UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA

COMPACTAÇÃO DA CROMATINA E MORFOMETRIA DE ESPERMATOZOIDES BOVINOS SELECIONADOS E CAPACITADOS

Marília Nogueira da Gama Campos

Médica Veterinária

UBERLÂNDIA – MINAS GERAIS – BRASIL

2010

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA

COMPACTAÇÃO DA CROMATINA E MORFOMETRIA DE ESPERMATOZOIDES BOVINOS SELECIONADOS E CAPACITADOS

Marília Nogueira da Gama Campos

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Emílio Beletti

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Uberlândia, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Ciências Veterinárias.

Área de concentração: Produção Animal
Linha de Pesquisa: Biotécnicas e Eficiências Reprodutivas

UBERLÂNDIA – MINAS GERAIS – BRASIL
Setembro 2010

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

C198c Campos, Marília Nogueira da Gama, 1983-
Compactação da cromatina e morfometria de espermatozóides bovinos selecionados e capacitados [manuscrito] / Marília Nogueira da Gama Campos. - 2010.
55 f. : il.

Orientador: Marcelo Emílio Beletti.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias.
Inclui bibliografia.
1. Bovino - Reprodução - Teses. 2. Reprodução animal - Teses. I. Beletti, Marcelo Emílio. II. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias. III.Título.

CDU: 636.2.082.4

Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias – Produção Animal – Faculdade de Medicina Veterinária – Universidade Federal de Uberlândia

Dissertação defendida e aprovada em 13 de setembro de 2010, pela comissão examinadora constituída por:

_____
Prof. Dr. Marcelo Emílio Beletti

_____
Prof. Dr. José Octavio Jacomini

_____
Prof. Dr. Maria Lúcia Gambarini Meirinhos

_____
Prof. Dr. André Luiz Quagliatto Santos
Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias

Não há lugar para a sabedoria

onde não há paciência.

Santo Agostinho

Aos meus pais Marcus, Rita e minha irmã Cilene que me ensinaram a importância do estudo e da perseverança com seus exemplos.

Ao meu amor, minha paz e meu marido Vinícius que me dá a serenidade necessária para que eu não esqueça tudo o que eles me ensinaram.

Com amor,dedico

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Universidade Federal de Uberlândia e ao Programa de Pós Graduação em Ciências Veterinárias da Faculdade de Medicina Veterinária por abrir suas portas e proporcionar o aprimoramento profissional de inúmeros alunos.

Ao meu orientador Prof. Dr. Marcelo Emílio Beletti por ser um exemplo como professor e pesquisador e proporcionar meu amadurecimento profissional.

Ao Prof. Dr. José Octavio Jacomini por todos os ensinamentos, companhia nas coletas de sêmen e por aceitar e participar desta banca de defesa.

As Prof(as). Dr(as). Maria Lúcia Gambarini Meirinhos, Ricarda Maria Santos e Teresinha Inês de Assumpção por aceitar e gentilmente participar da banca de defesa desta dissertação.

Aos professores e colegas do Laboratório de Reprodução Animal Dr. Jacomini, Dra. Ricarda, Dra.Teresinha, Msc. Benner, mestrandas Kele e Carina pela convivência, amizade e conselhos.

Aos colegas graduandos Guilherme e Moline pelo auxilio na realização deste trabalho.

Aos técnicos do laboratório de histologia Rui, Fabrício, Marcelo, Mariane pelo auxílio técnico e bons momentos.

A minha família: meu pai Marcus, minha mãe Rita, minha irmã Cilene, meu cunhado Bruno, meu marido Vinícius e Gepeto por incentivar, apoiar e acreditar.

Aos colegas de profissão e amigos do coração: Paula, Filipe e Anderson por me fazerem companhia mesmo a quilômetros de distância.

Aos colegas de mestrado pela acolhida e bons momentos durante as disciplinas as quais fizemos juntos.

A todos que não foram aqui mencionados, mas que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho, meus sinceros agradecimentos.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO 12

2. REVISÃO DE LITERATURA 14

2.1 O espermatozoide 14

2.2 Espermatogênese 15

2.2.1 Espermatocitogênese 16

2.2.2 Espermiogênese 16

2.3 Compactação da Cromatina 17

2.4 Avaliação espermática 19

2.4.1 Avaliação da compactação da cromatina espermática 20

2.5 Avaliação da morfologia e morfometria de espermatozoides bovinos 21

2.6 Métodos de preparação e seleção espermática 22

2.7 Capacitação Espermática 25

3. MATERIAL E MÉTODO 27

3.1 Local 27

3.2 Amostras de sêmen 27

3.4 Preparação e seleção do sêmen por Gradiente de Densidade 27

3.5 Preparação e seleção do sêmen por “swim-up” 28

3.6 Capacitação in vitro 28

3.7 Metacromasia induzida por coloração com Azul de Toluidina e obtenção de imagens 29

3.8 Análise de imagem computadorizada e avaliação da compactação cromatínica espermática 30

3.9 Análise Estatística 31

4.0 RESULTADOS 32

5.0 DISCUSSÃO 40

REFERÊNCIAS 40

COMPACTAÇÃO DA CROMATINA E MORFOMETRIA DE ESPERMATOZOIDES BOVINOS SELECIONADOS E CAPACITADOS

RESUMO – Com o intuito de melhorar a eficiência na obtenção de embriões viáveis em processos de fertilização *in vitro*, métodos de seleção e concentração de espermatozóides são utilizados. No entanto, pouco se sabe sobre a ação destes métodos sobre a compactação da cromatina e a morfometria da cabeça dos espermatozóides. Da mesma forma o efeito da capacitação espermática *in vitro* sobre essas características espermáticas é controverso. No presente estudo avaliou-se a ação da seleção de espermatozóides por gradiente de Percoll e "swim-up" e da capacitação espermática *in vitro* por heparina sobre a compactação da cromatina e a morfometria da cabeça de espermatozóides bovinos. Dezoito amostras de sêmen foram submetidas aos dois métodos de seleção e posterior capacitação. Esfregaços foram confeccionados em todas as etapas e corados pelo método de metacromasia induzida por azul de toluidina (AT). As imagens digitalizadas obtidas foram processadas em programas desenvolvidos em ambiente SCILAB. Observou-se que após a seleção por gradiente de Percoll e "swim up" os espermatozoides tendem a possuir cromatina mais frouxa e mais heterogênea. O método "swim up" selecionou cabeças mais simétricas, menores e com menor variação no tamanho quando comparadas a mesma amostra de sêmen anteriormente à seleção. Após a capacitação induzida por heparina os espermatozoides apresentaram cromatina mais frouxa e leve alteração da forma da cabeça.

Palavras-chave: azul de toluidina, condensação, gradiente de Percoll, heparina, swim-up

CHROMATIN CONDENSATION AND MORPHOMETRIC FEATURES OF SELECTED AND CAPACITATED BOVINE SPERMATOZOA

ABSTRACT – Aiming to improve the efficiency in obtaining viable embryos in *in vitro* fertilization procedures, sperm selection and concentration methods are used. However little is known about the action of these methods on the chromatin condensation and sperm head morphometry. Likewise the effect of sperm in vitro capacitation on these characteristics is controversial. This study evaluated the effect of sperm selection by Percoll gradient, "swim-up" procedure and sperm capacitation *in vitro* by heparin on chromatin condensation and sperm head morphometry of cattle. Eighteen semen samples were subjected to both methods of selection and subsequent capacitation tests. Smears were made at every stage and stained by the metachromasia method induced by toluidine blue (AT). The scanned images were processed in software developed in an SCILAB environment. It was observed that after selection by gradient of Percoll and "swim up" the sperm tend to have looser and more heterogeneous chromatin. The "swim up" method selected heads more symmetrical, smoller and with less size variation when compared to the same semen sample prior to selection. After heparin-induced capacitation the spermatozoa presented looser crhomatin and slight change of the head.

Key words: toluidine-blue, condensation, Percoll gradient, heparin, “swim-up”

1. INTRODUÇÃO

Um importante objetivo das análises de sêmen modernas é elucidar os caminhos moleculares das lesões estruturais da cromatina espermática que levam às anormalidades no processo de fertilização, na formação pronuclear, na qualidade embrionária inicial e nas taxas de concepção (EVENSON, 1999). Espermatozoides com lesões no DNA permanecem com a capacidade de fertilizar, mas o desenvolvimento embrionário subsequente torna-se comprometido (PÉREZ-CRESPO *et al*., 2008).

O espermograma é, frequentemente, considerado a melhor forma de avaliação da habilidade reprodutiva de touros. No entanto, esta análise é realizada por inspeção visual do examinador, conferindo certo grau de subjetividade e mesmo tendenciosidade ao resultado. A utilização da avaliação computacional tem sido considerada uma boa ferramenta para reduzir esses vieses no que se refere à motilidade e morfologia (BELETTI *et al*., 2005).

Hoje há considerável quantidade de métodos disponíveis para avaliar a estabilidade da cromatina espermática. Contudo poucos permitem a avaliação morfométrica concomitantemente à caracterização da cromatina espermática. A análise de imagem computacional de esfregaços de sêmen corados com azul de toluidina permite associar as duas avaliações. Este método de “metacromasia induzida” desenvolvido por Mello (1982) consiste no tratamento ácido do esfregaço seguido por coloração com azul de toluidina. Enquanto espermatozoides normais apresentam variações de tons do verde, aqueles com anormalidades na cromatina geralmente apresentam tonalidades que variam de azul escuro ao magenta (BELETTI, MELLO, 2004).

Métodos de seleção e concentração de espermatozoides móveis podem melhorar a qualidade do sêmen, recrutando espermatozoides com altas taxas de motilidade e morfologicamente normais (SAMARDZIJA *et al*., 2006), melhorando procedimentos de fertilização. Esta seleção ainda remove plasma seminal, agentes crioprotetores, debris e outros materiais (ZAVOS, 1992) enquanto inicia a capacitação dos espermatozoides (CENTOLA *et al*.,1998). As técnicas mais utilizadas para seleção de espermatozoides móveis são Filtração, Gradiente de Percoll e Swim-up (PERSON *et al*., 2007). Apesar de muitos estudos terem sido publicados relacionados à efetividade de diferentes métodos

de preparação do sêmen, não há evidências suficientes para que se recomende uma técnica específica (BOOMSMA et al., 2004; RICCI et al., 2009).

De acordo com Mendes Jr (2003) o método de seleção por Gradiente de Percoll recupera maior número de espermatozóides, mas a seleção por Swim-up seleciona os melhores. CESARI *et al*. (2006) observaram maior perda de acrossomas em células selecionadas pelo primeiro em comparação ao segundo. Assim como os separados pelo Gradiente de Percoll apresentaram maior motilidade espermática e maior produção de embriões, apesar do percentual de clivagem ser semelhante entre as técnicas. O uso da técnica de Gradiente de Percoll aumentou a proporção de espermatozóides móveis, como avaliaram Machado *et al*. (2009), contudo não houve efeito significativo para as demais características do esperma. Da mesma forma, as taxas de clivagem e formação de blastocistos não foram afetadas.

A capacitação do espermatozóide é definida como alterações fisiológicas que conferem ao espermatozóide de mamíferos a capacidade de fertilizar ovócitos homólogos (CHANG, 1951; AUSTIN, 1952). Porém ainda não é conhecido se este evento tem algum efeito sobre a cromatina e a morfometria da cabeça dos espermatozóides, uma vez que os diversos tratamentos realizados com o sêmen antes da PIV (produção in vitro) fazem com que as células sofram constantes alterações de osmolaridade e pH (LU, SEIDEL, 2004).

Alguns detalhes da influência da seleção de espermatozóides e da capacitação espermática *in vitro* sobre a qualidade final dos espermatozóides são conhecidos, porém pouco se sabe sobre seus efeitos na compactação cromatínica e na morfometria espermática.

O objetivo do presente estudo foi avaliar a ação da seleção de espermatozóides por gradiente de Percoll e “swim-up” e da capacitação espermática por heparina sobre a compactação da cromatina e a morfometria da cabeça de espermatozóides bovinos.

2. REVISÃO DE LITERATURA

Dados a respeito da estabilidade da cromatina em espermatozoides de mamíferos tem se modificado progressivamente nos últimos anos. A união de conhecimentos já consolidados com novos métodos de avaliação espermática, abre novas perspectivas para a atuação da pesquisa e avaliação de resultados.

