

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA
BACHARELADO EM MEDICINA VETERINÁRIA

MARCELA MONTENEGRO DE MEDEIROS COELHO

**FRAGMENTAÇÃO DO DNA ESPERMÁTICO IDENTIFICADA PELO TESTE DE
DISPERSÃO DA CROMATINA ESPERMÁTICA (SCD) E SUA INFLUÊNCIA
SOBRE A EFICIÊNCIA DA PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES BOVINOS**

UBERLÂNDIA - MG

2024

MARCELA MONTENEGRO DE MEDEIROS COELHO

**FRAGMENTAÇÃO DO DNA ESPERMÁTICO IDENTIFICADA PELO TESTE DE
DISPERSÃO DA CROMATINA ESPERMÁTICA (SCD) E SUA INFLUÊNCIA
SOBRE A EFICIÊNCIA DA PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES BOVINOS**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da
Universidade Federal de Uberlândia como requisito
parcial para obtenção do título de bacharel em Medicina
Veterinária

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Emílio Beletti

UBERLÂNDIA - MG

2024

MARCELA MONTENEGRO DE MEDEIROS COELHO

**FRAGMENTAÇÃO DO DNA ESPERMÁTICO IDENTIFICADA PELO TESTE DE
DISPERSÃO DA CROMATINA ESPERMÁTICA (SCD) E SUA INFLUÊNCIA
SOBRE A EFICIÊNCIA DA PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES BOVINOS**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da
Universidade Federal de Uberlândia como requisito
parcial para obtenção do título de bacharel em Medicina
Veterinária

Uberlândia, 25 de abril de 2024.

BANCA EXAMINADORA:

Prof. Dr. Marcelo Emílio Beletti
Instituto de Ciências Biomédicas - UFU

MSc. Kelvin Orlando Espinoza Blandon
Doutorado em Imunologia e Parasitologia Aplicadas - UFU

MV Heitor Pereira Marquez
Mestrado em Ciências Veterinárias - UFU

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer primeiramente aos meus pais, Antônio e Nicole, que desde muito antes de mim já sonhavam com esse momento. Eles que fizeram de tudo independentemente das adversidades e investiram em mim, na minha educação e futuro. Essa conquista é NOSSA! Agradecer e dedicar essa conquista também ao meu irmão, Bruno, por também estar comigo durante essa jornada. Obrigada por serem meu maior suporte desde sempre! Dedico essa conquista às minhas avós, Anna Maria e Maria do Socorro. À toda a minha família também.

Não menos importante, meu profundo agradecimento ao professor Marcelo Beletti. São figuras como ele que nos faz entender a importância e a potência que um bom professor tem na vida de um aluno. Acompanhei as atividades do Laboratório da Biologia da Reprodução desde o segundo período da faculdade, quando era sua aluna, e gosto de dizer que a “culpa” da minha escolha profissional é dele. Ele quem me estendeu a mão desde o começo, me deu oportunidade e no laboratório foi onde aprendi sobre a produção *in vitro* de embriões e me apaixonei pelo processo. Além de professor, se tornou meu orientador e amigo, e detém minha enorme admiração e respeito pelo pesquisador e pessoa que ele é. Obrigada por todos os ensinamentos e puxões de orelha, professor! Aproveito para agradecer a todos os colegas colaboradores do laboratório pelos aprendizados e conhecimentos que adquiri durante nossos dias de trabalho, desejo a todos muito sucesso!

Agradeço também pelos amigos que Uberlândia me deu e estiveram junto comigo durante meu período de faculdade: Gugs, Letícia, Laura, Maria, Carlos, Machado, Paulim, Rejão, Cabeça, Waguim, Ian, Pakita e Gump. Obrigada por serem minha família, por ajudarem a conservar minha sanidade, por todas as risadas e presepadas que passamos. São momentos que vou guardar com muito carinho. Nem todos os dias foram fáceis, mas ter vocês comigo fez tudo se tornar mais leve.

Aos meus amigos/irmãos de longa data: Luiza, Luiza, Laura, Millena, Milena, Jão, Theo, Bruno, Beto, Marcelo, Maria Vitória, João B., Paulo Henrique e Gugs (novamente). À minha irmã do coração, Luana. Às minhas primas, Duda, Giovanna e Nicolle. Parte do que sou hoje é graças a vocês. Que sorte a minha viver uma vida com vocês nela! É um enorme prazer compartilhar as vitórias e um enorme conforto

partilhar das dificuldades, que surgem ao longo dessa estrada. Obrigada pelo companheirismo fiel, amor em suas diversas linguagens, confidências e risadas lacrimejantes (para todos os efeitos) dos sofrimentos do dia a dia. Pelos encontros periódicos e inestimáveis.

RESUMO

A produção animal depende da eficiência reprodutiva do rebanho, e um fator que influencia diretamente a eficiência reprodutiva é a qualidade espermática. A avaliação andrológica de rotina não engloba avaliação de alterações da cromatina espermática, que pode causar ou levar à fragmentação de DNA, que vem sendo reconhecida como um importante fator que influencia na fertilidade do touro. Existem vários métodos para identificar a fragmentação do DNA espermático e entre eles está o teste de dispersão da cromatina espermática (SCD). Existem diferentes testes comerciais e diferentes análises sobre os resultados do SCD, mas em todos eles avalia-se a formação de halos e sua relação com a fragmentação de DNA. Objetiva-se com este trabalho avaliar a influência das alterações cromatínicas espermáticas identificadas pelo SCD sobre a produção *in vitro* de embriões bovinos, com o kit CANFrag®. Foram realizadas sete rotinas de produção *in vitro* de embriões utilizando-se nove amostras de sêmen com diferentes níveis de fertilidade e ao final de cada rotina foram calculadas as taxas de clivagem, de desenvolvimento embrionário inicial e de blastocisto para cada amostra de sêmen. Estas amostras também foram avaliadas pelo kit CANFrag®. As lâminas foram avaliadas visualmente quanto ao tamanho do halo (ausente, pequeno, médio e grande) e computacionalmente quanto a área em pixel do halo. Posteriormente foi aplicado o teste de correlação de Spearman entre as taxas das PIVEs e os resultados do kit CANFrag®, sendo encontrada correlação significativa negativa entre a taxa de desenvolvimento embrionário inicial e a área do halo espermático, indicando que a formação de halo foi prejudicial ao desenvolvimento embrionário, contrariando a expectativa segundo o kit CANFrag®. O CANFrag® foi idealizado para sêmen humano e nunca havia sido testado em bovinos. O resultado obtido pelo experimento pode ser devido à diferença de intensidade de compactação entre as espécies bovina e humana. Conclui-se que a interpretação do resultado do uso desse kit para a espécie bovina deve ser diferente, e que a área do halo está relacionada com alterações que não interferem a fecundação *in vitro*, porém interferem no desenvolvimento embrionário inicial *in vitro*.

Palavras-chave: cromatina espermática; fertilidade; dispersão da cromatina espermática; fragmentação do DNA; espermatozoide

ABSTRACT

Animal production depends on the reproductive efficiency of the herd, and a factor that directly influences reproductive efficiency is sperm quality. Routine andrological evaluation does not include evaluation of changes in sperm chromatin, which can cause or lead to DNA fragmentation, which has been recognized as an important factor that influences bull fertility. There are several methods to identify sperm DNA fragmentation and among them is the sperm chromatin dispersion (SCD) test. There are different commercial tests and different analyzes of SCD results, but all of them evaluate the formation of halos and their relationship with DNA fragmentation. The aim of this work is to evaluate the influence of sperm chromatin changes identified by the SCD on the *in vitro* production of bovine embryos, with the CANFrag® kit. Seven *in vitro* embryo production routines were carried out using nine semen samples with different fertility levels and at the end of each routine the cleavage, initial embryonic development and blastocyst rates were calculated for each semen sample. These samples were also evaluated using the CANFrag® kit. The slides were evaluated visually regarding the size of the halo (absent, small, medium and large) and computationally regarding the pixel area of the halo. Subsequently, the Spearman correlation test was applied between the rates of PIVEs and the results of the CANFrag® kit, and a significant negative correlation was found between the rate of initial embryonic development and the area of the spermatic halo, indicating that the formation of the halo was harmful to the embryonic development, contrary to expectations according to the CANFrag® kit. CANFrag® was designed for human semen and had never been tested on cattle. The result obtained by the experiment may be due to the difference in compaction intensity between bovine and human species. Therefore, it is concluded that the interpretation of the results of using this kit for bovine species must be different, and that the halo area is related to changes that do not interfere with *in vitro* fertilization, but do interfere with initial embryonic development *in vitro*.

