

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

MATHEUS VICENTE DA SILVA

TÉCNICAS DE IDENTIFICAÇÃO DE DEFEITOS DA CROMATINA ESPERMÁTICA
DE TOUROS (*Bos taurus*) E SUA CORRELAÇÃO COM A EFICIÊNCIA DA
PRODUÇÃO *in vitro* DE EMBRIÕES (PIVE)

UBERLÂNDIA

2022

MATHEUS VICENTE DA SILVA

TÉCNICAS DE IDENTIFICAÇÃO DE DEFEITOS DA CROMATINA ESPERMÁTICA
DE TOUROS (*Bos taurus*) E SUA CORRELAÇÃO COM A EFICIÊNCIA DA
PRODUÇÃO *in vitro* DE EMBRIÕES (PIVE)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias. Mestrado, da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Uberlândia, como requisito parcial à obtenção do título de mestre em Ciências Veterinárias.

Área de Concentração: Produção Animal

Linha de pesquisa: Biotécnicas e eficiência reprodutiva

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Emílio Beletti

UBERLÂNDIA
2022

Ficha Catalográfica Online do Sistema de Bibliotecas da UFU com
dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

S586 Silva, Matheus Vicente da, 1994-
2022 Técnicas de identificação de defeitos da cromatina
espermática de touros (*Bos taurus*) e sua correlação com
a eficiência da produção *in vitro* de embriões (PIVE)
[recurso eletrônico] / Matheus Vicente da Silva. - 2022.

Orientador: Marcelo Emílio Beletti.
Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de
Uberlândia, Pós-graduação em Ciências Veterinárias.
Modo de acesso: Internet.
Disponível em: <http://doi.org/10.14393/ufu.di.2022.361>
Inclui bibliografia.
Inclui ilustrações.

1. Veterinária. I. Beletti, Marcelo Emílio, 1964-,
(Orient.). II. Universidade Federal de Uberlândia. Pós-
graduação em Ciências Veterinárias. III. Título.

CDU: 619

Bibliotecários responsáveis pela estrutura de acordo com o AACR2:

Gizele Cristine Nunes do Couto - CRB6/2091

Nelson Marcos Ferreira - CRB6/3074



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
Secretaria da Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Ciências
Veterinárias
BR 050, Km 78, Campus Glória , Uberlândia-MG, CEP
38400-902 Telefone: (34) 2512-6811 -
www.ppgcv.famev.ufu.br - mesvet@ufu.br



ATA DE DEFESA - PÓS-GRADUAÇÃO

Programa de Pós-Graduação em:	CIÊNCIAS VETERINÁRIAS - PPGCVET				
Defesa de:	DISSERTAÇÃO DE MESTRADO ACADÊMICO PPGCVET Nº 10/2022				
Data:	27 de julho de 2022	Hora de início:	14:00	Hora de encerramento:	17:55
Matrícula do Discente:	12012MEV010				
Nome do Discente:	MATHEUS VICENTE DA SILVA				
Título do Trabalho:	TÉCNICAS DE IDENTIFICAÇÃO DE DEFEITOS DA CROMATINA ESPERMÁTICA DE TOUROS (<i>Bos taurus</i>) E SUA CORRELAÇÃO COM A EFICIÊNCIA DA PRODUÇÃO <i>in vitro</i> DE EMBRIÕES (PIVE)				
Área de concentração:	PRODUÇÃO ANIMAL				
Linha de pesquisa:	BIOTÉCNICAS E EFICIÊNCIA REPRODUTIVA				
Projeto de Pesquisa de vinculação:	FATORES AMBIENTAIS E NUTRICIONAIS QUE AFETAM A EFICIÊNCIA PRODUTIVA E REPRODUTIVA DE ANIMAIS DE INTERESSE ZOOTÉCNICO				

Reuniu-se por Videoconferência (meio eletrônico), na Universidade Federal de Uberlândia, a Banca Examinadora, designada pelo Colegiado do Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, assim composta: Professores Doutores: **Elisa Sant'Anna Monteiro da Silva - FAMEV/UFU; Leticia Zoccolaro Oliveira - DCCV/UFMG e Marcelo Emílio Beletti - ICBIM/UFU** orientador do candidato.

Iniciando os trabalhos o presidente da mesa, **Dr. Marcelo Emílio Beletti**, apresentou a Comissão Examinadora e o candidato(a), agradeceu a presença do público, e concedeu ao Discente a palavra para a exposição do seu trabalho. A duração da apresentação do Discente e o tempo de arguição e resposta foram conforme as normas do Programa.

A seguir o senhor(a) presidente concedeu a palavra, pela ordem sucessivamente, aos(às) examinadores(as), que passaram a arguir o(a) candidato(a). Ultimada a arguição, que se desenvolveu dentro dos termos regimentais, a Banca, em sessão secreta, atribuiu o resultado final, considerando o(a) candidato(a):

Aprovado.

Esta defesa faz parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre.

O competente diploma será expedido após cumprimento dos demais requisitos, conforme as normas do Programa, a legislação pertinente e a regulamentação interna da UFU.

Nada mais havendo a tratar foram encerrados os trabalhos. Foi lavrada a presente ata que após lida e achada conforme foi assinada pela Banca Examinadora.



Documento assinado eletronicamente por **Leticia Zoccolaro Oliveira, Usuário Externo**, em 27/07/2022, às 18:04, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Marcelo Emílio Beletti, Professor(a) do Magistério Superior**, em 27/07/2022, às 18:07, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Elisa Sant'anna Monteiro da Silva, Professor(a) do Magistério Superior**, em 28/07/2022, às 10:45, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://www.sei.ufu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **3745498** eo código CRC **B8B2DE01**.

AGRADECIMENTOS

Agradeço inicialmente a DEUS, por me abençoar, proteger e me dar a graça de viver.

Agradeço imensamente meus pais, Nerilda Maria da Silva e Romildo Peixoto Barbosa por todo a dedicação, amor, carinho e apoio ao longo da minha jornada até aqui.

Agradeço imensamente meu orientador, Marcelo Emílio Beletti, por me orientar, aconselhar e por compartilhar seu conhecimento comigo.

Agradeço a minha namorada, Tarika Gonçalves do Carmo Oliveira, por seu amor, carinho e companheirismo.

Agradeço aos alunos e colegas do laboratório de Biologia da Reprodução.

Agradeço a todos colegas do laboratório histologia da UFU.

Agradeço à Universidade Federal de Uberlândia e o Programa de Pós Graduação em Ciências Veterinária.

Muito obrigado!

RESUMO

Atualmente os exames de sêmen bovino fornecem um grau limitado de informação de prognóstica e diagnóstica da fertilidade, o que demonstra a necessidade de testes de função espermática, incluindo análises da integridade da cromatina. Neste contexto, foi proposto avaliar o desempenho de diferentes técnicas de identificação de defeitos de cromatina espermática de touros (*Bos taurus*) e correlacionar os resultados com a taxa de clivagem e a formação de blastocisto nas rotinas de produção *in vitro* de embriões (PIVE), com intuito de se identificar os métodos mais eficientes, de menor custo e de fácil aplicação no campo e em laboratórios de reprodução animal. Foram utilizadas quatro amostras de sêmen congeladas em meio TRIS-gema de quatro touros (*Bos taurus*) Girolandos com diferentes graus de fertilidade. Essas amostras foram submetidas à avaliação da cromatina espermática por diferentes técnicas: avaliação visual e computacional de esfregaços corados com azul de toluidina (AT) e com reação de Feulgen (RF), avaliação visual de esfregaços corados com laranja de acridina (LA) em microscopia de fluorescência e microscopia confocal de varredura a laser, avaliação em microscopia eletrônica de transmissão (MET) e SCSA (sperm chromatin structure assay). As mesmas amostras foram utilizadas em rotinas de produção *in vitro* de embriões, das quais foram calculadas as taxas de clivagem e blastocisto. Os resultados obtidos em cada técnica foram correlacionados entre eles e com as taxas de clivagem e blastocisto. De maneira geral, todas as alterações de cromatina identificadas por qualquer que seja o método, apresentaram maiores correlações com a taxa de blastocisto do que com a de clivagem, possivelmente porque as alterações cromatínicas interferem mais no desenvolvimento embrionário inicial do que na capacidade fecundante dos espermatozoides. Dentre os métodos testados, a avaliação de alterações de cromatina por microscopia eletrônica de transmissão (MET) e a coloração com laranja de acridina (LA) avaliada em microscopia de fluorescência e microscopia confocal de varredura a laser foram os mais eficazes para identificar alterações de cromatina que interferem na eficiência da produção *in vitro* de embriões bovinos. No entanto, a MET é de altíssimo custo. As técnicas que utilizam esfregaços corados com AT e Feulgen, mesmo sendo menos eficazes que MET e LA, são as de menor custo e podem ser utilizadas com relativa eficácia.

Palavras-chave: azul de toluidina, laranja de acridina, Feulgen, microscopia eletrônica de transmissão, fertilidade

ABSTRACT

Currently, bovine semen tests provide a limited degree of prognostic and diagnostic information on fertility, which demonstrates the need for sperm function tests, including analyses of chromatin integrity. In this context, it is proposed to evaluate the performance of different techniques for identifying sperm chromatin defects in bulls (*Bos taurus*) and to correlate the results with the cleavage rate and blastocyst formation in routines of *in vitro* embryo production (IVP), with the aim of identifying the most efficient, lowest-cost and easy-to-apply methods in the field and in animal reproduction laboratories. Four samples of semen frozen in TRIS-yolk medium from four Girolando bulls (*Bos taurus*) with different degrees of fertility were used. These samples were submitted to sperm chromatin evaluation by different techniques: visual and computational evaluation of smears stained with toluidine blue (TB) and with Feulgen reaction (FR), visual evaluation of smears stained with acridine orange (AO) under fluorescence microscopy and confocal laser scanning microscopy, evaluation in transmission electron microscopy (TEM) and SCSA (sperm chromatin structure assay). The same samples were used in routine *in vitro* embryo production, from which cleavage and blastocyst rates were calculated. The results obtained in each technique were correlated with each other and with the cleavage and blastocyst rates. In general, all the chromatin alterations identified by any method presented greater correlations with the blastocyst rate than with the cleavage rate, possibly because the chromatin alterations interfere more in the early embryonic development than in the fertilizing capacity of the embryos. sperm. Among the methods tested, the evaluation of chromatin alterations by transmission electron microscopy (TEM) and staining with acridine orange (AO) evaluated by fluorescence microscopy and confocal laser scanning microscopy were the most effective to identify in identifying chromatin alterations. that interfere with the efficiency of *in vitro* bovine embryo production. However, TEM is very expensive. The techniques that use smears stained with AT and Feulgen, despite being less effective than TEM and AO, are the least expensive and can be used with relative effectiveness.

Key-words: toluidine blue, acridine orange, Feulgen reaction, transmission electron microscopy, fertility

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1: Modelo substituição de histonas por protaminas durante a espermiogênese em mamíferos.....17
- Figura 2: Micrografias de espermatozoides submetidos a técnica de laranja de acridina, capturadas por microscopia confocal de varredura a laser. (A) Cabeças de espermatozoides apresentando sobreposição das pseudocores verde e vermelha; (B) cabeças de espermatozoides apresentando a pseudocor verde; (C) cabeças de espermatozoides apresentando pseudocor vermelha. (Seta branca) cabeça de espermatozoide com DNA desnaturado.....34
- Figura 3. “Pseudo color plot” de SCSA de espermatozoides humanos, demonstrando diferentes “gates”. (Norm) população de espermatozoides normais; (Mod DFI) população de espermatozoides com fragmentação de cromatina moderada; (High DFI) população de espermatozoides com alta fragmentação de DNA; (HDS) população de espermatozoides com alta fluorescência em verde do DNA, espermatozoide imaturo; (Debris) debris celulares. (modificado de Evenson, 2016).....36
- Figura 4: Micrografias eletrônicas de cabeças de espermatozoides bovinos, observando-se alteração de cromatina grau G1, caracterizando-se pela presença de até 3 pequenos pontos claros na cromatina (seta branca)38
- Figura 5: Micrografias eletrônicas de cabeças de espermatozoides bovinos, observando-se alteração de cromatina grau G2, caracterizando-se pela presença de até 6 pequenos pontos claros ou região mais clara ocupando até $\frac{1}{4}$ da cabeça (seta branca).....39
- Figura 6: Micrografias eletrônicas de cabeças de espermatozoides bovinos, observando-se alteração de cromatina grau G3, caracterizando-se pela presença de vários pontos claros (acima de 6) ou região mais clara ocupando até metade da cabeça (seta branca).....40
- Figura 7: Micrografias eletrônicas de cabeças de espermatozoides bovinos, observando-se alteração de cromatina grau G4, caracterizando-se pela presença Mais da metade da área nuclear mais clara ou grandes regiões totalmente claras (seta branca).....41

Figura 8: Diferentes tipos de descompactação de cromatina de espermatozoide corados com azul de toluidina. (N) normal; (DB) descompactação na base; (DMB) descompactação na metade basal; (DEC) descompactação no eixo central; (DBA) descompactação base ápice; (DT) descompactação total.....43

Figura 9: Diferentes tipos de descompactação de cromatina de espermatozoide corados com Feulgen. (N) normal; (DB) descompactação na base; (DMB) descompactação na metade basal; (DEC) descompactação no eixo central; (DT) descompactação total; (DD) descompactação dispersa; (DBA) Descompactação base ápice.....44

Figura 10. Média e desvio padrão das alterações de cromatina espermática identificadas por contagem visual (CV) e computacional (SDC) de esfregaços corados com azul de toluidina (AT) e com reação de Feulgen (FG), avaliação visual por microscópio confocal de varredura a laser (MCVL) e de fluorescência (MF) de esfregaços corados com laranja de acridina (LA), avaliação por microscopia eletrônica de transmissão (SAC - MET). Diferença significativa quando $p \leq 0,05$ ** e tendência a diferença significativa quando $0,05 \leq p \leq 0,1$ *.....49

Figura 11. Pseudo color plot de FITC X PE (fluorescência verde x fluorescência vermelha) de SCSA de espermatozoides bovinos corados com laranja de acridina, não sendo possível desenhar os “gates” referentes aos espermatozoides com e sem alterações no DNA.....53

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Taxas de clivagem e de blastocisto obtidas das amostras de sêmen de touros normalizadas com taxas de clivagem e de blastocisto obtidas com o sêmen do touro referência (fértil).....	46
Tabela 2. Média e desvio padrão obtidos pela avaliação visual e computacional de esfregaços corados com azul de toluidina e com reação de Feulgen, avaliação visual da técnica de coloração com laranja de acridina e avaliação por microscopia eletrônica de transmissão.....	47
Tabela 3. Correlação de Pearson entre taxa de clivagem e de blastocisto com a avaliação visual e computacional dos esfregaços corados com Azul de Toluidina.....	50
Tabela 4: Correlação de Pearson entre taxa de clivagem e de blastocisto com a visual e computacional dos esfregaços corados com Reação de Feulgen.....	51
Tabela 5: Correlação de Pearson entre taxa de clivagem e de blastocisto com os resultados obtidos com a técnica de coloração laranja de acridina e com a microscopia eletrônica de transmissão.....	52
Tabela 6: Correlação de Pearson entre a avaliação visual e computacional dos esfregaços corados com reação de Feulgen e azul de toluidina.....	53
Tabela 7: Correlação de Pearson entre avaliação visual com avaliação computacional dos esfregaços corados com reação de Feulgen e azul de toluidina.....	54
Tabela 8: Correlação de Pearson entre resultados obtidos com a técnica de coloração laranja de acridina com a avaliação visual e computacional dos esfregaços corados com azul de toluidina.....	55
Tabela 9: Correlação de Pearson entre resultados obtidos com a técnica de coloração laranja de acridina com a avaliação visual e computacional dos esfregaços corados com reação de Feulgen.....	56
Tabela 10: Correlação de Pearson entre a técnica de coloração por laranja acridina com a	

avaliação de cromatina espermática por microscopia eletrônica de transmissão.....57

Tabela 11: Correlação de Pearson entre avaliação de cromatina espermática por microscopia eletrônica de transmissão com a avaliação visual e computacional dos esfregaços corados com azul de toluidina.....58

Tabela 12: Correlação de Pearson entre avaliação de cromatina espermática por microscopia eletrônica de transmissão com a avaliação visual e computacional dos esfregaços corados com reação de Feulgen.....59

LISTA DE ABREVIações E SIGLAS

AT	Azul de toluidina
AC	Adenil ciclase
BER	Reparo por excisão de base
BSA	Albumina sérica bovina
CMA3	Cromomicina A3
COCs	Complexos ovócitos cúmulo
CV	Contagem visual
DB	Descompactação na base
DBA	Descompactação base ápice
DD	Descompactação dispersa
DEC	Descompactação no eixo central
DMB	Descompactação metade basal
DT	Descompactação total
FIV	Fertilização <i>in vitro</i>
G1	Grau de alteração 1
G2	Grau de alteração 2
G3	Grau de alteração 3
G4	Grau de alteração 4
GAPDH	Gliceraldeído3-fosfato desidrogenase
GST	Glutathiona S-transferase
HR	Reparo por recombinação homologa
LA	Laranja de acridina
MCVL	Microscopia confocal de varredura a laser
MET	Microscopia eletrônica de transmissão
MF	Microscopia de fluorescência
PIVEs	Produção <i>in vitro</i> de embriões
MMR	Reparo de incompatibilidade
N	Normal
NER	Reparo por excisão de nucleotídeos
NHRJ	Junção de extremidade não homóloga
PKA	Proteína quinase A

PRM1	Protamina 1
PRM2	Protamina 2
RF	Reação de Feulgen
ROS	Espécies reativas ao oxigênio
SAC	Somatória alterações de cromatina
SDC	Somatória de todos os tipos de descompactação de cromatina
SCD	Sperm Chromatin Dispersion
SCSA	Sperm Chromatin Structure Assay
TUNEL	Terminal deoxynucleotidil transferase dUTP nick end labeling

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	13
2	REVISÃO LITERATURA.....	15
2.1	Espermatogênese.....	15
2.2	Espermio gênese.....	15
2.3	Cromatina espermática.....	15
2.4	Fertilização.....	18
2.5	Desenvolvimento Embrionário	21
2.6	Danos a cromatina espermática.....	22
2.7	Técnicas de análise de integridade de cromatina espermática.....	23
2.7.1	Técnica de coloração com Reação de Feulgen (RF).....	24
2.7.2	Técnica de coloração com azul de toluidina (AT).....	25
2.7.3	Técnica de coloração com laranja de acridina (LA).....	26
2.7.4	Ensaio de estrutura de cromatina espermática (SCSA).....	27
2.7.5	Microscopia eletrônica de transmissão (MET).....	28
3	MATERIAS E MÉTODOS.....	29
3.1	Obtenção das amostras de Sêmen.....	29
3.2	Produção <i>in vitro</i> de embriões (PIVEs).....	29
3.3	Confecção das Lâminas.....	31
3.4	Técnica de coloração com Azul de Toluidina (AT).....	32
3.5	Técnica de coloração com reação de Feulgen (RF).....	32
3.6	Técnica de coloração com Laranja de Acridina (LA).....	33
3.7	Ensaio de estrutura de cromatina espermática (SCSA).....	35
3.8	Análise de alterações de cromatina espermática por microscopia eletrônica de transmissão (MET).....	36
3.9	Análise de imagem computacional das cabeças de espermatozoides	41
3.10	Análise estatística	44
4	RESULTADOS.....	46
5	DISCUSSÃO.....	61
6	CONCLUSÃO.....	67
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	68

1. INTRODUÇÃO

Em mamíferos, o gameta masculino é organizado morfológicamente em cabeça e cauda. Sendo a região da cabeça formada por acrossoma, núcleo e uma quantidade mínima de citoplasma (BELETTI, 2013). Durante a formação dessa célula, especificamente na espermiogênese, a cromatina associada a proteínas chamadas de histonas passa por uma reorganização e se associa a outro tipo de proteína chamada protamina (RATHKE et al., 2014). A troca de histonas por protaminas confere a cromatina um grau de compactação 20 vezes maior em relação a organização inicial (BALHORN, 2007). Essa nova configuração é capaz de silenciar a expressão gênica nas regiões protaminadas até que ela seja necessária após a fecundação, proteger a integridade do DNA no trato reprodutivo masculino e feminino e reduzir o tamanho da cabeça do espermatozoide, melhorando as propriedades hidrodinâmicas da célula (BRAUN, 2001).

A condição íntegra da cromatina do espermatozoide é importante para fecundação, implantação, embriogênese, placentação, a eficiência das tecnologias de reprodução assistida e a saúde da prole ao longo de sua vida (SHAMSI et al., 2010; DADA, 2017). Segundo Kumaresan et al. (2020), danos ao DNA espermático possuem correlação negativa com a fertilidade de machos, fecundação e o desenvolvimento embrionário.

A infertilidade do macho pode ser decorrente de espermatogênese defeituosa, inclusive durante a remodelação da cromatina, de estresse oxidativo, de infecções subclínicas, de presença de anormalidades cromossômicas, de condição genética constitutiva, de modificações genômicas, tais como encurtamento telômero e estressores ambientais (ESTEVEZ et al., 2021).

Atualmente os diagnósticos andrológicos em touros se restringem em exames macro (cor, volume e densidade) e microscópico (motilidade espermática, vigor, turbilhonamento, concentração espermática e análise de alterações morfológicas espermáticas). No entanto, esses exames fornecem um grau limitado de informações prognósticas e diagnósticas da fertilidade desses touros, o que demonstra a necessidade de testes de função espermática, incluindo análises da integridade da cromatina, a qual é essencial para garantir a fertilidade do espermatozoide e normalidade no desenvolvimento embrionário. (SHAMSI et al., 2010; EVENSON, 2016).

Portanto, é de fundamental importância conhecer a integridade da cromatina, devido sua influência na capacidade fecundante do espermatozoide e em especial, no desenvolvimento embrionário. Para isso faz-se necessário identificar métodos eficientes de análise da cromatina espermática para maximizar o efeito da seleção de machos para reprodução natural e em especial, para fertilização *in vitro*, buscando uma melhora no desenvolvimento inicial dos embriões.

Neste contexto, propõe-se avaliar o desempenho de diferentes técnicas de identificação de defeitos de cromatina espermática de touros (*Bos taurus*) e correlacionar os resultados com a taxa

de clivagem e a formação de blastocisto nas rotinas de produção *in vitro* de embriões (PIVE), com intuito de se identificar os métodos mais eficientes, de menor custo e de fácil aplicação no campo e em laboratórios de reprodução animal.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. ESPERMATOGÊNESE

O processo de espermatogênese pode ser subdividido em três fases: fase mitótica de amplificação, fase meiótica que garante um genoma haploide e uma fase pós meiótica também é conhecida como espermiogênese (RATHKE et al., 2014). Durante a espermatogênese as células sofrem transformações, como a perda da maior parte do seu citoplasma, formação de um flagelo, contenção da expressão genica, paralisação da replicação do DNA e empacotamento da cromatina no interior de um envelope nuclear (COLLAS; POCCIA, 1998).

A espermatogênese consiste em um processo complexo e dinâmico de proliferação e diferenciação, portanto, resultando em uma transição de espermatogônia diploide para espermatozoide haploide. Durante esse período ocorrerá a substituição das histonas canônicas por protaminas 1 e 2 no período de alongamento das espermátides e formação dos espermatozoides (LAMBARD et al., 2004).

2.2 ESPERMIOGÊNESE

Durante a espermiogênese, a maior parte das histonas nucleossômicas são substituídas por protaminas, sendo um processo de várias etapas. Primeiramente as histonas canônicas serão substituídas por variantes de histonas específicas ainda nos testículos, em seguida elas serão substituídas por proteínas de transição e finalmente por protaminas (NANASSY et al., 2011). Além disso, muitas organelas redundantes e o citosol são eliminados, além de alterar sua morfologia apresentando forma alongada. Como resultado da diferenciação, os espermatozoides são liberados (espermição), e a maturação final ocorre no epidídimo (BOERKE; DIELEMAN; GADELLA, 2007). A cromatina de espermatozoides de mamíferos é condensada de uma maneira específica ao tipo de célula, com intuito de adquirir proteção ao DNA durante o trânsito do trato reprodutivo até fertilização (WARD, 2010).

2.3 CROMATINA ESPERMÁTICA

A cromatina é descrita como um complexo formado por DNA e nucleoproteínas, possuindo uma estrutura altamente organizada dentro do núcleo celular, capaz de fornecer informações necessárias para a sobrevivência celular (GORDON et al., 2013). Protamina é a

principal nucleoproteína encontrada na cromatina de espermatozoides maduros, apesar da existência de uma pequena porcentagem de histonas ligadas a cromatina, enquanto que em células somáticas a histona é a principal nucleoproteína (WARD; COFFEY, 1991).

As protaminas são pequenas proteínas carregadas positivamente, possuindo um núcleo rico em arginina e resíduos de cisteína; as moléculas de protaminas interagem com a fita dupla de DNA por ligações eletrostáticas. Desta forma, proporcionando a compactação da cromatina (NANASSY et al., 2011; AITKEN et al., 2022). Além disso, ligações covalentes enxofre-enxofre (S-S) intra e interprotamina possuem papel crucial na estabilização do DNA e compactação da cromatina em touros (DONKIN; BARRÈS, 2018). Essa reorganização dramática da cromatina do espermatozoide resulta em um pacote de cromatina mais rígido e transcricionalmente silenciosa (NANASSY et al., 2011).

Existem dois tipos de protaminas, a protamina 1 (PRM1) e protamina 2 (PRM2) (NANASSY et al., 2011). Maior estabilidade ao DNA espermático se deve ao maior número de resíduos de cisteína na protamina 1, pois, a cisteína é responsável por forma ligações dissulfeto intra e interprotaminas, resultando no aumento na rigidez da compactação da cromatina espermática (NI et al., 2016; HUTCHISON; RAU; DEROUCHÉY, 2017). Em camundongos a protamina 1 constitui cerca de 30% da composição total de protaminas do espermatozoide presente no epidídimo (STEGER, 1999). Já em bovinos, acredita-se que a compactação cromatina espermática é influenciada pelo predomínio de PRM1 em relação a PRM2. Como mencionado anteriormente, o predomínio de PRM1 proporciona maior estabilidade à cromatina, devido à ligação dissulfeto inter e intra protaminas (HAMILTON et al., 2019; KUTCHY et al., 2019). Em homens, a desproporção entre PRM1 e PRM2 é relacionada com alteração na fertilidade e baixos resultados na fertilização *in vitro* (NANASSY et al., 2011).

Conforme demonstrado por Savadi-shiraz et al. (2015), quantidade de PRM1, PRM2 e proteína de transição (TNP1 e TNP2) presente na cromatina possui relação significativa com a morfologia do espermatozoide, concentração espermática e motilidade progressiva. Alteração da proporção de protaminas pode ser considerado um possível indicador de anormalidades proporcionadas devido à defeitos na espermiogênese e / ou perturbação de marcas epigenéticas dentro do genoma paterno (NANASSY et al., 2011).

As histonas são um grupo de proteínas altamente básicas, ricas em resíduos de lisina e arginina, as histonas são classificadas em ligante (H1) e canônicas (H2A, H2B, H3 e H4) (HAMAD, 2019). As quatro histonas canônicas interagem entre si de maneira ordenada durante a montagem do nucleossomo (formando um octâmero de histonas); além disso, existem variantes de histonas canônicas e de ligação (VENKATESH; WORKMAN, 2015). O nucleossomo é envolto por 160 pares de bases de DNA e um fragmento de DNA de ligação, que juntamente com uma

única histona de ligação, eles totalizam de 180–190 pares de bases de DNA (MEMILI; FIRST, 2000). Histonas canônicas são produzidas durante a fase de síntese de DNA do ciclo celular, pelo motivo de haver a necessidade de produção rápida e massiva de histonas durante essa fase (HENIKOFF; SMITH, 2015). A histona de ligação H1 tem capacidade de influenciar a condição das dobras da cromatina, por meio da união do nucleossomo com o DNA (YAN et al., 2003; CATENA et al., 2006).

