

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA

**INTEGRIDADE CROMATÍNICA E MORFOMETRIA DAS CABEÇAS
ESPERMÁTICAS E SUAS RELAÇÕES COM A CONCEPÇÃO EM ÉGUAS**

PEDRO SANCHES OQUENDO JUNIOR

UBERLÂNDIA – MINAS GERAIS – BRASIL

Fevereiro de 2026

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA

**INTEGRIDADE CROMATÍNICA E MORFOMETRIA DAS CABEÇAS
ESPERMÁTICAS E SUAS RELAÇÕES COM A CONCEPÇÃO EM ÉGUAS**

Pedro Sanches Oquendo Junior

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Emílio Beletti

Co-Orientadora: Prof.^a Dra. Elisa Sant’Anna Monteiro da Silva

Tese de Doutorado apresentada à
Faculdade de Medicina
Veterinária – UFU, como parte
das exigências para obtenção do
título de Doutor em Ciências
Veterinárias Área de
Concentração: Biotecnologias e
eficiência reprodutiva

UBERLÂNDIA – MINAS GERAIS – BRASIL

Fevereiro de 2026

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

O62
2026 Oquendo Junior, Pedro Sanches, 1979-
INTEGRIDADE CROMATÍNICA E MORFOMETRIA DAS CABEÇAS
ESPERMÁTICAS E SUAS RELAÇÕES COM A CONCEPÇÃO EM ÉGUAS
[recurso eletrônico] / Pedro Sanches Oquendo Junior. - 2026.

Orientadora: Marcelo Emílio Beletti.

Coorientadora: Elisa Sant'Anna Monteiro da Silva.

Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Uberlândia, Pós-
graduação em Ciências Veterinárias.

Modo de acesso: Internet.

DOI <http://doi.org/10.14393/ufu.te.2026.259>

Inclui bibliografia.

Inclui ilustrações.

1. Veterinária. I. Beletti, Marcelo Emílio, 1964-, (Orient.). II. Silva,
Elisa Sant'Anna Monteiro da, 1985-, (Coorient.). III. Universidade
Federal de Uberlândia. Pós-graduação em Ciências Veterinárias. IV.
Título.

CDU: 619

Bibliotecários responsáveis pela estrutura de acordo com o AACR2:

Gizele Cristine Nunes do Couto - CRB6/2091

Nelson Marcos Ferreira - CRB6/3074



ATA DE DEFESA - PÓS-GRADUAÇÃO

Programa de Pós-Graduação em:	Ciências Veterinárias				
Defesa de:	Tese de Doutorado Acadêmico PPGCVET Nº 04/2026				
Data:	25 de fevereiro de 2026	Hora de início:	09h:00	Hora de encerramento:	13h:36
Matrícula do Discente:	12213VET008				
Nome do Discente:	Pedro Sanches Oquendo Júnior				
Título do Trabalho:	Integridade cromatínica e morfometria das cabeças espermáticas e suas relações com a concepção em éguas				
Área de concentração:	Produção Animal				
Linha de pesquisa:	Biotécnicas e eficiência reprodutiva				
Projeto de Pesquisa de vinculação:	Técnicas laboratoriais e moleculares na reprodução animal				

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

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

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

Aprovado

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

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

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



Documento assinado eletronicamente por **Marcelo Emílio Beletti, Professor(a) do Magistério Superior**, em 25/02/2026, às 13:38, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Ricarda Maria dos Santos, Professor(a) do Magistério Superior**, em 25/02/2026, às 13:38, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Kelvin Blandon Espinoza, Usuário Externo**, em 25/02/2026, às 13:38, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Renata Lançoni, Professor(a) do Magistério Superior**, em 25/02/2026, às 13:39, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Gabriel Augusto Monteiro, Usuário Externo**, em 03/03/2026, às 12:10, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://www.sei.ufu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **7050903** e o código CRC **E24E2F0A**.

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

PEDRO SANCHES OQUENDO JUNIOR – nasceu em São Paulo, capital, em 18 de outubro de 1979. Ingressou no curso de Medicina Veterinária em 1997, concluindo a graduação no segundo semestre de 2001 pela Universidade de Santo Amaro. Na mesma instituição, realizou residência em clínica e cirurgia de equinos, com término em 2003.

Após a conclusão da residência, passou a atuar profissionalmente nas cidades de São Paulo e Sorocaba, desenvolvendo atividades clínicas voltadas à medicina equina. Em 2004, transferiu-se para os Estados Unidos, onde residiu no estado do Texas e atuou até dezembro de 2009 em hospital veterinário especializado em equinos, exercendo atividades clínicas, cirúrgicas e reprodutivas.

Ao retornar ao Brasil, estabeleceu-se em Uberlândia, Minas Gerais, retomando inicialmente a atuação clínica e reprodutiva de forma autônoma. Entre os anos de 2011 e 2013, realizou especialização em clínica e cirurgia de equinos pelo Instituto Brasileiro de Veterinária. Em 2012, fundou, juntamente com sua esposa Fabiana, um centro de atendimento veterinário e central de reprodução equina no município de Uberlândia, integrando atividades clínicas, reprodutivas e de gestão.

Entre 2013 e 2015, realizou nova especialização na mesma instituição, desta vez na área de Reprodução Equina. Em 2013, iniciou a carreira de docente, ministrando aulas de Clínica de Equinos, Biotecnologias da Reprodução, entre outras, atividade que se estendeu até 2024 na Universidade do Triângulo Mineiro.

Em 2019, foi aprovado no processo seletivo do Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da Universidade Federal de Uberlândia, ingressando no curso de Mestrado em março daquele ano e concluindo em de 2021. Desde março de 2022, é acadêmico do curso de Doutorado no mesmo programa.

Recentemente, foi aprovado em concurso público para o cargo de professor substituto na área de Reprodução Animal da Universidade Federal de Uberlândia.

A minha mãe

AGRADECIMENTOS

Nesta realização pessoal e profissional de grande significado, agradeço a Deus, pela presença constante e amparo ao longo deste percurso.

Aos meus pais, Pedro e Aparecida, que sempre valorizaram o estudo e o conhecimento como pilares fundamentais. Esses são valores que levo comigo e que espero transmitir à minha filha.

À Fabiana, minha esposa, e à minha filha Isabela (Bebela), agradeço profundamente não apenas pelo apoio direto na realização deste trabalho, mas, sobretudo, pela paciência, compreensão e carinho diante dos momentos de ausência e do mau humor, por vezes maior que o habitual. Sei que não foi fácil, mas “vai dar tudo certo”.

Aos familiares e amigos, que participaram de forma direta e indireta de todas as etapas deste doutorado, oferecendo apoio e incentivo, permitindo que eu pudesse me dedicar aos estudos e concluir mais esta importante fase da minha vida.

Ao professor Marcelo Emílio Beletti, orientador e muito mais que isso, deixo meu sincero agradecimento por jamais medir esforços para que este objetivo fosse alcançado. Pelas longas jornadas de trabalho, pelo ensinamento constante, pelas correções e, acima de tudo, pela tranquilidade transmitida, meu muito obrigado.

Aos cavalos, que há mais de vinte e cinco anos continuam a me conduzir a caminhos e destinos que jamais poderia imaginar, proporcionando encontros, aprendizados, conhecendo lugares e enfim a construção de uma família e uma trajetória profissional, deixo aqui minha eterna gratidão. Aos nossos animais, todos eles, em especial a Shy, Joy, Colt, Tininha, Cash, Nuni, Red, Magrelo, Copen, Bequinha, Melinha, Flor, Simba, Loba... De diferentes formas, estiveram presentes ao longo deste percurso tornando a caminhada mais leve e significativa.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001. Por fim, agradeço às agências de fomento à pesquisa, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG – Número do financiamento: APQ-01881-22) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq – Número do financiamento: 306482/2022-3) pelo suporte financeiro que viabilizou a realização deste projeto, o qual, de forma humilde, busca contribuir para o avanço da pesquisa científica em um país que, necessita valorizar cada vez mais a educação e a ciência.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	iv
LISTA DE FIGURAS	v
LISTA DE TABELAS	vii
RESUMO.....	viii
ABSTRACT	ix
CONSIDERAÇÕES INICIAIS	1
REFERÊNCIAS.....	4
CAPÍTULO 1 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	5
1.1 INTRODUÇÃO	5
1.1.1 Contexto da Reprodução Equina	5
1.1.2 Importância da Cromatina e Morfologia Espermática	6
1.1.3 Objetivos da Revisão	8
1.2 ASPECTOS ESTRUTURAIS E FUNCIONAIS DO ESPERMATOZOIDE EQUINO.....	9
1.2.1 Cabeça espermática e núcleo	9
1.2.2 Acrossomo	11
1.2.3 Peça intermediária e metabolismo mitocondrial	11
1.2.4 Cauda, axonema e mecanismos de motilidade.....	13
1.2.5 Membranas espermáticas e suscetibilidade ao estresse	14
1.3 TESTES DE AVALIAÇÃO DA CROMATINA	14
1.3.1 Ensaio Cometa	14
1.3.2 TUNEL (terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP Nick-End Labeling).....	15
1.3.3 Nicoletti	16
1.3.4 Dispersão de Cromatina Espermática (SCD)	18
1.3.5 Teste de estrutura da cromatina espermática (SCSA)	19
1.3.6 Azul de toluidina	21
1.3.7 Laranja de acridina	24
1.3.8 Reação de Feulgen	26

1.3.9 Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)	29
1.4 AVALIAÇÃO MORFOMÉTRICA	30
1.4.1 Análise computadorizada da morfometria espermática (ASMA)	30
1.4.2 Harmônicas de Fourier.....	32
1.5 CORRELAÇÃO ENTRE TESTES DE CROMATINA E MORFOMETRIA	33
1.6 CONSIDERAÇÕES FINAIS	35
1.7 REFERÊNCIAS.....	36
CAPÍTULO 2 - Integridade cromatínica e morfometria da cabeça do espermatozoide avaliadas em esfregaço de sêmen e sua relação com a concepção na inseminação artificial em éguas	42
RESUMO.....	42
ABSTRACT	43
2.1 INTRODUÇÃO	44
2.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	47
2.2.1 Animais e amostras de sêmen	47
2.2.2 Avaliação da cromatina espermática	48
2.2.2.1 Preparação da lâmina	48
2.2.2.2 Captura de imagens dos esfregaços corados com Azul de Toluidina	49
2.2.2.3 Captura de imagens dos esfregaços com Reação de Feulgen.....	49
2.2.2.4 Análise computacional de imagens com Azul de Toluidina e Reação de Feulgen	49
2.2.2.5 Microscopia de epifluorescência com Laranja de Acridina	51
2.2.3 Análise morfométrica das cabeças dos espermatozoides	52
2.2.4 Análise estatística	52
2.3 RESULTADOS.....	53
2.4 DISCUSSÃO	59
2.5 CONCLUSÃO	61
2.6 REFERÊNCIAS.....	63