Key-words: sperm chromatin; fertility; sperm chromatin dispersion; DNA fragmentation; spermatozoa

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO.....	10
2	OBJETIVO.....	11
	Objetivo Geral	11
	Objetivo Específico.....	11
3.	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	11
3.1	Cromatina Espermática e Protaminas	11
3.2	Métodos de Avaliação da Cromatina Espermática	13
3.2.1	SCSA.....	13
3.2.2	Azul de toluidina.....	14
3.2.3	Dispersão da Cromatina Espermática (SDC).....	14
3.3	Produção <i>in vitro</i> de Embriões Bovinos	17
3.3.1	PIVE.....	17
3.3.2	Ovum Pick Up - OPU.....	18
3.3.3	Seleção dos Oócitos.....	18
3.3.4	Maturação <i>in vitro</i> – MIV	19
3.3.5	Fertilização <i>in vitro</i> – FIV	19
3.3.6	Cultivo <i>in vitro</i> – CIV	20
4	MATERIAL E MÉTODO.....	21
4.1	Amostras de sêmen.....	21
4.2	Produção <i>in vitro</i> de embriões bovinos (PIVEs).....	21
4.2.1	Seleção Espermática	21
4.2.2	Seleção de Oócitos.....	22
4.2.3	MIV.....	22
4.2.4	FIV.....	22
4.2.5	CIV	23
4.3	SCD com KIT CANFrag®	24
4.3.2	Preparo do Sêmen.....	24
4.3.3	Preparo da Lâmina.....	24
4.4	Avaliação Subjetiva do Halo Espermático.....	25
4.5	Avaliação Computorizada do Halo Espermático	25
4.6	Análise Estatística.....	26
5	RESULTADOS	27
6	DISCUSSÃO	30

7	CONCLUSÃO	32
	REFERÊNCIAS	32

1. INTRODUÇÃO

A produção animal é um segmento que necessita estar constantemente em melhoramento de desempenho. Para isso, a eficiência reprodutiva dos rebanhos invariavelmente deve caminhar ao lado da produção, uma vez que sua manutenção é considerada um dos principais fatores que contribuem para a melhoria do desempenho produtivo e da lucratividade dos rebanhos comerciais (Carvalho *et al.* 2023). A ineficiência reprodutiva de um rebanho gera falhas na fertilização, perdas embrionárias e econômicas através de aumento de ressincronizações, aumento de custo de manejo e extensão do período entre partos (Parmar *et al.*, 2016). Geralmente, a maior atribuição para perdas embrionárias vai para a fêmea (Bishop, 1964), contudo, um fator que influencia diretamente na perda embrionária e, portando, a eficiência reprodutiva de um rebanho, é a qualidade espermática dos touros usados na reprodução (Beletti, 2013).

A avaliação andrológica determina a concentração, vigor, motilidade, turbilhonamento e patologias morfológicas (Beletti *et al.*, 2005), porém são preditores inconsistentes para a eficiência reprodutiva (García-Macías *et al.*, 2006; Simões *et al.*, 2014) uma vez que eliminam apenas amostras com qualidade claramente ruim ou potencialmente subfértil (Rodríguez-Martinez, 2003). O status da cromatina espermática é um fator determinante para além da capacidade fecundante, pois pode influenciar o posterior desenvolvimento embrionário, e é um fator subjugado na avaliação de rotina (Simões *et al.*, 2014).

O espermatozoide, além de ser a estrutura fundamental que carrega o material genético masculino de encontro ao gameta feminino, também é um importante componente que carrega outros fatores essenciais para o início do desenvolvimento embrionário normal (Erenpreiss *et al.*, 2006). Para a sua formação e capacitação existe uma série de processos importantes que ocorre desde a espermatogênese, a passagem pelo epidídimo (Fortes, 2012; Martins *et al.*, 2021) e pelo trato genital feminino, até a fecundação propriamente dita. Nos anos 80, Evenson (1980) já avaliava que touros com espermograma normal podem ser subférteis ou apresentar intervalos de subfertilidade inexplicáveis, e uma possível explicação para isso é o estado da compactação da cromatina espermática. Watson (2000) também apontou que a utilização do sêmen de touros com DNA danificado era parcialmente responsáveis no insucesso da inseminação artificial.

A integridade da cromatina espermática é fundamental para a transmissão das características genéticas paterna, pelo fato de que áreas descompactadas podem causar alterações do DNA, que podem levar a falhas no processo reprodutivo (Simões et al, 2014). Há um grande número de metodologias que identificam as alterações da cromatina espermática, a escolhida para esse trabalho foi a de dispersão da cromatina espermática (sperm chromatin dispersion: SCD), que vem sendo descrita em outros trabalhos (Fortes *et al.*, 2012; García-Macías *et al.*, 2006; Gosálvez *et al.*, 2013; Rochdi *et al.*, 2024) como um método válido na determinação de fertilidade.

2. OBJETIVO

2.1 Objetivo Geral

O objetivo desse trabalho foi avaliar a influência das alterações cromatínicas espermáticas identificadas pelo teste de dispersão da cromatina com o Kit CANFrag® sobre a produção *in vitro* de embriões bovinos.

2.2 Objetivo Específico

1. Avaliar o método de descompactação da cromatina espermática de bovinos através do kit CANFrag®, originalmente usado para a espécie humana
2. Avaliar a influência das alterações cromatínicas espermáticas identificadas por teste de dispersão da cromatina com Kit CANFrag® sobre a capacidade fecundante *in vitro* de espermatozoides bovino
3. Avaliar a influência das alterações cromatínicas espermáticas identificado por teste de dispersão da cromatina com Kit CANFrag® sobre o desenvolvimento embrionário inicial *in vitro* na espécie bovina

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Cromatina Espermática e Protaminas

A cromatina é o complexo de DNA, RNA e proteínas que está dentro do núcleo das células eucarióticas. Nas células somáticas, essas proteínas, que compõem as

unidades básicas para estruturação e compactação do material genético, são principalmente as histonas. As histonas (duas H2A, duas H2B, duas H3 e duas H4) formam um octâmero proteico envolvido por duas voltas de DNA dupla fita, sendo esta estrutura a unidade repetitiva da cromatina das células somáticas e é denominada de nucleossoma (Alberts *et al.* 2022). Durante a espermatogênese, ocorre uma substituição quase completa dessas proteínas por um grupo específico de proteínas de células germinativas espermáticas, as protaminas, e essa ligação DNA-protamina se enovela formando uma estrutura toroidal (Schagdarsurengin *et al.*, 2012). Em mamíferos, a compactação da cromatina segue numa contínua “maturação” durante sua passagem pelo epidídimo, resultado da formação de pontes de dissulfeto e pontes de zinco entre as protaminas estabelecidas para bloquear a cromatina em seu estado final, praticamente cristalino (Miller *et al.*, 2010; Martins *et al.*, 2021).

Esse evento resulta na intensa condensação da cromatina espermática, cerca de 6 à 10 vezes mais em relação à compactação de um nucleossoma (McLay e Clarke, 2003; Miller *et al.*, 2010). Tamanha essa compactação, que a capacidade de transcrição genética do DNA é inativada quase que por completo (McLay e Clarke, 2003; Miller *et al.*, 2010; Schagdarsurengin *et al.*, 2012; Beletti, 2013), e essa condensação é um importante elemento para a proteção e conservação do material genético contra agressões externas, como espécies reativas de oxigênio (EROs) e mecanismos apoptóticos (Beletti *et al.*, 2005; Fraser, Strzezek, 2007; McLay e Clarke, 2003; Martins 2021) até seu ponto de chegada, dentro do oócito (Eirenpreiss *et al.*, 2006; Miller *et al.*, 2010; Hamilton; Assumpção, 2020).

Um espermatozoide deve ser capaz de realizar a descompactação da cromatina em um momento apropriado do processo de fertilização (García-Macías *et al.*, 2006). Após sua entrada no oócito, as protaminas espermáticas são substituídas por histonas fornecidas pelo oócito, permitindo que a organização da cromatina seja disposta em nucleossomas novamente (McLay; Clarke, 2003; Miller *et al.*, 2010; Hamilton; Assumpção, 2020).

