

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

HEITOR PEREIRA MARQUEZ

CORRELAÇÃO DA INTEGRIDADE CROMATÍNICA E DA MORFOMETRIA DA
CABEÇA DE ESPERMATOZOIDES COM A PRODUÇÃO IN VITRO DE EMBRIÕES
E TAXA DE PRENHEZ NA RAÇA SENEPOL

UBERLÂNDIA

2026

HEITOR PEREIRA MARQUEZ

CORRELAÇÃO DA INTEGRIDADE CROMATÍNICA E DA MORFOMETRIA DA
CABEÇA DE ESPERMATOZOIDES COM A PRODUÇÃO IN VITRO DE EMBRIÕES
E TAXA DE PRENHEZ NA RAÇA SENEPOL

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

Área de concentração: Produção Animal

Linha de pesquisa: Biotécnicas e eficiência reprodutiva

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Emílio Beletti

UBERLÂNDIA

2026

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

M357 Marquez, Heitor Pereira, 1999-
2026 Correlação da integridade cromatínica e da morfometria da
cabeça de espermatozoides com a produção in vitro de embriões e
taxa de prenhez na raça Senepol [recurso eletrônico] / Heitor
Pereira Marquez. - 2026.

Orientador: Marcelo Emílio Beletti.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia,
Pós-graduação em Ciências Veterinárias.

Modo de acesso: Internet.

DOI <http://doi.org/10.14393/ufu.di.2026.186>

Inclui bibliografia.

Inclui ilustrações.

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

CDU: 619

Bibliotecários responsáveis pela estrutura de acordo com o AACR2:

Gizele Cristine Nunes do Couto - CRB6/2091

Nelson Marcos Ferreira - CRB6/3074



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

Secretaria da Coordenação do Programa de Pós-Graduação em
Ciências Veterinárias

Rodovia BR 050, Km 78, Bloco 1CCG, Sala 209 A e B - Bairro Glória, Uberlândia-MG, CEP
38400-902

Telefone: (34) 2512-6811 - www.ppgcv.fmvz.ufu.br - mesvet@ufu.br



ATA DE DEFESA - PÓS-GRADUAÇÃO

Programa de Pós-Graduação em:	Ciências Veterinárias				
Defesa de:	Dissertação de Mestrado Acadêmico PPGCVET Nº 12/2026				
Data:	23 de fevereiro de 2026	Hora de início:	09h:00	Hora de encerramento:	10:25
Matrícula do Discente:	12412MEV010				
Nome do Discente:	Heitor Pereira Marquez				
Título do Trabalho:	Correlação da integridade cromatínica e da morfometria da cabeça de espermatozoides com a produção <i>in vitro</i> de embriões e taxa de prenhez na raça Senepol				
Área de concentração:	Produção Animal				
Linha de pesquisa:	Biotécnicas e eficiência reprodutiva				
Projeto de Pesquisa de vinculação:	Técnicas laboratoriais e moleculares na reprodução animal				

Reuniu-se no formato híbrido, presencial na sala 2B213, Campus Umuarama e por videoconferência da Universidade Federal de Uberlândia, a Banca Examinadora, designada pelo Colegiado do Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinária, assim composta: Professores Doutores: Ricarda Maria dos Santos - (FMVZ/UFU); Kelvin Orlando Espinoza Blandon - (Universidad Nacional de Agricultura, Honduras) e Marcelo Emílio Beletti - (ICBIM/UFU), orientador do candidato.

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

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

Aprovado.

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

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

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



Documento assinado eletronicamente por **Marcelo Emílio Beletti, Professor(a) do Magistério Superior**, em 23/02/2026, às 10:28, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Ricarda Maria dos Santos, Professor(a) do Magistério Superior**, em 23/02/2026, às 10:28, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Kelvin Blandon Espinoza, Usuário Externo**, em 23/02/2026, às 16:00, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://www.sei.ufu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **7051136** e o código CRC **66D07EED**.

HEITOR PEREIRA MARQUEZ

CORRELAÇÃO DA INTEGRIDADE CROMATÍNICA E DA MORFOMETRIA DA
CABEÇA DE ESPERMATOZOIDES COM A PRODUÇÃO IN VITRO DE EMBRIÕES
E TAXA DE PRENHEZ NA RAÇA SENEPOL

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

Área de concentração: Produção Animal

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Emílio Beletti

Uberlândia, 23 de fevereiro de 2026.

Banca examinadora:

Prof. Dr. Marcelo Emílio Beletti
(Orientador – UFU-MG)

Prof. Dra. Ricarda Maria dos Santos
(Examinador – UFU-MG)

Ms. Kelvin Orlando Espinoza Blandon
(Examinador – EXTERNO)

Dedico este trabalho aos meus
pais, pelo apoio incondicional, e a todos
que torcem por mim.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus pelas oportunidades e privilégios concedidos e também pelas minhas limitações. Sob suas bênçãos e proteção, trilhei caminhos que não pensei que conseguisse percorrer.

Agradeço ao meu orientador Prof. Dr. Marcelo Emílio Beletti pela paciência e tempo dedicado a esse trabalho. Tenho grande admiração pelo grande pesquisador e educador que é e me sinto honrado em passar pela graduação e pós-graduação sob sua orientação.

Agradeço ao Prof. Dr. Bruno Travençolo e seus orientados pelo apoio nas análises computacionais de imagens.

Agradeço a cada um dos membros do grupo do Laboratório de Biologia da Reprodução da UFU que direta ou indiretamente colaboraram para execução desse trabalho.

Agradeço o auxílio e paciência dos técnicos da histologia: Fabrício, Wilian e Gabriel.

Agradeço a todos da Vale do Embrião, especialmente ao Manoel, pelo apoio e fornecimento de amostras e dados da empresa, que foram essenciais para o trabalho.

Agradeço à SEDIM Agropecuária e à Genetropic também por fornecerem amostras que foram usadas na pesquisa.

Agradeço aos membros da banca Dr. Kelvin Orlando Espinoza Blandon e Prof. Dra. Ricarda Maria dos Santos pelo tempo disponibilizado.

Agradeço o apoio financeiro fornecido pelas agências de fomento FAPEMIG (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais), processo número APQ-01881-22 e CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - Brasil), processo número 306482/2022-3 e à CAPES.

Por último e mais importante, minha eterna gratidão aos meus pais pela vida. Acreditaram em mim quando nem mesmo eu acreditava. Sempre foram meu esteio e os honrarei eternamente. Sem esse apoio não chegaria até aqui.

RESUMO

Este trabalho avaliou a integridade cromatínica e a morfometria da cabeça de espermatozoides de touros Senepol a fim de elucidar as correlações entre esses parâmetros e os resultados da produção *in vitro* de embriões (PIVE) — especificamente, taxas de clivagem, desenvolvimento embrionário e blastocistos — bem como as taxas de prenhez em receptoras após a inovulação dos embriões. Amostras de sêmen criopreservadas, previamente utilizadas em um laboratório comercial de PIVE de Uberlândia-MG, foram processadas em esfregaços e coradas com azul de toluidina (AT) e por reação de Feulgen para análise computacional de imagem. O Ensaio de Estrutura da Cromatina espermática (SCSA) foi realizado para determinar a porcentagem de células espermáticas com fragmentação do DNA. A análise computacional das imagens dos esfregaços corados quantificou ~~várias~~ características da cabeça do espermatozoide, incluindo a descompactação média e a heterogeneidade da cromatina, a porcentagem de espermatozoides com descompactação da cromatina em regiões específicas da cabeça e diversos parâmetros morfométricos. Os resultados revelaram uma correlação negativa moderada entre a fragmentação do DNA (SCSA) e a taxa de clivagem. Da mesma forma, a descompactação total da cromatina identificada pela reação de Feulgen se correlacionou negativamente com a taxa de blastocisto. A análise morfométrica demonstrou que a elipticidade estava significativa e positivamente correlacionada com a taxa de prenhez, enquanto a relação largura/comprimento e o fator de forma exibiram correlações negativas com essa mesma taxa. Esses resultados demonstram que, mesmo em amostras de sêmen consideradas férteis pelos padrões andrológicos convencionais, alterações da cromatina podem comprometer a eficiência da PIVE e a taxa de prenhez subsequente. Embora tanto o SCSA quanto a análise computacional de esfregaços corados com Feulgen mostrem eficácia moderada na detecção de tais alterações, a redução da elipticidade da cabeça do espermatozoide resultante da descompactação da cromatina — mesmo quando não detectada por testes de cromatina — é um preditor robusto da eficiência da PIVE e da prenhez pós-inovulação.

Palavras-chave: morfologia espermática, elipticidade, análise de imagem computacional, taxa de prenhez, fragmentação de DNA.

ABSTRACT

This study assessed chromatin integrity and sperm head morphometry in Senepol bull semen to elucidate the relationships between these parameters and in vitro embryo production (IVEP) outcomes—specifically cleavage, embryonic development, and blastocyst rates—as well as pregnancy rates in recipient cows following embryo transfer. Cryopreserved semen samples, previously utilized in a commercial IVEP laboratory, were processed into smears and stained using Toluidine Blue or the Feulgen reaction for digital imaging. Additionally, the Sperm Chromatin Structure Assay (SCSA) was performed to determine the percentage of cells with DNA fragmentation. Computational image analysis of the stained smears quantified various sperm head characteristics, including average decompaction and heterogeneity of sperm chromatin, percentage of spermatozoa with chromatin decompaction in specific regions of the sperm head, and diverse morphometric parameters. The findings revealed a moderate negative correlation between DNA fragmentation (SCSA) and cleavage rates. Similarly, total chromatin decompaction identified via the Feulgen reaction correlated negatively with blastocyst rates. Morphometric analysis demonstrated that ellipticity was significantly and positively correlated with pregnancy rates, whereas the width-to-length ratio and form factor exhibited negative correlations with the same outcome. These data demonstrate that even in semen samples deemed fertile by conventional andrological standards, chromatin alterations can compromise IVEP efficiency and subsequent pregnancy rates. While both SCSA and computational analysis of Feulgen-stained smears show moderate efficacy in detecting such alterations, reduced sperm head ellipticity resulting from chromatin decompaction—even when undetected by direct chromatin assays—serves as a robust predictor of IVEP performance and post-transfer pregnancy success.

