

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS - UFU
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Giuliana Palombo Gaspar

**Uso das colorações de azul de toluidina e reação de Feulgen para avaliação de alterações
cromatínicas em espermatozoides de garanhões**

Uberlândia - MG

2024

Uso das colorações de azul de toluidina e reação de Feulgen para avaliação de alterações cromatínicas em espermatozoides de garanhões

Trabalho de conclusão de curso apresentado como requisito para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas pela Universidade Federal de Uberlândia/MG.

Orientador: Marcelo Emílio Belletti.

Uberlândia - MG

2024

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS - UFU
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Uso das colorações de azul de toluidina e reação de Feulgen para avaliação de alterações
cromatínicas em espermatozoides de garanhões

Giuliana Palombo Gaspar

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Emílio Beletti

Homologado pela coordenação do curso de
Biologia em __/__/____

Uberlândia – MG
2024

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS - UFU
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Uso das colorações de azul de toluidina e reação de Feulgen para avaliação de alterações
cromatínicas em espermatozoides de garanhões

Giuliana Palombo Gaspar

Aprovado pela Banca Examinadora em: / / Nota: ____

Nome e assinatura do Presidente da Banca Examinadora

Uberlândia, de de

Dedico esse trabalho aos meus familiares, que me deram a base para crescer e alcançar meus objetivos.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por me presentear todos os dias com sua presença, por me sustentar e me proteger em todos os momentos que precisei.

Agradeço a minha mãe Valéria por sempre me ajudar em tudo que podia, por cuidar de mim mesmo de longe e por todo seu apoio e amor imensuráveis. Agradeço ao meu pai Odair que sempre fez de tudo para que eu pudesse alcançar meus objetivos, por ter me fornecido o maior amor e cuidado que já senti, todo apoio em minhas escolhas, os direcionamentos, tudo que consegui alcançar e que ainda vou alcançar, eu devo a eles. A minha irmã por sempre estar presente, por dividir seus sonhos comigo e sempre me dar esse suporte fraternal tão significativo. Ao meu cunhado Jonas por sempre me mostrar um caminho leve e bonito para se olhar na vida, conseguindo me tirar muitas aflições. Ao meu namorado Matheus por sempre tentar me deixar confortável, por colocar como um dos seus objetivos principais me fazer feliz. A todos os meus tios, tias, primos, primas e meu avô, por mesmo de longe torcerem por mim, orarem e tornarem minha vida mais especial com a união dessa grande família.

Agradeço às minhas amigas Marias Ffis: Amanda, Bruna Gentil, Bruna Scuccuglia, Júlia, Lara, Lorena, Marcela, Maria Paula e Maria Cecília por tornarem a minha experiência universitária mais feliz, leve e com um acolhimento tão familiar. Aos meus amigos de São Carlos por estarem comigo nos meus melhores e piores momentos, sem nunca saírem de perto de mim. Ao meu time de Cheerleading por todas as amizades que construí e por terem me mostrado um outro lado muito bom de se viver as coisas.

Agradeço à Luisa e ao Muller por terem aceitado fazer parte da minha banca e por sempre estarem tão dispostos a me ajudar.

Agradeço ao meu orientador Marcelo Emílio Beletti, por todo incentivo, paciência, auxílio, dedicação, ensinamentos e por sempre ter acreditado em mim.

E, por fim, à Universidade Federal de Uberlândia e a todos os professores que participaram da minha formação profissional e pessoal.

LISTA DE TABELA

Tabela 1: Média (%) e desvio padrão de todas as variáveis numéricas avaliadas.....21

Tabela 2: Índice de correlação de Spearman (R) e valor de P entre a prenhez das éguas e cada uma das variáveis avaliadas.....22

LISTA DE ABREVIACÃO

AT	Azul de toluidina
FG	Feulgen
IA	Inseminação Artificial
TE	Transferência de embriões
FIV	Fertilização in vitro
ICSI	Injeção intracitoplasmática de espermatozoides
difAT	Diferença percentual média de descompactação da cromatina em relação a cabeças padrões com AT
difFG	Diferença percentual média de descompactação da cromatina em relação a cabeças padrões com Feulgen
hetAT	Heterogeneidade porcentual da cromatina com AT
hetFG	Heterogeneidade porcentual da cromatina com Feulgen
alt%AT	Porcentagem de espermatozoides com regiões de descompactação da cromatina com AT
alt%FG	Porcentagem de espermatozoides com regiões de descompactação da cromatina com Feulgen
ATDB	Descompactação da base com azul de toluidina
FDB	Descompactação da base pelo método Feulgen
ATDMB	Descompactação da metade basal com azul de toluidina
FDMB	Descompactação da metade basal pelo método Feulgen
ATDEC	Descompactação do eixo central com azul de toluidina
FDEC	Descompactação do eixo central pelo método Feulgen
ATDBA	Descompactação base-ápice com azul de toluidina
FDBA	Descompactação base-ápice pelo método Feulgen
ATDD	Descompactação dispersa com azul de toluidina
FDD	Descompactação dispersa pelo método Feulgen
ATDT	Descompactação total com azul de toluidina
FDT	Descompactação total pelo método Feulgen

RESUMO

Muitos garanhões com esperma considerado normal em exames de rotina ainda enfrentam problemas de fertilidade, que podem estar ligados a alterações na cromatina dos espermatozoides. Métodos de avaliação da estrutura cromatínica, como a coloração com azul de toluidina 4N (AT) e a reação de Feulgen (FG), são utilizados para identificar tais alterações, como quebras de DNA e baixa compactação. Nesse contexto, foi proposto avaliar a análise de imagem computacional de esfregaços de sêmen corados com AT e FG. Neste estudo, foram analisadas 40 amostras de sêmen de garanhões, as quais foram submetidas à coloração com AT e FG, e avaliadas por meio de análise de imagem computacionais. Parâmetros como a porcentagem de espermatozoides com áreas de descompactação, heterogeneidade da cromatina, diferença da compactação cromatínica em relação a espermatozoides normais e a porcentagem de seis tipos de descompactação, segundo o local da descompactação na cabeça espermática foram analisadas. Todas as amostras de sêmen foram utilizadas em inseminação artificial e a prenhez das éguas foi verificada por ultrassom após dois meses. Foi realizado o teste de correlação de Spearman entre as variáveis espermáticas e a prenhez das éguas. Os resultados mostraram que nenhum dos métodos testados teve correlação significativa com a prenhez. A coloração com FG apresentou limitações, com 33 amostras exibindo 100% de espermatozoides com um dos tipos de alteração cromatínica. Este é o primeiro trabalho a empregar algoritmos para análise de imagem computacional de cromatina espermática de equinos, tanto com azul de toluidina quanto com ocorrência de Feulgen, o que ressalta seu potencial para futuras investigações nesta área. Nessas condições, a existência de correlação negativa, mesmo que não significativa, entre a prenhez e a descompactação total e dispersa da cromatina e a diferença percentual quando utilizada reação de Feulgen, e a diferença percentual e heterogeneidade, quando utilizada a coloração com AT, demonstram que estas variáveis têm potencial para serem utilizadas na avaliação da fertilidade de garanhões.

