo sua localização, um software foi desenvolvido na Faculdade de Computação (FACOM) da Universidade Federal de Uberlândia (UFU) pelo prof. Dr. Bruno Augusto Nassif Travençolo. Esse software foi criado em ambiente de programação MATLAB e executado pelo programa *Octave*, um software gratuito. Já para avaliação da descompactação e heterogeneidade da

cromatina, foi utilizado software desenvolvido em ambiente de programação SCILAB pelo grupo Visão Cibernética do Instituto de Física de São Carlos (USP) e pelo grupo Biologia da Reprodução e Análise de Imagem do Instituto de Ciências Biomédicas da UFU (ICBIM-UFU)

4.4.1 – Segmentação das cabeças dos espermatozoides.

Primeiramente as imagens digitais foram segmentadas por limiarização (*thresholding*), onde foi obtida uma imagem chamada de máscara. A máscara é uma imagem binária (i.e., uma imagem que possui apenas dois tons de cores, no caso o preto e o branco) que, quando combinada com a imagem original, cria uma imagem somente com as cabeças dos espermatozoides, eliminando da imagem original o fundo da imagem (*background*), a cauda e outros elementos corados. Dessa forma, essa máscara permite separar cada cabeça de espermatozoide contido nas imagens originalmente capturadas no microscópio (figura 3).

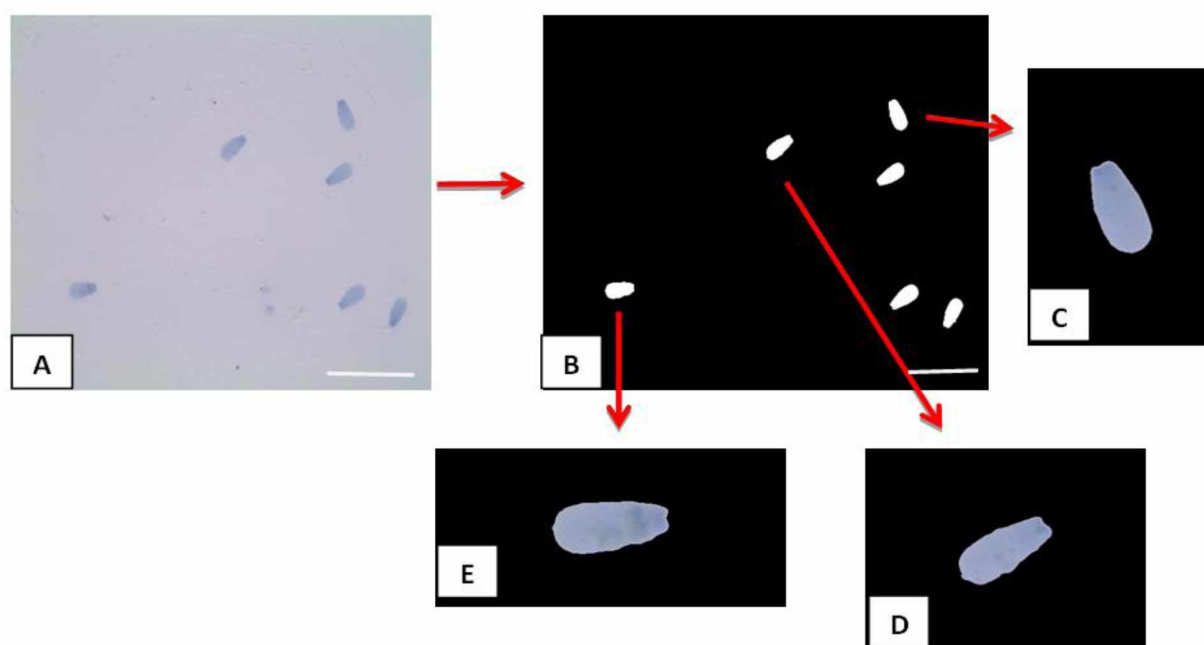


Figura 3 – Segmentação das cabeças de espermatozoides pelo *Octave*. A: Imagem original; B: Imagem segmentada; C,D,E: Cabeças de espermatozoides isoladas. Barra: 10µm.

4.4.2 – Classificação quanto a localização da compactação da cromatina.

As imagens de cada cabeça de espermatozoides foram processadas no *Octave*. Esse software selecionou automaticamente 6 cabeças com maior intensidade (mais claras). A

média dessas 6 cabeças foram consideradas como valor padrão, e a região que ultrapassa essa média foi delineada pelo software. O delineamento foi realizado pela demarcação de linhas brancas (figura 4).

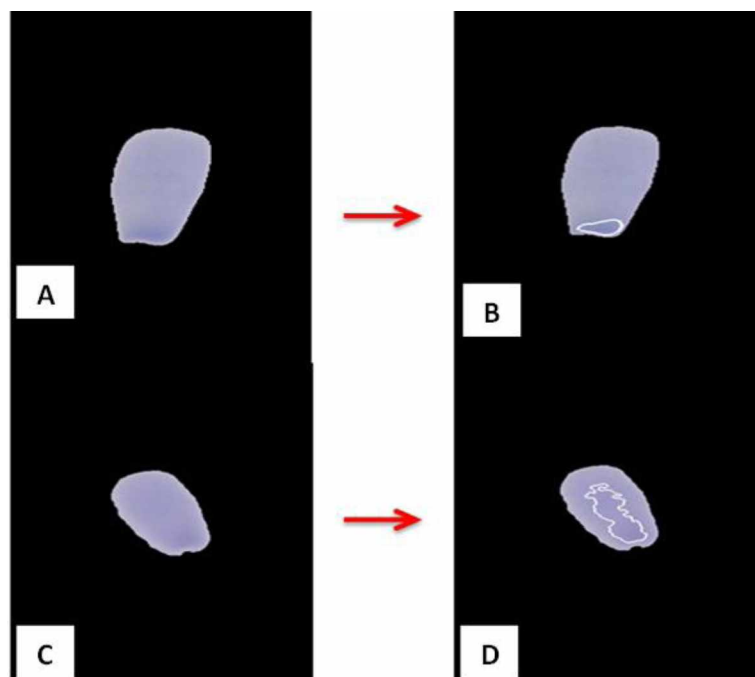


Figura 4– Delineamento das alterações cromatínicas. A, C: Imagens das cabeças dos espermatozoides segmentadas; B,D: Imagens correspondentes de A e C das cabeças de espermatozoides com contorno em linha branca demonstrando o local da descompactação cromatínica.

Foi proposto então, classes de alterações cromatínicas de acordo com a localização da descompactação. Essa classificação foi baseada no trabalho de Beletti et al (2004). Assim, as alterações cromatínicas foram divididas em:

- 1) **Descompactação na base (DB)**: atinge no máximo o terço basal da cabeça.
- 2) **Descompactação na metade basal (DMB)**: além do terço basal, atinge também até dois terços da cabeça.
- 3) **Descompactação no eixo central (DEC)**: ocorre em todo o eixo central sem atingir as laterais da cabeça.
- 4) **Descompactação total (DT)**: a cabeça como um todo, descompactada.
- 5) **Áreas dispersas (AD)**: áreas de descompactação dispersa na cabeça do espermatozoide.

4.4.3 – Classificação quanto a descompactação e heterogeneidade da cromatina.

Para avaliação da descompactação (Des) e heterogeneidade (Het) cromatínica inicialmente as imagens das cabeças espermáticas foram transformadas em tons de cinza (figura 5). O valor médio das cabeças-padrão para essas análises foram realizadas de forma semelhante ao descrito anteriormente, foram selecionadas automaticamente pelo software as seis cabeças mais clara (mais compactadas) e homogêneas. A média dos valores de *pixel* destas cabeças foi considerada como o valor de referência da coloração normal dos espermatozoides (cabeças-padrão). Depois, para cada imagem, a diferença entre o valor médio das cabeças-padrão e o valor médio de cada cabeça analisada foi determinada. Esta diferença foi transformada em porcentagem do valor médio das cabeças padronizadas, caracterizando quantitativamente a intensidade da descompactação desta cabeça (Des). O coeficiente de variação dos níveis de cinza de cada cabeça também foi calculado, caracterizando quantitativamente a heterogeneidade da cromatina desta cabeça (Het), ou seja, a variação da intensidade da descompactação na cabeça do espermatozoide (BELETTI et al., 2005).

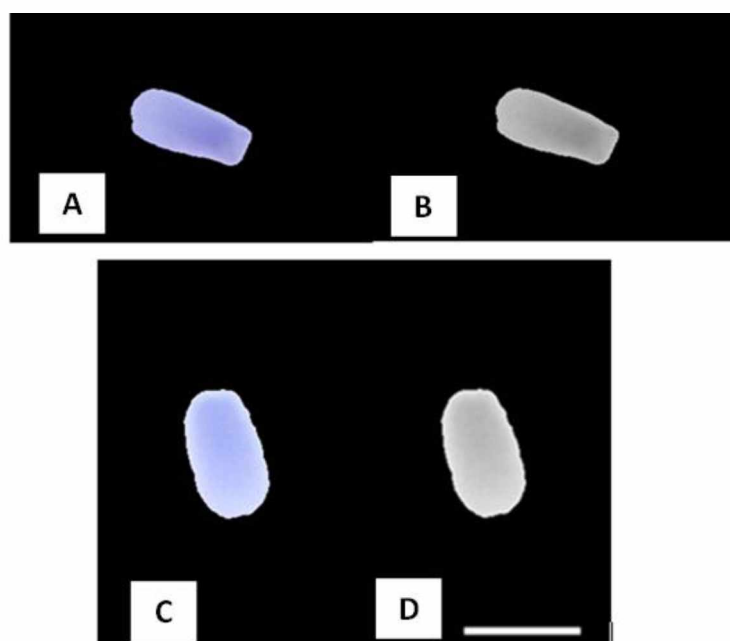


Figura 5- Transformação das cabeças de espermatozoides em tons de cinza. A, C: Imagens das cabeças dos espermatozoides segmentadas; B, D: Imagens correspondentes das cabeças em tons de cinza. Barra: 5 μ m.

Na tentativa de se definir um nível de Des e de Het que a partir do qual o espermatozoide pode ser considerado como portador de alteração de cromatina, foram

testados dois níveis de alterações cromatínicas de acordo com a intensidade da Des e Het: 5 e 10%.

4.5- Produção *in vitro* de embriões (PIVE)

4.5.1 - Obtenção dos ovários

Ovários de vacas de 2 a 7 anos de idade, predominantemente da raça nelore ou mestiças, foram adquiridos no Frigorífico Real localizado no município de Uberlândia (Rodovia BR-050, quilômetro 81, Zona Rural).