Keywords: sperm morphology, ellipticity, computer-assisted image analysis, pregnancy rate, DNA fragmentation.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Estrutura dos nucleossomos.....	14
Figura 2: Estrutura toroidal da protamina.....	16
Figura 3: Gráfico gerado a partir da execução da técnica SCSA para avaliação de amostra de sêmen.....	20
Figura 4: Fotomicrografia de cabeças de espermatozoides de esfregaço de sêmen bovino corado por AT.....	24
Figura 5: Fotomicrografia de cabeças de espermatozoides de esfregaço de sêmen bovino corado por reação de Feulgen.....	25
Figura 6: Gráfico de dispersão representando a porcentagem de espermatozoides com DNA fragmentado de um dos touros avaliados.....	26
Figura 7: Cabeças com descompactação em diferentes regiões coradas por AT.....	28
Figura 8: Cabeças com descompactação em diferentes regiões coradas por reação de Feulgen.....	29

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Média e desvio padrão das variáveis cromatínicas identificadas pela coloração com AT, por reação de Feulgen e SCSA32

Tabela 2: Média e desvio padrão das variáveis morfométricas identificadas pela coloração com AT e por reação de Feulgen.....33

Tabela 3: Média e desvio padrão das taxas de clivagem, taxa de desenvolvimento embrionário, taxa de blastocisto e prenhez34

Tabela 4: Correlação entre as diferentes regiões de descompactação da cromatina, heterogeneidade e descompactação média dos espermatozoides dos touros analisados corados por AT e a porcentagem total de alterações com as taxas de clivagem, de desenvolvimento embrionário, de blastocisto e de prenhez34

Tabela 5: Correlação entre as diferentes regiões de descompactação da cromatina, heterogeneidade e descompactação média dos espermatozoides dos touros analisados corados por reação de Feulgen e a porcentagem total de alterações com as taxas de clivagem, de desenvolvimento embrionário, de blastocisto e prenhez....35

Tabela 6: Correlação entre a porcentagem de espermatozoides com DNA fragmentado identificados por SCSA e as taxas de de clivagem, taxas de desenvolvimento embrionário, taxas de blastocisto e prenhez.....36

Tabela 7: Correlação entre as médias das medidas morfológicas dos espermatozoides dos touros analisados corados por AT com as taxas de clivagem, de desenvolvimento embrionário, de blastocisto e de prenhez36

Tabela 8: Correlação entre as médias das medidas morfológicas dos espermatozoides dos touros analisados corados por reação de Feulgen com as taxas de clivagem, de desenvolvimento embrionário, de blastocisto e de prenhez.....38

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
2 REVISÃO DE LITERATURA	14
2.1 Cromatina espermática	14
2.2 Azul de Toluidina (AT)	17
2.3 Reação de Feulgen	18
2.4 SCSA	19
2.5 Morfometria da cabeça dos espermatozoides	21
3 MATERIAIS E MÉTODOS	23
3.1 Doses de sêmen e relatório técnico	23
3.2 Preparo das lâminas para colorações	23
3.3 Coloração com Azul de Toluidina (AT)	23
3.4 Reação de Feulgen	24
3.5 SCSA	25
3.6 Análise computacional das imagens	27
3.7 Obtenção das taxas de clivagem, de desenvolvimento embrionário, de blastocisto e de prenhez	29
3.8 Avaliação estatística	30
4 RESULTADOS	31
5 DISCUSSÃO	39
6 CONCLUSÃO	42
REFERÊNCIAS	43

1-INTRODUÇÃO:

A produção animal demanda por eficiência em todas as suas fases, o que significa produzir mais em áreas cada vez mais reduzidas. Especialmente na bovinocultura, a produção eficiente depende, dentre diversos outros fatores, da eficiência reprodutiva dos animais e, a fim incrementar tal eficiência, empresas, técnicos e produtores incluídos nessa cadeia investem em diversas biotécnicas da reprodução, resultando em maior produção de carne e leite (Mello et al., 2016). É o caso da inseminação artificial a tempo fixo (IATF), que cresceu absurdamente na última década em nosso país, totalizando 23.267.777 protocolos hormonais comercializados no ano de 2024 (Baruselli., 2025); e a produção *in vitro* de embriões (PIVE), biotécnica amplamente aplicada no mundo, principalmente EUA e Brasil, que permite uma grande aceleração no ganho genético dos rebanhos.

Sabe-se, porém, que características reprodutivas em geral são consideradas de baixa herdabilidade, ou seja, altamente influenciadas pelo ambiente, o que significa dizer que não se trata de uma condição estática e, por isso, devem ser monitoradas frequentemente. As fêmeas bovinas podem ser avaliadas periodicamente, por meio da palpação e ultrassonografia, para avaliação uterina e ovariana, enquanto os touros são avaliados pelo exame andrológico.

No entanto, no caso dos machos, tal avaliação nos permite uma rasa interpretação da real condição reprodutiva do animal, e danos sutis nos espermatozoides podem passar despercebidos, mas, como indica a literatura, comprometem resultados a campo, o que justifica as recentes pesquisas para identificação de biomarcadores de fertilidade (Abah et al., 2025). Vigor, turbilhonamento, motilidade, concentração e número de patologias são de fato características importantes, mas parecem não ser suficientes para prever a fertilidade de um reprodutor (Kumaresan et al., 2020).

A taxa de concepção é calculada pelo número de vacas prenhes dividido pelo total de inseminadas, e é influenciada por diversos fatores como: sanidade reprodutiva das matrizes, inseminador, detecção de cio e a qualidade seminal. Estudos têm identificado touros cujo sêmen pós descongelamento atendem aos requisitos mínimos exigidos pelos programas de inseminação, mas que ainda assim apresentam baixas taxas de fertilidade, o que leva ao menor número de nascimentos e consequentemente impacta na viabilidade econômica da atividade (Pardede et al., 2025).

O material genético em si, cujo seu transporte até o local da fecundação é função básica dos espermatozoides, também é fator essencial para um bom desempenho reprodutivo e danos à sua estrutura são negativamente correlacionados com fecundação, implantação, desenvolvimento embrionário, placentação e até mesmo o desenvolvimento após o nascimento (Evenson, 2016; Kumaresan et al., 2020). A cromatina espermática, composição básica do material genético, é uma estrutura altamente compactada para proteção do DNA contra eventuais danos e sua integridade pode ser avaliada por diferentes técnicas como: coloração com azul de toluidina (AT), reação de Feulgen, coloração com laranja de acridina (LA), *Sperm Chromatin structure assay* (SCSA), teste TUNEL, kits *Sperm-Bos-Halomax*, dentre várias outras (Satrio et al., 2025)

Assim como todas as biotécnicas empregadas na reprodução bovina, na PIVE a fertilidade do touro utilizado, bem como a condição de seus espermatozoides são de extrema relevância, especialmente na etapa de FIV (fertilização *in vitro*), cujo seu sucesso ou fracasso diz muito sobre a capacidade fecundante das células espermáticas e, além disso, sobre a capacidade dos embriões recém formados de se tornarem blastocistos, o que também está associado com a integridade do DNA (Dabiri et al., 2026). Isso posto, parece interessante fazer uso da PIVE como parâmetro para avaliar o quão impactante é a condição da cromatina sobre seus resultados.

A morfologia espermática é outra característica importante na predição de fertilidade, aplicada, inclusive, nos exames andrológicos bovinos convencionais, porém apresenta certo grau de subjetividade, que pode ser minimizada por sistemas de avaliação computadorizada (CASA), mas tem seu uso limitado em função do alto custo (D. Banaszewska et al., 2015). Parâmetros morfométricos também têm sido empregados em análises de correlação com fertilidade, em que, por meio de análises computadorizadas de imagens obtidas a partir de colorações de esfregaços de sêmen bovino, mais do que medidas básicas de tamanho, a forma dos espermatozoides também tem sido descrita (Ostermeier et al., 2001a, b; Beletti e Costa, 2003).

A integridade cromatínica espermática depende fortemente de dois fatores: o teor de descompactação e o nível de fragmentação do DNA. Avaliou-se no presente trabalho, além da integridade cromatínica, os parâmetros morfométricos das cabeças espermáticas de touros Senepol usados em rotinas de PIVE, com o intuito de correlacionar as análises com o desempenho desses animais na PIVE, não somente quanto às taxas de clivagem e blastocisto, como também quanto às taxas de prenhez

das receptoras após inovulação dos embriões produzidos. Para isso foram executadas as técnicas de coloração por azul de toluidina (AT) e por Reação de Feulgen, para posterior análise de descompactação e heterogeneidade cromatínica, bem como para determinar as regiões da cabeça com maior incidência de descompactação e os parâmetros morfométricos de cada cabeça. Além disso, foi realizado o ensaio de estrutura da cromatina espermática (SCSA), para identificar a porcentagem de células com fragmentação de DNA.

2-REVISÃO DE LITERATURA:

2.1- Cromatina espermática:

Em seres eucarióticos, existem duas classes de proteínas que se ligam ao DNA nuclear em células somáticas, são elas as histonas e as proteínas cromossômicas não histonas, formando um complexo que é conhecido como cromatina. O nucleossomo, unidade básica da estrutura dos cromossomos eucarióticos, é composto por oito histonas, sendo duas moléculas de cada uma das seguintes: H2A, H2B, H3 e H4 – e a fita dupla de DNA, com 147 nucleotídeos de comprimento. Esse octâmero de histonas estrutura um cerne proteico no qual a fita dupla de DNA se enrola, como retrata a imagem a seguir (Alberts et al., 2017).

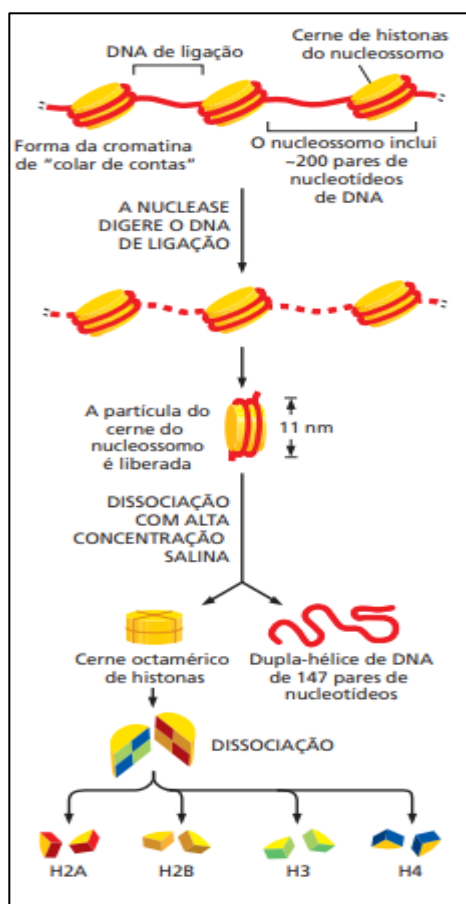


Figura 1: Estrutura dos nucleossomos (Alberts et al., 2017).

Já nas células gaméticas, como os espermatozoides, o material genético apresenta uma organização específica. Estruturalmente, a célula espermática apresenta duas regiões básicas: a cabeça e a cauda. A cabeça é preenchida pelo acrossoma e em sua maior parte pelo núcleo, composto, por sua vez, pela cromatina altamente condensada, além do citoplasma e estruturas do citoesqueleto (Beletti,

2013). A cromatina espermática, assim como na célula somática, também consiste em um complexo de DNA e núcleoproteínas, o que a diferencia nesse caso é a classe dessas proteínas, sendo majoritariamente protaminas, responsáveis por esse alto grau de compactação. A protamina (PRM) é uma pequena proteína, cerca da metade do tamanho da histona, de caráter extremamente básico, contendo 47 aminoácidos, com 24 resíduos de arginina e 6 de cisteína (Chapman et al., 2003). Existem duas formas de protaminas: a PRM1, expressa em sua forma madura em todos os mamíferos e a PRM2, expressa em apenas algumas espécies (Robertson et al., 2024). Recentes estudos têm identificado maior proporção de PRM1 em touros de alta fertilidade e já a consideram como possível biomarcador de fertilidade (Pardede et al., 2022)

No entanto, quando se fala em cromatina dos espermatozoides é necessário abordar o processo de formação dessas células: a espermatogênese, que ocorre nos túbulos seminíferos e se divide em 3 fases: fase proliferativa ou spermatogonial, fase meiótica ou spermatocitária e fase de diferenciação ou spermiogênica (França e Avellar, 2025). Todo esse processo se dá por meio de divisões mitóticas e meióticas e intenso remodelamento celular, em que spermatogônias diploides dão origem a células haploides altamente diferenciadas e especializadas que são os espermatozoides. Além disso, a espermatogênese ocorre da base para o lúmen dos túbulos, com todo o suporte nutricional das células de Sertoli, que também são responsáveis pela barreira entre as células germinativas e o sistema imune (Salokhiddinovna, 2024).