Palavras-chave: cromatina, equino, sêmen, fertilidade, inseminação artificial.

ABSTRACT

Many stallions with sperm deemed normal in routine examinations still face fertility issues, which may be linked to alterations in sperm chromatin. Chromatin structure assessment methods, such as staining with toluidine blue 4N (TB) and the Feulgen reaction (FR), are used to identify these alterations, including DNA fragmentation and poor chromatin compaction. In this context, a computational image analysis of semen smears stained with TB and FR was proposed. In this study, 40 semen samples from stallions were stained with TB and FR and evaluated using computational image analysis. Parameters such as the percentage of sperm with decompaction areas, chromatin heterogeneity, differences in chromatin compaction relative to normal sperm, and the percentage of six types of decompaction based on the decompaction site in the sperm head were analyzed. All semen samples were used in artificial insemination, and pregnancy in mares was confirmed by ultrasound after two months. Spearman's correlation test was performed between sperm variables and pregnancy outcomes. The results showed that none of the tested methods had a significant correlation with pregnancy rates. The FR staining method presented limitations, with 33 samples showing 100% of sperm with one type of chromatin alteration. This is the first work to employ algorithms for computational image analysis of equine sperm chromatin, both with toluidine blue and with Feulgen occurrence, which highlights its potential for future investigations in this area. Under these conditions, a negative, albeit non-significant, correlation between pregnancy and both total chromatin decompaction and dispersion, as well as the percentage difference when using Feulgen staining, and the percentage difference and heterogeneity when using TB staining, suggest that these variables have potential for evaluating stallion fertility.

Keywords: chromatin, equine, semen, fertility, artificial insemination.

SUMÁRIO

1.INTRODUÇÃO.....	11
2.OBJETIVOS.....	16
2.1 Geral.....	16
2.2 Específico.....	16
3.METODOLOGIA	17
4.RESULTADOS.....	19
5. DISCUSSÃO.....	23
6.CONCLUSÃO	25
7.REFERÊNCIAS.....	26

1. Introdução

O Brasil ocupa a terceira posição no mundo em termos de rebanho equino, contando com aproximadamente 5,8 milhões de animais (ALLAN, 2021; IBGE, 2023), ficando atrás somente dos Estados Unidos (10,7 milhões) e México (6,3 milhões) (ALLAN, 2021). Na equinocultura, práticas como a inseminação artificial (IA) e a coleta e transferência de embriões (TE) são bastante comuns. No entanto, outras técnicas como superovulação, congelamento de embriões, fertilização in vitro (FIV), injeção intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI) (Lange-Consiglio et al., 2009; Smits et al., 2012a; Zaniboni et al., 2012), transferência de oócitos (Hinrichs, 2010), transferência intrafalopiana de gametas (GIFT) e congelamento de oócitos surgiram há alguns anos como biotecnologias inovadoras.

Na equinocultura, a inseminação artificial (IA) destaca-se como uma das biotecnologias mais amplamente utilizadas para maximizar a eficiência reprodutiva de éguas e garanhões. Essa técnica permite o transporte de material genético de alta qualidade a longas distâncias, facilitando o manejo e a preservação de características genéticas desejáveis (Samper, 2009). No entanto, embora a IA dependa de parâmetros como motilidade, vigor e concentração espermática para avaliar a qualidade do sêmen, estudos indicam que esses fatores nem sempre são suficientes para garantir o sucesso reprodutivo. Em alguns casos, mesmo com sêmen considerado de boa qualidade e éguas sem histórico de problemas reprodutivos, a concepção não ocorre (Aurich, 2012).

Essa limitação destaca a necessidade de investigar outros fatores que influenciam a fertilidade, como danos à cromatina espermática, que podem comprometer o potencial de fecundação, mesmo quando os parâmetros espermáticos tradicionais estão dentro dos padrões aceitáveis (Ball, 2008). Nesse contexto, a avaliação da capacidade de fecundação dos espermatozoides representa um passo essencial no processo de capacitação espermática, auxiliando na identificação de possíveis causas de insucesso nos programas de IA (Muradas, Weiss, & Kozicki, 2013).

Nos mamíferos, a estrutura do gameta masculino é composta por uma cabeça e uma cauda, com a cabeça contendo o acrossoma, o núcleo e uma pequena quantidade de citoplasma (Beletti, 2013). Tradicionalmente, parâmetros como motilidade, concentração e vigor têm sido utilizados para avaliar o potencial fertilizante do sêmen. Pesquisas indicam que há uma correlação significativa entre esses parâmetros e as taxas de prenhez

em éguas. Contudo, em alguns casos, mesmo com boas condições nos parâmetros espermáticos, éguas que não apresentam histórico de problemas reprodutivos continuam a não conceber após a inseminação artificial (IA). Isso indica que esses parâmetros não são suficientes para avaliar todas as variáveis relacionadas à fertilidade espermática, sendo necessário explorar outras causas de insucesso em programas de IA, como os danos à cromatina espermática. Avaliar a capacidade de fecundação dos espermatozoides é o primeiro passo no processo de capacitação espermática (Muradas, Weiss e Kozicki 2013). Esse processo é fundamental para prever o potencial fecundante das células espermáticas, e, para isso, diversos métodos laboratoriais de análise do sêmen são empregados, permitindo a identificação de fatores que influenciam diretamente o sucesso reprodutivo. Diversas características dos espermatozoides, como motilidade, alterações morfológicas e funcionalidade do acrossoma, estão relacionadas à fertilidade (Acosta et al., 1988; Linford et al., 1976; Uwland, 1984). No caso dos garanhões, a fertilidade está associada tanto à morfologia quanto à motilidade espermática (Jasko, Lein, Foote, 1990; Jasko et al., 1992). No espermograma, as características mais frequentemente analisadas incluem a motilidade e a morfologia dos espermatozoides (Sieme et al., 2003; Ehlers et al., 2011; Hoogewijs et al., 2012). A avaliação não computadorizada do sêmen envolve análises subjetivas da concentração, feitas com o auxílio da câmara de Neubauer, da motilidade, que avalia o percentual de espermatozoides móveis com movimentos retilíneos, e da morfologia, por meio de microscopia de contraste de fase e colorações como Cerovski e trypan-blue/Giemsa (CBRA, 1998). No entanto, essas análises podem ser insuficientes, pois não consideram a estrutura interna da célula espermática, como a cromatina, composta pelo DNA e por proteínas específicas, que são indicadores importantes de funcionalidade, capacidade fecundante e desenvolvimento embrionário (Kanayama & Beletti, 2011).