Após evisceração das vacas, os ovários foram mantidos em solução salina com antibiótico (Gentamicina 50µg/µL) à temperatura de 36 a 38°C e transportados em garrafa térmica até o laboratório e rapidamente submetidos à aspiração folicular.

4.5.2- Aspiração folicular e rastreamento dos ovócitos

Folículos de 3 a 8mm de diâmetro foram aspirados com seringa de 10 mL e agulha 1,2 x 40 (18G). O líquido folicular aspirado contendo os complexos-*cumulus*-ovócito (COC) foi acondicionado em tubo de 50 mL em banho maria 38,5°C. Quando finalizado a aspiração dos ovários, o líquido foi mantido em banho maria por 10 minutos para sedimentação dos COCs. O sedimento foi analisado sob estereomicroscópio em placa de petri descartável 100x20mm para o rastreamento dos ovócitos.

Os ovócitos rastreados passaram por uma seleção de qualidade morfológica. Somente ovócitos grau I e II (GONÇALVES et al., 2008), ou seja, com mais de 4 camadas de células do *cumulus* e citoplasma homogêneo, foram utilizados nos experimentos. Estes foram lavados em meio de lavagem contendo TCM 199 com sais de Hank's, Gentamicina 50µg/µL, 10% de Soro Fetal Bovino (SFB), HEPES ácido, HEPES sódico e bicarbonato de sódio (NaHCO₃).

4.5.3 - Maturação dos ovócitos

Após lavagem, cerca de 20 ovócitos recuperados pela aspiração foram separados em gotas de 100 µL de meio de maturação, que consistia de TCM-199 suplementado com 10%

de SFB, NaHCO_3 , Gentamicina $50\mu\text{g}/\mu\text{L}$, $0,5\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de FSH (Folltropin-V[®]) e $5\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de LH (Lutropin[®]). Gotas de maturação contendo os ovócitos foram dispostas em placa de petri 60x30mm e cobertas com óleo mineral. A placa foi mantida em incubadora a temperatura $38,5^\circ\text{C}$, 5% de CO_2 e umidade 95% por 22 a 24 horas.

Foi respeitado um tempo máximo de 1 hora e meia entre o início da aspiração e o início da maturação.

4.5.4 - Seleção espermática e fertilização *in vitro*

As gotas contendo os ovócitos foram separadas em dois grupos ou mais, dependendo da quantidade de ovócitos recuperados da aspiração. Para cada grupo foi utilizado amostras de sêmens insulados diferentes, sendo que em um grupo sempre era utilizado o sêmen de um touro altamente fértil.

As amostras de sêmens foram descongeladas a 37°C em banho maria por 40 segundos e posteriormente selecionados em gradiente de Percoll como descrito anteriormente.

Um volume de $30\mu\text{L}$ do pellet foi ressuspendido em meio de fertilização (meio FIV) que consistia em TALP suplementado com PHE (2mM de penicilina, 1mM de hipotaurina, $245\mu\text{M}$ de epinefrina) e 0,6 UI/mL de heparina.

A concentração foi corrigida de acordo com a motilidade e a quantidade de espermatozoides contida no pellet formado. Foi estimado uma concentração de 1×10^6 de espermatozoides por mL de meio FIV.

Os ovócitos maturados foram lavados duas vezes em meio FIV. Após a lavagem, eles foram transferidos para gotas de $90\mu\text{L}$ de meio FIV na placa de fertilização. A placa foi coberta por óleo mineral e co-incubadas com espermatozoides a $38,5^\circ\text{C}$, 5% de CO_2 e umidade 95% por 18 horas.

O dia da fertilização foi considerado o dia 0 (D0).

Em cada rotina de PIVE foi utilizado sêmen do touro insulado para fertilizar metade do número total de ovócitos recuperados e sêmen de touro fértil para fertilizar a outra metade dos ovócitos, dessa forma, tanto a maturação, como a fertilização e o cultivo dos embriões foram submetidos às mesmas condições. Portanto, ambos os grupos sofreram de forma semelhante as influências das variáveis não controláveis, como por exemplo: procedência dos ovócitos, umidade, tempo de manipulação dos ovócitos/embriões, qualidade dos meios produzidos, entre outros.

4.5.5 - Cultivo dos embriões *in vitro*

No dia D1, ou seja, um dia após o período de fertilização, os prováveis zigotos foram desnudados parcialmente, foi realizado a remoção parcial das células do *cumulus*. O método utilizado foi sucessivas pipetagens nas gotas de fertilização contendo os prováveis zigotos.

Após a remoção parcial, eles foram lavados duas vezes em meio do fluido sintético do oviduto (SOF), suplementado com aminoácidos essenciais e não essenciais, 340 μ M 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 4 poços cobertas com óleo mineral. Os prováveis zigotos foram incubados a 38,5°C, 5% de CO₂ e 95% de umidade. Foi realizado o *feeding* no dia 3 (D3) com a troca parcial do meio de cultivo.

4.5.6 - Avaliação da clivagem e desenvolvimento de blastocisto

A avaliação da clivagem foi realizada no dia 2 (D2) após a fertilização. Já a avaliação do desenvolvimento dos embriões até o estágio de blastocisto foi analisada 7 dias após a fertilização (D7).

4.6 - Análise Estatística

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 das PIVEs com sêmen de animais insulados, tendo como referência os resultados obtidos com o touro fértil, 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 fértil, na mesma rotina de PIVE.

Todas as avaliações estatísticas foram realizadas com o software Action. Para a definição do teste estatístico empregado na análise, utilizou-se previamente o teste de normalidade Kolmogorov-Smirnov. Possuindo distribuição normal, foi utilizado o teste de correlação de Pearson entre os índices das PIVEs e as alterações da cromatina espermática, com posterior teste “t” para verificação de significância. Diferenças significativas foram

consideradas quando $p < 0,05$, e $0,1 > p > 0,05$ foi considerado uma tendência (QUINN; KEOUGH, 2002; POMINI PINTO et al., 2015).

5 – RESULTADOS

Nem todas as partidas de sêmen dos touros insulados que foram coletadas estavam viáveis. Das 58 amostras de sêmen coletadas, 50 apresentavam motilidade e viabilidade para serem usados na PIVE. Algumas partidas apresentavam pouca concentração de espermatozoides e espermatozoides mortos ou com motilidade baixa. Essas amostras foram descartadas do experimento.

Foram realizadas cerca de 50 PIVEs no final do experimento. Com a utilização de 3.136 ovócitos grau I e grau II para cada grupo de sêmen (insulados e fértil), a taxa de clivagem das PIVEs fertilizadas com sêmen de touro insulado foi de 49,71% (1.559) e a clivagem do touro comprovadamente fértil foi de 69,32 (2.174). Já a taxa de blastocisto foi de 14,88% (232) para PIVEs utilizando sêmen de touro insulado e 47,01% (1.022) para o touro comprovadamente fértil. Neste caso, para as taxas de blastocistos foram consideradas somente o número de embriões clivados.

Quando analisado os índices de blastocistos do laboratório em relação ao número total de ovócitos iniciados o cultivo da PIVE, a porcentagem dos blastocistos formados por sêmen insulado foi de 7,40% e aqueles formados a partir do sêmen de touro fértil foi de 32,59%.

A coloração com AT e as posteriores análises de imagens computacionais só foram realizadas com as partidas submetidas à técnica de PIVE. Após a separação dos espermatozoides pela técnica de Percoll, não foi possível analisar alguns esfregaços, pois estes apresentaram artefatos de técnica nas cabeças dos espermatozoides, principalmente como pequenos pontos sobre e ao redor das cabeças (Figura 6).

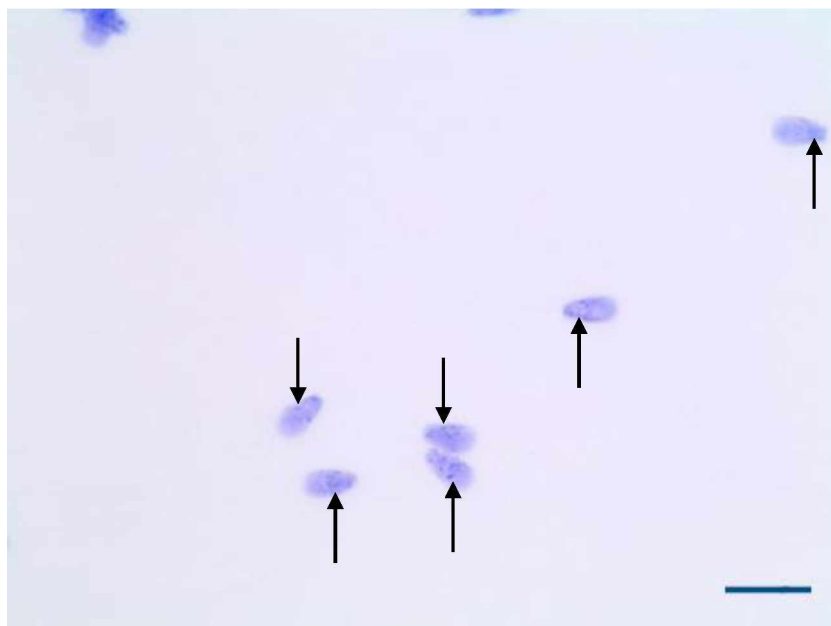


Figura 6 - Espermatozoides com artefato de técnica após seleção por Percoll. Artefatos identificados pelas setas. Barra: 10 μ m.

5.1- Classificação da descompactação da cromatina espermática conforme sua localização

Com a finalidade de classificar as alterações na cromatina espermática, imagens obtidas dos esfregaços de sêmen corado com AT foram processadas em um ambiente de programação no software *Octave*. Para cada amostra de sêmen, foi analisada cerca de 100 cabeças de espermatozoides, totalizando cerca de 10.000 imagens de cabeças de espermatozoides antes da seleção com Percoll e após a seleção.

As análises computacionais delimitaram as regiões de descompactação da cromatina que foram classificadas em: descompactação na base (DB), descompactação na metade basal (DMB), descompactação no eixo central (DEC), descompactação total (DT) e áreas com descompactação dispersa (AD) (Figura 7).

