

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
CURSO DE BIOTECNOLOGIA

Fragmentação do DNA espermático identificada pelo teste de Nicoletti e sua correlação com a eficiência da produção in vitro de embriões bovinos

Felipe Rosalino Leite

Monografia apresentada à Coordenação do
Curso de Biotecnologia, da Universidade
Federal de Uberlândia, para obtenção do
grau de Bacharel em Biotecnologia.

Uberlândia - MG
Março - 2024

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
CURSO DE BIOTECNOLOGIA

Fragmentação do DNA espermático identificada pelo teste de Nicoletti e sua correlação com a eficiência da produção in vitro de embriões bovinos.

Felipe Rosalino Leite

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Emílio Beletti

Monografia apresentada à Coordenação do
Curso de Biotecnologia, da Universidade
Federal de Uberlândia, para obtenção do
grau de Bacharel em Biotecnologia.

Uberlândia - MG
Março - 2024

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
CURSO DE BIOTECNOLOGIA

Fragmentação do DNA espermático identificada pelo teste de Nicoletti e sua correlação com a eficiência da produção in vitro de embriões bovinos.

Felipe Rosalino Leite

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Emílio Beletti

Instituto de Ciências Biomédicas

Homologado pela coordenação do Curso
de Biotecnologia em __/__/__

Prof. Dr. Nilson Nicolau Junior

Uberlândia
Março - 2024

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
CURSO DE BIOTECNOLOGIA

Fragmentação do DNA espermático identificada pelo teste de Nicoletti e sua correlação com a eficiência da produção in vitro de embriões bovinos.

Felipe Rosalino Leite

Aprovado pela Banca Examinadora em: 28 / 03 / 2024

Nota: 90

Prof. Dr. Marcelo Emílio Beletti

Uberlândia, ____ de _____ de _____

Dedico esse trabalho aos meus pais Luciana e André

*Luiz por sempre acreditarem em mim e em meu
sucesso.*

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais Luciana e André Luiz, por me apoiarem em minhas escolhas desde o início e serem meus maiores amuletos da sorte. Minha maior vitória é ter vocês como base e como meus melhores amigos.

A minha avó Elinete por ser minha outra metade, sempre me trazendo paz e calma quando eu mais precisei e ser a maior representação de amor que eu conheço.

A minha prima Mayra, que mesmo sem saber foi uma voz de acalento, força e estímulo. Torço por você com todo o meu ser.

A minha tia-avó Margareth que mesmo não estando mais fisicamente entre nós sempre foi uma das minhas maiores apoiadoras e mesmo após se ir continuou de forma ativa me dando força e incentivo.

Ao restante da minha família, em especial aos meus tios e tias que sempre me colocaram em suas orações e me incentivaram em minhas decisões.

Aos meus amigos, em especial a Ana Letícia, Victória, Letícia e Luís Felipe por serem minha família enquanto estive tão longe de casa e por todos os momentos (de alegria ou tristeza) que passamos juntos durante esses anos.

Ao meu orientador Marcelo, por ter paciência comigo respeitando meu ritmo e me ensinar muita coisa que levarei em minha experiência profissional.

RESUMO

Atualmente, a maioria dos sêmens utilizados em biotecnologias reprodutivas são submetidos apenas ao espermograma de rotina. No entanto, frequentemente existem casos em que o sêmen é classificado como “normal”, porém os resultados obtidos nas biotecnologias são insatisfatórios. Isso pode ser explicado pela presença de alterações na cromatina espermática que não são detectadas pelo espermograma e que comprometem aspectos como a capacidade fecundante dos espermatozoides e o desenvolvimento embrionário. Existem diversos métodos para identificar essas alterações, sendo considerado o método “ouro” o “Sperm Chromatin Structure Assay” (SCSA), o qual nem sempre têm resultados satisfatórios. Recentemente o teste de Nicoletti, desenvolvido originalmente para análise de fragmentação de DNA (apoptose) de células somáticas, foi sugerido como alternativa ao SCSA. Nesse trabalho, objetivou-se verificar a relação entre as alterações de cromatina espermática identificada pelo teste de Nicoletti e a eficiência da produção in vitro de embriões (PIVE) bovinos. Nove amostras de sêmen bovino de diferentes níveis de fertilidade foram submetidas ao teste de Nicoletti e utilizadas em rotinas de PIVEs. Foram calculadas as taxas médias de clivagem, blastocisto e desenvolvimento embrionário de cada amostra de sêmen. Posteriormente foi realizado o teste de correlação de Pearson entre os resultados obtidos pelo teste de Nicoletti e as taxas das PIVEs. A única correlação significativa encontrada foi negativa e entre o teste de Nicoletti e a taxa de clivagem. Esta taxa está relacionada com a capacidade fecundante dos espermatozoides. É sabido que as alterações leves na cromatina espermática geralmente não interferem na capacidade fecundante dos espermatozoides, mas interfere no desenvolvimento embrionário. Ao contrário das alterações cromatínicas severas, que alteram a morfologia da cabeça, alterando a hidrodinâmica e conseqüentemente, interferindo na capacidade fecundante dos espermatozoides. Assim, foi possível concluir que o teste de Nicoletti, quando utilizado na avaliação da cromatina de espermatozoides de touro, identifica principalmente alterações da cromatina espermática severas, não sendo uma boa alternativa para o SCSA.