A cromatina é definida como uma estrutura complexa de DNA e nucleoproteínas, organizada de maneira altamente precisa no núcleo celular, com o papel de fornecer informações vitais para a sobrevivência celular (Gordon et al., 2013). A integridade do DNA espermático pode ser comprometida em diferentes estágios, como durante a espermatogênese, espermiogênese, trânsito epididimal ou após a ejaculação (ESTEVES et al., 2021). Na fase de espermiogênese, ocorrem modificações estruturais na cromatina com o objetivo de compactá-la, protegendo assim o genoma paterno e influenciando a regulação epigenética, visto que a cromatina torna-se inativa para a transcrição. Isso limita a capacidade de reparo do DNA nos espermatozoides, o que pode resultar em danos

persistentes ao DNA em espermatozoides viáveis e/ou em apoptose incompleta (SHAMSI; IMAM; DADA, 2011; DONKIN; BARRÈS, 2018; ESTEVES et al., 2021).

As alterações na cromatina espermática podem afetar o desenvolvimento embrionário e a presença de mutações genéticas, dependendo da gravidade dos danos ao DNA e da capacidade do oócito de repará-los após a fertilização (Shamsi, Imam, & Dada, 2011). A integridade da cromatina espermática é crucial para a fecundação, implantação, embriogênese, placentação, eficiência das tecnologias de reprodução assistida e para a saúde da prole ao longo de sua vida (Shamsi et al., 2010; Dada, 2017). Durante a espermiogênese nos mamíferos, as histonas somáticas são substituídas por nucleoproteínas específicas conhecidas como protaminas. Alterações nas proteínas ou em suas proporções podem impactar a condensação da cromatina espermática, resultando em uma cromatina menos compacta (BELETTI; MELLO, 2004).

Desenvolver métodos precisos para o diagnóstico da infertilidade masculina é fundamental, pois garante a segurança e a eficácia das técnicas de reprodução assistida. Isso ajuda a evitar anomalias embrionárias, limita o comprometimento no desenvolvimento do embrião, e previne alterações cromossômicas, genéticas e epigenéticas que possam ser transmitidas a gerações futuras (LEFIÈVRE et al., 2007; OEHNINGER; BELETTI, 2019).

Em 1982, Mello desenvolveu um método para avaliar a cromatina espermática utilizando o corante azul de toluidina, que determina o grau de descondensação da cromatina (Beletti, Costa, & Guardieiro, 2005). Essa técnica já foi aplicada para avaliar a cromatina em diversas espécies, como a humana (Erenpreiss et al., 2006), bovina (Beletti, Fontoura Costa, Guardieiro, 2005), caprina e ovina (Kamimura, Jacomini, & Beletti, 2010), de galo (Rodrigues, Rocha, Beletti, 2009) e equina (Naves et al., 2004). O azul de toluidina é um corante catiônico que apresenta metacromasia, ou seja, uma mudança de cor para violeta devido à ressonância eletrônica entre moléculas de corante agrupadas. Essa propriedade é especialmente útil na detecção de anomalias na condensação da cromatina, pois quando esfregaços de espermatozoides são corados com azul de toluidina a pH 4,0, o corante se liga aos fosfatos ionizados no DNA (Mello, 1982).

Para investigar possíveis danos na cromatina espermática de equinos, o método de coloração com azul de toluidina utiliza a chamada "metacromasia induzida". Esse método consiste no tratamento ácido (HCl 4N a 25°C), seguido pela coloração com azul de toluidina em pH 4,0, na qual há uma larga variedade de tonalidades expressadas conforme a disponibilidade e proximidade de grupos fosfato do DNA não ligados à proteína, aptos a ligarem moléculas do corante (BELETTI, 1992). As moléculas do corante do AT se ligam

aos fosfatos de DNA, que não estão bloqueados por proteínas como as protaminas. Em espermatozoides com cromatina normal, a maior parte dos fosfatos encontra-se bloqueada pela protamina, permitindo que poucas moléculas de corante se liguem ao DNA. Com isso, ocorre baixa ressonância de elétrons do corante, resultando em uma coloração verde com mínima metacromasia. Já os espermatozoides com alterações na cromatina possuem maior número de fosfatos livres onde um maior número de moléculas de corante se ligam e consequentemente, ocorre mais ressonância de elétrons, gerando a metacromasia, visualizada como uma cor variando de azul escuro à magenta (BELETTI, 2013). A solução de azul de toluidina deve estar em pH 4,0 para garantir que apenas os grupos fosfatos sejam ionizados (Beletti, Costa, & Guardieiro, 2005). No entanto, esse método é eficaz apenas em espermatozoides com danos cromatínicos significativos, uma vez que a presença de metacromasia depende da quantidade de protaminas ligadas a dupla fita de DNA e da estabilidade da cromatina (Beletti, 2013; Mello, 1982; Vidal; Mello, 2019). A coloração com azul de toluidina, aliada à análise computacional de imagens, pode identificar regiões com diferentes níveis de compactação da cromatina na cabeça dos espermatozoides (Cruz et al., 2014). As cores são diferenciadas por valores de pixels, o que reduz a subjetividade e possibilita a quantificação das alterações. Além de diminuir a subjetividade, essa metodologia permite uma análise simultânea da morfometria e da cromatina de cada espermatozoide, possibilitando a correlação dessas duas características (Beletti et al., 2005; Silva et al., 2008; Kanayama e Beletti, 2011).