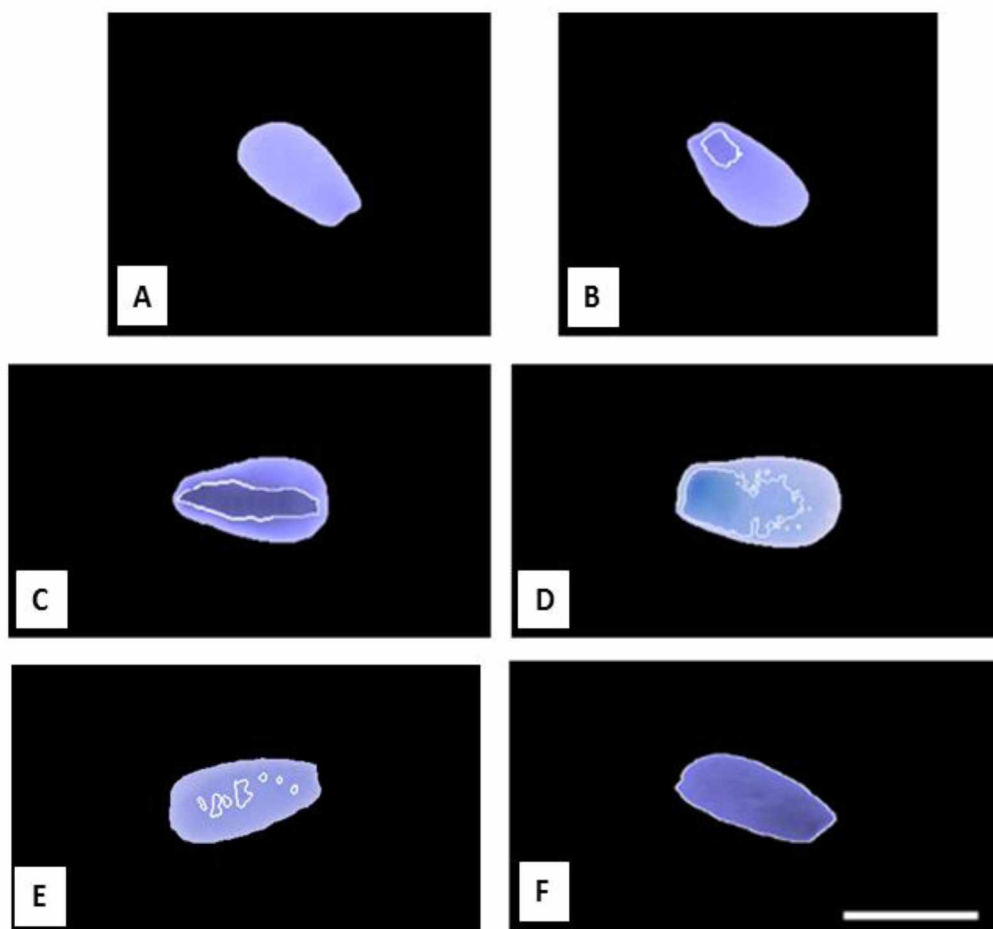


Figura 7 - Cabeças de espermatozoides bovinos com alterações cromatínicas identificados por análises de imagem computacional. Os esfregaços foram corados com AT. A: Normal (N); B: Descompactação na base (DB); C: Descompactação no eixo central (DEC); D: Descompactação na metade basal (DMB); E: Áreas de descompactação dispersa (AD); F: Descompactação total (DT). Barra 5 μ m.

A classificação e quantificação dos espermatozoides com alterações na cromatina foram realizadas antes e após a separação pela técnica de Percoll. As avaliações da cromatina espermática após a seleção por Percoll foram realizadas para analisar a cromatina dos espermatozoides selecionados e utilizados na PIVE.

As alterações do tipo AD só foram encontradas após a seleção pela técnica de Percoll. Assim foram obtidas as seguintes tabelas:

Tabela 1: Dados representativos da eficiência da PIVE e alterações da cromatina antes da seleção dos espermatozoides pela técnica de Percoll.

| | Clivagem | Blastocisto | DB | DMB | DEC | DT | N |
|----------------------|-----------------|--------------------|-----------|------------|------------|-----------|----------|
| Média | 62.38 | 30.64 | 10.36 | 9.65 | 2.62 | 0.77 | 76.21 |
| Desvio padrão | ±17.25 | ±26.93 | ±11.95 | ±8.25 | ±2.84 | ±0.85 | ±19.77 |

Média e desvio padrão das alterações antes da seleção dos espermatozoides por Percoll. Descompactação na base (DB); Descompactação na metade basal (DMB); Descompactação no eixo central (DEC); Descompactação total (DT); Normal (N).

Tabela 2: Dados representativos da eficiência da PIVE e alterações da cromatina após a seleção dos espermatozoides pela técnica de Percoll.

| | Clivagem | Blastocisto | DB | DMB | DEC | DT | AD | N |
|----------------------|-----------------|--------------------|-----------|------------|------------|-----------|-----------|----------|
| Média | 63.16 | 30.50 | 12.38 | 23.69 | 4.03 | 3.71 | 6.78 | 49.4 |
| Desvio padrão | ±16.85 | ±25.94 | ±11.48 | ±17.38 | ±4.84 | ±3.53 | ±4.05 | ±25.47 |

Média e desvio padrão das alterações após a seleção dos espermatozoides por Percoll. Descompactação na base (DB); Descompactação na metade basal (DMB); Descompactação no eixo central (DEC); Descompactação total (DT); Áreas de descompactação dispersa (AD); Normal (N).

Correlacionando as alterações da cromatina com a PIVE antes da seleção por Percoll, notamos que as alterações que apresentaram correlações significativas e negativas em relação à clivagem foram a DEC e DT ($p=0,03$ e $p=0,047$, respectivamente). DB e DMB apresentaram uma tendência de correlação negativa ($p=0,06$ e $p=0,07$, respectivamente). Em relação aos blastocistos, a DB apresentou uma tendência de correlação negativa ($p=0,09$). Espermatozoides considerados normais apresentaram correlação significativa e positiva em relação à clivagem ($p=0,02$) (Tabela 3).

Após a seleção por Percoll, os resultados não foram semelhantes. Os valores não apresentaram correlação significativa tanto para clivagem quanto para blastocisto e os valores de r se aproximaram de zero, inclusive para espermatozoides classificados como normais. (Tabela 3).

Tabela 3: Correlação entre as alterações na cromatina e a eficiência da PIVE antes e após a seleção dos espermatozoides pela técnica de Percoll.

| | Antes da seleção por Percoll | | | | Após a seleção por Percoll | | | |
|---------------|------------------------------|-------|-------------|------|----------------------------|------|-------------|-------|
| | Clivagem | | Blastocisto | | Clivagem | | Blastocisto | |
| | r | p | r | p | r | p | r | p |
| DB | -0,27** | 0,06 | -0,25** | 0,09 | -0,08 | 0,6 | -0,05 | 0,71 |
| DMB | -0,27** | 0,07 | -0,23 | 0,12 | 0,03 | 0,85 | -0,21 | 0,13 |
| DEC | -0,31* | 0,03 | 0,07 | 0,65 | 0,06 | 0,67 | -0,06 | 0,70 |
| DT | -0,29* | 0,047 | -0,20 | 0,19 | 0,04 | 0,76 | -0,28** | 0,052 |
| AD | - | - | - | - | -0,03 | 0,82 | -0,06 | 0,67 |
| Normal | 0,35* | 0,02 | 0,24 | 0,1 | 0,00 | 0,98 | 0,23 | 0,11 |

*Coeficiente de correlação significante para $p < 0,05$. ** Tendência de correlação para $0,1 > p > 0,05$. Descompactação na base (DB), Descompactação na metade basal (DMB), Descompactação no eixo central (DEC), Descompactação total (DT), Áreas de descompactação dispersa (AD) e Normal (N).

5.2- Análise quantitativa da descompactação (Des) e da heterogeneidade (Het) da cromatina espermática

Foram utilizadas três diferentes abordagens para análise quantitativa da descompactação e heterogeneidade cromatínica. A primeira e geralmente a utilizada em trabalhos anteriores, avaliou a descompactação e a heterogeneidade médias de todos os espermatozoides analisados em uma amostra. Nas outras duas, avaliou-se a porcentagem de espermatozoides anômalos, considerando dois níveis de descompactação e heterogeneidade: 5 e 10%.

Foi analisado a Des e a Het média de todos os espermatozoides e a porcentagem de cabeças de espermatozoides que apresentaram Des e Het acima de 5% e acima de 10% em cada amostra (Tabela 4).

Tabela 4 - Dados demonstrativos da classificação da heterogeneidade e descompactação da cromatina.

| | | Het média | Het >5% | Het >10% | Des média | Des >5% | Des >10% |
|---|--------------------------|--------------|------------|-------------|--------------|------------|-------------|
| Antes da seleção por Percoll | Média | 7.72 | 51.28 | 25.29 | 3.47 | 16.44 | 2.47 |
| | Desvio padrão | ±4.90 | ±23.75 | ±25.06 | ±1.61 | ±22.27 | ±6.97 |
| Após a seleção por Percoll | Média | 8.24 | 62.27 | 31.35 | 6.58 | 72.46 | 12.40 |
| | Desvio padrão | ±4.14 | ±19.74 | ±24.67 | ±1.69 | ±22.51 | ±18.08 |

Het média– heterogeneidade média de todos os espermatozoides analisados; Het >5% - porcentagem de espermatozoides que apresentaram heterogeneidade maior que 5%; Het >10% - porcentagem de espermatozoides que apresentaram heterogeneidade maior que 10%; Des média– Descompactação média de todos os espermatozoides analisados; Des>5% - porcentagem de espermatozoides que apresentaram descompactação maior que 5%; Des >10% - porcentagem de espermatozoides que apresentaram descompactação maior que 10%.

Foi correlacionado os dois níveis de Des da cromatina com a eficiência da PIVE. Notamos que antes da separação pela técnica de Percoll, a clivagem é afetada com uma correlação significativa e negativa em relação à Des. A Des média de todos os espermatozoides apresentou correlação negativa e significativa ($p=0,01$) quando correlacionado com a clivagem do embrião. Analisando os níveis de Des, ainda em relação à clivagem, ambos os níveis de Des, acima de 5% e acima de 10% apresentaram correlação negativa e significativa ($p=0,03$ e $p=0,02$, respectivamente). Em relação à formação de blastocistos, todos os parâmetros analisados não apresentaram correlação significativa, tampouco tendências. Da mesma forma, após a seleção por Percoll, todos os parâmetros analisados para Des não foram significantes e não houve tendência (Tabela 5).