Palavras chaves: cromatina espermática; iodeto de propídio; citometria de fluxo; espermatozoide; fertilidade; desenvolvimento embrionário.

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	1
2.	OBJETIVO GERAL	5
2.1.	Objetivos específicos	5
3.	METODOLOGIA	5
3.1.	Obtenção das amostras de sêmen	5
3.2.	Seleção espermática	5
3.3.	Teste Nicoletti.....	6
3.4.	Produção in vitro de embriões (PIVE)	7
3.4.1.	Obtenção e seleção de ovócitos.....	7
3.4.2.	Maturação in vitro (MIV)	8
3.4.3.	Fertilização in vitro (FIV)	8
3.4.4.	Cultivo in vitro (CIV).....	9
3.4.5.	Análise estatística	9
4.	RESULTADOS.....	10
5.	DISCUSSÃO	12
6.	CONCLUSÃO	14
7.	REFERÊNCIAS	14

1. INTRODUÇÃO

A avaliação do potencial de fertilidade do sêmen de um touro é de suma importância quando o objetivo é a utilização desse material juntamente a técnicas biotecnológicas de reprodução como a inseminação artificial (IA) e a produção *in vitro* de embriões (PIVE) (GARCÍA-ÁLVAREZ, 2009). É imprescindível que todos os touros destinados à reprodução passem pela avaliação de sua aptidão reprodutiva, processo esse que compreende a observação de quesitos como as saúdes geral e genética desses animais assim como a saúde do sistema genital dos mesmos (CBRA, 2013). Um dos exames mais importantes realizados no período que antecede a destinação do sêmen bovino para processos de reprodução assistida, denominado espermograma, teve suas bases estabelecidas na Suécia por Lagerlöf (1934), e consiste na avaliação de características dos espermatozoides que possuem influência decisiva na eficiência da reprodução. Inicialmente o sêmen é coletado através de técnicas como o uso de vagina artificial e eletroejaculação e após a correta diluição esse material é submetido a exames que irão avaliar dentre outros aspectos a motilidade espermática, o vigor, concentração espermática e alterações morfológicas (CBRA, 2013).

A motilidade espermática é medida em porcentagem e representa a quantidade de espermatozoides móveis e pode ser avaliada com métodos computacionais, enquanto o vigor é classificado de 1 a 5 e faz referência a velocidade e intensidade do movimento espermático, onde 1 representa uma movimentação exclusivamente oscilatória e 5 um movimento progressivo, retilíneo e muito rápido. Já a concentração espermática faz alusão à quantidade de espermatozoides presentes em cada centímetro cúbico ($\text{cm}^3 = \text{mL}$) de amostra e essa característica é medida principalmente através da utilização da câmara de Neubauer. A avaliação da morfologia do espermatozoide é realizada em esfregaços de sêmen corados e observados em microscópio de campo claro ou não corados e observados em microscopia de contraste de fase. Essa avaliação é feita identificando-se a porcentagem de alterações

morfológicas da cabeça e da cauda dos espermatozoides (CBRA, 2013). A correta identificação desses parâmetros é imprescindível visto que dessa maneira pode-se reduzir a chance de utilização de espermatozoides provenientes de animais com fertilidade reduzida. Ao discutir-se o componente “touro” isoladamente, a importância da fertilidade do macho se prova fortemente maior do que a da fêmea de maneira individual, uma vez que é esperado que um touro seja capaz de cobrir várias vacas, tanto na monta natural quanto na inseminação artificial (BARBOSA; MACHADO, 2005).

Contudo, mesmo que, por muitas décadas, esse tipo clássico de análise de sêmen tenha sido considerado o maior suporte para identificação de fator de infertilidade masculina, houve diversos casos em que os parâmetros avaliados se encontravam na faixa “normal”, todavia os resultados das fertilizações demonstravam que os sêmens utilizados eram “questionáveis” ou “insatisfatórios” (EVENSON, 2016). Um dos maiores problemas dessa análise clássica se resume na falha da mesma em conseguir detectar alguns defeitos no espermatozoide, como alterações na cromatina espermática, que comprometem a integridade do genoma masculino. Sendo assim, viu-se necessária a utilização de outros métodos de análise de qualidade de sêmen bovino que fossem sensíveis a ponto de identificar essas alterações na cromatina espermática, objetivando a otimização dos resultados das inseminações artificiais ou fertilizações *in vitro* (CALISKAN et al., 2022).