Outro método utilizado no estudo foi descrito por Feulgen e Rossenbeck (1924), que envolve a hidrólise ácida nos espermatozoides, que desnatura o DNA e remove as purinas (depurinação), expondo os aldeídos dos resíduos de desoxirribose e convertendo-os em ácido apurínico. Isso permite que os aldeídos reajam com o reagente de Schiff, resultando em uma coloração magenta (vermelho-púrpura) no núcleo celular, que é denominada Feulgen-positivo (DI STEPHANO, 1948; FEULGEN; ROSSSENBECK, 1924; MELLO; VIDAL 1978; MELLO; VIDAL, 2017). O comportamento do DNA diante da hidrólise ácida é representado pela curva de Feulgen, na qual o ramo ascendente indica o aumento progressivo da duração da hidrólise e, consequentemente, da depurinação, até atingir o valor máximo, representado pelo pico ou platô da curva de hidrólise (MELLO; VIDAL, 2017). Quando o tempo de hidrólise ácida ultrapassa o ponto ideal para a máxima eficiência da reação de Feulgen (fase decrescente da curva), ocorre a liberação de pirimidinas do DNA, acompanhada pela degradação gradual e solubilização dos ácidos apurínicos (despolimerização) (TAMM; HODES; CHARGAFF, 1952; ANDERSSON;

KJELLSTRAND, 1975; MELLO; VIDAL, 2017). As mudanças no padrão de despolimerização e depurinação do DNA resultam do nível de interação no complexo proteína-DNA. Assim, as variações nesse complexo e na interação entre o corante e os grupos aldeídos acontecem durante a hidrólise. Portanto, o estudo da curva de hidrólise é necessário para entender a resistência ácida do DNA em diferentes níveis de compactação, permitindo uma melhor resposta à reação de Feulgen (ANDERSSON; KJELLSTRAND, 1975).

Em 1966, Gledhill observou que alguns touros com problemas de fertilidade apresentavam espermatozoides com maior intensidade de coloração na reação de Feulgen, inicialmente atribuída a um aumento no conteúdo de DNA dessas células. Posteriormente, análises por microespectrofotometria de ultravioleta revelaram que não havia diferença na quantidade de DNA, mas sim uma alteração na estrutura do complexo DNA-proteína. Essa modificação torna a cromatina menos compacta e o DNA mais suscetível à hidrólise, permitindo à reação de Feulgen identificar espermatozoides com cromatina menos condensada, o que pode impactar a fertilidade do macho (GLEDHILL, 1966). Os níveis de compactação da cromatina influenciam diretamente a resposta à reação de Feulgen (GLEDHILL, 1966; GLEDHILL et al., 1966; MELLO; VIDAL, 1978).

2. Objetivos

2.1 Objetivo Geral

O objetivo deste trabalho foi identificar a melhor coloração para análise de imagem computadorizada da compactação da cromatina espermática em garanhões.

2.2 Objetivo específico

2.2.1. Verificar possíveis correlações entre a heterogeneidade da cromatina espermática corada com AT pH 4,0 e coradas com a reação de Feulgen e a prenhez de éguas inseminadas artificialmente.

2.2.2. Verificar possíveis correlações entre a diferença percentual média de compactação de cada cabeça em relação a cabeças padrões coradas com AT pH 4,0 e coradas com reação de Feulgen e a prenhez de éguas inseminadas artificialmente.

2.2.3. Verificar possíveis correlações entre a porcentagem de espermatozoides com regiões de descompactação da cromatina utilizando coloração com AT pH 4,0 e a coloração com a reação de Feulgen e a prenhez de éguas inseminadas artificialmente.

3. Metodologia

3.1 Coloração com azul de toluidina:

Foram utilizadas 40 alíquotas de amostras de sêmen de garanhões com idade entre cinco e 15 anos e peso entre 400 e 500 kg doados pela empresa Gallop Medicina Veterinária Equina. Alíquotas foram obtidas de todas as amostras de sêmen utilizadas nas rotinas de inseminação artificial realizada pela Gallop durante uma estação de monta (entre agosto de 2023 e abril de 2024). Seguindo a técnica utilizada por Beletti et al. (2005), foram realizados esfregaços de sêmen de todas as amostras, os quais foram fixados com etanol-ácido acético em uma proporção de 3:1 por um minuto e em etanol 70% por três minutos. Após a fixação, foi realizada hidrólise ácida por 10 minutos a 25 °C em HCl 4N. Depois de realizar a hidrólise, foi feita uma lavagem com água destilada corrente e o material foi seco em temperatura ambiente. Em seguida, foi realizada a coloração do esfregaço, depositando uma gota de solução de azul de toluidina 0,025% em tampão McIlvaine (tampão fosfato, ácido cítrico) pH 4,0 e cobrindo com lamínula. Após três minutos, foi retirado o excesso de corante encostando-se papel toalha na lateral da lâmina e rapidamente as bordas da lamínula foram vedadas com esmalte de unha.

Com as lâminas já coradas, 150 imagens digitais foram capturadas de cada esfregaço, utilizando-se um microscópio (Leica DM500) acoplado a um sistema de captura de imagens (Leica ICC50), com objetiva de imersão de 100 X, segundo a técnica utilizada por Hiraiwa et al. (2021).

3.2 Coloração com Feulgen

A reação de Feulgen é uma técnica citoquímica fundamentada em duas etapas: hidrólise ácida e exposição do material hidrolisado ao reativo de Schiff (específico para aldeído e cetona) (MELLO; VIDAL 1978; MELLO; VIDAL, 2017). Foram utilizadas 40

alíquotas das mesmas amostras de sêmen utilizadas na coloração com azul de toluidina. A primeira etapa da técnica consistiu na realização de esfregaços e fixação de forma semelhante à realizada com AT. Após a fixação, procedeu-se à hidrólise ácida em HCl 4 N, mantida à temperatura ambiente por 45 minutos. Em seguida, as lâminas foram lavadas em água destilada 10 vezes. Utilizando uma pipeta Pasteur, aplicou-se o reagente de Schiff sobre a lâmina até cobrir completamente o esfregaço, incubando-se com o reagente por 60 minutos à temperatura ambiente. Após a coloração, seguiu-se banhos de desidratação em séries de álcoois de 70%, 85%, 95% e álcool absoluto I, II e III, durante 3 minutos cada. Em seguida, realizou-se banhos em xilol I, II e III, também por 3 minutos cada. A montagem da lâmina foi feita com goma de Damar, aplicando-se duas gotas sobre a lâmina e posicionando a lamínula sobre o esfregaço.