Tabela 5 - Correlação entre a descompactação da cromatina e a eficiência da PIVE antes e após a seleção dos espermatozoides pela técnica de Percoll.

| | Antes da seleção por Percoll | | | | Após a seleção por Percoll | | | |
|--------------------|-------------------------------------|----------|--------------------|----------|-----------------------------------|----------|--------------------|----------|
| | Clivagem | | Blastocisto | | Clivagem | | Blastocisto | |
| | r | p | r | p | r | p | r | p |
| Des média | -0,40* | 0,01 | -0,17 | 0,30 | 0,12 | 0,42 | 0,08 | 0,61 |
| Des >5% | -0,34* | 0,03 | -0,16 | 0,32 | 0,01 | 0,93 | 0,01 | 0,94 |
| Des >10% | -0,36* | 0,02 | -0,11 | 0,32 | 0,02 | 0,92 | -0,01 | 0,99 |

* Coeficiente de correlação significativo para $p<0,05$. ** Tendência de correlação para $0,1>p>0,05$. Des média– descompactação média de todos os espermatozoides analisados. Des >5% - porcentagem de espermatozoides que apresentaram descompactação maior que 5%. Des >10% - porcentagem de espermatozoides que apresentaram descompactação maior que 10%.

Em relação à heterogeneidade, não houve correlação significativa assim como não houve tendência, tanto na clivagem como na formação de blastocistos antes e após a seleção por Percoll. Het acima de 10% após a seleção por Percoll foi o único valor considerado tendência de correlação ($p=0,07$) (Tabela 6).

Tabela 6 - Correlação entre as referências propostas da heterogeneidade cromatínica e a eficiência da PIVE antes e após a seleção dos espermatozoides pela técnica de Percoll.

| | Antes da seleção por Percoll | | | | Após a seleção por Percoll | | | |
|------------------------|------------------------------|------|-------------|------|----------------------------|------|-------------|------|
| | Clivagem | | Blastocisto | | Clivagem | | Blastocisto | |
| | r | p | r | p | r | p | r | p |
| Het media total | -0,03 | 0,84 | 0,09 | 0,57 | 0,03 | 0,83 | -0,16 | 0,29 |
| Het >5% | -0,14 | 0,38 | 0,00 | 0,99 | -0,06 | 0,72 | -0,16 | 0,29 |
| Het >10% | 0,00 | 0,99 | 0,09 | 0,56 | -0,07 | 0,64 | -0,27** | 0,07 |

* Coeficiente de correlação significativa para $p<0,05$. ** Tendência de correlação para $0,1>p>0,05$. Het. média total – heterogeneidade média de todos os espermatozoides analisados. Het >5% - porcentagem de espermatozoides que apresentaram heterogeneidade maior que 5%. Het >10% - porcentagem de espermatozoides que apresentaram heterogeneidade maior que 10%.

6 – DISCUSSÃO

As alterações na cromatina são importantes fatores para prever a fertilidade do touro. Hoje várias metodologias podem ser utilizadas para detecção de anormalidades na cromatina. O SCSA é uma das técnicas de análise da cromatina espermática mais utilizada pelos laboratórios (EVENSON et al., 1980). Com essa técnica é possível identificar e quantificar um grande número de espermatozoides com alteração na cromatina de forma extremamente rápida, porém não analisa a morfologia e morfometria concomitantemente com a cromatina espermática. Por outro lado, análises em esfregaços de sêmen com a técnica de coloração com AT é um método de análise de cromatina mais simples, mais acessível economicamente e capaz de analisar a morfologia e morfometria da cabeça do espermatozoide. Com o aumento da sensibilidade pela metacromasia induzida (MELLO, 1982), é possível detectar espermatozoides com pequenas alterações na cromatina e ainda analisar o status dessa alteração (localização e intensidade). E como forma de minimizar a subjetividade das avaliações por AT, o uso de análise de imagem computacional é uma forte ferramenta. Essa ferramenta detecta as variações da intensidade da coloração na cabeça do espermatozoide por diferenças nos valores de *pixels*, tornando a análise mais objetiva.

No presente trabalho, com a coloração de AT juntamente com as análises computacionais, foi possível classificar as alterações cromatínicas de acordo com a localização nas cabeças dos espermatozoides. Inicialmente foi proposto a seguinte classificação das alterações: descompactação na base (DB), descompactação na metade basal (DMB), descompactação no eixo central (DEC) e descompactação total (DT). Cada alteração foi correlacionada com a capacidade fecundante do espermatozoide e o desenvolvimento embrionário subsequente. As correlações foram realizadas com a classificação das alterações antes e após a seleção espermática por Percoll. Análises após a seleção por Percoll foram realizadas a fim de saber se os espermatozoides utilizados na PIVE apresentavam ou não alterações na cromatina e como a seleção influencia na eficiência da PIVE. Após a seleção por Percoll, vimos a necessidade de acrescentar outra classificação, as áreas de descompactação dispersas (AD).

A maioria das alterações encontradas na cromatina foi a DB e a DMB. Sabe-se que na região basal da cabeça do espermatozoide, se localiza o ânulo nuclear (WARD; COFFEY, 1989). Nessa região, as sequências de DNA não são organizadas por toroides, sendo assim não apresenta a alta compactação como nas demais regiões; talvez essa região, por apresentar

uma estrutura diferente das demais regiões da cabeça do espermatozoide, pode ser considerada menos estável e com grande sensibilidade a alterações (BELETTI et al., 2004). Talvez, as alterações podem iniciar nessa região e se estender ao longo da cabeça do espermatozoide, originando as alterações cromatínicas propostas nesse trabalho (DB, DMB, DEC, DT).

DEC e DT foram as alterações cromatínicas que apresentaram menor incidência nas amostras analisadas, tanto antes da seleção por Percoll (2,62% e 0,77% respectivamente) como após a seleção (4,03% e 3,71% respectivamente). Esses tipos de alterações são considerados mais graves, pois atinge uma grande área da cabeça dos espermatozoides. Assim a incidência dessas alterações ocorre com menos frequência.

O Percoll é muito utilizado para seleção espermática nos procedimentos de PIVE, todavia alguns estudos apontaram que a técnica pode influenciar na integridade do DNA. O processo de centrifugação pode aumentar a formação de espécies reativas de oxigênio (ROS) produzidas por leucócitos e células não viáveis, aumentando ainda mais as chances de dano no DNA espermático (AITKEN; CLARKSON, 1988; BOURNE et al, 2004; SAKKAS, ALVAREZ, 2010). Isso pode explicar a necessidade de acrescentar mais uma classificação das alterações cromatínicas, a AD. Entretanto, não é descartada a hipótese de artefatos da técnica de Percoll influenciarem as análises computacionais. Provavelmente o Percoll prejudica o método de avaliação da cromatina por AT e as análises computacionais. Após o uso dessa técnica de seleção dos espermatozoides, as análises das lâminas com esfregaços de sêmen se tornaram mais difíceis em comparação com as análises dos esfregaços antes da seleção por Percoll. Uma grande parte das amostras apresentaram microesferas ao redor da cabeça dos espermatozoides, provavelmente partículas de sílica do Percoll que impregnaram os espermatozoides. Essas microesferas inviabilizaram as análises por imagens computacionais e esses esfregaços foram descartados. Mesmo aqueles esfregaços que possuíam aparência normal, na análise de imagem poderiam conter artefatos só perceptíveis pelo computador, gerando dados não confiáveis. O protocolo utilizado não foi adequado para essas análises. Lavagens sucessivas dos espermatozoides após a seleção talvez poderiam ter evitado tais artefatos de técnica. Outro fator que prejudicou as análises foi que ao centrifugar o sêmen com o gradiente de Percoll algumas amostras apresentaram uma concentração muito baixa, assim ao realizar o esfregaço, havia poucos espermatozoides na lâmina, dificultando a captura de imagens das cabeças de espermatozoides. Além disso, as tabelas das correlações de AT com a PIVE, da Het com a PIVE e da Des com a PIVE não apresentaram valores semelhantes antes e após a seleção por Percoll.

Assim, dados apresentados após a seleção por Percoll não foram confiáveis nesse trabalho. A técnica utilizada na seleção e na análise computacional interferiu nos resultados e nas análises estatísticas.

Quanto à correlação das alterações cromatínicas e os índices da PIVE, DEC e DT obtiveram uma correlação negativa significativa em relação à clivagem. Isto quer dizer que quanto maior a presença dessas alterações, menor a taxa de clivagem dos embriões. Ou seja, a presença dessas alterações na cromatina interfere intensamente no processo de fertilização do espermatozoide. As demais alterações apresentaram uma tendência negativa de correlação. Assim, essas alterações são um indicativo de influências negativas no processo de fertilização do espermatozoide. Em relação à formação de blastocistos, houve tendência negativa na correlação para a DB, mostrando que essa alteração pode interferir no processo de desenvolvimento embrionário. É importante analisar esses dados levando em consideração as taxas de clivagem. Assim, DEC apresentou correlação negativa e significativa em relação à clivagem e em relação à formação de blastocisto, a correlação mostrou que DEC não influenciou no processo de desenvolvimento embrionário. Nesse caso, já que o processo de fecundação foi significativamente prejudicado pela presença da alteração, os poucos blastocistos formados provavelmente não surgiram da fecundação de espermatozoides com este tipo de alteração. Portanto, por serem eventos dependentes, a correlação das alterações cromatínicas com a formação de blastocistos serão influenciadas negativa ou positivamente dependendo do desempenho do espermatozoide no processo de fertilização.

Ainda com as imagens das cabeças dos espermatozoides corados com AT, foi possível avaliar a heterogeneidade (Het) e o grau de descompactação (Des) da cromatina dos espermatozoides por análise computacional (BELETTI et al., 2005; SILVA et al., 2008; OLIVEIRA et al., 2011; CAMPOS et al., 2012), todavia ainda não se sabe até que ponto esses parâmetros são prejudiciais no processo de fertilização e desenvolvimento embrionário. Sabe-se que o espermatozoide apresenta grande importância na eficiência da PIVE (HANSEN, 2006) e qualquer alteração nos espermatozoides pode mudar as taxas de clivagem e formação de blastocisto. Assim, neste trabalho foi testado dois níveis de anormalidade quanto a heterogeneidade (Het) e a descompactação (Des) da cromatina. O primeiro nível testado foi considerando como espermatozoides anômalos aqueles com Het e Des acima de 5% e a segunda com Het e Des acima de 10%. Com os resultados, notamos que em relação ao grau de Des da cromatina, tanto espermatozoides com Des acima de 5% como aqueles acima de 10% apresentaram correlações negativas significativas em relação à clivagem dos embriões. Assim, espermatozoides com mais de 5% de Des na cromatina apresentam uma

forte interferência no processo de fertilização. Pelo fato da Des interferir na fertilização, houve pouca formação de blastocistos e isso pode prejudicar na correlação da Des com o desenvolvimento embrionário. Dessa forma, não houve correlação significativa nos dados apresentados. Após a seleção por Percoll, as correlações da Des e a eficiência da PIVE foram próximas de zero para ambos os níveis de anormalidade. Silva et al (2008) não encontrou qualquer correlação entre Des e Het com a taxa de clivagem e de blastocisto; no entanto, em seu trabalho, foi utilizado apenas sêmen de touro altamente fértil e não fizeram qualquer normalização dos dados tentando neutralizar os efeitos das variáveis não controladas.