Nas células pós-meióticas, a estrutura nucleossômica da cromatina passa por uma reorganização global em que a maioria das histonas é removida, trocado com as chamadas proteínas de transição (TNP1/2), que são substituídas posteriormente pelas protaminas 1 e 2. Mas, antes da remoção da histona, dois eventos específicos afetam a nucleossomo: a incorporação de variantes de histonas e um aumento de modificações pós-traducionais, como a acetilação das caudas de histonas (ROUSSEAU et al., 2005; TORRES-FLORES; HERNÁNDEZ-HERNÁNDEZ, 2020), como mostra na figura1. Enquanto grande parte do DNA do esperma é silenciada por sua associação com protaminas, as histonas retidas demonstram formar duas estruturas especificamente ligadas a genes potencialmente necessários no embrião durante os estágios iniciais de desenvolvimento (CASTILLO et al., 2014). Isso sugere que alguns domínios de loop de DNA podem escapar completamente à condensação de protamina (WARD, 2010). Trabalhos relatam que nucleossomos são retidos na cromatina espermática de mamíferos em uma porcentagem de 2-15%. Esta retenção ocorre de forma não aleatória na cromatina e associada a genes específicos para o desenvolvimento embrionário (OLIVA, 2006; WARD, 2010; DAIGNEAULT, 2021).

Hammoud et al. (2011) observaram que entre homens inférteis os níveis de retenção de histonas variam de 5 a 32%, desta maneira, remoção ineficiente de histonas e alta porcentagem de retenção foi atribuído como erros nos processos de remodelação da estrutura da cromatina ou correlacionado à atividade ineficiente da acetil-transferase nas histonas, portanto, influenciando na troca de histona por protamina.

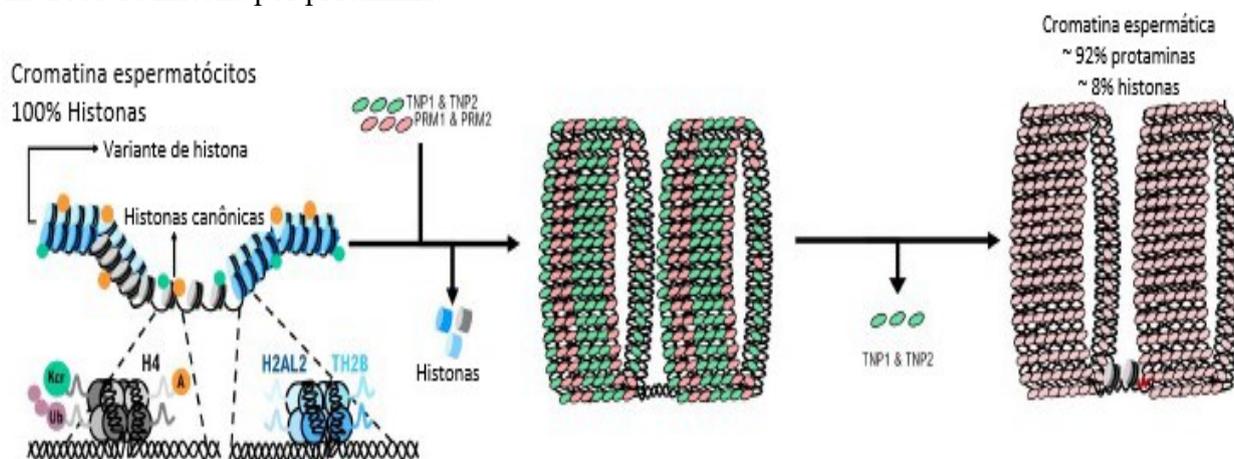


Figura1. Modelo substituição de histonas por protaminas durante a espermiogênese em mamíferos

(modificado de TORRES-FLORES; HERNÁNDEZ-HERNÁNDEZ, 2020).

2.4 FERTILIZAÇÃO

Após a deposição dos espermatozoides no trato reprodutivo do feminino, haverá deslocamento dos espermatozoides até a ampola do oviduto para realizar a fertilização. (ROMERO-AGUIRREGOMEZCORTA et al., 2018). Existe vários mecanismos propostos para descrever o deslocamento dos espermatozoides até o oviduto, como: quimiotaxia, onde os espermatozoides são atraídos por quimioatrações presentes no oviduto; termoataxia, deslocamento pela diferença de temperatura entre istmo e a ampola (local mais quente); reoataxia, caracterizada como deslocamento dos espermatozoides contra o fluxo; tigmotaxia, tendência dos espermatozoides em deslocar próximos ao epitélio do oviduto (ROMERO-AGUIRREGOMEZCORTA et al., 2018). Os resultados apresentados por El-Sherry et al. (2014), sobre o comportamento de deslocamento de espermatozoides de touro em micro fluídos, considera a reoataxia como mecanismo ideal para caracterizar o deslocamento do espermatozoide de touros em direção ao ovócito.

As protaminas proporcionam alto grau de compactação a cromatina espermática, com intuito de proteção ao genoma paterno durante sua permanência do espermatozoide no trato reprodutivo. Desta forma, tendo um papel importante na fertilização (DAIGNEAULT, 2021). Foi proposto por Sillaste et al. (2017), que a retenção de histonas na cromatina espermática acontecerá em áreas genômicas necessárias para a maturação espermática bem-sucedida e fertilização. Desta forma, estando envolvida na sinalização durante a deslocamento espermático, capacitação e reação acrossômica.

Após a entrada do espermatozoide no trato reprodutivo feminino ocorrerá o processo de capacitação espermática, sendo este um processo complexo que envolverá mudanças estruturais e funcionais do espermatozoide (FERRAMOSCA; ZARA; 2014). A capacitação espermática é um requisito essencial para a fertilização do ovócito, pois permitirá que o espermatozoide possa se ligar à zona pelúcida, penetrá-la e fundir-se com o oolema (MOSTEK et al., 2021). Devido à alta compactação da cromatina dos espermatozoides ocorrerá o silenciamento da transcrição gênica. Portanto, a maior parte dos processos de sinalização da capacitação espermática é mediada por receptores de membrana (MAHAJAN et al., 2022).

Durante a capacitação espermática, ocorrerá o efluxo de colesterol da membrana plasmática, aumento do pH intracelular levando a alcalinização do citoplasma espermático, geração de espécies reativas de oxigênio, produção de AMPc, ativação dos canais de Ca, ativação de proteína quinase, aumento da fosforilação da tirosina, hiperativação da motilidade espermática,

ativação das proteínas acrossomais e metabolismo energético (MOSTEK et al., 2021).

A produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) possui papel importante na capacitação espermática, como no aumento da fluidez da membrana plasmática, ou seja, a oxidação do colesterol em oxisterois e em seguida a sua saída da membrana plasmática, resultando no aumentando a fluidez da membrana (AITKEN, 2017). *In vitro*, o efluxo de colesterol da membrana plasmática de espermatozoides poderá ser induzido pela ação da albumina, pois, esta proteína possui a capacidade de facilitar a extração de colesterol da membrana (BOERKE et al., 2008).

Durante a capacitação de espermatozoides de touros ocorre modificações redox de proteínas relacionadas à via cAMP/PKA (ROPN1L, SPA17), excitose acrossômica (ACRB, proteína 9 associada ao acrossoma de esperma, IZUMO4), polimerização de actina (CAPZB) e hiperativação (TUBB4B, TUB1A). A transferência do sinal de oxidação para as proteínas é possível pela atuação da glutathione S-transferase (GST) e gliceraldeído3-fosfato desidrogenase específica do testículo (GAPDH) (MOSKET et al., 2021). A combinação de superóxido, óxido nítrico, o aumento de bicarbonato e aumento da concentração intracelular de cálcio ativarão a adenil ciclase (AC). Desta forma, estimulando a produção de AMPc, conseqüentemente ativará proteína quinase A (PKA), que é essencial para apoiar a fosforilação da tirosina (AITKEN, 2017; MOSKET et al., 2021).

Apesar de ROS participar da capacitação espermática, quando a alta produção de ROS excede a capacidade de defesa da célula pela ação de antioxidantes, ocorrerá estresse oxidativo. Deste modo, o estresse oxidativo provocará a perda da integridade celular, afetando a motilidade e induzirá danos ao DNA espermático. Portanto, o estresse oxidativo impacta diretamente na capacidade fecundante do espermatozoide e conseqüentemente no desenvolvimento embrionário (WYCK et al., 2018; KUMARESAN et al., 2020)

A hiperativação de espermatozoides se caracteriza por um padrão de movimento assimétrico de alta amplitude da cauda do espermatozoide. Esta hiperativação possibilita o desprendimento dos espermatozoides do epitélio do oviduto, como também a penetração através das células do cúmulo, com objetivo de alcançar a zona pelúcida (ROMERO-AGUIRREGOMEZCORTA et al., 2018). Para hiperativação é necessário o aumento do Ph intraflagelar, despolarização da membrana e o aumento da concentração de cálcio intracelular, através dos canais iônicos CatSper. Desta forma, ocorre o influxo de cálcio para interior da cauda para realização de movimento flagelar hiperativado (LISHKO; MANNOWETZ, 2018).

A capacitação do espermatozoide que ocorre no trato reprodutivo feminino, também pode ser realizada *in vitro*, através da incubação do espermatozoide em meio contendo agentes capacitadores, como, exemplo: heparina (FERNÁNDEZ; CÓRDOBA, 2014), cafeína (BREININGER; CETICA; BECONI, 2010); bicarbonato (BREININGER; CETICA; BECONI,

2010) ácido hialurônico (FERNÁNDEZ; CÓRDOBA, 2014) e albumina sérica bovino (BSA) (PAVLOK; KUBELKA; PEKNICOVÁ, 2001). Portanto, é possível induzir a capacitação, hiperativação e reação acrossomal de espermatozoides de touros, com objetivo de alcançar eficiência à fertilização *in vitro* (FERRÉ et al., 2017).

Após a capacitação e hiperativação o espermatozoide se encontra na ampola do oviduto para a realizar passagem pelas células do cúmulo, penetração da zona pelúcida, adesão e fusão ao ovócito, e bloqueio da polispermia. Desta forma, concluindo a fertilização (BIANCHI; WRIGHT, 2020).

A zona pelúcida do ovócito de bovinos é composta por três tipos de glicoproteínas, ZPA, ZPB e ZPC, propõem-se que ZPC e ZPB são receptores primários para ligação com espermatozoide e indução da reação acrossomal (SUTOVSKY, 2018). Com a reação acrossomal, ocorrerá a perda da membrana externa do acrossoma e a liberação da matriz acrossomal contendo enzimas (proteases), responsáveis pela degradação da zona pelúcida, com intuito de penetração da ZP e exposição de proteínas localizadas no segmento equatorial da cabeça dos espermatozoides responsáveis pela ligação com oolema (adesão e fusão) (SUTOVSKY, 2018, LEUNG et al., 2021).

Em espermatozoides bovinos as proteínas IZUMO1, SPACA6 e TMEM95 presentes na membrana celular, principalmente na região equatorial da cabeça do espermatozoide, são responsáveis pela fusão do espermatozoide com membrana plasmática do ovócito (oolema), através da interação com proteínas presentes na membrana plasmática do ovócito, como receptor JUNO, CD81 e CD9 (FUKUDA et al., 2016; DENEKE; PAULI, 2021; HERNÁNDEZ-FALCÓ et al., 2022). Após a fusão dos gametas, o ovócito liberará grânulos corticais contendo proteínas, glicosidases, lectina e zinco, que irão se fundir com a zona pelúcida, resultando em alterações estruturais visando o endurecimento e resistência da zona pelúcida à digestão proteolítica. Desta forma, levando ao bloqueio da poliespermia (FAHRENKAMP; ALGARRA; JOVINE, 2020).

No interior do citoplasma do ovócito, o núcleo espermático que estava adormecido sofre transformações que levarão a descompactação da cromatina devido a remoção de protaminas, acarretando uma estrutura acessível para atividade transcricional funcional (COLLAS; POCCIA, 1998; MCLAY; CLARKE, 2003; VAN DER HEIJDEN et al., 2008).

Para o sucesso da fertilização é necessário que reinicie o ciclo celular do ovócito adormecido e com a produção de um embrião que possua cópias funcionais dos genomas materno e paterno, o bloqueio da polispermia, conclusão da segunda divisão meiótica do ovócito e a remodelação bioquímica da cromatina do espermatozoide para formação do pro núcleo masculino (MCLARY; CLARKE, 2003).

2.5 DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO

Após a fusão dos gametas, o pró núcleo masculino e feminino ocupam o mesmo ooplasma, a cromatina paterna será submetida a remodelação e as protaminas presentes no DNA são removidas e substituídas por histonas maternas (VAN DER HEIJDEN et al., 2008). Remodelação da cromatina paterna durante a fertilização é necessária pelo fato de o DNA dos espermatozoides maduros estarem compactados e transcricionalmente inativos (MCLARY; CLARKE, 2003).

Mesmo com o grande número de protaminas presente na cromatina de espermatozoides, existe um pequeno número de histonas retidas na cromatina espermática. Estas histonas estão ligadas a genes promotores de desenvolvimento embrionário, em promotores de microRNAs, e em agrupamentos de “genomic imprinting” (NANASSY et al., 2011). Acredita-se que a retenção de histonas na cromatina paterna possui grande importância, por transmitir informações gênicas responsáveis pelo desenvolvimento embrionário (DAIGNEAULT, 2021).

A reprogramação epigenética do genoma ocorre em estágios de mudanças no potencial de desenvolvimento celular, como a ocorrência da desmetilação do DNA, que removerá a maioria das marcas epigenéticas presentes no genoma paterno e materno pós fertilização, como também no estágio de desenvolvimento embrionário pré-implantação (DAIGNEAULT, 2021). Remodelação da cromatina espermática pós fertilização é considerada como a primeira reprogramação epigenética pós fertilização, devido a substituição de protaminas por histonas de origem materna. Além disso, as histonas recém adicionadas adquirem novas modificações pós traducionais, como a metilação de histona, que será responsável pela ativação ou inibição da transcrição de genes importantes para o desenvolvimento embrionário (OKADA; YAMAGUCHI, 2017). Portanto, a reprogramação epigenética é de grande importância por garantir que alterações epigenéticas de origem parentais sejam detectadas e corrigidas com objetivo de permitir o desenvolvimento embrionário inicial, ativação do genoma embrionário e a saúde da prole ao longo da sua vida (MORGAN et al., 2005; XAVIER et al., 2019).

Após a fertilização, o desenvolvimento embrionário de mamíferos inicia-se no oviduto, onde o zigoto sofre suas primeiras divisões mitóticas enquanto progride em direção ao útero. O embrião bovino no estágio de 16 células estará presente no útero, 4 dias após a fertilização. Posteriormente, no 7 dia pós fertilização, o embrião se tornará blastocisto, com 9 a 10 dias haverá a ruptura da zona pelúcida, desse modo, formando do blastocisto eclodido. O blastocisto continuará a crescer e alterar a sua morfologia com o propósito de realizar o desenvolvimento do embrião, reconhecimento e manutenção da gestação (LONERGAN et al., 2016; BANLIAT et al., 2022).

Embrião é transcricionalmente inativo durante as primeiras divisões celulares. O seu

desenvolvimento é mantido por RNAs e proteínas pertencentes ao ovócito. No estágio de 8 células o embrião bovino ativará a o genoma embrionário (BANLIAT et al., 2022). Com a produção *in vitro* de embriões bovinos a ativação do genoma embrionário (AGE) ocorre entre os estágios de 8 a 16 células (GRAF et al., 2014). Enquanto, embriões *in vivo* foi relatado a AGE no estágio de 4 a 8 células (JIANG et al., 2014).

Subsequente a desmetilação do DNA parentais e a ativação do genoma embrionário, ocorrerá a metilação do DNA embrionário, denominado como “de novo DNA methylation”, com objetivo restabelecer padrões de metilação do genoma e aquisição da totipotência em células tronco embrionárias (XAVIER et al., 2019; KIEFER et al., 2021).

Alterações na estrutura e estabilidade da cromatina espermática interferem diretamente sobre a proteção ao DNA contra danos causados pelo estresse oxidativo, na descompactação anormal da cromatina paterna após a fertilização, incapacidade na formação do pró núcleo e alterações no desenvolvimento embrionário inicial (D’OCCHIO; HENGSTBERGER; JOHNSTON, 2007; NOBLANC et al., 2013).

Daigneault (2021) sugere que danos ao DNA que ocorrem durante a espermatogênese ou após a maturação espermática, afetará o desenvolvimento embrionário, devido a presença de anormalidades genômicas causadas por danos presentes no DNA paterno. Pois, espermatozoides são particularmente vulneráveis ao estresse oxidativo, além de ter limitada capacidade de reparo do DNA, devido ao silenciamento gênico proporcionado pela compactação da cromatina. Além disso, a alta produção de ROS interfere negativa nos padrões de metilação do DNA paterno. Desta forma, promovendo o silenciamento de genes importantes para o desenvolvimento e proteção celular (XAVIER et al., 2019). O impacto de danos ao DNA paterno sobre o desenvolvimento embrionário dependera da extensão dos danos e a capacidade do ovócito em repará-los (WYCK et al., 2018).

2.6 DANOS A CROMATINA ESPERMÁTICA

A perda de integridade no DNA espermático pode ocorrer durante a espermatogênese, espermiogênese, trânsito epididimal ou pós-ejaculação (ESTEVEZ et al., 2021). Os mecanismos responsáveis por induzir danos ao DNA espermática são: apoptose abortiva, protaminação defeituosa, microambiente epididimal defeituoso e estresse oxidativo (GUALTIERI et al., 2021).

Durante a espermiogênese a cromatina sofre alterações estruturais, visando a sua compactação, assim como proteção do genoma paterno e regulação epigenética, uma vez que a cromatina se torna transcricionalmente inerte. Desta forma, tornando a capacidade de reparo do DNA espermático limitada, levando a persistência de danos ao DNA em espermatozoides viáveis

e / ou ocorrência de apoptose abortiva (SHAMSI; IMAM; DADA, 2011; DONKIN; BARRÈS, 2018; ESTEVES et al., 2021) A consequência de alterações na cromatina espermática sobre o desenvolvimento embrionário e a presença de alterações genéticas (mutações) dependerá da gravidade do dano à cromatina espermática e a capacidade do ovócito em reparar danos do DNA após fertilização (SHAMSI, IMAM, DADA, 2011).

As células reprodutivas possuem diferentes mecanismos de reparo do DNA, como, por exemplo: reparação por excisão de nucleotídeos (NER), que corrigirá alterações que afetam dupla fita de DNA. Este mecanismo de reparo ocorre durante o desenvolvimento embrionário, impedindo que danos presentes no DNA possam levar a malformações e defeitos genéticos a prole (VAN DER WEES et al., 2007; CHATTERJEE; WALKER, 2017; GARCÍA-RODRÍGUEZ et al., 2018). O reparo de incompatibilidade (MMR) corrigirá a incompatibilidade entre bases de DNA, que ocorrem devido recombinações imperfeitas entre sequências de bases ou erros durante a replicação do DNA. Portanto, este mecanismo de reparo possui a capacidade de suprimir o aumento de alterações genômicas da célula (GUNES; AL-SADAAN; AGARWAL, 2015; LIU; KEIJZERS; RASMUSSEN, 2017).

Reparo por excisão de base (BER) realiza o reconhecimento e remoção de bases alteradas que afetam uma das fitas de DNA, não ocorrendo distorções da dupla hélice; este mecanismo de reparo está presente em células germinativas e zigotos (GUNES; AL-SADAAN; AGARWAL, 2015; GARCÍA-RODRÍGUEZ et al., 2018). O reparo por recombinação homologa (HR) e junção de extremidade não homóloga (NHEJ), são as principais vias de reparo de quebra de fita dupla de DNA. Apesar de atenderem o mesmo objetivo, existe diferença entre os mecanismos quanto a cascata de ativação e fase do ciclo celular que ocorrerá o reparo da fita de DNA (GUNES; AL-SADAAN; AGARWAL, 2015; MOURRAIN; BOISSONNEAULT, 2021).

2.7 TÉCNICAS DE ANÁLISE DE INTEGRIDADE DE CROMATINA ESPERMÁTICA

A análise clássica do sêmen bovino consiste na avaliação da concentração, motilidade e morfologia espermática, sendo utilizados como base para a análise da fertilidade, úteis principalmente a campo, por serem análises rápidas e de menor custo. Entretanto, apresentam um determinado grau de subjetividade e existe a ocorrência de casos em que os parâmetros clássicos se encontram normais, embora, exista uma redução da fertilidade de machos (BELETTI; COSTA; GUARDIEIRO, 2005; EVENSON, 2016).

É de suma importância desenvolver técnicas para diagnosticar com precisão a infertilidade masculina, para estabelecer segurança e eficiência das técnicas de reprodução assistidas, impedindo a ocorrência de anomalias embrionárias, diminuição no desenvolvimento embrionário,

alterações cromossômicas e genéticas, além de alterações epigenéticas transgeracionais. (LEFIÈVRE et al., 2007; OEHNINGER; OMBELET, 2019). Em humanos, qualquer tipo ou grau de dano ao DNA do espermatozoide possui grande impacto sobre o desempenho reprodutivo (OEHNINGER; OMBELET, 2019)

As técnicas mais utilizadas com objetivo de análise de alterações do DNA espermático são agrupadas em metodologias, dentre elas: (1) reações enzimáticas que marcam quebras da fita de DNA (TUNEL, terminal deoxynucleotidil transferase dUTP nick end labeling), (2) desnaturação induzida de DNA e/ou depleção de proteínas como intermediários para revelar as quebras de DNA (SCSA, SCD e COMET), (3) uso de corantes capazes de detectar a qualidade da condensação da cromatina espermática (coloração com azul de toluidina, teste de laranja de acridina, coloração com azul de anilina e CMA3) (RIBAS-MAYNOU; BENET, 2019; ESTEVES et al., 2021; DUTTA, HENKEL, AGARWAL, 2021,).

2.7.1 TÉCNICA DE COLORAÇÃO COM REAÇÃO DE FEULGEN (RF)

A primeira descrição da reação de Feulgen como uma técnica direcionada para estudo do DNA foi feita por Feulgen e Rossenbeck (1924), sendo fundamentada nos resultados de Schiff (1866), que analisou a influência dos reagentes sobre aminas aromáticas e aldeídos. A reação de Feulgen é uma técnica citoquímica fundamentada em duas etapas: hidrólise ácida e exposição do material hidrolisado ao reativo de Schiff (específico para aldeído e cetona) (MELLO; VIDAL 1978; MELLO; VIDAL, 2017).

A hidrólise ácida induz a desnaturação do DNA e a remoção das purinas do DNA (depurinação), resultando na exposição dos aldeídos dos resíduos de desoxirribose e sua transformação em ácido apurínico, proporcionando que os aldeídos possam reagir com reativo de Schiff. Desta forma, o núcleo celular apresentará cor magenta (vermelho-púrpura), sendo denominado com Feulgen-positivo (DI STEPHANO, 1948; FEULGEN; ROSSSENBECK, 1924; MELLO; VIDAL 1978; MELLO; VIDAL, 2017). O comportamento do DNA diante da hidrólise ácida é representado pela curva de hidrólise de Feulgen, em que temos um ramo ascendente da curva que representa o aumento gradual da duração da hidrólise ácida e, ao mesmo tempo um aumento progressivo da depurinação, que resultara no máximo valor de depurinação, sendo representado pelo pico ou platô da curva de hidrólise (MELLO; VIDAL, 2017).

Quando a hidrólise ácida ultrapassa o tempo ótimo para máxima eficiência da reação de Feulgen (curva decrescente), sucederá a liberação de pirimidinas do DNA e juntamente com degradação gradual e solubilização (despolimerização) dos ácidos apurínicos (TAMM; HODES; CHARGAFF, 1952; ANDERSSON; KJELLSTRAND, 1975, MELLO; VIDAL, 2017). As

alterações do padrão de despolimerização e depurinação do DNA são consequência do grau de interação do complexo proteína-DNA. Desta forma, as mudanças que ocorrem neste complexo e a relação entre o corante com o grupo aldeído se dará durante o processo de hidrólise. Portanto, se faz necessária aplicação do estudo da curva de hidrólise sendo utilizado como forma de compreender a resistência ácida do DNA em diferentes graus de compactação e para uma melhor resposta a reação de Feulgen (ANDERSSON; KJELLSTRAND, 1975).

Os graus de compactação da cromatina influenciarão diretamente na resposta à reação de Feulgen, mesmo que o tempo de hidrólise seja semelhante, como observado em espermatozoides de touros com infertilidade que apresentaram maior resposta à reação de Feulgen, devido ao menor grau de compactação da cromatina espermática. (GLEDHILL, 1966; GLEDHILL et al., 1966; MELLO; VIDAL, 1978).

Além do nível de compactação da cromatina, outros fatores possuem influência sobre a resposta da reação de Feulgen, sendo elas: (1) método de fixação utilizado, o qual atuará sobre o complexo proteína-DNA, influenciando na capacidade de exposição de purinas do DNA à hidrólise ácida, como também na velocidade de dissociação e solubilização das porções da molécula do ácido apurínico durante a hidrólise ácida. Portanto, o fixador utilizado interferirá no tempo de hidrólise e na intensidade da coloração (ANDERSSON; KJELLSTRAND, 1975; MELLO; ZANARDI, 1976a, 1976b; SILVA; MELLO, 1986); (2) concentração, temperatura e o tempo de hidrólise ácida altos induzirá a despolimerização do ácido apurínico. Portanto, ocorrendo a perda dos grupos aldeídos capazes de se ligarem com as moléculas do reativo de Schiff (MELLO; VIDAL, 1978, MELLO; VIDAL, 2017); (3) alterações durante a preparação do reativo de Schiff, devido à ausência de SO₂, valores extremos de pH e alterações nos componentes da fucsina básica (MELLO; VIDAL, 1978; MELLO; VIDAL, 2017).

2.7.2 TÉCNICA DE COLORAÇÃO COM AZUL DE TOLUDINA (AT)

Toluidina azul (AT) é um corante tiazínico catiônico amplamente usado como um corante biológico, sendo descoberto por William Perkin em 1856, e se transformando em uma ferramenta de grande relevância para detectar mudanças na cromatina (VIDAL; MELLO, 2019). O método de coloração por azul de toluidina (TB) em espermatozoides de touros baseia-se na ocorrência da “metacromasia induzida” postulada por MELLO (1982), que se apoia no uso da hidrólise ácida prévia a coloração com AT, por 15- 20 min a 25 °C em HCl 4N, sendo avaliada a capacidade das moléculas do corante de se ligarem aos grupos fosfatos do DNA. Além do uso da hidrólise ácida, é de extrema importância que a solução AT esteja em pH 4, uma vez que o pH 4 garantirá que apenas os grupos fosfatos sejam ionizados (BELETTI; COSTA; GUARDIEIRO, 2005).

Espermatozoides de touro com a cromatina pouco compactada e corados com AT terão maior número de moléculas de corante ligadas aos grupos fosfatos do DNA, o que resultara em cabeças de espermatozoide apresentando coloração azul escuro a magenta (metacromático). No entanto, somente em espermatozoides que apresentam alterações acentuadas em sua cromatina podem ser analisados por esse método de coloração. Portanto, a presença ou ausência de metacromasia é dependente da presença de protaminas ligadas a dupla fita de DNA e estabilidade da cromatina. (BELETI, 2013; MELLO, 1982; VIDAL; MELLO, 2019). Desta forma, metacromasia induzida por ácido é sugerida como uma forma de diagnóstico da infertilidade no touro (MELLO, 1982).

Em espermatozoides com alterações da cromatina ocorrerá aparecimento da coloração azul escuro a magenta (metacromasia), em contrapartida, em cromatina com menor grau de descompactação terá menor número de moléculas de AT ligadas ao grupo fosfato livre do DNA, resultando em uma coloração que varia de verde a azul claro (BELETTI; MELLO, 1996; BELETTI; COSTA; GUARDIEIRO, 2005)

2.7.3 TÉCNICA DE COLORAÇÃO COM LARANJA DE ACRIDINA (LA)

O laranja de acridina (LA) é uma molécula aromática catiônico que apresenta seletividade pelo grupamento fosfato dos ácidos nucleicos (VARGHESE; FISCHER-HAMMADEH; HAMMADEH, 2011; ERENPREISA et al., 2018). LA possui propriedade metacromático, devido a sua mudança de fluorescência (espectro de emissão) quando ligada e diferentes substratos (DARZYNKIEWICZ, 1990).