CAPÍTULO 3 – REINTERPRETAÇÃO DO MÉTODO DE NICOLETTI PARA AVALIAÇÃO DE INTEGRIDADE DA CROMATINA ESPERMÁTICA EQUINA: ANÁLISE COMPARATIVA COM SCSA	66
RESUMO.....	66
3.1 INTRODUÇÃO	67
3.2 MATERIAL E MÉTODOS	68
3.2.1 Animais	68
3.2.2 Citômetro de fluxo	68
3.2.3 Análise SCSA.....	69
3.2.4 Análise pelo método Nicoletti	70
3.2.5 Análise estatística	71
3.3 RESULTADOS.....	71
3.4 DISCUSSÃO	72
3.5 CONCLUSÃO	73
3.6 REFERÊNCIAS.....	75
CONSIDERAÇÕES FINAIS	77

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AAR - “Average absorbance Ratio” ou Taxa média de absorbância

ASMA - Análise computadorizada da morfometria espermática

AT - Azul de Toluidina

ATP - Adenosina trifosfato

BrdUTP - 5-bromo-2'-deoxyuridine-5'-trifosfato

DCE - Dispersão de cromatina espermática

DFI - Índice de fragmentação do DNA

DNA - Ácido desoxirribonucleico

ECD - “Electron Coupled Dye”

EFDs - Descritores elípticos de Fourier

FDE - Fragmentação do DNA espermático

FHA - Análise de harmônicas de Fourier

FIT-A - Isotiocianato de fluoresceína - área

hCG - Gonadotrofina coriônica humana

ICSI - Injeção intracitoplasmática de espermatozoide

IP - Iodeto de propídio

LA - Laranja de Acridina

MET - Microscopia eletrônica de transmissão

OXPHOS - Fosforilação oxidativa

PIV - Produção *in vitro*

RF - Reação de Feulgen

ROS - Espécies reativas ao oxigênio

SCD - Dispersão de cromatina

SCSA - Sperm chromatin structure assay

TdT - Enzima terminal deoxynucleotidyl transferase

TUNEL - Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Figura 1 – Ilustração de um espermatozoide equino	11
Figura 2 – Ilustração da estrutura interna da peça intermediária e cauda	12
Figura 3 – Esquema de ligação do Azul de Toluidina aos grupos fosfato do DNA	
Figura 4 – Esquema de ligação do Laranja de Acridina ao DNA	
Figura 5 – Espermatozoide corados com LA, fluorescendo verde e DNA intacto e vermelho DNA fragmentado	21

CAPÍTULO 2 - INTEGRIDADE CROMATÍNICA E MORFOMETRIA DA CABEÇA DO ESPERMATOZOIDE AVALIADAS EM ESFREGAÇÃO DE SÊMEN E SUA RELAÇÃO COM A CONCEPÇÃO NA INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL EM ÉGUAS

Figura 1 – Análise computacional da compactação de cromatina em espermatozoides de garanhão submetidos a reação de Feulgen (magnificação 400x). As áreas circuladas em branco indicam regiões de descompactação identificadas pelo software Scilab. Essas áreas foram nomeadas de acordo com o semento da cabeça espermática afetado. N: normal; DB: descompactação de base; DMB: descompactação de meia base; DEC: descompactação eixo central; DD: descompactação dispersa; DBA: descompactação base-ápice; DT: descompactação total	49
---	----

CAPÍTULO 3 – REINTERPRETAÇÃO DO MÉTODO DE NICOLETTI PARA AVALIAÇÃO DE INTEGRIDADE DA CROMATINA ESPERMÁTICA EQUINA: ANÁLISE COMPARATIVA COM SCSA

Figura 1 – A- SCSA representado em dot plot da fluorescência verde (DNA fita dupla) versus fluorescência vermelha (DNA desnaturado), com delimitação da população espermática com DNA fragmentado (12,54%); B-D Histogramas de intensidade de fluorescência obtidos pelo método de Nicoletti. B – Nicoletti 1 quantificando a proporção de Hipodiploides à esquerda	
--	--

(47,25%); C – Nicoletti 2 considerando o pico hiperhaploides à direita (37,81%); D – Nicoletti
3 Excluindo agregados e células somáticas maiores que as cabeças espermáticas (9,58%) 67

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 2 - INTEGRIDADE CROMATÍNICA E MORFOMETRIA DA CABEÇA DO ESPERMATOZOIDE AVALIADAS EM ESFREGAÇÃO DE SÊMEN E SUA RELAÇÃO COM A CONCEPÇÃO NA INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL EM ÉGUAS

Tabela 1 - Coeficiente de correlação de Spearman (R) e valor de <i>P</i> das variáveis clássicas de avaliação de sêmen em relação à concepção	54
Tabela 2 - Média e desvio padrão (DP) das variáveis clássicas de avaliação de sêmen.....	55
Tabela 3 - Coeficiente de correlação de Spearman (R) e <i>P</i> -valor das variáveis de alteração de cromatina identificadas pela coloração Azul Toluidina, Reação de Feulgen e Laranja de Acridina em relação à concepção	56
Tabela 4 - Média e desvio padrão (DP) das variáveis de alteração de cromatina identificadas pela coloração Azul Toluidina, Reação de Feulgen e Laranja de Acridina nos grupos concepção positiva e negativa.....	57
Tabela 5 – Coeficiente de correlação de Spearman (R) e valor de <i>P</i> das variáveis morfométricas em relação à concepção	58
Tabela 6 –Média e desvio padrão (DP) das variáveis morfométricas nos grupos concepção positiva e negativa ...	59
Tabela 7 –Médias e desvios-padrão das variáveis morfométricas das raças mangalarga e quarto de milha	60

RESUMO

Esta tese aborda alterações morfológicas da cabeça e da cromatina de espermatozoides de garanhões e sua relação com a prenhez de éguas após inseminação artificial, estando organizado em três capítulos: o primeiro consiste em uma revisão bibliográfica sobre características espermáticas e cromatínicas e métodos de avaliação, com ênfase em equinos, na qual foram descritos aspectos estruturais e funcionais do espermatozoide equino, os principais testes de avaliação de cromatina, bem como abordagens morfológicas e descritores matemáticos de forma buscando integrar evidências estruturais, funcionais e metodológicas e ressaltando a importância da avaliação nuclear como ferramenta complementar à análise seminal convencional na investigação da fertilidade em garanhões; o segundo corresponde a um artigo submetido à *Animal Reproduction Science*, intitulado “Integridade cromatínica e morfometria da cabeça do espermatozoide avaliadas em esfregaço de sêmen e sua relação com a concepção na inseminação artificial em éguas”, no qual se avaliou se alterações na compactação da cromatina, detectadas por Azul de Toluidina, Reação de Feulgen e Laranja de Acridina, bem como variáveis morfológicas computacionais da cabeça espermática, estariam associadas à concepção, observando-se que os métodos de coloração não se mostraram preditores satisfatórios nas condições estudadas, enquanto a morfometria computacional, especialmente a elipticidade, demonstrou potencial como ferramenta complementar e objetiva para estimar a fertilidade; e o terceiro, um *short communication* a ser submetido à mesma revista, intitulado “Reinterpretação do método de Nicoletti para avaliação da integridade da cromatina espermática equina: análise comparativa com SCSA”, no qual se comparou o SCSA ao método de Nicoletti, originalmente desenvolvido para detectar apoptose em timócitos por meio da mensuração de perda de DNA com iodeto de propídio, verificando-se que a análise tradicional baseada em menor intensidade de fluorescência não apresentou correlação com o SCSA, ao passo que uma subpopulação com maior intensidade de fluorescência apresentou correlação positiva significativa, sugerindo que, devido à elevada compactação da cromatina espermática, o dano cromatínico manifesta-se por aumento da acessibilidade ao corante, e não por perda de DNA, exigindo a reinterpretação do método para essa espécie.

ABSTRACT

This thesis addresses morphometric alterations of the sperm head and chromatin of stallion spermatozoa and their relationship with pregnancy rates in mares following artificial insemination, and is organized into three chapters: the first consists of a literature review on sperm and chromatin characteristics and evaluation methods, with emphasis on equines, in which structural and functional aspects of the equine spermatozoon are described, along with the main chromatin assessment tests, as well as morphometric approaches and mathematical shape descriptors, aiming to integrate structural, functional, and methodological evidence and to highlight the importance of nuclear evaluation as a complementary tool to conventional semen analysis in the investigation of stallion fertility; the second corresponds to a manuscript submitted to *Animal Reproduction Science*, entitled “Chromatin integrity and sperm head morphometry evaluated in semen smears and their relationship with conception following artificial insemination in mares,” in which it was assessed whether alterations in chromatin compaction, detected by Toluidine Blue, the Feulgen reaction, and Acridine Orange, as well as computational morphometric variables of the sperm head, were associated with conception, demonstrating that the chromatin staining methods evaluated were not satisfactory predictors of conception under the studied conditions, whereas computational sperm head morphometry, particularly ellipticity, showed potential as a complementary and objective tool for estimating stallion fertility; and the third, a short communication to be submitted to the same journal, entitled “Reinterpretation of the Nicoletti method for the evaluation of equine sperm chromatin integrity: comparative analysis with SCSA,” in which SCSA was compared with the Nicoletti method, originally developed to detect apoptosis in thymocytes by measuring DNA loss using propidium iodide, revealing that the traditional analysis based on reduced fluorescence intensity did not correlate with SCSA, whereas a subpopulation with increased fluorescence intensity showed a significant positive correlation, suggesting that, due to the high compaction of equine sperm chromatin, chromatin damage manifests as increased dye accessibility rather than DNA loss, thus requiring reinterpretation of the method for this species.