Alguns espermatozoides com anormalidades na compactação da cromatina ainda são capazes de fertilizar os oócitos. No entanto, alterações de cromatina geralmente são acompanhadas de fragmentação de DNA o que pode causar morte embrionária inicial ou persistir durante o período embrionário, induzindo à apoptose e levando ao aborto (Beletti *et al.*, 2005; Simões *et al.*, 2014). A fragmentação do DNA

está associada com a subfertilidade (Fortes *et al.*, 2012) e vem sendo reconhecida como um novo parâmetro potencial para avaliar a qualidade espermática (Gosálvez *et al.*, 2013; Alkmin *et al.*, 2013; Hamilton; Assumpção, 2020).

3.2 Métodos de Avaliação da Cromatina Espermática

Existem vários métodos de avaliação da cromatina, sendo o SCSA (Sperm Chromatin Structure Assay) considerado o método padrão ou ouro. Como uma das consequências da descompactação da cromatina espermática é a fragmentação do DNA, frequentemente estes métodos são tidos como identificadores da fragmentação do DNA. Muitos são esses métodos, dentre eles: SCSA, SCD (sperm chromatin dispersion), ensaio de cometa, TUNEL (transferase dUTP nick end labelling), coloração com azul de toluidina, coloração com CMA3 (Hamilton; Assumpção, 2020).

3.2.1 SCSA

Sendo o método mais utilizado para alterações na estabilidade da cromatina, desenvolvido por Evenson (1980), o SCSA é baseado na avaliação com citometria de fluxo da fluorescência de espermatozoides corados com laranja de acridina (Evenson *et al.*, 1980). Os espermatozoides se coram em verde fluorescente quando o corante se liga a uma dupla hélice de DNA e vermelho quando ligado à um DNA desnaturado (García-Macías, 2006) (Evenson, 2016).

A quantidade de fluorescência verde e vermelha emitida individualmente por 5000 espermatozoides são contabilizadas na citometria de fluxo e é gerado um índice da amostra com a porcentagem de células espermáticas com presença de DNA fragmentado. Apesar de ser uma técnica excepcional, mostrando-se eficaz em correlacionar alterações da cromatina com a fertilidade de touros, garanhões e javalis, seu uso é limitado pelo alto custo da utilização da citometria de fluxo (Ostermeier *et al.*, 2001) além de ser uma técnica complexa, de difícil implementação e demorada (Gosálvez *et al.*, 2013).

3.2.2 Azul de toluidina

Desenvolvido por Mello (1982), o método da “metacromasia induzida” utiliza o corante Azul de Toluidina em pH 4,0 posterior à uma hidrólise ácida (Simões *et al.*, 2014). A metacromasia se define pela mudança de coloração de determinadas substâncias em presença de outras substâncias ou elementos orgânicos.

Com o corante Azul de Toluidina (AT), a coloração irá se dar de acordo a ligação corante-grupos fosfato do DNA. Quando a reação acontece numa fita dupla de DNA, o corante produz uma coloração verde fluorescente, indicando sua integridade; enquanto, quando em contato com uma fita de DNA desnaturada, produz uma fluorescência azul escuro à magenta (Beletti *et al.*, 2005; Beletti, 2013). Isso se dá pelo fato de que a maioria dos grupos fosfato do DNA íntegro estão bloqueados pelas protaminas, e, portanto, poucas moléculas do corante se ligam ao DNA, enquanto quando existe áreas descompactadas, essas ligações aumentam, proporcionando a diferença de colorações (Martins *et al.*, 2021).

A coloração com AT seguida de análise de imagem computacional consegue identificar regiões com diferentes condições de compactação de cromatina espermática na cabeça do espermatozoide. Portanto, se mostra um método condizente com o status da estruturação do DNA, e, por isso, é amplamente utilizado para avaliar essa finalidade (Hiraiwa, *et al.*, 2021).

3.2.3 Dispersão da Cromatina Espermática (SDC)

A avaliação do teste de dispersão da cromatina espermática é um teste baseado na detecção de halos de DNA espalhados ao redor da cabeça do espermatozoide depois de submeter a amostra à uma sequência de desnaturação e remoção da protamina. Após o teste, os espermatozoides que não apresentam fragmentação do DNA formariam os halos de dispersão, enquanto os que tem fragmentação do DNA formam pequenos halos ou halo nenhum. É um teste que tem sido relatado como simples, rápido e com acurácia para a identificação de fragmentação do DNA (Gosálvez *et al.*, 2013). Já outros artigos afirmam que os

espermatozoides com fragmentação formariam halo e os sem fragmentação, não (García-Macías *et al.*, 2006; Fortes *et al.*, 2012).

3.2.3.1 Sperm-Bos-Halomax

O teste de SDC pode ser realizado através do kit Sperm-Bos-Halomax (SBH), sendo este específico para bovinos. Existem duas variantes do kit, para avaliação em microscópio de luz e microscópio de fluorescência (García-Macías *et al.*, 2006; Fortes *et al.*, 2012, Kusumawati *et al.*, 2023).

Para a obtenção da lâmina para avaliação, primeiramente o espermatozoide é diluído em agarose de baixo ponto de fusão à temperatura ideal de 37°C, posteriormente a mistura é colocada em uma lâmina pré tratada com ágar padrão e espalhada com lamínula. Posteriormente, a lâmina então deve receber um banho com uma solução ácida, depois uma solução de lise e lavada com água destilada, e, então, passar por desidratação seriada com álcool 70%, 90% e 100%, e a coloração deve ser feita de acordo com o microscópio de avaliação (García-Macías *et al.*, 2006; Fortes *et al.*, 2012, Kusumawati *et al.*, 2023).

Nesses trabalhos os resultados mostraram que espermatozoides com DNA fragmentado corresponderam aqueles com presença de difusão periférica de fragmentos de cromatina, ou seja, halos. Enquanto os espermatozoides não fragmentados apresentaram apenas pequenos halos de relaxamento das alças de DNA ligadas ao núcleo central (García-Macías *et al.*, 2006; Fortes *et al.*, 2012).

3.2.3.2 Sperm-Sus-Halomax

O trabalho desenvolvido por Alkmin e colegas (2013) usou o teste Sperm-Sus-Halomax para a avaliação de amostras de sêmen de javali analisadas progressivamente ao longo do tempo após o seu descongelamento. O teste considerou quatro classificações em relação à integridade nuclear espermática: halo visível e compacto ao redor da cabeça do espermatozoide – halo normal; pequeno halo ao redor da cabeça do espermatozoide – halo pequeno; halo grande e espalhado ao redor da cabeça do espermatozoide – halo grande espalhado; nenhum halo ao redor da cabeça do espermatozoide – halo ausente

Neste, grandes áreas de halo ao redor da cabeça do espermatozoide foram entendidas compatíveis com fragmentação do DNA, entrando de acordo com o teste de dispersão da cromatina Sperm-Bos-Halomax.

3.2.3.3 Halosperm G2

O trabalho de Gosálvez (2013), diferentemente dos resultados obtidos pelo uso do Sperm-Bos-Halomax e Sperm-Sus-Halomax utilizados por outros autores, apresentou o contrário. Apesar de utilizar sêmen humano, o teste utilizado para avaliação da fragmentação do DNA considerou que apenas a cromatina espermática fracamente compactada sofrerá a desnaturação do DNA com o banho ácido e posterior lavagem das protaminas com a solução de lise, enquanto a formação de halo se dá pela forte compactação da cromatina, com a dispersão do núcleo (DNA) espermático. Em outras palavras, espermatozoides sem a dispersão do DNA formará grandes halos por conta da força da sua compactação, enquanto os problemáticos terão o DNA lavado da cromatina frouxa e não haverá a presença dos halos, ou apenas uma formação de halo pequena, após a fixação e coloração da amostra.

3.2.3.4 SpermFunc

O teste SpermFunc, realizado no trabalho conduzido por Rochdi (2024), que também utilizou sêmen humano, avalia a formação de um halo aparente como um indicador de não fragmentação do DNA, enquanto a não formação de halo ou halo pequeno identifica fragmentação do DNA. Portanto, halos grandes e médios foram classificados como DNA íntegro e a ausência ou presença de um halo pequeno foram classificados como com presença de fragmentação do DNA.

3.2.3.5 CANFrag

O teste com o Kit CANFrag, realizado em outros trabalhos com sêmen humano (B *et al.*, 2020; Patel *et al.*, 2022), avalia a formação de halo como um indicador de não fragmentação do DNA, enquanto ausência de halo ou halo pequeno indica fragmentação do DNA. Portanto, halos grandes e médios foram classificados como

DNA íntegro e a ausência ou presença de um halo pequeno foram classificados como com presença de fragmentação do DNA.