2.1 O espermatozoide

Como descrito por Eddy (2006) o espermatozoide é o produto final do processo denominado espermatogênese, o qual resulta em uma célula altamente diferenciada em sua estrutura e função, capaz de combinar-se com um ovócito homólogo e iniciar uma nova geração. Os dois principais componentes do espermatozoide são a cabeça e a cauda, conectados pela peça conectora ou pescoço. A cabeça contém o núcleo, acrossoma, estruturas do citoesqueleto e uma pequena quantidade de citoplasma. Partindo do pescoço, a cauda é dividida sucessivamente em peça intermediária, peça principal e peça terminal, onde uma formação central complexa de microtúbulos denominada axonema é cercada por fibras densas, desde o pescoço até a peça principal. Uma hélice de mitocôndrias envolve fortemente estas fibras densas, assim como o axonema na região da peça intermediária (Figura 1).

Enquanto a maioria dos espermatozoides mamíferos possuem estas características gerais, existem diferenças espécie específicas no tamanho e formato das cabeças, comprimento e componentes flagelares. As estruturas especializadas dos espermatozoides de mamíferos são essenciais para a entrega do material genético masculino à célula haplóide feminina, onde os pró-nucleos formarão o zigoto e iniciarão o desenvolvimento embrionário. O acrossoma, por exemplo, contém enzimas necessárias para penetrar no ovócito e atingir a fertilização, enquanto o flagelo contém a fonte energética e maquinaria para gerar a motilidade necessária afim de que o espermatozoide alcance seu objetivo. Além disso, na maioria dos mamíferos o sexo cromossomal do núcleo espermático haplóide determina o sexo do animal resultante (Oliver 1895).

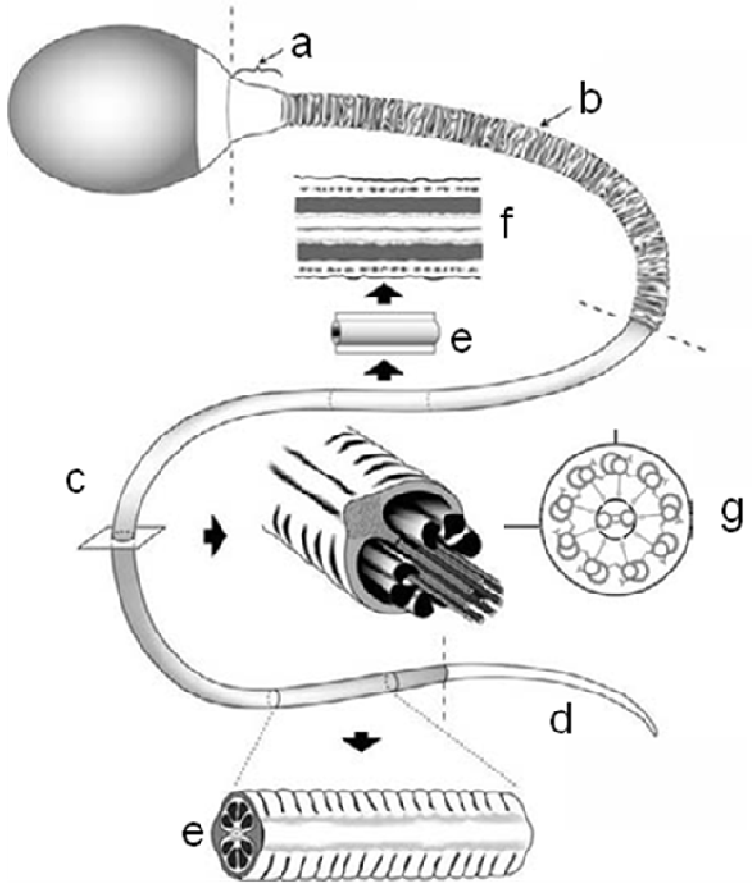

Figura 1 – Caracteristicas gerais dos espermatozoides de mamíferos. A cabeça conectada a cauda pela peça conectora (a). Regiões flagelares: peça intermediária (b), peça principal (c), peça terminal (d), conjunto de fibras densas (e), envoltório de mitocôndrias (f), formação central complesa de microtúbulos denominada axonema (g) (EDDY, 2006).

2.2 Espermatogênese

Entende-se por espermatogênese o processo de diferenciação celular contínua que ocorre em mamíferos (BELLVÉ *et al*., 1977a) e culmina na formação do gameta masculino. Procede em três fases principais: renovação celular e proliferação de espermatogônias através de mitoses, meiose e espermiogenese (BELLVÉ *et al*., 1977b). As duas primeiras fases são conhecidas como *espermatocitogênese*. Já a *espermiogênese* compreende as modificações metamórficas, estruturais e de desenvolvimento celulares (HAFEZ, 2004). Este processo advém no epitélio seminífero,

que forma o maior compartimento testicular, sendo composto por dois tipos celulares básicos: as células germinativas em desenvolvimento intercaladas às células de suporte de Sertoli (BELLVÉ *et al*., 1977; HAFEZ, 2004). A complexidade do epitélio seminífero consiste no fato de que a citocinese não se completa a cada mitose sucessiva ou divisões meioticas. Logo as células em diferentes estágios de desenvolvimento permanecem como em sincícios, nos quais são interconectadas por pontes citoplasmáticas (FAWCETT, 1959).

2.2.1 Espermatocitogênese

Células germinativas ou espermatogônias sofrem diversas divisões celulares e modificações de desenvolvimento ao longo do epitélio seminífero, progredindo em direção ao lúmen tubular (DYM, FAWCETT, 1970). De acordo com Roosen-Rung (1952), por meio de mitoses estas células tanto se renovam como proliferam. Na sequência aparecem outros tipos, como as espermatogônias A, intermediárias e B. As tipo B formam os espermatócitos primários após iniciarem a divisão meiótica. Estes terminam a primeira divisão meiótica formando os espermatócitos secundários, que ao concluírem a meiose, originam células haplóides, as quais recebem o nome de espermátidas (BELLVÉ *et al*., 1977; HAFEZ, 2004). Na espécie bovina são necessários em média 45 dias para a conclusão desta fase (HAFEZ, 2004).

2.2.2 Espermiogênese

Modificações morfológicas marcam esta etapa, incluindo condensação da cromatina nuclear, formação da cauda do espermatozoide ou aparelho flagelar e desenvolvimento do capuchão. Segundo Hafez (2004) com a coalescência de grânulos proacrossomáticos dentro do aparelho de Golgi e aderência de um fino saco membranoso ao envelope nuclear, inicia-se a formação do acrossoma que distriui estes grânulos sobre a superfície do núcleo das espermátides. A alongação de componentes da cauda (axonema) inicia a formação do aparelho flagelar.

Conforme reportado por Ross (1976), durante a meiose e inicio da espermiogênese, as células permanecem cercadas por processos interdigitais citoplasmáticos provenientes das laterais das células de Sertoli. À medida que a diferenciação ocorre, os espermatócitos e novas espermátides são gradualmente desalojados em direção ao lúmen dos túbulos seminíferos até que, durante o final da espermiogênese, as espermátides permanecem dentro de dobras profundas do citoplasma apical das células de Sertoli.

Durante a espermiogênese em bovinos, as histonas (proteínas nucleares) são substituidas por proteínas ricas em cisteína e arginina, a qual compacta o DNA firmemente (GLEDHILL *et al*., 1966; MELLO, 1982), dentro de densos grânulos e possibilita mudanças em seu formato. A célula torna-se mais alongada e achatada perdendo seu aspecto esferoidal (HAFEZ, 2004). A espermiogênese culmina com a excisão do corpo residual e a espermiação com a liberação do espermatozoide ao lúmen dos túbulos seminíferos (BELLVÉ, 1977b).

2.3 Compactação da Cromatina

Durante a espermiogênese a cromatina haplóide passa por uma das mais significativas mudanças conhecidas na biologia. Proteínas nucleares básicas, as histonas, são substituídas por proteínas de transição e depois por protaminas (MEISTRICH *et al*, 2003), pequenas proteínas básicas ricas em arginina (CHO *et al*, 2003).

O modelo de ligação protamina-DNA foi inicialmente proposto por Balhorn (1982) que apresentou a ligação desta proteína ao sulco menor da fita de DNA. Ao neutralizar completamente as cargas negativas da dupla hélice, é possível que as fitas se encaixem lado a lado, formando um conjunto linear. Estes conjuntos de aproximadamente 50 Kb de DNA são compactados firmemente pelas protaminas em estruturas em formato de rosca, chamados toróides ou “donut”. Os toróides representam a unidade básica da cromatina espermática (Figura 2).

Em núcleos espermáticos de mamíferos a estabilidade da compactação da cromatina é alcançada por pontes covalentes dissulfídicas entre as protaminas intermolecular e intramolecularmente (CHO *et al.*, 2003; WARD, COFFEY, 1991). Cho *et*

al. (2003) demonstram a importância da protamina na estabilidade da compactação, ao evidenciar que pequenas reduções nos níveis de protamina nas células espermáticas resultam em danos no DNA, tornando-o incapaz de transmitir o genoma masculino para a próxima geração.

Além de sua capacidade de gerar um genoma paterno compacto, muitas outras atribuições foram dadas às protaminas como: proteção da mensagem genética às nucleases ou agentes potencialmente mutagênicos dos meios internos e externos, competição e remoção de fatores transcricionais e outras proteínas da espermátide resultando em uma mensagem paterna livre de informações epigenéticas e portanto, permitindo uma nova reprogramação pelo ovócito, envolvimento na reprogramação genética paterna durante a espermatogênese e outras (OLIVA, 2006).

Um segundo nível de arranjo cromatínico é formado com a organização destes toróides fixados a uma mesma estrutura denominada matriz nuclear proteinácea (Figura 2), em locais denominados de Regiões de anexação da matriz (MARs) (SOTOLONGO *et al*., 2003; SHAMAN *et al*., 2007).

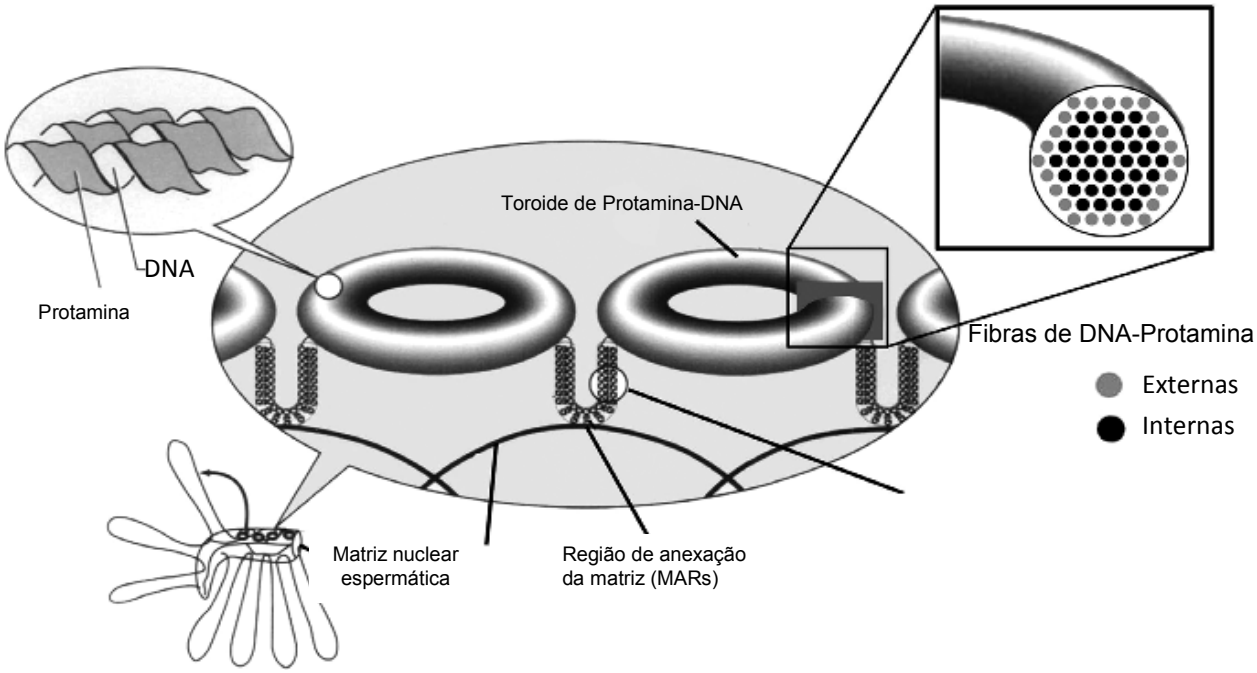

Figura 2 – Modelo estrutural da compactação da cromatina em espermatozoides de mamíferos. Detalhe à esquerda: formação de conjuntos lineares decorrente da ligação protamina-DNA. Detalhe à direita: Fibras de DNA unidas às protaminas dentro do toróide (SHAMAN, 2006).