CONSIDERAÇÕES INICIAIS

A cromatina espermática apresenta uma organização estrutural profundamente distinta daquela observada em células somáticas, refletindo uma estratégia biológica especializada de empacotamento do material genético. No espermatozoide, a elevada compactação do DNA decorre principalmente da substituição das histonas por protaminas, proteínas altamente básicas e ricas em resíduos de arginina, que interagem eletrostaticamente com os grupos fosfato negativamente carregados do DNA. Essa interação neutraliza as cargas da dupla hélice e permite um empacotamento extremamente eficiente, incompatível com a organização nucleossômica típica das células somáticas (Ward e Coffey, 1991; Ausió et al., 2014).

Do ponto de vista estrutural, as protaminas ligam-se ao DNA predominantemente ao longo do sulco menor da dupla hélice, estabelecendo um arranjo em que as moléculas de DNA se organizam em fibras lineares dispostas lado a lado. Esse modelo de organização não induz superenovelamento negativo do DNA, em contraste com o que ocorre na cromatina nucleossômica, na qual o enrolamento em torno das histonas gera tensão de torção. Em mamíferos, a estabilidade adicional dessa arquitetura é garantida pela formação de ligações dissulfeto entre resíduos de cisteína das protaminas, o que confere elevada resistência mecânica e química ao núcleo espermático (Ward e Coffey, 1991; Ausió et al., 2014).

Além da compactação promovida pelas protaminas, a cromatina espermática mantém níveis adicionais de organização. Evidências indicam que o DNA não se encontra distribuído de forma homogênea, mas organizado em níveis estruturais, nos quais regiões altamente compactadas coexistem com pequenas porções menos condensadas. Essas regiões menos compactadas frequentemente apresentam retenção de histonas e encontram-se associadas com componentes da matriz nuclear, reforçando que a cromatina espermática não deve ser interpretada como biologicamente inerte, mas como uma estrutura organizada e funcional (Ward e Coffey, 1991 e Beletti, 2013).

Nesse contexto, a cromatina espermática passa a ser compreendida como um sistema estrutural altamente especializado, cuja integridade envolve não apenas a compactação física do DNA, mas também a preservação de sua arquitetura nuclear. Estudos indicam que o espermatozoide transporta, além do DNA possíveis sinalizadores epigenéticos paternos como RNAs e regiões nucleossomais específicas, com possível influência nos eventos iniciais do desenvolvimento embrionário. Assim, alterações na organização cromatínica podem refletir modificações estruturais com consequências funcionais além da fertilização propriamente dita (Beletti, 2013; Ausió et al., 2014).

Diante dessa complexidade estrutural, a avaliação da cromatina espermática requer métodos capazes de acessar propriedades físico-químicas do DNA e de sua interação com proteínas nucleares. Ensaio histoquímicos têm sido amplamente empregados com esse objetivo, uma vez que se baseiam na ligação seletiva de corantes a componentes específicos do DNA ou da cromatina, permitindo inferir aspectos relacionados à compactação, acessibilidade e organização nuclear do espermatozoide. Esses métodos fornecem informações estruturais relevantes e complementares às análises convencionais do sêmen (Beletti, 2013).

O azul de toluidina é um corante básico com afinidade pelos grupos fosfato do DNA, ligando-se por interações eletrostáticas. Sua propriedade metacromática permite que variações na organização da cromatina sejam evidenciadas por alterações na intensidade e na tonalidade da coloração nuclear. Trabalhos que utilizaram essa coloração demonstram que núcleos com cromatina menos compactada apresentam maior acessibilidade aos grupos fosfato, resultando em coloração violeta, enquanto núcleos com cromatina altamente condensada e restrição a ligação do corante se coram em verde (Beletti, 2013).

O laranja de acridina é um corante fluorescente que se intercala na molécula de DNA e apresenta emissão diferencial conforme o estado estrutural do material genético. Quando ligado ao DNA de fita dupla, emite fluorescência verde, enquanto a ligação a regiões de DNA desnaturado ou de fita simples resulta em fluorescência vermelha. Essa característica permite inferir alterações na estabilidade estrutural do DNA espermático, sendo amplamente explorado em abordagens fluorométricas e citométricas (Evenson et al., 2016).

A reação de Feulgen destaca-se por sua elevada especificidade ao DNA. O método baseia-se na hidrólise ácida controlada do DNA, expondo grupos aldeído da desoxirribose quando existe alterações no complexo DNA-proteína, os quais reagem com o reagente de Schiff, produzindo coloração proporcional ao conteúdo de DNA fragmentado no núcleo. Assim, os espermatozoides com menor condensação cromatínica irão se corar de forma mais intensa na reação de Feulgen. Essa propriedade permite preservar a relação entre estrutura nuclear e conteúdo genético, tornando a reação de Feulgen particularmente adequada tanto para avaliações qualitativas quanto para análises quantitativas da cromatina espermática (Beletti, 2013; Mello e Vidal, 2017).

Além das colorações histoquímicas, ensaios fluorométricos e citométricos também podem ser aplicados para avaliação da integridade do DNA. O ensaio de Nicoletti baseia-se na quantificação de DNA fragmentado por meio da incorporação de corantes fluorescentes como o iodeto de propídio, permitindo a identificação de subpopulações celulares com perda da

integridade genômica através da análise por citômetro de fluxo (Nicoletti et al., 1991). De modo complementar, o SCSA utiliza o laranja de acridina também associado à citometria de fluxo para avaliar a suscetibilidade do DNA à desnaturação ácida, gerando índices quantitativos relacionados à estabilidade da cromatina espermática (Evenson et al., 2016).

A morfometria nuclear permite quantificar objetivamente parâmetros como área, perímetro e forma, os quais refletem indiretamente a organização e compactação da cromatina. Estudos demonstram que variações morfométricas do núcleo espermático podem estar associadas a alterações estruturais da cromatina, tornando relevante essa abordagem metodológica na avaliação da integridade espermática (Beletti et al., 2005).

A aplicação de métodos morfométricos torna-se ainda mais robusta quando associada a descritores matemáticos de forma, como as harmônicas de Fourier. Essa abordagem permite decompor o contorno nuclear em componentes harmônicos, possibilitando a descrição quantitativa de variações sutis na forma do núcleo espermático que não são facilmente detectáveis por medidas lineares simples. A utilização de descritores de Fourier em análises espermáticas tem sido descrita como ferramenta sensível para detecção de alterações morfológicas associadas à organização nuclear, refletindo indiretamente aspectos da organização cromatínica (Ostermeier et al., 2001; Severa et al., 2010).

Quando associadas a colorações específicas para DNA, como a reação de Feulgen, laranja de acridina e azul de toluidina, as análises morfométricas permitem integrar informações relacionadas à forma nuclear e à distribuição do material genético. A análise computacional das imagens obtidas a partir dessas colorações possibilita a extração objetiva de parâmetros morfométricos e de intensidade óptica, contribuindo para a caracterização quantitativa do núcleo espermático e reduzindo a subjetividade inerente à avaliação visual. Estudos que aplicaram morfometria quantitativa e análise digital de imagens à avaliação espermática demonstram que essa abordagem amplia o poder analítico de métodos histoquímicos tradicionais, permitindo comparações mais reprodutíveis entre amostras e condições experimentais (Beletti et al. 2005; Silva et al., 2025).

Dessa forma, esta tese tem como objetivo avaliar a integridade cromatínica e a morfometria da cabeça espermática de garanhões e correlacionar esses parâmetros com os índices de concepção obtidos após inseminação artificial. A proposta central consiste em determinar se esses marcadores laboratoriais podem contribuir de maneira objetiva para estimar o potencial fertilizante de garanhões, complementando a avaliação seminal convencional e ampliando a capacidade preditiva da análise andrológica.

REFERÊNCIAS

- AUSIÓ, J.; GONZÁLEZ-ROMERO, R.; WOODCOCK, C.L. Comparative structure of vertebrate sperm chromatin. *Journal of Structural Biology*, 2014.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.jsb.2014.09.004>
- BELETTI, M.E.; COSTA, L.F.; GUARDIEIRO, M.M. Morphometric features and chromatin condensation abnormalities evaluated by toluidine blue staining in bull spermatozoa. **Braz. J. morphol. Sci.**, v.22(2), p.85-90, 2005.
- BELETTI, M.E. Cromatina espermática: quebrando paradigmas. *Rev. Bras. Reprod. Anim.*, v.37(2), p.92-96, 2013. www.cbpa.org.br.
- EVENSON, D.P. The sperm chromatin assay (SCSA®) and other sperm DNA fragmentation tests for evaluation of sperm nuclear DNA integrity as related to fertility. **Anim. Reprod. Sci.**, n.169, p.56-75, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2016.01.017>.
- MELLO, M.L.S.; VIDAL, B.C. The Feulgen reaction: A brief review and new perspectives. *Acta Histochemica*, 2017. <http://dx.doi.org/10.1016/j.acthis.2017.07.002>
- NICOLETTI, I.; MIGLIORATI, G.; PAGLIACCI, M.C.; GRIGNANI, F.; RICCARDI, C. A rapid and simple method for measuring thymocyte apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. **Journal of Immunological Methods**, v.139, p.271-279, 1991.
- OSTERMEIER, G.C.; SARGEANT, G.A.; YANDELL, B.S.; PARRISH, J.J. Measurement of Bovine Sperm Nuclear Shape Using Fourier Harmonic Amplitudes. **Journal of Andrology**, v.22, n.4, p.584–594, 2001. <https://doi.org/10.1002/j.1939-4640.2001.tb02218.x>
- SEVERA, L.; MÁCHAL, L.; SVÁBOVÁ, L.; MAMICA, O. Evaluation of shape variability of stallion sperm heads by means of image analysis and Fourier descriptors. **Animal Reproduction Science**, v.119, n.1–2, p 50–55, 2010.
<https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2009.12.007>
- SILVA, M.V.; ROCHA, L.O.; TRAVENÇOLO, B.A.N.; GUIMARÃES, E.C.; BELETTI, M.E. Methods Used to Assess Bull Sperm Chromatin Integrity and Its Correlation with In Vitro Embryo Production Efficiency. **Veterinary Sciences**, v.12, n.2, p. 84, 2025.
<https://doi.org/10.3390/vetsci12020184>
- WARD, S.; COFFEY, S. Minireview DNA Packaging and Organization in Mammalian Spermatozoa: Comparison with somatic cells. *Biology of Reproduction*, v.44, p.569-574, 1991.