Quando a molécula de LA estiver ligada ao DNA de fita dupla se comportará como um monômero, através da intercalação entre fitas de DNA, gerando fluorescência verde. Entretanto, quando LA estiver ligado ao DNA de fita simples (desnaturado) apresentará fluorescência vermelha, por meio de agregação com a fita simples do DNA, como também interação corante-corante. Desta forma, permitindo uma dimerização coplanar da molécula de LA (VARGHESE; FISCHER-HAMMADEH; HAMMADEH, 2011; ERENPREISA et al., 2018).

Técnica de coloração com LA avalia estabilidade de cromatina espermática, através da suscetibilidade de DNA nuclear do espermatozoide à desnaturação induzida por hidrólise ácida *in situ*, em seguida é realizado a quantificação da incidência de Fluorescência verde (DNA estável) e vermelho (DNA desnaturado, alteração da integridade da cromatina) (TEJADA et al., 1984; VARGHESE; FISCHER-HAMMADEH; HAMMADEH, 2011).

Cabeças de espermatozoides que apresentam alteração na integridade de cromatina terão fluorescência que poderá variar de laranja a amarelo, devido à sobreposição da fluorescência verde

e vermelho de áreas distribuídas irregularmente dentro da cabeça do espermatozoide (TEJADA et al., 1984; MOHAMMED et al., 2015).

O Método de coloração com laranja de acridina foi desenvolvido por Tejada et al. (1984), sendo caracterizado como método simples de estudo sobre a heterogeneidade da cromatina da cabeça do espermatozoide e avaliação sua resistência a agentes desnaturantes. Esta técnica possui diferentes aplicações, tais como: avaliação de controle de qualidade de sêmen de banco genético, uma ferramenta para diagnóstico diferencial para paciente com baixa fertilidade, avaliação do potencial de fertilização de indivíduo direcionados para fertilização *in vitro* e como uma ferramenta para compreensão dos tipos de infertilidades causadas por alterações na cromatina espermática (TEJADA et al., 1984).

2.7.4 ENSAIO DE ESTRUTURA DE CROMATINA ESPERMÁTICA (SCSA)

O ensaio de estrutura de cromatina espermática (SCSA®) foi descrito pela primeira vez por Evenson, Darzynkiewicz e Melamed (1980), que utilizou a desnaturação ácida e a citometria de fluxo como plataforma de análise da instabilidade da cromatina espermática. Diferentes de outros testes de fragmentação de DNA, o SCSA apresenta apenas um protocolo de execução que é aceito internacionalmente. Este ensaio possui a função de medir tanto a fragmentação do DNA do esperma (sDF) quanto estrutura anormal da cromatina, por meio da desnaturação ácida induzida *in situ* (EVENSON; LARSON; JOST., 2002; EVENSON, 2016).

SCSA utiliza das propriedades metacromáticas da laranja de acridina para avaliar a suscetibilidade do DNA espermático à desnaturação ácida (pH 1,2 por 30 s) *in situ*, seguido de coloração com LA. O SCSA é capaz de avaliar 1.024 canais discretos de fluorescência vermelha e verde, por meio da citometria de fluxo (DARZYNKIEWICZ et al., 1975; EVENSON et al., 1985; EVENSON et al., 1999; CORDELLI et al., 2005; VARGHESE; FISCHER-HAMMADEH; HAMMADEH, 2011).

A citometria de fluxo (CMF) é capaz de analisar simultaneamente atributos importantes e múltiplos do espermatozoide, como a viabilidade, estabilidade do DNA, integridade acrossomal e função mitocondrial. Portanto, este método se torna uma ferramenta útil para avaliar o potencial de fertilidade de um indivíduo, pela capacidade de medir diferentes fluorescências associadas a uma mesma célula, além de possuir grande sensibilidade, exatidão, rapidez na obtenção de resultados e um número estatisticamente satisfatório de células (CORDELLI et al., 2005).

Por meio da CMF é possível determinar a % HDS (população de espermatozoides com DNA apresentando alta fluorescência verde), o aumento de HDS se deve a deficiência de protaminas ligadas ao DNA, conseqüentemente, um grande número de histonas retidas ao DNA,

esta condição é característica de células espermáticas imaturas (EVENSON et al., 1999; EVENSON et al., 2000; EVENSON, 2016). Também é possível determinar sDF (quebras nas fitas de DNA nuclear) que são classificadas como (1) quebras de fita simples, afetando uma fita de DNA, enquanto seu molde permanece intacto, (2) quebra de fita dupla, ambas as fitas de DNA são afetadas, resultando em um potencial perda/alteração da informação genética (EVENSON, 2016; ESTEVES et al., 2021).

2.7.5 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO

Microscopia eletrônica de transmissão é uma técnica de microscopia na qual a transmissão de feixes de elétrons através do espécime forma a imagem eletromicrográfica (TIZRO; CHOI; KHANLOU, 2019). As primeiras aplicações do microscópio eletrônico para análise de material biológico ocorreram em 1934. desde então se tornou possível gerar imagens de células e tecidos em resoluções superiores a da microscopia de luz (MARTON, 1976)

A microscopia eletrônica de transmissão (MET) é um dispositivo ideal para estudar a ultraestrutura de células e diferentes tipos de materiais biológicos, sendo considerado a melhor técnica de identificação de patologias espermáticas e caracterização de defeitos ultraestruturais de acrossoma, núcleo, cromatina, peça intermediária, mitocôndria, estruturas axonêmicas e peraxonemais de espermatozoides, uma vez que estes defeitos possuem influência sobre o potencial fertilizante (MORETTI; SUTERA; COLLODEL, 2016; COLLODEL et al., 2021).

Com a utilização da MET em espermatozoides bovinos foi possível analisar a ultraestrutura da peça intermediária (BAHR; ENGLER, 1970), caracterização ultraestruturais de lesões acrossômicas (OLIVEIRA et al., 2011) e visualização de estruturas toroidais presentes na cromatina (FILHO; BELETTI; DE OLIVEIRA, 2015). Além disso, foi possível identificar e classificar em 5 categorias de alterações presentes na cromatina de espermatozoides bovinos (ALVES, 2016)

Apesar da grande eficiência no estudo sobre material biológico, apenas informações “estáticas” são obtidas, pois, à fixação físico-química e incorporação de resina na amostra impossibilita estudos dinâmicos. Portanto, é necessário estabelecer procedimentos de preparação adequados para combinar a preservação estrutural e/ou molecular com a qualidade de resolução da micrografia eletrônica (MALATESTA, 2021).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS DE SÊMEN

Este estudo foi aprovado pela Comissão de Ética na Utilização de Animais da Universidade Federal de Uberlândia, CEUA/UFU 002/17.

Foram utilizadas amostras de sêmen congeladas em meio TRIS-gema de quatro touros (*Bos taurus*) Girolandos com diferentes graus de fertilidade. Essas amostras de touros criados a pasto e inicialmente com fertilidade desconhecida foram obtidas por uso de vagina artificial e congeladas em meio TRIS-gema automaticamente no equipamento da TK (Uberaba, MG, Brasil) modelo 3000 Compacta, utilizando-se a curva de congelamento P2S1. Em seguida, as palhetas de 500 µL contendo 40.000.000 de espermatozoides moveis, foram armazenadas a -196°C em nitrogênio líquido. Por meio de rotinas de PIVE foi verificado que as quatro amostras possuíam diferentes desempenhos na produção de blastocistos. Apesar de não ter uma relação direta e absoluta com o desempenho de touros a campo, geralmente existe uma correlação entre a eficiência na PIVE e fertilidade do touro a campo (UTT, 2016).

Amostras de uma única partida de sêmen de cada touro foi utilizada para realização de rotinas de produção *in vitro* de embriões, e para avaliação da compactação da cromatina utilizando-se todas as metodologias avaliadas no presente estudo.

3.2 PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES (PIVEs)

Foram realizadas 13 rotinas de produção *in vitro* de embriões de acordo com o protocolo do laboratório de Biologia da Reprodução da Universidade Federal de Uberlândia, modificado de Lucio et al. (2016). Utilizou-se 419 ovócitos em PIVEs para os touros considerados férteis (215 para o touro 2 e 204 para o touro 3) e 336 em PIVEs para os touros considerados subférteis (181 para o touro 1 e 155 para o touro 4).

Os dados obtidos utilizando sêmen testado foram normalizados tendo como referência os resultados obtidos com um touro fértil, previamente testado em nossos laboratórios e com resultados bastante estáveis. Tal ação foi realizada como forma de neutralização das variáveis da PIVE que não são controláveis. Para isso, em todas as placas onde foram realizadas as rotinas de PIVE utilizando as amostras de sêmen do experimento, também foram realizadas PIVEs utilizando sêmen deste touro referência (510 ovócitos). Para a normalização, as taxas de clivagem e de blastocisto das amostras testadas foram transformadas em porcentagem das taxas obtidas com o sêmen do touro referência, na mesma rotina de PIVE.

Foram realizadas coletas de ovários provenientes de vacas *post mortem* no abatedouro comercial de inspeção municipal da cidade de Uberlândia e transportados para o laboratório de biologia da reprodução em garrafa térmica contendo soro fisiológico na temperatura de 37°C. Logo em seguida, os ovários foram lavados em solução fisiológica e ainda mantidos em banho-maria a 37°C até aspiração dos folículos antrais, com auxílio de seringa de 10mL e agulha 18G. O fluido ovariano foi cuidadosamente inserido em tubos de 50mL para que as estruturas sedimentassem. O sedimento analisado com auxílio de microscópio estereoscópico para rastreamento e seleção de complexos ovócitos cúmulo (COCs). Os COCs foram recuperados e classificados morfológicamente de acordo com a homogeneidade e coloração do citoplasma, número de camadas e aspecto das células do cúmulo em viáveis (qualidade 1 e 2) e não viáveis (qualidade 3 e 4) (STOJKOVIC et al., 2001). Apenas ovócitos classificados como grau 1 e 2 foram utilizados no sistema de produção *in vitro* de embriões. Os ovócitos foram lavados em meio TCM – 199 HEPES (0,2 mM piruvato sódico, 10 mM HEPES ácido, 10 mM de HEPES sódico, 5 mM bicarbonato de sódio, 83 µg/mL de amicacina, suplementado com 10% de soro fetal bovino) e uma vez em meio de maturação TCM 199 com bicarbonato (0,2 mM piruvato sódico, 26 mM bicarbonato de sódio, 83 µg/mL de amicacina, 1 µg/mL FSH, 5 µg/mL LH, suplementado com 10% de soro fetal bovino). Foram transferidos 20 ovócitos por gota de 100 µL de meio de maturação, cobertas com óleo mineral em placas de petri de poliestireno de 60 x 15 mm, e foram mantidos por cerca de 22 h em estufa a 38,5°C, 100% de umidade e atmosfera de 5% de CO₂ em ar.

Após maturação, os ovócitos foram lavados três vezes em meio Fert-TALP e foram transferidos para gotas de 100 µL, do mesmo meio, cobertas com óleo mineral em placas de petri de poliestireno de 60 x 15 mm. Gotas foram distribuídas aleatoriamente a fim de compor os grupos experimentais: touros do experimento e o touro de referência da fertilização *in vitro* (FIV).

Previamente a Fertilização *in vitro*, foi realizada a seleção espermática por gradiente de Percoll, com objetivo de selecionar os espermatozoides viáveis. Uma dose de sêmen foi descongelada em banho maria a 37°C por 30 segundos e foi depositada sobre um gradiente de Percoll, preparado previamente em um tubo Falcon de 15 mL, composto pela camada superior de 1 mL de Percoll 45% (500 µL de Percoll 90% e 500 µL de meio TALP- Sperm (Tyrode-albumina-lactato-piruvato, acrescido de 0,2 mM piruvato sódico e 83 µg/mL amicacina)) e a camada inferior de 1 mL de Percoll 90% (Percoll, solução 10x, solução estoque 2mM CaCl₂, solução estoque 0,4 mM MgCl₂, 0,1 mM DL-ácido láctico e 20 mM bicarbonato de sódio). Após a montagem do gradiente de Percoll, foi depositado o conteúdo das palhetas (500 µL) no tubo Falcon de 15 ml contendo gradiente de Percoll (45%/90%) e centrifugado por 30 minutos a 900 x G. Do sedimento resultante da seleção por gradiente de Percoll, foram retiradas duas alíquotas de 5 µL para

determinar a motilidade progressiva e a concentração em câmara de Neubauer. A concentração foi ajustada para 25 mil espermatozoides viáveis/ μL e então 8 μL foram utilizados para fecundar cada gota, em seguida, foram incubados por 18 a 20 h em atmosfera de 5% de CO_2 em ar, na temperatura de $38,5^\circ$ e 100% de umidade.

Aproximadamente 24 horas após a fertilização *in vitro*, os prováveis zigotos foram desnudados mecanicamente por pipetações sucessivas e foram lavados por 3 vezes em gotas de 100 μL de meio SOF (acrescido de 0,2 mM piruvato sódico, 5 mg/mL BSA, 2,5% de soro fetal bovino e 83 $\mu\text{g/mL}$ de sulfato de amicacina) e transferidos para gotas de 100 μL do mesmo meio e cobertas com óleo mineral em placas de poliestireno de 60 x 15 mm, onde foram cultivados por 6 dias em estufa, com atmosfera de 5% de CO_2 , 100% de umidade e temperatura de $38,5^\circ\text{C}$.

A taxa de clivagem foi determinada 48 horas após a fertilização *in vitro* por meio de contagem dos zigotos que apresentavam duas ou mais células com o auxílio de microscópio estereoscópico. Após o sétimo dia de fertilização a taxa de blastocisto foi determinada e calculada a partir da contagem da quantidade de embriões que alcançaram esse estágio de desenvolvimento e o número de ovócitos que iniciaram a clivagem.

3.3 CONFECÇÃO DAS LÂMINAS

Foi utilizada uma palheta por touro para realização de esfregaços, após descongelamento em água a 37°C por 30 segundos e seleção por gradiente de Percoll, pois, no processo de fertilização *in vitro* (FIV) são utilizadas apenas amostras que passam pela seleção por Percoll. Desse modo, foram avaliados realmente aqueles espermatozoides que participaram do processo de fertilização *in vitro* e não todos os espermatozoides da amostra de sêmen, o que possibilitou a compreensão de como as alterações da cromatina interferem na capacidade fertilizante do espermatozoide e no desenvolvimento embrionário inicial.

Para a seleção por gradiente de Percoll (45%/90%), foi depositado em um tubo de 15 ml, 500 μL de TALP-sperm (Tyrode-albumina-lactato-piruvato, acrescido de 0,2 mM piruvato sódico e 83 $\mu\text{g/mL}$ amicacina) e 500 μL de solução de Percoll 90% (Percoll, solução 10x, solução estoque 2mM CaCl_2 , solução estoque 0,4 mM MgCl_2 , 0,1 mM DL-ácido láctico e 20 mM bicarbonato de sódio), formando assim, a camada de Percoll 45%. Abaixo da camada de Percoll 45%, foi colocado 1 ml de solução Percoll 90%. Após a montagem do gradiente de Percoll, foi depositado o conteúdo das palhetas (500 μL) no tubo Falcon de 15 ml contendo gradiente de Percoll (45%/90%) e centrifugado por 30 minutos a 900 x G. O sedimento foi retirado do gradiente de Percoll e colocado em um microtubo de 2 ml, a amostra foi ressuspensa e lavada 3 x com 500 μL de Talp-sperm por centrifugação em 1300 x G por 5 minutos. Após a última lavagem o pellet

contendo espermatozoide foi suspenso com um volume de no máximo 150 µl, seguido de homogeneização. Foi então pipetado um volume de 10 µl para realização do esfregaço, sendo preparado três esfregaços por técnica microscópica, totalizando 9 esfregaços por touro.

Após a preparação dos esfregaços, foi realizada a fixação mergulhando-os em solução contendo etanol-ácido acético em uma proporção de 3:1 (fixador de Carnoy), permanecendo nesta solução por 1 minuto, seguida de lavagem do esfregaço em etanol 70% por 3 minutos (BELETTI; MELLO, 1996).

3.4 TÉCNICA DE COLORAÇÃO COM AZUL DE TOLUIDINA (AT)

Após a fixação, foi realizada a hidrólise ácida em HCl 4 N à temperatura ambiente por 25 minutos, seguida de lavagem em água destilada e secagem das lâminas em temperatura ambiente.

Conforme o protocolo descrito por Beletti e Mello (2004), após a secagem da lâmina, duas gotas de azul de toluidina 0,025% em tampão McIlvaine (citrato-fosfato de sódio) pH 4 foi depositada sobre a lâmina e coberta com lamínula. Em seguida foi depositado esmalte preto em torno do espaço entre a lamínula e a lâmina, com objetivo de vedar e impedir que corante secasse rapidamente, possibilitando que a lâmina fosse analisada após algum tempo.

Por meio do microscópio Olympus EX51 contendo câmera Olympus DP70, utilizando-se a objetiva de imersão de 100 x e optovar (lente intermediária) de 2 x, foram capturadas aproximadamente 200 imagens de cada esfregaço. Também foi realizada análise visual (subjetiva) de células normais (azul claro a verde) e com descompactação de cromatina (azul escuro a magenta), contabilizando um total de 200 células por esfregaço.

3.5 TÉCNICA DE COLORAÇÃO COM REAÇÃO DE FEULGEN (RF)

Após a fixação, foi realizada a hidrólise ácida em HCl 4 N a temperatura ambiente por 45 minutos. Conforme Silva e Mello (1986), para padronização da hidrólise ácida foi realizada previamente o teste de cinética de hidrólise. Esse teste baseia-se na avaliação da depuração diante da hidrólise ácida em uma determinada concentração de HCl e em diferentes períodos de incubação, com objetivo de compreender a resistência ácida do DNA em diferentes graus de compactação e para uma melhor resposta a reação de Feulgen.

O teste foi realizado em durações diferentes para hidrólise ácida, e com mesma concentração de HCl 4 N, iniciando com 30, seguido de 45, 60, 75 e 90 minutos em temperatura ambiente. Por meio da análise visual das lâminas, observou que com incubação de 45 minutos de HCl obtivemos a máxima eficiência da reação de Feulgen.

Posterior a hidrólise ácida as lâminas foram lavadas 10 vezes em água, em seguida, colocadas dentro de recipiente onde as lâminas foram coradas por reagente de Schiff. Utilizando uma pipeta Pasteur foi gotejado o reagente de Schiff sobre a lâmina até cobrir toda a superfície do esfregaço, a incubação no reagente de Schiff foi de 60 minutos em temperatura ambiente.

Em seguida foi realizado banhos de desidratação em álcool 70%, 85%, 95%, absoluto I, II, e III, por 3 minutos cada. Posteriormente foram realizados banhos de Xilol I, II e III, por 3 minutos cada. A montagem da lâmina foi realizada com Entellan, por meio da deposição duas gotas sobre a lâmina e posteriormente foi colocado a lamínula sobre o esfregaço. Movimentos delicados foram aplicados sobre a lamínula, com objetivo de retirar bolhas e distribuir de forma homogênea o Entellan.

Por meio de microscopia Olympus EX51 contendo câmera Olympus DP70, utilizando-se a objetiva de imersão de 100 x e optovar (lente intermediária) de 2 x, foram capturadas aproximadamente 200 imagens de cada esfregaço. Também foi realizada análise visual (subjetiva) de células normais (coradas mais fracamente) e com descompactação da cromatina (coradas mais intensamente), contabilizando um total de 200 células por esfregaço.

3.6 TÉCNICA DE COLORAÇÃO COM LARANJA DE ACRIDINA (LA)

O protocolo para teste de fluorescência com laranja de acridina foi realizado conforme descrito por Tejada et al. (1984), contendo modificações. Após a fixação, foi realizado a hidrólise ácida dos esfregaços adaptado de Beletti e Mello (1996). Para padronização da hidrólise ácida foi realizada previamente o teste de cinética de hidrólise. Este teste é fundamentado na avaliação da eficácia da hidrólise ácida em uma determinada concentração de HCl e período de incubação, com objetivo compreender a resistência ácida do DNA em diferentes graus de compactação e para uma melhor resposta com laranja de acridina. Como resultado do teste de cinética de hidrólise foi utilizado HCL 4 N a temperatura ambiente por 5 minutos. Em seguida as lâminas foram lavadas em água destilada e secas em temperatura ambiente.

As lâminas foram levadas para ambiente escuro para ser realizada a coloração, adaptado de Evenson e Jost (2000), os esfregaços foram corados com solução de LA (ácido cítrico 0,1 M, Na₂HPO₄ 0,2 M, EDTA 0,001 M, NaCl 0,15 M, estoque LA 6 µg/mL em água destilada pH 6), depositando-se 3 a 5 ml da solução sobre a superfície da lâmina e incubando por 5 minutos.

Em seguida, os esfregaços foram delicadamente lavados por 5 minutos em água destilada. Este procedimento foi realizado por três vezes. Antes que a superfície da lâmina pudesse estar seca, foi depositado duas gotas de glicerol sobre a lâmina e uma lamínula foi colocada sobre ela. Um papel toalha foi colocada sobre a lâmina montada e o excesso de glicerol foi retirado. A

lamínula foi então selada com esmalte de unha.

As lâminas foram avaliadas no mesmo dia em um microscópio confocal de varredura a laser invertido (ZEISS - LSM 510 Meta, Axiovert 200M), utilizando o software Zen Lite (Zeiss), com objetiva de imersão de 63 x, laser 488 nm, filtro de emissão para pseudocor verde com intervalo de comprimento de onda 499 - 563 nm, filtro de emissão da pseudocor vermelha com intervalo de comprimento de onda 574 - 681 nm. Foram capturadas imagens digitais de aproximadamente 150 cabeças de espermatozoides por esfregaço. Cabeças de espermatozoides que representavam a presença de alterações na estabilidade da cromatina, eram identificadas por observação visual de maior intensidade da pseudocor vermelha apresentada pelas cabeças de espermatozoides (Figura 2), foi calculada a porcentagem de cabeças apresentando DNA desnaturado por touro.

Também foi realizada avaliação visual (subjetiva) por microscopia de fluorescência das cabeças dos espermatozoides corados com LA, totalizando 150 cabeças por esfregaço, conforme descrito por Mohammed et al. (2015) e Tejada et al. (1984). A técnica de laranja de acridina possui correlação direta com a estabilidade da cromatina, apresentando fluorescência verde (DNA estável) e amarelo ou laranja (DNA desnaturado, sobreposição do vermelho sobre o verde), desta forma, contabilizamos o número de cabeças de espermatozoides apresentando fluorescência amarela ou laranja. Essa avaliação também foi realizada no microscópio Zeiss Axiovert 200M, o mesmo acoplado ao sistema confocal. No entanto, a avaliação foi realizada com a lâmpada de mercúrio (HbO) presente no microscópio e filtro de excitação azul.

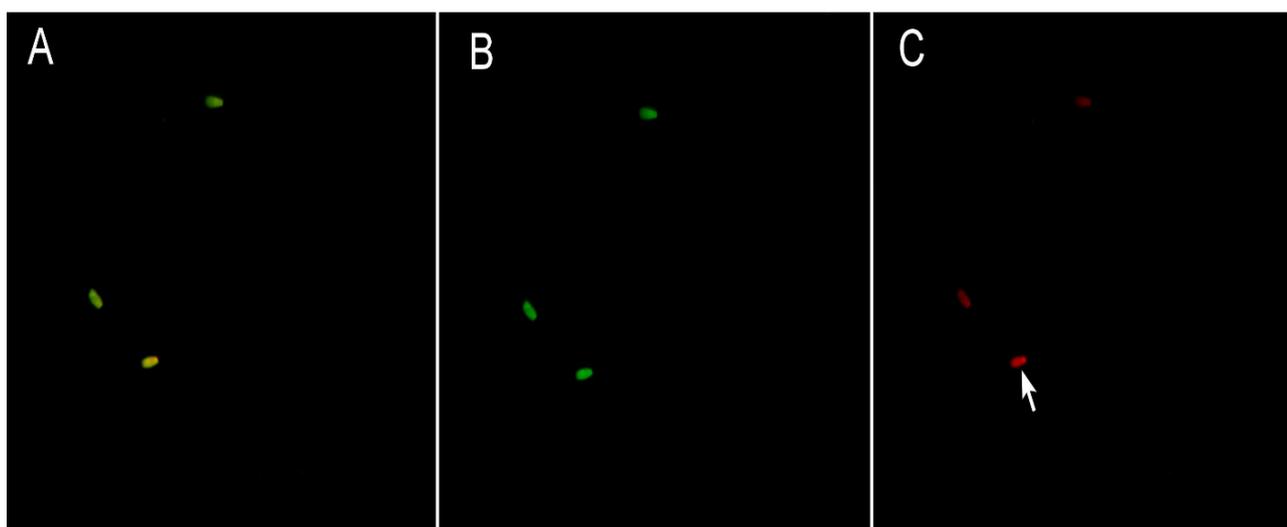


Figura 2. Micrografias de espermatozoides submetidos a técnica de laranja de acridina, capturadas por microscopia confocal de varredura a laser. (A) Cabeças de espermatozoides apresentando sobreposição das pseudocores verde e vermelha; (B) cabeças de espermatozoides apresentando pseudocor verde; (C) cabeças de espermatozoides apresentando pseudocor vermelha. Seta branca: cabeça de espermatozoide com DNA desnaturado.

3.7 ENSAIO DE ESTRUTURA DA CROMATINA ESPERMÁTICA (SCSA)

Palhetas de sêmen foram descongeladas a 37°C por 30 segundos, e o conteúdo foi depositado em um microtubo de 2 ml. As amostras do sêmen foram ressuspensa em 500 µl de PBS e centrifugadas a 1300 x G por cinco minutos. Esse procedimento foi repetido três vezes

O ensaio de estrutura da cromatina espermática foi baseado na descrição de Evenson e Jost (2000), contendo modificações. Após a última lavagem o pellet foi diluído em 150 µL de tampão TNE (Tris-HCl 0,01 M, NaCl 0,15 M, EDTA 1 mM e água destilada, pH 7,4). Essa mistura foi dividida em três alíquotas de 50 µL que foram depositadas em 3 microtubo de 2 ml, com objetivo de realizar três tratamentos, sendo os quais: protocolo padrão, controle negativo e positivo.

Para o protocolo padrão foi adicionado 50 µL de detergente ácido (HCl 0,08 M, NaCl 0,15 M, Triton X-100 0,1% em água destilada, pH 1,2). Após 30 segundos, 150 µL de LA tamponado foi adicionado (ácido cítrico 0,1 M, Na₂HPO₄ 0,2 M, EDTA 0,001 M, NaCl 0,15 M, estoque LA 6 µg/mL em água destilada pH 6), e 3 min após a adição do detergente ácido a amostra foi analisada.

Para o controle negativo, não foi adicionado detergente ácido, portanto, foi adicionado apenas 200 µL de LA tamponado e após dois minutos e meio a amostra foi analisada. O controle positivo foi realizado conforme descrito Castro et al. (2018), por meio da adição de 50 µL detergente ácido (1,2 M HCl, NaCl 0,15 M, Triton X-100 0,1% em água destilada, pH 0,1), incubado por 5 minutos, com objetivo de causar a desnaturação de 100% das células espermáticas e em seguida foi adicionado 150 µL de LA tamponado. Após 2 minutos e meio a amostra foi analisada.

O ensaio de estabilidade da cromatina foi avaliado usando a citometria de fluxo Cytotflex (Beckman Coulter; Fullerton, CA, USA). As amostras foram excitadas com laser de argônio a 488 nm, utilizada a plataforma Cytexpert para aquisição e para análise, a plataforma Cytotflex.

Após a amostra ser lida no equipamento, um gráfico (pseudo color plot) será gerado. Cada ponto no gráfico é considerado um evento, os quais na sua maioria são espermatozoides, mas alguns são debris celulares, células somáticas e outras “partículas”.

Por meio da medição da dispersão da luz visível em direções diferentes é possível a identificar a complexidade interna do “evento” “*side scatter*” (SSC) e o tamanho do “evento” “*forward scatter*” (FSC), indicando a complexidade interna ou granularidade da célula, respectivamente (MCKINNON, 2018).

