



Impacto da criopreservação na ultraestrutura cromatínica de sêmen bovino

Rosiane Nascimento Alves¹; Larissa Romanello²; João Paulo Moraes Utinetti³; Marcelo Emílio Beletti⁴

1. Departamento de Ciências Agrárias e Naturais, Universidade do Estado de Minas Gerais (UEMG) Unidade Ituiutaba-MG. E-mail: rosiane.alves@uemg.br. <https://orcid.org/0000-0001-7470-7082>
2. Departamento de Saúde e Psicologia, Universidade do Estado de Minas Gerais (UEMG) Unidade Ituiutaba-MG. E-mail: larissa.romanello@uemg.br. <https://orcid.org/0000-0003-4054-198X>
3. Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade Federal de Uberlândia (UFU) – MG. E-mail: joaopauloutinetti@gmail.com.
4. Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade Federal de Uberlândia (UFU) – MG. E-mail: mebeletti@ufu.br. <https://orcid.org/0000-0001-9320-7278>

Recebido em: 28/02/2024

Aceito em: 20/08/2024

Publicado em: 07/03/2025

Resumo

Durante a espermiogênese e a maturação epididimal em mamíferos, a estrutura da cromatina espermática sofre substituição de histonas nucleares por proteínas de transição e protaminas, levando a uma cromatina altamente condensada resistente a agressões oxidativas. Alterações na compactação da cromatina espermática, apesar de não serem avaliadas no espermograma de rotina, têm sido estudadas nas diversas espécies animais por terem sido relacionadas à subfertilidade e gerarem prejuízos nos resultados de técnicas reprodutivas. Embora o efeito do congelamento do sêmen utilizado na produção de embriões seja bastante controverso, esta prática é amplamente utilizada principalmente na reprodução de bovinos. Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar por Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) possíveis alterações cromatínicas no sêmen de cinco touros da raça Guzará provocadas pela criopreservação, a fim de identificar descompactação no material genético, que poderia ser utilizada como potencial biomarcador e assim prever a fertilidade em touros e o consequente sucesso reprodutivo destes animais. Após as análises observou-se um aumento progressivo nas alterações relacionadas à descompactação cromatínica mais grave das amostras de sêmen submetidas ao protocolo de criogenia. Tais alterações referentes aos graus mais graves são frequentemente associadas à diminuição no desenvolvimento embrionário de bovinos. Assim, os dados apresentados sugerem que o protocolo de congelamento utilizado nas amostras de sêmen bovino causou maior descompactação cromatínica, o que pode afetar negativamente o sucesso reprodutivo desta espécie.

Palavras-chave: Bovinos. compactação espermática, microscopia eletrônica de transmissão, congelamento.

Criopreservation in the chromatin ultrastructure of bovine sperm

Abstract

During spermiogenesis and epididymal maturation in mammals, the sperm chromatin structure undergoes replacement of nuclear histones by transition proteins and protamines, leading to a highly condensed chromatin resistant to oxidative insults. Alterations in the compaction of sperm chromatin, despite not being evaluated in the routine spermogram, have been studied in different animal species because they are related to subfertility





and may impair the results of reproductive biotechniques. Although the effect of freezing semen used in the production of embryos is quite controversial, this practice is widely applied, mainly in cattle reproduction. Thus, the objective of this work was to evaluate by Transmission Electron Microscopy (TEM) possible chromatin alterations in the semen of five Guzerá bulls caused by cryopreservation in order to identify decompaction in the genetic material that could be used as a potential biomarker, predict fertility in bulls and the consequent reproductive success of these animals. After analyses, it can be seen that there was a progressive increase in the most severe chromatin decompaction alterations of the semen samples submitted to freezing. These changes referring to most severe degrees are often associated with a decrease in the bovine embryonic development. Summary, the data presented here suggest that the semen cryopreservation protocol causes chromatin decompaction and has the potential to negatively affect the reproductive success of this species.

Key-words: Cattle; Sperm compactation; Transmission electron microscopy; Freezing.

Introdução

Touros que apresentam sêmen com parâmetros andrológicos normais, como morfologia e motilidade espermáticas, podem se comportar como subfêrteis. Uma das causas para esse comportamento é a ocorrência de alterações na compactação da cromatina espermática, que pode apresentar-se heterogênea e descondensada (BELETTI; MELLO, 1996; SOUZA et al., 2018). Estudos específicos em taurinos reportaram que o comprometimento da estrutura da cromatina espermática é indicativo de subfertilidade masculina (KASIMANICKAM et al., 2006).