CAPÍTULO 1 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA: AVALIAÇÃO DA CROMATINA E MORFOLOGIA ESPERMÁTICA EM GARANHÕES

1.1 INTRODUÇÃO

1.1.1 Contexto da Reprodução Equina

A reprodução equina desempenha um papel central no desenvolvimento da indústria equestre global, impulsionada pelo crescimento das modalidades esportivas, dos sistemas de criação especializados e da valorização genética de garanhões e matrizes de alto desempenho (Canisso et al., 2008; Lima e Cintra, 2016).

Em garanhões, a fertilidade apresenta reconhecida variabilidade individual, mesmo entre animais que exibem parâmetros seminais considerados dentro dos limites de normalidade em avaliações convencionais. Estudos em andrologia equina demonstram que alterações estruturais do espermatozoide podem não ser detectadas por análises rotineiras de motilidade e morfologia, embora influenciem o desempenho reprodutivo, evidenciando que parâmetros clássicos não abrangem todos os determinantes da fertilidade (Love e Kenney, 2002; Varner, 2008).

A organização da cromatina espermática constitui um dos principais determinantes da qualidade funcional da célula, uma vez que a adequada compactação nuclear garante estabilidade ao material genético e contribui para a correta transmissão da informação genética ao embrião. Alterações na integridade do DNA, incluindo fragmentação e desorganização estrutural, têm sido associadas à redução da fertilidade e a prejuízos no desenvolvimento embrionário inicial, demonstrando que danos nucleares podem comprometer a progressão da clivagem e a viabilidade embrionária (Love & Kenney, 2002; Evenson, 2016).

Além disso, a análise seminal tradicional não é capaz de avaliar diretamente a integridade cromatínica, o que limita sua capacidade preditiva isolada. Revisões sobre testes de fragmentação de DNA ressaltam que métodos específicos de avaliação nuclear revelam alterações não identificadas pela rotina andrológica convencional, reforçando a necessidade de abordagens complementares para estimar com maior precisão o potencial reprodutivo masculino (Varner, 2008; Evenson, 2016).

No contexto da espécie equina, a manipulação seminal — incluindo diluição, resfriamento e criopreservação — pode intensificar alterações subcelulares envolvendo membrana plasmática, função mitocondrial e organização nuclear, alterações essas que nem sempre são evidentes em

exames de rotina, mas que podem impactar significativamente a fertilização e o desenvolvimento embrionário (Varner, 2008; Evenson, 2016).

Dessa forma, a identificação de marcadores estruturais e moleculares da qualidade espermática torna-se essencial para aprimorar a avaliação andrológica de garanhões, permitindo uma estimativa mais abrangente do potencial reprodutivo e auxiliando na tomada de decisões em programas de reprodução assistida (Love e Kenney, 2002; Varner, 2008; Evenson, 2016).

Um dos principais entraves à eficiência reprodutiva da espécie é a reconhecida sensibilidade do sêmen equino ao resfriamento e à criopreservação, processos nos quais muitos garanhões exibem desempenho insatisfatório mesmo quando o sêmen fresco se mostra com boa fertilidade (Loomis e Graham, 2008). Essa suscetibilidade decorre de particularidades fisiológicas da membrana plasmática, da alta vulnerabilidade ao estresse oxidativo e da variabilidade na compactação da cromatina. Consequentemente, o processo de congelamento e descongelamento pode induzir danos importantes, incluindo ruptura de membranas, perda de motilidade, disfunção mitocondrial e alterações na integridade do DNA espermático (Varner, 2008).

Estudos mostram que danos em torno de 30% ao DNA podem comprometer não apenas a fertilização, mas também o desenvolvimento embrionário inicial (Evenson e Wixon, 2006; Hamilton e Assumpção, 2020). Em equinos, investigações recentes destacam a importância da avaliação da cromatina como ferramenta complementar para seleção de garanhões e para compreensão dos efeitos do processamento seminal (Morrell et al., 2008).

Com o avanço de biotécnicas como inseminação artificial (IA), transferência de embriões (TE), injeção intracitoplasmática de espermatozoide (ICSI) e produção *in vitro* de embriões (PIVE), cresce a necessidade de métodos diagnósticos capazes de avaliar com maior precisão a qualidade funcional do sêmen e prever o desempenho reprodutivo (Fonte et al., 2024). Nesse contexto, testes voltados para analisar a descompactação da cromatina e integridade do DNA – como TUNEL, SCSA, Cometa, Dispersão de cromatina (SCD) e colorações específicas – tem se destacado como ferramentas valiosas na investigação da fertilidade de garanhões (Abah et al., 2025).

1.1.2 Importância da Cromatina e Morfologia Espermática

A avaliação da qualidade espermática é um dos pilares da reprodução assistida em equinos, sendo utilizada para estimar o potencial fertilizante dos garanhões e orientar o manejo

reprodutivo. Tradicionalmente, essa avaliação baseia-se em parâmetros clássicos, como motilidade total e progressiva, vigor, concentração e morfologia espermática. No entanto, embora essenciais, esses indicadores apresentam limitações importantes na capacidade de prever o desempenho reprodutivo real, especialmente em garanhões com fertilidade limítrofe ou quando ocorrem alterações estruturais não detectadas pela microscopia convencional. Nesse cenário, cresce o reconhecimento da compactação da cromatina e da integridade do DNA espermático como marcadores fundamentais da competência reprodutiva masculina (Varner, 2008; Silva et. al., 2025).

A cromatina espermática representa o arcabouço estrutural que protege o material genético durante o transporte até o oócito. Em mamíferos, o processo de remodelamento cromatínico durante a espermiogênese envolve a substituição progressiva das histonas por protaminas, moléculas altamente básicas e ricas em cisteína, que permitem condensação eficiente do DNA e conferem grande estabilidade estrutural ao núcleo espermático (Ward e Coffey, 1991).

A integridade do DNA espermático é fundamental não apenas para o processo de fertilização, mas também para o desenvolvimento embrionário inicial e para a viabilidade gestacional. Estudos demonstram que danos ao DNA, como quebras simples ou duplas das fitas, perda de protaminação, estresse oxidativo, ou falhas no processo de condensação, podem resultar em redução da clivagem, diminuição da qualidade embrionária, falhas de implantação e aumento das perdas gestacionais precoces em humanos e equinos (Evenson e Wixon, 2006; Hamilton e Assumpção, 2020). Em equinos, há evidências crescentes de que o DNA espermático íntegro desempenha papel crítico em biotécnicas avançadas, como ICSI e PIV, tornando a avaliação da cromatina um componente essencial da medicina reprodutiva moderna (Burns e Herickhoff, 2014; Gibbs et al., 2014; Silva et al., 2025).

A morfologia espermática, por sua vez continua sendo um parâmetro indispensável para a avaliação da fertilidade dos garanhões. Alterações morfológicas refletem defeitos adquiridos durante a espermatogênese, maturação epididimária ou lesões secundárias a processos inflamatórios, estresse térmico, estresse oxidativo e manejo incorreto das amostras (Varner, 2008). Anormalidades de cabeça, peça intermediária ou cauda podem comprometer funções essenciais como motilidade, interação com o trato reprodutivo da fêmea, reação acrossômica, penetração da zona pelúcida e transporte adequado do material genético. Embora a motilidade seja frequentemente utilizada como critério de avaliação espermática, sua capacidade isolada de prever fertilidade é limitada; entretanto, quando associada a avaliações funcionais e

moleculares, contribuí significativamente para a compreensão global da qualidade seminal (Sieme, 2008; Love, 2011).

A relação entre morfologia espermática e integridade da cromatina também tem sido tema de pesquisas. Em diferentes espécies, incluído os equinos, certos defeitos morfológicos – especialmente aqueles relacionados à cabeça espermática – apresentam associação com padrões inadequados de protaminação, suscetibilidade aumentada à fragmentação de DNA e maior vulnerabilidade a estresses ambientais, como o congelamento (Morrell et al., 2008; Serafini et al., 2015).

Diversas metodologias têm sido utilizadas para mensurar a integridade da cromatina e do DNA espermático, incluindo TUNEL, SCSA, Cometa, dispersão de cromatina espermática (DCE) e colorações específicas com afinidade a fosfatos expostos ou regiões de cromatina descompactada, como Azul de Toluidina (AT) e Laranja de Acridina (LA). Embora apresentem diferentes princípios e sensibilidades, esses testes têm contribuído para identificar ganhões subférteis, entender efeitos da criopreservação, aprimorar protocolos de resfriamento e selecionar amostras mais adequadas para técnicas de reprodução assistida. A adoção crescente destes métodos reforça o reconhecimento da cromatina como elemento central da capacidade reprodutiva, e não apenas como estrutura passiva de armazenamento genético (Evenson e Wixon, 2006; Morrell, 2012).

Assim, a integração entre morfologia espermática e avaliação de cromatina permite uma compreensão mais abrangente da qualidade espermática e da fertilidade de ganhões. Tais parâmetros completam a análise seminal convencional fornecendo mais informações sobre o potencial fertilizante dos espermatozoides.

1.1.3 Objetivos da Revisão

Os artigos reunidos nesta revisão demonstram que a eficiência reprodutiva de ganhões e éguas é pautada por fatores estruturais, fisiológicos e moleculares que influenciam diretamente a capacidade fecundante dos gametas e o ambiente uterino. Em ganhões, a variabilidade individual na qualidade espermática, especialmente relacionado à cromatina, metabolismo e resposta ao processamento seminal, explica parte considerável da heterogeneidade observada nas taxas de prenhez (Varner et al., 2000; López-Fernández et al., 2007).

Diante destas evidências, esta revisão tem como primeiro objetivo descrever os aspectos estruturais e funcionais do espermatozoide equino, explorando sua organização nuclear, o

acrossomo, o citoesqueleto flagelar e o aparato mitocondrial conforme detalhado nos estudos de Varner et al. (2000) e Varner e colaboradores (2014). Esses estudos mostram que características como alterações no acrossomo, compactação da cromatina, arquitetura do flagelo, metabolismo baseado em fosforilação oxidativa e vulnerabilidade ao estresse oxidativo têm impacto direto sobre a capacidade fecundante.