3.3 Produção *in vitro* de Embriões Bovinos

3.3.1 PIVE

O primeiro relatório da produção *in vitro* de embriões bovinos bem estabelecido foi publicado em 1982, por Benjamin G. Brackett e colegas. O trabalho apresentou um protocolo repetível que resultou no primeiro nascimento e normal desenvolvimento de um bezerro produzido em laboratório. Depois de estudo e aprimoramento, na década de 90 se tornou uma biotecnologia usada comercialmente (Vizoná *et al.*, 2020). Em 2021, o Brasil foi considerado o segundo maior produtor de embriões do mundo, perdendo apenas para os Estados Unidos (Viana, 2022). Porém em relação à produção *in vitro* de embriões o Brasil é referência na área e assume a liderança mundial (Gonçalves; Viana, 2019).

A produção *in vitro* de embriões (PIVE) atual é uma área da biotecnologia ligada à reprodução animal que exige o trabalho sinérgico de profissionais em diferentes frentes atuação, com diferentes especialidades à nível de campo e laboratório (Carvalho *et al.*, 2023). A PIVE é uma ferramenta valiosa que promove o aumento da produção animal por possibilitar o aumento do número de nascimentos por fêmea de alto valor genético e proporciona saltos no ganho genético das propriedades por possibilitar também o cruzamento com machos de alto valor genético, produzindo descendentes com características desejáveis (Vizoná *et al.*, 2020; Carvalho *et al.*, 2023).

Pode-se dizer que a produção *in vitro* de embriões tem seu início ainda no campo, com o manejo das vacas doadoras e receptoras e a técnica de eleição conhecida como OPU (*Ovum Pick Up*), ou aspiração folicular guiada por ultrassonografia. No laboratório são realizados os eventos de maturação *in vitro*, fertilização *in vitro* e cultivo *in vitro* desses materiais genéticos (MIV, FIV e CIV, respectivamente) e de volta ao campo, ocorre a transferência desses embriões produzidos *in vitro* (Embrapa, 2014).

3.3.2 *Ovum Pick Up (OPU)*

A OPU é uma técnica atualmente se realiza com o bloqueio local epidural utilizando uma agulha descartável, no espaço sacrococcígeo, com lidocaína (podendo haver associação com outros anestésicos) de uma vaca doadora. A coleta dos oócitos nos folículos ovarianos destas ocorre através de uma probe ultrassonográfica intravaginal com uma agulha descartável acoplada, juntamente à uma bomba produtora de vácuo (pressão negativa) para a sucção do fluido folicular, e palpação retal para auxiliar a posicionar o ovário e folículo. (Embrapa, 2014).

3.3.3 Seleção dos Oócitos

Logo após a aspiração folicular o material coletado passa por uma filtragem e, dentre os sólidos retidos no filtro, os oócitos são visualmente selecionados e classificados de acordo com (Stojkovic *et al.*, 2001):

- 1- A heterogeneidade do citoplasma
- 2- A característica das células do cúmulus ao redor do oócito

Grau I: granulações finas e homogêneas no citoplasma, sem vacúolos, coloração escura e células do cúmulus compactadas e com muito mais que 5 camadas ao redor de todo o ovoplasma

Grau II: granulação minimamente homogênea no citoplasma, sem vacúolos e com um pouco menos de camadas, porém com mais que 5, de células do cúmulus compactadas ao redor de todo o ovoplasma.

Grau III: granulação com certa heterogeneidade, alguns vacúolos, com poucas camadas de células ao redor (3-5) e até parte do perímetro desnudo.

Grau IV: Sem Cumulus (S/C): apenas o ovoplasma, células do cúmulus ausentes com citoplasma homogêneo ou irregular; Degenerados: citoplasma heterogêneo com granulações grosseiras e cúmulus expandido.

3.3.4 Maturação *in vitro* – MIV

A maturação *in vitro* é o primeiro importante processo que ocorre fora do ambiente natural, marcada pela retomada da meiose. Envolve uma série de eventos moleculares e bioquímicos, nucleares e citoplasmáticos complexos em um período de 22 à 24 horas que ocorrem para que o oócito se torne viável para a fertilização. Os oócitos maduros ficam estacionados na sua segunda meiose (MII), em metáfase, e só dão continuidade no seu desenvolvimento quando são fecundados por um espermatozoide e liberam o segundo corpúsculo polar, dando origem ao zigoto (Gottardi *et al.*, 2009; Martins, 2023).

3.3.5 Fertilização *in vitro* – FIV

A fertilização deve ser entendida como um processo contínuo e progressivo, que se inicia com a passagem do espermatozoide pelas células do cúmulo e zona pelúcida, com a reação acrossomal e a fusão do espermatozoide ao oócito. Como resultado, acontece a extrusão do segundo corpúsculo polar do oócito – que se encontrava estacionado em metáfase II, fazendo com que ele conclua sua segunda meiose – e o desenvolvimento dessa junção possa ser iniciado, formando o zigoto (Martins, 2023).

O espermatozoide, ao penetrar o oócito, antes de iniciar seu processo de descompactação da cromatina, em que as protaminas começam a ser desativadas e substituídas por nucleossomas novamente, ele já possui áreas específicas formadas por histonas modificadas (variações de histonas específicas do testículo) e histonas acetiladas. Acredita-se que essas áreas possuem funções significativas para o processo de fertilização em si e para os primeiros acontecimentos do desenvolvimento embrionário, além de conter importantes marcadores genéticos paternos transmitidos ao oócito, que envolvem a expressão de genes para o desenvolvimento embrionário inicial e sinalizações epigenéticas, configurando o “imprinting” de diferentes genes paternos, sabendo que as histonas são importantes sítios de ocorrência desses eventos, tais como a metilação e acetilação. (Oliva 2006; Schagdarsurengin *et al.*, 2012; Beletti, 2013).

3.3.6 Cultivo *in vitro* – CIV

O cultivo *in vitro* de embriões é o período de 7 dias de desenvolvimento embrionário *in vitro* antes da inovulação (implantação do embrião no útero da vaca receptora) marcado por eventos importantíssimos. Dentre eles a clivagem, a ativação do genoma embrionário, a compactação dos blastômeros, a formação do botão embrionário e a formação da blastocela, até chegar na fase de blastocisto (Embrapa, 2014). O sucesso desses delicados eventos depende de fatores internos e externos, como a qualidade da maturação citoplasmática oocitária e condições do meio de cultura, e é facilmente influenciável por eles (Ferré *et al.*, 2019)

Até a atualidade, ainda é um grande desafio melhorar meios e técnicas para aumentar a qualidade dos embriões produzidos *in vitro*, que até então continua inferior em comparação à dos produzidos *in vivo*. Em geral, apenas 20% a 40% dos zigotos chegam à fase de blastocisto (Ferré *et al.*, 2019).

As fragmentações mais graves do DNA podem alterar a hidrodinâmica do espermatozoide e impedir sua capacidade de fertilização, enquanto fragmentações mais leves podem não comprometer a fecundação, mas o desenvolvimento embrionário inicial, ou mais à frente, interferir nas etapas posteriores levando à absorção embrionária ou aborto (Beletti, 2013).

Após 7 dias em cultivo os embriões já devem estar em fase de blastocisto. Os blastocistos podem ser classificados como: blastocisto inicial, blastocisto, blastocisto expandido/regredido, blastocisto eclodindo e blastocisto eclodido (Jimenez *et al.*, 2009). O momento ideal do blastocisto para a transferência é quando está expandido/regredido, que é o momento prévio à eclosão, situação em que o embrião se torna aderente. Existem alguns fatores, como raça, manipulação e meio, que podem atrasar ou alterar o desenvolvimento embrionário. (Embrapa, 2014)

4. MATERIAL E MÉTODO

4.1 Amostras de sêmen

Foram selecionadas nove amostras de sêmen congelado de nove touros diferentes do banco de sêmen do Laboratório de Biologia da Reprodução da Universidade Federal de Uberlândia, com diferentes qualidades espermáticas e diversos níveis de fertilidade. Uma amostra (partida) de sêmen de um touro (amostra 1) com qualidade espermática excelente e bom desempenho em PIVEs foi utilizado em todas as rotinas de produção como padrão (referência) para minimizar os efeitos das variáveis não controláveis durante as PIVEs.