Recentemente, Martins e colaboradores (2021) demonstraram que a maturação no epidídimo é crucial à compactação da cromatina e morfometria final da cabeça de espermatozoides bovinos. A cromatina espermática sofre alterações, principalmente no âmbito da compactação, em função da substituição de histonas por proteínas de transição e depois por protaminas, que irão condensar ao máximo a cromatina espermática. Por conterem resíduos de arginina, as protaminas se ligam mais fortemente ao DNA quando comparadas às histonas somáticas, resultando assim no alto grau de compactação da cromatina espermática no núcleo da célula (GOLAN et al., 1996).

Alterações na membrana espermática, integridade acrossomal, potencial energético, oxidação celular, compactação e heterogeneidade cromatínicas podem levar a diminuição no potencial de fertilização do espermatozoide (LUCIO et al., 2016). A descompactação da cromatina aumenta os níveis de fragmentação do DNA, o que está relacionado à baixas taxas de fertilização e de implantação embrionária, bem como à altas taxas de aborto. Assim, a integridade da cromatina espermática se revelou um parâmetro muito importante após a intensificação do uso de biotécnicas reprodutivas como a injeção intracitoplasmática de espermatozoide na produção *in vitro* de embriões (PIVE) (LEWIS; AITKEN, 2005).

Estudos demonstram que o processo de criopreservação provoca danos ao DNA espermático em diversas espécies (HAMMADEH et al., 2001; GURLER et al., 2016; LE et al., 2019; RARANI et al., 2019), induzidos pelo estresse oxidativo causado por espécies reativas de oxigênio (EROs) (LEWIS; AITKEN, 2005). Além disso, mudanças osmóticas na célula e os cristais de gelo formados durante este processo, provocam o relaxamento da cromatina e possibilitam a fragmentação do DNA espermático por ruptura física da estrutura terciária do complexo DNA-protamina (JOHNSTON et al., 2012). Além disso, a motilidade, a viabilidade e a integridade acrossomal e da membrana perinuclear são prejudicadas pela criopreservação do sêmen de touros (MARTÍNEZ et al., 2005).

A avaliação da cromatina não é contemplada entre os parâmetros avaliados em um espermograma de rotina, mas a relação negativa entre a sua descompactação com a fertilidade de touros e o desenvolvimento embrionário tem sido relatada em vários estudos (ENCISO et al., 2011). O desenvolvimento de técnicas que determinem a relação entre os parâmetros morfológicos destes espermatozoides e a fertilidade é talvez o maior desafio a ser superado pelos centros de inseminação artificial (FUNK, 2006).

As tecnologias de reprodução assistida vêm utilizando ferramentas sofisticadas, tais como: análise de esperma assistida por computador (AMANN; WABERSKI, 2014) e análise de citometria de fluxo (CHRISTENSEN et al., 2004) para avaliar a integridade da cromatina (GOLAN et al., 1997). No entanto, técnicas laboratoriais especializadas, como a análise morfométrica da cabeça do espermatozoide e o uso de métodos estatísticos elaborados, não são rotineiramente aplicados uma vez que demandam alto custo e maior tempo de execução (VALLE et al., 2012; VICENT-FIEL et al., 2014).



Assim, o investimento em pesquisa e o aperfeiçoamento na caracterização da estrutura cromatínica de espermatozoides submetidos ao congelamento são necessários para possibilitar a identificação de amostras de sêmen com maior fertilidade e sucesso reprodutivo. Neste contexto, o objetivo deste estudo foi de analisar a compactação cromatínica de espermatozoides bovinos através da microscopia eletrônica de transmissão submetidos à criogenia.

Metodologia

Este trabalho fez parte do projeto “RNAs espermáticos envolvidos no desenvolvimento embrionário inicial em bovinos”, e foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa de uso animal (CEUA) da Universidade Federal de Uberlândia, segundo o parecer 044/17.