O segundo objetivo é analisar as causas e consequências da fragmentação do DNA espermático (FDE), baseando-se em evidências de que a cromatina do ganhão pode ser comprometida por falhas na protaminação, estresse oxidativo, danos térmicos, envelhecimento e manipulações como resfriamento e congelamento (Love, 2005; López-Fernández et al., 2007; Love, 2011; Wach-Gygax et al., 2017; Hamilton e Assumpção, 2020). Estes trabalhos demonstram que a FDE está associada à redução da fertilidade, menor viabilidade embrionária e maior sensibilidade às técnicas de preservação seminal.

O terceiro objetivo é realizar uma revisão crítica dos testes utilizados para mensurar a qualidade da cromatina espermática e sua capacidade em identificar ganhões subfêrteis, como SCSA (Love, 2005), DCE (López-Fernández et al., 2007), TUNEL e Comet (Hamilton e Assumpção, 2020) além de técnicas de coloração como AT e LA (Beletti e Mello, 2004; Naves et al., 2004; Beletti, 2005). Diversos estudos reforçam que essas metodologias detectam alterações não acessíveis à análise seminal convencional, oferecendo melhor capacidade diagnóstica para prever fertilidade (Varner et al., 2000; Morrell et al., 2008; Love, 2011).

Assim, essa revisão busca integrar os achados de artigos publicados sobre como danos estruturais podem afetar a capacidade fecundante dos espermatozoides ressaltando a importância da aplicação de testes cromatínicos em ganhões subfêrteis como parte fundamental na busca por melhores técnicas de manipulação, armazenamento e transporte de sêmen visando incrementar a taxa de concepção.

1.2 ASPECTOS ESTRUTURAIS E FUNCIONAIS DO ESPERMATOZOIDE EQUINO

1.2.1 Cabeça espermática e núcleo

A cabeça do espermatozoide equino apresenta formato espatulado, com contorno elíptico e achatamento dorsoventral, sendo constituída principalmente pelo núcleo e pelo acrossomo. O núcleo ocupa a maior parte do volume cefálico e abriga o genoma haploide paterno em estado de condensação extrema. Essa organização estrutural diferencia profundamente o núcleo

espermático daquele observado em células somáticas, tanto do ponto de vista morfológico quanto funcional (Varner et al., 2000).

Durante a espermiogênese, ocorre extensa remodelação da cromatina, processo no qual as histonas nucleossomais são progressivamente substituídas por proteínas de transição e, posteriormente, por protaminas. Esse rearranjo culmina na formação de uma estrutura altamente compactada, metabolicamente inativa e estruturalmente estável. A intensa compactação nuclear contribui para a redução expressiva do volume do núcleo, estimada em aproximadamente 5–10% do volume observado em células somáticas, favorecendo a hidrodinâmica e aumentando a resistência física do espermatozoide durante o transporte no trato reprodutivo da fêmea (Varner et al., 2014).

As protaminas são proteínas nucleares altamente básicas, ricas em arginina e cisteína. Os resíduos de cisteína estabelecem pontes dissulfeto intra e intermoleculares que estabilizam o DNA compactado em estruturas organizadas em toróides, promovendo proteção mecânica e química adicional ao genoma paterno. Essa arquitetura nuclear reduz a suscetibilidade a danos ambientais, mas não elimina completamente regiões estruturalmente mais vulneráveis. Áreas associadas aos domínios de ligação entre toróides e regiões de ancoragem à matriz nuclear permanecem relativamente mais susceptíveis a quebras de fita simples ou dupla (Hamilton e Assumpção, 2020).

Falhas no processo de protaminação, defeitos na formação das pontes dissulfeto ou persistência de quebras fisiológicas não reparadas durante a espermatogênese podem resultar em fragmentação do DNA espermático. Essas alterações estruturais têm sido associadas à redução do potencial fértil e a prejuízos no desenvolvimento embrionário inicial, evidenciando que a integridade nuclear constitui componente essencial da competência funcional espermática (Hamilton e Assumpção, 2020).

Na porção caudal do núcleo localiza-se a fossa de implantação, região especializada do envelope nuclear que constitui o ponto de ancoragem da peça intermediária do flagelo. Essa conexão é estabelecida por meio do capitulum e das colunas segmentadas, estruturas que integram mecanicamente núcleo e flagelo, permitindo a transmissão eficiente das forças geradas pelo axonema. Alterações morfoestruturais nessa região podem comprometer a estabilidade do complexo cabeça-flagelo e interferir na motilidade espermática, evidenciando a interdependência entre arquitetura nuclear e função locomotora (Varner et al., 2014).

Dessa forma, a cabeça espermática não representa apenas um compartimento anatômico destinado ao transporte do material genético, mas um sistema estrutural altamente especializado, cuja organização molecular e integridade mecânica são determinantes para o sucesso reprodutivo. A compreensão detalhada dessa arquitetura nuclear fundamenta a necessidade de métodos específicos capazes de avaliar a compactação da cromatina e detectar alterações submicroscópicas que não são identificadas por exames seminais convencionais.

1.2.2 Acrossomo

O acrossomo, situado sobre os dois terços anteriores do núcleo, é uma organela essencial para que o espermatozoide realize a penetração das camadas que envolvem o oócito. É composto por uma membrana plasmática externa, membrana acrossomal externa, membrana acrossomal interna e uma matriz acrossômica contendo proteínas e enzimas hidrolíticas que possibilitam a reação acrossômica (Varner et al., 2000).

Durante a reação acrossômica, que pode ser induzida pela exposição de espermatozoides capacitados à progesterona, ocorre fusão controlada entre a membrana plasmática e a membrana acrossomal externa, formando vesículas e permitindo a liberação do conteúdo como receptores proteicos e enzimas hidrolíticas importantes para adesão e penetração na zona pelúcida (Varner et al., 2000). A fusão, todavia, não ocorre imediatamente, é caracterizada por um processo lento e altamente regulado, distinto de eventos exocíticos convencionais observados em outras células (Varner et al. 2014).

A integridade acrossômica é determinante para fertilização. Varner e colaboradores (2000), identificaram garanhões clinicamente subférteis cujos espermatozoides não respondiam adequadamente a estímulos que deveriam induzir a reação acrossômica, apesar de apresentarem motilidade e morfologia dentro dos parâmetros normais. Isso demonstra que falhas no acrossomo podem comprometer a fecundação *in vivo* sem serem detectados por exames convencionais.

1.2.3 Peça intermediária e metabolismo mitocondrial

A peça intermediária do espermatozoide equino constitui a região de transição entre a cabeça e o flagelo, sendo estruturalmente organizada ao redor do axonema e envolvida por uma bainha mitocondrial helicoidal que se dispõe longitudinalmente ao longo da porção proximal do flagelo.

Essa região encontra-se ancorada ao núcleo por meio da fossa de implantação, do capitulum e das colunas segmentadas, formando um complexo de conexão que assegura a integração mecânica entre o núcleo e o aparelho flagelar. A adequada organização dessa interface estrutural é essencial para a transmissão eficiente das forças geradas pelo batimento flagelar, permitindo que a energia produzida pelas mitocôndrias seja convertida em movimento progressivo eficaz (Varner et al., 2000).

A peça intermediária contém uma bainha helicoidal formada por 40-50 giros mitocondriais (figura 1). Esses giros são organizados de maneira altamente simétrica, onde desarranjos nessa simetria foram correlacionados com queda na fertilidade, indicando que a organização mitocondrial representa um marcador estrutural relevante para o desempenho reprodutivo (Gibbs et al., 2014).

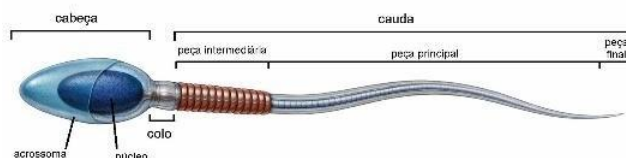


Fig. 1. Ilustração de um espermatozoide equino. Fonte Beletti, M.E.

No que se refere ao metabolismo energético, Varner e colaboradores (2014) demonstram que o espermatozoide equino depende predominantemente da fosforilação oxidativa (OXPHOS) como fonte principal de produção de ATP. Essa característica distingue o espermatozoide equino de espécies em que a glicólise exerce papel mais preponderante. A atividade mitocondrial elevada observada pelos autores está diretamente relacionada à manutenção da motilidade linear progressiva e à subsequente aquisição da hiperativação.

Entretanto, essa forte dependência de OXPHOS traz implicações funcionais importantes. A cadeia respiratória mitocondrial do espermatozoide equino produz quantidades significativas de espécies reativas ao oxigênio (ROS) devido ao vazamento de elétrons durante a fosforilação oxidativa. Foi apontado que espermatozoides provenientes de garanhões férteis apresentam níveis mais elevados de atividade mitocondrial e, consequentemente, maior produção de ROS – fenômeno interpretado como reflexo de metabolismo mais intenso (Varner et al., 2014).

Todavia, esse mecanismo de geração de energia pode elevar a produção de ROS ao ponto de suplantar a capacidade antioxidante do espermatozoide promovendo uma peroxidação lipídica, afetando a membrana plasmática, acrossomal e mitocondrial. Esses danos também alcançam a

cromatina resultando em fragmentação do DNA como foi observado pós descongelamento (López-Fernández et al., 2007).