Visualizando o “pseudo color plot” foi delimitada uma área (“gate”) onde teoricamente estariam os espermatozoides. Dessa forma, nas análises da fluorescência seria avaliado apenas os eventos no interior do “gate”, ou seja, somente os espermatozoides (figura 3).

Após esta etapa, foi criado outro “pseudo color plot” apenas com os eventos do “gate” inicial, com a intensidade de fluorescência verde no eixo Y e intensidade de fluorescência vermelha no eixo X. Nesse “pseudo color plot” deveria surgir agrupamentos de eventos que representariam diferentes populações de espermatozoides que representariam diferentes níveis de integridade do DNA. Delimitando com novos “gates” cada uma dessas populações, seria possível quantificar o número de espermatozoides com DNA íntegro e o número de espermatozoides com DNA desnaturado (figura 3).

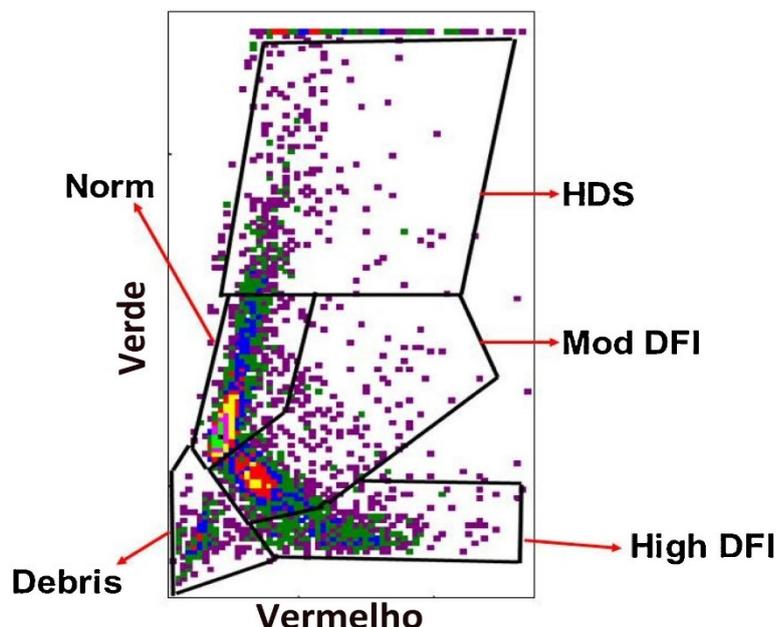


Figura 3. “Pseudo color plot” de SCSA de espermatozoides humanos, demonstrando diferentes “gates”. (Norm) população de espermatozoides normais; (Mod DFI) população de espermatozoides com fragmentação de cromatina moderada; (High DFI) população de espermatozoides com alta fragmentação de DNA; (HDS) população de espermatozoides com alta fluorescência em verde do DNA, espermatozoide imaturos; (Debris) debris celulares. (modificado de Evenson, 2016).

3.8 ANÁLISE DE ALTERAÇÕES DE CROMATINA ESPERMÁTICA POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO (MET)

Para cada amostra de sêmen, após o descongelamento de quatro palhetas (0,5 mL) de sêmen contendo aproximadamente 40.000.000 de espermatozoides cada, o conteúdo foi colocado em um microtubo de fundo cônico de 2 mL contendo 500 µL de solução de glutaraldeído 2,5%, em tampão fosfato a 0,1 M (pH 7,4), incubado por 2 horas.

Posteriormente, foi realizado a lavagem da amostra contida no microtubo, com objetivo de remover os fixadores presentes na amostra. O protocolo de lavagem consistiu em centrifugação a 70 x G durante 5 minutos, o sobrenadante era descartado e o pellet ressuspenso com solução tampão fosfato pH 7,4; este protocolo de lavagem foi realizada por três vezes. Após a última lavagem foi adicionado aos microtubos 500 µL de solução de tetróxido de ósmio a 1%, por 30

minutos. O microtubo foi novamente submetido a centrifugação a 70 x G por 5 minutos e o sobrenadante descartado.

Em seguida foi realizada a retirada do tetróxido de ósmio de forma semelhante ao que foi feito para retirada do glutaraldeído. Após a última lavagem, adicionou-se ágar 3% a 50°C ao precipitado de células e misturado de forma a introduzir o ágar entre as células, mas mantendo-as no fundo do microtubo. Este foi levado à geladeira (4°C) até a solidificação do ágar.

Ao retirar o material incluído em ágar do microtubo, este foi partido em fragmentos de 1 mm³. Os fragmentos foram colocados em frascos de vidro e desidratados em banhos de 5 minutos em solução de concentrações crescentes de álcool (50%, 70%, 80%, 90% e 95%) e depois três banhos de 10 minutos cada em álcool 100%.

Ao final da última etapa de desidratação o álcool 100 % é descartado e realizado três banhos de 10 minutos em óxido de propileno. E em seguida foi adicionado solução contendo 1 porção de óxido de propileno para 1 porção de resina Epon EMS (Electron Microscopy Sciences, Hatfield, PA, UK) e o frasco de vidro foi tampado, permanecendo assim por 12 horas em temperatura ambiente. Após este período, os frascos foram destampados e colocados em estufa à temperatura de 37 °C por 4 horas. Então, a solução 1:1 de óxido de propileno e resina foi retirada e resina pura foi colocada.

Os fracos contêm apenas Epon puro foram novamente colocados em estufa à temperatura de 37 °C por mais 4 horas. Em seguida a resina foi novamente retirada dos frascos e cada fragmento do material colocado em uma forma de silicone e identificado. Foi adicionado nova solução de resina Epon até completar a forma e colocada em estufa à temperatura de 60 ° C por pelo menos 72 horas para cura (polimerização) da resina Epon.

Após solidificação (polimerização) na estufa, os blocos foram retirados das formas e o material foi cortado com ultramicrotomo Reichert-Jung (Leica Microsystems Inc., Buffalo Grove, IL, EUA) e os cortes, entre 60 e 90 nm de espessura, foram colocados em telas (grids) de cobre e contrastados com acetato de uranila e citrato de chumbo, conforme descrito por Bozzola e Russel (1998). Os cortes foram analisados e documentados fotograficamente em microscópio eletrônico Hitachi HT 7700, e imagens digitais de cabeças de espermatozoides foram obtidas.

Para a avaliação das cabeças dos espermatozoides de cada amostra, foram contabilizados o mínimo de 100 cabeças por amostra, desta forma foi possível calcular a porcentagem de ocorrências de modificações na cromatina espermática, seguindo critério de classificação modificado de Alves (2016). Assim, cada cabeça de espermatozoide das imagens capturadas foi classificada em um dos seguintes graus:

G1 – Presença de até 3 pequenos pontos claros na cromatina.

G2– Presença de até 6 pequenos pontos claros ou região mais clara ocupando até ¼ da

Cabeça.

G3 – Presença de vários pontos claros (acima de 6) ou região mais clara ocupando até metade da cabeça.

G4 – Acima da metade da área nuclear mais clara ou grandes regiões totalmente claras.

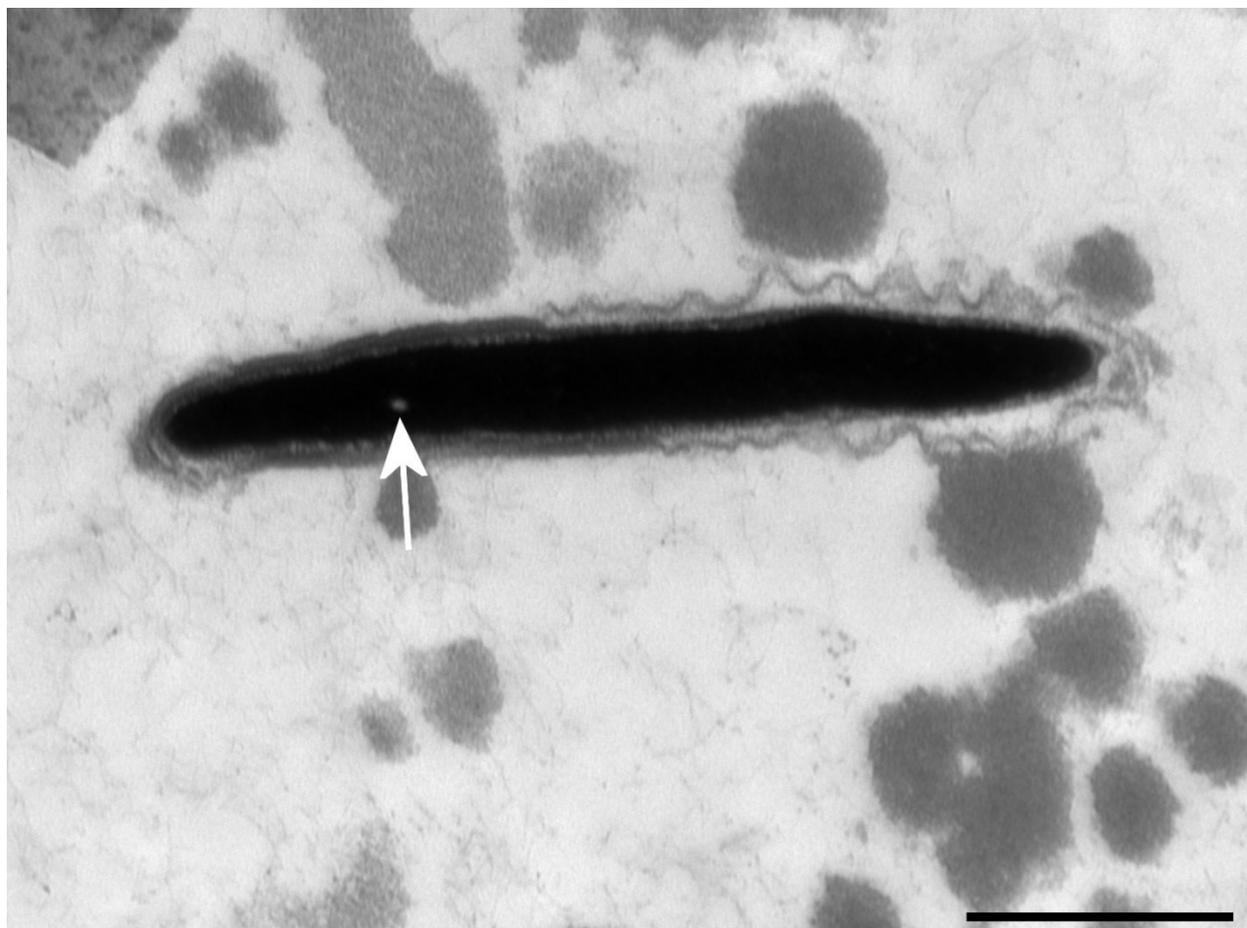


Figura 4. Micrografias eletrônicas de cabeças de espermatozoides bovinos, observando-se alteração de cromatina grau G1, caracterizando-se pela presença de até 3 pequenos pontos claros na cromatina (seta branca). Barra de escala 1 μ m.

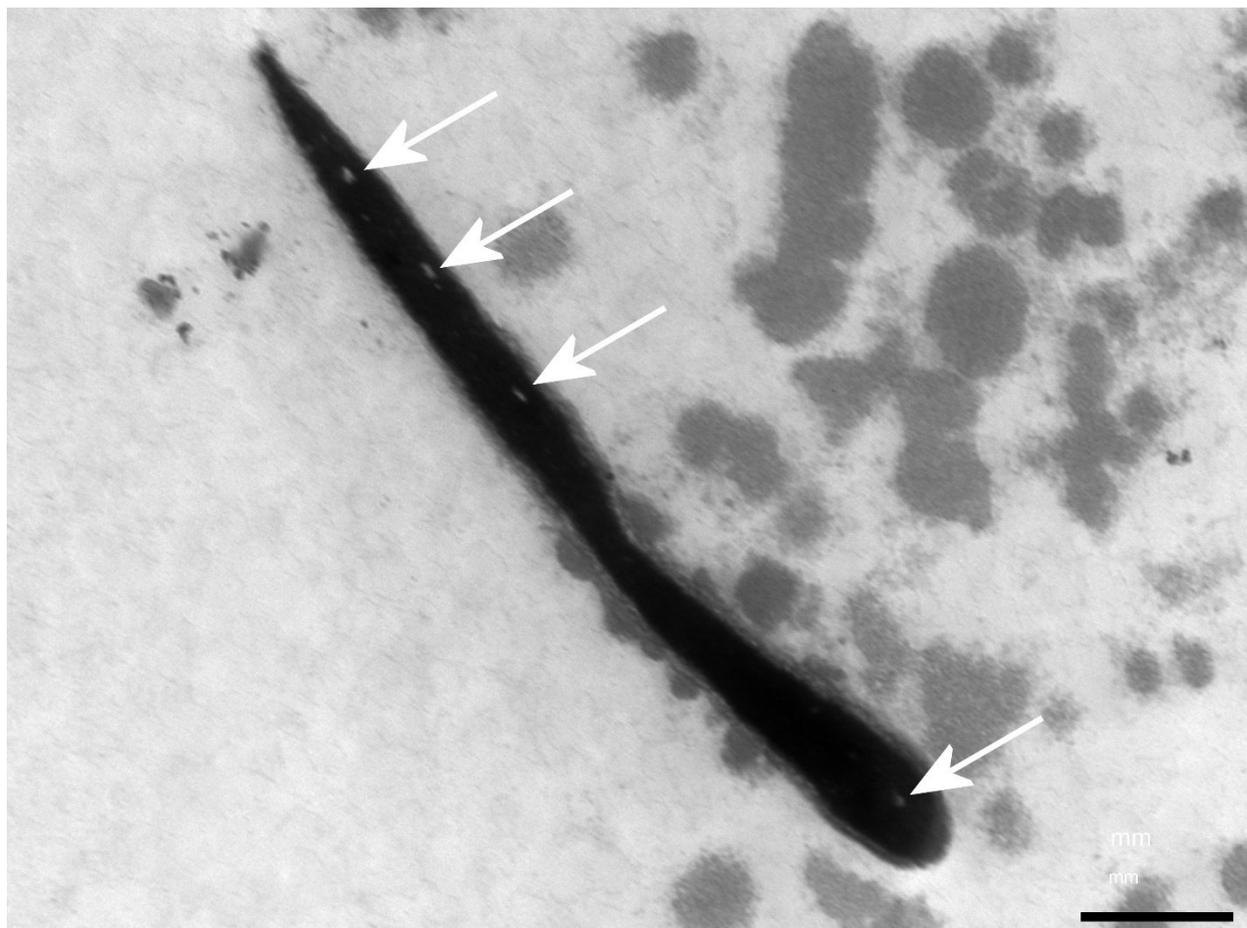


Figura 5. Micrografias eletrônicas de cabeças de espermatozoides bovinos, observando-se alteração de cromatina grau G2, caracterizando-se pela presença de até 6 pequenos pontos claros ou região mais clara ocupando até $\frac{1}{4}$ da cabeça (seta branca). Barra de escala 1 μm

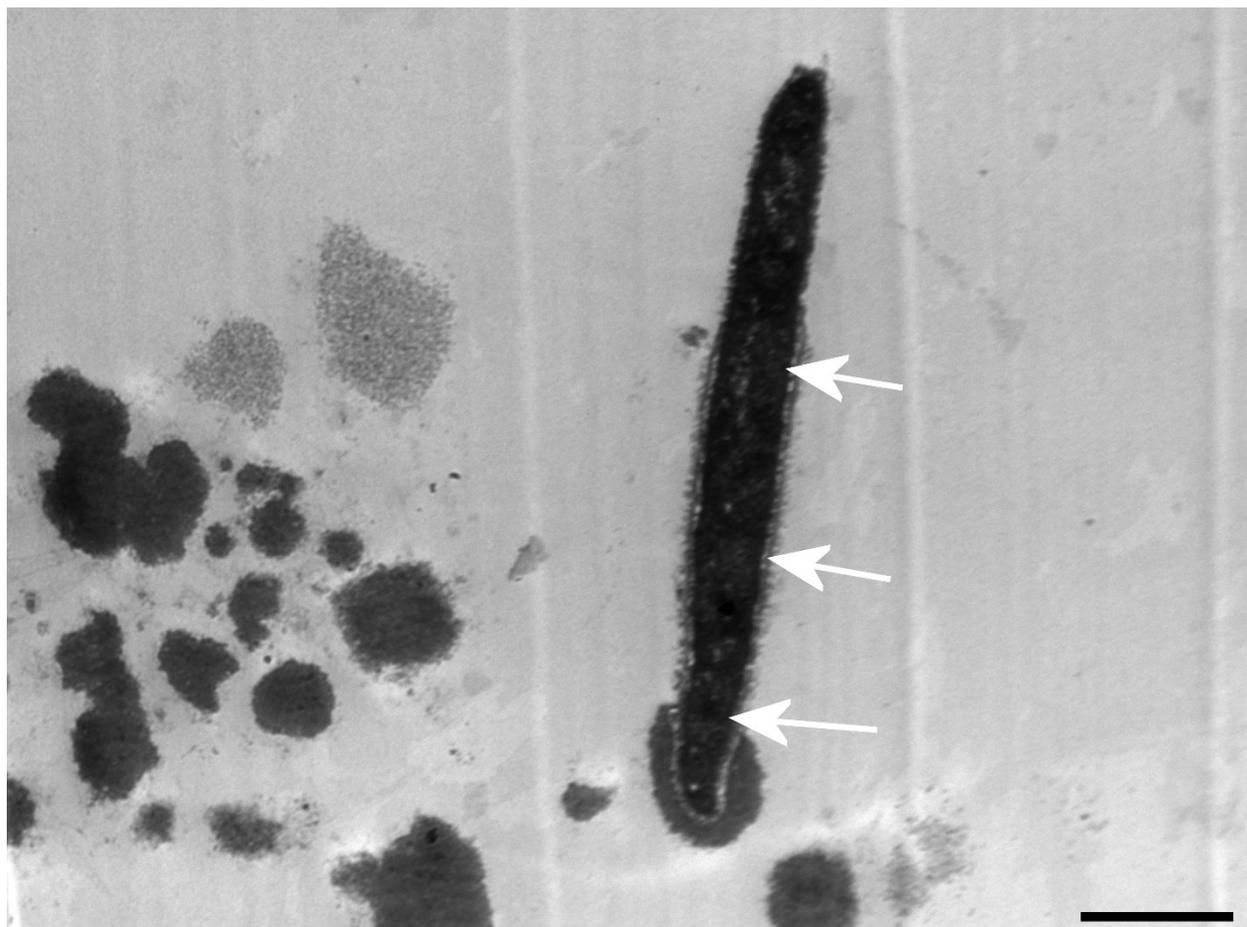


Figura 6. Micrografias eletrônicas de cabeças de espermatozoides bovinos, observando-se alteração de cromatina grau G3, caracterizando-se pela presença de vários pontos claros (acima de 6) ou região mais clara ocupando até metade da cabeça (seta branca). Barra de escala 1 μm .

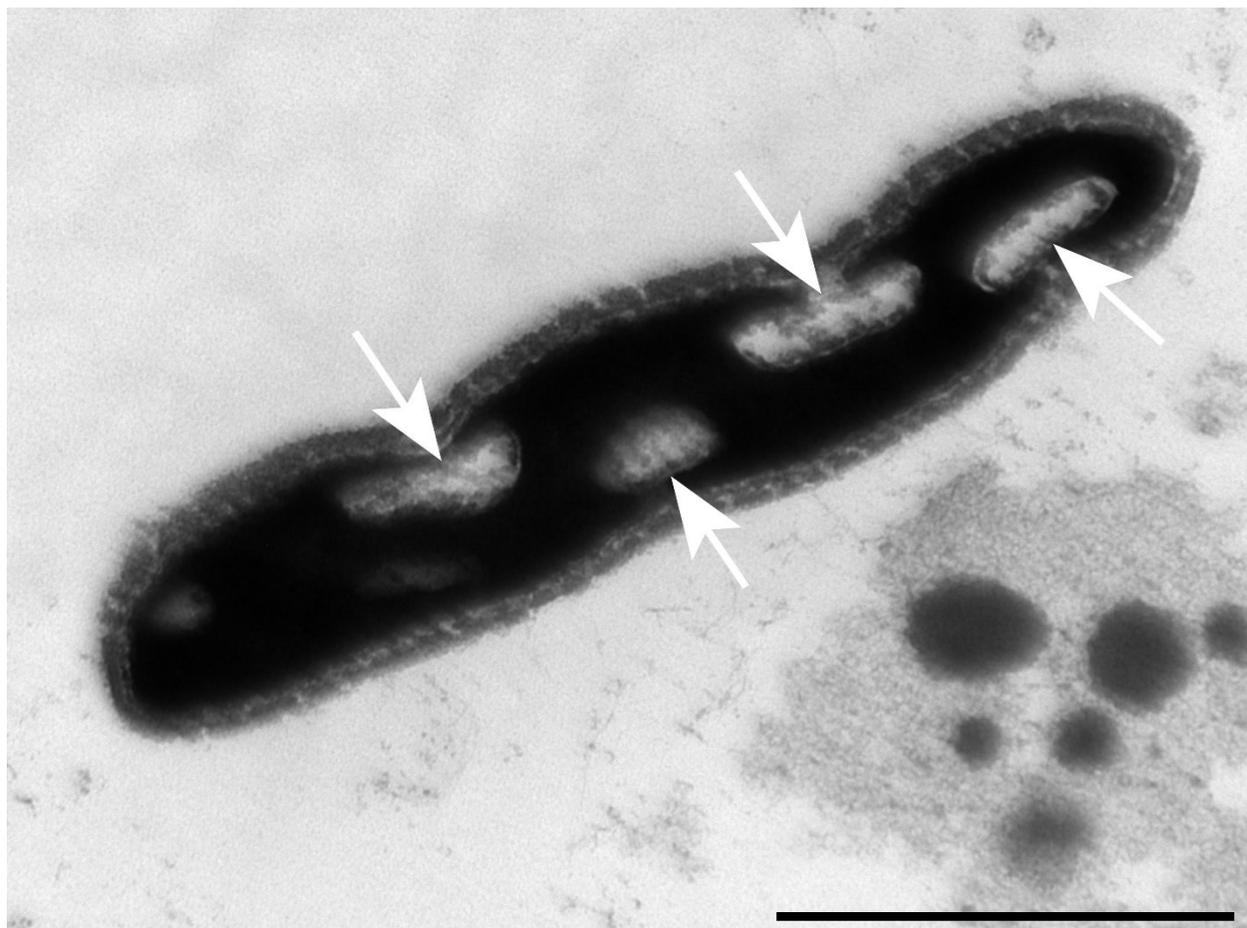


Figura 7. Micrografias eletrônicas de cabeças de espermatozoides bovinos, observando-se alteração de cromatina grau G4, caracterizando-se pela presença Mais da metade da área nuclear mais clara ou grandes regiões totalmente claras (seta branca). Barra de escala 1 μ m.

3.9 ANÁLISE DE IMAGEM COMPUTACIONAL DAS CABEÇAS DE ESPERMATOZOIDES

As imagens dos espermatozoides de cada esfregaço foram capturadas, por meio do microscópio Olympus EX51 acoplado a câmera Olympus DP70, pertencente ao laboratório de LAMOVI-UFU, utilizando-se objetiva de 100 x e optovar (lente intermediária) de 2 x. Essas imagens capturadas foram analisadas em 3 etapas: (1) segmentação das cabeças de espermatozoides, (2) marcação da área descompactada da cromatina, (3) classificação das alterações de cromatina.

A segmentação das cabeças dos espermatozoides foi realizada por limiarização (thresholding) baseada em histograma, sendo formada uma imagem binária (máscara) de cada cabeça de espermatozoide. Esta técnica possui como objetivo a formação de uma imagem contendo apenas a cabeça do espermatozoide, portanto, eliminando elementos presentes na imagem original, como a cauda dos espermatozoides ou artefatos decorrentes do processo de coloração (MARTINS et al., 2021). Em seguida, as imagens contendo apenas a cabeça do

espermatozoide passaram por um processo de descarte de pixels presente no perímetro da cabeça e suavização de seu contorno, isto é possível devido a uma técnica matemática, denominada de operação de erosão (CRUZ; BELETTI; TRAVENÇOLO, 2014; MARTINS et al., 2021). Este processamento inicial das imagens ocorreu por programação desenvolvida em linguagem MATLAB e sendo executado pelo software OCTAVE.

Assim como a segmentação das cabeças de espermatozoides, para marcação de áreas descompactadas na cromatina também foi utilizado programação matemática desenvolvida em MATLAB e executada pelo OCTAVE. Primeiramente foram identificadas as 10 cabeças mais claras (mais compactadas) por amostra, e o valor médio de pixels dessas cabeças foram consideradas como valor referência. Desta forma o software foi capaz de identificar nas cabeças avaliadas os valores de pixels menores que o valor de referência, utilizando-se 7% abaixo da média dos valores de pixel para a técnica de coloração com AT, 4% abaixo da média para a técnica de reação de Feulgen. Como forma de reduzir ruído e melhorar a delimitação da região alterada, foi utilizado um filtro Gaussiano ($\sigma=2$ e $\text{raio}=5$). Finalmente, para delimitação das áreas definidas como descompactadas, foi utilizada a marcação com linhas brancas. As classificações das alterações de cromatina de acordo com a localização da descompactação foram determinadas por Souza et al. (2018) e com adaptações, as alterações cromatínicas foram divididas em: Descompactação na base (DB); Descompactação na metade basal (DMB); Descompactação no eixo central (DEC); Descompactação base ápice (DBA), Descompactação total (DT); Descompactação dispersa (DD); Normal (N), (Figura 8-9). Todas as classificações foram realizadas por um mesmo avaliador.

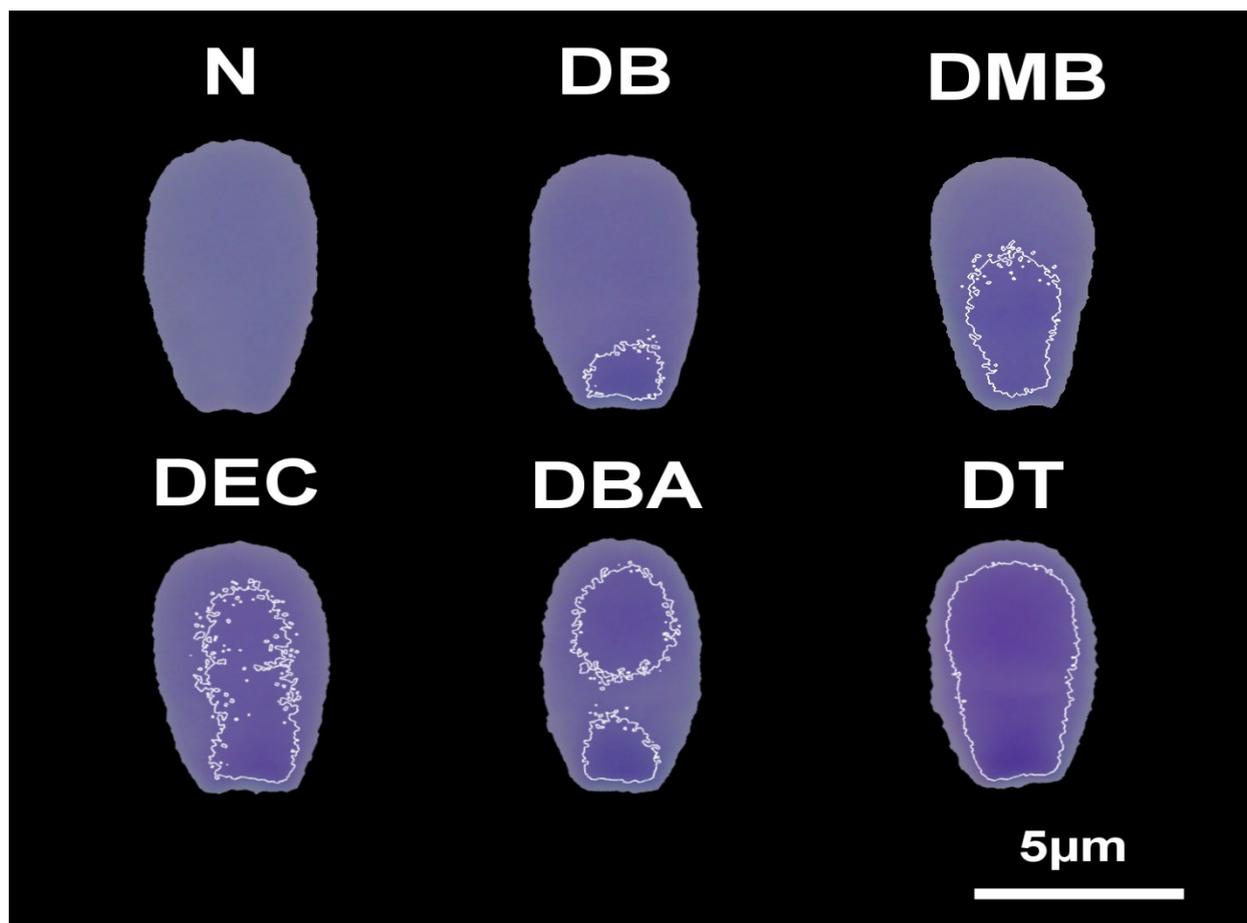


Figura 8. Diferentes tipos de descompactação de cromatina de espermatozoide corados com azul de toluidina. (N) normal; (DB) descompactação na base; (DMB) descompactação na metade basal; (DEC) descompactação no eixo central; (DBA) descompactação base ápice; (DT) descompactação total. Barra de escala: 5 μm .