Usando a mesma metodologia para análises da Des e Het da cromatina, Campos et al (2012) analisaram a cromatina dos espermatozoides antes e após a seleção espermática pelas técnicas de Percoll e por *swim up*. Na técnica de Percoll, ocorreu a presença de um maior número de espermatozoides com cromatina descompactada e heterogênea, enquanto que aqueles separados por *swim up* não apresentaram diferenças na cromatina. Isso poderia também ter ocorrido por interferência do Percoll no método de análise e não necessariamente tenha ocorrido aumento nas alterações de cromatina, assim como no presente trabalho. Silva et al (2008) comparou os resultados da Het e Des de dois laboratórios diferentes e não houve tendência semelhante nos resultados. É importante salientar que como evidenciado, há diferenças nos resultados desses parâmetros para cada laboratório, isso porque há muitas variáveis envolvidas, como: os protocolos utilizados, a qualidade dos meios utilizados para a separação espermática, a qualidade e a procedência do sêmen. Todos esses fatores podem interferir na análise da Het e Des após a seleção por Percoll. Todavia, não se pode descartar as influências do Percoll nas análises de cromatina, como citado anteriormente na discussão.

É importante salientar que a descompactação na cromatina e consequente fragmentação da cromatina (BELETTI, 2013) pode não ser o único fator que leva a diminuição da capacidade fecundante do espermatozoide e o desenvolvimento embrionário. Podemos supor que outras modificações podem acompanhar a descompactação do DNA espermático prejudicando a clivagem e a formação dos blastocistos.

Nossos resultados mostraram que o grau de Des da cromatina apresentou correlação negativa com a taxa de clivagem dos embriões. Sabe-se que o espermatozoide de humanos possui RNAs mensageiros que transcrevem genes com função na fertilização, como a clusterin e o AKAP-4 (OSTERMEIER et al., 2004; BOERKE et al., 2007). Pode ser que a descompactação interfira na transcrição de RNAs mensageiros equivalentes aos da clusterin e AKAP-4 em bovinos ou ainda prejudique o funcionamento desses genes. De forma semelhante, podemos presumir sobre a formação de blastocistos provenientes da fertilização

por espermatozoides com alteração na cromatina. Neste trabalho, dos ovócitos que clivaram, a taxa de blastocisto foi de apenas 14,88% (7,48% dos ovócitos totais), pode ser que os RNAs mensageiros dos genes equivalentes ao FOXG1B e WNT5A, responsáveis por eventos da embriogênese e morfogênese em humanos (BOERKE et al., 2007), se tornem comprometidos devido a descompactação da cromatina e suas funções alteradas, não levando o desenvolvimento embrionário adiante.

Não podemos descartar também a hipótese de influências epigenéticas na cromatina do espermatozoide. Compreender os mecanismos epigenéticos do espermatozoide pode contribuir para entender os efeitos paternos no desenvolvimento embrionário (CARREL et al., 2012). A metilação do DNA espermático é uma modificação epigenética que ocorre durante a fase de diferenciação da espermatogênese (TRASLER, 1998). Os padrões epigenéticos de metilação do DNA regulam as ligações das histonas e a compactação da cromatina (WAGGONER, 2007). Além disso, sem a metilação paterna adequada, o embrião não consegue se desenvolver (YAMAUCHI et al., 2010). Em humanos, a metilação imprópria do DNA espermático está associado a perdas gestacionais (EL HAJJ et al., 2011). Anormalidades na metilação de genes específicos estão associados à infertilidade e defeitos morfológicos nos espermatozoides (NAVARRO-COSTA et al., 2010; KUMAR et al., 2012).

Sabe-se que durante a fase de diferenciação da espermatogênese da maioria dos mamíferos, cerca de 98% das histonas do DNA espermático são substituídas por protaminas (BENCH et al., 1996), tornando o DNA altamente compactado. Evidências apontam que histonas residuais do DNA espermático apresentam papel na fertilização do ovócito (YAMAUCHI et al., 2010). Van der Heijden et al. (2006) demonstraram que as histonas residuais do DNA dos espermatozoides estão presentes no zigoto após a fertilização. Logo após a formação do pró-núcleo masculino, essas histonas seriam perdidas. As histonas estão associadas ao controle transcricional, compactação da cromatina e metilação do DNA, assim provavelmente contribuições epigenéticas são transmitidas para o zigoto através de histonas paternas (YAMAUCHI et al., 2010). Provavelmente qualquer influência que altere os padrões epigenéticos do DNA espermático podem levar a danos na expressão de certos genes, anormalidades da metilação do DNA, deficiência de histonas no DNA e a não compactação da cromatina, e isso pode influenciar no processo de fecundação e desenvolvimento embrionário.

Portanto, com os ensaios de PIVE desenvolvidos nesse trabalho, foi demonstrado que alterações na cromatina localizada no eixo central da cabeça dos espermatozoides e espermatozoides que apresentam toda a cabeça descompactada interferem intensamente no

processo de fecundação do espermatozoide. Os outros tipos de alterações tendem a interferir, porém de forma menos intensa. Em relação ao desenvolvimento embrionário inicial, DB tende a interferir no desenvolvimento, caso ocorra a fecundação. Nas análises da descompactação da cromatina, espermatozoides que apresentam mais de 5% de descompactação interferem no processo de fecundação. Já nas análises relacionadas à heterogeneidade, não foi observado influências no processo de fertilização e desenvolvimento embrionário quando testado os dois níveis de anormalidade, 5 e 10%.

Um fator importante a ser considerado nesse trabalho é que os dados correlacionados com a PIVE apresentam valor em experimentos *in vitro*, sob condições e meios de cultivos conhecidos. Não podemos extrapolar esses dados em relação à monta natural, por exemplo. Muitos processos biológicos estão envolvidos nos eventos de fertilização e desenvolvimento embrionário e cada animal pode responder de forma diferente a esses processos, além de estarem sujeitos a interferências ambientais que podem levar ao insucesso da fertilização e ao desenvolvimento embrionário.

Como evidenciado neste trabalho, as alterações cromatínicas no DNA espermático interferem no processo de fertilização e podem interferir no desenvolvimento embrionário, entretanto, não podemos descartar as influências que podem acompanhar essas alterações. Tais influências como transcrição de RNAs mensageiros e fatores epigenéticos podem interferir em processos que são inerentes às suas funções.

7 – CONCLUSÃO

Com a finalização deste trabalho, podemos concluir que as alterações cromáticas que mais interferem no processo de fecundação são as alterações localizadas no eixo central da cabeça dos espermatozoides e alterações na cabeça como um todo. Alterações na base e na metade basal da cabeça dos espermatozoides podem interferir de forma menos intensa no processo de fecundação. Já no processo de desenvolvimento embrionário inicial, DB pode interferir na formação dos blastocistos. Além disso, espermatozoides que apresentam mais de 5% de descompactação na cromatina são considerados prejudiciais no processo de fecundação. Em relação à heterogeneidade da cromatina espermática, não houve influências nos processos de fertilização e desenvolvimento embrionário para os níveis de anormalidade testados nesse trabalho.

REFERÊNCIAS

- AITKEN, R. I.; CLARKSON, I.S. Significance of reactive oxygen species and antioxidants in defining the efficacy of sperm preparation techniques. **Journal of Andrology**, v.9, n.6, p.367-76, 1988.
- ALKMIN, D.V.; MARTINEZ-ALBORCIA, M.J.; PARRILLA,I.; VAZQUEZ, J.M.; MARTINEZ, E.A.; ROCA, J. The nuclear DNA longevity in cryopreserved boar spermatozoa assessed using the Sperm-Sus-Halomax, **Theriogenology**, v. 79, n.9, p.1294-300, 2013.
- ARMAN, C.; CASARES, P. I. Q.; SANCHEZ-PARTIDA, L. G.; SETCHELL, B.P. Ram sperm motility after intermittent scrotal insulation evaluated by manual and computer-assisted methods. **Asian journal of andrology**. v. 8, n. 4, p 411, 2006.
- ARRUDA, R. P. **Avaliação dos efeitos de diluidores e crioprotetores para o espermatozoide eqüino pelo uso de microscopia de epifluorescência, citometria de fluxo, análises computadorizadas da motilidade (CASA) e da morfometria (ASMA)**. 2000. 121f. Tese (Livre Docência) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP.
- ARRUDA, R. P.; CELEGHINI, E. C. C.; ALONSO, M. A.; CARVALHO, H. F.; OLIVEIRA, L. Z.; NASCIMENTO, J.; SILVA, D. F.; AFFONSO, F. J.; LEMES, K. M.; JAIMES, J.D. Métodos de avaliação da morfologia e função espermática: momento atual e desafios futuros. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.35, n.2, p.145-151, 2011.
- AVERY, B, B.; GREVE, H. R. T. Development of in vitro matured and fertilized bovine embryos, cultured from days 1–5 post insemination in either Menezo-B2 medium or in HECM-6 medium. **Theriogenology**, v.44, n.7, p. 935–945, 1995.
- BABA, D.; KASHIWABARA, S-I.; HONDA, A.; YAMAGATA, K.; WU, Q.; IKAWA, M.; OKABE, M.; BABA, T. Mouse sperm lacking cell surface hyaluronidase PH-20 Can p ass through the layer of *cumulus* cells and fertilize the egg. **Journal of Biological Chemistry** v.277, n.33, p.30310–30314, 2002.
- BALHORN, R. A model for the struture of chromatin in mammalian sperm. **Journal of Cell Biology**, v.93, n.2, p.298-305, 1982.
- BALHORN, R. The protamine family of sperm nuclear proteins. **Genome Biology**, v. 8, n.9, p.227, 2007.
- BALHORN, R.; GLEDHILL, B. L.; WYROBEK, A. J. Mouse sperm chromatin proteins: quantitative isolation and partial characterization. **Biochemistry** v.16, n.18, p.4074–4080, 1977.
- BANKS, W. J. Sistema reprodutor masculino. In: BANKS, W. J. **Histologia Veterinária Aplicada**. São Paulo: Manole, p.546-564, 1992.