Foi apontado por Watson (2000) que uma das causas responsáveis pelo insucesso na inseminação artificial era a utilização de espermatozoides que apresentavam seu DNA danificado. Descoberta essa que complementou o que Dobrinski e Barth (1993) mostraram em sua pesquisa, onde concluíram que existia uma estreita relação entre o número de espermatozoides com DNA danificado e o número de patologias espermáticas. Dependendo da intensidade e frequência dessas alterações na cromatina dos espermatozoides, a fertilidade do macho poderia ser comprometida de diferentes maneiras, como por exemplo, alterações leves

poderiam interferir em etapas posteriores à fecundação e o desenvolvimento embrionário inicial de forma a possivelmente causar morte embrionária e reabsorção fetal ou aborto. Alterações um pouco mais graves mesmo não interferindo na motilidade dos espermatozoides e consequentemente no processo de fecundação, poderiam ser responsáveis por tornar inviável a união dos pró-núcleos masculino e feminino, de forma a inviabilizar o desenvolvimento do zigoto. Em casos de alterações graves na cromatina dos espermatozoides, eles poderiam apresentar modificações morfológicas como alterações no formato da cabeça, o que afetaria sua motilidade, dessa forma interferindo diretamente na fecundação (BELETTI, 2013).

Existem hoje diversos métodos para avaliar a integridade da cromatina espermática e identificar alterações em sua estabilidade como o uso do corante catiônico azul de toluidina descrito por Mello (1982); o ensaio cometa (IRVINE et al., 2000), que se baseia em uma eletroforese de células isoladas; a técnica de dispersão de cromatina espermática (SCD) (QIU et al., 2020); e a análise da estrutura da cromatina espermática (SCSA) (EVENSON et al., 1980), o qual até os dias atuais é tido como o principal método de detecção para a avaliação da integridade da cromatina espermática (PANG et al., 2022). Outra alternativa é o teste de Nicoletti, que consiste na marcação do material genético espermático com o corante iodeto de propídio (PI) e posterior avaliação através de citometria de fluxo a fim de diferenciar células saudáveis de células apoptóticas. As células apoptóticas seriam menos intensamente marcadas por PI do que as normais (NICOLETTI et al., 1991). Até o momento este método foi testado em humanos (WINKLE et al., 2009), equinos (KAKASI et al., 2015) e suínos (KAKASI et al., 2015), nunca tendo sido testado em sêmen bovino.

A escolha por métodos de avaliação da integridade da cromatina espermática diferentes do SCSA vem se justificando a cada dia mais (ZINI et al., 2009), já que existem diversos estudos que mostram que, mesmo a análise da estrutura da cromatina espermática sendo considerada o método de ouro para detecção e avaliação da integridade espermática, os

resultados obtidos através do mesmo não têm demonstrado forte relação com a fertilidade dos touros analisados (NAGY et al., 2013).

A apoptose é uma forma muito comum de morte celular presente nos eucariotos e tem um papel importante no processo da embriogênese. Esse processo conta com a ativação de caspases e outras proteases resultando na clivagem de substratos essenciais para o funcionamento normal das células (LI; YUAN, 2008), como proteínas nucleares. Além disso essas caspases também acabam por ativar outras enzimas de degradação como as DNases, cuja ação cliva o material genético celular (RICCARDI et al., 2006).

Sabendo da relação da taxa de apoptose espermática com a taxa de fertilidade do touro, o uso do teste de Nicoletti se mostra muito eficiente na identificação desse fenômeno de morte celular (RICCARDI et al., 2006). Grande parte do sucesso desse método se dá ao uso do iodeto de propídio, um composto fluorogênico que se liga aos ácidos nucleicos da cromatina espermática (WALLEN et al., 1982) de modo que a emissão de fluorescência é proporcional ao conteúdo de DNA. Isso torna fácil a identificação da presença de apoptose no sêmen marcado por PI e analisado por citometria de fluxo, já que as células apoptóticas apresentam um amplo pico hipodiploide enquanto as células normais e saudáveis são distinguidas por um pico mais estreito e não hipodiploide (SCHMID et al., 1994).

2. OBJETIVO GERAL

Verificar a relação entre a fragmentação do DNA espermático identificada pelo teste de Nicoletti e a eficiência da produção *in vitro* de embriões bovinos.

2.1. Objetivos específicos

- i) Identificar a influência da fragmentação de DNA espermático identificada pelo teste de Nicoletti sobre a taxa de clivagem de PIVEs, ou seja, sobre a capacidade de fecundação dos espermatozoides.
- ii) Identificar a influência da fragmentação de DNA espermático identificada pelo teste de Nicoletti sobre a taxa de desenvolvimento embrionário de PIVEs.
- iii) Identificar a influência da fragmentação de DNA espermático identificada pelo teste de Nicoletti sobre a taxa de blastocisto, ou seja, sobre a eficiência de aproveitamento de ovócitos na PIVE.