Foram coletadas cinco amostras de sêmen de touros da raça Guzerá (T1, T2, T3, T4 e T5) com idades entre 24 a 36 meses. Cada amostra foi dividida em dois grupos, sendo um à fresco que não será congelado e o outro grupo submetido ao protocolo criogênico. Para as amostras à fresco, 1 mL de cada amostra foi fixada em microtubos contendo 1 mL de glutaraldeído a 2,5% tamponado em PBS pH 7,4. Já as amostras submetidas ao protocolo criogênico foram diluídas na proporção 1:3 (v/v) em diluente TRIS-gema e glicerol a 6,5% (CHACUR et al., 2012), envasadas em palhetas de 0,5 mL e congeladas automaticamente em equipamento modelo 3000 Compacta TK (Uberaba, MG, Brasil) com curva de congelamento ps2 e mantidas em nitrogênio líquido. Após um mês de condicionamento em nitrogênio líquido, 2 mL de sêmen de cada touro foram descongelados e fixados em microtubo contendo 1 mL de glutaraldeído a 2,5% tamponado em tampão salina – fostato (PBS) em pH 7,4. Tanto as amostras à fresco quanto as submetidas ao congelamento, permaneceram em geladeira por 24 horas para posterior centrifugação a 9000x G durante dez minutos. Centrifugou-se as amostras, trocando o tampão PBS entre as centrifugações por duas vezes. Após esta etapa o material foi pós-fixado em solução de tetróxido de ósmio a 1% por 1 hora. Todas as amostras foram então submetidas ao protocolo de inclusão para microscopia eletrônica de transmissão segundo Bozzola e Russell (1998). Após a polimerização do material, os blocos foram submetidos a ultramicrotomia (UltracutE; Reichert-Jung; Leica) obtendo-se

cortes ultrafinos (entre 60 e 90 nm), os quais foram contrastados com acetato de uranila e citrato de chumbo e analisados em microscópio eletrônico de transmissão HT 7700 (Hitachi Ltda; Tokyo; Japão).

Os cortes foram analisados e documentados fotograficamente, sendo que para cada amostra 100 imagens digitais com 100 cabeças de espermatozoides foram obtidas. Verificou-se a porcentagem de modificações na cromatina espermática, seguindo critérios adaptados de Alves (2016), no qual cada cabeça espermática foi classificada em um dos seguintes grupos: Grau 0 – ausência de alteração cromatínica; Grau 1 – presença de até 3 pequenos pontos claros na cromatina; Grau 2 – presença de até 6 pequenos pontos claros ou região mais clara ocupando até ¼ da cabeça espermática; Grau 3 – presença de vários pontos claros (acima de 6) ou região mais clara ocupando até metade da cabeça espermática; Grau 4 – Acima da metade da área nuclear mais clara ou grandes regiões totalmente claras na cabeça espermática.

O software Excel-Action foi utilizado nas análises estatísticas, adotando nível de significância de 95% ($\alpha \leq 0,05$). Considerando que os dados obtidos tratam-se de scores de descompactação cromatínica, utilizou-se o teste não paramétrico de Mann-Whitney com intuito de verificar a diferença estatística dos dados tanto dentro de cada grupo de alteração cromatínica quanto entre eles.

Resultados e discussão

Foram avaliadas por MET cinco amostras de sêmen bovino, totalizando 500 cabeças espermáticas analisadas. As classificações quanto aos graus de alteração da cromatina espermática estão apresentadas na Tabela 1.

A partir das análises das eletromicrografias observou-se que nenhuma amostra de sêmen submetida à criopreservação apresentou ausência de alteração nuclear (Grau 0).

A Figura 1 apresenta os graus de descompactação encontrados neste estudo e a base de suas classificações. Já na Figura 2 pode-se observar um aumento progressivo das alterações cromatínicas mais graves devido a criopreservação (Graus 3 e 4) e consequente diminuição das alterações menos graves (Graus 0, 1 e 2). Considerando a média dos grupos, tanto os dados referentes ao Grau 1 quanto ao Grau 3, apresentaram diferença estatística, porém com perfis diferentes. Enquanto o congelamento diminuiu o aparecimento de poucos pontos de des-



compactação cromatínica (Grau 1) no sêmen analisado, este método aumentou a frequência de vários pontos claros de descompactação cromatínica ocu-

pando até a metade da cabeça espermática (Grau 3).