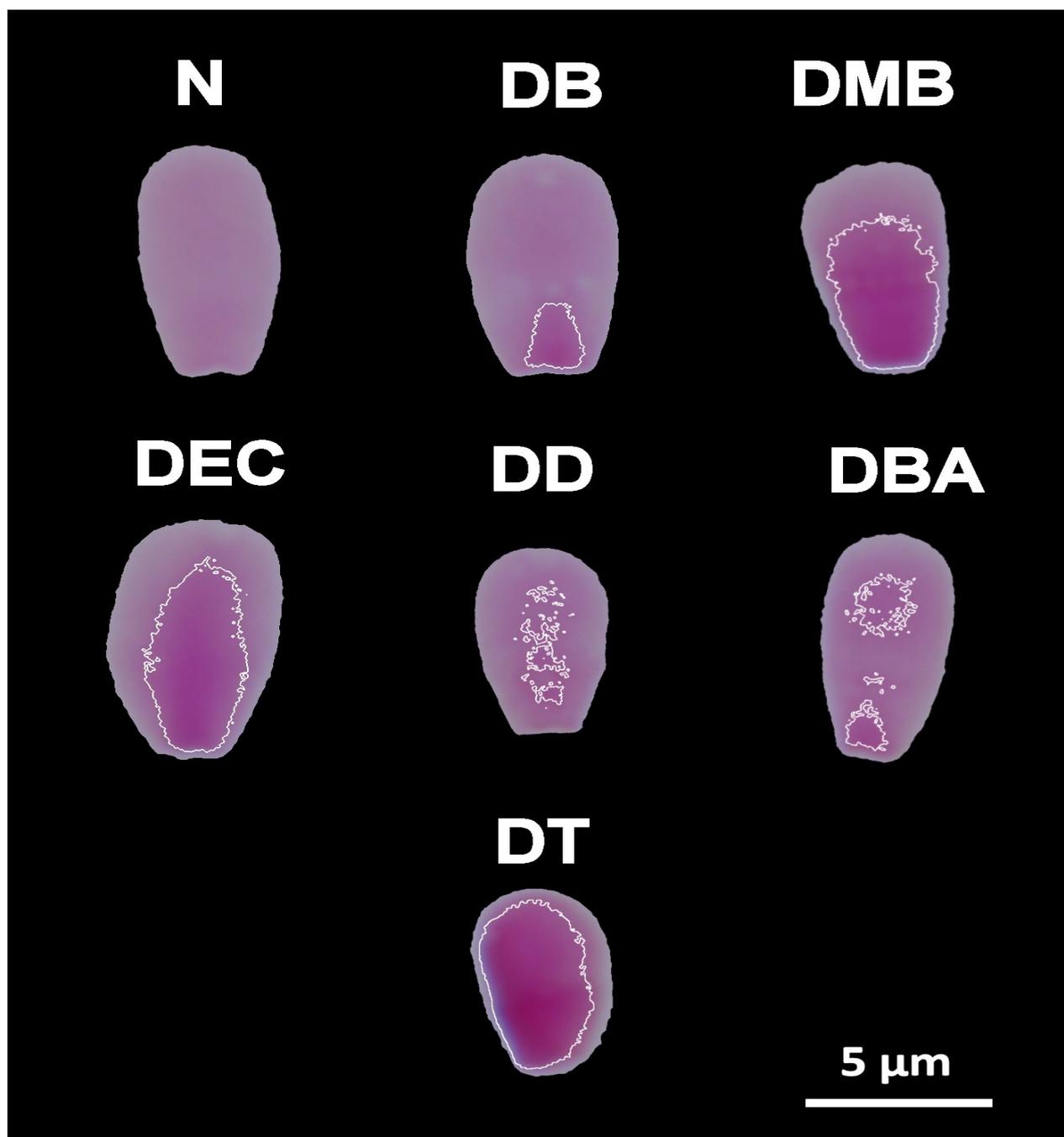


Figura 9. Diferentes tipos de descompactação de cromatina de espermatozoide corados com Feulgen. (N) normal; (DB) descompactação na base; (DMB) descompactação na metade basal; (DEC) descompactação no eixo central; (DT) descompactação total; (DD) descompactação dispersa; (DBA) Descompactação base ápice. Barra de escala: 5 µm.

3.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Como forma de neutralizar os efeitos de variáveis que não são controláveis na PIVE, optou-se em normalizar os resultados obtidos na PIVEs das amostras de sêmen dos touros presentes no experimento, portanto, utilizamos como referência os resultados obtidos por um touro fértil, previamente testado e com excelentes resultados na PIVE. Desta forma, os resultados obtidos de taxa de blastocisto das amostras de sêmen de touros avaliados foram transformadas em porcentagem das taxas de blastocisto obtidas com o sêmen do touro referência, na mesma rotina

de PIVE.

Para a normalização dos resultados de contagem visual e de quantificação dos tipos de descompactação da cromatina, obtidos por meio das técnicas de coloração com azul de toluidina, reação de Feulgen e laranja de acridina, optou-se por transformar os resultados em porcentagem em relação ao número total de cabeças contabilizadas por técnica.

Foi utilizado o teste t de amostra pareadas para identificar diferença estatística entre as alterações de cromatina identificadas por avaliação visual e computacional de esfregações corados com azul de toluidina e reação de Feulgen, avaliação de esfregaço corados com laranja de acridina e avaliação por microscopia eletrônica de transmissão.

Para avaliar como os defeitos de cromatina espermática identificadas pelas técnicas coloração com azul de toluidina, reação de Feulgen, laranja de acridina, microscopia eletrônica de transmissão, influenciam na taxa de clivagem (processo de fertilização) e a taxa de blastocisto (desenvolvimento embrionário inicial), foi utilizado o teste de correlação de Pearson entre os resultados referente a cada variável com as taxas normalizadas de clivagem e de blastocisto. Para identificar possíveis associações entre técnicas de identificação de defeitos de cromatina espermática, foi utilizado o teste de correlação de Pearson.

Foi considerado diferença significativa quando $p \leq 0,05$ e considerado como tendência quando $0,05 \leq p \leq 0,10$ (POMINI PINTO et al., 2015). Toda a análise estatística foi realizada usando o programa GraphPad Prism 8.0.1 (GraphPad Software Inc., SanDiego, CA, EUA).

4. RESULTADOS

Os resultados para taxas normalizadas de clivagem e de blastocisto obtidas nas PIVEs estão demonstradas na tabela 1, sendo observados os diferentes níveis de fertilidade *in vitro* dos touros utilizados no experimento. Para normalização, os resultados obtidos de taxa de clivagem e blastocisto das amostras de sêmen de touros avaliados foram transformados em porcentagem das taxas de clivagem e de blastocisto obtidas com o sêmen do touro referência, na mesma rotina de PIVE.

TABELA 1. Taxas de clivagem e de blastocisto obtidas das amostras de sêmen de touros normalizadas com taxas de clivagem e de blastocisto obtidas com o sêmen do touro referência (fértil).

TOURO	TAXA DE CLIVAGEM	TAXA DE CLIVAGEM NORMALIZADA	TAXA DE BLASTOCISTO	TAXA DE BLASTOCISTO NORMALIZADA
1	34,25%	49,67 %	3,23%	6,00 %
2	57,67%	111,57 %	60,48%	108,52 %
3	48,53%	85,81 %	37,37%	78,15 %
4	36,13%	75,19 %	3,57%	7,14 %

Foram avaliadas um total de 5.539 cabeças de espermatozoides, sendo avaliadas 4 amostras de sêmen, por avaliação visual (touro 1, n= 200; touro 2, n= 200; touro 3, n= 200; touro 4, n= 200) e computacional (touro 1, n= 360; touro 2, n= 265; touro 3, n= 229; touro 4, n= 234) de coloração com azul de toluidina, de esfregaços corados com laranja de acridina avaliadas por microscopia confocal de varredura a laser (touro 1, n=148; touro 2, n= 150; touro 3, n= 150, touro 4, n= 150) e de fluorescência (touro 1, n=150, touro 2, n= 150; touro 3, n= 150; touro 4, n= 150), por avaliação visual (touro 1, n= 200; touro 2, n= 200; touro 3, n= 200; touro 4, n= 200) e computacional (touro1, n= 266; touro2, n= 454; touro 3, n= 324; touro 4, n= 209) de coloração com reação de Feulgen e microscopia eletrônica de transmissão (touro 1, n= 100; touro2, n= 100; touro 3, n= 100; touro 4, n= 100)

A média e o desvio padrão dos resultados obtidos pela avaliação visual e computacional de esfregaços corados com azul de toluidina (AT) e com reação de Feulgen (RF), avaliação visual da técnica de coloração com laranja de acridina (LA), avaliação em microscopia eletrônica de transmissão (MET) estão na tabela 2.

TABELA 2. Média e desvio padrão obtidos pela avaliação visual e computacional de esfregaços corados com azul de toluidina e com reação de Feulgen, avaliação visual da técnica de coloração com laranja de acridina e avaliação por microscopia eletrônica de transmissão.

MÉTODOS	VARIÁVEIS	MÉDIA E DESVIO PADRÃO
AZUL DE TOLUIDINA	CV	13,50 ± 11,27
	SDC	15,87 ± 19,77
	DB	10,34 ± 12,59
	DEC	0,07 ± 0,14
	DMB	3,09 ± 3,67
	DD	0,00 ± 0,00
	DT	1,64 ± 2,50
	DBA	0,73 ± 1,20
REAÇÃO DE FEULGEN	CV	8,25 ± 7,63
	SDC	8,81 ± 10,51
	DB	7,02 ± 8,92
	DEC	0,06 ± 0,11
	DMB	1,11 ± 1,43
	DD	0,09 ± 0,19
	DT	0,44 ± 0,68
	DBA	0,09 ± 0,19
LARANJA DE ACRIDINA	MCVL	22,48 ± 17,67
	MF	20,00 ± 18,17
MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO	SAC	77,73 ± 20,94
	G1	26,72 ± 13,62
	G2	18,48 ± 6,40
	G3	17,68 ± 12,32
	G4	14,86 ± 15,98

CV, contagem visual de alteração de coloração; SDC, somatória de todos os tipos de descompactações de cromatina; DB, descompactação na base; DEC, descompactação no eixo central; DMB, descompactação na metade basal; DD, descompactação dispersa; DT, descompactação total; DBA, descompactação base-ápice; MCVL, microscopia confocal por varredura a laser; MF, microscopia de fluorescência; SAC, somatória de todos os graus de alterações de cromatina avaliadas por microscopia eletrônica de transmissão; G1, Presença de até 3 pequenos pontos claros na cromatina; G2, Presença de até 6 pequenos pontos claros ou região mais clara ocupando até ¼ da cabeça; G3, Presença de vários pontos claros (acima de 6) ou região mais clara ocupando até metade da cabeça; G4, Acima da metade da área nuclear mais clara ou grandes regiões totalmente claras.

Observa-se na tabela 2 as variáveis avaliadas pela técnica de coloração com azul de toluidina. A somatória de todos os tipos de descompactação de cromatina foi numericamente superior às alterações de cromatina encontradas por contagem visual. Entre os tipos de descompactações de cromatina encontradas, observou-se que o tipo de descompactação na base foi numericamente superior às demais, seguida pelo tipo de descompactação metade basal e descompactação total.

A média obtida da avaliação visual e computacional pela técnica de coloração com reação de Feulgen, comportou-se de forma semelhante ao observado pela técnica de coloração com azul de toluidina. A somatória dos tipos de descompactação de cromatina foi numericamente superior à contagem visual, entre os tipos de descompactações de cromatina encontradas, observou-se que o tipo de descompactação na base foi numericamente superior às demais, seguida pelo tipo de descompactação metade basal e descompactação total (tabela2).

As médias da avaliação visual e computacional da técnica de coloração com azul de toluidina foram numericamente superiores às médias da avaliação visual e computacional técnica de coloração com reação de Feulgen (tabela2).

Observou-se que a avaliação visual por microscopia confocal de varredura a laser de esfregos corados com laranja de acridina, apresentou numericamente superior quando comparado à avaliação visual por microscopia de fluorescência (tabela2). Com relação às médias das variáveis avaliadas por microscopia eletrônica de transmissão, podemos observar que o grau de alteração G1 foi numericamente superior às demais alterações, enquanto o grau de alteração G4 foi numericamente inferior dentre as alterações observadas (tabela 2).

A análise estatística dos resultados obtidos da contagem visual e computacional das técnicas de coloração com azul de toluidina e reação de Feulgen, avaliação visual da técnica de coloração com laranja de acridina e avaliação por microscopia eletrônica de transmissão, encontra-se na figura 10.

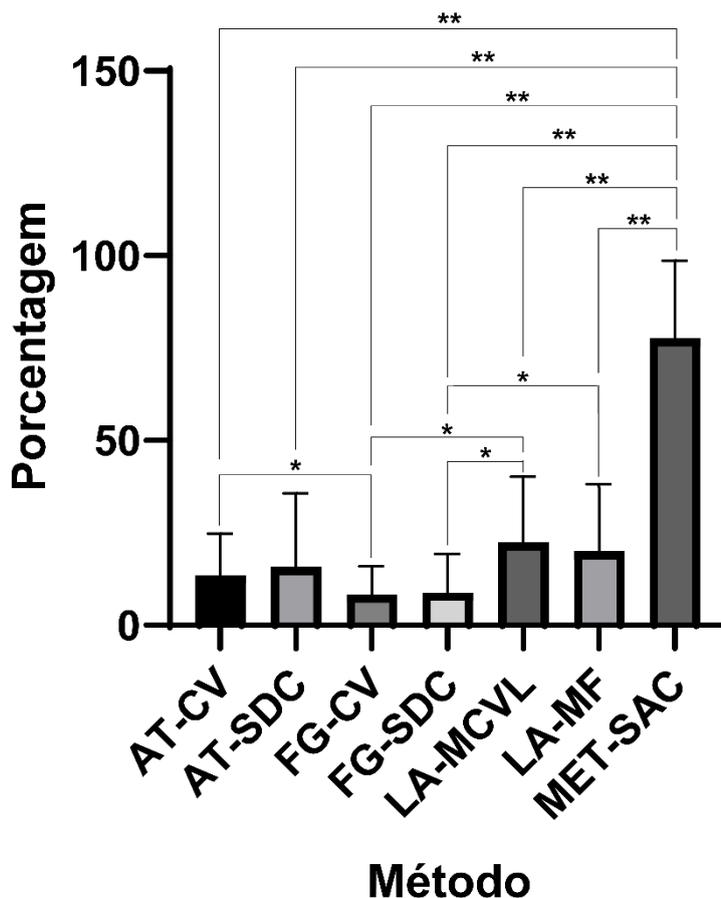


Figura 10. Média e desvio padrão das alterações de cromatina espermática identificadas por contagem visual (CV) e computacional (SDC) de esfregaços corados com azul de toluidina (AT) e com reação de Feulgen (FG), avaliação visual por microscópio confocal de varredura a laser (MCVL) e de fluorescência (MF) de esfregaços corados com laranja de acridina (LA), avaliação por microscopia eletrônica de transmissão (SAC - MET). Diferença significativa quando $p \leq 0,05$ ** e tendência a diferença significativa quando $0,05 \leq p \leq 0,1$ *.

Observa-se na figura 10 a média de alterações de cromatina identificadas por avaliação visual do método de coloração com azul de toluidina foi superior ($0,05 \leq P \leq 0,1$) à média da avaliação visual do método de coloração com reação de Feulgen.

A média de alterações de cromatina identificadas por esfregaços corados com laranja de acridina avaliados com microscopia confocal de varredura a laser foi superior ($0,05 \leq P \leq 0,1$) a média da contagem visual e computacional do método de coloração com reação de Feulgen. Enquanto, a média de alterações de cromatina identificadas por esfregaços corados com laranja de acridina avaliados com microscopia de fluorescência foi superior ($0,05 \leq P \leq 0,1$) a média de contagem computacional de esfregaços corados com reação de Feulgen. A média de alterações de cromatina espermática identificadas pela avaliação por microscopia eletrônica de transmissão foi superior ($P \leq 0,05$) as médias obtidas pelos demais métodos analisados (figura 10).

Correlacionou-se os resultados obtidos da taxa de clivagem e de blastocisto com as variáveis obtidas pela avaliação visual e computacional dos esfregaços corados com Azul de Toluidina (tabela 3).

TABELA 3. Correlação de Pearson entre taxa de clivagem e de blastocisto com a avaliação visual e computacional dos esfregaços corados com azul de toluidina

VARIÁVEIS	TAXA DE CLIVAGEM	TAXA DE BLASTOCISTO
CV	-0,85	-0,93*
SDC	-0,91*	-0,90*
DB	-0,90*	-0,92*
DEC	-0,80	-0,57
DMB	-0,89	-0,95*
DD		
DT	-0,88	-0,74
DBA	-0,86	-0,69

CV, contagem visual; SDC, somatória de todos os tipos de descompactações de cromatina; DB, descompactação na base; DEC, descompactação no eixo central; DMB, descompactação na metade basal; DD, descompactação dispersa; DT, descompactação total; DBA, descompactação base-ápice. ** diferença significativa quando $P \leq 0,05$, * tendência a diferença significativa quando $0,05 \leq P \leq 0,1$.

Observa-se na tabela 3 tendência a uma correlação negativa entre alguns tipos de descompactação da cromatina e a taxa de clivagem, como por exemplo a somatória dos tipos de descompactações observadas ($r = -0,91$, $P = 0,091$) e a descompactação na base ($r = -0,90$, $P = 0,097$). A taxa de blastocisto possui tendência a correlação negativa com a contagem visual de cabeças de espermatozoides com alteração de cromatina ($r = -0,93$, $P = 0,071$), com o total descompactações observadas ($r = -0,90$, $P = 0,097$), com a descompactação na base da cabeça ($r = -0,92$, $P = 0,076$), com a descompactação na metade basal da cabeça ($r = -0,95$, $P = 0,054$).

Correlacionou-se os resultados obtidos da taxa de clivagem e de blastocisto com as variáveis obtidas pela avaliação visual e computacional dos esfregaços corados com Reação de Feulgen (tabela 4).

TABELA 4. Correlação de Pearson entre taxa de clivagem e de blastocisto com a visual e computacional dos esfregaços corados com reação de Feulgen

VARIÁVEIS	TAXA DE CLIVAGEM	TAXA DE BLASTOCISTO
CV	-0,88	-0,91*
SDC	-0,86	-0,77
DB	-0,83	-0,71
DEC	0,81	0,76
DMB	-0,91*	-0,87
DD	-0,80	-0,57
DT	-0,12	-0,50
DBA	-0,80	-0,57

CV, contagem visual; SDC, somatória de todos os tipos de descompactações de cromatina; DB, descompactação na base; DEC, descompactação no eixo central; DMB, descompactação na metade basal; DD, descompactação dispersa; DT, descompactação total; DBA, descompactação base-ápice. **diferença significativa quando $P \leq 0,05$, * tendência a diferença significativa quando $0,05 \leq P \leq 0,1$.

A descompactação na metade basal da cabeça ($r = -0,91$, $P = 0,088$) observado pela técnica de reação de Feulgen, apresenta tendência de correlação negativa com a taxa de clivagem. A contagem visual das cabeças de espermatozoides com alteração de cromatina coradas pela reação de Feulgen possuem tendência de correlação negativa com a taxa de blastocisto ($r = -0,91$, $P = 0,092$). As demais correlações não foram significativas ($P > 0,01$) (tabela 4).

Também se correlacionou os resultados obtidos da taxa de clivagem e de blastocisto com os resultados obtidos com a técnica de coloração com laranja de acridina, bem como com a microscopia eletrônica (tabela 5).

TABELA 5. Correlação de Pearson entre taxa de clivagem e de blastocisto com os resultados obtidos com a técnica de coloração laranja de acridina e com a microscopia eletrônica de transmissão.

TÉCNICAS	VARIÁVEIS	TAXA DE CLIVAGEM	TAXA DE BLASTOCISTO
LARANJA DE ACRIDINA	MCVL	-1,00**	-0,92*
	MF	-0,97**	-0,91*
MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO	SAC	-0,92*	-1,00**
	G1	0,75	0,93*
	G2	-0,63	-0,91*
	G3	-0,94*	-0,98**
	G4	-0,87	-0,98**

MCVL, microscopia confocal por varredura a laser; MF, microscopia de fluorescência SAC, somatória de todos os graus de alterações de cromatina avaliadas por microscopia eletrônica de transmissão; G1, Presença de até 3 pequenos pontos claros na cromatina; G2, Presença de até 6 pequenos pontos claros ou região mais clara ocupando até $\frac{1}{4}$ da cabeça; G3, Presença de vários pontos claros (acima de 6) ou região mais clara ocupando até metade da cabeça; G4, Acima da metade da área nuclear mais clara ou grandes regiões totalmente claras. ** diferença significativa quando $P \leq 0,05$, * tendência a diferença significativa quando $0,05 \leq P \leq 0,1$.

A técnica de coloração de cabeça de espermatozoide com laranja acridina observada através de microscópio confocal de varredura a laser e por microscópio de fluorescência demonstrou correlação significativa negativa com a taxa de clivagem ($r = -1,00$, $P = 0,004$; $r = -0,97$, $P = 0,029$, respectivamente) e tendência a correlação negativa com a taxa de blastocisto ($r = -0,92$, $P = 0,081$; $r = -0,91$, $P = 0,089$, respectivamente) (tabela 5).

Com relação a microscopia eletrônica de transmissão, foi observado tendência de correlação negativa das alterações G3 ($r = -0,94$, $P = 0,057$) e da somatória de todos os graus de alterações de cromatina ($r = -0,92$, $P = 0,078$) com a taxa de clivagem. A somatória de todos os graus de alterações de cromatina e as alterações G3 e G4, apresentam correlação significativa negativa com a taxa de blastocisto ($r = -1,00$, $P = 0,004$; $r = -0,98$, $P = 0,021$; $r = -0,98$, $P = 0,020$, respectivamente), enquanto as alterações G2 apresentam tendência de correlação negativa ($r = -0,91$, $P = 0,090$). Em contrapartida a alteração G1 apresenta tendência de correlação positiva com a taxa de blastocisto. ($r = 0,93$, $P = 0,069$) (tabela 5).

Em relação das análises por SCSA, os “pseudo color plot” da fluorescência não demonstraram claramente diferentes populações de eventos (espermatozoides). Assim, não foi possível desenhar os “gates” referentes aos espermatozoides com e sem alterações no DNA (figura 11).

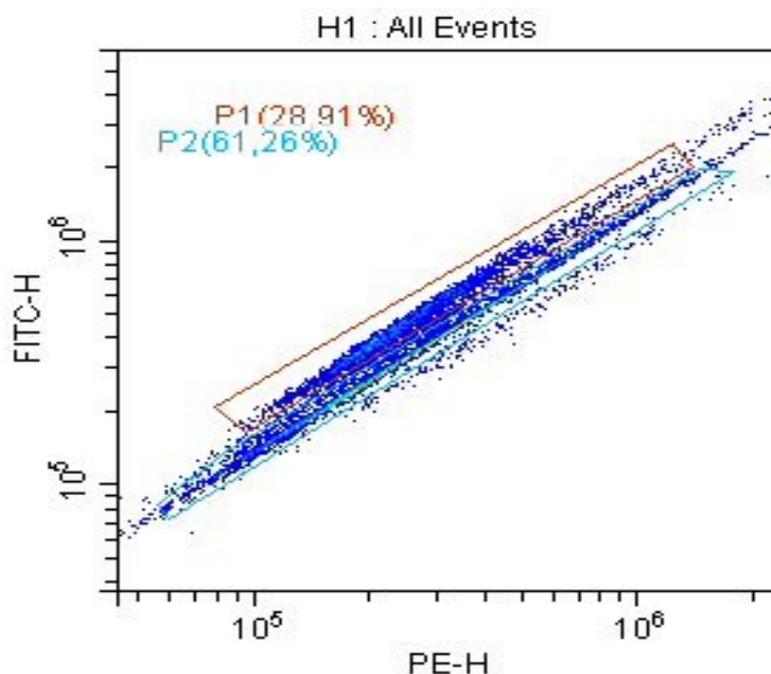


Figura 11. Pseudo color plot de FITC X PE (floreescência verde x floreescência vermelha) de SCSA de espermatozoides bovinos corados com laranja de acridina, não sendo possível desenhar os “gates” referentes aos espermatozoides com e sem alterações no DNA

Correlacionou-se os resultados obtidos da avaliação visual e computacional, comparando as técnicas de coloração com Reação de Feulgen e azul de toluidina (tabela 6).

TABELA 6. Correlação de Pearson entre a avaliação visual e computacional dos esfregaços corados com reação de Feulgen e azul de toluidina.

VARIÁVEIS	AZUL DE TOLUIDINA							
	CV	SDC	DB	DEC	DMB	DD	DT	DBA
CV	0,99**	1,00**	1,00**	0,81	0,99**		0,93*	0,90
SDC	0,92*	0,97**	0,95*	0,94*	0,92*		0,99**	0,98**
DB	0,88	0,94*	0,92*	0,96**	0,88		0,99**	0,99**
DEC	-0,50	-0,54	-0,55	-0,33	-0,56		-0,44	-0,41
DMB	0,97**	1,00**	0,99**	0,88	0,97**		0,97**	0,95*
DD	0,74	0,84	0,81	1,00**	0,75		0,97**	0,99**
DT	0,26	0,12	0,18	-0,43	0,26		-0,20	-0,27
DBA	0,74	0,84	0,81	1,00**	0,75		0,97**	0,99**

CV, contagem visual; SDC, somatória dos tipos de descompactações de cromatina; DB, descompactação na base; DEC, descompactação no eixo central; DMB, descompactação na metade basal; DD, descompactação dispersa; DT, descompactação total; DBA, descompactação base-ápice. ** diferença significativa quando $P \leq 0,05$, * tendência a

diferença significativa quando $0,05 \leq P \leq 0,1$.

A contagem visual de cabeças de espermatozoides com alteração de cromatina corados com Feulgen demonstrou correlação significativa positiva com a contagem visual de cabeças de espermatozoides com alteração de cromatina corados com azul de toluidina ($r= 0,99$, $P = 0,006$) (tabela 6).

A técnica de coloração de cabeça de espermatozoide com reação de Feulgen demonstrou que os tipos de descompactação base ápice apresentou correlação significativa positiva com a descompactação base ápice ($r= 0,99$, $P = 0,014$) de cabeças de espermatozoides corados com azul de toluidina (tabela 6). A descompactação metade basal de espermatozoides corados com reação de Feulgen demonstrou correlação significativa positiva com a descompactação metade basal de espermatozoides com alteração de cromatina corados com azul de toluidina ($r= 0,97$, $P = 0,026$) (tabela 6).