3. METODOLOGIA

3.1. Obtenção das amostras de sêmen

Foram escolhidas nove amostras congeladas de sêmen de touro presentes no Laboratório de Biologia da Reprodução da Universidade de Uberlândia e já testadas em rotinas de PIVE. As amostras encontravam-se preservadas em um botijão de nitrogênio líquido a -196°C e estas possuíam vários níveis de fertilidade, variando de quase estéril, passando por subfêrteis até altamente férteis.

3.2. Seleção espermática

Antes das amostras de sêmen serem avaliadas pelo teste de Nicoletti, elas foram

submetidas ao processo de seleção espermática por gradiente de Percoll (AVERY; GREVE, 1995), a fim de purificá-las de quaisquer contaminantes como células somáticas, espermatozoides patológicos e diluente, assim como é realizado na produção *in vitro* de embriões.

As palhetas de sêmen retiradas do botijão foram descongeladas em banho maria a 37 °C por 40 segundos, depositadas em um tubo do tipo Falcon de 15 ml sobre a solução contendo 1 mL de Percoll a 45% e 1 mL de Percoll a 90%, ambas as concentrações diluídas em meio Sperm-Talp (Tyrode's albumin lactate pyruvate medium), previamente estabilizado por 2 horas em uma estufa à 38,5 °C em uma atmosfera de 5% de CO₂ e saturada de umidade. Em seguida o tubo foi centrifugado a 1400 g por 30 min, o que ocasionou a formação de um “pellet” de espermatozoides viáveis. Para a retirada do Percoll, descartou-se o sobrenadante do tubo e o “pellet” foi ressuspendido em 0,5 mL de PBS, e assim a solução foi submetida a uma segunda centrifugação a 1400 g por 20 minutos, sendo novamente descartado o sobrenadante

3.3. Teste Nicoletti

Após lavar o “pellet” pela segunda vez com o intuito de retirar quaisquer resquícios de Percoll e retirar o sobrenadante, adicionou-se 1 mL de iodeto de propídio (100 µg de PI por mL de PBS) ao tubo que foi deixado em temperatura ambiente e em ambiente escuro por 1 hora antes de ser submetido ao citômetro de fluxo.

As análises das amostras foram feitas utilizando o citômetro de fluxo CytoFlex (Beckman Coulter) e o software CytExpert (Beckman coulter). A população de espermatozoide foi identificada de acordo com o seu tamanho, gerado pela dispersão do laser para frente (FSC) e pela granulicidade, formada a partir da dispersão lateral do laser (SSC). Assim, um “gate” foi traçado delimitando a população de “Singlets”, que são as células que passam sozinhas no feixe de luz, diminuindo a possibilidade de analisar grumos de células e excluindo a população muito

pequena (debris celulares). A partir dessa segunda população, 20.000 eventos foram adquiridos e analisados no canal ECD, com excitação de 488nm e emissão de 615nm onde obteve-se a porcentagem de espermatozoides normais (sem fragmentação de DNA) e apoptóticos (com fragmentação de DNA) em cada amostra. Os resultados das análises são mostrados em histogramas.

3.4. Produção *in vitro* de embriões (PIVE)

3.4.1. Obtenção e seleção de ovócitos

Inicialmente foram coletados ovários de vacas abatidas por um abatedouro comercial da cidade de Araguari (MG). Após serem levados para o Laboratório de Biologia da Reprodução com o auxílio de uma garrafa térmica com soro fisiológico a 37°C, os mesmos foram lavados com solução fisiológica e mantidos em banho maria a 37°C.

Com o auxílio de seringas de 10 mL e agulhas 18G foram aspirados os folículos antrais e então esse aspirado foi depositado em tubos de 50 mL por cerca de 15 minutos para que ocorresse a sedimentação. Após esse período o sedimentado foi transferido para placas de poliestireno de 90 x 15 mm que foram submetidas ao microscópio estereoscópio para realizar o rastreamento e seleção dos complexos ovócitos cúmulo (COCs) de grau I: caracterizados por apresentarem granulações finas e homogêneas no ovoplasma, ausência de vacúolos, coloração escura e células do cúmulos compactadas e com várias camadas, e de grau II: apresentam ovoplasma minimamente heterogêneo, ausência de vacúolos e células do cúmulos compactadas com mais de três camadas (STOJKOVIC et al., 2001).

As rotinas de PIVE com cada uma das amostras não foram realizadas nos mesmos dias. Como forma de neutralizar parcialmente os efeitos das variáveis não controláveis na PIVE, incluindo os fatores ambientais nos diferentes dias em que foram realizadas, em todas as rotinas de PIVE existia uma gota em que foi utilizada uma amostra de sêmen referência, previamente

testado em nossos laboratórios e com excelentes resultados (amostra 1).

3.4.2. Maturação *in vitro* (MIV)

Posteriormente à seleção dos ovócitos, eles foram lavados uma vez 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 de FSH, 5 µg/mL de LH, suplementado com 10% de soro fetal bovino). Na sequência, para finalizar a maturação dos ovócitos, transferiu-se gotas de 100 µL do meio de maturação contendo de 15 a 20 ovócitos cada para placas de Petri de poliestireno de 60 x 15 mm que foram preenchidas com óleo mineral e armazenadas em estufa a 38,5°C, com umidade saturada e atmosfera de 5% de CO₂ por 22 horas.