Com as lâminas já coradas, 150 imagens digitais foram capturadas de cada esfregaço, utilizando-se um microscópio (Leica DM500) acoplado a um sistema de captura de imagens (Leica ICC50), com objetiva de imersão de 100 X, segundo a técnica utilizada por Hiraiwa et al. (2021).

3.3 Análise das imagens

Após a captura das 150 imagens das 40 amostras de sêmen coradas com azul de toluidina e 150 imagens de 40 amostras submetidas à reação de Feulgen, cabeças de espermatozoides foram segmentadas (isoladas e colocadas em uma imagem com fundo preto) utilizando-se um algoritmo desenvolvido em MATLAB e executada no software OCTAVE (CRUZ; BELETTI; TRAVENÇOLO, 2014; MARTINS et al., 2021).

As imagens das cabeças segmentadas dos esfregaços corados com AT e reação de Feulgen foram analisadas por outro algoritmo desenvolvido em Scilab, onde foram calculadas a diferença de compactação de cada cabeça em relação a cabeças padrões, sendo feita ao final a média destas diferenças em cada amostra (difAT e difFG). Utilizado o mesmo algoritmo, também foi calculado o coeficiente de variação dos valores dos pixels de cada cabeça, representando a heterogeneidade da compactação da cromatina. Ao final, também foi calculada a heterogeneidade média de cada amostra (hetAT e hetFG) (BELETTI, COSTA, GUARDIEIRO, 2005, HIRAIWA et al., 2021).

Utilizando-se um terceiro algoritmo desenvolvido em MATLAB e executada no software OCTAVE, foram identificadas a existência ou não de regiões de menor compactação da cromatina em cada cabeça. As cabeças com essas regiões foram consideradas portadoras de alteração na cromatina espermática (HIRAIWA et al., 2021).

Foi calculada a porcentagem de espermatozoide com anomalias na cromatina em cada amostra (alt%AT e alt%FG). As alterações de cromatina também foram classificadas em seis tipos de acordo com a localização da região descompactada: descompactação da base (ATDB e FDB), descompactação da metade basal (ATDMB e FDMB), descompactação do eixo central (ATDEC e FDEC), descompactação base-ápice (ATDBA e FDBA), descompactação dispersa (ATDD e FDD) e descompactação total (ATDT e FDT) (HIRAIWA et al., 2021).

3.4 Análise estatística

Todas as amostras foram utilizadas para inseminação artificial de éguas que comprovadamente tenha ovulado. Após dois meses foi verificada a prenhez das éguas por uso de ultrassom. Foram calculados média e desvio padrão de todas as variáveis numéricas. Também foi realizado teste de correlação de Spearman para verificar possíveis correlações entre os métodos e a prenhez das éguas. Foram consideradas significativas as correlações que apresentaram valor de $P < 0,05$.

4. Resultados

A porcentagem de éguas prenhas após dois meses da inseminação artificial foi de 62,5%.

As médias e desvios padrões de cada variável numérica avaliada estão demonstrados na tabela 1.

Já a tabela 2 mostra os coeficientes de correlação (R) e o valor de P entre a prenhez das éguas e cada uma das variáveis avaliadas.

Nenhuma das variáveis analisadas apresentaram correlação significativa ($p < 0,05$) com a prenhez das éguas.

É importante salientar que quando utilizada a reação de Feulgen, 33 amostras deram 100% de espermatozoides com regiões de descompactação e outras sete amostras tiveram mais de 92% de espermatozoides com regiões de descompactação. Isso refletiu na média de todas as amostras, que foi de 99,67% (tabela 1). Já, quando utilizada coloração com AT, a média foi de 65,46% e o número de amostras com 100 % de espermatozoides com regiões de descompactação cromatínica foi de apenas seis amostras.

Tabela 1: Média (%) e desvio padrão de todas as variáveis numéricas avaliadas.

Variável	Média	Desvio padrão
AT dif	6,18	2,66
AT het	8,82	4,79
FG dif	6,12	1,04
FG het	23,81	2,27
% an AT	65,46	33,28
% an FG	99,67	1,17
ATDB	14,48	9,88
ATDMB	10,57	13,11
ATDEC	3,95	5,51
ATDBA	23,39	21,46
ATDD	12,15	15,15
ATDT	0,92	1,14
FDB	22,25	10,23
FDMB	26,08	11,01
FDEC	9,93	7,07
FDBA	38,82	12,66
FDD	1,29	2,36
FDT	1,30	3,88

AT dif: diferença percentual de descompactação da cromatina em relação a cabeças padrões com AT; **AT het:** Heterogeneidade percentual da cromatina com AT; **FG dif:** diferença percentual de descompactação da cromatina em relação a cabeças padrões com Feulgen; **FG het:** Heterogeneidade percentual da cromatina com Feulgen; **% an AT:** porcentagem de espermatozoides com regiões de descompactação da cromatina com AT; **% an FG:** porcentagem de espermatozoides com regiões de descompactação da cromatina com Feulgen; **ATDB, ATDMB, ATDEC, ATDBA, ATDD, ATDT:** porcentagem de espermatozoides corados com AT e que apresentaram regiões de descompactação na base da cabeça, até próximo à metade basal da cabeça, no eixo central da cabeça, na base e ápice da cabeça, dispersa pela cabeça e em toda a cabeça, respectivamente; **FDB, FDMB, FDEC, FDBA, FDD, FDT:** porcentagem de espermatozoides corados com reação de Feulgen e que apresentaram regiões de descompactação na base da cabeça, até próximo à metade basal da cabeça, no eixo central da cabeça, na base e ápice da cabeça, dispersa pela cabeça e em toda a cabeça, respectivamente.

Tabela 2: Índice de correlação de Spearman (R) e valor de P entre a prenhez das éguas e cada uma das variáveis avaliadas.