É na fase final da espermatogênese, especificamente na spermiogênese que ocorrem, além das alterações estruturais com o alongamento das spermatídes e formação da vesícula acrossomal, as principais mudanças da cromatina, a fim de moldar o núcleo em uma estrutura achatada. A compactação se dá principalmente pela substituição das histonas somáticas por proteínas nucleares transicionais e pelas protaminas, quando os nucleossomos dão lugar a estruturas toroidais de DNA firmemente empacotadas e ligadas à matriz nuclear, como mostra a Figura 2, processo conhecido como protaminação (Robertson et al., 2024). As protaminas apresentam domínios de ancoragem que auxiliam na sua ligação à estrutura do DNA, e as regiões ricas em cisteína beneficiam as pontes dissulfeto entre essas moléculas, que levam a formação dos toroides (Ugoku et al., 2020). Importante ressaltar que ainda assim, comportando-se aqui como sinalizador epigenético, um pequeno número

de histonas ficam retidas no DNA (Beletti, 2013), que, nessa configuração, está devidamente protegido e compactado, facilitando a hidrodinâmica celular necessária durante o trajeto pelo oviduto rumo à fecundação (Balhorn, 2007).

Nos túbulos seminíferos testiculares os espermatozoides são formados, porém ainda não possuem motilidade, que só é adquirida a partir do trânsito pelo epidídimo (Dacheux et al., 2014), quando inclusive a cromatina se torna ainda mais compacta por mais formações de ligações dissulfeto (Robertson et al., 2024). Ao chegar no trato reprodutivo feminino, após a ejaculação, o espermatozoide não está totalmente pronto para fecundação e precisa passar por uma série de reações bioquímicas pelo contato entre sua membrana e a parede do oviduto que o levam à capacitação, passando pela hiperpolarização de membrana que propicia a hiperativação e reação acrossomal, eventos que condicionam o processo de fecundação (Gervasi e Visconti, 2016). A integridade acrossomal é, portanto, muito importante para o sucesso reprodutivo e especificamente o formato do acrossoma pode ser afetado por eventuais anomalias na compactação da cromatina, por esse motivo os defeitos morfológicos de cabeça, muito comuns em diversas espécies, são associados à infertilidade.

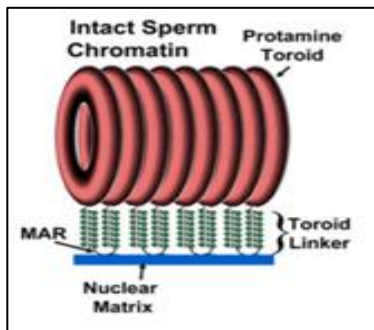


Figura 2: Estrutura toroidal da protamina (Evenson, 2016).

Diante deste contexto, é interessante a análise de que para que a fecundação e o desenvolvimento embrionário ocorram de forma bem-sucedida todos os mecanismos envolvidos devem funcionar de forma inequívoca, principalmente no que se refere à estrutura do material genético paterno. À cada etapa da espermatogênese e mesmo após sua conclusão, o DNA espermático está susceptível a diversas possibilidades de danos. Apoptoses abortivas durante o desenvolvimento espermático aumentam células com danos no DNA, a retenção de histonas dificulta a compactação cromatínica, a protaminação incorreta leva ao aumento da fragmentação do DNA, o

excesso de espécies reativas de oxigênio causam peroxidação lipídica da membrana espermática que também prejudica o DNA, além de biotécnicas, como a criopreservação, que também causam efeitos deletérios à cromatina (Robertson et al., 2024).

Por isso, com o avanço da ciência e descoberta da influência da integridade do DNA sobre a fertilidade, diversas pesquisas focaram em investigar essas anormalidades no núcleo espermático de várias espécies por diferentes técnicas, e algumas delas serão apresentadas a seguir (Fernandes et al., 2025).

2.2- Azul de Toluidina (AT):

Azul de toluidina (AT) é um corante metacromático acidófilo, ou seja, seletivo para componentes ácidos, tais como sulfatos, carboxilatos e radicais fosfatos, assim sendo, tem afinidade por ácidos nucleicos e se liga a material nuclear ricos em DNA e RNA (Sridharan e Shankar, 2012). Muito empregado em análises citológicas, também é usado para avaliação da cromatina espermática de touros a fim de identificar possíveis anormalidades em sua condensação, método desenvolvido por Mello (1982).

O AT apresenta uma propriedade metacromática que consiste na mudança de sua coloração induzida por ressonância eletrônica entre suas moléculas que se ligam aos fosfatos ionizados do DNA, quando em pH 4. Na cromatina com integridade perfeita, os fosfatos, sítios de ligação das moléculas do corante, estão bloqueados pelas protaminas, o que limita a ligação corante-DNA e mantém a coloração variando de verde a azul claro. No entanto, espermatozoides com cromatina com condensação inferior, apresentam menos protaminas ligadas e conseqüentemente há maior interação entre o corante e DNA, alterando a coloração para azul escuro a magenta (Beletti et al., 2005). Esse método torna-se ainda mais eficaz a partir da prévia hidrólise ácida, uma vez que permite que espermatozoides com cromatina íntegra sejam pouco afetados pela solução ácida, enquanto aqueles com cromatina levemente alterada, que sem a hidrólise prévia seriam tidos como íntegros, corem-se mais intensamente em azul (Beletti, 2013).

Basicamente, a coloração é feita após a confecção dos esfregaços e hidrólise ácida, havendo mínimas variações entre protocolos em algumas etapas, principalmente no tempo de cada uma delas. Alguns autores recomendam 30 minutos de fixação e 10 de incubação, outros 60 minutos de fixação e 5 de incubação. Fato é

que a coloração com o AT é um procedimento simples, adequado para pequenas amostras e compatível com microscópio óptico (Satrio, et al., 2025).

Diversas pesquisas utilizam dessa técnica para avaliar a condição reprodutiva de machos, principalmente bovinos. Pardede et al., (2020) fizeram uso da coloração com AT e avaliaram doses de sêmen congelado de touros de diferentes idades, que atendiam aos padrões mínimos exigidos pelos programas de inseminação, mas perceberam que os mais velhos apresentavam fragmentação de DNA significativamente maior, o que possivelmente impactou no índice de fertilidade, obtido pela porcentagem de vacas prenhes à primeira concepção. Por meio desse mesmo tipo de coloração, Souza et al. (2018) verificaram diferentes tipos de alteração na cromatina espermática (basal, metade basal, eixo central, dispersa, total) em touros férteis e subférteis e perceberam maior descompactação e heterogeneidade em touros subférteis. Lucio et al. (2016) notaram que o estresse térmico induz alterações morfométricas e cromatínicas, também identificadas mediante coloração com AT, que impactaram na fertilização *in vitro* (FIV) e na taxa de blastocistos. Riveros et al. (2023), fizeram uso da mesma técnica e verificaram possível influência dessas mesmas características de touros Angus sobre a concepção de vacas nelore após IATF.

2.3 Reação de Feulgen:

Outra técnica que pode ser empregada na análise espermática é a coloração por reação de Feulgen. Proposta por Robert Feulgen há mais de 100 anos (1924), é bastante utilizada em citogenética e biologia celular. Trata-se de um método citoquímico que possibilitou a descoberta do DNA como parte integrante da estrutura da cromatina. Imagens positivas para Feulgen apresentam coloração vermelho-púrpura, quando observadas em microscopia de luz e, assim como a coloração por AT, é necessário um tratamento prévio que induz a hidrólise ácida seguida da incubação com reagente de Schiff, um leucoderivado da fucsina básica (Mello e Vidal, 2017).

O ácido clorídrico remove rapidamente as bases purínicas (adenina e guanina), sem alterar, no entanto, os açúcares e fosfatos do DNA. A hidrólise, então, gera grupos aldeídos que ficam expostos à ligação com o reagente de Schiff, gerando a coloração vermelho-púrpura (Fernandes et al., 2025). Espermatozoides com cromatina menos compactada e, portanto, com menos ligações entre DNA e

nucleoproteínas, tornam-se mais sensíveis à hidrólise e se coram mais intensamente, enquanto aqueles com DNA íntegro apresentam menos aldeídos expostos, o que resulta em uma coloração mais fraca (Beletti, 2013).

Gledhill (1966) foi o pioneiro na aplicação dessa técnica para bovinos, e por meio dela identificou diferenças no conteúdo de DNA entre espermatozoides com cabeças morfologicamente normais e anormais. Beletti e Mello (2004), também com o objetivo de investigar a relação entre a condição da cromatina e a morfologia espermática em coelhos, utilizaram da coloração por AT e reação de Feulgen e verificaram correlação positiva entre defeitos primários e secundários e alterações cromatínicas, no entanto, diferentemente do AT, espermatozoides corados por Feulgen apresentaram coloração mais homogênea, variando apenas em intensidade. Fernandes et al. (2025) avaliaram por exame andrológico touros *Bos indicus* e mestiços (*Bos indicus* x *Bos taurus*) e os classificaram como potenciais reprodutores satisfatórios ou insatisfatórios e verificaram que, mediante análise dos núcleos espermáticos corados por reação de Feulgen, os zebuínos apresentaram com maior frequência a presença de vacúolos nucleares. Outro estudo dividiu 10 touros de centrais de inseminação em grupos de baixa, média e alta fertilidade, mensurada pela concepção ao longo de um ano e verificaram mediante análise nuclear por coloração de Feulgen que os animais de baixa fertilidade apresentaram 35% dos núcleos descondensados (Vieytes et al., 2008).

2.4 SCSA:

Em 1980 Evenson apresentou uma técnica cujo objetivo era comparar a cromatina espermática de touros e homens férteis e subférteis por meio da citometria de fluxo, associada à coloração com laranja de acridina (LA) e os resultados demonstravam diferença significativa de integridade do DNA espermático entre os indivíduos. O SCSA® (Sperm Chromatin Structure Assay) desde então, passou a ser bastante utilizado não somente de forma experimental como também em clínicas de reprodução humana, e é considerada a técnica padrão ouro para esse tipo de análise. Basicamente, o protocolo do SCSA® consiste na diluição das amostras de sêmen (fresco ou congelado) em solução de detergente ácido por 30s, o que em tese expõe as regiões do DNA com quebra de fita (fita simples-ss), seguida da coloração com

laranja de acridina. As moléculas de LA se intercalam no DNA de dupla fita, íntegro, fluorescendo em verde após excitação por laser (488 nm), enquanto nas regiões de fita simples elas se acumulam e deslocam a fluorescência para o vermelho, sob a mesma excitação. Após a incubação com o corante a amostra pode ser avaliada pelo citômetro de fluxo e alguns dados de milhares de espermatozoides podem ser obtidos simultaneamente, como o índice de fragmentação do DNA (%DFI) e o nível de histonas retidas e não substituídas por protaminas, que reflete numa maior intensidade de coloração (%HDS). A partir desses dados, gráficos de dispersão são criados, em que cada ponto representa um evento, dos quais a maioria são espermatozoides, sendo que o eixo Y indica a intensidade de fluorescência verde e o eixo X a intensidade de fluorescência vermelha. Dentro desses chamados “plots”, subpopulações de eventos podem ser computacionalmente selecionadas a fim de excluir eventos que provavelmente não são espermatozoides, como debris celulares e células somáticas. Na Figura 3, podemos observar um gráfico em que a linha representa o limite superior de coloração normal de DNA, acima dela seriam espermatozoides com alto HDS e, mais acima, eventos que não são espermatozoides (Evenson, 2022).

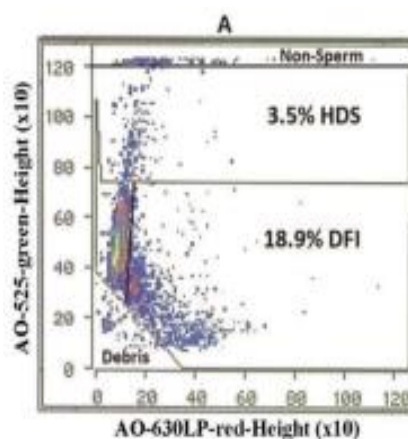


Figura 3: Gráfico gerado a partir da execução da técnica SCSA para avaliação de amostra de sêmen (Evenson, 2022).