BARROS, C.; CAPOTE, C.; PEREZ, C.; CROSBY, J. A.; BECKERMI, D. E.; IOANNES, A. Immunodetection of acrosin during the acrosome reaction of hamster, guinea-pig and human spermatozoa. **Biological Research** v.25, n.1, p.31–40, 1992.

BAVISTER, B. D. Co-culture for embryo development: is it really necessary? **Human Reproduction**, v.7, n.10, p.1339-1341, 1992.

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, n.1, p.97-103, 1996.

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

BELETTI, M. E.; MELLO, M.L. Comparison between the toluidine blue stain and the Feulgen reaction for evaluation of rabbit sperm chromatin condensation and their relationship with sperm morphology. **Theriogenology**, v. 62, n.3-4, p.398–402, 2004b.

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. Cromatina espermática: quebrando paradigmas. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 37, n.2, p.92-96, 2013.

BENCH, G., S.; FRIZ, A., M.; CORZETT, M., H.; MORSE, D., H.; BALHORN, R. DNA and total protamine masses in individual sperm from fertile mammalian subjects. **Cytometry**, v. 23, n.4, p.263–271, 1996.

BERMUDEZ, D.; ESCALIER, D.; GALLO, J. M.; VIELLEFOND, A.; RIUS, F.; PEREZ, D. E, VARGAS, I.; SCHREVEL, J. Proacrosin as a marker of meiotic and post-meiotic germ cell differentiation: Quantitative assessment of human spermatogenesis with a monoclonal antibody. **Journal of Reproduction and Fertility** v. 100, n.2, p.567–575, 1994

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

BEYDOLA, T.; SHARMA, R. K.; LEE, W.; AGARWAL, A. Sperm preparation and selection techniques. In: RIZK, B., AZIZ, N., AGARWAL, A. **Male Infertility Practice**. New Delhi: Jaypee Brothers Medical Publishers, p.244–251, 2013.

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

BOERKE, A.; DIELEMAN, A. J.; GADELLA, B. M. A possible role for sperm RNA in early embryo development. **Theriogenology** v.68 p147-155, 2007.

BOURNE, H.; EDGAR, D.H.; BAKER, H.W.G. Sperm Preparation Techniques. In: GARDNER, D.K.; WEISSMAN, A.; HOWLES, C.M.; SHOHAM, Z. (Eds). **Textbook of Assisted Reproductive Techniques: Laboratory and Clinical Perspectives**. 2nd ed. USA: Informa Healthcare. p.79-91, 2004.

BRACKETT, B.G.; BOUSQUET, D.; BOICE, M.L.; DONAWICK, W.J.; EVANS, J.F. AND DRESSEL, M.A. Normal development following *in vitro* fertilization in the cow. **Biology of. Reproduction**. v.27, n.1, p.147-158, 1982.

BYERS, S. W.; GLOVER, T. D. Effect of scrotal insulation on the pituitary-testicular axis of the ram. **Journal of Reproduction and Fertility** v.71 p.21-31. 1984.

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.

CARREL, D.T. Epigenetics of the male gamete. **Fertility and Sterility**, v.97, n.2, p.267-274, 2012.

CELEGHINI, E. C. C.; ANDRADE, A. F. C.; FERNANDES, C.; NASCIMENTO, J.; TICIANELLI, J. S.; ARRUDA, R. P. Damage assessment of the equine sperm membranes by fluorimetric technique. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v.53, n.6, p.1285-1292, 2010.

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.

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

CORRÊA, G. A. Tensão de oxigênio durante o cultivo *in vitro* de embriões bovinos: efeito na produção e expressão de genes relacionados ao estresse oxidativo. 2006, 61p. (Dissertação de mestrado). Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Brasília: Universidade de Brasília.

DADOUNE, J-P. Spermatozoal RNAs: What About Their Functions? **Microscopy research and technique**, v.72, n.8, p.536–551, 2009.

DAVIDOFF, M. S.; BREUCKER, H.; HOLSTEIN, A. F.; SEIDEL, K. Cellular architecture of the lamina propria of human seminiferous tubules. **Cell and Tissue Research**, v. 262, n.2, p.253-261, 1990.

DODE, M.A.N. Avanços na maturação ovocitária em bovinos. In: XX Reunião anual da sociedade brasileira de tecnologia de embriões. **Anais: Acta Scientiae Veterinariae**, Araxá: Sociedade Brasileira de Tecnologia de Embriões, p.115 – 130, 2006.

DUARTE, I. N. **Efeito da elevação temporária da temperatura testicular sobre a compactação da cromatina espermática em touros**. 2010.38 f. Monografia (Graduação em

Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Uberlândia, 2010.

EDDY, E.M. The spermatozoon. In: Neill JD. (Ed.). **Knobil and Neill's physiology of reproduction**. New York: Elsevier, 2006. v.1, p.3-54.

EL HAJJ, N.; ZECHNER, U.; SCHNEIDER, E.; TRESCH, A.; GROMOLL, J.; HAHN, T.; SCHORSCH, M.; HAAF, T. Methylation status of imprinted genes and repetitive elements in sperm DNA from infertile males. **Sexual Developmental**. v.5, n.2, p.60-9, 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.; DARZYNKIEWICZ, Z.; MELAMED, M.R. Relation of mammalian sperm chromatin heterogeneity to fertility. **Science**, v.210, n.4474, p.1131-1133, 1980.

EVENSON, D.P.; JOST, L.K. Sperm chromatin structure assay is useful for fertility assessment. **Methods in Cell Science**.; v.22, n.2-3, p.169-189, 2000.

FAN, H.; ZHAO, Z.J.; CHENG, J.; SU, X.W.; WU, Q. X.; SHAN, Y. F. Overexpression of DNA methyltransferase 1 and its biological significance in primary hepatocellular carcinoma. **World Journal of Gastroenterology**, v. 15, n. 16, p. 2020-2026, 2009.

FATEHI, A. N.; ROELEN, B. A. J.; COLENBRANDER, B.; SCHOEVERS, E. J.; GADELLA, B. M.; BEVERS, M.; VAN DER HURK, R. Presence of cumulus cells during in vitro fertilization protects the bovine oocyte against oxidative stress and improves first cleavage but does not affect further development. **Zygote** v.13, n.2, p.177–185, 2005.

FERNANDES, C. E; DODE, M. A. N.; PEREIRA, D.; SILVA, A. E. D. F. Effects of scrotal insulation in Nellore bulls (*Bos taurus indicus*) on seminal quality and its relationship with *in vitro* fertilizing ability. **Theriogenology**, v.70, p.1560–8. 2008.

FLORMAN, H M.; JUNGnickel, 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, n.4, p. 239-244, 2012.

FRIEDMAN R.; SCOTT M.; HEATH S.E.; HUGHES J.P.; DAELS P.F.; TRAN T.Q. The effects of increased testicular temperature on spermatogenesis in the stallion. **Journal of Reproduction and Fertility** 44127-134, 1991.

GANDOLFI, T. A. L.; GANDOLFI, F. The maternal legacy to the embryo: cytoplasmic components and their effects on early development. **Theriogenology**, v. 55, n.6, p. 1255-1276, 2001.

GILCHRIST, R.B.; LANE, M.; THOMPSON, J.G. Oocyte-secreted factors: regulators of *cumulus* cell function and oocyte quality. **Human Reproduction Update**, v. 14, n.2, p. 159-177, 2008.

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.

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

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

GORDON, I. **Laboratory Production of Cattle Embryos**. Ed. Cab International, 1994.

HAFEZ, E.S.E.; HAFEZ, B. **Reproduction in Farm Animals**. New York: Wiley-Blackwell, 509p.; 2000.

HAMILTON, P. W.; ALLEN, D. C. Morphometry in histopathology. **Journal of Pathology**, London, v.175, p.369-379, 1995.

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.

HANSEN, P.J. Realizing the promise of IVF in cattle – an overview. **Theriogenology**, v.65, n.1, p.119-125, 2006.

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

HERMANN, F. A more extensive treatment appeared in idem, **Recherches sur la fécondation et le commencement de l'hénogénie chez divers animaux**. Mémoires de la Société de Physique et d'Histoire Naturelle de Genève. v.26, p.92-397, 1879.

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

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. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.193, n.3, p.1347-1354, 1993.

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.

JOVINE L.; DARIE C.C.; LITSCHER E.S.; WASSARMAN, P.M. Zona pellucida domain proteins. **Annual Review Biochemistry** v. 74, p.83–114, 2005.

KANAYAMA, C. Y., BELETTI, M. E. Avaliação computacional da compactação da cromatina e de características morfométricas da cabeça de espermatozoides de coelho (*Oryctolagus cuniculus*). **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.63, n.1, 2011.

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.

KARABINUS D.S.; VOGLER C.J.; SAACKE R.G.; EVENSON D.P. Chromatin structural changes in sperm after scrotal insulation of Holstein bulls. **Journal of Andrology**, v.18, n.5, p.549-555, 1997.

KHURANA, N.K.; NIEMANN, H. Effects of oocyte quality, oxygen tension, embryo density, cumulus cells, and energy substrates on cleavage and morula/blastocyst formation of bovine embryos. **Theriogenology**, v.54, n.5, p.741–56, 2000.

KITAGAWA, Y.; SUZUKI, K.; YONEDA, A.; WATANABE T. Effects of oxygen concentration and antioxidants on the *in vitro* developmental ability, production of reactive oxygen species (ROS), and DNA fragmentation in porcine embryos. **Theriogenology**, v.62, n.7, p.1186-1197, 2004.

KIYOSHI, M.; WILLIS, W. D.; BROWN, P. R.; GOULDING, E.H.; FULCHER, K. D.; EDDY, E. M. Targeted disruption of the Akap4 gene causes defects in sperm flagellum and motility. **Developmental Biology**, v.248, n.2, p.331–42, 2002.

KLOSE, R. J.; BIRD, A. P. Genomic DNA methylation: the mark and its mediators. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 31, n.2, p. 89-97, 2006.