4.2 Produção *in vitro* de embriões bovinos (PIVEs)

Foram realizadas sete rotinas de PIVE, sendo que apenas na última rotina foram utilizadas as nove amostras. Cada amostra, com exceção da amostra 1, foi utilizada em quatro rotinas, sendo utilizados em média 17 oócitos por amostra, por rotina.

4.2.1 Seleção Espermática

As amostras foram descongeladas em banho maria por 30 segundos à 37°C. A seleção espermática se deu por meio de gradiente de Percoll 45/90: 200µL de Talp-Sperm (Tyrode's albumin lactate pyruvate medium) + 200µL de Percoll/400µL de Percoll depositados lentamente no fundo do tubo Falcon para a formação do gradiente e seguidos de estabilização em estufa à 38°C e atmosfera de 5% de CO₂ com saturação de umidade por ao menos 10 minutos. Após estabilização, foi depositada a amostra de sêmen imediatamente após ser descongelada por cima do gradiente. O tubo foi submetido a uma centrifugação de 30 minutos a 200 x g.

O sobrenadante foi descartado e coletado o pellet formado no fundo do tubo foi coletado e depositado em um eppendorf de 1,5mL contendo 1mL de PBS, homogeneizado e submetido a uma nova centrifugação para a lavagem dessa amostra dos resquícios de Percoll, durante 5 minutos à 200 x g. Após a centrifugação, o sobrenadante foi retirado e o restante foi novamente homogeneizado para ser utilizado na fertilização (adaptado de Avery; Greve, 1995).

4.2.2 Seleção de Oócitos

Com ovários coletados de abatedouro comercial de Araguari – MG e transportados em garrafa térmica embebida de soro fisiológico à 37°C, foi feita a aspiração folicular destes no Laboratório de Biologia da Reprodução da Universidade Federal de Uberlândia com o auxílio de seringas de 10mL e agulhas 18G para a coleta dos oócitos. O material aspirado, depositado em tubos Falcon, foi filtrado e seguiu para recrutamento e seleção do complexo cúmulo-oócito (COCs) em placas de poliestireno de 90x15 ao microscópio (Lucio *et al.*, 2016); oócitos degenerados e/ou sem células do cúmulo oóphorus e/ou grau III foram excluídos, e apenas os de grau I e II foram lavados e colocados em meio FIV para a fertilização *in vitro* (Stojkovic *et al.*, 2001).

4.2.3 MIV

Após a seleção, os oócitos foram lavados uma vez em gotas com meio TCM 199 HEPES (0,2 mM piruvato sódico, 10 mM HEPES ácido, 10 mM de HEPES sódico, 5 mM bicarbonato de sódio, 83µg/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, 83µg/mL de amicacina, 1µg/mL de FSH, 5µg/mL de LH, suplementado com 10% de soro fetal bovino). Em seguida foram transferidos para a placa de maturação. Em placa de Petri 60x15mm, foram preparadas gotas de 100µL de meio de maturação e cada uma contendo de 15 a 20 oócitos, e a placa preenchida com óleo mineral estéril. As placas foram armazenadas em estufa à 38,5°C, com atmosfera de 5% de CO₂ e umidade saturada por 22h. (Lucio *et al.*, 2016).

4.2.4 FIV

Os oócitos maturados foram lavados três vezes em meio Fert-TALP (TALP suplementado com penicilamina (21.1 mM), hipotaurina (10.4 mM), epinefrina (1 mM), heparina (10mg/mL) e BSA (albumina sérica bovina) (6mg/mL)) e, em seguida, colocados nova placa de Petri 60x15mm em gotas de 100µl desse mesmo meio, também preenchida por óleo mineral.

Com a coleta do pellet da capacitação espermática, foi feita duas alíquotas de 5µl que foram depositadas na Câmara de Neubauer para avaliação da motilidade progressiva e concentração de espermatozoides viáveis, ajustando esse parâmetro para 25mil/µL. Em cada gota da placa de Petri contendo os oócitos maturados foi adicionado 8µl de uma amostra de sêmen e posteriormente incubada por 18h em estufa com temperatura de 38,5%, atmosfera de 5% de CO₂ e umidade saturada (Lucio *et al.*, 2016).

4.2.5 CIV

Passadas 18h do momento da fertilização, as estruturas passaram por um processo de remoção das células do cumulus oóphorus, o desnudamento. Esse processo se dá através de sucessivas pipetagens incompletas promovendo a entrada e saída rápida das estruturas na pipeta e balanço da gota, resultando na remoção das células aderidas. Posteriormente, as estruturas desnudas foram lavadas três vezes em gotas de 100µL de meio SOF (Synthetic Oviduct Fluid) acrescido de piruvato sódico 0,2 mM, 5 mg/mL BSA, 2,5% de soro fetal bovino e 83µg/mL de sulfato de amicacina e transferidos para uma nova placa de Petri 60x15mm com gotas de 100µL contendo o mesmo meio da lavagem e cobertas com óleo mineral estéril (Lucio *et al.*, 2016).

Quarenta e oito horas após a FIV foi calculada a taxa de clivagem, sendo esta a porcentagem de ovócitos que iniciaram a clivagem. No sétimo dia após a FIV foi realizada a contagem dos blastocistos e calculadas as taxas de desenvolvimento embrionário e de blastocistos, sendo a taxa de desenvolvimento embrionário a porcentagem de ovócitos que iniciaram a clivagem e chegaram a blastocisto. Já a taxa de blastocisto é a porcentagem de ovócitos do início da PIVE que chegaram a blastocisto.

4.3 SCD com KIT CANFrag®

Foi utilizado para a avaliação das amostras, um kit destinado para avaliação da descompactação de cromatina de seres humanos, o CANFrag®. Foi feito o teste para

sêmen bovino e demonstrou-se aplicável. O kit contava com uma caixa contendo 12 lâminas pré-preparadas com ágar padrão, alguns eppendorfs com ágar de baixo ponto de fusão, uma solução ácida de HCl, uma solução de lise, um corante e um fixador.

4.3.1 Preparo do Sêmen

Foi descongelada uma nova palheta da mesma partida usada na PIVE à 38°C por 30 segundos. Posteriormente, foi utilizado o mesmo método de seleção por gradiente de Percoll utilizado nas PIVEs.

A concentração espermática foi determinada pela contagem de espermatozoides na Câmara de Neubauer. Quando necessário, foi feita a diluição em mais PBS para atingir a concentração de 15-20 x 10⁶

4.3.2 Preparo da Lâmina

Foram feitas lâminas com as 9 amostras submetidas à PIVE segundo o manual de instruções do fabricante. Resumidamente, o tubo de agarose gel foi colocado em água fervente (90-100°C) por dois minutos. Em seguida o tubo foi deixado em banho-maria a 37°C e foi adicionado 40µL de sêmen já com concentração ajustada, misturando-se delicadamente. Posteriormente foi colocado 150µL desta mistura na lâmina revestida de ágar e coberta com lamínula. As lâminas foram colocadas em geladeira (4-8 °C) por 5 minutos para solidificar o gel e a lamínula foi removida cuidadosamente deslizando-a para fora. Essas lâminas foram colocadas em superfície uniforme e cobertas com 1mL de desnaturante ácido e incubada em temperatura ambiente por 7 minutos. Após retirada desta solução, foi colocado imediatamente 1mL de solução de lise por 10 minutos em temperatura ambiente. Posteriormente a lâmina foi cuidadosamente lavada com 20 mL de água destilada. A lâmina então entrou com um processo de desidratação progressiva, com álcool 70%, 90% e absoluto, respectivamente, cada um por 2 minutos, retirando sempre o excesso do álcool anterior. Ao final, retirou-se o excesso e a lâmina foi seca ao ar.

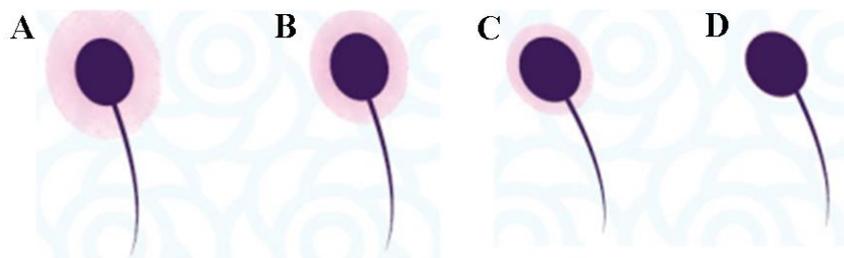
Finalmente, a lâmina foi corada com a solução de corante + fixador (300µL + 300µL), despejando por completo em toda sua superfície. Esse processo durou 9

minutos. Decorrido o tempo, o excesso de corante foi retirado e a lâmina mergulhada rapidamente em recipiente com água. A lâmina então foi seca ao ar.