Tabela 1: Porcentagem de cada classificação dos graus de descompactação cromatínica de espermatozoides bovinos antes e após a criopreservação. **Legenda:** 0 – Ausência de alteração nuclear; 1 – Presença de até 3 pequenos pontos claros na cromatina; 2 – Presença de até 6 pequenos pontos claros ou região mais clara ocupando até ¼ da cabeça espermática; 3 – Presença de vários pontos claros (acima de 6) ou região mais clara ocupando até metade da cabeça espermática; 4 – Acima da metade da área nuclear mais clara ou grandes regiões total-

Grau de Descom pactação	À fresco (%)					Criopreservado (%)				
	T1	T2	T3	T4	T5	T1	T2	T3	T4	T5
0	2,2	0,96	2,91	7,96	0	0	0	0	0	0
1	23,7	35,6	33	38	8,85	5,94	5,17	23	7,27	1,59
2	31,8	33,6	30,1	40,7	46,9	23,8	27,6	37	32,7	26,2
3	41,5	27,9	33	13,3	43,4	59,4	55,2	40	59,1	71,4
4	0,74	1,92	0,97	0	0,88	10,9	12,1	0	0,91	0,79

Ao analisarmos se o processo de criopreservação alterou a quantidade média de descompactação cromatínica nas amostras de sêmen bovino analisadas, observou-se um aumento significativo destas alterações em comparação às amostras que não foram submetidas a este protocolo de criogenia independente do Grau de descompactação apresentado (Figura 3).

Alves (2016) observaram regiões ou pontos mais claros devido à menor compactação dos toroides de protamina na cromatina espermática de bovinos, semelhantemente aos resultados aqui encontrados. É importante ressaltar que toroides de protaminas nada mais são do que aproximadamente 50.000 pb de DNA firmemente enrolados pelas protaminas, formando uma estrutura em forma de “donut” (rosca) ou toroide na cromatina espermática. Beletti (2013) afirmou que essas alterações podem levar a distúrbios durante o desenvolvimento embrionário, o que foi corroborado pelo mesmo grupo de pesquisa em 2021 ao demonstrar que espermatozoides com 5% ou mais de descompactação cromatínica apresentaram interferência na fertilidade do touro, uma vez que diminuíram a produção de embriões *in vitro* (PIVE) (HIRAIWA et al., 2021). Embora Perdrix e colaboradores (2011), tenha sugerido que a presença de grandes vacúolos nucleares em espermatozoides humanos com tamanho superior a 13% da área total da cabeça espermática não apresente correlação com a fragmentação do DNA, diversos trabalhos associam tais vacúolos à anomali-

as acrossomais (KACEM et al., 2010; PERDRIX et al., 2011; LAVOLPE et al., 2015). Por outro lado, estes vacúolos, especialmente quando ocupam mais de 50% da superfície nuclear, têm sido associados ao aumento na fragmentação e desnaturação de DNA (FRANCO et al., 2008, 2011; GAROLLA et al., 2008), bem como à baixa eficiência nas técnicas de reprodução assistida (BERKOVITZ et al., 2006).

É comprovado que processos de congelamento espermático diminuem a motilidade e o sucesso da fertilização (MARTINS et al., 2007), e afetam negativamente a integridade do DNA (LE et al., 2019). Nishizono (2004) ainda relata a perda da capacidade de fertilização em camundongos C57BL/6 devido à criopreservação espermática.

Por meio de microscopia e estudando espermatozoides humanos, Spanò e colaboradores (1999) constataram grande deterioração na maior parte de suas amostras após criopreservação e descongelamento.

Até o momento, é muito escasso o conhecimento sobre os efeitos ultraestruturais causados pela criogenia em sêmen de touros, procedimento rotineiramente utilizado em protocolos de reprodução animal assistida. A análise em MET de espermatozoides submetidos à criogenia, proposta nesta pesquisa, certamente implementou esta ferramenta na análise de possíveis alterações cromatínicas neste contexto. Estudos complementares devem ser realizados a fim de comprovar se a criopreservação é um fator limitante no sucesso de técnicas de repro-

dução como a Fertilização *In Vitro* (FIV). Ressaltando que o cenário brasileiro denota a grande importância em tais estudos, uma vez que o Brasil é um dos maiores produtores de carne bovina do mundo,

além de ser um dos principais centros de melhoramento genético para reprodução de taurinos puro de origem (PO), sobretudo na região do Triângulo Mineiro.