Em estudo que visava comparar a integridade do DNA além de outros parâmetros para avaliar a qualidade espermática entre touros Nelore de diferentes idades, pesquisadores utilizaram o SCSA® e notaram %DFI maior em touros mais velhos e touros jovens quando comparados com touros adultos, o que atribuíram à

maior susceptibilidade a danos oxidativos e protaminação deficiente respectivamente nos dois extremos (Carreira et al., 2017). Em contrapartida, Gogol e Trzcińska (2022) usando a mesma técnica, não perceberam influência da fragmentação do DNA sobre a taxa de concepção de vacas e novilhas após a inseminação, em que foram utilizados touros Holandeses de baixa, média e alta fertilidade.

2.5 Morfometria da cabeça dos espermatozoides:

A compactação da cromatina e a forma da cabeça espermática são características que estão intimamente relacionadas e toda e qualquer alteração em sua estrutura tem o potencial de influenciar na morfologia do espermatozoide (Riveros et al., 2023). A morfometria computacional de cabeças espermáticas também pode ser empregada na avaliação de reprodutores bovinos, uma vez que permite caracterizar os espermatozoides de forma menos subjetiva, mais precisa e com maior repetibilidade do que a avaliação morfológica convencional aplicada nos exames andrológicos de rotina, que se baseiam na análise visual humana (Beletti, 2005).

Medidas primárias como área, perímetro, largura, comprimento e medidas mais complexas como as amplitudes harmônicas de Fourier, permitem descrever precisamente a forma geométrica das cabeças computacionalmente e identificar populações de espermatozoides distintos mesmo em amostras tidas como normais (Ostermeier et al., 2001a). Além dessas, medidas derivadas das descritas podem ser obtidas, como: a razão largura/comprimento; a elipticidade, que mede a elongação do contorno da cabeça; e o fator de forma, que indica o desvio do contorno da cabeça em relação à uma elipse suave (Beletti e Costa, 2005).

Os descritores de Fourier (F0, F1 e F2) são, basicamente, medidas que decompõem o perímetro em camadas, permitindo uma melhor descrição da forma espermática. Fourier 0 indica a magnitude da transformada de Fourier obtida a partir do contorno da cabeça espermática e está diretamente relacionada ao tamanho geral do espermatozoide e valores menores dessa medida indicam cabeças menores. Fourier 1 está associado ao arredondamento da porção anterior do espermatozoide, e células com formato piriforme apresentam valores de F1 maiores. Já Fourier 2 é uma medida mais relacionada com o alongamento e elipticidade das cabeças espermáticas (Lucio et al., 2016).

Outras medidas podem ser empregadas na análise de forma como a simetria

lateral e simetria ântero-posterior. A simetria lateral visa identificar assimetrias ao longo do eixo principal do espermatozoide que potencialmente afetam a hidrodinâmica essencial para célula. Já a simetria ântero-posterior permite a identificação de assimetrias no eixo secundário do espermatozoide e também auxilia na identificação de cabeças com formato piriforme. Tais medidas são calculadas a partir da inversão das cabeças ao longo do eixo principal ou secundário seguida do preenchimento de vazios e identificação das regiões de interseções entre a área original e a invertida (Beletti e Costa, 2003).

3 – Materiais e métodos:

3.1-Doses de sêmen e relatório técnico:

Foram utilizadas 25 amostras/partidas de sêmen congeladas de 25 touros da raça Senepol que foram previamente usadas em aproximadamente 500 rotinas de PIVE, todas utilizando os mesmos meios em um mesmo laboratório comercial da cidade de Uberlândia-MG. Estas rotinas geraram aproximadamente 3000 embriões que foram inovulados em receptoras.

Essas doses foram doadas em parte pelo próprio laboratório e por outras duas fazendas de gado de corte da região.

3.2-Preparo das lâminas para colorações:

As doses de sêmen foram descongeladas a 36°C por 30 segundos e 5 gotas de cada palheta eram utilizadas para confecção de 5 esfregaços por touro: duas para colorações e três para *backup* e uso em eventual falha no processo de coloração e confecção das lâminas. Cada esfregaço era fixado em etanol ácido acético (3:1) por um minuto e, posteriormente, em etanol 70% por três minutos e secos em temperatura ambiente.

3.3-Coloração com Azul de Toluidina (AT):

Após a fixação, uma das técnicas utilizadas foi a coloração com AT, em que, após a hidrólise ácida por 25 minutos em HCl 4N, os esfregaços eram lavados em água destilada, secos, e posteriormente corados. Duas gotas de solução de Azul de Toluidina (AT) 0,025%, em tampão ácido cítrico-fosfato (tampão McIlvaine) pH 4 eram depositadas sobre o esfregaço e cobertas com lamínula, quando então aguardava-se cerca de 2 a 3 minutos para penetração do corante. Após esse tempo retirava-se o excesso sob papel toalha e então era depositado o esmalte ao redor da lamínula, para evitar a secagem.

Após a confecção da lâmina, imagens digitais foram capturadas pela câmera acoplada ao microscópio óptico Olympus BX40 com objetiva de 40x com auxílio do programa S-EYE e resolução de 3840x2160 pixels, totalizando aproximadamente 200 espermatozoides por lâmina. A imagem a seguir retrata um esfregaço corado por AT.

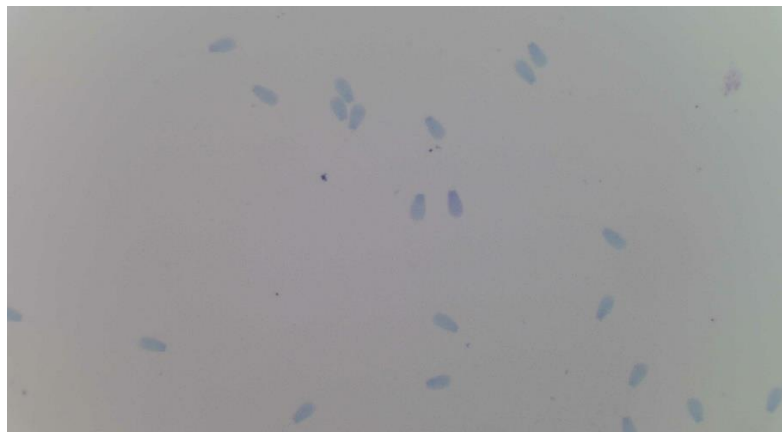


Figura 4: Fotomicrografia de cabeças de espermatozoides de esfregaço de sêmen bovino corado por AT, visualizadas em aumento de 40x.

3.4-Reação de Feulgen:

Outra técnica de coloração utilizada foi mediante a reação de Feulgen, em que os esfregaços fixados também eram submetidos à hidrólise ácida em HCl, agora por 45 minutos. Após a hidrólise ácida, as lâminas eram lavadas em água destilada, secas à temperatura ambiente e então era depositado o reativo de Schiff sobre todo o esfregaço, quando então aguardava-se 1 hora para incubação. Após esse período as lâminas eram levemente lavadas com água destilada e posteriormente submetidas a banhos de desidratação de 30 segundos cada em álcool 70%, seguido de álcool 85%, 95%, absoluto I, II e III, quando então passava-se para os banhos em xilol I, II e III por 3 minutos cada. Ao final do último banho uma lamínula era previamente higienizada e preparada, sobre a qual eram depositadas 3 gotas espaçadas de Entellan e o esfregaço era então retirado diretamente do último banho de xilol e depositado sobre a lamínula.

Após a retirada do excesso de Entellan para sua distribuição uniforme sobre o esfregaço corado, também eram capturadas imagens digitais pela câmera acoplada ao microscópio óptico Olympus BX40 com objetiva de 40x com auxílio do programa S-EYE e resolução de 3840x2160 pixels, totalizando aproximadamente 200 espermatozoides por lâmina. A seguir está uma imagem de um esfregaço corado por reação de Feulgen.



Figura 5 - Fotomicrografia de cabeças de espermatozoides de esfregaço de sêmen bovino corado por reação de Feulgen, vizualizadas em aumento de 40x.

3.5-SCSA:

Outra técnica utilizada para avaliar a integridade da cromatina e fragmentação do DNA foi o SCSA (“Sperm chromatin structure assay”), método elaborado por Evenson e colaboradores que utiliza a citometria de fluxo e o corante laranja de acridina (LA). O conteúdo de sêmen restante de cada uma das palhetas de cada um dos touros era depositado em microtubos de 1,5mL, nos quais eram acrescentados 500 µl de PBS para posterior centrifugação a 1300 rcf por 5 minutos. Após esse tempo o sobrenadante era descartado e acrescido 500 µl novamente e, após a homogeneização, a amostra passava por nova centrifugação. Uma última lavagem era realizada repetindo o procedimento, totalizando 3 centrifugações.

Era acrescentado ao pellet restante da última centrifugação 150 µl de tampão TNE (0.01 M Tris-HCl, 0.15 M NaCl, 1 mM EDTA) seguido de homogeneização e distribuição em outros 3 microtubos, com 50 µl do conteúdo cada e identificados como: NM (não marcado), P (protocolo padrão) e CN (controle negativo). Previamente ao preparo das amostras, ainda no laboratório, a solução para coloração era preparada mediante a mistura da solução tampão para LA (0,1 M ácido cítrico, 0,2 M Na₂PO₄, 1 mM EDTA, 0,15 M NaCl) e solução estoque de LA a 0,1% e depositado em microtubos de 1,5mL cobertos com papel alumínio. Cerca de 60 µl de detergente ácido (HCl 0,08 M, NaCl 0,15 M, Triton X-100 0,1%) por touro também eram depositados em microtubos de 1,5mL.

Após o preparo das amostras e reagentes, estes eram levados para análise em

citômetro de fluxo CytoFLEX-Beckman Coulter. Primeiramente, todas as amostras não marcadas eram analisadas para calibração do equipamento e identificação da fluorescência natural de cada uma delas. Em seguida, para o protocolo padrão, 50 µl de detergente ácido eram adicionados ao microtubo P, aguardava-se 30 segundos e então adicionava-se 150 µl de LA e aguardava-se mais 2 minutos e meio para então a amostra ser analisada. Posteriormente, para o controle negativo, eram adicionados 200 µl de LA ao microtubo CN, aguardava-se 2 minutos e meio e a amostra era submetida a análise por citometria de fluxo.

Importante ressaltar que como eram levados ao citômetro amostras de sêmen de diferentes touros por vez, para evitar falsas marcações, inicialmente todas as amostras não marcadas de cada um dos touros eram avaliadas, posteriormente as do protocolo padrão de cada um dos touros e finalmente o controle negativo de cada um dos touros, sempre de forma separada e nesta mesma ordem.

A partir da passagem das amostras pelo CytoFLEX, para cada tratamento (NM, P e CN) o software gerava plots nos quais cada ponto representa um evento, que são em sua maioria espermatozoides mas também outros compostos do diluente específico daquela dose ou mesmo debris celulares, como retratado na Figura 6. A partir desses plots o objetivo é distinguir populações identificando aqueles que realmente são espermatozoides e, a partir desses, verificar a diferença da intensidade de fluorescência emitida, que em tese representa também a diferença na integridade da cromatina das células espermáticas, em que fluorescência verde seria emitida por espermatozoides com DNA íntegro e fluorescência vermelha por espermatozoides com DNA fragmentado.