Também se correlacionou avaliação visual com avaliação computacional dos esfregaços corados com reação de Feulgen e azul de toluidina (tabela 7).

TABELA 7. Correlação de Pearson entre avaliação visual com avaliação computacional dos esfregaços corados com reação de Feulgen e azul de toluidina

	SDC	DB	DEC	DMB	DD	DT	DBA
CVAT	0,98**	0,99**	0,74	1,00**		0,88	0,84
CVRF	0,95**	0,93*	-0,50	0,99**	0,81	0,17	0,81

CVAT, contagem visual de esfregaços corados com azul de toluidina; CVRF, contagem visual de esfregaços corados com reação Feulgen; SDC, somatória dos tipos de descompactações de cromatina; DB, descompactação na base; DEC, descompactação no eixo central; DMB, descompactação na metade basal; DD, descompactação dispersa; DT, descompactação total; DBA, descompactação base-ápice. ** diferença significativa quando $P \leq 0,05$, * tendência a diferença significativa quando $0,05 \leq P \leq 0,1$.

A contagem visual de esfregaços corados com azul de toluidina (ATCV) possuem correlação significativa positiva com a somatória de todos os tipos de descompactação de cromatina ($r= 0,98$, $P = 0,016$), descompactação na base ($r = 0,99$, $P = 0,008$) e descompactação metade basal ($r= 1,00$, $P = 0,003$) avaliadas por esfregaços corados com azul de toluidina (tabela 7). A contagem visual de esfregaços coloração com reação de Feulgen possuem correlação significativa positiva com a somatória de todos os tipos de descompactação de cromatina ($r = 0,95$, $P = 0,045$), com a descompactação metade basal ($r = 0,99$ $P = 0,011$) e tendência de correlação positiva com a descompactação na base ($r = 0,93$, $P = 0,074$) avaliada por esfregaços corados com reação de Feulgen (tabela 7).

Correlacionou-se os resultados obtidos com a técnica de coloração com laranja de acridina com a avaliação visual e computacional dos esfregaços corados com azul de toluidina (tabela 8).

TABELA 8. Correlação de Pearson entre resultados obtidos com a técnica de coloração laranja de acridina com a avaliação visual e computacional dos esfregaços corados com azul de toluidina.

		LARANJA DE ACRIDINA	
VARIÁVEIS		MCVL	MF
AZUL DE TOLUIDINA	CV	0,90	0,94*
	SDC	0,94*	0,98**
	DB	0,94*	0,98**
	DEC	0,81	0,86
	DMB	0,92*	0,96**
	DD		
	DT	0,90*	0,95*
	DBA	0,88	0,93*

MCVL, microscopia confocal por varredura a laser; MF, microscopia de fluorescência; CV, contagem visual de alteração de coloração; SDC, somatória de todos os tipos de descompactações de cromatina; DB, descompactação na base; DEC, descompactação no eixo central; DMB, descompactação na metade basal; DD, descompactação dispersa; DT, descompactação total; DBA, descompactação base-ápice. ** diferença significativa quando $P \leq 0,05$, * tendência a diferença significativa quando $0,05 \leq P \leq 0,1$.

A técnica de laranja de acridina avaliada por microscopia confocal de varredura a laser (MCVL) possui tendência a correlação positiva com a somatória de todos os tipos de descompactações de cromatina ($r = 0,94$, $P = 0,060$), com a descompactação na base ($r = 0,94$, $P = 0,064$), com a descompactação metade basal ($r = 0,92$, $P = 0,075$) e com a descompactação total ($r = 0,90$, $P = 0,099$) avaliadas por esfregaço corados com azul de toluidina (tabela 8). A avaliação de esfregaços corados com laranja de acridina por microscopia de fluorescência (MF) possui correlação significativa positiva com a somatória de todos os tipos de descompactação de cromatina ($r = 0,98$, $P = 0,018$), com a descompactação na base ($r = 0,98$, $P = 0,023$), com a descompactação metade basal ($r = 0,96$, $P = 0,037$), e tendência a correlação positiva com a contagem visual ($r = 0,94$, $P = 0,056$), com a descompactação total ($r = 0,95$, $P = 0,052$) e com a descompactação base ápice ($r = 0,93$, $P = 0,074$) avaliadas por esfregaço corados com azul de toluidina (tabela 8).

Correlacionou-se os resultados obtidos com a técnica de coloração com laranja de acridina com a avaliação visual e computacional dos esfregaços corados com reação de Feulgen (tabela 9).

TABELA 9. Correlação de Pearson entre resultados obtidos com a técnica de coloração laranja de acridina com a avaliação visual e computacional dos esfregaços corados com reação de Feulgen.

	VARIÁVEIS	LARANJA DE ACRIDINA	
		MCVL	MF
REAÇÃO DE FEULGEN	CV	0,92*	0,97**
	SDC	0,89	0,95*
	DB	0,86	0,92*
	DEC	-0,77	-0,66
	DMB	0,94*	0,98**
	DD	0,81	0,86
	DT	0,14	0,10
	DBA	0,81	0,86

MCVL, microscopia confocal por varredura a laser; MF, microscopia de fluorescência; CV, contagem visual de alteração de coloração; SDC, somatória de todos os tipos de descompactações de cromatina; DB, descompactação na base; DEC, descompactação no eixo central; DMB, descompactação na metade basal; DD, descompactação dispersa; DT, descompactação total; DBA, descompactação base-ápice. ** diferença significativa quando $P \leq 0,05$, * tendência a diferença significativa quando $0,05 \leq P \leq 0,1$.

A técnica de coloração com laranja de acridina avaliada por microscopia confocal de varredura a laser (MCVL) possui tendência a correlação positiva com a contagem visual ($r = 0,92$, $P = 0,083$) e com a descompactação metade basal ($r = 0,94$, $P = 0,060$) avaliada por esfregaço corado com reação de Feulgen. A técnica de coloração de cabeça de espermatozoide com laranja acridina observada através microscopia de fluorescência (MF) possui correlação significativa positiva com a contagem visual ($r = 0,97$, $P = 0,034$) e com o tipo de descompactação metade basal ($r = 0,98$, $P = 0,017$), e tendência a correlação positiva com a somatória do tipos de descompactação da cromatina ($r = 0,95$, $P = 0,054$) e com a descompactação na base ($r = 0,92$, $P = 0,078$) avaliadas por esfregaço corado com reação de Feulgen (tabela 9).

Correlacionou-se os resultados obtidos a técnica de coloração com laranja de acridina com a microscopia eletrônica (tabela 10).

TABELA 10. Correlação de Pearson entre a técnica de coloração por laranja acridina com a avaliação de cromatina espermática por microscopia eletrônica de transmissão.

		LARANJA DE ACRIDINA	
VARIÁVEIS		MCVL	MF
	SAC	0,95*	0,94*
MICROSCOPIA	G1	-0,80	-0,86
ELETRÔNICA DE	G2	0,68	0,70
TRANSMISSÃO	G3	0,97**	0,97**
	G4	0,91*	0,93*

MCVL, microscopia confocal por varredura a laser; MF, microscopia de fluorescência; SAC, somatória de todos os graus de alterações de cromatina avaliadas por microscopia eletrônica de transmissão; G1, Presença de até 3 pequenos pontos claros na cromatina; G2, Presença de até 6 pequenos pontos claros ou região mais clara ocupando até $\frac{1}{4}$ da cabeça; G3, Presença de vários pontos claros (acima de 6) ou região mais clara ocupando até metade da cabeça; G4, Acima da metade da área nuclear mais clara ou grandes regiões totalmente claras. ** diferença significativa quando $P \leq 0,05$, * tendência a diferença significativa quando $0,05 \leq P \leq 0,1$.

A técnica de coloração de cabeça de espermatozoide com laranja acridina observada através de microscópio confocal de varredura a laser e por microscópio de fluorescência demonstrou correlação significativa positiva com a alteração G3 ($r = 0,97$, $P = 0,033$; $r = 0,97$, $P = 0,025$, respectivamente), e tendência a correlação positiva com a somatória de todos os graus de alterações de cromatina ($r = 0,95$, $P = 0,054$; $r = 0,94$, $P = 0,057$, respectivamente) e com a alteração G4 ($r = 0,91$, $P = 0,094$; $r = 0,93$, $P = 0,069$, respectivamente) avaliadas por microscopia eletrônica de transmissão (tabela 10).

Também se correlacionou a avaliação de cromatina espermática por microscopia eletrônica de transmissão com a avaliação visual e computacional dos esfregaços corados com azul de toluidina (tabela 11).

TABELA 11. Correlação de Pearson entre avaliação de cromatina espermática por microscopia eletrônica de transmissão com a avaliação visual e computacional dos esfregaços corados com azul de toluidina.

		MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO				
		SAC	G1	G2	G3	G4
AZUL DE TOLUIDINA	CV	0,95*	-0,97**	0,85	0,97**	0,98**
	SDC	0,93*	-0,92*	0,76	0,97**	0,95**
	DB	0,95*	-0,94*	0,80	0,98**	0,97**
	DEC	0,64	-0,57	0,28	0,72	0,64
	DMB	0,96**	-0,96**	0,85	0,98**	0,99**
	DD	-	-	-	-	-
	DT	0,80	-0,75	0,51	0,86	0,81
	DBA	0,75	-0,70	0,44	0,83	0,76

CV, contagem visual de alteração de coloração; SDC, somatória de todos os tipos de descompactações de cromatina; DB, descompactação na base; DEC, descompactação no eixo central; DMB, descompactação na metade basal; DD, descompactação dispersa; DT, descompactação total; DBA, descompactação base-ápice. SAC, somatória de todos os graus de alterações de cromatina avaliadas por microscopia eletrônica de transmissão; G1, Presença de até 3 pequenos pontos claros na cromatina; G2, Presença de até 6 pequenos pontos claros ou região mais clara ocupando até ¼ da cabeça; G3, Presença de vários pontos claros (acima de 6) ou região mais clara ocupando até metade da cabeça; G4, Acima da metade da área nuclear mais clara ou grandes regiões totalmente claras. ** diferença significativa quando $P \leq 0,05$, * tendência a diferença significativa quando $0,05 \leq P \leq 0,1$.

Os graus de alteração G3 e G4 observados por microscopia eletrônica de transmissão possuem correlação significativa positiva com a contagem visual ($r = 0,97$, $P = 0,032$; $r = 0,98$, $P = 0,017$, respectivamente), com a somatória de todos os tipos de descompactação de cromatina ($r = 0,97$, $P = 0,031$; $r = 0,95$, $P = 0,046$, respectivamente), com a descompactação na base ($r = 0,98$, $P = 0,022$, $r = 0,97$, $P = 0,029$, respectivamente) e com a descompactação metade basal ($r = 0,98$, $P = 0,017$, $r = 0,99$, $P = 0,013$, respectivamente) avaliada por esfregaço corado com azul de toluidina (tabela 11).

A somatória de todos os graus de alterações de cromatina avaliadas por microscopia eletrônica de transmissão possui tendência a correlação significativa positiva com a contagem visual ($r = 0,95$, $P = 0,052$), com a somatória dos tipos de descompactação de cromatina ($r = 0,93$, $P = 0,066$) avaliadas por esfregaço corado com azul de toluidina (tabela 11). O grau de alteração G1 possui correlação significativa negativa com a contagem visual ($r = -0,97$, $P = 0,027$), com o tipo de descompactação metade basal ($r = -0,96$, $P = 0,038$), e tendência a correlação negativa com a

somatória dos tipos de descompactação de cromatina ($r = -0,92$, $P = 0,084$) e com a descompactação na base ($r = -0,94$, $P = 0,062$) avaliada por esfregaço corado com azul de toluidina (tabela 11).

Correlacionou-se a avaliação de cromatina espermática por microscopia eletrônica de transmissão com a avaliação visual e computacional dos esfregaços corados com reação de Feulgen (tabela 12).

TABELA 12. Correlação de Pearson entre avaliação de cromatina espermática por microscopia eletrônica de transmissão com a avaliação visual e computacional dos esfregaços corados com reação de Feulgen.

		MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO				
		SAC	G1	G2	G3	G4
REAÇÃO DE FEULGEN	CV	0,93*	-0,94*	0,79	0,97**	0,97**
	SDC	0,82	-0,81	0,58	0,88	0,85
	DB	0,77	-0,76	0,51	0,84	0,80
	DEC	-0,74	0,47	-0,53	-0,70	-0,62
	DMB	0,91*	-0,88	0,70	0,95**	0,93*
	DD	0,64	-0,57	0,28	0,72	0,64
	DT	0,42	-0,46	0,72	0,31	0,41
	DBA	0,64	-0,57	0,28	0,72	0,64

CV, contagem visual de alteração de coloração; SDC, somatória de todos os tipos de descompactações de cromatina; DB, descompactação na base; DEC, descompactação no eixo central; DMB, descompactação na metade basal; DD, descompactação dispersa; DT, descompactação total; DBA, descompactação base-ápice. SAC, somatória de todos os graus de alterações de cromatina avaliadas por microscopia eletrônica de transmissão; G1, Presença de até 3 pequenos pontos claros na cromatina; G2, Presença de até 6 pequenos pontos claros ou região mais clara ocupando até $\frac{1}{4}$ da cabeça; G3, Presença de vários pontos claros (acima de 6) ou região mais clara ocupando até metade da cabeça; G4, Acima da metade da área nuclear mais clara ou grandes regiões totalmente claras. ** diferença significativa quando $P \leq 0,05$, * tendência a diferença significativa quando $0,05 \leq P < 0,1$.

A alteração G3 observada por microscopia eletrônica de transmissão, possui correlação significativa positiva com a contagem visual ($r = 0,97$, $P = 0,034$) e com a descompactação metade basal ($r = 0,95$, $P = 0,048$) avaliadas por esfregaço corados com reação de Feulgen. O grau G4 possui correlação significativa positiva com a contagem visual ($r = 0,97$, $P = 0,035$) e tendência a correlação positiva com a descompactação metade basal ($r = 0,93$, $P = 0,072$) avaliadas por esfregaço corados com reação de Feulgen. A somatória de todos os graus de alterações de cromatina possui tendência a correlação positiva com a contagem visual ($r = 0,93$, $P = 0,065$) e com a descompactação metade basal ($r = 0,91$, $P = 0,091$) avaliadas por esfregaço corados com reação de Feulgen. O grau de alteração G1 possui tendência a correlação negativa com a contagem

visual ($r = -0,94$, $P = 0,058$) de esfregaço corados com reação de Feulgen (tabela 12).

5. DISCUSSÃO

A integridade da cromatina espermática é de extrema importância para fecundação, implantação, embriogênese, placentação, a eficiência das tecnologias de reprodução assistida e a saúde da prole ao longo de sua vida (SHAMSI et al., 2010; DADA, 2017). O SCSA é considerado o método “ouro” para avaliação de alterações cromatínicas (EVENSON, 2016), no entanto, é de alto custo devido ao uso de citômetro de fluxo. No entanto, existem métodos alternativos mais baratos, de fácil aplicação, mas de resultados questionáveis. Alguns desses métodos foram testados no presente trabalho.

O SCSA utiliza das propriedades metacromáticas do laranja de acridina, para avaliar a suscetibilidade do DNA espermático à desnaturação ácida (pH 1,2 por 30 s) *in situ*, seguido de coloração com AO e avaliação em citometria de fluxo (EVENSON, 2016), quando é realizada contagem automática e rápida do número de espermatozoides verdes (DNA íntegros) e vermelhos (DNA desnaturado). Apesar do SCSA ser considerado o método “ouro”, neste trabalho não foi possível obter resultados confiáveis e com repetibilidade, demonstrando ser este um método de difícil uso em condições laboratoriais de baixa tecnologia e com estrutura física deficiente. Em quase todos os testes com as amostras experimentais não foi possível definir os limites dos “gates” representativos de cada uma das populações de espermatozoide que deveriam aparecer nos “pseudo color plot” típicos da metodologia (Figura 3). Mesmo quando o método foi testado conforme sugerido por Castro et al. (2018), não ficou claro a separação das diferentes populações de espermatozoides. Com isso, não foi possível realizar a correlação dos resultados destas avaliações com as taxas de clivagem e blastocisto obtidas nas rotinas de PIVE.

Uma possibilidade de usar as características de metacromasia do laranja de acridina, de forma mais simples e com menor custo, pode-se utilizar a coloração de esfregaços com este corante (TEJADA et al., 1984). No presente trabalho foi testado o método de Tejada et al. (1984) com modificações propostas por Beletti e Mello (1996). Os esfregaços foram analisados por avaliação visual em microscopia de fluorescência e em microscopia confocal de varredura a laser. Em ambas as análises foi possível, sem grande subjetividade, diferenciar espermatozoides verdes (DNA íntegro) e vermelhos (DNA desnaturado). A repetibilidade dos resultados também foi superior a encontrada no SCSA. Com isso, foi possível obter resultados para correlacionar com os resultados das PIVEs. Ambas as avaliações mostraram alta correlação negativa com a taxa de clivagem. Apesar de alguns ovócitos iniciarem a clivagem mesmo sem terem sido fecundados, existe uma forte relação da taxa de clivagem com a capacidade fecundante dos espermatozoides (KHARCHE; JHA, 2016). Portanto, as alterações de cromatina identificadas por esses dois métodos caracterizam sêmen com baixa capacidade de fertilização *in vitro*. Apesar de não ter uma

relação direta e absoluta com o desempenho de touros a campo, geralmente existe uma correlação entre a eficiência na PIVE e fertilidade do touro a campo (UTT, 2016), o que sugere que tais métodos possam provavelmente serem bons na identificação de touros com problemas de fertilidade ligados a falta de capacidade fecundantes de seus espermatozoides.

A metodologia de coloração de esfregaços com laranja de acridina, independente do tipo de microscópio utilizado na avaliação, demonstrou uma tendência de correlação negativa com a taxa de blastocisto. Existem duas maneira de se calcular a taxa de blastocisto: (1) a porcentagem de ovócitos inicialmente colocados para maturação e que chegaram a blastocisto e (2) a porcentagem de ovócitos que iniciaram a clivagem e chegaram a blastocisto. A primeira está relacionada com a eficiência da PIVE como um todo, fertilização e desenvolvimento embrionário. Já a segunda, a qual foi utilizada neste trabalho, estaria relacionada somente a capacidade do ovócito fecundado ter um desenvolvimento embrionário inicial satisfatório. Nesse caso a tendência de correlação identificada sugere que caso algum espermatozoide com alteração de cromatina fecunde um ovócito, este teria problemas no desenvolvimento embrionário inicial.

Outro método que a princípio seria de fácil aplicação e de baixíssimo custo seria o da “metacromasia induzida” em esfregaços de sêmen corados com azul de toluidina após hidrólise ácida (MELLO, 1982). Tal método originalmente utiliza avaliação visual dos espermatozoides, onde aquele corados de verde a azul claro são considerados portadores de cromatina normal e aqueles corados de azul escura a magenta são considerados portadores de alterações na cromatina (BELETTI; MELLO, 2004). Essa avaliação visual possui alto grau de subjetividade. Para reduzir esta subjetividade Beletti; Costa e Guardieiro (2005) criaram uma avaliação computacional de imagens digitais dos esfregaços, que permite quantificar a descompactação média e a heterogeneidade da cromatina dos espermatozoides de uma amostra de sêmen. Em 2018, Souza et al. propuseram uma classificação computacional de diferentes tipos de descompactação da cromatina, segundo a localização da área descompactada. Todas essas variações do uso do AT foram utilizadas neste trabalho.

A avaliação visual do esfregaço submetido a metacromasia induzida mostrou uma tendência de correlação negativa com a taxa de blastocisto, mas não com a taxa de clivagem. Ou seja, este método identificaria principalmente alterações que não interfeririam com a fecundação, mas sim com o desenvolvimento embrionário inicial.

A classificação dos tipos de descompactação conforme a localização da área descompactada mostrou que a somatória de todos os tipos de alterações e a alteração na base da cabeça tendem a ter correlação negativa tanto com a taxa de clivagem, como com a taxa de blastocisto, ou seja, essas alterações interfeririam tanto na fecundação como no desenvolvimento inicial. Semelhante a avaliação visual, a descompactação da metade basal da cabeça do

espermatozoide possui uma tendência de correlação apenas com a taxa de blastocisto, ou seja, esta alteração não interferiria na fecundação, mas sim no desenvolvimento embrionário inicial. As demais variáveis avaliadas na coloração com AT, não mostraram correlações significativas com os resultados das PIVEs, o que demonstra a ineficácia dessas variáveis na identificação de problemas de fertilidade em touros.

Apesar de não se demonstrar uma grande eficiência da coloração com AT, este método é o de mais fácil aplicação e o de menor custo.

A reação de Feulgen foi o primeiro método de avaliação da cromatina espermática associado com problemas de fertilidade em touros (GLEDHILL, 1966). No entanto, este método tem sido pouco utilizado por ser de interpretação subjetiva, já que a diferença entre os espermatozoides normais e com alteração na cromatina é dada pela diferença na intensidade da coloração. No presente trabalho, foi testada a avaliação visual subjetiva os esfregaços corados com Feulgen, bem como pela primeira vez foram adaptados os algoritmos de avaliação computacional originalmente utilizados com AT, para realizar uma avaliação mais objetiva da intensidade de coloração. Também foi realizada a classificação de diferentes tipos de descompactação de cromatina conforme a localização da área descompactada.

Assim como a contagem visual dos esfregaços corados com AT, a avaliação visual dos esfregaços corados com Feulgen apresentaram uma tendência de correlação negativa com a taxa de blastocisto, demonstrando que ambas as técnicas devem identificar alterações semelhantes. As altas correlações positivas encontradas entre essas duas técnicas (tabela 6), tanto para avaliação visual como para a maioria das características avaliadas computacionalmente, corrobora com esta afirmação.

A alteração na metade basal da cabeça identificada por Feulgen apresentou uma tendência de correlação negativa com a taxa de clivagem, porém não com a taxa de blastocisto, inversamente ao encontrado para a mesma alteração identificada por AT. Apesar desta diferença, a correlação positiva significativa entre a alteração na metade basal identificada pelas duas colorações (Tabela 6) é provável que a maioria dos espermatozoides com esta alteração identificados por AT sejam também identificados por Feulgen.

Assim como o AT, apesar do Feulgen não demonstrar uma grande eficiência na identificação de alterações na cromatina, é um método relativamente de fácil execução e de baixo custo. A coloração com AT mostrou-se mais rápida e com diferenciação visual menos subjetiva.

Quando comparado a avaliação visual por AT e Feulgen com as classificações das alterações conforme a localização das áreas descompactadas (tabela 7) foi detectada correlação positiva significativa entre a somatória dos espermatozoides com os diferentes tipos de descompactação cromatínica (SDC) e a avaliação visual (CV). Isso era esperado, pois na avaliação

visual não se faz a classificação, apenas é definido se o espermatozoide tem ou não alteração de cromatina. No entanto, também foi observada correlação positiva significativa da contagem visual (CV) com as alterações na metade basal (DMB) em ambas as técnicas, ou seja, a proporção de alterações na metade basal dentro o total de alterações é muito semelhante em todas as amostras avaliadas. Já a tendência de correlação positiva entre as avaliações visuais (CV) e as alterações na base (DB) em ambas as colorações, pode ser explicada por que este tipo de alteração é a mais abundante, portanto é a que mais influência o total de alterações, que é semelhante às avaliações visuais. A maior incidência de DB em espermatozoides está relacionada a uma estrutura conhecida como anel nuclear, localizado na base da cabeça dos espermatozoides, esta região apresenta uma cromatina menos compactada e mais sensível a alterações (WARD; COFFEY, 1989). Desta forma, a cromatina localizada no anel nuclear exposta a hidrólise ácida permite que mais moléculas de AT se liguem aos grupos fosfato do DNA e resultando no aparecimento da coloração magenta em cabeças de espermatozoides (BELETTI; COSTA; VIANA; 2004). Da mesma forma, no anel nuclear ocorrerá o aumento da depuração na fita de DNA, favorecendo o aumento da intensidade da coloração vermelho-púrpura pela coloração com reação de Feulgen.

Para verificar se as alterações identificadas por laranja de acridina (LA) e azul de toluidina (AT) são semelhantes, foi realizada a correlação entre essas características (tabela 8). Quase todas as variáveis mostraram ou correlação positiva significativa ou tendência a correlação positiva, demonstrando que existe grande similaridade entre as alterações identificadas por essas técnicas.

Semelhantemente ao que foi feito entre LA e AT, também foram calculadas as correlações entre as variáveis avaliadas com LA e com Feulgen (tabela 9). Neste caso, diminuíram as correlações e tendências à correlação, mostrando a princípio uma menor similaridade entre as alterações identificadas pelas duas técnicas. No entanto, quando se observa a tabela 2, é possível verificar que o AT e o LA identificam maior quantidade de alterações do que o Feulgen, o que pode ser interpretado como uma menor sensibilidade e, portanto, o Feulgen não estaria identificando alterações mais leves que o AT e o LA identificam.

Uma outra alternativa testada neste trabalho foi o uso da microscopia eletrônica de transmissão para identificação de alterações de cromatina espermática. Essa metodologia é de difícil execução e de altíssimo custo, pois tanto os insumos utilizados na preparação da amostra como o equipamento para avaliação são extremamente caros. Uma grama de tetróxido de ósmio atualmente vale mais de R\$ 4.000,00 e um microscópio novo pode custar mais de R\$7.000.000,00. Outro fator negativo é que somente é possível observar cortes de cabeças de espermatozoides com 60 a 90 nm de espessura, o que limita a área observada. Por isso faz-se necessário um grande número de cabeças avaliadas para minimizar este viés. No presente trabalho foram avaliadas aproximadamente 100 cabeças por amostra de sêmen.

As avaliações por MET apresentaram correlações negativas significativas dos graus G3 e G4 e da somatória de todos os graus de alterações com a taxa de blastocisto. Isso indica que as quando um espermatozoide portador dessas alterações consegue fecundar um ovócito, provavelmente interfira no desenvolvimento embrionário Inicial. O grau G2 mostrou apenas uma tendência de correlação negativa com a taxa de blastocisto, o que pode significar um possível comportamento semelhantes aos graus G3 e G4, no entanto com menor intensidade. Em contrapartida o Grau G1 mostrou uma tendência de correlação positiva com a taxa de blastocisto, demonstrando que este tipo de alteração não interfere em nada com o desenvolvimento embrionário inicial. Em relação a taxa de clivagem foi verificada apenas tendência de correlação negativa com o grau G3 e com a somatória de todos os graus. Isso demonstra que as alterações cromatínicas identificadas por MET interferem muito mais no desenvolvimento embrionário do que na capacidade fecundante dos espermatozoides, com exceção do grau G1.

Também foram calculadas as correlações entre as variáveis identificadas por MET e AT (tabela 11). Verificou-se que a avaliação visual com AT (CV) e a somatória dos tipos de alterações conforme a localização da área descompactada (SDC) possuem tendência à correlação positiva com a total de alterações identificadas por MET (SAC), demonstrando existir uma certa semelhança entre as alterações identificadas por essas variáveis. Já, a avaliação visual do AT (CV) e todos os tipos de alterações conforme a localização da área descompactada (SDC) mostraram coeficiente de correlação negativa com o grau G1, alguns significativos, outros com tendência e outros não significativos. Apesar destes valores negativos serem a princípio inesperados, levando em consideração a inexistência de correlação de G1 com a taxa de clivagem e uma tendência de correlação positiva com a taxa de blastocisto (tabela 5), isso demonstra que esse tipo de alteração pouco ou nada interferem negativamente os resultados das PIVEs e, portanto, não deve ser considerada uma alteração, mas sim, uma condição fisiológica. O mesmo raciocínio poderia ser seguido para o grau G2, o qual não apresentou correlação e nem tendência a correlação com qualquer variável identificada por AT. No entanto, este grau de alteração apresentou tendência a correlação negativa com a taxa de blastocisto, o que demonstra que essa condição não é fisiológica, mas uma alteração cromatínica. As alterações mais intensas identificadas por MET (graus G3 e G4) tiveram correlação positiva significativa com avaliação visual com AT (CV), a somatória dos tipos de alterações conforme a localização da área descompactada (SDC), descompactação na base (DB) e descompactação da metade basal (DMB). Isso demonstra que as alterações identificadas por AT são semelhantes aos graus G3 e G4 do MET. As variáveis descompactação no eixo central (DEC), descompactação total (DT) e descompactação base ápice não apresentaram correlação com qualquer das variáveis de MET. Isso não necessariamente significa que as alterações não sejam semelhantes, visto que a quantidade destas variáveis de AT

foram consideravelmente menores que DB e DMB.