Devido ao grau de complexidade destes modelos, torna-se evidente que a espermatogênese é apenas parte do processo. A compactação da cromatina espermática e consequente manutenção da integridade do DNA são essenciais para garantir que aquela célula espermática será capaz de fertilizar e suportar o desenvolvimento inicial do zigoto (BELETTI *et al*., 2004).

2.4 Avaliação espermática

A expansão da biotecnologia na área da reprodução animal tem auxiliado sistemas de produções que buscam melhores desempenhos de seus rebanhos. A natureza da infertilidade ou sub-fertilidade masculina é tão ou mais relevante que à feminina, uma vez que o progresso desta ciência relaciona-se com a manipulação e escolha de gametas saudáveis de ambos os sexos. Logo, estudos com modelos bovinos têm adquirido importância no contexto geral da medicina reprodutiva, pois seus resultados podem ser extrapolados para modelos humanos além de oferecer maior número de dados a respeito do tipo de criação, fertilidade e progênie (PEDDINTI *et al*., 2008).

Os padrões para julgamento de sêmen animal para doadores foram aprovados pelo Ministério da Agricultura e Abastecimento (Portaria SDR, número 26 de 05 de setembro de 1996). Para bovinos inicialmente realiza-se uma avaliação andrológica de posição e biometria testicular, epidídimos, palpação de ampolas dos canais deferentes, glândulas vesiculares, pênis e prepúcio. Em seguida se avalia o comportamento sexual do animal de acordo com sua origem (Zebuínos ou Taurinos). Após a escolha do método de coleta de sêmen (vagina-artificial, eletro-ejaculador e massagem de ampola; nesta ordem de eleição) inicia-se a avaliação das características do ejaculado. Estas características englobam volume de sêmen ejaculado, movimento de massa, vigor, número total de espermatozoides, motilidade espermática, porcentagem de espermatozoides normais e número de ejaculados por semana. Exames complementares podem ser realizados como testes de termo-resistência, exames sorológicos e microbiológicos (CBRA, 1998).

Estas análises são superficiais uma vez que anormalidades na condensação da cromatina espermática podem ser encontradas em touros. Fitas de DNA quebradiças

podem ser provocadas em parte, pelo estresse oxidativo e mecanismos apoptóticos. Estes espermatozoides podem vir a fecundar ovócitos *in vivo* e *in vitro* (FATEHI *et al.*, 2006), porém estes defeitos induzirão à apoptose, desnaturação embrionária e aborto (TWIGG, 1998; PÉREZ-CRESPO *et al.*, 2008). Os efeitos potenciais do pai no desenvolvimento embrionário parecem ocorrer no início da fase S no zigoto e após a expressão do genoma do embrião no estágio de 4 à 8 células (EID *et al.*, 1994). Logo testes laboratoriais do sêmen devem incluir avaliações dos atributos necessários para a fertilização e desenvolvimento embrionário, como a integridade do genoma espermático (BELETTI *et al.*, 2004; EVENSON, WIXON, 2006).

2.4.1 Avaliação da compactação da cromatina espermática

Complexos anômalos de DNA-proteína foram inicialmente identificados por Gledhill (1966) em touros subférteis a partir da Reação de Feulgen. Estas alterações nos complexos produziam cromatinas menos compactas que eram mais sensíveis à hidrólise intencional, causando colorações mais intensas nestas cabeças.

A análise da estrutura da cromatina espermática (SCSA) tem sido frequentemente utilizada e é baseada na avaliação de espermatozoides corados com alaranjado de acridina (AA) e avaliados por citômetro de fluxo. Evenson *et al*. (1980) descrevem que a resistência da cromatina espermática nuclear é determinada pela coloração com AA. De acordo com as propriedades metacromáticas do corante, quando intercalado com DNA fita dupla a célula é corada de verde e ao refletir sua ligação eletrostática com os fosfatos livres do DNA (fita simples) a célula fluoresce vermelho. O grau de desnaturação pode ser medido pela variação da fluorescência em comparação com a fluorescência nuclear total.

Este método foi modificado por Tejada *et al*. (1984), que em esfregaços de sêmen humano conseguiram bons resultados na diferenciação de espermatozoides normais e anômalos. Em bovinos esta técnica foi realizada por Beletti e Mello (1996). Os esfregaços foram avaliados em microscópios de fluorescência, o que tornou o método mais barato. Porém uma vez que a fluorescência desaparece com o tempo, esfregaços corados com AA devem ser rapidamente avaliados e não é possível realizar avaliações morfométricas concomitantes à estes métodos.

Um método simples, eficaz e menos oneroso foi desenvolvido por Mello (1982), baseado nas propriedades do azul de toluidina, um corante catiônico que exibe metacromasia; alteração de cor induzida pela ressonância elétrica entre várias moléculas coradas. Quando esfregaços de sêmen são corados em pH 4,0, as moléculas do corante se ligam com fosfatos ionizados do DNA. Este pH é necessário para garantir que outros locais de ligação, outros anions, não existam.

No espermatozoide normal, a cromatina se encontra compacta e a maioria dos fosfatos se encontra ligados às protaminas, resultando em uma coloração do verde ao azul–claro. Espermatozoides com cromatina mais frouxa permitem ligação de mais moléculas do corante resultando uma coloração de azul-escuro à magenta. Submeter os esfregaços à hidrólise antes de corá-los aumenta a sensibilidade deste teste, uma vez que extrai proteínas nucleares de cromatinas mal compactadas, expondo os fosfatos livres do DNA e promovendo mais sítios de ligação ao corante. Variações na coloração podem ser avaliadas por analise de imagem computacional eliminando a subjetividade inerente à outros métodos (BELETTI *et al*., 2004; ERENPREISS *et al*., 2004).

2.5 Avaliação da morfologia e morfometria de espermatozoides bovinos

Avaliações seminais possuem a finalidade de diferenciar ejaculados de alta e baixa qualidade ou suspeitos de sub-fetilidade. Considerando que as cabeças dos espermatozóides de mamíferos são compostas quase que inteiramente de cromatina, acredita-se que seu formato deva estar relacionado com seu conteúdo e compactação do DNA (SAILER *et al*., 1996; OSTERMEIER *et al*., 2001a; BELETTI, MELLO, 2004).

Sabe-se que existem correlações significantes entre anormalidades de cromatina e alterações morfológicas (SAILER *et al*., 1996; OSTERMEIER *et al*., 2001a), e estas diminuem as taxas de fertilização. Somente espermatozóides viáveis, ou seja, sem alterações morfológicas que prejudiquem suas propriedades hidrodinâmicas inclusive sua progressão retilínia, são capazes de interagir com o ovócito (WALTERS *et al*., 2004; KAWAI *et al*., 2006).

No entanto as análises das características morfométricas de espermatozoides geralmente são feitas de forma subjetiva, por métodos de baixa acurácia e repetibilidade (OSTERMEIER *et al*., 2001b). Métodos de avaliação por análise de imagem

computacional podem fornecer dados mais objetivos da motilidade celular e anormalidades morfológicas (SAILER *et al*., 1996; BELETTI *et al*., 2005b). Uma vez que a maioria dos métodos desenvolvidos é aplicada em espermatozoides de humanos viu-se a necessidade de desenvolver novas metodologias que envolvessem medidas morfométricas espécie-independente (GRAVANCE *et al*., 1999; BELETTI, COSTA, 2003).

As análises computacionais geralmente compreendem medidas como: área da cabeça, perímetro, comprimento, largura. (SAILER *et al*., 1996), bem como fatores derivados destas medidas: razão largura/ comprimento, elipsidade, fator forma, simetria lateral, simetria antero-posterior (BELETTI, COSTA, 2003). Para avaliar não somente modificações de tamanho, mas também alterações de forma, utilizam-se as harmônicas de Fourier que medem a curvatura do perímetro (OSTERMEIER *et al*., 2001b). Acredita-se que anormalidades de cromatina ou danos no DNA resultem em alterações mínimas na morfologia da cabeça de espermatozoides e que as harmônicas de Fourier seriam capazes de detectar estas pequenas alterações, podendo funcionar como indicador de fertilidade (OSTERMEIER *et al*., 2001a).

O grupo de pesquisa *Cybernetic Vision* do Intituto de Física/São Carlos da Universidade de São Paulo, em colaboração com o grupo *Reprodução e Análise de Imagem* do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade Federal de Uberlândia (UFU), criaram programas em ambiente *Scilab*, para análise morfométrica de espermatozóides espécie-independente, concomitante com avaliação da estabilidade da cromatina espermática pelo método de coloração por azul de toluidina (BELETTI, COSTA, 2003; BELETTI *et al*., 2004; BELETTI *et al*., 2005a).

2.6 Métodos de preparação e seleção espermática

Em 1970 surgiram as primeiras incursões na produção *in vitro* de embriões (PIVE) no que concerne aos animais de produção. Já no início de 1980 constatava-se o nascimento do primeiro bovino. A partir da possibilidade de viabilizar todo o processo de fertilização artificialmente, a PIVE tem recebido grande impulso, seja por suas potenciais aplicações para as espécies humana e animais, bem como utilidade para as ciências básicas e aplicadas (GONÇALVES *et al*., 2008).

A manipulação e escolha de gametas de ambos os sexos faz parte da rotina da PIVE. Para isso é necessário estabelecer metodologias que priorizem a manutenção das estruturas nucleares espermáticas, uma vez que predeterminam o sucesso dos estágios inicias de desenvolvimento do embrião, em virtude de suas contribuições genéticas e epigenéticas (WALTERS *et al*., 2004).

A técnica ideal para separação espermática deve ser rápida, simples, de baixo custo, capaz de recuperar a maioria dos espermatozoides móveis, não resultar em alterações espermáticas, remover espermatozoides mortos e outras células, incluindo microorganismos, remover substâncias bioativas e tóxicas (como crioprotetores, fatores decapacitantes, radicais livres), permitir o processamento de grandes volumes de sêmen, além de permitir o controle da concentração final da suspensão espermática (HENKELL, SCHILL, 2003; GONÇALVES *et al*., 2008).

Sugere-se que técnicas de preparação do sêmen envolvendo centrifugações podem ser tóxicas às células, pois estimulam a produção e liberação de radicais livres (ROS) pelos espermatozoides e leucócitos seminais, induzindo danos ao DNA. Por outro lado técnicas delicadas como a seleção por gradiente de Percoll e método de migração ascendente (swim up) recuperam células com o mínimo de disfunções (ZINI *et al*., 2000; AITKEN, CLARKSON, 1988). Logo para propósitos de fecundação *in vitro* estas são as técnicas mais utilizadas (SOMFAI *et al*., 2002; RHEINGANTZ *et al*., 2002; PERSON *et al*., 2007).

O método de “swim up” utiliza a característica espermática de se deslocar contra forças que o pressione. Logo, a pressão exercida pela força da gravidade na coluna de meio onde os espermatozoides se encontram, faz com que os viáveis se desloquem contra e permaneçam na superfície da coluna (MENDES JR *et al*., 2003). O meio utilizado deve ser apropriado, geralmente o Tyrode com albumina, lactato e piruvato (TALP) (MATSUYAMA *et al*., 1993). Durante a migração ascendente dos espermatozoides através do meio, ocorre a remoção dos fatores de decapacitação, diluentes e crioprotetores (SHAMSUDDIN *et al*., 1993; SHAMSUDDIN, RODRIGUEZ-MARTINEZ, 1994).

Percoll® (GE Healthcare, Upsalla, Suécia) é um meio para centrifugação de células, vírus e partículas subcelulares por gradiente de densidade. É composto por partículas de sílica coloidais (15-30nm de diâmetro), não dialisáveis, cobertas com

polivinilpirolidona (PVP) (RODRIGUEZ-MARTINEZ *et al*., 1997; SAMARDZIJA *et al*., 2006). O método de gradiente de Percoll consiste na deposição dos espermatozoides sobre duas ou mais camadas deste meio em diferentes concentrações. Apesar de seu mecanismo de ação não ser completamente esclarecido, acredita-se que a centrifugação por Percoll® separe as estruturas de acordo com densidades, selecionando espermatozoides com morfologia nuclear mais densa (PRAKASH *et al*., 1998).

Inúmeros estudos em diferentes espécies animais têm sido desenvolvidos: bovinos (MENDES JR *et al*., 2003; SUZUKI *et al*., 2003; CESARI *et al*., 2006; RICCI *et al*., 2009), equinos (MORRELL *et al*., 2009), búfalos (MEHMOOD *et al*., 2009) entre outros, com o intuito de definir qual método atende a mais pré-requisitos, podendo tornar-se o de eleição.