1.2.4 Cauda, axonema e mecanismos de motilidade

A cauda do espermatozoide equino compreende a peça intermediária, a peça principal e a peça terminal. No interior da peça principal encontra-se o axonema, estrutura responsável pela motilidade flagelar com um arranjo composto por nove dupletos periféricos e um par central (Figura 2) (Varner et al., 2014)

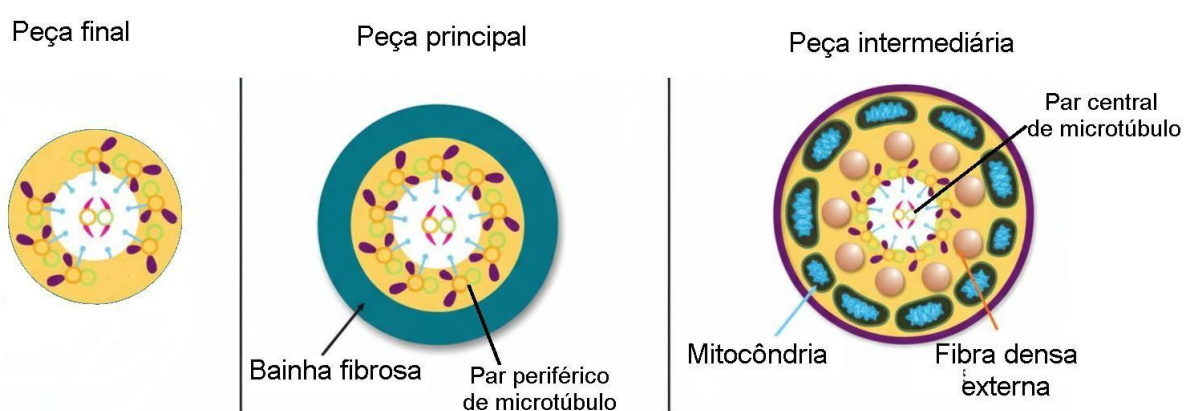


Fig. 2. Ilustração da estrutura interna da peça intermediária e cauda. Fonte: Beletti, M.E.

A motilidade é produzida por ciclos de ligação e liberação de braços de dineína sobre os microtúbulos adjacentes, utilizando ATP derivado das mitocôndrias. A presença de fibras densas externas e bainha fibrosa confere rigidez, direcionamento e elasticidade ao movimento flagelar. Durante sua progressão no trato reprodutivo da fêmea, inicialmente o espermatozoide apresenta motilidade progressiva retilínea e após sua capacitação, atinge um padrão hiperativado, caracterizado por batimentos amplos e assimétricos, permitindo que penetre no complexo cumulus-oophorus (Varner et al., 2014).

Segundo Varner e colaboradores (2014), a hiperativação é um pré-requisito para sucesso na fecundação e depende criticamente da integridade do axonema e da homeostase interna de cálcio. Equilíbrio que pode ser prejudicado pelos processos de congelamento e descongelamento uma vez que provocam mudanças nos níveis de cálcio (Neuhauser et al., 2019).

1.2.5 Membranas espermáticas e suscetibilidade ao estresse

As membranas plasmática, acrossomal e mitocondrial apresentam composição lipídica altamente fluida, característica associada à maior vulnerabilidade ao estresse térmico e oxidativo. López-Fernández e colaboradores (2007) demonstram que danos subletais na membrana plasmática acumulam-se rapidamente após o congelamento, intensificando-se nas horas subsequentes.

O processo de criopreservação provoca diversas alterações espermática, entre elas: lesão na membrana plasmática, redução do potencial de membrana mitocondrial (causando redução da motilidade) e acúmulo de Ca^{2+} . Esses achados estão correlacionados com sêmen com menor potencial de fertilidade (Neuhauser et al., 2019). Danos semelhantes foram observados após vitrificação, reforçando que membranas espermáticas são altamente suscetíveis ao dano induzido por oscilações osmóticas e choque térmico (Restrepo et al., 2018).

1.3 TESTES DE AVALIAÇÃO DA CROMATINA

1.3.1 Ensaio Cometa

O ensaio Cometa, também denominado eletroforese em gel de célula única, é amplamente empregado na avaliação de danos primários ao DNA, sendo reconhecido por sua elevada sensibilidade para detectar quebras de fita simples, sítios alcalino-lábeis e lesões associadas a processos incompletos de reparo (Tice et al., 2000; Speit e Hartmann, 2012). A técnica permite a análise em nível individual de célula, sendo aplicável tanto em estudos *in vitro* quanto *in vivo*.

O princípio do método baseia-se na migração diferencial do DNA sob campo elétrico após lise celular e exposição a condições altamente alcalinas. Inicialmente, as células são incorporadas em agarose e submetidas a soluções de lise contendo alta força iônica e detergentes, promovendo a remoção de membranas celulares e a liberação do DNA nuclear. Posteriormente, a incubação em meio alcalino (pH superior a 13) induz a desnaturação do DNA e converte sítios alcalino-sensíveis, como sítios apurínicos, em quebras de fita simples detectáveis, ampliando a expressão de lesões pré-existentes (Tice et al., 2000).

Durante a eletroforese alcalina, fragmentos ou regiões contendo quebras apresentam maior mobilidade em direção ao polo positivo, enquanto o DNA menos fragmentado permanece concentrado na região nuclear original. Essa dinâmica origina a morfologia característica semelhante a um “cometa”, composta por uma região correspondente ao DNA retido

(“cabeça”) e outra referente ao DNA migrado (“cauda”). Parâmetros como comprimento da cauda, porcentagem de DNA migrado e momento de cauda estão associados à magnitude do dano estrutural detectado (Tice et al., 2000; Speit e Hartmann, 2012).

Além da identificação de quebras primárias, o ensaio possibilita a detecção indireta de ligações cruzadas entre DNA-DNA e DNA-proteína, uma vez que tais alterações reduzem a migração eletroforética da molécula, resultando em menor formação de cauda (Tice et al., 2000). O método também pode ser adaptado para a investigação de lesões oxidativas específicas mediante o emprego de enzimas reparadoras, como a formamidopirimidina-DNA-glicosilase (FPG), que converte bases oxidadas em quebras detectáveis durante a eletroforese, ampliando o espectro de danos avaliáveis (Speit e Hartmann, 2012).

Entre as principais vantagens do ensaio destacam-se sua elevada sensibilidade, a necessidade de pequeno número de células, a análise individualizada e a versatilidade metodológica. Como limitações, ressaltam-se a influência de variáveis técnicas — incluindo condições de lise, alcalinização e eletroforese — a necessidade de padronização rigorosa para comparação interlaboratorial e o fato de que o método detecta predominantemente danos estruturais primários, não permitindo, isoladamente, inferir a ocorrência de mutações fixadas.

1.3.2 TUNEL (terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP Nick-End Labeling)

O teste TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end labeling) é um método destinado à detecção direta de quebras de DNA por meio da identificação de terminais 3'-hidroxila (3'-OH) expostos nas regiões onde ocorreram rupturas das fitas nucleotídicas. Diferentemente de técnicas baseadas em suscetibilidade à desnaturação ou alterações indiretas da estrutura cromatínica, o TUNEL identifica quebras já estabelecidas na molécula de DNA, refletindo lesões estruturais presentes no núcleo celular (Kakasi et al., 2015).

O princípio da técnica fundamenta-se na ação da enzima Terminal deoxynucleotidyl Transferase (TdT), que reconhece os terminais 3'-OH livres e catalisa a incorporação de nucleotídeos marcados, como BrdUTP (5-bromo-2'-deoxiuridina-5'-trifosfato). Após essa etapa, anticorpos fluorescentes específicos contra o nucleotídeo incorporado permitem a visualização e quantificação das quebras por microscopia de fluorescência ou citometria de fluxo. A intensidade do sinal fluorescente está relacionada ao número de nucleotídeos incorporados e, consequentemente, ao número de extremidades livres detectáveis. Dessa

forma, células com maior fluorescência tendem a apresentar maior quantidade de quebras acessíveis à enzima, enquanto células com DNA íntegro apresentam marcação mínima ou ausente (Kakasi et al., 2015).

O objetivo do teste é quantificar fragmentação real do DNA, sendo amplamente utilizado como marcador de apoptose e dano genômico em diferentes tipos celulares. Entre suas principais vantagens destacam-se a análise individualizada das células, a aplicabilidade em citometria de fluxo — permitindo avaliação de grande número de eventos — e a detecção direta de quebras de fita simples ou dupla.

Entretanto, na espécie equina, a aplicação do TUNEL apresenta limitações relacionadas à acessibilidade da cromatina espermática. Em estudo conduzido por Mesa et al. (2016), a incubação de sêmen equino a 41 °C por uma hora não resultou em aumento significativo da porcentagem de células TUNEL-positivas. Além disso, a exposição a 50 µM de H₂O₂ foi associada à redução da marcação TUNEL. Esses achados indicam que, sob determinadas condições experimentais, o método pode não evidenciar alterações detectáveis, mesmo diante de estímulos potencialmente lesivos.

Resultados semelhantes foram observados por Burns e Herickhoff (2014), nos quais a fragmentação detectável pelo TUNEL tornou-se mais evidente após exposição prolongada a condições oxidativas intensas. Nos grupos controle ou em momentos iniciais de avaliação, o teste não identificou alterações detectáveis, sugerindo que determinados níveis ou padrões de dano podem não ser prontamente evidenciados pela técnica.

A limitação de sensibilidade do TUNEL em espermatozoides equinos tem sido atribuída à elevada compactação protamínica do DNA, caracterizada pela formação extensiva de pontes dissulfeto entre protaminas, o que restringe o acesso da enzima TdT às extremidades 3'-OH. Por essa razão, protocolos adaptados incluem o uso prévio de agentes redutores, como o dithiothreitol (DTT), com o objetivo de promover relaxamento cromatínico e aumentar a penetração dos reagentes (Mesa et al., 2016). Contudo, mesmo com essa modificação metodológica, parte das lesões pode permanecer não detectável, indicando que o teste pode subestimar a extensão real da fragmentação em cromatina altamente compactada.

1.3.3 Nicoletti

O teste de Nicoletti foi originalmente descrito como um método simples e rápido para detecção de apoptose e fragmentação de DNA por meio de citometria de fluxo em timócitos, utilizando o corante fluorogênico iodeto de propídio (IP), um fluorocromo intercalante

amplamente empregado para quantificação do conteúdo de DNA celular. A técnica baseia-se na mensuração do conteúdo total de DNA intracelular, permitindo identificar populações celulares que apresentem redução mensurável desse conteúdo (Nicoletti et al., 1991; Kakasi et al., 2015).

O princípio do método fundamenta-se no fato de que células com DNA íntegro mantêm seu conteúdo nuclear após a permeabilização controlada, formando um pico bem definido no histograma de intensidade de fluorescência. Em contraste, células com DNA fragmentado apresentam perda de fragmentos menores durante o processamento, resultando em redução da intensidade do sinal fluorescente e formação de uma população sub-haplóide (subdiploide em células somáticas), característica de diminuição do conteúdo de DNA (Nicoletti et al., 1991; Kakasi et al., 2015).