As correlações entre as variáveis identificadas por MET e Feulgen tiveram comportamento semelhante as do MET e AT, porém com menor intensidade (coeficientes de correlação menores). Isso pode ser interpretado de forma semelhante ao que aconteceu com as correlações entre Feulgen e AO, ou seja, o Feulgen possui menor sensibilidade que o AT.

As duas técnicas que foram mais eficientes na identificação de problemas que influenciam a eficiência da PIVE (correlações negativas significativas com as taxas de clivagem e de blastocisto) foram a coloração com laranja de acridina e a microscopia eletrônica de transmissão. Para esclarecer se estas duas técnicas identificam alterações semelhantes, foi então realizada a correlação entre estes métodos. O grau G3 apresentou correlação positiva significativa com as avaliações da coloração com laranja de acridina independentemente do tipo de microscopia utilizado. Já os graus G4 e a somatória de todos os graus de alteração mostraram apenas tendência de correlação positiva com as avaliações com laranja de acridina. Tais achados demonstram que as alterações mais intensas identificadas por MET são semelhantes as identificadas por coloração com laranja de acridina.

Como neste trabalho foram utilizadas apenas quatro amostras de sêmen, faz-se necessário novos estudos com amostragem maior para que sejam confirmadas ou não todas as tendências aqui identificadas.

É importante compreender que neste trabalho os dados correlacionados com a produção de embriões *in vitro* apresentam relevância em experimentos *in vitro*, sob condições e meios de cultivos conhecidos e controlados. Portanto, não podemos simplesmente utilizar estes dados para expressar o comportamento *in vivo*, visto que processos biológicos envolvem a fertilização e o desenvolvimento embrionário e tais processos são influenciados por interferência ambiental e características individuais de cada animal, como a idade, estado nutricional e fatores genéticos. Apesar de não existir uma relação direta e absoluta com o desempenho de touros a campo, geralmente existe uma correlação, meso que fraca, entre a eficiência na PIVE e fertilidade do touro a campo (UTT, 2016).

Enfim, a escolha do método a ser utilizado para identificação de defeitos na cromatina espermática de touro, depende da estrutura disponível, disponibilidade de recursos financeiros e a familiaridade do profissional com o método a ser utilizado.

6. CONCLUSÃO

Todas as alterações de cromatina identificadas por qualquer que seja o método, interferem mais no desenvolvimento embrionário inicial do que na capacidade fecundante dos espermatozoides.

Dentre os métodos testados, a avaliação de alterações de cromatina por microscopia eletrônica de transmissão (MET) e a coloração com laranja de acridina (LA) avaliada em microscopia de fluorescência e microscopia confocal de varredura a laser foram os mais eficazes para identificar alterações de cromatina que interferem na eficiência da produção *in vitro* de embriões bovinos. No entanto, a MET apresenta limitações para a utilização em rotinas laboratoriais e a campo, visto que, é de altíssimo custo, necessita de longo período para o processamento da amostra e de um profissional qualificado para realização dessa técnica.

As técnicas que utilizam esfregaços corados com AT e Feulgen, mesmo sendo menos eficazes que MET e LA, são as de menor custo e podem ser utilizadas com relativa eficácia na identificação de alterações de cromatina espermática.

Referências bibliográficas

AITKEN, R. J. Reactive oxygen species as mediators of sperm capacitation and pathological damage. **Molecular Reproduction of Development**, v. 84, n. 10, p. 1039-1052, Oct. 2017. DOI: <https://doi.org/10.1002/mrd.22871> . Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/mrd.22871> . Acesso em: 09 agosto de 2022.

AITKEN, R. J; DREVET, J. R; MOAZAMIAN, A.; GHARAGOZLOO, P. Male Infertility and Oxidative Stress: A Focus on the Underlying Mechanisms. **Antioxidants (Basel)**, v. 11, n. 2, p.306, Feb. 2022. DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/antiox11020306> . Disponível em : <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8868102/> . Acesso em 3 de fevereiro de 2022.

ALVES, P. H. M. **Correlação entre alterações nucleares de espermatozoides de touro identificados por microscopia eletrônica de transmissão e a eficiência na produção *in vitro* de embriões**. 2016. 46 f. Orientador: Marcelo Emílio Beletti. Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias. Disponível em: <https://repositorio.ufu.br/bitstream/123456789/17991/1/Correla%C3%A7%C3%A3oEntreAlter%C3%A7%C3%B5es.pdf>

ANDERSSON, G. K. A.; KJELLSTRAND, P. T. T. A study of DNA depolymerisation during Feulgen acid hydrolysis. **Histochemistry**, v.43, n.2, p.123–130, Jun. 1975. DOI: <https://doi.org/10.1007/bf00492441> . Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/BF00492441#article-info> . Acesso em 3 de março de 2022.

BAHR, G. F.; ENGLER, W. F. Considerations of volume, mass, DNA, and arrangement of mitochondria in the midpiece of bull spermatozoa. **Experimental Cell Research**, v. 60, n. 3, p. 338–340, Jun. 1970. DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/0014-4827\(70\)90526-4](http://dx.doi.org/10.1016/0014-4827(70)90526-4) . Disponível em : <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/5422964/> Acesso em 12 de maio de 2022.

BALHORN, R. The protamine family of sperm nuclear proteins. **Genoma Biology**, v.8, n. 9, p. 227, 2007. Doi: <http://dx.doi.org/10.1186/gb-2007-8-9-227> Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17903313/> . Acesso em 13 de março de 2020.

BANLIAT, C.; MAHÉ, C.; LAVIGNE, R.; COM, E.; PINEAU, C.; LABAS, V.; GUYONNET, B.; MERMILLOD, P.; SAINT-DIZIER, M. Dynamic Changes in the Proteome of Early Bovine Embryos Developed *In Vivo*. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, v. 10, p. 863700, Mar. 2022. DOI: <http://dx.doi.org/10.3389/fcell.2022.863700> . Disponível em: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fcell.2022.863700/full> . Acesso em 09 de agosto de 2022.

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, March. 1996. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/240614010_Methodological_variants_contributing_to_detection_of_abnormal_DNA-protein_complexes_in_bull_spermatozoa . Acesso em 3 de fevereiro de 2022.

BELETTI, M. E.; MELLO, M. L. S. Comparison between the toluidina blue stain and the Feulgen

reaction for evaluation of rabbit sperm chromatin condensation and their relationship. **Theriogenology**, v.62, n. 3-4, p.398-402, Aug. 2004. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2003.10.016>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0093691X03004473?via%3Dihub>. Acesso em 13 de maio de 2022.

BELETTI, M. E.; COSTA, L. D. A. F.; VIANA, M. P. A computational approach to characterization of bovine sperm chromatin alterations. *Biotech Histochem*, v. 79, n. 1, p. 17-23, Feb. 2004. DOI: <https://doi.org/10.1080/10520290410001700774>. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/10520290410001700774>. Acesso em 15 de abril de 2022.

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 Morphology. Sciences**, v. 22, n.2, p.85-90, Jan. 2005. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/252360754_Morphometric_features_and_chromatin_condensation_abnormalities_evaluated_by_Toluidine_Blue_staining_in_bull_spermatozoa

BELETTI, M. E. Cromatina espermática: quebrando paradigmas. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.37, n. 2, p.92-96, 2013. Disponível em: [http://www.cbra.org.br/pages/publicacoes/rbra/v37n2/pag92-96%20\(RB465\).pdf](http://www.cbra.org.br/pages/publicacoes/rbra/v37n2/pag92-96%20(RB465).pdf). Acesso em 16 de julho de 2020.

BIANCHI, E.; WRIGHT, G. J. Find and fuse: Unsolved mysteries in sperm-egg recognition. **PLoS Biology**, v. 18, n. 11, p. e3000953, Nov. 2020. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3000953>. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7688107/>. Acesso em 08 e agosto de 2022.

BOERKE, A.; DIELEMAN, S. J.; GADELLA, B. M. A possible role for sperm RNA in early embryo development. **Theriogenology**, v.68, (Suppl 1), p.147–155, Sep. 2007. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2007.05.058>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0093691X07003068?via%3Dihub>. Acesso em: 20 de agosto.

BOERKE, A.; TSAI, P. S.; GARCIA-GIL, N.; BREWIS, I. A.; GADELLA, B. M. Capacitation-dependent reorganization of microdomains in the apical sperm head plasma membrane: Functional relationship with zona binding and the zona-induced acrosome reaction. **Theriogenology**, v. 70, n. 8, p. 1188–1196, Nov. 2008. doi: <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2008.06.021>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0093691X08004056?via%3Dihub>. Acesso em 08 de agosto de 2022.

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

BRAUN, R. E. Packaging paternal chromosomes with protamine. **Nature Genetics**, v. 28, p. 10-12, May. 2001. DOI: <https://doi.org/10.1038/ng0501-10>. Disponível em: https://www.nature.com/articles/ng0501_10. Acesso em 15 de março de 2020.

BREININGER, E.; CETICA, P. D.; BECONI, M. T. Capacitation inducers act through diverse intracellular mechanisms in cryopreserved bovine sperm. **Theriogenology**. v. 74, n. 6, p. 1036-

49, Oct. 2010. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2010.04.034> . Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0093691X10002451?via%3Dihub> . Acesso em 07 de agosto de 2022.

CASTILLO, J.; AMARAL, A.; AZPIAZU, R.; VAVOURI, T.; ESTANYOL, J. M.; BALLESCA, J. L.; OLIVA, R. Genomic and proteomic dissection and characterization of the human sperm chromatin. **Molecular Human Reproduction**, v. 20, n. 11, p.1041–1053, Nov. 2014. DOI: <https://doi.org/10.1093/molehr/gau079> . Disponível em: <https://academic.oup.com/molehr/article-lookup/doi/10.1093/molehr/gau079> . Acesso em: 10 de julho de 2020.

CASTRO, L. S.; SIQUEIRA, A. F. P.; HAMILTON, T. R. S.; MENDES, C. M.; VISINTIN, J. A.; ASSUMPCÃO, M. E. O. A. . Effect of bovine sperm chromatin integrity evaluated using three different methods on *in vitro* fertility. **Theriogenology**, v. 107, p. 142-148, Feb. 2018. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2017.11.006> Disponível em : <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0093691X1730540X?via%3Dihub> . Acesso em 22 de janeiro de 2022.

CATENA, R.; RONFANI, L.; SASSONE-CORSI, P.; DAVIDSON, I. Changes in intranuclear chromatin architecture induce bipolar nuclear localization of histone variant H1T2 in male haploid spermatids. **Development Biology**, v. 296, n. 1, p. 231–238, Aug. 2006. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2006.04.458> Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0012160606007573> . Acesso em: 10 de maio de 2020.

CHATTERJEE, N.; WALKER, G. C. Mechanisms of DNA damage, repair, and mutagenesis. **Environmental and Molecular Mutagen**, v. 58, n. 5, p. 235-263, Jun. 2017. DOI: <https://doi.org/10.1002/em.22087> Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/em.22087> . Acesso em : 02/08/2022.

COLLAS, P.; POCCIA, D. Remodeling the sperm nucleus into a male pronucleus at fertilization. **Theriogenology**, v.49, n. 1, p. 67–81, Jan. 1998. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(97\)00403-2](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(97)00403-2) Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0093691X97004032> . Acesso em: 10 de abril de 2020.

COLLODEL, G.; FERRETTI, F.; MASINI, M.; GUALTIERI, G.; MORETTI, E. Influence of age on sperm characteristics evaluated by light and electron microscopies. **Scientific Reports**, v. 11, n. 1, p. 4989, march. 2021. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-021-84051-w>. Disponível em : <https://www.nature.com/articles/s41598-021-84051-w#article-info>. Acesso em 12 de maio de 2022.

CORDELLI, E.; ELEUTERI, P.; LETER, G.; RESCIA, M.; SPANÒ, M. Flow cytometry applications in the evaluation of sperm quality: semen analysis, sperm function and DNA integrity. **Contraception**, v. 72, n. 4, p. 273-279, Oct. 2005. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.contraception.2005.03.004> Disponível em : [https://www.contraceptionjournal.org/article/S0010-7824\(05\)00090-9/fulltext](https://www.contraceptionjournal.org/article/S0010-7824(05)00090-9/fulltext) Acesso em 16 de fevereiro de 2022.

CRUZ, R. E. S.; BELETTI, M. E.; TRAVENÇOLO, B. A. N. Using image analysis and processing for morphological characterization of bovine spermatozoa. In: **X Workshop de Visão**

Computacional, 2014, Uberlândia. Proceedings X Workshop de Visão Computacional, 2014, p. 270-274.

DADA, R. Sperm DNA damage diagnostics: when and why. **Translational andrology and urology**, v. 6, n.4, p. 691–S694, Sep. 2017. DOI: <https://doi.org/10.21037/tau.2017.05.26>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29082201/>. Acesso em 12 de novembro de 2021.

DAIGNEAULT, B. W. Dynamics of paternal contributions to early embryo development in large animals. **Biology of Reproduction**, v. 104, n. 2, p. 274-281, Feb. 2021. DOI: <https://doi.org/10.1093/biolre/ioaa182>. Disponível em: <https://academic.oup.com/biolreprod/article/104/2/274/5913243?login=false>. Acesso em 10 de agosto de 2022.

DARZYNKIEWICZ, Z.; TRAGANOS, F.; SHARPLESS, T.; MELAMED, M. R. Thermal denaturation of DNA in situ as studied by acridine orange staining and automated cytofluorometry. **Experimental Cell Research**, v. 90, n. 2, p. 411–428, Feb. 1975. DOI: [https://doi.org/10.1016/0014-4827\(75\)90331-6](https://doi.org/10.1016/0014-4827(75)90331-6). Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/0014482775903316>. Acesso em 12 de fevereiro de 2022.

DARZYNKIEWICZ, Z. Differential staining of DNA and RNA in intact cells and isolated cell nuclei with acridine orange. **Methods Cell Biology**, v. 33, p. 285–98. 1990. DOI: [https://doi.org/10.1016/s0091-679x\(08\)60532-4](https://doi.org/10.1016/s0091-679x(08)60532-4). Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1707487/>. Acesso em 12 de abril de 2022.

DENEKE, V. E.; PAULI, A. The Fertilization Enigma: How Sperm and Egg Fuse. **Annual Reviews of Cells and Developmental Biology**, v. 37, p. 391-414, Oct. 2021. DOI: <https://doi.org/10.1146/annurev-cellbio-120219-021751>. Disponível em: https://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev-cellbio-120219-021751?url_ver=Z39.88-2003&rfr_id=ori%3Arid%3Aacrossref.org&rfr_dat=cr_pub++0pubmed. Acesso em 07 de agosto de 2022.

DI STEPHANO, H. S. A cytochemical study of the Feulgen nuclear reaction. **Proceeding of the National Academy of Sciences**, v.34, n. 3, p. 75–80, Mar. 1948. DOI: <https://doi.org/10.1073/pnas.34.3.75>. Disponível em: https://www.pnas.org/doi/10.1073/pnas.34.3.75?url_ver=Z39.88-2003&rfr_id=ori%3Arid%3Aacrossref.org&rfr_dat=cr_pub++0pubmed

DUTTA, S.; HENKEL, R.; AGARWAL, A. Comparative analysis of tests used to assess sperm chromatin integrity and DNA fragmentation. **Andrologia**, v. 53, n. 2, p.13718, Mar. 2021. doi: <https://doi.org/10.1111/and.13718>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32628294/>. Acesso em 13 de fevereiro de 2022.

D'OCCHIO, M. J, HENGSTBERGER, K. J, JOHNSTON, S. D. Biology of sperm chromatin structure and relationship to male fertility and embryonic survival. **Animal Reproduction Science**, v. 101, n. 1-2, p. 1-17, Sep. 2007. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2007.01.005>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0378432007000097?via%3Dihub>. Acesso em 12 de agosto de 2022.

DONKIN, I.; BARRÈS, R. Sperm epigenetics and influence of environmental factors. **Molecular Metabolism**, v. 14, p. 1-11, Aug. 2018. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.molmet.2018.02.006>.

Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2212877818301042?via%3Dihub>. Acesso em 8 de fevereiro de 2022.

EL-SHERRY, T. M.; ELSAYED, M.; ABDELHAFEZ, H. K.; ABDELGAWAD, M. Characterization of rheotaxis of bull sperm using microfluidics. *Integrative Biology*, v. 6, n. 12, p. 1111–1121, Dec. 2014. DOI: <https://doi.org/10.1039/c4ib00196f>. Disponível em: <https://academic.oup.com/ib/article-abstract/6/12/1111/5199211?redirectedFrom=fulltext&login=false>. Acesso em: 08/08/2022.

ERENPREISA, J.; KRIGERTS, J.; SALMINA, K.; SELGA, T.; SOROKINS, H.; FREIVALDS, T. Differential staining of peripheral nuclear chromatin with Acridine orange implies an A-form epichromatin conformation of the DNA. *Nucleus*, v. 9, n. 1, p. 171–181. 2018. DOI: <https://doi.org/10.1080/19491034.2018.1431081>. Acesso em 10 de fevereiro de 2022.

ESTEVES, S. C.; ZINI, A.; COWARD, R. M.; EVENSON, D. P.; GOSÁLVEZ, J.; LEWIS, S. E. M.; SHARMA, R.; HUMAIDAN, P. Sperm DNA fragmentation testing: Summary evidence and clinical practice recommendations. *Andrologia*, v. 53, n. 2, p. 13874, Mar. 2021. DOI: <https://doi.org/10.1111/and.13874>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33108829/>. Acesso em 10 de novembro de 2021.

EVENSON, D. P.; DARZYNKIEWICZ, Z.; MELAMED, M. R. Comparison of human and mouse sperm chromatin structure by flow cytometry. *Chromosoma*, v. 78, n. 2, p. 225–238. 1980. DOI: <https://doi.org/10.1007/bf00328394>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7389511/>.

EVENSON, D.P., HIGGINS, P.H., GRUENEBERG, D., BALLACHEY, B. Flow cytometric analysis of mouse spermatogenic function following exposure to ethylnitrosourea. *Cytometry*, v. 6, n. 3, p. 238–253, May. 1985. DOI: <https://doi.org/10.1002/cyto.990060311>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3996139/> Acesso em 12 de fevereiro de 2022.

EVENSON, D. P.; JOST, L. K.; MARSHALL, D.; ZINAMAN, M. J.; CLEGG, E.; PURVIS, K.; DE ANGELIS, P.; CLAUSSEN, O. P. Utility of the sperm chromatin structure assay as a diagnostic and prognostic tool in the human fertility clinic. *Hum reproduction*, v. 14, n. 4, p. 1039–49, Apr. 1999. DOI: <https://doi.org/10.1093/humrep/14.4.1039>. Disponível em: <https://academic.oup.com/humrep/article-lookup/doi/10.1093/humrep/14.4.1039> Acesso em 16 de fevereiro de 2022.

EVENSON, D.; JOST, L. Sperm chromatin structure assay is useful for fertility assessment. *Methods in cell Science*, v. 22, n. 2-3, p.169–189. 2000. DOI: <https://doi.org/10.1023/a:1009844109023>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11264952/>. Acesso em 22 de janeiro de 2022.

EVENSON, D. P.; JOST, L. K.; CORZETT, M.; BALHORN, R. Characteristics of human sperm chromatin structure following an episode of influenza and high fever: a case study. *Journal Andrology*, v. 21, n. 5, p. 739–746. Sep/Oct. 2000. DOI: <https://doi.org/10.1002/j.1939-4640.2000.tb02142.x>. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/j.1939-4640.2000.tb02142.x?sid=nlm%3Apubmed> Acesso em 14 de fevereiro de 2022.

EVENSON, D. P.; LARSON, K.; JOST, L. K. The sperm chromatin structure assay: its clinical use for detecting sperm DNA fragmentation related to male infertility and comparisons with other techniques. *Journal Andrology*, v. 23, n. 1, p. 25–43, Feb. 2002. DOI:

<https://doi.org/10.1002/j.1939-4640.2002.tb02599.x>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11780920/> Acesso em 16 de fevereiro de 2022.

EVENSON, D. P. The Sperm Chromatin Structure Assay (SCSA®) and Other sperm DNA fragmentation tests for evaluation of sperm nuclear DNA integrity as related to fertility. **Animal Reproduction Science**, v. 169, p. 56–75, Jun. 2016. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2016.01.017>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26919909/> . Acesso em 4 de fevereiro de 2022.

FAHRENKAMP, E.; ALGARRA, B.; JOVINE, L. Mammalian egg coat modifications and the block to polyspermy. **Molecular Reproductive and Development**, v. 87, n. 3, p. 326-340, Mar. 2020. DOI: <https://doi.org/10.1002/mrd.23320> . Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7155028/> . Acesso em 09 de agosto de 2022.

FERNÁNDEZ, S.; CÓRDOBA, M. Hyaluronic acid as capacitation inductor: metabolic changes and membrane-associated adenylate cyclase regulation. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 49, n. 6, p. 941-6, Dec. 2014. DOI: <https://doi.org/10.1111/rda.12410> . Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/rda.12410> . Acesso em 09 de agosto de 2022.

FERRAMOSCA, A.; ZARA, V. Bioenergetics of mammalian sperm capacitation. **BioMed Research International**, v. 2014, p. 902953, Mar. 2014. DOI: <https://doi.org/10.1155/2014/902953> . Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3984864/> . Acesso em 07 de agosto de 2022.

FERRÉ, L. B.; BOGLIOTTI, Y.; CHITWOOD, J. L.; FRESNO, C.; ORTEGA, H. H.; KJELLAND, M. E.; ROSS, P. J. Effect of spermatozoa motility hyperactivation factors and gamete coincubation duration on *in vitro* bovine embryo development using flow cytometrically sorted spermatozoa. **Reproduction, Fertility and development**, v. 29, n. 4, p. 805-814, Dev. 2017. DOI: <https://doi.org/10.1071/RD15289> . Disponível em: <https://www.publish.csiro.au/RD/RD15289> . Acesso em 07 de agosto de 2022.

FEULGEN, R.; ROSSENBECK, H. Mikroskopisch-chemischer nachweis einer nucleinsäure vom typus der thymonucleinsäure und die darauf beruhende elektive färbung von zellkernn in mikroskopischen preparaten. **Hoppe-Seyler's z. Physiology. Chemistry**, v. 135, p. 203-248. 1924. DOI: <https://doi.org/10.1515/bchm2.1924.135.5-6.203>. Disponível em: <https://www.degruyter.com/document/doi/10.1515/bchm2.1924.135.5-6.203/html>. Acesso em 3 de março de 2022.

FILHO, R. M.; BELETTI, M. E.; DE OLIVEIRA, F. Ultrastructure of bovine sperm chromatin. **Microscopy research and technique**, v. 78, n. 12, p. 1117–1120, Dec. 2015. DOI: <https://doi.org/10.1002/jemt.22593> . Disponível em : <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26515508/> Acesso em 12 de maio de 2022.

FUKUDA, M.; SAKASE, M.; FUKUSHIMA, M.; HARAYAMA, H. Changes of IZUMO1 in bull spermatozoa during the maturation, acrosome reaction, and cryopreservation. **Theriogenology**. v. 86, n. 9, p. 2179-2188.e3, Dec. 2016. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2016.07.010> . Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0093691X16303041?via%3Dihub> . Acesso em 09 de agosto de 2022.

GARCÍA-RODRÍGUEZ, A.; GOSÁLVEZ, J.; AGARWAL, A.; ROY, R.; JOHNSTON, S. DNA Damage and Repair in Human Reproductive Cells. **International Journal of Molecular**

Sciences, v. 20, n. 1, p. 31, Dec. 2018. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms20010031> Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6337641/> .Acesso em 9 de fevereiro de 2022.

GLEDHILL, B. L.; GLEDHILL, M. P.; RIGLER, J. R.; RINGERTZ, N. R. Changes in deoxyribonucleoprotein during spermiogenesis in the bull. **Experimental Cell Research**, v. 41, n. 3, p. 652-665, Mar. 1966. DOI: [https://doi.org/10.1016/s0014-4827\(66\)80116-7](https://doi.org/10.1016/s0014-4827(66)80116-7). Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/4952052/> . Acesso em 3 março de 2022.

GLEDHILL, J. E. Studies on DNA content, dry mass and optical area of ejaculated spermatozoal heads from bulls with normal and lowered fertility. **Acta veterinaria Scandinavica**, v. 7, n. 2, p. 166-174. 1966. DOI: <https://doi.org/10.1186/BF03547107>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/5912476/> Acesso em 3 março de 2022.

GORDON, J. A. R.; GRANDY, R. A.; LIAN, J. B.; STEIN, J. L.; VAN WIJNEN, A. J.; STEIN, G. S. Chromatin. In: ANDERSON, W.W. et al. **Brenner's Encyclopedia of Genetics**. 2ª Ed.. Elsevier. 2013, p. 538-541. DOI: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374984-0.00235-7> .

GRAF, A.; KREBS, S.; ZAKHARTCHENKO, V.; SCHWALB, B.; BLUM, H.; WOLF, E. Fine mapping of genome activation in bovine embryos by RNA sequencing. **Proceedings of the National Academy of Sciences U S A**, v. 111, n. 11, p. 4139-44, Mar. 2014. DOI: <https://doi.org/10.1073/pnas.1321569111> . Disponível em: https://www.pnas.org/doi/10.1073/pnas.1321569111?url_ver=Z39.88-2003&rfr_id=ori:rid:crossref.org&rfr_dat=cr_pub%20%20pubmed . Acesso em 12 de agosto de 2022.

GUALTIERI, R.; KALTHUR, G.; BARBATO, V.; LONGOBARDI, S.; DI RELLA, F.; ADIGA, S. K.; TALEVI, R. Sperm Oxidative Stress during *In Vitro* Manipulation and Its Effects on Sperm Function and Embryo Development. **Antioxidants**, Basel, Switzerland, v. 10, n. 7, p. 1025. Jun. 2021. DOI: <https://doi.org/10.3390/antiox10071025>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34202126/>. Acesso em 9 de fevereiro de 2022.

GUNES, S.; AL-SADAAN, M.; AGARWAL, A. Spermatogenesis, DNA damage and DNA repair mechanisms in male infertility. **Reproductive BioMedicine Online**, v. 31, n. 3, p. 309–319, Sep. 2015. doi: <https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2015.06.010> Disponível em: [https://www.rbmojournal.com/article/S1472-6483\(15\)00304-1/fulltext](https://www.rbmojournal.com/article/S1472-6483(15)00304-1/fulltext) Acesso em: 02 agosto de 2022.

HAMAD, M. F. Quantification of histones and protamines mRNA transcripts in sperms of infertile couples and their impact on sperm's quality and chromatin integrity. **Reprod Biol**, v. 19, n. 1, p. 6-13, Mar. 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.repbio.2019.03.001> . Disponível: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1642431X18303401?via%3Dihub> . Acesso em: 13 de junho.

HAMILTON, T. R. S.; SIMÕES, R.; MENDES, C. M.; GOISSIS, M. D.; NAKAJIMA, E.; MARTINS, E. A. L.; VISINTIN, J. A.; ASSUMPÇÃO, M. E. O. A. Detection of protamine 2 in bovine spermatozoa and testicles. **Andrology**, v.7, n. 3, p. :373-381, May. 2019. DOI: <https://doi.org/10.1111/andr.12610> . Disponível em : <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/andr.12610> . Acesso em: 02de agosto de 2022.

HAMMOUD, S. S.; NIX, D. A.; HAMMOUD, A. O.; GIBSON, M.; CAIRNS, B. R.; CARRELL, D. T. Genome-wide analysis identifies changes in histone retention and epigenetic modifications

at developmental and imprinted gene loci in the sperm of infertile men. **Human Reproduction**, v. 26, n. 9, p. 2558–2569, Sep. 2011. DOI: <https://doi.org/10.1093/humrep/der192> . Disponível em: <https://academic.oup.com/humrep/article/26/9/2558/721066?login=false> . Acesso em: 18 de julho de 2020.