Variável	PRENHEZ	
	R	P
AT dif	-0,02	0,92
AT het	-0,06	0,73
FG dif	-0,10	0,55
FG het	0,05	0,77
% an AT	0,21	0,20
% an FG	0,04	0,80
ATDB	0,16	0,32
ATDMB	0,17	0,29
ATDEC	0,23	0,15
ATDBA	0,29	0,07
ATDD	0,00	0,99
ATDT	0,13	0,43
FDB	0,02	0,89
FDMB	0,07	0,67
FDEC	0,05	0,74
FDBA	0,03	0,84
FDD	-0,07	0,68
FDT	-0,13	0,42

AT dif: diferença percentual de descompactação da cromatina em relação a cabeças padrões com AT; **AT het:** Heterogeneidade percentual da cromatina com AT; **FG dif:** diferença percentual de descompactação da cromatina em relação a cabeças padrões com Feulgen; **FG het:** Heterogeneidade percentual da cromatina com Feulgen; **% an AT:** porcentagem de espermatozoides com regiões de descompactação da cromatina com AT; **% an FG:** porcentagem de espermatozoides com regiões de descompactação da cromatina com Feulgen; **ATDB, ATDMB, ATDEC, ATDBA, ATDD, ATDT:** porcentagem de espermatozoides corados com AT e que apresentaram regiões de descompactação na base da cabeça, até próximo à metade basal da cabeça, no eixo central da cabeça, na base e ápice da cabeça, dispersa pela cabeça e em toda a cabeça, respectivamente; **FDB, FDMB, FDEC, FDBA, FDD, FDT:** porcentagem de espermatozoides corados com reação de Feulgen e que apresentaram regiões de descompactação na base da cabeça, até próximo à metade basal da cabeça, no eixo central da cabeça, na base e ápice da cabeça, dispersa pela cabeça e em toda a cabeça, respectivamente.

5. Discussão

Muitos garanhões com resultados normais em exames de rotina de espermatozoides enfrentam desafios de fertilidade. Uma das principais razões para esses problemas está relacionada a mudanças na estrutura da cromatina dos espermatozoides, que não são avaliadas nos exames de rotina. É importante destacar que diferentes métodos identificam tipos distintos de alterações na estrutura cromatínica, como quebras de DNA, baixa compactação e susceptibilidade a danos na cromatina (BELETTI, 2013).

A reação de Feulgen foi o primeiro método que identificou, inicialmente em touros, alterações de cromatina em espermatozoides (GLEDHILL, 1966). No entanto, como a identificação dos espermatozoides com cromatina descompactada é realizada por diferença de intensidade de coloração, este método originalmente era de avaliação muito subjetiva.

Outro método alternativo para avaliação da cromatina espermática foi criado por Mello (1982) e é baseado na indução de afrouxamento da cromatina por meio de hidrólise ácida e posterior coloração com azul de toluidina (AT) em pH 4,0. Originalmente, este método também utilizava avaliação visual de diferença de intensidade de coloração e de leve diferença de cor, sendo também uma avaliação subjetiva. Em 2004, Beletti, Costa e Viana criaram algoritmos em ambiente de programação Scilab, que identificavam regiões de descompactação da cromatina na cabeça de espermatozoides de touro. Souza et al. (2018) e Hiraiwa et al. (2021) aperfeiçoaram estes algoritmos, classificando tipos de alterações de cromatina espermática segundo o local de descompactação na cabeça do espermatozoide, e os correlacionaram com a fertilidade de touros a campo e na produção *in vitro* de embriões, respectivamente. No presente trabalho foi a primeira vez que estes algoritmos foram utilizados na análise de imagem de esfregaços de sêmen de garanhões corados com AT. Também foi a primeira vez que se utilizou esses algoritmos em imagens de esfregaços corados com reação de Feulgen, independente da espécie animal. Os resultados obtidos nessas análises mostraram um total de 99,67% de espermatozoides com áreas de descompactação quando utilizada reação de Feulgen e 65,46%, quando utilizada a coloração com AT. Como a porcentagem de prenhez foi de 62,5%, esses resultados demonstram que os espermatozoides de garanhão possuem uma distribuição de compactação da cromatina naturalmente mais heterogênea do que ocorre em touros, de tal maneira que não se pode considerar todos os tipos de descompactação segundo o local da descompactação na cabeça do espermatozoide como sendo importante na fertilidade do garanhão. Dentre os diferentes tipos de descompactação, somente a descompactação dispersa e principalmente a descompactação total, quando utilizada a reação de Feulgen,

apresentaram coeficientes de correlação negativos, porém não significativos, em relação a prenhez das éguas.

Todos os garanhões utilizados neste trabalho eram reprodutores férteis frequentemente utilizados como doadores de sêmen para inseminação artificial. Também é importante salientar que na inseminação artificial, existem muitos outros fatores que influenciam o resultado, tanto seminais como ambientais e femininos. Portanto, somente aumentando muito o total de amostras e utilizando-se além de garanhões férteis, também alguns com níveis menores de fertilidade seria possível chegar a possíveis correlações mais intensas e talvez, significativas. De qualquer maneira, pode-se especular que as alterações mais graves como a descompactação total devem interferir mais na fertilidade do garanhão do que os demais tipos.

Em 2005, Beletti, Costa e Guardieiro criaram outros algoritmos desenvolvidos em ambiente de programação matemática Scilab para serem utilizados em análise de imagem computacional de esfregaços corados com AT. Esses algoritmos identificam as 10 cabeças mais compactadas e com maior homogeneidade de compactação no esfregaço (cabeças padrões) e calculam a diferença da média dos valores de pixel de cada cabeça em relação a média dos valores de pixel das cabeças padrões. Posteriormente esta diferença é transformada em porcentagem da média dos valores de pixel das cabeças padrões. Estes algoritmos também calculam o coeficiente de variação dos valores de pixel de cada cabeça, sendo que quanto maior este valor, maior é a heterogeneidade da compactação da cabeça. No presente trabalho foi a primeira vez que estes algoritmos foram aplicados a imagens de esfregaços de sêmen de garanhões corados com AT e reação de Feulgen. Os resultados obtidos com estas análises também não mostraram correlações significativas com a prenhez das éguas. Quando utilizada a coloração com AT, ambos os coeficientes de correlação foram negativos e quando utilizada reação de Feulgen, somente a diferença da compactação em relação às cabeças padrões apresentaram correlação negativa.

Novamente, é importante salientar a existências de diversas variáveis não controladas que podem influenciar os resultados da inseminação artificial, sendo as alterações da cromatina espermática apenas um fator que pode interferir na fertilidade do garanhão. Nessas condições, a existência de correlação negativa, mesmo que não significativa, entre a prenhez e a descompactação total e dispersa da cromatina e a diferença porcentual quando utilizada reação de Feulgen, e a diferença porcentual e heterogeneidade, quando utilizada a coloração com AT, demonstram que estas variáveis

têm potencial para serem utilizadas na avaliação da fertilidade de garanhões. Novos trabalhos devem ser feitos para comprovar este potencial.