O objetivo do teste é identificar células que sofreram fragmentação associada à perda detectável de DNA, tradicionalmente relacionada a processos apoptóticos em células somáticas. Diferentemente de métodos baseados na marcação direta de quebras de fita, o teste de Nicoletti detecta a consequência estrutural da fragmentação, isto é, a redução mensurável do conteúdo total de DNA celular (Nicoletti et al., 1991).

Do ponto de vista metodológico, o ensaio envolve a incubação das células em solução contendo citrato de sódio a 0,1%, Triton X-100 a 0,1% e iodeto de propídio, promovendo permeabilização da membrana e marcação do DNA remanescente. Após aproximadamente uma hora de incubação à temperatura ambiente, as amostras podem ser analisadas diretamente no citômetro de fluxo, gerando histogramas nos quais células com DNA preservado formam o pico principal de fluorescência, enquanto células com perda de DNA são identificadas por sinal de menor intensidade relativa (Nicoletti et al., 1991). A metodologia destaca-se pela simplicidade operacional, reduzido número de etapas e ausência de reações enzimáticas complexas, quando comparada a técnicas como o TUNEL (Kakasi et al., 2015).

No estudo conduzido por Kakasi et al. (2015), o teste de Nicoletti foi comparado ao teste TUNEL em doze amostras de sêmen equino criopreservado. Os valores médios de fragmentação detectados pelo método de Nicoletti foram significativamente mais baixos ($1,93 \pm 0,98\%$) do que aqueles obtidos pelo TUNEL ($30,77 \pm 13,03\%$). A análise estatística demonstrou grande discordância entre os métodos, sugerindo que não são intercambiáveis e que podem refletir fenômenos distintos relacionados ao dano ao DNA (Kakasi et al., 2015). Outro ponto discutido no estudo refere-se à especificidade analítica. Enquanto o TUNEL apresentou marcação inespecífica de membrana plasmática e mitocôndrias em análise por

microscopia de fluorescência, o teste de Nicoletti não demonstrou evidências de ligação inespecífica nas condições avaliadas, o que foi interpretado como uma vantagem metodológica no contexto do estudo. Ainda assim, os próprios autores ressaltam que análises adicionais são necessárias para determinar o valor diagnóstico do teste de Nicoletti em estudos de fertilidade equina (Kakasi et al., 2015).

Assim, com base nos dados disponíveis, o teste de Nicoletti pode ser caracterizado como uma técnica de citometria de fluxo de execução simples, capaz de detectar redução mensurável do conteúdo de DNA em espermatozoides equinos. Destaca-se pela praticidade metodológica e pela ausência de marcações inespecíficas observadas no teste comparativo. Contudo, sua menor proporção de células classificadas como fragmentadas em relação ao TUNEL e a ausência de validação robusta em estudos de fertilidade indicam que sua aplicabilidade clínica ainda requer investigação adicional antes de ser incorporada como ferramenta rotineira na avaliação reprodutiva.

1.3.4 Dispersão de Cromatina Espermática (SCD)

O teste de dispersão da cromatina espermática (Sperm Chromatin Dispersion – SCD), também conhecido como teste de Halo, consiste na avaliação da integridade do DNA espermático por meio da análise do padrão de dispersão cromatínica após exposição das células a tratamentos controlados de lise e depleção proteica. Em equinos, a metodologia tem sido aplicada por meio de kits comerciais específicos, como o Sperm-Halomax®, originalmente desenvolvido para garanhões (López-Fernández et al., 2007). O princípio do método baseia-se na remoção parcial de proteínas nucleares sob condições padronizadas, permitindo que a cromatina se expanda diferentemente conforme o estado estrutural do DNA. Assim, a classificação dos espermatozoides é realizada com base na morfologia do halo observado ao redor do núcleo após o processamento (López-Fernández et al., 2007; Cortés-Gutiérrez et al., 2009).

Em estudo conduzido em garanhões, foram descritas duas populações principais após o SCD: núcleos que permanecem compactos ou apresentam halos pequenos e regulares e núcleos que exibem halos mais amplos de dispersão cromatínica. A associação entre o padrão de halo e a presença de quebras de DNA foi corroborada por ensaio de incorporação enzimática utilizando Klenow polimerase, que demonstrou marcação preferencial em espermatozoides classificados como portadores de DNA fragmentado (López-Fernández et al., 2007). Deve-se considerar, entretanto, que diferentes variantes metodológicas do SCD podem empregar critérios distintos de classificação morfológica, razão pela qual a

interpretação dos halos deve ser realizada de acordo com o protocolo específico adotado (Cortés-Gutiérrez et al., 2009).

A aplicação do SCD na avaliação de sêmen equino submetido à criopreservação tem sido descrita na literatura. Em estudo experimental, foram avaliadas amostras em diferentes etapas do processamento seminal, incluindo sêmen fresco e pós-descongelamento, bem como após exposição a agentes indutores de dano, como calor, hidróxido de sódio (NaOH) e radiação ultravioleta, utilizados como controles positivos para o ensaio (Carretero et al., 2012). Esses procedimentos produziram padrões de dispersão compatíveis com alteração estrutural da cromatina, demonstrando a capacidade do SCD de responder a condições experimentalmente lesivas. Além disso, a fragmentação do DNA espermático avaliada pelo SCD foi descrita como um fenômeno dinâmico, podendo aumentar ao longo do tempo de incubação e sob diferentes condições de processamento, como refrigeração e congelamento (López-Fernández et al., 2007).

Estudos adicionais confirmaram a aplicabilidade do SCD na avaliação rotineira da fragmentação do DNA em sêmen equino, destacando sua execução relativamente simples e a possibilidade de análise por microscopia convencional (Olaciregui et al., 2016). Entretanto, o padrão de dispersão obtido no ensaio depende não apenas da presença de quebras na molécula de DNA, mas também da organização protamínica da cromatina espermática, a qual pode variar entre espécies e influenciar a resposta ao tratamento lisante (Cortés-Gutiérrez et al., 2009).

Dessa forma, os dados disponíveis indicam que o SCD constitui ferramenta útil para avaliação da integridade da cromatina espermática em garanhões, especialmente em estudos que envolvem manipulação e processamento seminal. Contudo, sua interpretação deve considerar as especificidades do protocolo empregado e as características estruturais da cromatina equina (López-Fernández et al., 2007; Carretero et al., 2012; Olaciregui et al., 2016).

1.3.5 Teste de estrutura da cromatina espermática ou Sperm Chromatin Structure Assay (SCSA)

O *Sperm Chromatin Structure Assay* (SCSA) foi introduzido como método destinado a avaliar a suscetibilidade do DNA espermático à desnaturação e relacioná-la à fertilidade. O ensaio baseia-se na exposição controlada do DNA a condições ácidas, seguida da coloração com laranja de acridina, um fluorocromo metacromático que permite distinguir DNA de fita dupla e fita simples por emissão diferencial de fluorescência (Evenson et al., 1980). Nessa

condição, o DNA estruturalmente estável mantém-se predominantemente em fita dupla e emite fluorescência verde, enquanto regiões suscetíveis à desnaturação tornam-se parcialmente de fita simples, emitindo fluorescência vermelha (Evenson et al., 1980; Love, 2005).

A análise é realizada por citometria de fluxo, o que possibilita a avaliação de milhares de espermatozoides em curto intervalo de tempo, conferindo robustez estatística e reprodutibilidade ao método (Love, 2005). A partir da razão entre fluorescência vermelha e fluorescência total (vermelha + verde), obtém-se o índice de fragmentação de DNA (DFI), anteriormente descrito como percentual de células fora da população principal (%COMP_{at}), além de parâmetros derivados como média e desvio-padrão da distribuição populacional (Love, 2005; Evenson et al., 2002). Esses indicadores refletem a proporção de espermatozoides com cromatina estruturalmente instável e a heterogeneidade dessa instabilidade dentro da amostra.

Em garanhões, demonstrou-se associação inversa entre o percentual de células com maior suscetibilidade à desnaturação e índices de fertilidade, incluindo prenhez por ciclo e prenhez sazonal, evidenciando que aumentos no DFI ou no %COMP_{at} acompanham reduções nas taxas de concepção (Love e Kenney, 1998; Love, 2005). De modo semelhante, ejaculados equinos utilizados para inseminação artificial com sêmen resfriado apresentaram correlação negativa entre DFI e taxa de prenhez, reforçando o valor clínico do teste na identificação de subfertilidade (Morrell et al., 2008). Esses achados sustentam a utilização do SCSA como ferramenta complementar na investigação de desempenho reprodutivo inferior ao esperado. Uma das principais contribuições do método reside na sua capacidade de detectar alterações que não necessariamente se refletem em parâmetros convencionais como motilidade ou morfologia espermática. Estudos clínicos indicam que a qualidade do DNA pode declinar mesmo quando a motilidade permanece dentro de padrões considerados adequados, especialmente durante armazenamento e resfriamento do sêmen (Love, 2005). Assim, o SCSA amplia a avaliação andrológica ao incorporar um componente estrutural nuclear que não é rotineiramente mensurado nos exames tradicionais.

Apesar de sua utilidade diagnóstica, o SCSA apresenta limitações que devem ser consideradas na interpretação dos resultados. A própria organização altamente compactada da cromatina espermática impõe restrições físicas à ação do fluorocromo. Evidências indicam que o método detecta com maior eficiência alterações localizadas em regiões de ligação entre toróides de protaminas, onde o DNA apresenta maior acessibilidade. Em contrapartida, regiões internas fortemente compactadas podem não ser plenamente

acessíveis à intercalação da laranja de acridina, o que pode levar à subestimação de determinados tipos de lesão estrutural (Serafini et al., 2015). Essa característica ajuda a explicar por que o teste Cometa, capaz de promover descondensação mais extensa do DNA por meio da extração de proteínas nucleares, pode identificar danos persistentes não integralmente evidenciados pelo SCSA (Serafini et al., 2015).

Adicionalmente, modelos experimentais de estresse testicular leve demonstraram que o SCSA pode apresentar sensibilidade limitada para alterações discretas ou de evolução prolongada. Em garanhões submetidos à orquiectomia unilateral, observou-se elevação transitória de parâmetros como mean- α t aproximadamente 14 dias após o procedimento, com posterior retorno aos valores basais, enquanto o teste Cometa continuou a detectar alterações nucleares até 60 dias (Serafini et al., 2015). Esses resultados sugerem que o SCSA é eficaz para identificar alterações iniciais de suscetibilidade à desnaturação, mas pode ser menos sensível para monitoramento de danos persistentes localizados em regiões menos acessíveis ao corante.