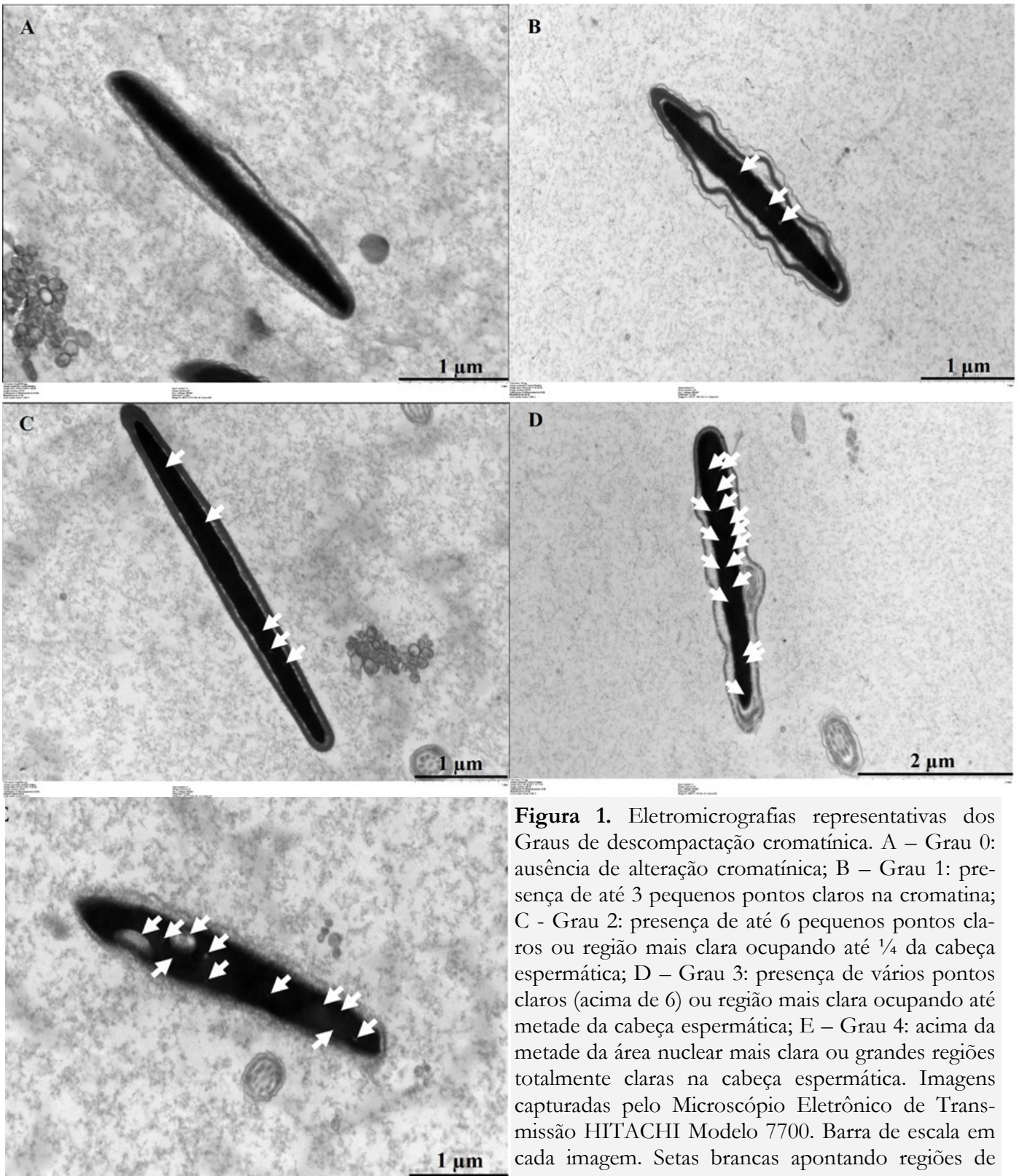


Figura 1. Eletromicrografias representativas dos Graus de descompactação cromatínica. A – Grau 0: ausência de alteração cromatínica; B – Grau 1: presença de até 3 pequenos pontos claros na cromatina; C - Grau 2: presença de até 6 pequenos pontos claros ou região mais clara ocupando até $\frac{1}{4}$ da cabeça espermática; D – Grau 3: presença de vários pontos claros (acima de 6) ou região mais clara ocupando até metade da cabeça espermática; E – Grau 4: acima da metade da área nuclear mais clara ou grandes regiões totalmente claras na cabeça espermática. Imagens capturadas pelo Microscópio Eletrônico de Transmissão HITACHI Modelo 7700. Barra de escala em cada imagem. Setas brancas apontando regiões de