KRAWETZ, S., A.; KRUGER, A.; LALANCETTE, C.; TAGET, R.; ANTON, E.; DRAGHICI, S.; DIAMOND, M., P. A survey of small RNAs in human sperm. **Human Reproduction**, v. 26, n.12, p.3401-12, 2011.

KUMAR, M.; KUMAR, K.; JAIN, S.; HASSAN, T.; DADA, R. Novel insights into the genetic and epigenetic paternal contribution to the human embryo. **Clinics**, v. 68, p.5-14, 2012.

LEWIS, W.H. ,GREGORY, P.W. Cinematographs of living developing rabbit eggs. **Science** v. 69, p.226-229, 1929.

LIU, W.,M.; PANG, R.,T.; CHIU, P.,C.; WONG, B.,P.; LAO, K.; LEE, K.,F. Spermborne microRNA-34c is required for the first cleavage division in mouse. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.109, n.2, p.490-4, 2012.

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.

LONERGAN, P.; FAIR, T. *In vitro* produced embryo-Dealing with the warts. **Theriogenology**, v.69, p.17-22, 2008.

LUCIANO AM, LODDE V, BERETTA MS, COLLEONI S, LAURIA A, MODINA S. Developmental capability of denuded bovine oocyte in a co-culture system with intact cumulus-oocyte complexes: role of cumulus cells, cyclic adenosine 30 ,50 - monophosphate, and glutathione. **Molecular Reproduction and Development**, v.71, p. 389–97, 2005.

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.

MARTINS, C., F.; DODE, M., N.; BAO, S., N.; RUMPF, R. The use of the acridine orange test and the TUNEL assay to assess the integrity of freeze-dried bovine spermatozoa DNA. **Genetic Mol Res**, v.15, p94-104, 2007.

MATOS, D.L.; ARAÚJO, A. A.; ROBERTO, I. G.; TONIOLLI, R. Análise computadorizada de espermatozoides: revisão de literatura. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.32, p.225-232, 2008.

MAWYER, J. D.; CAVINDER, C. A.; VOGELSANG, M. M; SIGLER, D. H.; LOVE, C. C.; BRINSKO, S. P.; BLANCHARD, T. L.; VARNER, D. D.;ARNOLD, C. E.;TEAGUE, S.; GORDON, R. K. Thermoregulation of the testicle in response to exercise and subsequent effects on semen characteristics of stallions. **Journal of animal science** . v. 90. Ed.8 p2532-2539, 2012.

MCLAY, D. W, CLARKE, H.J. Remodelling the paternal chromatin at fertilization in mammals. **Reproduction** v.125, p.625–633, 2003.

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

MIEUSSET, R.; CASARES, P. Q.; PARTIDA, L. G. S.; SOWERBUTTS, S. F.; ZUPP, J. L.; SETCHELL, B. P. Effects of heating the testes and epididymides of rams by scrotal insulation on fertility and embryonic mortality in ewes inseminated with frozen-semen. **Journal of reproduction and fertility**. v. 94, ed 2, p. 337-343, 1992.

MILLER, D.; OSTERMEIER, G. C.; KRAWETZ, S. A. The controversy, potential and roles of spermatozoal RNA. **TRENDS in molecular medicine**. v. 11, n.4, 2005.

MISHIMA, T.; TAKIZAWA, T.; LUO, S.,S.; ISHIBASHI, O.; KAWAHIGASHI, Y.; MIZUGUCHI, Y.; ISHIKAWA, T.; MORI, M.; KANDA, T.; GOTO, T. MicroRNA (miRNA) cloning analysis reveals sex differences in miRNA expression profiles between adult mouse testis and ovary. **Reproduction**, v.136, n.6, p.811–822, 2008.

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

NAGANO, M.; KATAGIRI, S.; TAKAHASHI, Y. Relationship between bovine oocyte morphology and *in vitro* developmental potential. **Zygote**, v.14, n.1, p.53-61, 2006.

NAVARRO-COSTA, P.; NOGUEIRA, P.; CARVALHO, M.; LEAL, F.; CORDEIRO, I.; CALHAZ- JORGE, C.; GONÇALVES, J.; PLANCHA, C. E. Incorrect DNA methylation of the DAZL promoter CpG island associates with defective human sperm. **Human Reproduction**, v.25, n.10, p. 2647-54, 2010.

NAVES, C. V.; BELETTI M. E.; DUARTE, M. B.; VIEIRA, R. C.; DINIZ, E. G.; JACOMINI, J. O. Avaliação da cromatina espermática em equinos com azul de toluidina e acridine Orange. **Bioscience Journal**, v. 20, n. 3, p. 117-124, 2004.

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

OLIVEIRA, L. Z.; SANTOS, R. M.; HOSSEPIAN, D. E.; LIMA, V. F. M.; ARRUDA, R. P.; DE ANDRADE, A. F. C.; GUIMARÃES JUNIOR, V.; BELETTI, M. E. Chromatin and morphometry alterations of bovine sperm head after Percoll density gradient centrifugation. **Livestock Science**, v.141, n.2-3, p.267-71, 2011.

OSTERMEIER, G. C.; DIX, D. J.; MILLER, D.; KHATRI, P.; KRAWETZ, S. A. Spermatozoal RNA profiles of normal fertile men. **The Lancet**, v. 360, p. 772-77, 2002.

OSTERMEIER, G. C.; MILLER, D.; HUNTRISS, J. D.; DIAMOND, M. P.; KRAWETZ, S.A. Reproductive biology: delivering spermatozoan RNA to the oocyte. **Nature**, v.429, p.154, 2004.

PINCUS, G.; ENZMANN, E. The comparative behavior of mammalian eggs *in vivo* and *in vitro*. **The journal of experimental medicine**. v. 62, n.5, p.665-675, 1935.

POMINI PINTO, R. F.; FONTES, P.K.; LOUREIRO, B.; SOUSA CASTILHO, A.C.; SOUSA TICIANELLI, J.; MONTANARI RAZZA, E.; SATRAPA, R.A.; BURATINI, J.; MORAES BARROS, C. Effects of FGF10 on bovine oocyte meiosis progression, apoptosis, embryo development and relative abundance of developmentally important genes *in vitro*. **Reproduction In Domestic Animals**, v. 50, n. 1, p. 84-90, 2015.

QUINN, G. P.; KEOUGH, M. J. **Experimental design and data analysis for Biologist**. 1ª ed. Cambridge University Press, Cambridge. 537p., 2002.

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

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

RODRIGUEZ, K.F.; FARIN, C.E. Gene transcription and regulation of oocyte maturation. **Reproduction, Fertility and Development**, v.16, n.1-2, p.55-67, 2004.

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.

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, n.4, p.1027–1036, 2010.

SAUNDERS, C.M.; LARMAN, M.G.; PARRINGTON, J.; COX, L.J.; ROYSE, J.; BLAYNEY, L.M. PLC zeta: a sperm-specific trigger of Ca²⁺ oscillations in eggs and embryo development. **Development**, v.129, n.15, p.3533–44, 2002.

SETCHELL, B.P. The parkes lecture. Heat and the testis. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.114, p.179-194, 1998.

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 zebrinos. **Acta Scientiarum Animal Sciences**, v. 30, n.1, p. 473-478, 2008.

SIRARD, M.A.; RICHARD, F.; BLONDIN, P.; ROBERT, C. Contribution of the oocyte to embryo quality. **Theriogenology**, v.65, n.1, p.126-136, 2006.

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.

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

STRICKER, S. A. Comparative biology of calcium signaling during fertilization and egg activation in animals. **Developmental Biology**. v. 211, n.2, p. 57-76, 1999.

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

TOYODA, Y.; CHANG, M. Fertilization of rat eggs *in vitro* by epididymal spermatozoa and the development of eggs following transfer. **Journal Reproduction & Fertility**. v.36, n.1, p. 9-22, 1974.

TRASLER, J.M. Origin and roles of genomic methylation patterns in male germ cells. **Seminars in Cell & Developmental Biology**, v. 9, n.4, p.467–474, 1998.

TROUGAKOS, I. P.; GONOS, E. S. Clusterin/apolipoprotein J in human aging and cancer. **The International Journal of Biochemistry**, v. 34, n.11, p.1430–1448, 2002.

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.

VAN DER HEIJDEN, G. W.; DERIJCK, A. A.; RAMOS, L.; GIELE, M.; VAN DER VLAG, J.; DE BOER, P. Transmission of modified nucleosomes from the mouse male germline to the zygote and subsequent remodeling of paternal chromatin. **Developmental Biology**, v. 298, n.2, p. 458-69, 2006.

WAGGONER, D. Mechanisms of disease: epigenesis. **Seminars in Pediatric Neurology**, v. 14, n.1, p. 7-14, 2007.

WARD, W.S.; COFFEY, D.S. Identification of a sperm nuclear annulus: a sperm DNA anchor. **Biology of Reproduction**, v. 41, n.2, p.361-70, 1989.

WHITTEN, W. K.; BIGGERS, J. D. Complete development *in vitro* of the pre-implantation stages of the mouse in a simple chemically defined medium. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 17, n.2, p.399-401, 1968.

WRENZYCKI C, HERRMANN D, KESKINTEPE L, MARTINS A JR, SIRISATHIEN S, BRACKETT B, NIEMANN H. Effects of culture system and protein supplementation on mRNA expression in pre-implantation bovine embryos. **Human Reproduction**, v.16, n.5, p.893–901, 2001.

YAMAUCHI, Y.; SHAMAN, J.; WARD, W. S. Non-genetic contributions of the sperm nucleus to embryonic development. **Asian Journal of Andrology**, v.13, n.1, p.31-35, 2011.

YANAGIMACHI, R. Mammalian fertilization. In: KNOBIL, A.; NEILL, J.D. **The physiology of reproduction**. New York: Raven Press. p. 189–317, 1994.

YUAN YQ, VAN SOOM, COOPMAN FOJ, MINTIENS K, BOERJAN ML, VAN ZEVEREN A, et al. Influence of oxygen tension on apoptosis and hatching in bovine embryos cultured in vitro. **Theriogenology**, v.59, n.7, p.1585–96, 2003.

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

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

**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
espermatozóides 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

ANEXO B

Meios utilizados na PIVE

Antibiótico

Diluir o sulfato de gentamicina em solução fisiológica.

250 mg de sulfato de gentamicina em 5 mL de solução fisiológica

Solução de piruvato

A solução de piruvato dever ser feita todos os dias.

Pesar 0,0055 g de Piruvato sódico e diluir em 500 μ L de água Milli-Q.