3.4.3. Fertilização *in vitro* (FIV)

Os ovócitos maduros foram submetidos a três lavagens usando meio Fert-TALP (TALP suplementado com penicilamina (21.1 mM), hipotaurina (10.4 mM), epinefrina (1 mM), heparina (10 mg/mL) e BSA (albumina sérica bovina) (6 mg/mL)) e, em seguida, transferidos para gotas de 100 µL desse mesmo meio que se encontravam dispostas em placas de Petri de poliestireno de 60 x 15 mm e cobertas com óleo mineral.

Após o fim da segunda centrifugação da etapa de seleção espermática, obteve-se um “pellet” de espermatozoides do qual foram retiradas duas alíquotas de 5 µL que foram dispostas em uma câmara de Neubauer para que fosse feita a avaliação da motilidade progressiva e a concentração de espermatozoides viáveis, parâmetro esse que foi ajustado para 25 mil/µL de espermatozoides móveis. Então cada gota das placas de Petri foi acrescida com 8 µL desta

solução e posteriormente incubadas em estufa por 18 a 20 horas em atmosfera com 5% de CO₂, umidade saturada e temperatura de 38,5°C.

3.4.4. Cultivo *in vitro* (CIV)

Passadas 24 horas após a realização da etapa anterior (FIV), os possíveis zigotos passaram por um processo de remoção parcial das células do cumulus oophorus (desnudamento) através de repetidas pipetagens e foram posteriormente lavados três vezes em gotas de 100 µL de meio SOF (synthetic oviduct fluid), acrescido de piruvato sódico 0,2 mM, 5 mg/mL BSA, 2,5% de soro fetal bovino e 83 µg/mL de sulfato de amicacina. Após a terceira lavagem, os possíveis zigotos, agora desnudados e limpos, foram transferidos para gotas de 100 µL do mesmo meio que se encontravam dispostas em placas de Petri de poliestireno de 60 x 15 mm e cobertas com óleo mineral. Os zigotos foram cultivados em estufa por 6 dias com atmosfera de 5% de CO₂, temperatura de 38,5°C e umidade saturada.

A determinação da taxa porcentual de clivagem foi realizada através de microscópio estereoscópico 48h após a FIV por meio da contagem de zigotos que apresentassem duas ou mais células.

No sétimo dia após a FIV foi realizada a contagem dos blastocistos. A taxa porcentual de desenvolvimento embrionário foi calculada considerando o número de zigoto que sofreram clivagem e chegaram ao estágio de blastocisto.

3.4.5. 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%.

Para avaliar como a fragmentação de DNA identificada pelo método de Nicoletti influencia a produção *in vitro* de embriões bovinos, foi realizado o teste de correlação de Pearson entre a porcentagem de espermatozoides com DNA fragmentado com as taxas normalizadas de clivagem, de desenvolvimentos embrionário e de blastocisto. Foram considerados estatisticamente significativos os coeficientes de correlação que apresentaram $P < 0,05$.

4. RESULTADOS

As porcentagens de espermatozoides com DNA fragmentado e as taxas normalizadas de clivagem, de desenvolvimento embrionário e de blastocisto de cada uma das nove amostras estão demonstradas na tabela 1. A existência de taxas maiores do que 100% é devida a normalização realizada tendo como referência a amostra 1

Tabela 1: Porcentagem de espermatozoides com fragmentação de DNA e taxas normalizadas de clivagem, de desenvolvimento embrionário e de blastocistos.

Amostras	DNA fragmentado	Taxa de clivagem	Taxa de desenvolvimento embrionário	Taxa de blastocisto
1	21,4	100	100	100
2	50,9	84,8	126,8	108,5
3	64,9	47,7	180,8	78,8
4	57,4	38,1	216,5	77,6
5	36,1	78,9	165,4	107,7
6	50,7	53,3	160,8	71,1
7	72,8	45,6	140,0	77,5
8	70,3	31,6	65,0	5,6
9	48,1	89,9	77,5	67,9

Os histogramas para definição da porcentagem de espermatozoides com DNA fragmentado gerados na citometria de fluxo estão demonstrados na figura 1.