Avaliações com diferentes enfoques são realizadas a fim de padronizar os efeitos de cada um dos métodos. Em relação à preparação e seleção por gradiente de Percoll admite-se que há separação satisfatória das células espermáticas e de material estranho como soluções extensoras, células e bactérias (WALTERS *et al*., 2004; SAMARDŽIJA *et al*., 2006) além de recuperar maior número de espermatozoides (MENDES JR *et al*., 2003). Porcentagens maiores de células com acrossoma intacto foram encontradas em sêmen selecionado por este método (BRANDEIS, MANUEL, 1993), pois a exposição ao Percoll protege as células de produções excessivas de radicais livres, os quais causam disfunções de membrana relacionadas com peroxidação de seus lipídios (OOSTERHUIS *et al*., 2000). Cesari *et al*. (2006) discordam destes resultados, pois encontraram maior perda de acrossomas nas mesmas condições. Amostras de sêmen submetidas a este tratamento apresentaram maior motilidade espermática (YAO *et al*., 1996; CESARI et al., 2006) e maior produção de embriões. No entanto o percentual de clivagem é semelhante entre as técnicas de acordo com Cesari *et al*. (2006).

O método de “swim up” seleciona os melhores espermatozoides (MENDES JR *et al*., 2003) e preferencialmente os de ótima motilidade (BRANDEIS, MANUEL, 1993). Recruta uma porcentagem menor de espermatozoides viáveis (10-20% das amostras originais), ou seja, sem anormalidades significativamente maiores em comparação com o outro método de seleção (WALTERS *et al*., 2004; RICCI *et al*., 2009). Porém outros autores observaram taxas de clivagem superiores após a fecundação in vitro (FIV) com

sêmen selecionado por este método, em relação à outros métodos de seleção (PARRISH *et al*., 1995; RHEINGANTZ *et al*., 2002).

Ambos os métodos produzem efeitos comparáveis em defeitos específicos como de cabeça, peça intermediária e anormalidades de cauda. No entanto, o método com Percoll® tem demonstrado maior habilidade que o método de “swim up” em concentrar espermatozoides morfologicamente normais (SAMARDŽIJA *et al*., 2006), promovendo melhoras de 20% na média qualitativa da morfologia dos espermatozoides normais. De acordo com Prakash (1998) e Somfai (2002), este fato confirma a capacidade do Percoll® em converter populações heterogêneas em homogêneas.

As evidências são insuficientes para que se recomende uma técnica específica (BOOMSMA *et al*., 2004; RICCI *et al*., 2009; MACHADO *et al*., 2009), principalmente porque não há dados que esclareçam o recrutamento de espermatozoides, por estes métodos de seleção, em relação à manutenção de suas estruturas nucleares e compactação da cromatina.

2.7 Capacitação Espermática

Em meados dos anos 50 Chang e Austin observaram que os espermatozoides de mamíferos em sêmen recém ejaculado não possuíam a habilidade de fertilizar *in vivo*. Era necessária a permanência no trato genital feminino para que completassem o processo de maturação, posteriormente definido como capacitação (BARROS, 1968).

A capacitação envolve a exocitose de enzimas que possibilitam a penetração na zona pelúcida e a aquisição de propriedades pela membrana da cabeça do espermatozoide que permitam sua fusão com o ovócito (YANAGIMACHI, 2006). Ocorrem mudanças no padrão de movimentação do flagelo que passa de movimentos de motilidade progressiva com curvaturas de pequena amplitude, para movimentos de curvatura da cauda de grande amplitude. O que caracteriza a hiperativação do espermatozoide, necessária para sua movimentação pelo epitélio do oviduto e penetração na zona pelúcida (FRASER, 1998; DEMOTT, SUAREZ, 1992; KATZ *et al*., 1978). Este processo envolve também a reorganização de proteínas e lipídios de membrana e

modificações na atividade metabólica que culminam com a reação acrossomal (HAFEZ, 2004; ASSUMPÇÃO *et al*., 2002).

Para que aconteçam estas mudanças bioquímicas e estruturais são necessários eventos como dessorção de macromoléculas para a superfície espermática, modificações iônicas, aceleração dos ciclos da adenil-ciclase e proteína quinase A, distribuição de fosfolipídios pela membrana plasmática e fosforilações proteicas (principalmente em capacitações *in vitro* (FLORMAN, DUCIBELLA, 2006).

Alguns íons são imprescindíveis para o processo. Estudos têm demonstrado que o processo de capacitação é bicarbonato-dependente (GADELLA, HARRISON, 2000; GADELLA, VISCONTI, 2006). Presente no trato reprodutivo feminino *in vivo*, acredita-se que sua contribuição seja na regulação do pH e principalmente na regulação da atividade da adenil-ciclase, a enzima responsável pela síntese de Camp. Outra modificação iônica ocorre com um grande influxo do íon Ca^{2+} e hiperpolarização do potencial de membrana. O cálcio também se associa com as mudanças de motilidade (FLORMAN, DUCIBELLA, 2006; GADELLA, VISCONTI, 2006). Outros íons como sódio (Na^{+}) e potássio (K^{+}) também estão envolvidos.

Para que ocorra a fecundação dos ovócitos é preciso que os espermatozoides entrem em contato com a zona pelúcida previamente capacitados, de forma que sejam capazes de responder aos seus estímulos e sofram a reação acrossomal (YANG, JIANG, FOOTE, 1993; ASSUMPÇÃO *et al*., 2002). Muitos estudos têm demonstrado que a capacitação *in vitro* pode ser realizada adicionando-se agentes capacitadores ao meio, como o glicosaminoglicano heparina, onde os espermatozoides permanecerão antes da fertilização. O mecanismo ainda não é conhecido por completo, mas parece estar envolvido com o desencadeamento de mudanças bioquímicas na membrana plasmática dos espermatozoides (GOLÇALVES *et al*., 2008; BLONDIN, 2009) .

Muitos avanços foram feitos nos últimos anos a respeito dos processos envolvidos na capacitação espermática, mas as bases moleculares deste fenômeno ainda não são bem entendidas. Em vista de todas as transformações as quais as células espermáticas passam durante este evento, dados são necessários para maiores esclarecimentos a respeito das consequências para a morfometria e compactação da cromatina espermática.

3. MATERIAL E MÉTODO

3.1 Local

O experimento foi realizado nos laboratórios do setor de Citologia, Histologia e Embriologia do Instituto de Ciências Biomédicas e na Fazenda do Glória da Universidade Federal de Uberlândia (UFU), no período de maio a novembro de 2009.

3.2 Amostras de sêmen

Foram coletadas 18 amostras de sêmen por meio de vagina artificial de touros mestiços (*Bos indicus x Bos taurus*) de fertilidade desconhecida, utilizados em cobertura natural na Fazenda do Glória. As coletas foram realizadas em intervalos de uma semana.

As amostras foram transportadas do local de coleta até o laboratório, em intervalos menores que duas horas, resfriadas a 4ºC. Foram incubadas em estufa a 39ºC, 5% de CO_2 e máxima umidade por 30 minutos. Uma gota de todas as amostras de sêmen fresco foi utilizada para se obter dois esfregaços, os quais foram fixados em etanol-ácido acético 3:1 por um minuto e etanol 70% por mais três minutos, sendo posteriormente secos em temperatura ambiente.

3.4 Preparação e seleção do sêmen por Gradiente de Densidade

A obtenção do gradiente de Percoll foi de acordo com o protocolo estabelecido por Parrish (1995) com modificações, colocando-se em tubos Falcon cônicos de 15ml, 2000 µL de solução isotônica de Percoll à concentração de 45% cuidadosamente sobre 2000µL de solução isotônica de Percoll a 90% (Nutricell, Campinas) sem permitir homogeneização entre as duas soluções. Todos os meios foram previamente estabilizados em estufa a 39ºC, 5% de CO_2 e máxima umidade, por no mínimo 60

minutos. De cada amostra foram retirados 500µL de sêmen e colocados cuidadosamente sobre o gradiente, os quais foram submetidos à centrifugação por cinco minutos a 500xg. Retirou-se o sobrenadante e o pellet foi ressuspendido em 1500µl de meio SP-TALP (Nutricell, Campinas) seguindo para nova centrifugação a 200xg por sete minutos. O sedimento final foi ressuspendido em meio de fecundação (Nutricell, Campinas) como será esclarecido no processo de capacitação *in vitro* (item 3.6). Dois esfregaços foram obtidos desta solução e foram fixados pelo mesmo processo dos esfregaços de sêmen fresco.

3.5 Preparação e seleção do sêmen por "swim-up"

Trezentos microlitros de cada amostra de sêmen foram colocados em tubos falcon cônicos de 15mL, cuidadosamente cobertos com 500 µL de meio SP-TALP (Nutricell, Campinas) e incubados por uma hora em estufa à 39ºC, 5% de CO_2 e máxima umidade. Retirou-se 200 µL de sobrenandante contendo os espermatozoides selecionados, de forma a não permitir que outros componentes do sêmen que permaneceram no fundo do tubo entrassem em contato com o material aspirado. Foi utilizada uma pequena aliquota para fazer dois esfregaços. O restante do sobrenandante foi utilizado para os testes de capacitação (item 3.6).

3.6 Capacitação *in vitro*

A contagem de espermatozoides foi realizada em Câmara de Newbauer para determinação da concentração de cada amostra. Tubos falcon cônicos de 15mL foram preparados para receber as soluções finais dos processos de seleção. Seguindo as recomedações feitas pelo fabricante (Nutricell, Campinas) das proporções a serem utilizadas de meio de fecundação em relação à heparina e o PHE (0,045ml de PHE:1ml de meio e 0,012ml de Heparina:1ml de meio), a cada 400 µL de meio de fecundação adicionaram–se 5 µL do agente capacitante heparina e 20 µL de PHE (Penicilina, Hipotaurina e Epinefrina). De acordo com a concentração obtida, foram colocados aproximadamente um milhão de espermatozóides por tubo, os quais foram devidamente

identificados e colocados em estufa à 39ºC, 5% de CO_2 e máxima umidade por um período de 20 horas. Após este período, uma gota referente a cada amostra foi retirada para a obtenção de dois esfregaços, os quais foram fixados pelo mesmo processo dos anteriores.

3.7 Metacromasia induzida por coloração com Azul de Toluidina e obtenção de imagens

Todos os esfregaços passaram por hidrólise em ácido clorídrico 4N por 20 minutos e foram lavados em água destilada. Após secagem, foi colocada uma gota de azul de toluidina 0,025%, pH 4,0 em tampão ácido cítrico-fosfato de sódio (tampão McIlvaine) sobre a lâmina do esfregaço, a qual foi imediatamente coberta com uma lamínula (BELETTI, COSTA, 2003; BELETTI, MELLO, 2004; SILVA *et al*., 2008).

Passados três minutos, foram capturadas 50 imagens digitais de cada lâmina (Figura 4), usando-se microscópio de luz Olympus BX40 com objetiva de 100x (imersão), acoplado a uma câmera Olympus OLY-200 e conectada a um microcomputador PC através de placa digitalizadora Data Translation 3153. As imagens digitais foram usadas para segmentar por limiarização (thresholding) 100 cabeças de espermatozóides em tons de cinza (Figura 4), de cada lâmina (BELETTI *et al*., 2005 a,b; SILVA *et al*., 2008). O programa utilizado para a segmentação foi o JASC PAINT SHOP PRO 8.

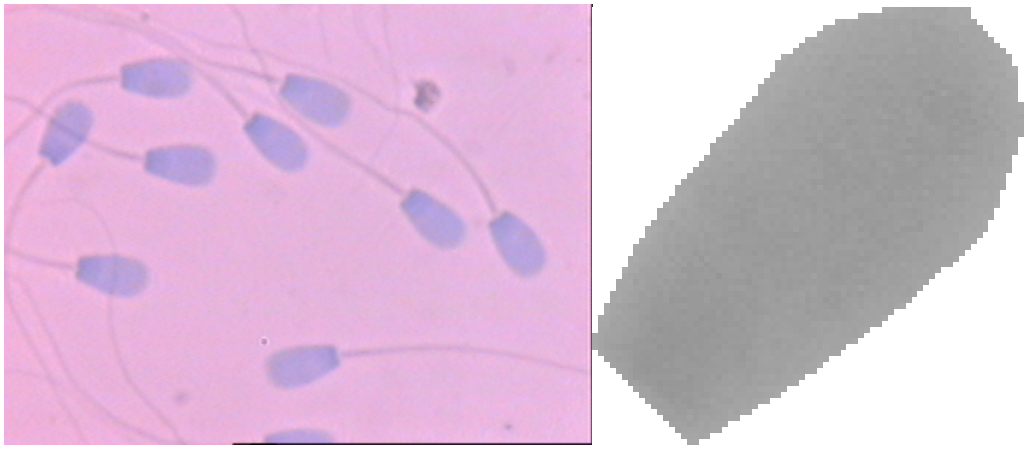

Figura 4 - À esquerda imagem obtida pelo microscópio de luz de um dos esfregaços corados pelo corante metacromático azul de toluidina. À direita uma cabeça de espermatozoide segmentada por limiarização em tons de cinza.