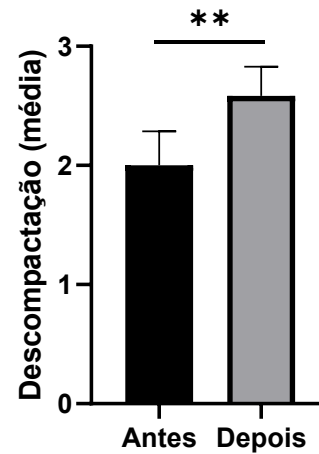
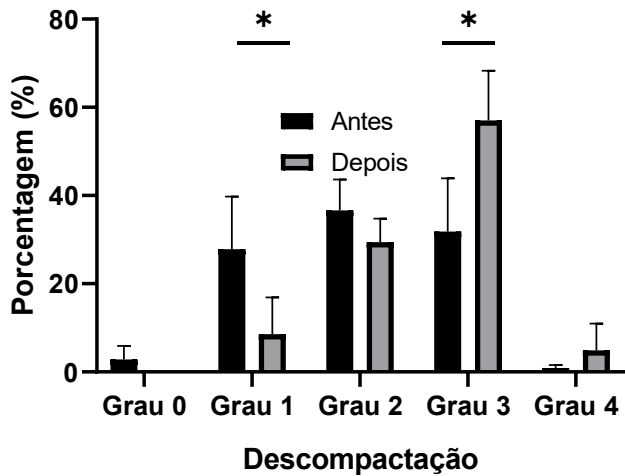


Figura 2. Descompactação média da cromatina espermática de bovinos antes e após o protocolo de criopreservação analisadas em Microscopia Eletrônica de Transmissão em relação a cada Grau de descompactação. Aplicação do teste de Mann-Whitney para análise estatística dos dados adotando nível de significância de 95% ($*\alpha \leq 0,05$).

Figura 3. Descompactação média da cromatina espermática de bovinos antes e após o protocolo de criopreservação analisada em Microscopia Eletrônica de Transmissão. Aplicação do teste de Mann-Whitney para análise estatística dos dados adotando nível de significância de 95% ($**\alpha \leq 0,005$).

Conclusão

A descompactação da cromatina espermática de sêmen bovino é um excelente indicador da fertilidade do touro conforme resultados alcançados na produção de embriões *in vitro* (PIVE). Neste contexto, o protocolo de criopreservação adotado neste estudo aumentou significativamente a descompactação cromatínica de espermatozoides bovinos avaliados por microscopia eletrônica de transmissão (MET). Diversos antioxidantes bem como protocolos alternativos de criogenia vêm sendo testados e validados com o intuito de reduzir tais alterações cromatínicas. Assim, estudos como este ampliam e aprimoram o conhecimento de técnicas úteis na avaliação dos efeitos criogênicos neste contexto, garantindo assim maior eficiência na reprodução assistida em bovinos.

Referências

ALVES, P. H. M. **Correlação entre vacúolos nucleares de espermatozoides de touro identificados por microscopia eletrônica de transmissão e a eficiência na fertilização *in vitro***. 2016. 43f. Dissertação - Mestrado em Ciências Veterinárias - Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2016.

AMANN, R.P.; WABERSKI, D. Computer-assisted sperm analysis (CASA): capabilities and potential developments. **Theriogenology**, v. 81, p.

5–17, 2014.

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

BERKOVITZ, A.; ELTES, F.; LEDERMAN, H.; PEER, S.; ELLENBOGEN, A.; FELDBERG, B.; BARTOOV, B. How to improve IVF-ICSI outcome by sperm selection. **Reproductive Biomedicine Online**, v.12, p.634–638, 2006.

BOZZOLA, J.J.; RUSSELL, L.D. **Electron microscopy: principles and techniques for biologists**. 2 ed. Sudbury: Jones and Bartlett Publishers, 1998. 670p.