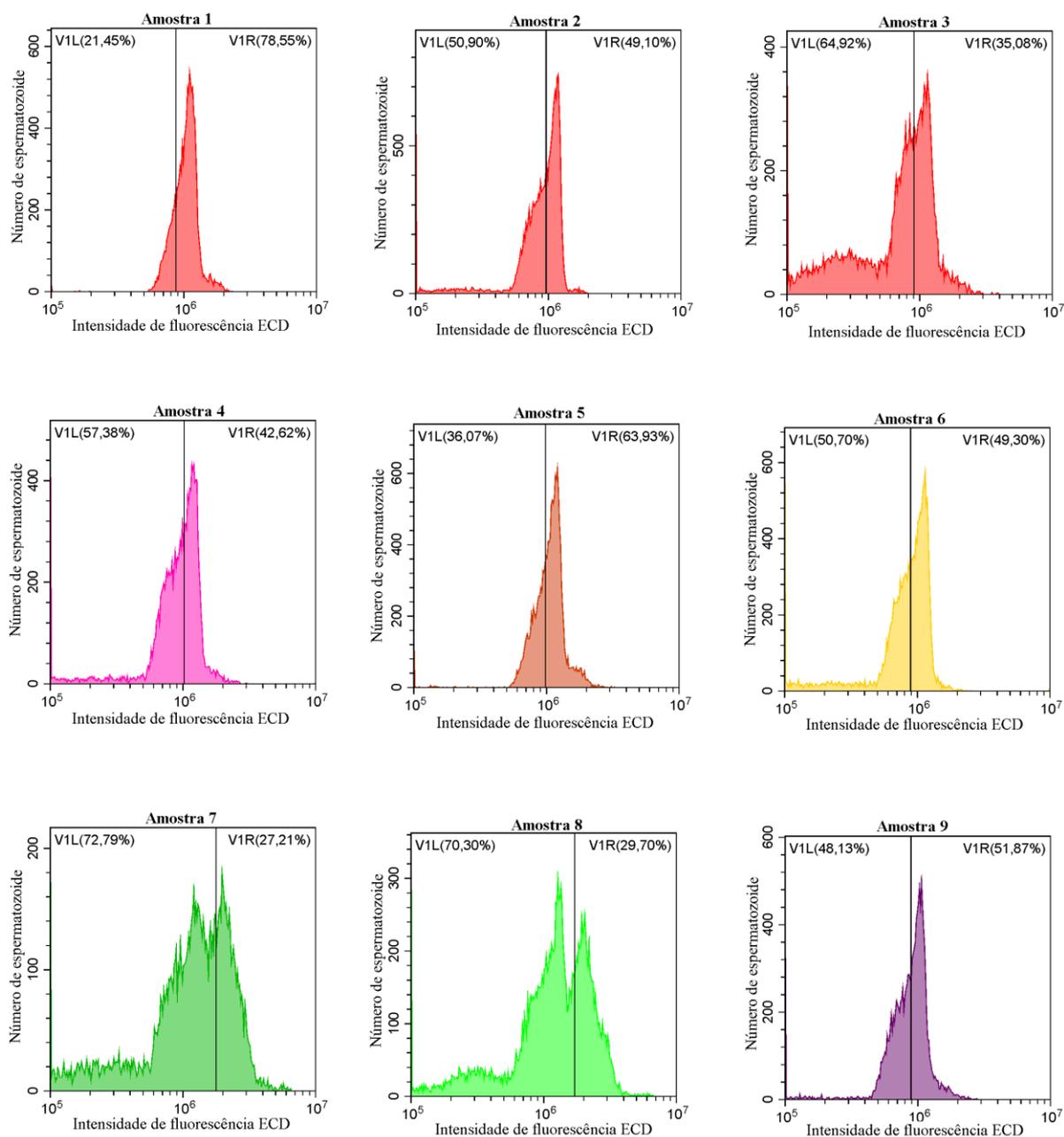


Figura 1: Histogramas que demonstram os resultados de cada amostra após avaliação pelo método de Nicoletti, onde a linha vertical separa os espermatozoides com (à esquerda da linha) e sem (à direita da linha) fragmentação de DNA. V1L é a porcentagem de espermatozoides com danos no DNA e V1R é a porcentagem de espermatozoides sem danos no DNA.

Na tabela 2 estão os coeficientes de correlação entre a porcentagem de espermatozoides com DNA fragmentado identificados pelo teste de Nicoletti com as taxas de clivagem, de desenvolvimento embrionário e de blastocistos obtidas nas rotinas de PIVE.

Tabela 2: Coeficientes de correlação de Pearson da porcentagem de espermatozoides com DNA fragmentado identificada pelo método de Nicoletti com as taxas de clivagem, de desenvolvimento embrionário e de blastocisto.

	Taxa de clivagem	Taxa de desenvolvimento embrionário	Taxa de blastocisto
Nicoletti	-0,84**	0,04	-0,63*

*0,10>P>0,05, **P<0,05

5. DISCUSSÃO

A integridade do DNA espermático é fator essencial para o desenvolvimento embrionário (FATEHI et al., 2006), já que espermatozoides que apresentam danos em seu material genético estão associados a falhas no processo de embriogênese (BELETTI, 2013) mesmo sendo capazes de fertilizar os ovócitos (HAMILTON; ASSUMPÇÃO, 2020). Assim, se mostra de extrema importância a avaliação da cromatina espermática como parte da determinação do potencial de fertilidade do sêmen de um touro antes da sua utilização em técnicas como a de PIVE e IA (GARCÍA-ÁLVAREZ, 2009). Os trabalhos sobre alterações de cromatina e fragmentação do DNA espermático, em sua maioria, relacionam esses acontecimentos com a perda parcial da capacidade fecundante dos espermatozoides e principalmente com a interferência no desenvolvimento embrionário que esses danos causam (SALEH et al., 2003; TAMBURRINO et al., 2012; SIMON et al., 2014; HAMILTON; ASSUMPÇÃO, 2020).