3.8 Análise de imagem computadorizada e avaliação da compactação cromatínica espermática

Todas as análises computacionais foram realizadas por algoritmos desenvolvidos em ambiente de programação matemática *Scilab* com o "tool box" denominado SIP. O Scilab é disponibilizado gratuitamente pela INRIA (Institut national de recherche en informatique et automatic) gratuitamente no site http://www.scilab.org/. Já o SIP é uma ferramenta para trabalhar com imagens desenvolvida pelo Cybernetic Vision Research Group e é disponibilizado gratuitamente no site http://siptoolbox.sourceforge.net/.

Após a segmentação das cabeças, estas foram processadas por programas desenvolvidos em ambiente *Scilab* para se obter a média dos valores de pixel que compõem cada uma das cabeças. Para se ter uma referência da coloração da cabeça do espermatozóide normal, foram selecionadas automaticamente dentre as cabeças de cada esfregaço, as seis mais claras e com coloração mais homogênea. A média dos valores de pixel destas cabeças foi considerada como o valor de referência da coloração normal dos espermatozóides (cabeças padrões) no respectivo esfregaço. Depois, as diferenças entre os valores médios das cabeças padrões e a média dos valores dos pixel de cada cabeça analisada foram determinadas. Esta diferença foi transformada em porcentagem (Dif%) do valor das cabeças padrões do esfregaço o qual a cabeça foi segmentada. O coeficiente de variação (CV) dos níveis de cinza (valores dos pixels) de cada cabeça também foi calculado (BELETTI *et al.,* 2005 a; SILVA *et al*., 2008).

As mensurações da área (A), perímetro (P), largura (L), comprimento (C), razão largura:comprimento (L/C), elipsidade (E) e fator forma (FF) de todas as cabeças foram realizadas pelo uso de algoritmos desenvolvidos em ambiente de programação SCILAB e publicados por Beletti e Costa (2003).

A área foi calculada pela somatória do número de pixels que compõem a imagem da cabeça. O perímetro foi dado pelo número de pixels contidos no contorno da imagem da cabeça.

Para se obter comprimento e largura da cabeça, o centro de massa de cada cabeça foi determinado e a cabeça foi transladada a uma posição onde o novo centro de massa corresponda à origem dos eixos da coordenada Cartesiana. Tendo normalizado a posição da cabeça, sua principal orientação foi encontrada usando a transformada de

Karhunen-Leève. Este processo envolve a matriz de correlação das coordenadas dos píxels que compõem o núcleo; determinando-se seu auto-valor e seu auto-vetor e usando o último para definir uma transformação linear que rotaciona o objeto original considerando o eixo x alinhado ao longo da orientação da máxima dispersão. Após reposicionar a cabeça, a projeção dos píxels no eixo x permite determinar-se o comprimento do núcleo e a projeção no eixo y corresponde ao valor da largura.

A elipsidade é dada pela expressão matemática $E=(C-L)/(C+L)$. Já o fator de forma é dado pela expressão matemática $FF=(1-E)_x P^2/4\pi A$.

Também foram considerados para caracterização e análise da forma as harmônicas da transformada de Fourier com amplitude de 0 a 2 (F0, F1, F2) (OSTERMEIER *et al*., 2001a; BELETTI e COSTA, 2003), os quais foram obtidos também pelo uso de programas desenvolvidos em ambiente *Scilab*.

A simetria da cabeça espermática foi calculada avaliando-se a simetria lateral (SL) pelo eixo principal e a simetria ântero-posterior (SAP) ao longo do segundo eixo principal. Este procedimento utilizado por Beletti e Costa (2003), envolve dobrar a cabeça ao longo de sei eixo maior (SL) ou menor (SAP), preenchendo os espaços vazios com representações computacionais e identificando a interseção entre as áreas originais e as preenchidas. Alterações nestas medidas refletem falhas nas propriedades hidrodinâmicas da célula e patologias específicas como cabeça piriforme e pescoço estreito (BELETTI *et al*., 2005 a,b; BELETTI, COSTA, 2003).

3.9 Análise Estatística

Para verificação da distribuição normal dos dados obtidos pela avaliação computacional das amostras de sêmen foi utilizado o teste de Kolmogorov-Smirnov ($\alpha \leq 0,05$). O teste t ($\alpha \leq 0,05$) foi utilizado para verificar se existem diferenças estatisticamente significantes entre as amostras de sêmen fresco, selecionadas por gradiente de Percoll, “swim-up” e capacitadas.

4.0 RESULTADOS

Os resultados referentes às análises da cromatina espermática estão demonstrados nas tabelas 1 e 2 sendo a primeira referente à espermatozoides selecionados pelo método de Gradiente de Percoll e sua subsequente capacitação, e a segunda àqueles submetidos à seleção por “swim-up” e sua posterior capacitação.

Tabela 1: Média e desvio-padrão dos coeficientes de variação (CV) e da diferença percentual dos valores de pixel (Dif%) das cabeças analisadas em relação às cabeças padrões nas amostras de sêmen fresco, selecionados por gradiente de Percoll e capacitados.

	CV	Dif %
Sêmen fresco	2,31±0,332[a]	3,90±1,59[a]
Percoll	2,62 ±0,395[b]	4,62±1,36[a]
Percoll Capacitado	2,60±0,312[b]	6,19±1,35[b]

Letras diferentes em uma mesma coluna significam médias diferentes ($p \leq 0,05$)

Tabela 2: Média e desvio-padrão dos coeficientes de variação (CV) e da diferença percentual dos valores de pixel (Dif%) das cabeças analisadas em relação às cabeças padrões nas amostras de sêmen fresco, selecionados por “Swim-up” e capacitados.

	CV	Dif %
Sêmen fresco	2,31±0,332[a]	3,90±1,59[a]
Swim-up	2,35 ±0,431[a]	3,99±1,08[a]
Swim-up Capacitado	2,38 ±0,498[a]	5,22±1,54[b]

Letras diferentes em uma mesma coluna significam médias diferentes ($p \leq 0,05$)

As análises em relação ao tamanho das cabeças dos espermatozóides estão demonstradas nas tabelas 3 e 4.

Tabela 3: Média e desvio-padrão da área (A), perímetro (P), largura (L) e comprimento (C) da cabeça dos espermatozóides nas amostras de sêmen fresco, selecionados por gradiente de Percoll e capacitados.

	A	P	L	C
Sêmen fresco	229,45±28,54	17,05±1,12	3,27±0,223	6,43±0,476
Percoll	231,24±41,89	17,08±1,54	3,26±0,340	6,43±0,572
Percoll Capacitado	228,75±39,23	17,01±1,46	3,25±0,301	6,42±0,563

Tabela 4: Média e desvio-padrão da área (A), perímetro (P), largura (L) e comprimento (C) da cabeça dos espermatozóides nas amostras de sêmen fresco, selecionados por "Swim-up" e capacitados.

	A	P	L	C
Sêmen fresco	229,45±28,54[a]	17,05±1,12[a]	3,27±0,223[a]	6,43±0,476[a]
Swim-up	191,22±14,26[b]	15,58±0,669[b]	2,98±0,157[b]	5,89±0,312[a]
Swim-up Capacitado	204,15±25,24[a,b]	16,10±1,02[a,b]	3,08 ±0,233[a,b]	6,07±0,412[a]

Letras diferentes em uma mesma coluna significam médias diferentes ($p \leq 0,05$)

As tabelas 5 e 6 demonstram as análises das variáveis relacionadas com a forma da cabeça do espermatozoide. As harmônicas do descritor de Fourier com amplitudes de zero a dois podem ser visualizadas nas tabelas 7 e 8.

Tabela 5: Média e desvio-padrão da razão largura:comprimento (L/C), elipsidade (E), fator de forma (FF), simetria lateral (SL) e simetria antero-posterior (SAP) da cabeça dos espermatozóides nas amostras de sêmen fresco, selecionados por gradiente de Percoll e capacitados.

	L/C	E	FF	SL	SAP
Semên fresco	0,511±0,036[a]	0,324±0,031[a]	0,923±0,016[a]	0,962±0,003[a]	0,915±0,012[a]
Percoll	0,508±0,031[a]	0,326±0,027[a]	0,921±0,013[a]	0,963±0,001[a]	0,918±0,010[a]
Percoll Capacitado	0,507±0,030[a]	0,327±0,026[a]	0,921±0,013[a]	0,964±0,002[b]	0,914±0,009[a]

Letras diferentes em uma mesma coluna significam médias diferentes ($p \leq 0,05$)

Tabela 6: Média e desvio-padrão da razão largura:comprimento (L/C), elipsidade (E), fator de forma (FF), simetria lateral (SL) e simetria antero-posterior (SAP) da cabeça dos espermatozóides nas amostras de sêmen fresco, selecionados por “Swim-up” e capacitados.

	L/C	E	FF	SL	SAP
Semên fresco	0,511±0,036[a]	0,324±0,03 [a]	0,923±0,016[a]	0,962±0,003[a]	0,915±0,012[a]
Swim-up	0,508±0,037[a]	0,327±0,032[a]	0,919±0,014[a]	0,964±0,001[b]	0,917±0,006[a]
Swim-up Capacitado	0,509±0,037[a]	0,325±0,032[a]	0,922±0,015[a]	0,965±0,002[b]	0,916±0,007[a]

Letras diferentes em uma mesma coluna significam médias diferentes ($p \leq 0,05$)

Tabela 7: Média e desvio-padrão das harmônicas do descritor de Fourier com amplitudes de zero a dois (F0, F1 e F2) da cabeça dos espermatozóides nas amostras de sêmen fresco, selecionados por gradiente de Percoll e capacitados.

	F0	F1	F2
Sêmen fresco	1566,65±273,76	211,28±46,32	128,51±17,88
Percoll	1571,14±281,63	204,48±46,30	133,56±27,20
Percoll Capacitado	1571,02±289,45	212,48±49,10	127,05±26,84

Tabela 8: Média e desvio-padrão das harmônicas do descritor de Fourier com amplitudes de zero a dois (F0, F1 e F2) da cabeça dos espermatozóides nas amostras de sêmen fresco, selecionados por Swim-up e capacitados.

	F0	F1	F2
Sêmen fresco	1566,65±273,76	211,28±46,32	128,51±17,88
Swim-up	1313,70±189,97	177,09±21,51	107,22±12,08
Swim-up Capacitado	1397,20±216,17	190,04±32,83	115,52±18,82

5.0 DISCUSSÃO

No contexto da reprodução assistida de humanos e animais, o grau de aberrações do DNA ou danos nas células espermáticas tem sido ligado ao não emparellhamento durante a fertilização e desenvolvimento embrionário, reduzindo as chances do nascimento de uma cria saudável (PARRISH *et al*., 1995).

Alguns pesquisadores têm citado a seleção por Gradiente de Percoll como o método de eleição para a preparação de amostras seminais utilizadas em rotinas de fecundação *in vitro,* pois ele rende amostras de melhor qualidade (LESSLEY, GARNER, 1983; LEE *et al*., 2009). Outros estudos têm concluído que ainda não há método ideal a ser utilizado (BOOMSMA *et al*., 2004; RICCI *et al*., 2009; MACHADO *et al*., 2009). Em conformidade com RICCI *et al*. (2009) ainda são necessários dados que auxiliem na escolha de um método que selecione espermatozoides com boa motilidade e capacidade de fecundação do ovócito homólogo. Com este objetivo, este trabalho avaliou a ação da seleção de espermatozóides por gradiente de Percoll e “swim-up” e da capacitação espermática por heparina sobre a compactação da cromatina e a morfometria da cabeça,

Considerando que a seleção com Percoll e “swim up” eliminam parte dos espermatozóides com alterações morfológicas e de motilidade e que problemas na cromatina espermática geralmente são acompanhados por essas alterações (OSTERMEIER *et al*., 2001a; BELETTI *et al*., 2005), era de se esperar que após a seleção restassem apenas células mais compactadas. Entretanto, não foi isso que ocorreu pois de acordo com a avaliação da compactação da cromatina de espermatozoides bovinos, pelo método de metacromasia por meio do corante azul de toluidina verificou-se que ambas as seleções tendem a selecionar espermatozoides com cromatina menos compactada e mais heterogênea (Tabelas 1 e 2). Porém esta é apenas uma tendência, pois não houve diferença estatística ($\alpha \leq 0,05$) antes e depois dos tratamentos, entre as variáveis Dif% e CV, que refletem respectivamente, a descompactação e a homogeneidade da cromatina espermática. Na seleção por Percoll este fato torna-se mais evidente e pode ser explicado, porque apesar de eliminar alguns espermatozóides com alterações de cromatina, este método também os submete a um

grande estresse mecânico durante as centrifugações, o que poderia diminuir a compactação no geral.