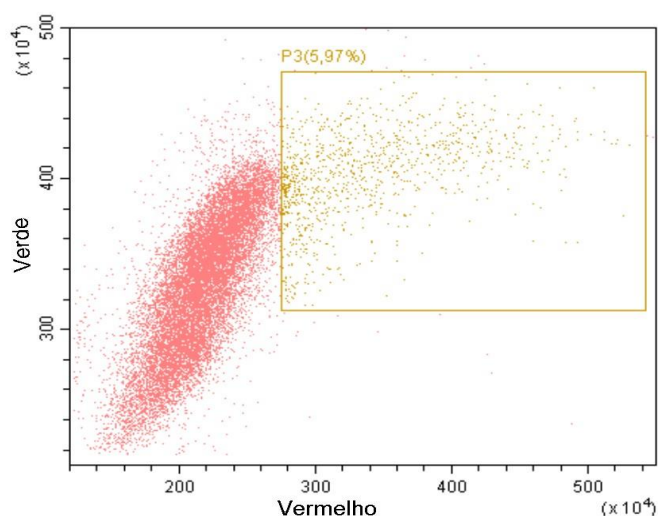


Figura 6: Gráfico de dispersão representando a porcentagem de espermatozoides com DNA fragmentado de um dos touros avaliados. O eixo Y associado com DNA íntegro (fluorescência verde) e o eixo X associado com DNA fragmentado (fluorescência verde).

3.6-Análise computacional das imagens:

A análise das imagens computadorizada foi realizada em etapas que se basearam na segmentação das cabeças, classificação das alterações cromatínicas, análise quantitativa da descompactação e heterogeneidade cromatínicas e morfometria de cada cabeça. Para cada esfregaço/amostra, em média, 300 ou mais cabeças foram segmentadas por “*thresholding*” (limiarização), com auxílio de software desenvolvido em ambiente MATLAB e executado pelo programa Octave. Nesse programa, foram selecionadas as 20 cabeças mais compactadas, ou seja, mais claras, como referência para determinar o valor médio de pixels. As regiões com valor de pixel 2% inferior à essa média foram destacadas pelo software, o que possibilitou determinar as regiões com descompactação dentro de cada cabeça, tanto para as cabeças coradas por AT como por reação de Feulgen. Foi utilizada então a seguinte classificação: descompactação dispersa (DD), descompactação basal (DB), descompactação central (DC), descompactação do eixo-central (DEC), descompactação da metade-basal (DMB), descompactação total (DT) e cabeças normais (N) (Silva et al., 2025; Hiraiwa et al., 2021).

Para mensuração da descompactação e heterogeneidade da cromatina foi utilizado um algoritmo desenvolvido em ambiente de programação Sixelab, no qual as cabeças segmentadas foram convertidas em tons de cinza. A média dos níveis de cinza de 10 cabeças mais compactas por esfregaço/amostra foi determinada e esse valor foi considerado padrão. Para cada cabeça foi determinada a diferença percentual do valor de pixels em relação à média pré-determinada, o que representa a descompactação. Além disso, a heterogeneidade das cabeças foi determinada a partir do cálculo do coeficiente de variação da intensidade dos níveis de cinza de cada cabeça (Beletti et al., 2005).

Os parâmetros morfométricos de cada cabeça avaliada também foram obtidos a partir da segmentação executada pelo software desenvolvido em ambiente Matlab e utilizando algoritmo desenvolvido em Scilab. Medidas básicas como área, perímetro, largura, comprimento foram calculadas e características derivadas a essas também foram determinadas, como a razão largura/comprimento, elipticidade e Fator de Forma. Também para caracterização da forma, foram determinados os valores das três primeiras harmônicas da transformada de Fourier (Fourrier 0, Fourrier 1, Fourrier 2) de cada uma das cabeças, além da simetria lateral e simetria ântero-posterior,

características intimamente associadas a hidrodinâmica espermática (Beletti et al., 2005).

As Figuras 7 e 8 retratam a classificação das cabeças espermáticas coradas, respectivamente, por AT e reação de Feulgen, de acordo com a região de descompactação.

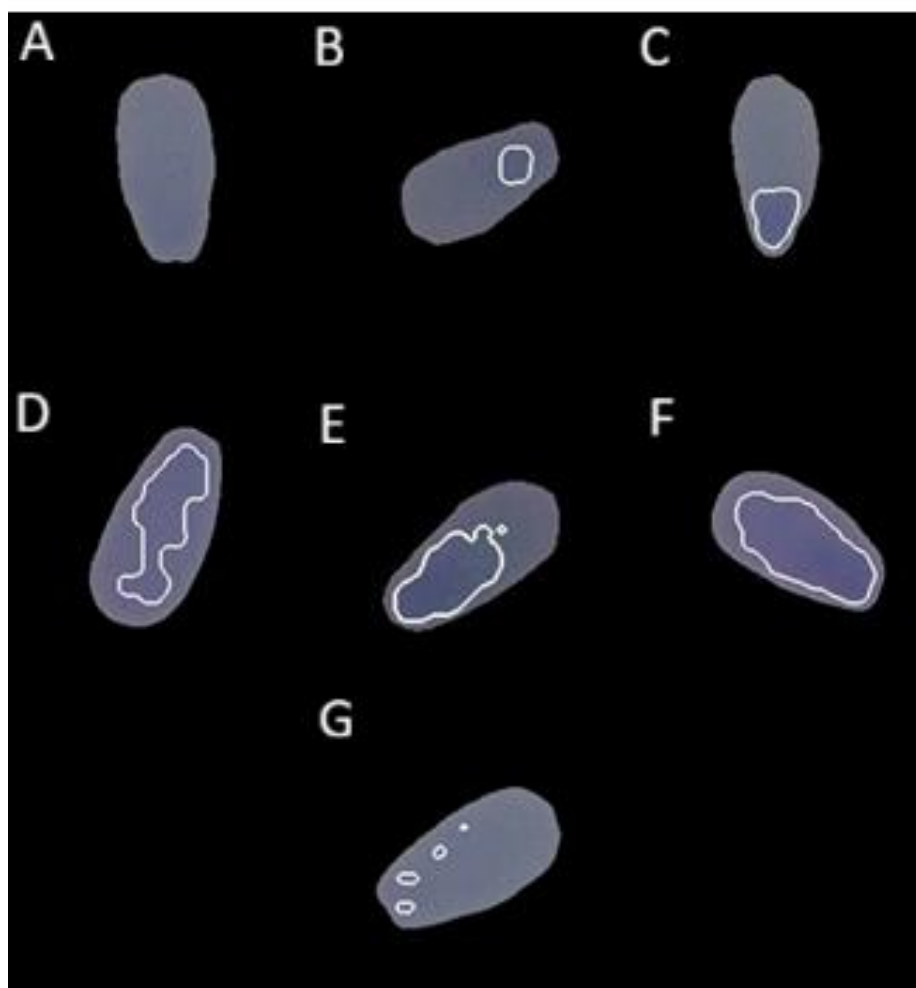


Figura 7 – Cabeças espermáticas com descompactação em diferentes regiões coradas por AT. (A) Normal, (B) descompactação central, (C) descompactação basal, (D) descompactação no eixo central, (E) descompactação da metade basal, (F) descompactação total e descompactação dispersa (G).

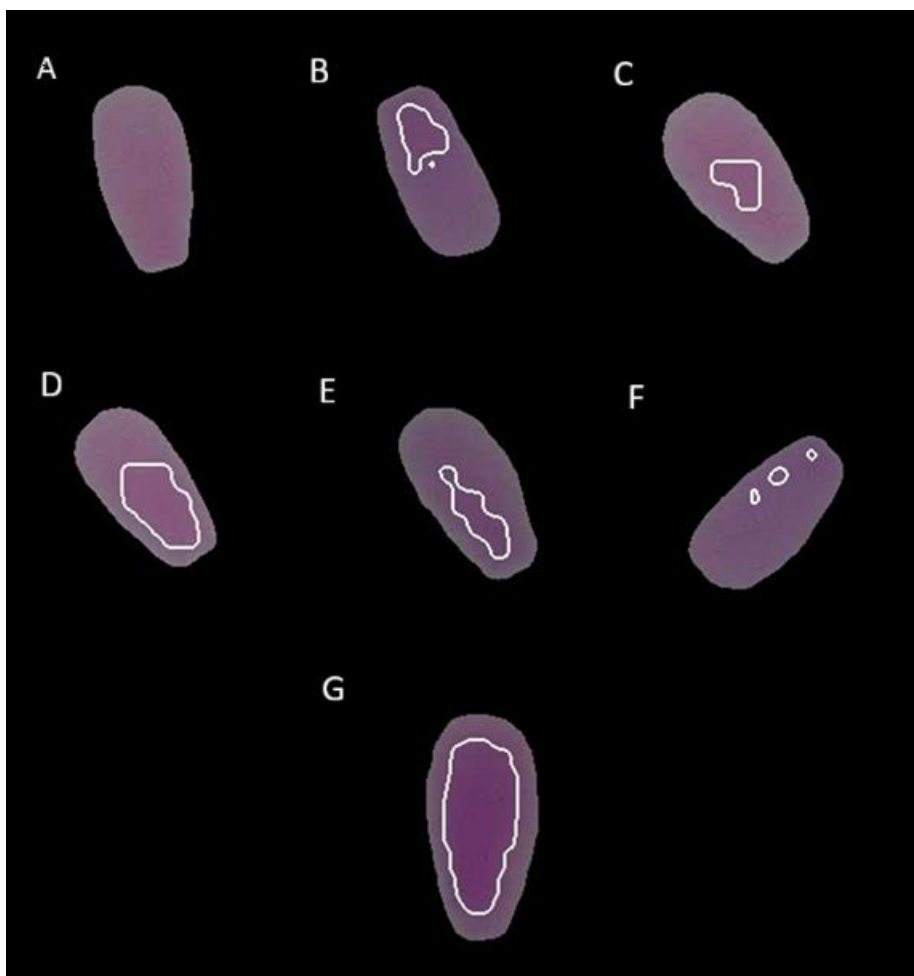


Figura 8 – Cabeças espermáticas com descompactação em diferentes regiões coradas por reação de Feulgen. (A) Normal, (B) descompactação basal, (C) descompactação central, (D) descompactação da metade basal, (E) descompactação do eixo central, (F) descompactação dispersa e (G) descompactação total.

3.7 - Obtenção das taxas de clivagem, de desenvolvimento embrionário, de blastocisto e de prenhez:

As taxas de clivagem, de desenvolvimento embrionário, de blastocisto e de prenhez foram obtidas a partir do relatório fornecido pelo laboratório, que contém diversas informações acerca de todas as rotinas datadas de 2013 a 2022, tais como: data da aspiração, identificação da doadora, raça, categoria animal, identificação do touro, identificação da partida do sêmen utilizada, identificação dos técnicos, identificação dos meios de cultivo utilizados, número de ovócitos, número de ovócitos viáveis, número de ovócitos submetidos à maturação, número de clivados, número de embriões produzidos, número de embriões inovulados e número de receptoras prenhes. A fim de minimizar o efeito de variáveis que não fossem as de interesse,

foram consideradas rotinas de produção de embriões somente da raça senepol, em que foram usadas a mesma partida de sêmen da amostra avaliada, em que os mesmos técnicos trabalharam e em que os mesmos meios foram utilizados.

O cálculo dessas taxas foi realizado da seguinte forma: a taxa de clivagem é igual ao número de estruturas clivadas 48h após a FIV dividido pelo número de ovócitos submetidos à maturação; a taxa de desenvolvimento embrionário, calculada 7 dias após a fertilização, é igual ao número de blastocistos dividido pelo número de clivados; e a taxa de blastocisto igual ao número de blastocistos dividido pelo número de ovócitos submetidos à maturação e a taxa de prenhez igual ao número de receptoras prenhes. Para cada um dos touros avaliados, foram calculadas as médias de cada uma dessas taxas de todas as rotinas de PIVE em que esses mesmos touros/partidas foram utilizados.

Importante ressaltar que todos os embriões foram transferidos a fresco em sua maioria na estação chuvosa, em receptoras predominantemente nulíparas e mestiças sob diferentes estratégias de suplementação nutricional, particulares de cada propriedade.