No presente trabalho, ao final das PIVEs foram calculadas três taxas (porcentagens): A

taxa de clivagem, que é a proporção entre o número de ovócitos que iniciaram a MIV e quantos destes ovócitos iniciaram a clivagem após a FIV (LUCIO et al., 2016; HIRAIWA et al., 2021), e está relacionada com a capacidade de fecundação do ovócito (LUCIO et al., 2016); a taxa de desenvolvimento embrionário que é a porcentagem de zigotos clivados após a fertilização e que chegaram até ao estágio de blastocistos morfológicamente normais (HIRAIWA et al., 2021); e por fim, a taxa de eficiência da PIVE ou como é mais conhecida, taxa de blastocisto, que é a proporção entre o número de ovócitos que iniciaram a MIV e que após o CIV, chegaram a blastocistos morfológicamente normais. Essa proporção é influenciada pelas duas taxas anteriormente citadas (ALMEIDA et al., 2022).

Alguns ovócitos podem iniciar a clivagem mesmo não sendo fecundados, formando um embrião haploide que geralmente se quer chegam em blastocisto. Como isto é extremamente raro, mesmo com esta possibilidade, a taxa de clivagem é frequentemente usada para mensurar a capacidade fecundante dos espermatozoides (KHARCHE; JHA, 2016). Neste trabalho a fragmentação de DNA espermática identificada pelo método de Nicoletti interferiu de forma negativa apenas na taxa de clivagem, ou seja, na capacidade fecundante. Conseqüentemente, também interferiu em menor intensidade, na taxa de blastocisto. Segundo Beletti (2013), as alterações graves na cromatina espermática podem ocasionar modificações morfológicas da cabeça, o que altera a hidrodinâmica do espermatozoide, fazendo com que seja alterada sua motilidade, assim interferindo na capacidade de fecundação. Portanto, fica claro que os espermatozoides identificados como alterados pelo teste de Nicoletti, foram apenas aqueles que apresentavam danos mais severos em seu DNA a ponto de interferir (muitas das vezes impedindo) em sua capacidade fecundante.

A taxa de desenvolvimento embrionário está relacionada com possíveis alterações espermáticas, entre elas alterações de cromatina, que podem interferir com o desenvolvimento embrionário (GAMA CAMPOS et al., 2013). Contudo, ela também é influenciada por

alterações nos ovócitos. Mas, para minimizar este efeito, nas PIVEs foram utilizados ovócitos coletados de vacas de um mesmo lote. Além disso também foi realizada a normalização dos resultados das PIVEs, como forma de neutralizar parcialmente os efeitos das variáveis não controláveis na PIVE, entre eles o efeito dos ovócitos na taxa de desenvolvimento embrionário. Segundo Beletti (2013), os espermatozoides com alterações leves na cromatina permanecem com a capacidade fecundante, porém essas alterações interferem no desenvolvimento embrionário inicial (HAMILTON; ASSUMPÇÃO, 2020). Portanto, provavelmente o método de Nicoletti, quando aplicado em touros, não é eficaz na identificação de danos menos severos, o que explica a ausência de correlação significativa da porcentagem de espermatozoides alterados com a taxa de desenvolvimento embrionário.

6. CONCLUSÃO

O método de Nicoletti identifica em sêmen de touros apenas fragmentação de DNA que interfere na capacidade fecundante do espermatozoide, ou seja, as alterações de cromatina mais severas.

7. REFERÊNCIAS

AVERY, B.; GREVE, T. Impact of PercollR on bovine spermatozoa used for in vitro insemination. *Theriogenology*, v. 44, n. 6, p. 871-878, 1995.

BARBOSA, R. T.; MACHADO, R. A importância do exame andrológico em bovinos. São Carlos, SP: Embrapa Pecuária Sudeste, 2005. 13 p. (**Embrapa Pecuária Sudeste. Circular técnica, 41**). ISSN 1516-4111X

BELETTI, M. E. Cromatina espermática: quebrando paradigmas. **Revista Brasileira de**

Reprodução Animal, v. 37, p. 92-96, 2013.

CALISKAN, Z.; KUCUKGERGIN, C.; AKTAN, G.; KADIOGLU, A.; OZDEMIRLER, G. Evaluation of sperm DNA fragmentation in male infertility. **Andrologia**, 54(11), e14587, 2022.

CBRA (Colégio Brasileiro de Reprodução Animal) **Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal**. 3 ed. Belo Horizonte: CBRA, 2013.