4.4 Avaliação Subjetiva do Halo Espermático

Para a avaliação subjetiva da formação do halo no espermatozoide foram fotografados campos aleatórios da lâmina em microscópio Leica ICC50 HD com objetiva de 40x. Posteriormente, as imagens foram avaliadas visualmente, sendo analisadas cerca de 200 cabeças de espermatozoide por amostra. Os espermatozoides foram classificados como sem halo, com halo pequeno (menor que 1/3 da cabeça do espermatozoide), com halo médio (aproximadamente 1/3 da cabeça do espermatozoide) e com halo grande (maior que 1/3 da cabeça do espermatozoide) (figura 1).

Figura 1. (A) e (B) são espermatozoides classificados como sem fragmentação do DNA. (C) e (D) são espermatozoides classificados como com fragmentação do DNA.



Fonte: Adaptada do Manual de Instruções de Uso do Kit CANfrag®, 2024.

4.5 Avaliação Computadorizada do Halo Espermático

As imagens capturadas também foram avaliadas computacionalmente utilizando-se um algoritmo desenvolvido em ambiente de programação Scilab. Este algoritmo identificou por limiarização (Thresholding) a cabeça do espermatozoide juntamente com o halo e determinou em pixel a área total desta região (cabeça + halo). Foram avaliados 100 espermatozoides de cada amostra.

4.6 Análise Estatística

Como forma de neutralizar parcialmente os efeitos das variáveis não controláveis na PIVE, foi realizada a normalização dos dados obtidos em cada PIVE, tendo como parâmetro os resultados obtidos com a amostra referência. Para isso, as taxas da amostra referência foram transformadas em 100% e as taxas das demais foram normalizadas proporcionalmente às taxas da amostra referência. Como em alguns casos as taxas percentuais da amostra avaliada foi maior do que a amostra referência, após a normalização, algumas taxas apresentaram valor superior a 100%.

Foi então realizado o teste de Kolmogorov-Smirnov para determinar se a distribuição dos dados era normal (Gaussiana). Uma vez verificado que a distribuição não era normal, para avaliar como as alterações identificadas pelo Kit CANFrag® influencia a produção *in vitro* de embriões bovinos, foi realizado o teste de correlação de Spearman os resultados das avaliações dos espermatozoides e as taxas normalizadas de clivagem, de desenvolvimentos embrionário e de blastocisto. Foram considerados estatisticamente significativos os coeficientes de correlação que apresentaram $P < 0,05$.

5. RESULTADOS

As taxas médias reais e normalizadas de clivagem, desenvolvimento embrionário e blastocisto obtidas nas rotinas de PIVE estão demonstradas na tabela 1.

Tabela 1. Taxas médias reais e normalizadas de clivagem, desenvolvimento embrionário e blastocisto obtidas nas rotinas de PIVE.

Amostra	TCR (%)	TCN (%)	TDER (%)	TDEN (%)	TBR (%)	TBN (%)
1	68,6	100	22,2	100	14,6	100
2	58,2	84,8	28,2	126,8	15,9	108,5
3	32,7	47,7	40,2	180,8	11,5	78,8
4	26,1	38,1	48,1	216,5	11,4	77,6
5	54,1	78,9	36,8	165,4	15,8	107,7
6	36,6	53,3	35,7	160,8	10,4	71,1
7	31,3	45,6	31,1	140,0	11,4	77,5
8	21,7	31,6	14,4	65,0	0,8	5,6
9	61,7	89,9	17,2	77,5	9,9	67,9

TCR: taxa de clivagem real; TCN: taxa de clivagem normalizada; TDER: taxa de desenvolvimento real; TDEN: taxa de desenvolvimento normalizado; TBR: taxa de blastocisto real; TBN: taxa de blastocisto normalizada. Fonte: Autoria própria, 2024.

As avaliações dos espermatozoides pelo Kit CANFrag® estão demonstradas na tabela 2. Devido a sujidades que se formaram na lâmina da amostra 8, o algoritmo de análise da área do halo não conseguiu identificar de forma confiável a região cabeça mais o halo, conseqüentemente não foram utilizados aos dados desta variável para a amostra 8.

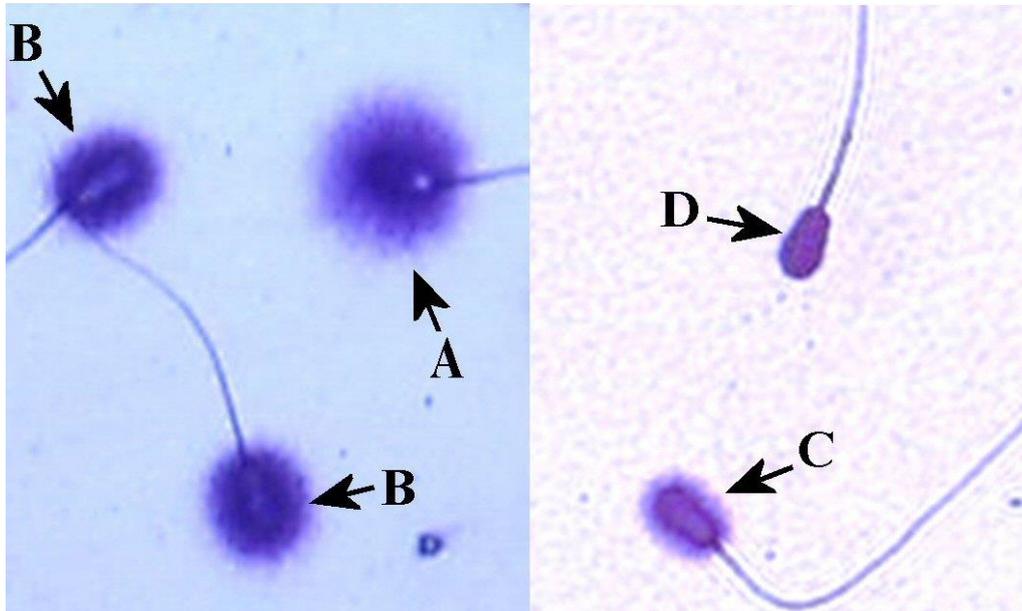
Tabela 2. Resultados das avaliações das amostras de sêmen utilizando o Kit CANFrag®.

Amostra	Sem halo (%)	Halo P (%)	Halo M (%)	Halo G (%)	Halo M+G (%)	Com Halo (%)	Área do halo (pixel)
1	3,4	2,0	94,1	0,5	94,6	96,6	395
2	16,7	83,3	0,0	0,0	0,0	83,3	398
3	10,9	10,9	61,1	17,1	78,2	89,1	295
4	29,1	68,0	2,9	0,0	2,90,8	70,9	267
5	41,6	1,9	56,5	0,0	56,5	58,4	272
6	88,2	11,8	0,0	0,0	0,0	11,8	301
7	5,9	59,3	34,7	0,0	34,7	94,1	390
8	19,2	0,0	77,4	3,4	80,8	80,8	
9	0,0	10,1	87,8	2,0	89,9	100	417

Halo P: menor que 1/3 do tamanho da cabeça do espermatozoide. Halo M: aproximadamente do tamanho de 1/3 da cabeça do espermatozoide. Halo G: maior que 1/3 do tamanho da cabeça do espermatozoide. Fonte: Autoria própria, 2024.

A figura 2 mostra exemplos de espermatozoides de amostras de sêmen processadas pelo KIT CANFrag®.

Figura 2. Imagens de lâminas de sêmen processado pelo Kit CANFrag®, onde se observa cabeça de espermatozoide com halo grande (A), com halo médio (B), com halo pequeno (C) e sem halo (D).



Fonte: Autoria própria, 2024. Imagem retirada das lâminas com o microscópio Leica ICC50 HD no aumento de 40x

Os coeficientes de correlação entre as taxas das PIVEs e as análises pelo Kit CANFrag® obtidos pelo teste de Spearman estão demonstrados na tabela 3.

Tabela 3. Coeficiente de correlação de Spearman entre as taxas das PIVEs e as análises pelo Kit CANFrag®.

	Taxa de clivagem	Taxa de desenvolvimento embrionário	Taxa de blastocisto
Área do halo	0,71	-0,95*	-0,14
Sem Halo	-0,43	0,48	0,07
Halo pequeno	-0,05	0,43	0,30
Halo médio	0,28	-0,50	-0,23
Halo grande	-0,04	-0,37	-0,37
Halo médio + grande	0,28	-0,50	-0,23
Com Halo	0,43	-0,48	-0,07

* $P < 0,05$. Fonte: Autoria própria, 2024.