Resultados complementares utilizando outro método de análise, o da estrutura da cromatina espermática (SCSA), descrevem que de acordo com os parâmetros avaliados, amostras seminais preparadas pela técnica de “swim up” apresentam porcentagens maiores de espermatozoides com cromatina normalmente condensadas em comparação com os preparados pelo método de Percoll, além de que este método não induz danos ao DNA (HENKEL *et al*., 1994; SPANÓ *et al*., 1999; ZINI *et al*., 2000; YOUNGLAI *et al*., 2001). Rheingantz (2002) obteve melhores taxas de clivagem com sêmen de bovino preparado por “swim up”, indicando-o como método de eleição para FIV. Mehmood (2009) concluiu o mesmo em seu experimento com sêmen descongelado de búfalos. No entanto, Cesari *et al*. (2006) e Silva *et al.* (2008) não encontraram relação entre estas pequenas alterações na compactação da cromatina, taxa de fertilização e formação de blastocistos na produção in vitro de embriões.

Sakkas *et al.* (2000) ao utilizarem o método de Gradiente de Percoll encontraram diminuições na porcentagem de espermatozoides com danos no DNA, concordando com Le Lannau e Blanchard (1988). Acrescentam-se a esses dados os resultados obtidos com a avaliação em microscopia de luz de esfregaços também corados com azul de toluidina, os quais mostram não haver alterações na cromatina em espermatozoides selecionados por este método (ZUCCARI et al., 2008).

As tabelas 1 e 2 também mostram que os espermatozóides apresentam cromatina ainda mais frouxa após a seleção com Percoll e “swim up” e posterior capacitação com heparina. Corroborando com outros autores (DELGADO et al., 1988; REYES et al., 1989; ROMANATO et al., 2003, 2005; PERSON et al., 2007; SANCHEZ-VAZQUEZ et al., 2008; BARRATT et al., 2010), que têm relatado o importante papel de glicosaminoglicanos sulfatados (GAGs), como a heparina. Durante a fertilização *in vivo* sua atuação transforma a cromatina firmemente condensada e inerte à transcrição, em uma cromatina descondensada e competente. Em condições fisiológicas os GAGs se ligam aos receptores específicos na membrana plasmática (PELUSO *et al*., 1992; SANCHEZ-PRIETO *et al*., 1996) dos espermatozoides, induzindo-os à capacitação (REYES *et al*. 1989; MILLER *et al*., 1990; MEDEIROS, PARRISH, 1996) e à reação acrossomal (REYES *et al*., 1984; DELGADO *et al*., 1988). Além disso, induzem à liberação de nucleoproteínas

básicas necessárias para a manutenção da conformação cromatínica, levando à descompactação da mesma (REYES *et al*., 1991). Este mecanismo de solubilização do núcleo espermático com liberação das histonas H1 e protaminas pela heparina (ROMANATO *et al*., 2003, 2005; SANCHEZ-VAZQUEZ *et al*., 2008), é um pré-requisito para a descondensação da cromatina após a fertilização do ovócito. Estudos *in vitro* também têm demonstrado esta sequência de eventos após a utilização de heparina e outros GAGs, incluindo o heparan sulfato (PERSON *et al*., 2007; BARRATT *et al*., 2010).

Em espermatozoides humanos têm sido proposto que a descondensação rápida e necessária da cromatina após a fecundação é facilitada pela ligação do íon zinco nos locais onde se formariam as pontes de dissulfeto, prevenindo sua formação. Por outro lado a heparina, com suas propriedades quelantes de zinco, levaria à depleção dos níveis do íon no meio, possibilitando a formação destas pontes e consequentemente aumentando a compactação da cromatina. Porém, além de quelar, a heparina substitui o zinco, exercendo uma força de repulsão que mantêm ou até aumenta a separação das fitas de cromatina, de forma semelhante a que ocorre experimentalmente com o uso de detergentes aniônicos como dodecil sulfato de sódio (SDS), causando uma descondensação imediata da cromatina (ROMANATO *et al*., 2005). Com esta sequência de eventos é possível explicar a tendência à diminuição da compactação da cromatina após a capacitação com heparina, observada pelos resutados das tabelas 1 e 2.

Sabe-se que existe uma relação entre a variação da morfometria, o potencial fértil de cada animal e estruturas anormais de cromatina (SAILER, 1996). Assim como se acredita que o método utilizado para seleção de espermatozoides móveis pode influenciar alguns parâmetros relacionados com motilidade e morfologia das cabeças de espermatozoides (MELLO, FALCO, 1996; BELETTI *et al*., 2004). Nos resultados demonstrados pelas tabelas 3 e 4 observamos diferenças referentes ao tamanho da cabeça somente em espermatozóides selecionados pelo método de “swim up”. As medidas referentes a área, perímetro, largura e seus desvios padrão diminuíram, demonstrando o recrutamento de cabeças menores e com menor variação no tamanho quando comparadas a mesma amostra de sêmen anteriormente à seleção.

De acordo com Beletti *et al*. (2010), por meio de analise de imagem 2D é possível confrontar os valores obtidos da área média de cabeças ($p=0,046$) de espermatozoides com cromatina normalmente compactada ($23,6\mu m^2$) e área média de células com

cromatina frouxa (21,4 μm^2). Assim como a partir da obtenção de fatias virtuais e reconstrução 3D, mensurou-se a altura da cabeça dos mesmos espermatozóides, possibilitando o cálculo aproximado do volume médio de cada cabeça, obtendo-se 31,2μm^3 nas cabeças normais e 61,3 μm^3 em espermatozoides com cromatina descompactada (p=0,000). Logo espermatozóides com cromatina mais frouxa possuem área da cabeça menor dos que os normais, pois na realidade o volume da cabeça destes espermatozóides é maior. Ou seja, os espermatozóides com cromatina normal, altamente compactada, são achatados e os com cromatina frouxa tendem a se tornar esféricos ou cilíndricos.

Observa-se nas tabelas 5 e 6 que espermatozóides selecionados por Percoll e “swim up” não sofreram mudanças significativas no tamanho. Porém existe uma tendência ao aumento da elipsidade nas células selecionadas pelo método de gradiente de Percoll, as quais apresentaram descondensação da cromatina mais evidente (tabelas 1 e 2), seguidos de um novo aumento após a capacitação quando há um maior afrouxamento da mesma.

Quanto à forma da cabeça, somente após o “swim up” houve diferença significativa na simetria lateral, demonstrando que este método de seleção recruta espermatozóides com cabeças mais simétricas, portanto, mais hidrodinâmicas.

Após a capacitação, os espermatozóides selecionados por Gradiente de Percoll apresentaram alteração significativa na simetria lateral e ântero-posterior, sendo estas maior e menor, respectivamente, indicando que durante a capacitação há uma mudança na forma das cabeças, possivelmente provocada pela descompactação da cromatina.

Os descritores de Fourier não foram capazes de identificar alterações em nenhum dos tratamentos. Vasta literatura demonstra que os métodos de seleção de espermatozoides alteram a distribuição morfológica dos espermatozoides, aumentando a porcentagem dos normais. Semelhante aos resultados obtidos por Beletti e Mello (2004), os resultados do presente estudo demonstram que apesar de mudanças na cromatina alterarem a morfometria espermática de diversas formas, não são seguidas obrigatoriamente de alterações morfológicas evidentes (BELETTI et al., 2005), ou que sejam detectáveis pelas harmônicas utilizadas.

6.0 CONCLUSÕES

Após a seleção por gradiente de Percoll e “swim up” os espermatozoides tendem a possuir cromatina mais frouxa e mais heterogênea quando comparados aos da mesma amostra de sêmen anteriormente à seleção.

O método de swim-up seleciona cabeças menores e resulta em amostras mais homogêneas em relação à simetria e variação de tamanho, quando comparadas com as mesmas amostras de sêmen anteriormente à seleção e após a seleção por Gradiente de Percoll.

Após a capacitação induzida por heparina os espermatozoides apresentam cromatina mais frouxa e leve alteração da forma da cabeça.

REFERÊNCIAS

AITKEN, R.J.; CLARKSON, J.S. Significance of reactive oxygen species and antioxidants in defining the efficacy of sperm preparation techniques. *Journal of Andrology,* v. 9, p. 367-376, 1988.

ASSUMPÇÃO, M.E.O.A.; HAIPECK, K.; LIMA, A.S.; MELLO, M.R.B.; OLIVEIRA, L.J.; OLIVEIRA, V. P.;TAVARES, L.M.T.; VISINTIN, J.A. Capacitação espermática *in vitro* com heparina e cálcio ionóforo e sua correlação com a fertilidade em touros. *Brazilian Journal of veterinary Research of animal Science, v.39, n.3, p.149-156, 2002.*

AUSTIN, C.R. The 'capacitation' of the mammalian sperm. *Nature, v.* 170, p. 326, 1952.

BALHORN, R. A model for the structure of chromatin in mammalian sperm. *The Jounal of Cell Biology*, v.93, p. 298-305, 1982.

BARRATT, C.L.R.; AITKEN, R.J.; BJORNDAHL, L.; CARRELL, D.T.;DE BOER, P.; KVIST, U.; LEWIS, S.E.M..; PERREAULT, S.D.; PERRY, M.J.; RAMOS, L.; ROBAIRE, B.; WARD, S.; ZINI, A. DNA: organization, protection and vulnerability: from basic science to clinical applications—a position report. *Human Reproduction*, v. 25, n. 4, p. 824–838, 2010.

BARROS, C.; FRANKLIN, L.E. behavior of the gamete membranes during Sperm entry into the mammalian egg. *Communications*, v. C, p. 13-18, 1968.

BELETTI, M.E.; COSTA, L.F. A systematic approach to multi-species sperm morphometrical 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. *Biotechnic and Histochemistry*, Louisville, v. 79, n. 1, p. 17-23, 2004.

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, p. 105-116, 2005.

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 Morphology Science*, v. 22, n. 2, p. 85-90, 2005a.

BELETTI, M.E.; COSTA, L.F.; VIANA, M.P. A spectral framework for sperm shape characterization. *Computers in Biology and Medicine*, Washington, v.35, n.6, p.463-473, 2005b.

BELETTI, M.E.; MELLO, M.L.S. Methodological variants contributing to detection of abnormal DNA-complexes in bull spermatozoa. *Brazilian Journal of Genetics*, v. 19,n. 1, p. 97-103,1996.

BELETTI, M.E.; MELLO, M.L.S. Comparision 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, p. 398-402, 2004.

BELETTI, M.E.; LEMOS, M.S., GAMA-CAMPOS, M.N.; PINTO, D.A.; MORAES, A.S. Less packed states of chromatin leads to volume changes of heads of bull sperm. In: Meeting of the brazilian society for cell biology,15., 2010, São Paulo. *Anais*…, São Paulo, 2010.

BELLVÉ, A.R.; CAVICCHIA, J.C.; MILLETFE, C.F.; O'BRIEN, D.A.; BHATNAGAR, Y.M.; MARTIN DYM Spermatogenic cells of the prepuberal mouse - Isolation and Morphological Characterization. The Journal of Cell Biology, v. 74, p. 68-85, 1977a.

BELLVÉ, A.R.; MILLETFE, C.F.; O'BRIEN, D.A.; BHATNAGAR, Y.M. Dissociation of the mouse testis and characterization of isolated spermatogenic cells. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry*,v. 25, n. 7, p. 480-494, 1977b.

BJORNDAHL, L.; KVIST, U. Human sperm chromatin stabilization: a proposed model including zinc bridges. *Molecular Human Reproduction*, V.16, n.1, p. 23–29, 2010.

BLONDIN, P.; BEAULIEU, M.; FOURNIER, V.; MORIN, N.; CRAWFORD, L.; MADAN, P.; KING, W.A. Analysis of bovine sexed sperm for IVF from sorting to the embryo. *Theriogenology*, v.71, p.30-38, 2009.

BOOMSMA, C.M.; HEINEMAN, M.J.; COHLEN, B.J.; FARQUHAR, C. Semen preparation techniques for intrauterine insemination. *Cochrane Database Systematic Reviews*, v.3, 2004.