PBS

| Componentes | PBS Completo |
|--|--------------|
| Água Milli-Q | 1 L |
| NaCl (137mM/171mM) | 8 g |
| KCl (2,7mM/3,4mM) | 0,2 g |
| Na ₂ HPO ₄ -Anidro (8mM) | 1,15 g |
| Na ₂ HPO ₄ -12H ₂ O (4mM) | - |
| KH ₂ PO ₄ (1,5mM/1,8mM) | 0,2 g |
| CaCl ₂ -2H ₂ O (0,7mM) | 0,1 g |
| MgCl ₂ -6H ₂ O (0,5mM) | 0,1 g |
| DL-Glucose (5,5mM) | 1 g |
| Antibiótico | 1 mL |

Base e Meio de Lavagem

| BASE TCM 199 Hepes | 10 mL |
|----------------------------|----------|
| Água Milli-Q | 10 mL |
| TCM 199 | 0,095 g |
| Bicarbonato de Sódio (5mM) | 0,0042 g |
| Hepes Ácido (10mM) | 0,024 g |
| Hepes Sódico (10mM) | 0,026 g |

| Meio de Lavagem | 10 mL |
|---------------------|------------|
| BASE TCM 199 Hepes | 9 mL |
| SFB | 1 mL |
| Solução de Piruvato | 20 μ L |
| Antibiótico | 10 μ L |

FSH (Folltropin) (0,5 µg/µL)

Solução mãe = Diluir conteúdo de um frasco (400 mg) em 80 mL de TCM Bicarbonato (Base de maturação).

Diluir 500µL da solução mãe em 4,5 mL de TCM Bicarbonato e fazer alíquotas de 100µL

LH (Lutropin) (5µg/µL)

Solução mãe = Diluir o conteúdo do frasco (25 mg) em 5 mL de TCM Bicarbonato (Base de maturação).

Diluir 1 mL em 9mL de TCM e fazer alíquotas de 110 µL.

Base e meio de Maturação

| BASE TCM 199 Bicarbonato | 10 mL | 15 mL |
|-----------------------------|---------|---------|
| Água Milli-Q | 10 mL | 15 mL |
| TCM 199 | 0,095 g | 0,142 g |
| Bicarbonato de Sódio (26mM) | 0,022 g | 0,033 g |

| Meio de Maturação | 10 mL | 15 mL |
|---------------------------------|--------|---------|
| Solução Mãe TCM 199 Bicarbonato | 9 mL | 13,5 mL |
| SFB | 1 mL | 1,5 mL |
| Solução de Piruvato | 20 µL | 30 µL |
| Antibiótico | 10 µL | 15 µL |
| FSH | 10 µL | 15 µL |
| LH | 100 µL | 150 µL |

Solução estoque de KCL e NaH₂PO₄-H₂O para Solução 10X**KCL (1M)**

| Componentes | 1 mL | 5 mL |
|--------------|----------|---------|
| Água Milli-Q | 1 mL | 5 mL |
| KCl | 0,0745 g | 0,373 g |

NaH₂PO₄-H₂O (100mM)

| Componentes | 1 mL | 5 mL |
|--|----------|---------|
| Água Milli-Q | 1 mL | 5 mL |
| NaH ₂ PO ₄ -H ₂ O | 0,0138 g | 0,069 g |

Solução 10X

(Preparar e fazer alíquotas de 410µL)

| Componentes | 5 mL |
|--|-----------|
| Água Milli-Q | 5 mL |
| Estoque KCl (1M) (31mM) | 0,1545 mL |
| Estoque NaH ₂ PO ₄ -H ₂ O (100mM) (3mM) | 0,146 mL |
| NaCl (800mM) | 0,233 g |
| Hepes Ácido (50mM) | 0,060 g |
| Hepes Sódico (50mM) | 0,065 g |

Soluções estoques de CaCl_2 e MgCl_2 para Percoll 90%

CaCl_2 (1M)

| Componentes | 10 mL |
|--|--------|
| Água Milli-Q | 10 mL |
| $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (1M) | 1,47 g |

MgCl_2 (100mM)

| Componentes | 10 mL |
|---|---------|
| Água Milli-Q | 10 mL |
| $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (100mM) | 0,203 g |

Percoll 90%

| Componentes | 1 touro | 2 touros |
|---------------------------------|-------------------|--------------------|
| Percoll | 1,8 mL | 3,6 mL |
| Solução 10X | 200 μL | 400 μL |
| Estoque CaCl_2 (1M) | 4 μL | 8 μL |
| Estoque MgCl_2 (100mM) | 7,8 μL | 15,6 μL |
| DL-Ácido Láctico (60%) (26,4mM) | 7,4 μL | 14,8 μL |
| Bicarbonato de Sódio (20mM) | 0,0042 g | 0,0084 g |

Base TALP-FERT e TALP-SPERM (25mL e 50mL)

| Componentes | TL-Fert | TL-Sperm | | |
|---|--------------------|--------------------|--------------------|-------------------|
| | 25 mL | | 50 mL | |
| Água Milli-Q | 25 mL | 25 mL | 50 mL | 50 mL |
| NaCl (114mM/100mM) | 0,166 g | 0,145 g | 0,333 g | 0,291 g |
| KCl (3mM/3mM) | 0,006 g | 0,00575 g | 0,012 g | 0,0115 g |
| $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (0,5mM/0,4mM) | 0,002 g | 0,002 g | 0,005 g | 0,004 g |
| NaH_2PO_4 -Anidro (0,3mM) | 0,00117 g | 0,0010 g | 0,00235 g | 0,0020 g |
| Bicarbonato de Sódio (25mM) | 0,0525 g | 0,0525 g | 0,105 g | 0,105 g |
| $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (2mM) | 0,0075 g | 0,0075 g | 0,015 g | 0,015 g |
| DL-Ácido Láctico (60%) (12mM/26mM) | 35,7 μL | 77,5 μL | 71,5 μL | 155 μL |
| <i>Phenol Red</i> (30 μM) | 0,0003 g | 0,0003 g | 0,0005 g | 0,0005 g |
| Hepes Ácido (10mM) | - | 0,0595 g | - | 0,119 g |

Não pesar o *Phenol Red*, colocar o mínimo possível apenas como controle de pH. O TALP-FERT deve ficar numa coloração rósea enquanto o TALP-SPERM deve ficar numa coloração alaranjada.

PHE

(Preparar e fazer aliquotas de 180µL)

| Solução pH 4,0 | 50 mL |
|--------------------------------|---------------------------|
| Água Milli-Q | 50 mL |
| DL-Ácido Lático (60%) (29,4mM) | 0,165 g (pesar o líquido) |
| Bisulfito de Sódio | 0,050 g |

| Soluções Mãe | Penicilamina | Hipotaurina | Epinefrina |
|----------------------|--------------|-------------|------------|
| Salina 0,9% | 10 mL | 10 mL | - |
| D-Penicilamina (2mM) | 0,003 g | - | - |
| Hipotaurina (1mM) | - | 0,0011 g | - |
| Solução pH 4,0 | - | - | 40 mL |
| Epinefrina (245µM) | - | - | 0,0018 g |

| PHE final | 11 mL |
|----------------|--------|
| D-Penicilamina | 2,5 mL |
| Hipotaurina | 2,5 mL |
| Epinefrina | 2 mL |
| Salina 0,9% | 4 mL |

TALP-SPERM

| Componentes | 1 touro | 2 touros | 3 touros |
|---------------------|---------|----------|----------|
| BASE TALP-SPERM | 4,96 mL | 9,93 mL | 14,89 mL |
| Solução de Piruvato | 10 µL | 20 µL | 30 µL |
| Antibiótico | 5 µL | 10 µL | 15 µL |

TALP-FERT

| Componentes | 2 touros | 4 touros |
|----------------------------------|----------|----------|
| Base TALP-FERT | 3,6 mL | 7,2 mL |
| Antibiótico | 4 µL | 8 µL |
| Solução de Piruvato | 8 µL | 16 µL |
| PHE | 160 µL | 320 µL |
| Heparina | 40 µL | 80 µL |
| B ₅ SA (FIV) (6mg/mL) | 0,024 g | 0,048 g |

Estoques SOF

| Soluções Estoque | A Solução de Sais | B Solução de Bicarbonato | D Solução de CaCl ₂ | L- Glutamina |
|--|-------------------------|--------------------------------|--------------------------------------|-----------------|
| Água Milli-Q | 9,84 mL | 10 mL | 1 mL | 1 mL |
| NaCl (1,1M) | 0,629 g | - | - | - |
| KCl (72mM) | 0,0534 g | - | - | - |
| KH ₂ PO ₄ (12mM) | 0,0162 g | - | - | - |
| MgSO ₄ ·7H ₂ O (7,4mM) | 0,0182 g | - | - | - |
| DL-Ácido Lático (60%) (50µM) | 60 µL | - | - | - |
| Bicarbonato de Sódio (250mM) | - | 0,210 g | - | - |
| Phenol Red (260µM) | - | 0,001 g | - | - |
| CaCl ₂ ·2H ₂ O (178mM) | - | - | 0,0262 g | - |
| L-Glutamina (200mM) | - | - | - | 0,02923 g |

Base SOF

| BASE SOF | 20 mL | 40mL |
|---|--------------|-------------|
| Água Milli-Q | 15,6 mL | 31,2 mL |
| Estoque A | 2 mL | 4 mL |
| Estoque B | 2 mL | 4 mL |
| Estoque D | 200 µL | 400 µL |
| L-Glutamina | 20 µL | 40 µL |
| BME Essenciais (50X) | 200 µL | 400 µL |
| MEM Não-Essenciais (100X) | 200 µL | 400 µL |
| Myo-Inositol (2,8mM) | 0,01 g | 0,02 g |
| Tri-Citrato de Sódio Di-Hidratado (340µM) | 0,002 g | 0,004 g |

Meio SOF

| SOF final | 1 mL | 5 mL | 6 mL | 10 mL |
|------------------------------|-------------|-------------|-------------|--------------|
| BASE SOF | 968 µL | 4,84 mL | 5,81 mL | 9,68 mL |
| Solução de piruvato | 2 µL | 10 µL | 12 µL | 20 µL |
| Antibiótico | 5 µL | 25 µL | 30 µL | 50 µL |
| BSA (CIV) (5mg/mL) pu | 0,005 g | 0,025 g | 0,030 g | 0,05 g |
| (6mg/mL) | 0,006 g | 0,03 g | 0,036 g | 0,06 g |
| SFB | 25 µL | 125 µL | 150 µL | 250 µL |