O teste de Spearman mostrou correlação significativa ($P < 0,05$) e negativa somente entre a área do halo e a taxa de desenvolvimento embrionário.

6. DISCUSSÃO

Foram realizadas sete rotinas de PIVE, sendo que apenas na última rotina foram utilizadas as nove amostras. Importante salientar que em todas as rotinas existia uma gota com oócitos onde foi utilizada a amostra de sêmen número 1. Isso foi necessário para que esta mostra fosse utilizada como referência, para que fossem calculadas as taxas de clivagem, de desenvolvimento embrionário e de blastocisto normalizadas. Para isso, as taxas da amostra 1 foram consideradas 100% e as taxas das demais amostras, foram transformadas (normalizadas) proporcionalmente às taxas da amostra 1. Isso explica o porquê existem taxas acima de 100% para algumas amostras de sêmen. Dessa forma, mesmo as rotinas das nove amostras não tendo sido realizadas ao mesmo tempo, a influência das variáveis não controláveis foi minimizada (Hiraiwa *et al.*, 2021).

O uso do Kit CANFrag® levou a formação de halos semelhantes ao descrito no seu Manual de Instrução e em artigos (B *et al.*, 2020; Patel *et al.*, 2022). Segundo o Manual, existem os espermatozoides sem halo e com halo pequeno, são como portadores de fragmentação de DNA. Já aquele com halos médios e grandes, não são portadores de fragmentação de DNA. A mensuração da área ocupada pelo halo e a cabeça do espermatozoide utilizando-se análise de imagem computacional foi sugerida por Fernández *et al.* (2003) como uma forma de minimizar a subjetividade do método SCD. Importante salientar que o Kit CANFrag® foi idealizado para ser utilizado em humanos e conseqüentemente, não foram encontradas referências bibliográficas sobre seu possível uso para sêmen bovino.

Para verificar como a presença e o tamanho do halo formado durante o uso do Kit CANFrag® se relaciona com eficiência da PIVE, foi realizado o teste de correlação de Spearman entre as taxas de clivagem, desenvolvimento embrionário e blastocisto e as avaliações dos halos. A única correlação estatisticamente significativa foi entre área do halo e a taxa de desenvolvimento embrionário, sendo esta negativa. Ou seja, quanto maior a área média dos halos da amostra pior é a taxa de desenvolvimento embrionário. Segundo Beletti (2013), espermatozoides com alterações de cromatina leves não alteram a hidrodinâmica do espermatozoide e conseqüentemente, não interfere em sua capacidade fecundante. No entanto, estas alterações leves deixam o

espermatozoide suscetíveis à fragmentação de DNA. Existe também a possibilidade de durante a espermatogênese ocorrer a fragmentação do DNA por apoptose de uma célula germinativa mais avançada e, mesmo assim, ser formado um espermatozoide com fragmentação do DNA e como consequência, com cromatina mal compactada. Ou seja, a fragmentação do DNA pode ser causa ou consequência da alteração da cromatina (Hamilton; Assumpção, 2020). Independente de como ocorre a fragmentação, quando um espermatozoide com DNA fragmentado fecunda um oócito, ocorre o comprometimento do desenvolvimento embrionário. Portanto, grandes áreas de halo provavelmente correspondem a estas alterações leves que não interferem na fecundação, mas comprometem o desenvolvimento embrionário.

Esses resultados não são compatíveis com a maioria dos artigos que utilizam o SCD. Nesses artigos, quanto maior o halo, menor é a fragmentação do DNA. A ausência de halo seria devido a dispersão (perda) do DNA que por estar fragmentado, se soltaria da matriz nuclear e se dispersaria. Já os espermatozoides com DNA íntegro, teriam a formação de halo porque o DNA estaria preso a matriz nuclear, não se dispersando (se perdendo) totalmente.

Importante ressaltar que a maioria dos trabalhos com SDC são realizados com espermatozoides humanos, que possuem uma cromatina muito mais frouxa do que espermatozoides de bovino, o que faz com que as respostas ao tratamento de lise sejam distintas (Ribas-Maynou *et al.*, 2021). Assim, pode-se deduzir que no presente trabalho a hidrólise (lise) promovida pelo Kit CANFrag® não foi suficiente para dispersar o DNA fragmentado. Mas, foi suficiente para formar halo nos espermatozoides com cromatina frouxa, de forma semelhante ao que acontece nos métodos de coloração com azul de toluidina após hidrólise ácida e na reação de Feugen (Beletti; Mello, 2004). Isso explicaria os resultados diferentes obtidos no presente trabalho. No kit comercial “Sperm Bos Halomax”, específico para espermatozoides de touro, a formação de Halo acontece quando existe fragmentação do DNA (García-Macías *et al.*, 2006; Fortes *et al.*, 2012, Kusumawati *et al.*, 2023).

7. CONCLUSÃO

O uso do Kit CANFrag® para identificação de alterações cromatínicas em espermatozoides de touro deve ser interpretado de forma diferente ao utilizado para espermatozoides humanos.

Devem ser considerados espermatozoides com fragmentação de DNA aqueles com halo.

A área do halo formado pelo Kit CANFrag® está relacionada com alterações que não interferem no processo de fecundação *in vitro*, porém interferem no desenvolvimento embrionário inicial *in vitro*.

REFERÊNCIAS

- ALBERTS, B. **Molecular Biology of the Cell**. 7th ed., New York, Ny U.A., Garland Science Taylor & Francis, 2022.
- ALKMIN, D.V.; MARTINEZ-ALBORCIA, M.J.; PARRILLA, I.; VAZQUEZ, J.M.; MARTINEZ, E.A.; ROCA, J. The nuclear DNA longevity in cryopreserved boar spermatozoa assessed using the sperm-sus-halomax. **Theriogenology**, v.79, n.9, p.1294-1300, jun. 2013. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.theriogenology.2013.02.026>
- AVERY, B.; GREVE, T. Impact of percoll on bovine spermatozoa used for in vitro insemination. **Theriogenology**, v.44, p.871-878, 1995. Elsevier Science Inc.
- B, V.L.; STEPHEN, S.; DEVARAJ, R.; MITHRAPRABHU, S.; BERTOLLA, R.P.; MAHENDRAN, T. Sperm chromatin structure assay versus sperm chromatin dispersion kits: technical repeatability and choice of assisted reproductive technology procedure. **Clinical And Experimental Reproductive Medicine**, v. 47, n. 4, p. 277-283, 1 dez. 2020. The Korean Society for Reproductive Medicine. <http://dx.doi.org/10.5653/cerm.2020.03860>.
- BELETTI, M. E. Cromatina espermática: quebrando paradigmas. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 37, p. 92-96, 2013.
- BELETTI, M.E.; COSTA, L.F; GUARDIEIRO, M.M. Morphometric features and chromatin condensation abnormalities evaluated by toluidine blue staining in bull spermatozoa. **Braz. J. Morphol. Sci.**, v. 22(2), p.85–90, 1 jan. 2005.
- BELETTI, M.E; MELLO, M.L.S. Comparison between the toluidine blue stain and the Feulgen reaction for evaluation of rabbit sperm chromatin condensation and their relationship with sperm morphology. **Theriogenology**, v.62, n.3-4, p.398-402, ago. 2004. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.theriogenology.2003.10.016>
- BISHOP, M. W. H. Paternal contribution on embryonic death. **J Reprod Fertil**, v.7, n.3, p.383–396, 1 jun. 1964. <https://doi.org/10.1530/jrf.0.0070383>.
- BRACKETT, B.G.; BOUSQUET, D.; BOICE, M.L.; DONAWICK, W.J.; EVANS, J.F; DRESSEL, M.A. Normal development following in vitro fertilization in the cow. **Biology of Reproduction**, v.27, p. 147-158, abr. 1982.
- CARVALHO, V.H.S; CARMO, R.B.; PINTO, S.C.C. Impacto das biotécnicas da reprodução animal e o melhoramento genético na pecuária de corte. **Pubvet**, v.17, n.8, p.1-10, 9 ago. 2023 [ojs.pubvet.com.br/index.php/revista/article/view/3201. https://doi.org/10.31533/pubvet.v17n8e1427](https://doi.org/10.31533/pubvet.v17n8e1427). Accessed 28 Sept. 2023.