BRANDEIS, V.T.; MANUEL, M.T. Effects of four methods of sperm preparation on the motile concentration, morphology, and acrosome status of recovered sperm from normal semen samples. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, v. 10, p. 409–416, 1993.

BRITO, L.F.; SILVA, A.E.; BARBOSA, R.T.; UNANIAN, M.M.; KASTELIC, J.P. Effects of scrotal insulation on sperm production, semen quality, and testicular echotexture in Bos indicus and Bos indicus x Bos taurus bulls. Animal Reproduction Science, v. 79, n. 1-2, p. 1-15, 2003.

CASADY, R.B.; MYERS, R.M.; LEGATES, J.E. The effect of exposure to high ambient temperature on spermatogenesis in dairy bull. *Dairy Science*, v. 36, p. 14, 1953.

CENTOLA, G.M.; HERKO, R.; ANDOLINA, E.; WEISENSEL, S. Comparison of sperm separation methods: effect on recovery, motility, motion parameters, and hyperactivation. *Fertility and Sterility*, v. 70, p. 1173-1175, 1998.

CESARI, A.; KAISER, G.G.; MUCCI, N.; MUTTO, A.; VINCENTI, A.; FORNE'S, M.W.; ALBERIO, R.H. Integrated morphophysiological assessment of two methods for sperm selection in bovine embryo production in vitro. *Theriogenology*, v. 66, p. 1185–1193, 2006.

CHANG, M.C. Fertilization capacity of spermatozoa deposited into the fallopian tube. *Nature*, v.168, p.697-698, 1951.

CHO, C.; JUNG-HA,H.; WILLIS, W.D.; GOULDING E.H.; STEIN, P.; XU,Z.; SCHULTZ, R.M.; HECHT, N.B.; EDDY, E.M. Protamine 2 Deficiency Leads to Sperm DNA Damage and Embryo Death in Mice. *Biology of Reproduction*, v. 69, p. 211-217, 2003.

COLÉGIO BRASILEIRO DE REPRODUÇAO ANIMAL (CBRA). Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal. Belo Horizonte: CBRA, 1998, 49p.

COSCIONI, A.C.; REICHENBACH, H.D.; SCHWARTZ, J.; LAFALCI, V.S.N.; RODRIGUES, J.L.; BRANDELLI, A. Sperm function and production of bovine embryos in vitro after swim-up with different calcium and caffeine concentration. *Animal Reproduction Science,* v. 67, n. 1-2, p. 59-67, 2001.

COSTA, L.F.; CÉSAR JR, R.M. Shape analysis and classification: Theory and Parctice. CRC Press, p. 248-565, 2001.

DARZYNKIEWICZ, Z.; GLEDHILL, B.L.; RINGERTZ, N.R.; Changes in deoxyribo-nucleoprotein during spermiogenesis in the bull. *Experimental Cell Research*, v. 58, p. 435-438, 1966.

DEMOTT, R.P.; SUAREZ, S.S. Hyperactivated sperm progress in the mouse oviduct. *Biology of Reproduction, v.* 46, p. 779-785, 1992.

DE VITA, R.; CALUGI, A.; CHIARANTANO, C.; FORTE, D.; MAURO, F.; UCCELLI, R. Effects of heat on mouse spermatogenesis monitored by flow cytometry. *International Journal of Hyperthermia*, v. 6, n. 3, p. 543-551, 1990.

DYM, M.; FAWCETT, D.W. The bloodtestis barrier in the rat and the physiological compartmentation of the seminiferous epithelium. *Biology of reproduction,* v.3, p.308-326, 1970.

EDDY, E.M The spermatozoon In: NEILL, J.D. Ed(s). *Knobil and Neill´Physiology of Reproduction* United States of America: Elsevier, 2006. P.3-54.

EID, L.N.; LORTON, S.P.; PARRISH, J.J.; Paternal influence on S-phase in the first cell cycle of the bovine embryo. *Biology of Reproduction*, v. 51, p. 1232–1237, 1994.

ERENPREISS, J.; JEPSON, K.; GIWERCMAN, A.; TSAREV, I.; ERENPREISA, JE.; SPANO, M. Toluidine blue cytometry test for sperm DNA conformation: comparison with the flow cytometric sperm chromatin structure and TUNEL assays. *Human Reproduction,* v. 19, n. 10, p. 2277–2282, 2004.

EVENSON, D.P.; Loss of livestock breeding efficiency due to uncompensable sperm nuclear defects. Reproduction *Fertility and Development*, v. 11, n. 1, p. 1–16, 1999.

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

EVENSON, D.P.;WIXON, R.; Clinical aspects of sperm DNA fragmentation detection and male infertility. *Theriogenology,* v. 65, p. 979–991. 2006.

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.

FILATOV, M.V.; SEMENOVA, E.V.; VORO'EVA, O.A.; LEONT'EVA, O.A.; DROBCHENKO, E.A. Relationship between abnormal sperm chromatin packing and IVF results. *Molecular Human Reproduction*, v. 5, n. 9, p. 825-830, 1999.

FLORMAN, H.M.; DUCIBELLA, T. Fertilization in Mammals In: NEILL, J.D. Ed(s). *Knobil and Neill´Physiology of Reproduction* United States of America: Elsevier, 2006. p. 55-112.

FRASER, L.R. Sperm capacitation and the acrosome reaction. *Human Reproduction*, v. 13, n. 1, 1998.

FAWCETT, D.W.; ITO, S.; SLAUTTERBACK, D. The occurrence of intracellular bridges in groups of cells exhibiting synchronous differentiation. *The Journal of Biophysical and Biochemical Cytology*, v. 5, n. 3, p. 453-460, 1959.

GADELLA, B.M.; HARRISON, R.A. The capacitating agent bicarbonate induces protein kinase A-dependent changes in phospholipid transbilayer behavior in the sperm plasma membrane. *Development*, v. 127, p. 2407-242, 2000.

GADELLA, B.M.; VISCONTI, P.E. Reglation of Capacitation In:DE JONGE, C.J.; BARRATT, C.R.L. Ed(s) *The sperm Cell – Production, Maturation, Fertilization, Reggeneration.* London: Cambridge University Press, 2006, p.134-169.

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

GLEDHILL, B.L. Changes in deoxyribonucleoprotein in relation to spermateliosis and the epididymal maturation of spermatozoa. *Journal of Reproduction and Fertility Supplement*, v. 13, p. 77-88, 1971.

GONÇALVES, P.B.D.; OLIVEIRA, M.A.L.; MEZZALIRA, A.; MONTAGNER, M.M.; VISINTIN, J.A.; COSTA, L.F.S.; Produção in vitro de embriões. In: GONÇALVES, P.B.D.; FIGUEIREDO, J.R.; FREITAS, V.J.F. Biotécnicas aplicadas à reprodução animal. São Paulo: ROCA, 2008, p. 261-292.

GRAVANCE, C.G.; DAVIS, R.O. Automated sperm morphometry analisys (ASMA) in rabbits. Journal of Andrology, v. 16, p. 88-93, 1995.

GRAVANCE, C.G.; GARNER, D.L.; PITT, C.; VISHWANATH, R.; SAX-GRAVANCE, S.K.; CASEY. P;J. Replicate and technician variation associated with computer aided bull sperm head morphometry analysis (ASMA). *International Journal of Andrology*, v. 22, n. 2, p. 77-82, 1999.

HAFEZ, E.S.E.; HAFEZ, B. *Reprodução Animal*. 7º.ed. São Paulo: Manole, 2004. 513p.

HENKEL, R.R.; FRANKEN, D.R.; LOMBARD, C.J.; SCHILL, W.B. Selective capacity of glass-wool filtration for the separation of human spermatozoa with condensed chromatin: a possible therapeutic modality for male-factor cases? *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, v. 11, p. 395-400, 1994.

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

KARABINUS, D.S.; VOGLER, C.J.; SAACKE, R.G.; EVENSON, D.P. Chromatin Structural Changes in Sperm After Scrotal Insulation of Holstein Bulls. *Journal of Anthology*, v. 18, n. 5, 1997.

KATZ, D.F.; YANAGIMACHI, R.; DRESDNER, R.D. Movement characteristics and power output of guinea-pig and hamster spermatozoa in relation to activation. *Journal of Reproduction and Fertility, v.* 52, p. 167-172, 1978.

KAWAI, Y.; HATA, T.; SUZUKI, O.; MATSUDA, J. The relationship between sperm morphology and in vitro fertilization ability in mice. *Journal of Reproduction Development*, v. 52, n. 4, p. 561-8, 2006.

LEE, H.L.; KIM, S.H.; JI, D.B.; KIM, Y.J. A comparative study of Sephadex, glass wool and Percoll separation techniques on sperm quality and IVF results for cryopreserved bovine semen. *Journal of Veterinary Science*, v. 10, n. 3, p. 249-255, 2009.

LE LANNAU, D.; BLANCHARD, Y. Nuclear maturity and morphology of human spermatozoa selected by Percoll density gradient centrifugation or swim-up procedure. *Journal of Reproduction and Fertility*, v. 84, p. 551-556, 1988.

LESSLEY, B.A.; GARNER, D.L. Isolation of motile spermatozoa by density gradient centrifugation in Percoll. *Gamete Research*, v. 7, p. 49-61,1983.

LU, K.H.; SEIDEL Jr, G.E. Effects of heparin and sperm concentration on cleavage and blastocyst development rates of bovine oocytes inseminated with flow cytometrically-sorted sperm. *Theriogenology*, v.62, n.5, p.819-30, 2004.

MACHADO, G.M.; CARVALHO, J.O.; SIQUEIRA FILHO, E.; CAIXETA, E.S.; FRANCO, M.M.; RUMPF, R.; DODE, M.A.N. Effect of Percoll volume, duration and force of centrifugation, on in vitro production and sex ratio of bovine embryos. *Theriogenology*, v.71, p.1289-1297, 2009.

MATSUYAMA, K.; MIYAKOSHI, H.; FUKUI, Y. Effect of glucose levels during the *in vitro* culture in synthetic oviduct fluid medium on *in vitro* development of bovine oocytes matured and fertilized *in vitro*. *Theriogenology*, v. 40, p. 595-605, 1993

MEHMOOD, A.; ANWAR, M.; SAQLAN NAQVI, S.M. Motility, acrosome integrity, membrane integrity and oocyte cleavage rate of spermseparated by swim-up or Percoll gradient method from frozen–thawed buffalo semen. *Animal Reproduction Science,*v. 111, p. 141–148, 2009.

MEISTRISH, M.L.; MOHAPATRA, B.; SHIRLEY, C.R.; ZAO, M. Roles of transition nuclear protein in spermiogenesis. *Chromosoma*, v. 111, p. 483-488, 2003.

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

MELLO, M.L.S.; FALCO, J.R.P. Critical electrolyte concentration of DNA-protein complexes in spermatozoal and somatic cell nuclei of the honey bee, *Apis mellifera. Insect Biochemistry and Molecular Biology***,** v. 26, n. 8-9, p. 793-795, 1996.

MENDES JR, J.O.B.; BURNS, PD.; DE LA TORRE SANCHEZ, J.F.; SEIDEL JR, G.E. Effect of heparin on cleavage rates and embryo production with four bovine sperm preparation protocols. *Theriogenology*, v. 60, n. 2, p. 331-340, 2003.

MILLER, D.J.; WINER, M.A.; AX, R.L. Heparin-binding proteins from seminal plasma bind to bovine spermatozoa and modulate capacitation by heparin. *Biology of Reproduction*, v.42, n.6, p.899-915,1990.

MORRELL, J.M.; JOHANNISSON, A.; DALIN, A.M.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Morphology and Chromatin Integrity of Stallion Spermatozoa Prepared by Density Gradient and Single Layer Centrifugation Through Silica Colloids. *Reproduction of Domestic Animals*, v. 44, p. 512–517, 2009.

OLIVA, R. Protamines and male infertility. *Human Reproduction Update*, v. 12, n. 4 p. 417–435, 2006.

OLIVER, G.; AND SCHÄFER, E.A. On the physiological actions of extracts of pituitary body and other glandular organs. *Journal of Physiology*, v. 18, p.277-299, 1895.

OOSTERHUIS, G.J.; MULDER, A.B.; KALSBEEK-BATENBURG, E.; LAMBALK, C.B.; SCHOEMAKER, J.; VERMES, I. Measuring apoptosis in human spermatozoa: a biological assay for semen quality? *Fertility and Sterility*, v. 74, p. 245-250, 2000.

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.

OSTERMEIER, G.C.; SARGEANT, G.A.; YANDELL, T.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.