3.8 - Avaliação estatística:

As análises estatísticas foram realizadas por meio da correlação entre as variáveis espermáticas (parâmetros morfométricos e integridade cromatínica, obtida tanto por meio das colorações com AT e reação de Feulgen como também por SCSA) e as taxas de clivagem, de desenvolvimento embrionário, de blastocisto e prenhez. Para isso, foram calculados os coeficientes de correlação de Pearson entre as variáveis seguido do teste t para obtenção do p-valor, em que as correlações foram consideradas significativas quando $p < 0,05$ e moderadas quando p estivesse entre 0,05 e 0,10 ($0,10 > p > 0,05$).

4 – Resultados:

A integridade da cromatina espermática dos 25 touros foi avaliada por dois métodos, o SCSA e a análise computacional de imagens geradas a partir dos esfregaços corados por AT e por reação de Feulgen, o que permitiu identificar as regiões da cabeça dos espermatozoides com descompactação e determinar a descompactação média e heterogeneidade da cromatina. Além disso, medidas morfométricas de cada uma das cabeças dos espermatozoides de cada um dos touros analisados foram obtidas, totalizando 12 variáveis para esse parâmetro (área, perímetro, largura, comprimento, razão largura/comprimento, elipticidade, Fator de Forma, Fourier 0, Fourier 1, Fourier 2, simetria lateral, simetria ântero-posterior). As alterações cromatínicas por região da cabeça, a descompactação média, a heterogeneidade e cada uma das características morfométricas analisadas de um total de 18645 cabeças (6961 por AT e 11684 por reação de Feulgen) foram correlacionadas com as médias das taxas de clivagem, taxas de desenvolvimento embrionário, taxas de blastocisto e taxas de prenhez fornecidas pelo laboratório. Além disso, as porcentagens de espermatozoides com DNA fragmentado de cada touro obtidas pelo SCSA também foram correlacionadas com as mesmas taxas.

A Tabela 1 mostra a média e o desvio padrão de cada uma das variáveis cromatínicas analisadas identificadas pela coloração com AT, por reação de Feulgen e SCSA.

Tabela 1 - Média e desvio padrão das variáveis cromatínicas identificadas pela coloração com AT, reação de Feulgen e SCSA.

	Variáveis cromatínicas	Média	Desvio Padrão
AT	%DD	0,154695	0,365155
	%DB	2,195445	1,400848
	%DC	0,48736	0,548089
	%DEC	0,148724	0,298323
	%DMB	0,342559	0,362837
	%DT	0,165348	0,209517
	%N	96,51226	1,847441
	Heterogeneidade	3,290987	1,361313
	Descompactação Média	2,679726	0,358557
FEULGEN	%DD	3,203643	3,177487
	%DB	9,030283	6,65945
	%DC	7,180977	6,656967
	%DEC	1,254843	1,238078
	%DMB	0,728106	0,724134
	%DT	0,106	0,157428
	%N	79,4416	13,10723
	Heterogeneidade	5,744118	1,782897
	Descompactação Média	5,113699	0,803247
SCSA		17,52696	11,3245

%DD, porcentagem de descompactação dispersa; %DB, porcentagem de descompactação basal; %DC porcentagem de descompactação centra; %DEC porcentagem de descompactação no eixo central; %DMB, porcentagem de descompactação na metade basal; %DT porcentagem de descompactação total; %N, porcentagem de cabeças normais.

Já a Tabela 2 retrata a média e desvio padrão das variáveis morfométricas também identificadas pelos dois tipos de coloração, enquanto a Tabela 3 mostra a média e desvio padrão das taxas de clivagem, taxas de desenvolvimento embrionário, taxas de blastocisto e taxas de prenhez obtidas quando o sêmen dos touros avaliados foi utilizado.

Tabela 2 - Média e desvio padrão das variáveis morfométricas identificadas pela coloração com AT e por reação de Feulgen.

Variáveis Morfométricas	AT		Feulgen	
	Média	Desvio Padrão	Média	Desvio Padrão
Área	42,047	3,120301	46,84123	2,824088
Perímetro	20,52471	0,795002	21,41378	0,64309
Largura	3,953333	0,143016	4,157748	0,160252
Comprimento	7,775459	0,320863	8,147822	0,258089
Largura/comprimento	0,508788	0,015815	0,510388	0,017102
Elípticidade	0,326279	0,013969	0,324879	0,015078
Fator de Forma	0,919861	0,009921	0,89867	0,006658
Fourrier 0	3105,987	311,9981	3346,431	247,4603
Fourrier 1	335,327	61,09629	391,886	58,16638
Fourrier 2	235,8791	24,62814	296,4776	25,82458
Simetria lateral	0,96034	0,004633	0,972718	0,002207
Simetria ântero-posterior	0,933427	0,010535	0,930631	0,009393

Tabela 3 - Médias e desvio padrão das taxas de clivagem, taxa de desenvolvimento embrionário, taxa de blastocisto e prenhez.

	Média	Desvio Padrão
Taxa de clivagem	67,8116	14,69169
Taxa de desenvolvimento embrionário	40,582	12,44882
Taxa de blastocisto	27,4416	9,510498
Prenhez	29,07471	13,41301

As Tabelas 4 e 5 mostram a correlação entre as variáveis cromatínicas identificadas pela coloração por AT e por reação de Feulgen, respectivamente, e as taxas de clivagem, de desenvolvimento embrionário, de blastocisto e prenhez, por meio dos coeficientes de correlação de Pearson (r).

Tabela 4 - Correlação entre as diferentes regiões de descompactação da cromatina, heterogeneidade e descompactação média dos espermatozoides dos touros analisados corados por AT e a porcentagem total de alterações com as taxas de clivagem, de desenvolvimento embrionário, de blastocisto e de prenhez.

	Taxa de clivagem		Taxa de desenvolvimento embrionário		Taxa de blastocisto		Prenhez	
	p	r	p	r	p	r	p	r
%DD	0,86	0,04	0,74	0,07	0,67	0,09	0,84	-0,05
%DB	0,27	0,23	0,83	-0,04	0,71	0,08	0,88	-0,04
%DC	0,51	-0,14	0,89	-0,03	0,50	-0,14	0,82	-0,06
%DEC	0,22	0,26	0,16	-0,29	0,68	-0,09	0,73	0,09
%DMB	0,47	0,15	0,62	-0,10	0,97	-0,01	0,77	0,08
%DT	0,69	0,08	0,49	0,15	0,29	0,22	0,94	-0,02
%Total								
Alterados	0,29	0,22	0,70	-0,08	0,84	0,04	0,92	-0,03
Heterogeneidade	0,87	-0,03	0,25	-0,24	0,24	-0,24	0,68	-0,11
Descompactação média	0,71	-0,08	0,50	-0,14	0,39	-0,18	0,30	-0,27

%DD, porcentagem de descompactação dispersa; %DB, porcentagem de descompactação basal; %DC porcentagem de descompactação centra; %DEC porcentagem de descompactação no eixo central; %DMB, porcentagem de descompactação na metade basal; %DT porcentagem de descompactação total; %Total Alterados, porcentagem do total de cabeças com algum tipo de descompactação.

Tabela 5 - Correlação entre as diferentes regiões de descompactação da cromatina, heterogeneidade e descompactação média dos espermatozoides dos touros analisados corados por reação de Feulgen e a porcentagem total de alterações com as taxas de clivagem, de desenvolvimento embrionário, de blastocisto e prenhez.

	Taxa de clivagem		Taxa de desenvolvimento embrionário		Taxa de blastocisto		Prenhez	
	p	r	p	r	p	r	p	r
%DD	0,97	-0,01	0,65	0,09	0,75	0,07	0,65	-0,12
%DB	0,67	-0,09	0,72	0,07	0,96	0,01	0,89	0,04
%DC	0,48	0,15	0,62	0,11	0,53	0,13	0,67	0,11
%DEC	0,88	-0,03	0,98	0,00	0,76	-0,07	0,99	0,00
%DMB	0,79	0,06	0,86	0,04	0,82	0,05	0,86	0,05
%DT	0,39	-0,18	0,15	-0,30	0,07**	-0,36	0,68	0,11
%Total								
Alterados	0,94	0,02	0,61	0,11	0,73	0,07	0,84	0,05
Heterogeneidade	0,77	0,06	0,79	-0,06	0,88	0,03	0,64	0,12
Descompactação média	0,25	-0,24	0,42	0,17	0,96	0,01	0,61	-0,13

**Correlação moderada quando $0,1 < p < 0,05$. %DD, porcentagem de descompactação dispersa; %DB, porcentagem de descompactação basal; %DC porcentagem de descompactação centra; %DEC porcentagem de descompactação no eixo central; %DMB, porcentagem de descompactação na metade basal; %DT porcentagem de descompactação total; %Total de alterados, porcentagem do total de cabeças com algum tipo de descompactação.

Nenhum dos tipos de descompactação identificados por AT se correlacionou significativamente com qualquer das taxas da PIVE ou prenhez. Já a descompactação total (%DT) identificada pela coloração por reação de Feulgen apresentou correlação negativa moderada com a taxa de blastocisto ($p=0,07$; $r = -0,36$).

A integridade da cromatina avaliada por meio do SCSA apresentou correlação negativa moderada ($r=-0,36$, $p=0,09$) com a taxa de clivagem, o que não foi observado para a taxa de desenvolvimento embrionário, taxa de blastocisto e prenhez, como mostra a Tabela 6. Ou seja, a taxa de clivagem tende a ser inferior quando utilizados na FIV amostras de sêmen de touros que apresentam maior porcentagem de espermatozoides com DNA fragmentado.

Tabela 6 - Correlação entre a porcentagem de espermatozoides com DNA fragmentado identificados por SCSA e as taxas de de clivagem, taxas de desenvolvimento embrionário, taxas de blastocisto e prenhez.

	Taxa de clivagem		Taxa de desenvolvimento embrionário		Taxa de blastocisto		Prenhez	
	p	r	p	r	p	r	P	r
SCSA	0,09**	-0,36	0,85	0,04	0,29	-0,23	0,28	-0,30

**Correlação moderada quando $0,1 < p < 0,05$.

A Tabela 7 retrata a correlação entre as variáveis morfométricas dos espermatozoides corados por AT com as taxas de clivagem, de desenvolvimento embrionário, de blastocisto e de prenhez, por meio dos coeficientes de correlação de Pearson (r).

Tabela 7 - Correlação entre as médias das medidas morfológicas dos espermatozoides dos touros analisados corados por AT com as taxas de clivagem, de desenvolvimento embrionário, de blastocisto e de prenhez

	Taxa de clivagem		Taxa de desenvolvimento embrionário		Taxa de blastocisto		Prenhez	
	p	r	p	r	p	R	p	r
Área	0,07**	0,37	0,54	-0,13	0,48	0,15	0,25	0,29
Perímetro	0,04*	0,42	0,61	-0,11	0,31	0,21	0,13	0,38
Largura	0,24	0,24	0,57	-0,12	0,86	0,04	0,80	0,07
Comprimento	0,03*	0,44	0,74	-0,07	0,20	0,27	0,06**	0,46
Largura/comprimento	0,14	-0,30	0,87	-0,03	0,15	-0,30	0,03*	-0,54
Elipticidade	0,14	0,30	0,86	0,04	0,15	0,30	0,03*	0,54
Fator de Forma	0,75	-0,07	0,97	0,01	0,69	-0,09	0,40	-0,22
Fourrier 0	0,02*	0,46	0,83	-0,05	0,13	0,31	0,05**	0,48
Fourrier 1	0,18	0,28	0,65	0,10	0,21	0,26	0,20	0,33
Fourrier 2	0,21	0,26	0,74	-0,07	0,67	0,09	0,39	0,22
Simetria lateral	0,62	0,10	0,94	0,01	0,61	0,11	0,41	0,21
Simetria ântero-posterior	0,66	-0,09	0,38	-0,18	0,31	-0,21	0,31	-0,26

*Correlação significativa quando $p < 0,05$. **Correlação moderada quando $0,1 < p < 0,05$.