ERENPREISS, J.; SPANO, M.; ERENPREISA, J.; BUNGUM, M.; GIWERCMAN, A. Sperm chromatin Structure and Male Fertility: Biological and Clinical Aspects." *Asian Journal of Andrology*, v.8, n.1, p.11–29, jan. 2006. <https://doi.org/10.1111/j.1745-7262.2006.00112.x>.

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, 2016.

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

FERNÁNDEZ, J.L.; MURIEL, L.; RIVERO, M.T.; GOYANES, V.; VAZQUEZ, R.; ALVAREZ, J.G. The sperm chromatin dispersion test: a simple method for the determination of sperm DNA fragmentation. **Journal of Andrology**, v.24, n.1, p.59-66, jan 2003. American Society of Andrology.

FERRÉ, L.B.; KJELLAND, M.E.; STRØBECH, L.B.; HYTTEL, P.; MERMILLOD, P.; ROSS, P.J. Review: recent advances in bovine in vitro embryo production. **Animal**, v.14, n.5, p.991-1004, 2020. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1017/s1751731119002775>.

FORTES, M.R.S.; HOLROYD, R.G. The integrity of sperm chromatin in young tropical composite bulls. **Theriogenology**, vol. 78, no. 2, July 2012, pp. 326-333.e4, <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2012.02.007>.

FRASER, L.; STRZEŃSEK, J. Is there a relationship between the chromatin status and DNA fragmentation of boar spermatozoa following freezing–thawing? **Theriogenology**, v. 68, n. 2, p. 248-257, jul. 2007. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.theriogenology.2007.05.001>.

GARCÍA-MACÍAS, V.; PAZ, P.; MARTINEZ-PASTOR, F.; ÁLVAREZ, M; GOMES-ALVES, S.; BERNARDO, J.; ANEL, E.; ANEL, L. DNA fragmentation assessment by flow cytometry and sperm-bos-halomax (bright-field microscopy and fluorescence microscopy) in bull sperm. **International Journal of Andrology**, vol. 30, no. 2, p. 88–98, Apr. 2007 <https://doi.org/10.1111/j.1365-2605.2006.00723.x>.

GONÇALVEZ, R.L.R.; VIANA, J.H.M. Situação atual da produção de embrião bovinos no brasil e no mundo. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.43, n.2, p156-159, abr. 2019.

GOSÁLVEZ, J.; RODRÍGUEZ-PREDREIRA, M.; MOSQUERA, A.; LÓPEZ-FERNÁNDEZ, C.; ESTEVES, S. C.; AGARWAL, A.; FERNÁNDEZ, J. L. Characterisation of a subpopulation of sperm with massive nuclear damage, as recognised with the sperm chromatin dispersion test. **Andrologia**, v.46, n.6, p.602-609, 26 mai. 2013. Hindawi Limited. <http://dx.doi.org/10.1111/and.12118>.

HAMILTON, T.R.S.; ASSUMPÇÃO, M.E.O.D. Sperm DNA fragmentation: causes and identification. **Zygote**, v.28, p.1–8, 20, out. 2019 doi: <https://doi.org/10.1017/s0967199419000595>

HIRAIWA, S.H.; ALVES, P.H.M.; TRAVENÇOLO, B.A.N; MARTINS, M.C.; BELETTI, M.E. Classification of the sperm chromatin compaction alterations in bulls (*Bos taurus*) and its correlation with the efficiency of the in vitro production of embryos. **Bioscience Journal**, v.37, p. 1-10, 10 jun. 2021. EDUFU - Editora da Universidade Federal de Uberlândia. <http://dx.doi.org/10.14393/bj-v37n0a2021-47967>.

JIMENEZ, C.R; TORRES, C.A.A.; NASCIMENTO, V.A.; SEPULVEDAD, C. Influência do desenvolvimento e qualidade de embriões transferidos a fresco e congelados na taxa de prenhez. **Associação Brasileira de Zootecistas**, p. 1-4, 18 a 22 mai 2009.

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, 2016.

MARTINS, M.C. **Avaliação da suplementação do meio de maturação in vitro de ovócitos bovinos com beta-ngf**. 2023. Dissertação (Doutorado em Medicina Veterinária) – Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2023. Disponível em: <https://repositorio.ufu.br/handle/123456789/41302>

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, fev. 2021. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.theriogenology.2020.12.004>.

MCLAY, D.W.; CLARKE, H.J. Remodelling the paternal chromatin at fertilization in mammals. **Reproduction**, v. 125, n.5, p.625-633, 1 maio 2003. Bioscientifica. <http://dx.doi.org/10.1530/rep.0.1250625>

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

MILLER, D.; BRINKWORTH, M.; ILES, D. Paternal DNA packaging in spermatozoa: more than the sum of its parts dna, histones, protamines and epigenetics. **Reproduction**, v.139, n. 2, p. 287-301, fev. 2010. Bioscientifica. <http://dx.doi.org/10.1530/rep-09-0281>.

OLIVEIRA, C.S.; SARAPIÃO, R.V.; QUINTÃO, C.C.R. Biotécnicas da reprodução em bovinos. **EMBRAPA**, out. 2014.

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

PARMAR, S. C.; DHAMI, A. J.; HADIYA, K. K.; PARMAR, C. P. Early embryonic death in bovines: an overview. **Raksha Technical Review**, v.6, n.1, p. 6-12, Sep.2016

PATEL, K.; PATEL, V.; PATEL, V.; PATEL, M. Creatine – a wonder molecule: a comparison study to identify the best in vitro capacitating agents for sperms. *International Journal of Research in Engineering, Science and Management*, v.5, n.8, p.47-57, ago. 2022.

RIBAS-MAYNOU, J.; GARCIA-BONAVILA, E.; HIDALGO, C.O.; CATALÁN, J.; MIRÓ, J.; YESTE, M. Species-specific differences in sperm chromatin decondensation between eutherian mammals underlie distinct lysis requirements. *Frontiers In Cell And Developmental Biology*, v.9, p.1-11, 30 abr. 2021. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fcell.2021.669182>.

ROCHDI, C.; ALLAI, L.; BELLAJDEL, I.; TAHERI, H.; SAADI, H.; MIMOUNI, A.; CHOUKRI, M. Evaluation of sperm DNA fragmentation using halosperm technique after the freezing–thawing process in men: a study on the validation of the scd protocol. *Journal Of Reproduction & Infertility*, v. 25, n. 1, p. 12-19, 17 mar. 2024. Knowledge E DMCC. <http://dx.doi.org/10.18502/jri.v25i1.15194>.

RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, H. Laboratory semen assessment and prediction of fertility: still utopia? *. *Reproduction in Domestic Animals*, v.38, n.4, p.312–318, 29 jul. 2003 <https://doi.org/10.1046/j.1439-0531.2003.00436.x>.

SCHAGDARSURENGIN, U.; PARADOWSKA, A.; STEGER, K. Analysing the sperm epigenome: roles in early embryogenesis and assisted reproduction. *Nature Reviews Urology*, v. 9, n. 11, p. 609-619, 9 out. 2012. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/nrurol.2012.183>.

SIMÕES, R.; SIQUEIRA, A. F. P.; NICHI, M.; VISINTIN, J. A.; ASSUMPÇÃO, M. E. O. D. Qualidade da cromatina espermática e sua implicação no desenvolvimento embrionário inicial de bovinos. *Revista de Educação Continuada Em Medicina Veterinária E Zootecnia Do CRMV-SP*, v.12, n.3, 2014, p.18–35, www.revistamvez-crmvsp.com.br/index.php/recmvz/article/view/24625, <https://doi.org/10.36440/recmvz.v12i3.24625>.

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 and culture. *Biology Of Reproduction*, v.64, n.3, p.904-909, 1 mar. 2001.

VIANA, H. M. 2021 Statistics of embryo production and transfer in domestic farm animals. *Embryo Technology Newsletter*, v.40, n.4, p.22-40, 2022

VIZONÁ, R.G.; PEREZ, B.C.; PEIXOTO, M.G.C.D.; VIANA, J.H.M.; VENTURA, R.V.; FILHO, A.E.V.; BALIEIRO, J.C.C. Genetic analysis of in-vitro embryo production traits in dairy gir cattle. *Theriogenology*, v. 148, p. 149–161, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2020.02.014>

WATSON, P.F. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Animal Reproduction Science*, v.60-61, p.481-492, jul. 2000. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0378-4320\(00\)00099-3](http://dx.doi.org/10.1016/s0378-4320(00)00099-3).