PARRISH, J.J.; KROGENAES, A.; SUSKO-PARRISH, J.L. Effect of bovine sperm separation by either swim-up or Percoll method on success of in vitro fertilization and early embryonic development. *Theriogenology,* v. 44, p. 859–869, 1995.

PARRISH, J.J., SUSKO-PARRISH, J., LEIBFRIEDRUTLEDGE, M.L.; CRISTER, E.S.; EYESTONE, W.H.; FIRST, N.L. Bovine in vitro fertilization with frozen-thawed semen. *Theriogenology*, v.25, n.1, p.591-600, 1996.

PEDDINTI, D.; NANDURI, B.; KAYA, A.; FEUGANG, J.M.; BURGESS, S.C.; MEMILI, E. Comprehensive proteomic analysis of bovine spermatozoa of varying fertility rates and identification of biomarkers associated with fertility. *BMC Systems Biology*, v. 2, p.19, 2008.

PELUSO, J.J.; LUCIANO, A.A.; NULSEN, J.C. The relationship between alterations in spermatozoal deoxyribonucleic acid, heparin binding sites and semen quality. *Fertility and Sterility*, v. 57, p. 665–670, 1992.

PÉREZ-CRESPO, M.; MOREIRA, P.; PINTADO, B.; GUTIÉRREZ-ADÁN, A. Factors From Damaged Sperm Affect Its DNA Integrity and Its Ability to Promote Embryo Implantation in Mice. *Journal of Andrology*, v.29, n. 1, p.47-54, 2008.

PERSON, C.N.; LESTER. T.D.; PERSON, MD.; RORIEL, R. W. Computer-Assisted Analysis of Sperm Parameters after Selection of Motile Sperm by Either Percoll Gradient, Filtration, or Swim-up Procedures. *Arkansas Animal Science Department Report,* p.51-53, 2007.

PRAKASH, P.; LEYKIN, L.; CHEN, Z.; TOTH, T.;SAYEGH,R.; SCHIFF,I.; ISAACSON, K. Preparation by differential gradient centrifugations is better than swim-up in selecting

sperm with normal morphology (strict-criteria). *Fertility and Sterility*, v. 69, n. 4, p. 722-726, 1998.

REYES, R.; CARRANCO, A.; HERNANDEZ, O.; ROSADO, A.; MERCHANT, H.; DELGADO, N. M. Glycosaminoglycan sulfate as acrosomal reaction-inducing factor of follicular fluid. *Archives of Andrology*, v. 12, p. 203–209, 1984.

REYES, R.; ROSADO, A.; HERNANDEZ, O.; DELGADO, N. M. Heparin and glutathione: Physiological decondensing agents of human sperm nuclei. *Gamete Research*, v. 23, p. 39–47, 1989.

REYES, R.; CARRANCO, A.; HUACUJA, L.; DELGADO, N. M. Male pronuclei formation release of phosphorylation of histone H-3 during decondensation of human sperm nuclei activated in vitro by heparin. *Archives of Andrology*, v. 26, p. 53–60, 1991.

RHEINGANTZ, M.G.T.; DESCHAMPS, J.C.; PIMENTEL, A.M.; PEGORARO, L.M.C Influência dos métodos do gradiente de Percoll e do *swim-up* sobre o desenvolvimento *in vitro* de embriões bovinos produzidos *in vitro. Revista Brasileira de Reprodução Animal,* v. 26, n. 4, p. 312-316, 2002.

RHEMREV, J.; JEYENDRAN R.S.; VERMEIDEN J.P.; ZANEVELD L.J. Human sperm selection by glass wool filtration and two-layer, discontinuous Percoll gradient centrifugation. *Fertilility and Sterility*, v. 51, p. 685-690, 1989.

RHYNES, W.E.; EWING, L.L. Testicular endocrine function in Hereford bulls exposed to high ambient temperature. *Endocrinology*, v.92, p. 509-515, 1973.

RICCI, G.M.D.; PERTICARARI, S.B.; BOSCOLO, R.B.; MONTICO, M.B.; GUASCHINO,S.M.D.; PRESANI,G.G.B. Semen preparation methods and sperm apoptosis: swim-up versus gradient density centrifugation technique. *Fertility and Sterility*, v. 91, n.2, p. 632-638, 2009.

RODRIGUEZ-MARTINEZ, H.; LARSSON, B.; PERTOFT, H. Evaluation of sperm damage and techniques for sperm clean-up. *Reproduction Fertility and Development*., v. 9, p. 297-308, 1997.

ROMANATO, M.; CAMEO, M.; BERTOLESI, G.; BALDINI, C.; CALVO, J.C.; CALVO, L. Heparan sulphate: a putative decondensing agent for human spermatozoa in vivo. *Human Reproduction*, v. 18, p. 1868–1873, 2003.

ROMANATO, M.; REGUEIRA, E.;CAMEO, M.S.; BALDINI, C.; CALVO, L.; CALVO, J.C. Further evidence on the role of heparan sulfate as protamine acceptor during the decondensation of human spermatozoa. *Human Reproduction*, v. 20, n. 10, p. 2784-2789, 2005.

ROSS, M.H. The Sertoli cell junctional specialization during spermiogenesis and at spermiation. *The Anatomical Record*, v. 186, p. 79, 1976.

SAILER, B.L.; JOST, L.K.; EVENSON, P. Bull sperm head morphometry related to abnormal chromatin structure and fertility. *Cytometry, v.* 24, p. 167–173, 1996.

SAILER, B.L.; SARKAR, L.J.; BJORDAHL, J.A.; JOST, L.K.; EVENSON, D.P. Effects of heat stress on mouse testicular cells and sperm chromatin structure. Journal of Andrology, v. 18, n. 3, p. 294-310, 1997.

SAKKAS, D.; MANICARDI, G.C.; TOMLINSON, M.; MANDRIOLLO, M.; BIZZARO, D.; BIANCHI, P.G.; BIANCHI, U. The use of two density gradient centrifugation techniques and the swim-up method to separate spermatozoa with chromatin and nuclear DNA anormalies. Human Reproduction, v. 15, n. 5, p. 1112-1116, 2000.

SAMARDŽIJA, M.; DOBRANIĆ, T.; KARADJOLE, M.; GETZ, I.; VINCE, S., GRAČNER, D.; MAĆEŠIĆ, N.; FILAKOVIĆ, I. The efficacy of gradient Percoll® on bull sperm separation for *in vitro* fertilization. *Veterinarski Arhives, v. 76, n.* 1, p. 37-44, 2006.

SANCHEZ-PRIETO, J.; GONZALEZ, J.; ILLERA, M.J.; LORENZO, P.L.; ORENSANZ, L.M. [3H]heparin binding in boar spermatozoa: Characterization and correlation with routine semen quality parameters. *Biology of Reproduction*, v. 55, p. 860–867,1996.

SÁNCHEZ-VÁZQUEZ, M.L.; FLORES-ALONSO, J.C.; MERCHANT-LARIOS H.; REYES R. Presence and release of bovine sperm histone H1 during chromatin decondensation by heparin-glutathione. *System Biology in Reproductive Medicine*, v.54, n.6, p.221-230, 2008.

SHAMAN, J.A.; YAMAUCHI, Y.; WARD, W.S. Function of the sperm nuclear matrix. *Archives of Andrology: Journal of Reproductive Systems*, v. 53, p. 135-140, 2007.

SHAMSUDDIN, M.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. A simple, non-traumatic *swim-up* method for the selection of spermatozoa for *in vitro* fertilization in the bovine. *Animal Reproduction Science*., v. 36, p. 61-75, 1994.

SHAMSUDDIN, M.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H.; LARSSON, B. Fertilizing capacity of bovine spermatozoa selected after swim-up in hyaluronic acid-containing medium. *Reproduction Fertility and Development,* v. 5, n. 3, p. 307-315, 1993.

SILVA, R.T.; MENDES JR., J.O.B.; BELETTI, M.E. Compactação da cromatina e morfometria da cabeça de espermatozoides na produção de embriões in vitro utilizando touros zebuinos. *Acta Scientiarum Animal Science*, v.30, n.4, p. 473-478, 2008.

SOMFAI, T.; BODÓ, S.; NAGY, S.; PAPPY, A.B.; IVÁNCSISCS, J.; BARANYAI, B.; GÓCZA, E.; KÓVACS, A. Effect of swim up and Percoll treatment on viability and acrosome integrity of frozen-thawed bull spermatozoa. *Reproduction of domestic animal*, v. 37, n. 5, p. 285-290, 2002.

SOTOLONGO B.; LINO E.; WARD W.S. Ability of hamster spermatozoa to digest their own DNA. *Biology of Reproduction*, v. 69, p. 2029–2035, 2003.

SPANÓ, M.; CORDELLI, E.; LETER, G.; LOMBARDO, F.; LENZI, A.; GANDINI, L. Nuclear chromatin variations in human spermatozoa undergoing swim-up and cryopreservation evaluated by the flow cytometric sperm chromatin structure assay. *Molecular Human Reproduction*, v.5, p.29-37, 1999.

SUZUKI, K.; GESHI, M.; YAMAUCHI, N.; NAGAI, T. Functional changes and motility characteristics of Japanese Black bull spermatozoa separated by Percoll. *Animal Reproduction Science*, v. 77, n. 3-4, p. 157-172, 2003.

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

TWIGG, J.P.; IRVINE, D.S.; AITKEN, R.J.; Oxidative damage to DNA in human spermatozoa does not preclude pronucleus formation at intracytoplasmic sperm injection. *Human Reproduction*, v. 13, n. 7, p. 1864-1871, 1998.

VOGLER, C.J.; BAME, J.H.; DeJARNETTE, J.M.; McGILLIARD, M.L.; SAACKE, R.G. Effects of elevated testicular temperature on morphology characteristics of ejaculated spermatozoa in the bovine. *Theriogenology*, v. 40, p. 1207-1219, 1993.

VOGLER, C.J.; SAACKE, R.G.; BAME, J.H.; DWARNETTE, J.M.; MCGILLIARD, Y.L Effects of Scrotal Insulation on Viability Characteristics of Cryopreserved Bovine Semen. *Jornal of Dairy Science*, v. 4, p. 3827-3835, 1991.

ZAVOS, P.M. Preparation of human frozen-thawed seminal specimens using the SpermPrep filtration method: improvements over the conventional swim up method. *Fertility and Sterility*, v. 57, p. 1326-1330, 1992.

ZINI, A.; FINELLI, A.; PHANG, D.; JARVI, K. Influence of semen processing technique on human sperm dna integrity SCSA. *Urology*, v. 56, n. 6, p. 1081-1084, 2000.

ZUCCARI, C.E.S.N.; CARRIJO, P.R.; LEITE, P.A.; SCALDELAI, P.R.R.; RODOVALHO, N.C.M.; ZANENGA, C.A.; KIEFER, C.; SILVA, E.V.C. Seleção por gradiente de Percoll sobre os parâmetros espermátiicos do sêmen bovino congelado. *Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal*, v. 9, n. 2, p. 358-366, 2008.

YANAGIMACHI, R. Mammalian fertilization. In: NEILL, J.D. Ed(s). *Knobil and Neill´Physiology of Reproduction* United States of America: Elsevier, 2006. p. 55-112.

YANG, X.; JIANG, S.; FOOTE, R.H. Bovine oocyte development following different oocyte maturation and sperm capacitation procedures. *Molecular Reproduction and Development,* v. 34, n. 1, p. 94-100, 1993.

YAO, Y.Q.; NG, V.; YEUNG, W.S.B.; HO, P.C. Profiles of sperm morphology and motility after discontinuous multiple-step Percoll density gradient centrifugation. *Andrologia*, v. 28, p. 127-131, 1996.

YOUNGLAI, E.V.; HOLT, D.; BROWN, P.; JURISICOVA, A.; CASPER, R.F. Sperm swim-up techniques and DNA fragmentation. *Human Reproduction*, v.16, p. 1950–1953, 2001.

WALTERS, A.H.; EYESTONE,W.E.; SAACKE,R.G.; PEARSON, R.E.;GWAZDAUSKAS, F.C Sperm morphology and preparation method affect bovine embryonic development. Jouranl of andrology, v. 25, n. 4, p. 554-563, 2004.

WARD, W.S.; COFFEY, D.S. Dna Packagin and Organization in Mammalian Spermatozoa: Comparison with Somatic Cells. *Biology of Reproduction*, v. 44, p. 569-574, 1991.

WESTRA, A.; DEWEY, W.C. Variation in Sensitivity to Heat Shock during the Cell-cycle of Chinese Hamster Cells in Vitro International. *Journal of Radiation Biology*, v. 19, n. 5, p. 467-477, 1971.