Nota-se que algumas variáveis morfométricas apresentaram associação com a taxa de clivagem e a taxa de prenhez. O perímetro ($p=0,04$; $r=0,42$), o comprimento ($p=0,03$; $r=0,44$) e Fourier 0 ($p=0,02$; $r=0,46$) das cabeças foram positivamente correlacionados com as taxas de clivagem, ou seja, rotinas em que foram utilizados touros cujos espermatozoides apresentaram perímetro e comprimento maiores, tiveram também taxas de clivagem superiores. A área também apresentou uma correlação moderada positiva com a taxa de clivagem ($p=0,07$; $r=0,37$).

Com relação às taxas de desenvolvimento embrionário e de blastocisto, nenhuma das variáveis tiveram correlação significativa ou moderada. Já a prenhez foi positiva e significativamente correlacionada com a elipticidade das cabeças ($p=0,03$; $r=0,54$) e negativa e significativamente correlacionada com a razão largura/comprimento ($p=0,03$; $r=-0,54$), ou seja, receptoras que foram inovuladas com embriões cujos pais apresentavam espermatozoides mais elípticos e com menor razão largura/comprimento, portanto menos “arredondados”, apresentaram maior probabilidade de se tornarem gestantes. As variáveis comprimento ($r=0,46$, $p=0,06$) e Fourier 0 ($r=0,48$, $p=0,05$) apresentaram correlação positiva moderada com a prenhez.

A Tabela 8 retrata as mesmas correlações por meio dos coeficientes de correlação de Pearson (r), porém as variáveis foram obtidas a partir de espermatozoides corados por reação de Feulgen.

Tabela 8 - Correlação entre as médias das medidas morfológicas dos espermatozoides dos touros analisados corados por reação de Feulgen com as taxas de clivagem, de desenvolvimento embrionário, de blastocisto e de prenhez.

	Taxa de clivagem		Taxa de desenvolvimento embrionário		Taxa de blastocisto		Prenhez	
	p	r	p	r	p	R	p	r
Área	0,99	0,00	0,61	-0,11	0,74	-0,07	0,41	0,21
Perímetro	0,67	0,09	0,60	-0,11	0,99	0,00	0,15	0,36
Largura	0,54	-0,13	0,75	-0,07	0,46	-0,15	0,64	-0,12
Comprimento	0,35	0,20	0,69	-0,08	0,63	0,10	0,05**	0,49
Largura/comprimento	0,10	-0,33	0,96	0,01	0,20	-0,26	0,02*	-0,58
Elipticidade	0,10	0,34	0,96	-0,01	0,20	0,27	0,01*	0,58
Fator de Forma	0,24	-0,25	0,80	-0,05	0,21	-0,26	0,01*	-0,59
Fourrier 0	0,19	0,27	0,69	-0,08	0,44	0,16	0,02*	0,56
Fourrier 1	0,87	-0,03	0,72	0,07	0,87	0,03	0,57	0,15
Fourrier 2	0,85	-0,04	0,95	0,01	0,89	-0,03	0,59	0,14
Simetria lateral	0,77	-0,06	0,42	0,17	0,52	0,14	0,30	0,27
Simetria ânter-posterior	0,98	-0,01	0,50	-0,14	0,63	-0,10	0,64	-0,12

*Correlação significativa quando $p < 0,05$. **Correlação moderada quando $0,1 < p < 0,05$

Diferentemente dos espermatozoides corados por AT, nenhum dos parâmetros morfométricos tiveram correlação significativa ou moderada com as taxas de clivagem, o que também ocorreu com as taxas de desenvolvimento embrionário e de blastocisto. No entanto, o mesmo padrão de correlação observada nos espermatozoides corados por AT, foi observado entre as variáveis de elipticidade ($p=0,01$; $r=0,58$) e razão largura/comprimento ($p=0,02$; $r=-0,58$) e a prenhez, indicando também que receptoras que foram inovuladas com embriões cujos pais apresentavam espermatozoides mais “arredondados”, apresentaram menores chances de se tornarem gestantes. As variáveis Fator de forma ($p=0,01$; $r=-0,59$) e Fourier 0 ($p=0,02$; $r=0,56$) também apresentaram correlação significativa com a prenhez. O comprimento dos espermatozoides ($p=0,05$; $r=0,49$) apresentou correlação moderada positiva com a prenhez.

5 – Discussão:

Foram utilizados três métodos de avaliação da cromatina espermática no presente trabalho: SCSA, análise computacional de imagens de esfregaços corados com AT e corados por reação de Feulgen. A porcentagem de espermatozoides com fragmentação de DNA identificada pelo SCSA apresentou uma correlação moderada negativa com a taxa de clivagem. Apesar da taxa de clivagem não possuir uma relação absoluta com a capacidade fecundante dos espermatozoides, ela foi fortemente influenciada por esta variável. Assim, pode-se supor que o SCSA identificou principalmente espermatozoides que devido à alteração cromatínica, perderam sua capacidade fecundante.

Já a análise de esfregaços corados com reação de Feulgen, evidenciou uma correlação negativa da taxa de blastocisto somente com o tipo de alteração que atinge praticamente toda a cabeça do espermatozoide (DT). É sabido que alterações cromatínicas espermáticas podem interferir na capacidade fecundante do espermatozoide e que quando algum espermatozoide com alteração cromatínica consegue fecundar o ovócito, geralmente influencia-se também no desenvolvimento embrionário (Silva et al., 2025). Considerando que não houve correlação nem mesmo moderada com taxa de clivagem e de desenvolvimento embrionário e que a quantidade de espermatozoides com este tipo de alteração foi pequena, pode-se supor que esta alteração interfere tanto na taxa de clivagem como no desenvolvimento embrionário, o que somados, acabou levando a correlação negativa moderada com a formação de blastocistos final. Já a cromatina avaliada a partir da coloração com AT, não mostrou qualquer relação significativa com as taxas da PIVE ou prenhez, comportando-se como uma técnica pouco sensível para identificar alterações cromatínicas em sêmen de touros da raça Senepol considerados férteis pela avaliação andrológica tradicional.

A análise da morfologia espermática empregada nos exames andrológicos convencionais apresenta subjetividade, o que limita o potencial da predição real da fertilidade de um touro. Como alternativa a esse problema, está a análise computadorizada de imagens, empregada no presente trabalho. Medidas de tamanho básicas como a área, comprimento e largura da cabeça espermática são características importantes, mas a morfologia é mais bem descrita quando utilizadas as harmônicas da transformada de Fourier (Ostermeier et al., 2001a). Basicamente,

nesse tipo de análise, o perímetro das cabeças espermáticas é decomposto em diversas camadas que descrevem minuciosamente o contorno dessas células e detecta pequenas imperfeições. No presente trabalho, a amplitude da primeira harmônica (Fourier 0), que está mais relacionada com o tamanho geral da cabeça do espermatozoide, foi positivamente correlacionada com a taxa de clivagem, assim como o perímetro e o comprimento, o que se contradiz com os achados de Kipper et al. (2017), em que esse perfil espermático foi associado a uma menor compactação de cromatina.

Ostermeier et al. (2001b) reportaram que touros de alta fertilidade, atestada por elevadas taxas de não-retorno, apresentavam espermatozoides com cabeças mais alongadas e afiladas, anormais à luz da análise clássica, do que espermatozoides de touros menos férteis. Os resultados do presente estudo convergem com esta observação na medida em que a elipticidade foi aqui positivamente correlacionada com a prenhez das receptoras. Em contrapartida, Beletti et al. (2005b) notaram que espermatozoides de touros zebuínos tendem a ser menores e menos elípticos, o que não influenciou, no entanto, a hidrodinâmica, característica que potencialmente afeta a fecundação. Mas, as harmônicas da transformada de Fourier mostraram-se diferentes, quando comparados touros zebuínos e taurinos, o que explicaria a pouca eficiência destas harmônicas na identificação de problemas de fertilidade em touros zebuínos. Touros da raça Senepol são taurinos adaptados e quando comparados com reprodutores zebuínos apresentam maior libido, o que os faz cobrir mais vacas em um mesmo período e lhes credenciam a também ter um melhor desempenho reprodutivo a campo (Chase et al., 1997). Porém, os achados deste estudo permitem inferir que esse melhor desempenho pode também estar associado a parâmetros seminais, como é o caso da elipticidade da cabeça espermática e mesmo a primeira harmônica de Fourier (Fourier 0), que nas condições do presente trabalho se apresentaram como possíveis preditores de prenhez.

Uma possível explicação biológica para esses achados, é que espermatozoides com a cromatina descompactada tendem a modificar sua morfologia de cabeça espatular para esférica, aumentando seu volume, mas diminuindo sua área quando observados em esfregaços. Isso ocorre porque nesta visão bidimensional só é percebida alterações nos eixos X e Y, e o aumento de volume se dá pelo aumento do eixo Z (Martins et al, 2021). Portanto, espermatozoides mais elípticos na visão 2D representam espermatozoide na forma espatular e com cromatina compactada e os

espermatozoides menos elípticos seriam os espermatozoides tendendo a esféricos, e representam espermatozoides com alterações na compactação da cromatina. Ou seja, a observação de que a fragmentação do DNA, avaliada pelo SCSA, e a descompactação total, detectada por reação de Feulgen, apresentaram correlação negativa moderada com as taxas de clivagem e de blastocisto, respectivamente, estão de acordo com a literatura, uma vez que sustenta a ideia de que alterações cromatínicas podem afetar a fecundação e, no caso de ocorrer a fecundação, danos no DNA prejudicam o desenvolvimento embrionário. Assim como Ostermeier et al. (2001b), as variáveis morfométricas aqui avaliadas não se correlacionaram com os resultados do SCSA, o que corrobora a sua tese de que a forma nuclear fornece informações sobre a fertilidade além das fornecidas pelos testes de estabilidade da cromatina.

6 – Conclusão:

Conclui-se que, mesmo utilizando amostras de sêmen de touros Senepol considerados férteis segundo a avaliação andrológica tradicional, alterações na cromatina espermática podem levar à redução da eficiência da PIVE e mesmo na taxa de prenhez pós inovulação. Tanto o SCSA como a análise de imagem computacional de esfregaços de sêmen corados com reação de Feulgen possuem moderada eficiência na identificação destas alterações. No entanto, a diminuição da elipticidade da cabeça espermática, identificada pela análise de imagem computacional e resultante da descompactação da cromatina, é um importante preditor da eficiência da PIVE e da prenhez.

REFERÊNCIAS

ABAH, K. O.; LIGOCKA-KOWALCZYK, Z.; ITODO, J. I.; AMEH, G.; PARTYKA, A.; NIZANSKI, W. Association between sperm DNA fragmentation and fertility parameters in farm animals: a systematic review and meta-analysis. **BMC Veterinary Research**, v. 21, n. 204, p. 1–15, 2025.

DOI: <https://doi.org/10.1186/s12917-025-04652-9>

ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; MORGAN, D.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P.; WILSON, J.; HUNT, T. **Biologia molecular da célula**. 6. ed. Artmed, 2017.

BALHORN, R. The protamine family of sperm nuclear proteins. **Genome Biology**, v. 8, n. 9, p. 227, 2007.

DOI: <https://doi.org/10.1186/gb-2007-8-9-227>.

BANASZEWSKA, D; ANDRASZEK, K; CZUBASZEK, M; BIESIADA-DRZAZGA, B. The effect of selected staining techniques on bull sperm morphometry. **Anim Reprod Sci**. 2015;159:17–24.

DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.anireprosci.2015.06.019>.

BARUSELLI, P. S. Após 2 anos de queda, mercado de IATF retoma crescimento. **Boletim Eletrônico do Departamento de Reprodução Animal**, FMVZ/USP, São Paulo, n. 9, 26 fev. 2025. Disponível em: <<http://vra.fmvz.usp.br/boletim-eletronico-vra/>>.