CHACUR, M.G.M.; DIAS, H.S.; PAPA, F.O.; LOUVISON, B.A.; CALESCO, M.M.; PAPA, P.M. Efeito de meios diluentes na viabilidade de sêmen congelado bovino. **Veterinária e Zootecnia**, v.19, p.346-355, 2012.

CHRISTENSEN, P.; STENVANG, J.P.; GODFREY, W.L. A flow cytometric method for rapid determination of sperm concentration and viability in mammalian and avian semen. **Journal of Andrology**, v. 25, p. 255–64, 2004.

ENCISO, M.; CISALE, H.; JOHNSTON, S.D.;



- SARASA, J.; FERNANDEZ, J.L.; GOSÁLVEZ, J. Major morphological sperm abnormalities in the bull are related to sperm DNA damage. **Theriogenology**, v.76, p.23-32, 2011.
- FRANCO J.G. Jr., BARUFFI, R.L.; MAURI, A.L.; PETERSEN, C.G.; OLIVEIRA, J.B.; VAGNINI, L. Significance of large nuclear vacuoles in human spermatozoa: implications for ICSI. **Reproductive Biomedicine Online**, v.17, p.42-5, 2008.
- FRANCO, J.G.Jr.; MAURI, A.L.; PETERSEN, C.G.; MASSARO, F.C.; SILVA, L.F.I.; FELIPE, V.; CAVAGNA, M.; PONTES, A.; BARUFFI, R.L.R.; OLIVEIRA, J.B.A.; VAGNINI, L.D. Large nuclear vacuoles are indicative of abnormal chromatin packaging in human spermatozoa. **International Journal of Andrology**, v.35, p.46-51, 2011.
- FUNK, D.A. Major advances in globalization and consolidation of the artificial insemination industry. **Journal of Dairy Science**, v, 89, p. 1362-8, 2006.
- GAROLLA, A.; FORTINI, D.; MENEGAZZO, M.; DE TONI, L.; NICOLETTI, V.; MORETTI, A.; SELICE, R.; ENGL, B.; FORESTA, C. High-power microscopy for selecting spermatozoa for ICSI by physiological status. **Reproductive Biomedicine Online**, v.17, p.610-616, 2008.
- GOLAN, R.; COOPER, T.G.; OSCHRY, Y.; OBERPENNING, F.; SCHULZE, H.; SHOCHAT, L.; LEWIN, L.M. Changes in chromatin condensation of human spermatozoa during epididymal transit as determined by flow cytometry. **Human Reproduction**, v. 11, p.1457-1462, 1996.
- GOLAN, R.; SHOCHAT, L.; WEISSENBERG, R.; SOFFER, Y.; MARCUS, Z.; OSCHRY Y; et al. Evaluation of chromatin condensation in human spermatozoa: a flow cytometric assay using acridine orange staining. **Molecular Human Reproduction**, v. 3, p. 47-54, 1997.
- GURLER, H.; MALAMA, E.; HEPPELMANN, M.; CALISICI, O.; LEIDING, C.; KASTELIC, J. P.; BOLLWEIN, H. Effects of cryopreservation on sperm viability, synthesis of reactive oxygen species, and DNA damage of bovine sperm. **Theriogenology**, v.86, p.562-571, 2016.
- HAMMADEH, M.E.; STREHLER, E.; ZEGIN-ADOU, T.; ROSENBAUM, P.; SCHMIDT, W. Chromatin decondensation of human sperm *in vitro* and its relation to fertilization rate after icsi. **Archives of Andrology**, v.47, p.83-7, 2001.
- HIRAIWA, S. H.; ALVES, P. H. M.; TRAVENÇOLO, B. A. N.; MARTINS, M. C.; BELETTI, M. E. Classification of the sperm chromatin compaction alterations in bulls (*Bos taurus*) and its correlation with the efficiency of the *in vitro* production of embryos. **Bioscience Journal**, v. 37, e37028, 2021.
- JOHNSTON, S.D.; SATAKE, N.; ZEE, Y.; LOPEZ-FERNANDEZ, C.; HOLT, W.V.; GOSALVEZ, J. Osmotic stress and cryoinjury of koala sperm: an integrative study of the plasma membrane, chromatin stability and mitochondrial function. **Reproduction**, v.143, p.787-97, 2012.
- KACEM, O.; SIFER, C.; BARRAUD-LANGE, V.; DUCOT, B.; DE ZIEGLER, D.; POIROT, C.; WOLF, J. Sperm nuclear vacuoles, as assessed by motile sperm organellar morphological examination, are mostly of acrosomal origin. **Reproductive Biomedicine Online**, v. 20, p.132-7, 2010.
- KASIMANICKAM, R.; NEBEL, R.L.; PEELER, I.D.; SILVIA, W.L.; WOLF, K.T.; MCALLISTER, A.J.; et al. Breed differences in competitive indices of Holstein and Jersey bulls and their association with sperm DNA fragmentation index and plasma membrane integrity. **Theriogenology**, v. 66, p. 1307-15, 2006.
- LAVOLPE, M.; LORENZI, D.; GRECO, E.; NODAR, F.; SEDÓ, C. A. Relationship Between Sperm DNA Fragmentation and Nuclear Vacuoles. **JBRA Assisted Reproduction**, v. 19, p.70-74, 2015.
- LE, M. T.; NGUYEN, T. T. T.; NGUYEN, T. T.; NGUYEN, T. V.; NGUYEN, T. A. T.; NGUYEN, Q. H. V.; CAO, T. N. Does conventional freezing affect sperm DNA fragmentation? **Clinical and Experimental Reproductive Medicine**, v. 46, p. 67-75, 2019.
- LEWIS, S.E.; AITKEN, R.J. DNA damage to spermatozoa has impacts on fertilization and pregnancy. **Cell and Tissue Research**, v. 322, p.