6. Conclusão

Os espermatozoides de garanhões possuem compactação cromatínica mais heterogênea quando comparados a espermatozoides de touro. Isso interfere na classificação dos tipos de alterações cromatínicas segundo a localização da descompactação na cabeça espermática.

A descompactação total e dispersa da cromatina e a diferença porcentual quando utilizada reação de Feulgen, e a diferença porcentual e heterogeneidade, quando utilizada a coloração com AT, demonstram ter potencial para serem utilizadas na avaliação da fertilidade de garanhões, o que deve ser confirmado com novos trabalhos.

Referências

- ACOSTA, A. A.; OEHNINGER, S.; MORSHEDI, M.; SWANSON, R. J.; SCOTT, R.; IRIANNI, F. Assisted reproduction in the diagnosis and treatment of male factor. **Obstetrical & Gynecological Survey**, v. 44, p. 1-18, 1988.
- ALLAN, F.K. **A Landscaping Analysis of Working Equid Population Numbers in LMICs, with Policy Recommendations**. Edinburgh: Brooke and University of Edinburgh, p 145, 2021.
- ANDERSSON, G. K. A.; KJELLSTRAND, P. T. T. A study of DNA depolymerisation during Feulgen acid hydrolysis. **Histochemistry**, v. 43, n. 2, p. 123–130, 1975.
- ARRUDA, R.P. **Avaliação dos efeitos de diluidores e crioprotetores para o espermatozóide equino pelo uso de microscopia de epifluorescência, citometria de fluxo, análises computadorizadas da motilidade (CASA) e da morfometria (ASMA)**. 2000. Tese (Livre Docência) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2000.
- BALL, B. A.; LITTLE, T. V.; WEBER, J. A.; WOODS, G. L. Survival of day-4 embryos from young normal mares and aged subfertile mares after transfer to normal recipient mares. **Journal of Reproduction and Fertility**, Cambridge, v. 85, p. 187-194, 1989.
- BELETTI, M. E. Anomalias em complexo DNA-Proteína de espermatozoides de touro: contribuição metodológica. 1992. 45 f. **Dissertação (Mestrado em Biologia Celular)** – Universidade de Campinas, Campinas, 1992.
- BELETTI, M.E. Cromatina espermática: quebrando paradigmas. *Revista Brasileira de Reprodução Animal* , v.37, p. 92-96, 2013.
- BELETTI, M. E.; COSTA, L. F.; GUARDIEIRO, M. M. Morphometric features and chromatin condensation abnormalities evaluated by toluidine blue staining in bull spermatozoa. **Brazilian Journal of Morphological Science**, v. 22, p. 85-90, 2005.

BELETTI, M. E.; MELLO, M. L. S. Comparison between the toluidine blue stain and the Feulgen reaction for evaluation of rabbit sperm chromatin condensation and their relationship with sperm morphology. **Theriogenology**, v. 62, n. 3–4, p. 398-402, 2004.

CAMPOS, M. N. G. Compactação da cromatina e morfometria de espermatozoides bovinos selecionados e capacitados [manuscrito]. 2010. 55 f. **Dissertação** (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Uberlândia, 2010.

CARNEIRO, G. F. Maturação in vitro de oócitos equinos. **Ciência e Tecnologia Veterinária**, v. 2, n. 2, p. 5-10, 2002.

CBRA: COLÉGIO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL. **Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal**. 2. ed. Belo Horizonte: CBRA, 1998.

CRUZ, R. E. S.; BELETTI, M. E.; TRAVENÇOLO, B. A. N. Using image analysis and processing for morphological characterization of bovine spermatozoa. In: **X Workshop de Visão Computacional**. 2014, Uberlândia. Proceedings..., p. 270-274.

DAVID, J. S. E.; BISHOP, M. W. H.; CEMBROWICS, H. J. Reproductive expectancy and infertility in cattle. **Veterinary Record**, Glasgow, v. 89, n. 7, p. 181-185, 1971.

DE CAMPOS VIDAL, Benedicto; MELLO, M.L S. Coloração com azul de toluidina para aplicações em biologia celular e tecidual. **Acta histochemica**, v. 121, n. 2, p. 101-112, 2019.

DI STEPHANO, H. S. A cytochemical study of the Feulgen nucleal reaction. **Proceeding of the National Academy of Sciences**, v.34, n. 3, p. 75–80, Mar. 1948.

DUARTE, M. B.; VIEIRA, R. C.; SILVA, F. O. C. Incidência de perda de prenhez até o 50º dia em éguas Quarto de Milha. **Ciência Rural**, v. 32, n. 4, p. 643-647, 2002.

DONKIN, I.; BARRES, R. Sperm epigenetics and influence of environmental factors. **Molecular Metabolism**, v. 14, p. 1-11, 2018.

ERENPREISS, J.; JEPSON, K.; GIWERCMAN, A.; TSAREV, I.; ERENPREISA, J.; 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.

EHLERS, J.; BEHR, M.; BOLLWEIN, H.; BEYERBACH, M.; WABERSKI, D. Standardization of computer-assisted semen analysis using an e-learning application. **Theriogenology**, v. 76, n. 3, p. 448-454, 2011.

ESTEVEES, S. C.; ZINI, A.; COWARD, R. M.; EVENSON, D. P.; GOSÁLVEZ, J.; LEWIS, S. E. M.; SHARMA, R.; HUMAIDAN, P. Sperm DNA fragmentation testing: Summary evidence and clinical practice recommendations. **Andrologia**, v. 53, n. 2, p. 13874, 2021.

FEULGEN, R.; ROSSENBECK, H. Mikroskopisch-chemischer nachweis einer nucleinsäure vom typus der thymonucleinsäure und die darauf beruhende elektive färbung von zellkernn in mikroskopischen preparaten. **Hoppe-Seyler's z. Physiology. Chemistry**, v. 135, p. 203-248. 1924. DOI: <https://doi.org/10.1515/bchm2.1924.135.5-6.203>. Disponível em: <https://www.degruyter.com/document/doi/10.1515/bchm2.1924.135.5-6.203/html>. Acesso em 15 de setembro de 2024.

GLEDHILL, B. L.; GLEDHILL, M. P.; RIGLER, J. R.; RINGERTZ, N. R. Changes in deoxyribonucleoprotein during spermiogenesis in the bull. **Experimental Cell Research**, v. 41, n. 3, p. 652-665, 1966.