BELETTI, M. E. Cromatina espermática: quebrando paradigmas. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 37, n. 2, p. 92–96, abr./jun. 2013.

BELETTI, M. E.; COSTA, L. F. A systematic approach to multispecies sperm morphometric characterization. **Analytical and quantitative cytology and histology**, v. 25, n. 2, p. 97-107, 2003.

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

DOI: <https://doi.org/10.1080/1052029041000167133>

BELETTI, M. E.; COSTA, L. F.; GUARDIEIRO, M. M. Morphometric features and chromatin condensation abnormalities evaluated by toluidine blue staining in bull spermatozoa. **Brazilian Journal of Morphological Sciences**, v. 22, n. 2, p. 85–90, 2005.

BELETTI, M. E.; COSTA, L. F.; VIANA, M. P. A comparison of morphometric characteristics of sperm from fertile *Bos taurus* and *Bos indicus* bulls in Brazil. **Animal Reproduction Science**, v. 85, n. 1–2, p. 105–116, 2005.

DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.anireprosci.2004.04.019>.

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, 2004. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2003.10.016>.

CARREIRA, J. T.; TREVIZAN, J. T.; CARVALHO, I. R.; KIPPER, B.; RODRIGUES, L. H.; SILVA, C.; PERRI, S. H. V.; DREVET, J. R.; KOIVISTO, M. B.; Does sperm quality and DNA integrity differ in cryopreserved semen samples from young, adult, and aged Nellore bulls? **Basic and Clinical Andrology**, v. 27, n. 12, p. 1–12, 2017. DOI: 10.1186/s12610-017-0056-9

CHAPMAN, J. C.; MICHAEL, S. D. Proposed mechanism for sperm chromatin condensation/decondensation in the male rat. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 1, n. 20, p. 1–7, 2003.

CHASE, C.C.; CHENOWET, P. J.; LARSEN, R. E.; OLSON, T. A.; HAMMOND, A.C.; MENCHACA, M. A.; RANDEL, R. D. Growth and reproductive development from weaning through 20 months of age among breeds of bulls in subtropical Florida. **Theriogenology**, v. 47, p. 723-745, 1997. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(97\)00030-7](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(97)00030-7)

DACHEUX, J. L.; DACHEUX, F. New insights into epididymal function in relation to sperm maturation. **Reproduction**, v. 147, n. 2, p. R27–R42, 2014. DOI: 10.1530/REP-13-0420

DABIRI, M.; GOSS, D. M.; RAMASAMY, R.; BHAKAT, M.; GARDNER, D. K.; DE GRAAF, S. P.; WARKIANI, M. E. Sperm DNA fragmentation and its influence on mammalian reproduction. **Nature Reviews Urology**, 2026. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41585-025-01123-6>.

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. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.anireprosci.2016.01.017>.

EVENSON, D. P. Sperm Chromatin Structure Assay (SCSA®) for fertility assessment. **Current Protocols**, v. 2, n. 8, e508, 2022.

FERNANDES, C. E.; ZART, A. L.; MARTINS, J. C. de A.; OKO, R.; SUTOVSKY, P.; NOGUEIRA, É. Prevalence and morphological appearance of sperm nuclear defects using Feulgen reaction in beef bulls. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 60, e70021, 2025. DOI: <https://doi.org/10.1111/rda.70021>

FRANÇA, L. R.; AVELLAR, M. C. W. Espermatogênese e maturação espermática: aspectos relevantes durante o exame andrológico nas espécies domésticas. In: **REUNIÃO ANUAL DA ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE ANDROLOGIA ANIMAL**, 9., 2025, Londrina. *Anais* [...]. Londrina: Associação Brasileira de Andrologia Animal, 2025.

GERVASI, M. G.; VISCONTI, P. E. Chang's Meaning of Capacitation: A Molecular

Perspective. **Molecular Reproduction & Development**, [S. l.], v. 83, n. 10, p. 860-874, 2016.

DOI: <https://doi.org/10.1002/mrd.22663>.

GLEDHILL, B. L. Studies on the DNA content, dry mass and optical area of morphologically normal and abnormal bull spermatozoal heads. **Acta Veterinaria Scandinavica**, [S. l.], v. 7, n. 1, p. 1-20, 1966.

DOI: <https://doi.org/10.1186/BF03547372>.

GOGOL, P.; TRZCIŃSKA, M. Relationship between quality parameters and fertilizing ability of cryopreserved sexed bull sperm. **Annals of Animal Science**, v. 22, n. 4, p. 1257–1263, 2022.

DOI: <https://doi.org/10.2478/aoas-2022-0046>

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 in vitro embryo production. **Bioscience Journal**, v. 37, e37028, 2021.

DOI: <https://doi.org/10.14393/BJ-v37n0a2021-47967>

KIPPER, B. H.; TREVIZAN, J. T.; CARREIRA, J. T.; CARVALHO, I. R.; MINGOTI, G. Z.; BELETTI, M. E.; PERRI S. H. V.; FRANCISCATO, D. A.; PIERUCCI, J. C.; KOIVISTO, M. B. Sperm morphometry and chromatin condensation in Nelore bulls of different ages and their effects on IVF. **Theriogenology**, v. 87, p. 154–160, 2017.

DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.theriogenology.2016.08.017>.

KUMARESAN, A.; DAS GUPTA, M.; DATTA, T. K.; MORRELL, J. M. Sperm DNA Integrity and Male Fertility in Farm Animals: A Review. **Frontiers in Veterinary Science** v. 7, art. 321, 2020.

DOI: <https://doi.org/10.3389/fvets.2020.00321>.

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.

DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.theriogenology.2016.03.015>

LLAVANERA, M.; RIBAS-MAYNOU, J.; DELGADO-BERMÚDEZ, A.; RECUERO, S.; MUIÑO, R.; HIDALGO, C. O.; TAMARGO, C.; BONET, S.; MATEO-OTERO, Y.; YESTE, M. Sperm chromatin condensation as an in vivo fertility biomarker in bulls: a flow cytometry approach. **BMC Veterinary Research**, v. 17, art. 63, 2021.

DOI: <https://doi.org/10.1186/s40104-021-00634-7>

MARTINS, M. C.; GONÇALVES, L. M.; NONATO, A.; TRAVENÇOLO, B. A. N.; ALVES, B. G.; BELETTI, M. E. Sperm head morphometry and chromatin condensation are in constant change at seminiferous tubules, epididymis, and ductus deferens in bulls. **Theriogenology**, v. 161, p. 200-209, 2021.

DOI: <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2020.12.004>

MELLO, M. L. S. Induced metachromasia in bull spermatozoa. **Histochemistry**, v. 74, n. 3, p. 387–392, 1982. DOI: <https://doi.org/10.1007/bf00493438>

MELLO, M. L. S.; VIDAL, B. C. The Feulgen reaction: a brief review and new perspectives. **Acta Histochemica**, v. 119, n. 7, p. 603–609, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.acthis.2017.07.002>

MELLO, R. R. C. *et al.* Produção in vitro (PIV) de embriões em bovinos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 40, n. 2, p. 58–64, abr./jun. 2016.

OSTERMEIER, G. C.; SARGEANT, G. A.; YANDELL, B. S.; PARRISH, J. J. Measurement of bovine sperm nuclear shape using Fourier harmonic amplitudes. **Journal of Andrology**, v. 22, n. 4, p. 584–594, 2001.

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, 2001.

PARDEDE, B. P.; SETYAWAN, E. M. N.; SAID, S.; KUSUMAWATI, A.; PURWANTARA, B.; PANGESTU, M.; MEMILI, E. A-Kinase Anchor Protein 4 (proAKAP4): protein molecule–based fertility marker of Indonesian dairy bull and its correlation with frozen-thawed sperm quality. **Veterinary Medicine International**, v. 2025, art. 8367714, 2025. DOI: <https://doi.org/10.1155/vmi/8367714>

PARDEDE, B. P.; SUPRIATNA, I.; YUDI, Y.; AGIL, M. Decreased bull fertility: age-related changes in sperm motility and DNA fragmentation. **E3S Web of Conferences**, v. 151, art. 01010, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1051/e3sconf/202015101010>

PARDEDE, B. P.; AGIL, M.; KARJA, N. W. K.; SUMANTRI, C.; SUPRIATNA, I.; PURWANTARA, B. PRM1 gene expression and its protein abundance in frozen-thawed spermatozoa as potential fertility markers in breeding bulls. **Veterinary Sciences**, v. 9, n. 3, art. 111, 2022. DOI: <https://doi.org/10.3390/vetsci9030111>

RIVEROS, J. A. N.; PEREIRA, I. C.; TEIXEIRA, A. C. B.; DINIZ, J. H. W.; BORGES, A. M.; DÍAZ, J. F. G.; BELETTI, M. E.; OLIVEIRA, L. Z. Sperm head morphometry and chromatin alterations in bulls with different conception rates. **Animal Reproduction Science**, v. 255, art. 107275, 2023. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2023.107275>

ROBERTSON, M. J.; CHAMBERS, C.; SPANNER, E. A.; de GRAAF, S. P.; RICKARD, J. P. The assessment of sperm DNA integrity: implications for assisted reproductive technology fertility outcomes across livestock species. **Biology**, v. 13, n. 7, art. 539, 2024. DOI: <https://doi.org/10.3390/biology13070539>

SALOKHIDDINOVNA, K. Y. Features of sperm development: spermatogenesis and

fertilization. **American Journal of Bioscience and Clinical Integrity**, v. 1, n. 1, p. 1–13, 2024.

Disponível em: <https://biojournals.us/index.php/AJBCI>

SATRIO, F. A.; MAGHFIRA; KARJA, N. W. K. Methods for assessing DNA fragmentation in bovine spermatozoa: a mini-review of Indonesian research. **ARSHI Veterinary Letters**, v. 9, n. 1, p. 29–30, 2025.

DOI: <https://dx.doi.org/10.29244/avl.9.1.29-30>

SOUZA, E. T.; SILVA, C. V.; TRAVENÇOLO, B. A. N.; ALVES, B. G.; BELETTI, M. E. Sperm chromatin alterations in fertile and subfertile bulls. **Reproductive Biology**, v. 18, n. 2, p. 177-181, 2018.

DOI: <https://doi.org/10.1016/j.repbio.2018.04.001>.

SILVA, M. V; ROCHA, L. O; TRAVENÇOLO, B. A. N; GUIMARÃES, E. C; BELETTI, M. E. Methods Used to Assess Bull Sperm Chromatin Integrity and Its Correlation with In Vitro Embryo Production Efficiency. **Veterinary Sciences**, v. 12, n. 2, art. 184, 2025.

DOI: <https://doi.org/10.3390/vetsci12020184>

SRIDHARAN, G.; SHANKAR, A. A. Toluidine blue: A review of its chemistry and clinical utility. **Journal of Oral and Maxillofacial Pathology**, [S. l.], v. 16, n. 2, p. 251-255, 2012.

DOI: <https://doi.org/10.4103/0973-029X.99081>.

UKOGU, O. A.; SMITH, A. D.; DEVENICA, L. M.; BEDIAKO, H.; McMILLAN, R. B.; MA, Y.; BALAJI, A.; SCHWAB, R. D.; ANWAR, S.; DASGUPTA, M.; CARTER, A. R. Protamine loops DNA in multiple steps. **Nucleic Acids Research**, v. 48, n. 11, p. 6108–6119, 2020.

DOI: 10.1093/nar/gkaa365

VIEYTES, A. L.; CISALE, H. O.; FERRARI, M. R. Relationship between the nuclear morphology of the sperm of 10 bulls and their fertility. **Veterinary Record**, v. 163, n. 21, p. 625–629, 2008.