- 33–41, 2005.
- 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, p. 924-33, 2016.
- MARTÍNEZ, C.O.; JUÁREZ-MOSQUEDA, M.L.; HERNÁNDEZ, J.; VALENCIA, J. Cryopreservation of bull spermatozoa alters the perinuclear theca. **Theriogenology**, v. 66, p. 1969-1975, 2005.
- MARTINS, C. F.; BÁO, S. N.; DODE, M. N.; CORREA, G. A.; RUMPF, R. Effects of freeze-drying on cytology, ultrastructure, DNA fragmentation, and fertilizing ability of bovine sperm. **Theriogenology**, v. 67, p.1307-1315, 2007.
- MARTINS, M.C.; GONÇALVES, L.M.; NONATO, A.; NASSIF TRAVENÇOLO, B.B.; 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.
- NISHIZONO, H.; SHIODA, M.; Takeo, T.; IRIE, T.; NAKAGATA, N. Decrease of Fertilizing Ability of Mouse Spermatozoa after Freezing and Thawing Is Related to Cellular Injury. **Biology of Reproduction**, v.71, p.973-978, 2004.
- PERDRIX, A.; TRAVERS, A.; CHELLI, M.H.; ESCALIER, D.; DO REGO, J.L.; MILAZZO, J.P.; MOUSSET-SIMÉON, N.; MACÉ, B.; RIVES, N. Assessment of acrosome and nuclear abnormalities in human spermatozoa with large vacuoles. **Human Reproduction**, v.26, p.47-58, 2011.
- RARANI, F. Z.; GOLSHAN-IRANPOUR, F.;DASHI, G. R. Correlation between sperm motility and sperm chromatin/ DNA damage before and after cryopreservation and the effect of folic acid and nicotinic acid on post-thaw sperm quality in normozoospermic men. **Cell and Tissue Banking**, v. 20, p. 367-378, 2019.
- 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, p. 177-181, 2018.
- SPANÒ, 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.
- VALLE, R.R.; NAYUDU, P.L.; LEAL, C.L.; GARCÍA-HERREROS M. Sperm head morphometry in ejaculates of adult marmosets (*Callithrix jacchus*): a model for studying sperm subpopulations and among-donor variations. **Theriogenology**, v. 78, p. 1152–65, 2012.
- VICENTE-FIEL, S.; PALACÍN, I.; SANTOLARIA, P.; FANTOVA, E.; QUINTÍN-CASORRÁN, F.J.; SEVILLA-MUR, E.; et al. *In vitro* assessment of sperm quality from rams of high and low field fertility. **Animal Reproduction Science**, v. 146, p.15–20, 2014.