GORDON, J. A. R.; GRANDY, R. A.; LIAN, J. B.; STEIN, J. L.; VAN WIJNEN, A. J.; STEIN, G. S. Chromatin. In: ANDERSON, W.W. **Brenner's Encyclopedia of Genetics**. 2^a Ed. Elsevier, 2013, p. 538-541.

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, art. e37028, 2021.

HINRICHS, K.; LOVE, C.C.; BRINSKO, S.P.; CHOI, Y.H.; VARNER, D.D. In vitro fertilization of in vitro-matured equine oocytes: effects of maturation medium, duration of maturation, and sperm calcium ionophore treatment, and comparison with rates of fertilization in vivo after oviductal transfer. **Biology of Reproduction**, v. 67, n. 1, p. 256-262, 2002.

HOOGEWIJS, M. K.; VLIEGHER, S.P. GOVAERE, J.L.; DE SCHAUWER, C.; DE KRUIF, A.; VAN SOOM, A. Influence of counting chamber type on CASA outcomes of equine semen analysis. **Equine Veterinary Journal**, v. 44, n. 5, p. 542-549, 2012.

HUNTER, R. H. F. Physiological factors influencing ovulation, fertilization, early embryonic development and establishment of pregnancy in pigs. **British Veterinary Journal**, v. 133, n. 5, p. 461-470, 1977.

IBGE – INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Rebanho de Equinos (Cavalos). Rio de Janeiro: IBGE, 2023. <https://www.ibge.gov.br/explica/producao-agropecuaria/equinos/br>. Acesso em: 03 nov. 2024.

JASKO, D. J.; LEIN, D. H.; FOOTE, R. H. Determination of the relationship between sperm morphologic classifications and fertility in stallions: 66 cases (1987-1988). **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 197, n. 3, p. 389-394, 1990.

JASKO, D. J.; LITTLE, T. V.; LEIN, D. H.; FOOTE, R. H. Comparison of spermatozoal movement and semen characteristics with fertility in stallions: 64 cases (1987-1988). **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 200, n. 7, p. 979-985, 1992.

KAMIMURA, C. D. F.; JACOMINI, J. O.; BELETTI, M. E. Alterações de cromatina em espermatozoides de ovinos e caprinos avaliadas por azul de toluidina e laranja de acridina. **Ciência Agrotécnica**, v. 34, p. 212–219, 2010.

KANAYAMA, C. Y.; BELETTI, M. E. Computational evaluation of chromatin condensation and morphometric characteristics of rabbit (*Oryctolagus cuniculus*) sperm head. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 63, p. 94-99, 2011.

LEFIÈVRE, L.; BEDU-ADDO, K.; CONNER, S. J.; MACHADO-OLIVEIRA, G. S.M; CHEN, Y.; KIRKMAN-BROWN, J. C.; AFNAN, M. A.; PUBLICOVER, S. J.; FORD, W. C.; BARRATT, C. L. R. Counting sperm does not add up any more: Time for a new equation? **Reproduction**, v. 133, n. 4, p. 675–684, 2007.

LINFORD, E.; GLOVER, F. A.; BISHOP, C.; STEWART, D. L. The relationship between semen evaluation methods and fertility in the bull. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 47, n. 2, p. 283-291, 1976.

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

MELLO, M.L.S. Metacromasia induzida em espermatozoides de touro. **Histochemistry** , v. 74, n. 3, p. 387-392, 1982.

MELLO, M. L. S.; VIDAL, B. C. The Feulgen reaction: A brief review and new perspectives. **Acta Histochemica**, v. 119, n. 6, p. 603-609, 2017.

MELLO, M. L. S.; VIDAL, M. B. C. A reação de Feulgen. **Ciência e cultura**, v.30, n. 6, p.665- 676, Jan. 1978.

MURADAS, P. R.; WEISS, R. R.; KOZICKI, L. E. Avanço na avaliação espermática de equinos: revisão. **Revista Acadêmica: Ciência Agrárias e Ambientais**, v. 11, n. 3, p. 299-313, 2013.

NAVES, C. S.; BELETTI, M. E.; DUARTE, M. B.; VIEIRA, R. C. Avaliação da cromatina espermática em equinos com azul de toluidina e acridine orange. **Bioscience Journal**, v. 20, n. 3, p. 117-124, 2004.

OEHNINGER, S.; OMBELET, W. Limits of current male fertility testing. **Fertility and Sterility**, v. 111, n. 5, p. 835–841, 2019.

POLGE, C. Fertilization in pig and horse. **Journal of Reproduction and Fertility**, Cambridge, v. 54, p. 461-470, 1978.

RODRIGUES, A. C. N.; ROCHA, J. V.; BELETTI, M. E. Análise computacional da compactação da cromatina de espermatozoides de galo. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 61, p. 1302-1307, 2009.

ROCHE, J. F. Early embryonic loss in cattle. In: MORROW, E. (Ed.). **Current Therapy in Theriogenology**. 2. ed. Philadelphia: Saunders, 1986. 200 p.

SAMPER, J. C. *Equine Breeding Management and Artificial Insemination*. 2. ed. [S.l.]: Elsevier Health Sciences, 2009.

SIEME, H., MARTINSSON, G.; RAUTERBERG, H.; WALTER, K.; AURICH, C.; PETZOLDT, R.; KLUG, E. Application of techniques for sperm selection in fresh and frozen-thawed stallion semen. **Reproduction in Domestic Animal**, v. 38, n. 2, p. 134-140, 2003.

SHAMSI, M. B.; IMAM, S. N.; DADA, R. Sperm DNA integrity assays: diagnostic and prognostic challenges and implications in management of infertility. **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**, v. 28, n. 11, p. 1073–1085, 2011.

SQUIRES, E. L.; CARNEVALE, E.M.; MCCUE, P.M.; BRUEMMER, J.E. Embryo technologies in the horse. **Theriogenology**, v. 59, n. 1, p. 151-170, 2003.

TAMM, C.; HODES, M. E.; CHARGAFF, E. The formation of apurinic acid from the deoxyribonucleic acid of calf thymus. **Journal Biological Chemistry**, v. 1995, n. 1, p. 49-63, 1952.

UWLAND, J. Possibilities and limitations of semen evaluation for the prognosis of male fertility. In: COUROT, M. (Ed.). **The male in farm animal reproduction**. Boston: Martinus Nijhoff, 1984.