HENIKOFF, S.; SMITH, M. M. Histone variants and epigenetics. **Cold Spring Harb Perspect Biol**, v.7, n. 1, p. 019364, Jan. 2015. DOI: <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a0193644> . Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4292162/#:~:text=Histones%20package%20and%20compact%20DNA%20by%20assembling%20into%20nucleosome%20core%20particles.&text=Investigations%20into%20the%20evolution%2C%20structure,processes%20and%20in%20epigenetic%20memory> . Acesso em: 15 de agosto de 2020.

HERNÁNDEZ-FALCÓ, M.; SÁEZ-ESPINOSA, P.; LÓPEZ-BOTELLA, A.; AIZPURUA, J.; GÓMEZ-TORRES, M. J. The Role of Sperm Proteins IZUMO1 and TMEM95 in Mammalian Fertilization: A Systematic Review. **International Journal of Molecular Sciences**; v.23, n. 7, p. 3929, Apr. 2022. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms23073929> . Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8999778/> . Acesso em: 02 de agosto de 2022.

HUTCHISON, J. M.; RAU, D. C.; DEROUCHÉY, J. E.; Role of Disulfide Bonds on DNA Packaging Forces in Bull Sperm Chromatin. *Biophysical Journal*, v. 113, n. 9, p. 1925-1933, Nov. 2017. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2017.08.050> . Disponível em: [https://www.cell.com/biophysj/fulltext/S0006-3495\(17\)30979-7](https://www.cell.com/biophysj/fulltext/S0006-3495(17)30979-7) . Acesso em: 02 agosto de 2022.

JIANG, Z.; SUN, J.; DONG, H.; LUO, O.; ZHENG, X.; OBERGFELL, C.; TANG, Y.; BI, J.; O'NEILL, R.; RUAN, Y.; CHEN, J.; TIAN, X.C. Transcriptional profiles of bovine in vivo pre-implantation development. **BMC Genomics**, v. 15, n. 1, p. 756, Sep. 2014. DOI: <https://doi.org/10.1186/1471-2164-15-756> . Disponível em: <https://bmcbgenomics.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2164-15-756> . Acesso em 12 de agosto de 2022.

KHARCHE, S. D.; JHA, B, K. Parthenogenesis. In: Steinhoff G, editors. *Regenerative Medicine - from Protocol to Patient*, eds 3. Cham: Springer, 2016, p. 425-48. https://doi.org/10.1007/978-3-319-27610-6_16.

KIEFER, H.; SELLEM, E.; BONNET-GARNIER, A.; PANNETIER, M.; COSTES, V.; SCHIBLER, L.; JAMMES, H. The epigenome of male germ cells and the programming of phenotypes in cattle. **Animal Frontiers**, v. 11, n. 6, p. 28-38, Dec. 2021. DOI: <https://doi.org/10.1093/af/vfab062> . Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8683155/> . Acesso em 12 de agosto de 2022.

KUMARESAN, A.; DAS GUPTA, M.; DATTA, T. K.; MORRELL, J. M. Sperm DNA Integrity and Male Fertility in Farm Animals: A Review. **Frontiers in veterinary science**, v. 7, p. 321, Jun. 2020. DOI: <https://doi.org/10.3389/fvets.2020.00321>. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fvets.2020.00321/full> . Acesso em 22 de novembro de 2021.

KUTCHY; N. A.; MENEZES, E. S. B.; UGUR, M. R.; UL HUSNA, A.; ELDEBAKY, H.; EVANS, H. C.; BEATY, E.; SANTOS, F. C.; TAN, W.; WILLS, R. W.; TOPPER, E.; KAYA, A.; MOURA, A. A.; MEMILI, E. Sperm cellular and nuclear dynamics associated with bull fertility. **Animal Reproduction Science**, v. 211, p. 106203, Dec. 2019. DOI:

<https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2019.106203>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0378432019304932?via%3Dihub>. Acesso em: 02 agosto de 2022.

LAMBARD, S.; GALERAUD-DENIS, I.; MARTIN, G.; LEVY, R.; CHOCAT, A.; CARREAU, S. Analysis and significance of mRNA in human ejaculated sperm from normozoospermic donors: relationship to sperm motility and capacitation. **Molecular Human Reproduction**, v.10, n. 7, p.535–541, Jul. 2004. DOI: <https://doi.org/10.1093/molehr/gah064>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15100385/>. Acesso em: 13 de abril de 2020.

LEFIÈVRE, L.; BEDU-ADDO, K.; CONNER, S. J.; MACHADO-OLIVEIRA, G. S.; CHEN, Y.; KIRKMAN-BROWN, J. C.; AFNAN, M. A.; PUBLICOVER, S. J.; FORD, W. C.; BARRATT, C. L. Counting sperm does not add up any more: Time for a new equation?. **Reproduction**, v. 133, n. 4, p. 675–684, Apr. 2007. DOI: <https://doi.org/10.1530/REP-06-0332>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17504912/>. Acesso em 9 de fevereiro de 2022.

LEUNG, M. R.; RAVI, R. T.; GADELLA, B. M.; ZEEV-BEN-MORDEHAI, T. Membrane Remodeling and Matrix Dispersal Intermediates During Mammalian Acrosomal Exocytosis. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, v. 9, p. 765673, Dec. 2021. DOI: <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.765673>. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fcell.2021.765673/full>. Acesso em 08 de agosto de 2022.

LISHKO, P. V.; MANNOWETZ, N. CatSper: A Unique Calcium Channel of the Sperm Flagellum. **Current Opinion in Physiology**, v. 2, p. 109-113, Apr. 2018. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cophys.2018.02.004>. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5914511/>. Acesso em: 07 de agosto de 2022.

LIU, D.; KEIJZERS, G.; RASMUSSEN, L. J. DNA mismatch repair and its many roles in eukaryotic cells. **Mutation Research/Reviews in Mutation Research**, v. 773, p. 174–187, . 2017. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2017.07.001>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1383574217300339?via%3Dihub>. Acesso em 02 de agosto de 2022

LONERGAN, P.; FAIR, T.; FORDE, N.; RIZOS, D. Embryo development in dairy cattle. **Theriogenology**, v. 86, n. 1, p. 270-7, Jul. 2016. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2016.04.040>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0093691X16300796?via%3Dihub>. Acesso em: 09 de agosto de 2022.

LUCIO, A. C.; ALVES, B. G.; ALVES, K. A.; MARTINS, M. C.; BRAGA, L. S.; MIGLIO, L.; ALVES, B. G.; SILVA, T. H.; JACOMINI, J. O.; BELETTI, M. E. Selected sperm traits are simultaneously altered after scrotal heat stress and play specific roles in *in vitro* fertilization and embryonic development. **Theriogenology**, v. 86, n. 4, p. 924-933, Sep. 2016. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2016.03.015>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0093691X16001321?via%3Dihub>. Acesso em 14 de novembro de 2021.

MAHAJAN, A.; SHARMA, P.; MISHRA, A. K.; GUPTA, S.; YADAV, S.; ANAND, M.; YADAV, B.; MADAN, A. K.; SWAIN, D. K. Interplay mechanisms between progesterone and endocannabinoid receptors in regulating bull sperm capacitation and acrosome reaction. **Journal of Cellular Physiology**, v. 237, n. 7, p. 2888-2912, Jul. 2022. DOI:

<https://doi.org/10.1002/jcp.30753> . Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/jcp.30753> . Acesso em 08 de agosto de 2022.

MALATESTA, M. Transmission Electron Microscopy as a Powerful Tool to Investigate the Interaction of Nanoparticles with Subcellular Structures. **International journal of molecular sciences**, v. 22, n. 23, p. 12789, Nov. 2021. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms222312789>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34884592/> . Acesso em 12 de maio de 2022.

MARTINS, M. C.; GONÇALVES, L. M.; NONATO, A.; TRAVENÇOLO, B. A. N.; ALVES, B. G.; BELETTI, M. E. Sperm head morphometry and chromatin condensation are in constant change at seminiferous tubules, epididymis, and ductus deferens in bulls. **Theriogenology**, v. 161, p. 200-209, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2020.12.004> Disponível em : <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0093691X20306361?via%3Dihub> . Acesso em 4 de abril de 2022.

MARTON, L. Early application of electron microscopy to biology. **Ultramicroscopy**, v. 1, n. 4, p. 281–296, Sep/ Oct. 1976. DOI: [https://doi.org/10.1016/0304-3991\(76\)90046-2](https://doi.org/10.1016/0304-3991(76)90046-2). Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/0304399176900462?via%3Dihub> Acesso 12 de maio de 2022.

MCKINNON, K. M. Flow Cytometry: An Overview. **Current Protocols Immunology**, v.120, p. 5.1.1-5.1.11, Feb. 2018. DOI: <https://www.doi.org/10.1002/cpim.40> . Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5939936/> . Acesso em 10 de fevereiro de 2022.

MCLAY , D. W.; CLARKE, H. J. Remodelling the paternal chromatin at fertilization in mammals. **Reproduction**, v. 125, n. 5, p. 625-33, May. 2003. DOI: <https://www.doi.org/%2010.1530/rep.0.1250625> . Disponível em: <https://rep.bioscientifica.com/view/journals/rep/125/5/625.xml> . Acesso em: 04 de junho de 2020.

MELLO, M. L. S.; ZANARDI, V. A. Dados cariometricos em espermatozoides de touro: influência de diferentes fixadores e tempos de hidrólise. **Ciência e cultura**, v. 28, n. 5, p. 551-554, Jan. 1976a. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/240613435_Dados_cariometricos_em_espermatozoides_de_touro_influencia_de_diferentes_fixadores_e_tempos_de_hidrólise Acesso em 3 março de 2022.

MELLO, M. L. S.; ZANARDI, V. A. Feulgen-DNA plug and two-wavelength cytophotometry of bull spermatozoa. **Mikroskopie**, v. 32, n. 5-6, p. 129-137, Aug. 1976b. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/22181687_Feulgen_DNA_plug_and_two_wavelength_cytophotometry_of_bull_spermatozoa Acesso em 3 março de 2022.

MELLO, M. L. S.; VIDAL, M. B. C. A reação de Feulgen. **Ciência e cultura**, v.30, n. 6, p.665-676, Jan. 1978. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/240613502_A_reacao_de_Feulgen. Acesso em 3 de março de 2022.

MELLO, M. L. S. Induced metachromasia in bull spermatozoa. **Histochemistry**, v.74, n.3, p.387–392, Sep. 1982. DOI: <https://doi.org/10.1007/BF00493438> Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/BF00493438#article-info>. Acesso em 2 fevereiro de 2022.

MELLO, M. L. S.; VIDAL, B. C. The Feulgen reaction: A brief review and new perspectives. **Acta Histochemica**, v. 119, n. 6, p. 603-609, Jul. 2017. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.acthis.2017.07.002> Disponível em : <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0065128117301617?via%3Dihub> . Acesso em 3 de março de 2022

MEMILI, E.; FIRST, N. L. Zygotic and embryonic gene expression in cow: a review of timing and mechanisms of early gene expression as compared with other species. **Zygote**, v.8, n.1, p.87-96, Feb. 2000. DOI: <http://dx.doi.org/10.1017/s0967199400000861> . Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10840878/>. Acesso em: 28 de julho de 2020.

MOHAMMED, E.; M; MOSAD, E.; ZAHRAN, A. Z.; HAMEED, D. A.; TAHA, E. A.; MOHAMED, M. A. Acridine Orange and Flow Cytometry: Which Is Better to Measure the Effect of Varicocele on Sperm DNA Integrity?. **Advances in Urology**. v.2015, p. 814150, Nov. 2015. doi: <http://dx.doi.org/10.1155/2015/814150> Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26681938/>. Acesso em 12 de abril de 2022.

MORETTI, E.; SUTERA, G.; COLLODEL, G. The importance of transmission electron microscopy analysis of spermatozoa: Diagnostic applications and basic. **Systems biology in reproductive medicine**, v. 62, n. 3, p. 171–183, Mar. 2016. DOI:<http://dx.doi.org/10.3109/19396368.2016.1155242>. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.3109/19396368.2016.1155242>. Acesso em 12 de maio de 2022.

MORGAN, H. D.; SANTOS, F.; GREEN, K.; DEAN, W.; REIK, W. Epigenetic reprogramming in mammals. **Human Molecular Genetics**, v. 14, n. 1, p. R47-58, Apr. 2005. DOI: <http://dx.doi.org/10.1093/hmg/ddi114> . Disponível em: https://academic.oup.com/hmg/article/14/suppl_1/R47/560895?login=false . Acesso em 11 de agosto de 2022.

MOSTEK, A.; JANTA, A.; MAJEWSKA, A.; CIERESZKO, A. Bull Sperm Capacitation Is Accompanied by Redox Modifications of Proteins. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 15, p. 7903, Jul. 2021. DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/ijms22157903> . Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8347624/> . Acesso em: 07 agosto de 2022.

MOURRAIN, L.; BOISSONNEAULT, G. DNA Repair in Haploid Context. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 22, p. 12418, Nov. 2021. DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/ijms222212418> Disponível em: <https://www.mdpi.com/1422-0067/22/22/12418> Acesso em 02 agosto de 2022.

NANASSY, L.; LIU, L.; GRIFFIN, J.; CARRELL, D. T. The clinical utility of the protamine 1/ protamine 2 ratio in sperm. **Protein Pept Lett**, v. 18, n. 8 p.772–777, Aug. 2011. DOI: <https://doi.org/10.2174/092986611795713934>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21443494/> . Acesso em: 21 de agosto de 2020.

NI, K.; SPIESS, A. N.; SCHUPPE, H. C.; STEGER, K. The impact of sperm protamine deficiency and sperm DNA damage on human male fertility: a systematic review and meta-analysis. **Andrology**, v.4, n. 5, p.789–799, May. 2016. DOI: <https://doi.org/10.1111/andr.12216> . Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27231200/> . Acesso em: 22 de agosto de 2020.

NOBLANC, A.; DAMON-SOUBEYRAND, C.; KARRICH, B.; HENRY-BERGER, J.; CADET, R.; SAEZ, F.; GUITON, R.; JANNY, L.; PONS-REJRAJI, H.; ALVAREZ, J. G.; DREVET, J. R.; KOCER, A. DNA oxidative damage in mammalian spermatozoa: where and why is the male nucleus affected?. **Free Radical Biology & Medicine**; v. 65, p. 719-723, Dec. 2013. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2013.07.044> . Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0891584913003973?via%3Dihub> . Acesso em 12 de agosto de 2022.

OEHNINGER, S.; OMBELET, W. Limits of current male fertility testing. **Fertility and Sterility**, v. 111, n. 5, p. 835–841, May. 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2019.03.005>. Disponível em: [https://www.fertstert.org/article/S0015-0282\(19\)30248-1/fulltext](https://www.fertstert.org/article/S0015-0282(19)30248-1/fulltext). Acesso em 9 de fevereiro de 2022.

OKADA, Y.; YAMAGUCHI, K. Epigenetic modifications and reprogramming in paternal pronucleus: sperm, preimplantation embryo, and beyond. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 74, n. 11, p. 1957-1967, Jun. 2017. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00018-016-2447-z> . Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00018-016-2447-z> . Acesso em 11 de agosto de 2022.

OLIVA, R. Protamines and male infertility. **Human Reproduction Update**, v.12, n.4, p. 417–435, Jul/Aug. 2006. DOI: <https://doi.org/10.1093/humupd/dml009>. Disponível em: <https://academic.oup.com/humupd/article/12/4/417/2182165>. Acesso em 25/10/2020. Acesso em 12 de junho de 2021.

OLIVEIRA, L. Z.; HOSSEPIAN DE LIMA, V. F.; LEVENHAGEN, M. A.; SANTOS, R. M.; ASSUMPÇÃO, T. I.; JACOMINI, J. O.; ANDRADE, A. F.; ARRUDA, R. P.; BELETTI, M. E. Transmission electron microscopy for characterization of acrosomal damage after Percoll gradient centrifugation of cryopreserved bovine spermatozoa. **Journal Veterinary Sciences**, v. 12, n. 3, p. 267-72. Sep. 2011. DOI: <https://doi.org/10.4142/jvs.2011.12.3.267>. Disponível em : <https://www.vetsci.org/DOIx.php?id=10.4142/jvs.2011.12.3.267>. Acesso em: 12 de maio de 2022.

PAVLOK, A.; KUBELKA, M.; PEKNICOVÁ, J. The effect of various capacitation active compounds and capacitation time on the *in vitro* fertility and protein tyrosine phosphorylation profiles of bovine sperm. **Zygote**, v. 9, n. 1, p. 25-38, Feb. 2001. DOI: <https://doi.org/10.1017/s0967199401001046> . Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11273031/> . Acesso em: 08 agosto de 2022.

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, Feb. 2015. DOI: <https://doi.org/10.1111/rda.12452>. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/rda.12452>. Acesso em 12 de maio de 2022.

RATHKE, C.; BAARENDS, W. M.; AWE, S.; RENKAWITZ-POHL, R. Chromatin dynamics during spermiogenesis. **Biochimica et Biophysica Acta**. v.1839, n. 3, p. 155–168, Mar. 2014. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bbagr.2013.08.004> . Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1874939913001387?via%3Dihub> . Acesso em: 13 de março de 2020.

RIBAS-MAYNOU, J.; BENET, J. Single and Double Strand Sperm DNA Damage: Different Reproductive Effects on Male Fertility. **Genes**, v.10, n.2, p.105, Jan. 2019. DOI: <https://doi.org/10.3390/genes10020105> . Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6410262/pdf/genes-10-00105.pdf> . Acesso em 9 de fevereiro de 2022.

ROMERO-AGUIRREGOMEZCORTA, J.; SUGRUE, E.; MARTÍNEZ-FRESNEDA, L.; NEWPORT, D.; FAIR, S. Hyperactivated stallion spermatozoa fail to exhibit a rheotaxis-like behaviour, unlike other species. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 16897, Nov. 2018. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-018-34973-9> . Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41598-018-34973-9> . Acesso em 09 de agosto de 2022.

ROUSSEAU, S.; CARON, C.; GOVIN, J.; LESTRAT, C.; FAURE, A. K.; KHOCHBIN, S. Establishment of male-specific epigenetic information. **Gene**, v.345, n.2, p.139–153, Jan. 2005. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.gene.2004.12.004> . Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0378111904007395?via%3Dihub> . Acesso em 4 de maio de 2020.

SAVADI-SHIRAZ, E.; EDALATKHAH, H.; TALEBI, S.; HEIDARI-VALA, H.; ZANDEMAMI, M.; PAHLAVAN, S.; MODARRESSI, M. H.; AKHONDI, M. M.; PARADOWSKA-DOGAN, A.; SADEGHI, M. R. Quantification of sperm specific mRNA transcripts (PRM1, PRM2, and TNP2) in teratozoospermia and normozoospermia: New correlations between mRNA content and morphology of sperm. **Molecular Reproduction Development**, v.82, n. 1, p.26–35, Jan. 2015. DOI: <https://doi.org/10.1002/mrd.22440> . Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/mrd.22440> . Acesso em: 12 de julho de 2020.

SHAMSI, M. B.; VENKATESH, S.; TANWAR, M.; SINGH, G.; MUKHERJEE, S.; MALHOTRA, N.; KUMAR, R.; GUPTA, N. P.; MITTAL, S. R. Comet assay: A prognostic tool for DNA integrity assessment in infertile men opting for assisted reproduction. **Indian Journal Medicine Research**, v.131, p. 675-681, May. 2010. Disponível em: <https://journals.lww.com/ijmr/pages/default.aspx> . Acesso em 15 fevereiro de 2022.

SHAMSI, M. B.; IMAM, S. N.; DADA, R. Sperm DNA integrity assays: diagnostic and prognostic challenges and implications in management of infertility. **Journal of assisted reproduction and genetics**, v. 28, n. 11, p. 1073–1085. Sep. 2011. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10815-011-9631-8> . Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s10815-011-9631-8> . Acesso em 9 de fevereiro de 2022.

SILLASTE, G.; KAPLINSKI, L.; MEIER, R.; JAAKMA, Ü.; ERISTE, E.; SALUMETS, A. A novel hypothesis for histone-to-protamine transition in *Bos taurus* spermatozoa. **Reproduction**; v. 153, n. 3, p. 241-251, Mar. 2017. DOI: <https://doi.org/10.1530/REP-16-0441> . Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5184773/> . Acesso em 08 de fevereiro de 2021.

SILVA, M. J. L.; MELLO, M. L. S. Lability to acid hydrolysis in some different DNA-protein complexes of spermatozoa. **Acta Histochemica**, v.78, n. 2, p.197-215. 1986. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0065-1281\(86\)80054-X](https://doi.org/10.1016/S0065-1281(86)80054-X) . Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S006512818680054X?via%3Dihub> . Acesso em 20 de abril de 2022.

SOUZA, E. T.; SILVA, C. V.; TRAVENÇOLO, B. A. N.; ALVES, B. G.; BELETTI, M. E. Sperm chromatin alterations in fertile and subfertile bulls. **Reproduction Biology**, v. 18, n. 2, p. 177-

181, Jun. 2018. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.repbio.2018.04.001>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1642431X17303479?via%3Dihub>. Acesso em 15 de janeiro de 2022.

STEGER, K. Transcriptional and translational regulation of gene expression in haploid spermatids. **Anatotomy and Embryology**, v. 199, n. 6, p. 471–487, Jun. 1999. DOI: <https://doi.org/10.1007/s004290050245>. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s004290050245>. Acesso em: 21 de agosto 2021

STOJKOVIC, M.; MACHADO, S. A.; STOJKOVIC, P.; ZAKHARTCHENKO, V.; HUTZLER, P.; GONÇALVES, P. B.; WOLF, E. Mitochondrial distribution and adenosine triphosphate content of bovine oocytes before and after *in vitro* maturation: correlation with morphological criteria and developmental capacity after *in vitro* fertilization culture. **Biology of Reproduction**, v. 64, p. 904-909, 2001. DOI: <https://doi.org/10.1095/biolreprod64.3.904>. Disponível em: <https://academic.oup.com/biolreprod/article/64/3/904/2723403> . Acesso em 10 de abril de 2022.

SUTOVSKY, P. Review: Sperm–oocyte interactions and their implications for bull fertility, with emphasis on the ubiquitin–proteasome system. **Animal**, v. 12, n. 1, p. s121–s132, Jun. 2018. doi: <https://doi.org/10.1017/S1751731118000253> . Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1751731118000253?via%3Dihub> . Acesso em 07 de agosto de 2022.

TAMM, C.; HODES, M. E.; CHARGAFF, E. The formation of apurinic acid from the deoxyribonucleic acid of calf thymus. **Journal Biology. Chemistry**, v. 195, n. 1, p. 49-63, Mar. 1952. Disponível em: [https://www.jbc.org/article/S0021-9258\(19\)50874-2/pdf](https://www.jbc.org/article/S0021-9258(19)50874-2/pdf). Acesso em 3 março de 2022.

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, Jul. 1984. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0015-0282\(16\)47963-X](https://doi.org/10.1016/S0015-0282(16)47963-X). Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S001502821647963X?via%3Dihub>. Acesso em 12 de abril de 2022.

TIZRO, P., CHOI, C., KHANLOU, N. Sample Preparation for Transmission Electron Microscopy. In: YONG, W. H. **Biobanking: Methods in Molecular Biology**. Vol 1897. New York: Springer nature, 2019. Cap. 33 417–424. DOI: https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8935-5_33

TORRES-FLORES, U.; HERNÁNDEZ-HERNÁNDEZ, A. The Interplay Between Replacement and Retention of Histones in the Sperm Genome. **Frontiers in Genetics**, v.11, p. 780, Jul. 2020. DOI: <https://doi.org/10.3389/fgene.2020.00780>. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fgene.2020.00780/full>. Acesso em: 26 de agosto de 2020.

UTT, M. D. Prediction of bull fertility. **Animal Reproduction Science**, v.169, p. 37-44, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2015.12.011> Disponível em : <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0378432015300919?via%3Dihub> . Acesso em 14 de junho de 2022.

VAN DER HEIJDEN, G. W.; RAMOS, L.; BAART, E. B.; VAN DEN BERG, I. M.; DERIJCK, A. A.; VAN DER VLAG, J.; MARTINI, E.; DE BOER, P. Sperm-derived histones

contribute to zygotic chromatin in humans. **BMC Development Biology**, v. 8, p. 34, Mar. 2008. DOI: <https://doi.org/10.1186/1471-213X-8-34>. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2358879/>. Acesso em: 10 de agosto de 2020.

VAN DER WEES, C.; JANSEN, J.; VRIELING, H.; VAN DER LAARSE, A.; VAN ZEELAND, A.; MULLENDERS, L. Nucleotide excision repair in differentiated cells. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 614, n. 1-2, p. 16–23, Jan. 2007. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2006.06.005> Disponível em : <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0027510706001989?via%3Dihub> Acesso em 02 de agosto de 2022.

VARGHESE, A. C.; FISCHER-HAMMADEH, C.; HAMMADEH, M. E. Acridine Orange Test for Assessment of Human Sperm DNA Integrity. In: Zini, A; Agarwal, A. , Sperm Chromatin: Biological and Clinical Applications in Male Infertility and Assisted Reproduction. Springer Science, 2011. Cap 13, p. 189-199.

VENKATESH, S, WORKMAN, J. L. Histone exchange, chromatin structure and the regulation of transcription. **Nature reviews. Molecular cell biology**, v. 16, n. 3, p. 178–189, Mar. 2015. DOI: <https://doi.org/10.1038/nrm3941>. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/nrm3941>. Acesso em: 15 de agosto de 2020.

VIDAL, B. C.; MELLO, M. L. S. Toluidine blue staining for cell and tissue biology applications. **Acta Histochemica**, v. 121, n. 2, p. 101–112, Feb. 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.acthis.2018.11.005>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0065128118303428?via%3Dihub>. Acesso em 2 de fevereiro de 2022.

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. Aug. 1989. DOI: <https://doi.org/10.1095/biolreprod41.2.361>. Disponível em: <https://academic.oup.com/biolreprod/article/41/2/361/2930733?login=false>. Acesso em 15 de maio de 2022.

WARD, W. S; COFFEY, D. S. DNA packaging and organization in mammalian spermatozoa: comparison with somatic cells. **Biology Reproduction**, v. 44, n. 4, p. 569-74, Apr. 1991. DOI: <https://doi.org/10.1095/biolreprod44.4.569>. Disponível em: <https://academic.oup.com/biolreprod/article/44/4/569/2762885?login=false>. Acesso em 8 de dezembro de 2021.

WARD, W. S. Function of sperm chromatin structural elements in fertilization and development. **Molecular Human Reproduction**, v. 16, n. 1, p. 30–36, Jan. 2010. DOI: <https://doi.org/10.1093/molehr/gap080>. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2790366/>. Acesso em 10 de novembro de 2021.

WYCK, S.; HERRERA, C.; REQUENA, C. E.; BITTNER, L.; HAJKOVA, P.; BOLLWEIN, H.; SANTORO, R. Oxidative stress in sperm affects the epigenetic reprogramming in early embryonic development. **Epigenetics Chromatin**, v. 11, n. 1, p. 60, Oct. 2018. DOI: <https://doi.org/10.1186/s13072-018-0224-y> . Disponível em: <https://epigeneticsandchromatin.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13072-018-0224-y> . Acesso em 10 de agosto de 2022.

XAVIER, M. J.; ROMAN, S. D.; AITKEN, R. J.; NIXON, B. Transgenerational inheritance: how impacts to the epigenetic and genetic information of parents affect offspring health. **Human Reproduction Update**, v. 25, n. 5, p. 518-540, Sep. 2019. DOI: <https://doi.org/10.1093/humupd/dmz017>. Disponível em: <https://academic.oup.com/humupd/article/25/5/519/5542317?login=false>. Acesso em 11 de agosto de 2022.

YAN, W.; MA, L.; BURNS, K. H.; MATZUK, M. M. HILS1 is a spermatid-specific linker histone H1-like protein implicated in chromatin remodeling during mammalian spermiogenesis. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.100, n.18, p.10546–10551, Sep. 2003. DOI: <https://doi.org/10.1073/pnas.1837812100>. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC193598/>. Acesso em: 02 de maio de 2020.