ALMEIDA, T. G.; MINGOTI, R. D.; CASTRO, L. D.; SIQUEIRA, A. F. P.; HAMILTON, T R. S.; FONTES, P. K.; NOGUEIRA, M. F. G.; ALVES, M. F.; BASSO, A. C.; MILAZZOTTO, M. P.; ASSUMPÇÃO, M. E. O. D. Paternal effect does not affect in vitro embryo morphokinetics but modulates molecular profile. **Theriogenology**, v. 178, p. 30-39, 2022.

DOBRINSKI, I.; BARTH, A. D. Abnormal chromatin condensation in bovine sperm nuclei. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, supl.4, p.15-23, 1993.

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.

FATEHI, A. N.; BEVERS, M. M.; SCHOEVERS, E.; ROELEN, B. A. J.; COLENBRANDER,

B.; GADELLA, B. M. DNA damage in bovine sperm does not block fertilization and early embryonic development but induces apoptosis after the first cleavages. **Journal of andrology**, v. 27, n. 2, p. 176-188, 2006.

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

GARCÍA-ÁLVAREZ, O.; MAROTO-MORALES, A.; MARTÍNEZ-PASTOR, F.; FERNÁNDEZ-SANTOS, M. R.; ESTESO, M. C.; PÉREZ-GUZMÁN, M. D.; SOLER, A. J. Heterologous in vitro fertilization is a good procedure to assess the fertility of thawed ram spermatozoa. **Theriogenology**, v. 71, n. 4, p. 643-650, 2009.

HAMILTON, T. R. D. S.; ASSUMPÇÃO, M. E. O. D. Sperm DNA fragmentation: causes and identification. **Zygote**, v. 28, n. 1, p. 1-8, 2020.

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, n. e37028, p. 1981-3163, 2021.

IRVINE, D. S.; TWIGG, J. P.; GORDON, E. L.; FULTON, N.; MILNE, P. A.; AITKEN, R. J. DNA integrity in human spermatozoa: relationships with semen quality. **Journal of Andrology**, Madison, v. 21, p. 33-44, Feb. 2000.

KHARCHE, S. D.; JHA, B. K. Parthenogenesis. **Regenerative Medicine-from Protocol to Patient: 2. Stem Cell Science and Technology**, p. 425-448, 2016.

LAGERLÖF, N. Morphologische Untersuchungen über Veränderungen im Spermabild und in den Hoden bei Bullen mit verminderter oder aufgehobener Fertilität. **Acta Path. Microb. Scand.**, Suppl.19, Uppsala, 254 p., 1934.

LI, J.; YUAN, J. Caspases in apoptosis and beyond. **Oncogene**, v. 27, n. 48, p. 6194-6206, 2008.

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.

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

NAGY, S.; JOHANNISSON, A.; WAHLSTEN, T.; IJÄS, R.; ANDERSSON, M.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Sperm chromatin structure and sperm morphology: Their association with fertility in AI-dairy Ayrshire sires. **Theriogenology**, v. 79, n. 8, p. 1153-1161, 2013.

NICOLETTI, I.; MIGLIORATI, G.; PAGLIACCI, M. C.; GRIGNANI, F.; RICCARDI, C. A

rapid and simple method for measuring thymocyte apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. **Journal of immunological methods**, v. 139, n. 2, p. 271-279, 1991.

PANG, T.; ZHANG, X. Technical Evaluation of Commercial Sperm DFI Quality Control Products in SCSA Testing. **Journal of Healthcare Engineering**, v. 2022, 2022.

QIU, Y.; YANG, H.; LI, C.; XU, C. Progress in research on sperm DNA fragmentation. **Medical science monitor: international medical journal of experimental and clinical research**, v. 26, p. e918746-1, 2020.

RICCARDI, C.; NICOLETTI, I. Analysis of apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. **Nature protocols**, v. 1, n. 3, p. 1458-1461, 2006.

SALEH, R. A.; AGARWAL, A.; NADA, E. A.; EL-TONSY, M. H.; SHARMA, R. K.; MEYER, A.; NELSON, D. R.; THOMAS JR., A. J. Negative effects of increased sperm DNA damage in relation to seminal oxidative stress in men with idiopathic and male factor infertility. **Fertility and sterility**, v. 79, p. 1597-1605, 2003.

SIMON, L.; MURPHY, K.; SHAMSI, M. B.; LIU, L.; EMERY, B.; ASTON, K. I.; HOTALING, J.; CARRELL, D. T. Paternal influence of sperm DNA integrity on early embryonic development. **Human Reproduction**, v. 29, n. 11, p. 2402-2412, 2014.

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, [s.l.], v. 64, n. 3, p. 904-909, 1 mar. 2001.

TAMBURRINO, L.; MARCHIANI, S.; MONTOYA, M.; MARINO, F. E.; NATALI, I.; CAMBI, M.; FORTI, G.; BALDI, E.; MURATORI, M. Mechanisms and clinical correlates of sperm DNA damage. **Asian journal of andrology**, v. 14, n. 1, p. 24, 2012.