Do ponto de vista operacional, a execução do SCSA depende da disponibilidade de citometria de fluxo, o que restringe sua aplicação a centros especializados. Essa exigência técnica limita sua incorporação ampla na rotina de muitos laboratórios veterinários, apesar de sua relevância diagnóstica (Love, 2005). Além disso, a interpretação clínica deve considerar que a fertilidade é fenômeno multifatorial. Fatores maternos, ambientais e relacionados ao manejo reprodutivo podem influenciar significativamente os resultados gestacionais, independentemente da integridade do DNA espermático (Love, 2005).

Dessa forma, o SCSA não deve ser utilizado como preditor isolado de fertilidade, mas como componente integrado de uma avaliação andrológica abrangente, contribuindo para a compreensão da qualidade nuclear espermática dentro do contexto clínico reprodutivo.

1.3.6 Azul de toluidina

O azul de toluidina (AT) é amplamente empregado como ferramenta histoquímica para a avaliação da condensação da cromatina espermática, fundamentando-se no fenômeno de metacromasia induzida após hidrólise ácida controlada. A técnica foi originalmente descrita em espermatozoides bovinos com o objetivo de detectar alterações no complexo DNA–proteína por meio da exposição de grupos fosfato do DNA, tornando-se um método simples e rápido para identificação de subpopulações espermáticas com possível instabilidade cromatínica. O protocolo clássico envolve fixação, hidrólise em ácido forte e coloração com solução de AT em pH 4,0, condição considerada crítica para garantir que

predominantemente os fosfatos do DNA permaneçam ionizados, reduzindo ligações inespecíficas a outros sítios aniônicos e aumentando a especificidade da reação (Mello, 1982).

O princípio biológico que sustenta a interpretação da coloração baseia-se na organização altamente compactada da cromatina espermática. Em espermatozoides normais, a substituição de histonas por protaminas promove forte empacotamento do DNA, restringindo a disponibilidade de fosfatos livres para interação com o corante. Nessas condições, a coloração tende a variar de verde a azul-claro. Por outro lado, quando há descompactação ou instabilidade estrutural, ocorre maior exposição de grupos fosfato, favorecendo maior ligação do AT e resultando em tonalidades mais intensas, frequentemente azul-escuro a violeta, compatíveis com a metacromasia (figura 3). Assim, o AT permite inferir diferenças estruturais no complexo DNA-proteína a partir de alterações cromáticas observáveis em microscopia óptica convencional (Mello, 1982; Beletti e Mello, 2004).

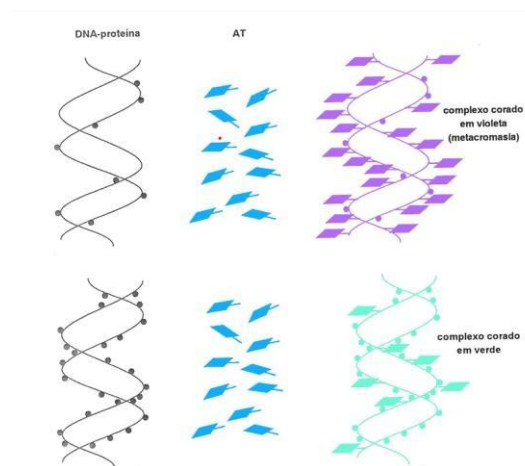


Fig. 3. Esquema de ligação do Azul de Toluidina aos grupos fosfato do DNA . Fonte: Beletti, M.E.

Desde sua descrição inicial, a técnica foi aplicada em diferentes espécies e contextos experimentais. Em coelhos, demonstrou equivalência diagnóstica com a reação de Feulgen na identificação de alterações cromatínicas, porém com maior capacidade de discriminar graus de alteração em virtude da variação de cor característica da metacromasia (Beletti e Mello, 2004). Em bovinos, a coloração por AT mostrou-se útil para identificar heterogeneidade cromatínica e regiões localizadas de descompactação, permitindo ainda associação com parâmetros morfométricos da cabeça espermática, reforçando a integração entre avaliação estrutural nuclear e morfologia. Esses achados sustentam a relevância do

método tanto na investigação básica da biologia nuclear espermática quanto na avaliação aplicada da qualidade seminal (Beletti et al., 2005).

Do ponto de vista prático, o principal objetivo da aplicação do AT na andrologia é identificar alterações estruturais da cromatina que possam comprometer a estabilidade nuclear e, potencialmente, a competência fertilizante. Entre suas vantagens destacam-se o baixo custo, a facilidade de execução, a possibilidade de aplicação em rotina laboratorial sem necessidade de equipamentos complexos e a capacidade de discriminar graus de alteração por variação cromática. Tais características tornam o AT especialmente atrativo em cenários onde métodos como citometria de fluxo ou microscopia eletrônica não estão disponíveis. A robustez metodológica da técnica foi ampliada com a incorporação de sistemas de análise computacional de imagens. Por meio da segmentação digital da cabeça espermática e da quantificação de valores de pixel, tornou-se possível mensurar objetivamente intensidade de coloração, descondensação e heterogeneidade cromatínica, reduzindo a subjetividade inerente à avaliação visual (Beletti et al., 2005). Essa abordagem foi aplicada em estudos que investigaram efeitos de estresse térmico escrotal, fertilidade *in vitro* e diferenças entre reprodutores com distintas taxas de concepção, demonstrando que parâmetros derivados da análise digital podem discriminar populações espermáticas e identificar padrões específicos de alteração cromatínica. A classificação de tipos de descompactação — como alterações na base, no eixo central, na metade basal ou em padrão disperso — acrescenta um componente topográfico à avaliação, sugerindo que não apenas a intensidade, mas também a localização das alterações pode ter relevância biológica (Lucio et al., 2016; Riveros et al., 2023; Silva et al., 2025).

Apesar de suas qualidades, o AT apresenta limitações que devem ser consideradas. A avaliação exclusivamente visual pode ser influenciada por subjetividade, sobretudo em casos de coloração intermediária, dificultando a distinção entre cromatina normal e discretamente alterada. Essa limitação também é observada na reação de Feulgen; contudo, o AT tende a oferecer melhor discriminação entre graus de alteração, uma vez que envolve variação de tonalidade e não apenas de intensidade de coloração. Além disso, a interpretação dos resultados depende de padronização rigorosa das condições de hidrólise e coloração, uma vez que pequenas variações metodológicas podem influenciar a intensidade e o padrão cromático obtido (Beletti e Mello, 2004).

1.3.7 Laranja de acridina

O teste de laranja de acridina (LA), também denominado Acridine Orange Test (AOT), foi proposto como método simples para avaliar a suscetibilidade do DNA espermático à desnaturação, utilizando as propriedades metacromáticas do fluorocromo como indicador indireto da estabilidade cromatínica. O princípio do método baseia-se na emissão diferencial de fluorescência da laranja de acridina quando ligada ao DNA, emitindo fluorescência verde quando intercalada ao DNA em conformação nativa (dupla fita) e fluorescência vermelha (figura 4) quando associada ao DNA desnaturado (fita simples), permitindo distinguir células com maior ou menor resistência à desnaturação (Tejada et al., 1984).

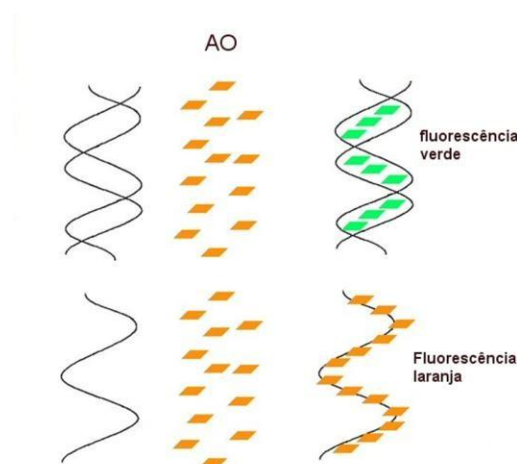


Fig. 4. Esquema de ligação do Laranja de Acridina ao DNA . Fonte: Beletti, M.E.

Na formulação clássica descrita por Tejada et al. (1984), o método foi apresentado como alternativa mais acessível à citometria de fluxo, possibilitando avaliação por microscopia de fluorescência em esfregaços fixados. Nesse estudo, os autores introduziram o conceito de effective sperm count, obtido pela multiplicação da porcentagem de espermatozoides fluorescendo em verde pela concentração espermática total, sugerindo potencial aplicação clínica na triagem inicial da fertilidade masculina. Com base na comparação entre indivíduos férteis e inférteis, foi proposto um ponto de corte para esse índice, reforçando a perspectiva de uso diagnóstico do teste (Tejada et al., 1984).

Protocolos subsequentes mantiveram a estrutura metodológica original, incluindo fixação em solução de Carnoy, coloração com laranja de acridina e leitura imediata em microscopia de fluorescência (figura 5), com classificação das cabeças espermáticas como verdes (DNA predominantemente nativo) ou vermelho-alaranjadas (DNA suscetível à desnaturação).

Essa abordagem preserva o caráter semiquantitativo da avaliação visual da estabilidade cromatínica (Tejada et al., 1984).



Fig. 5. Espermatozoides corados com LA, florescendo verde DNA intacto e vermelho DNA fragmentado Fonte: Arquivo Pessoal.

Entretanto, a utilidade clínica do LA em lâmina passou a ser questionada em investigações posteriores. Em estudo prospectivo envolvendo 103 homens subférteis, observou-se ampla variação na proporção de fluorescência verde, com mediana de 24% e grande dispersão entre os indivíduos avaliados (Eggert-Kruse et al., 1996). Nesse mesmo estudo, não foram identificadas correlações significativas entre os resultados do LA e parâmetros convencionais do espermograma, como concentração, motilidade, morfologia ou vigor, tampouco associação consistente com a ocorrência subsequente de gravidez. Com base nesses achados, os autores concluíram que o teste não apresentava utilidade clínica como ferramenta isolada de triagem na investigação básica da infertilidade (Eggert-Kruse et al., 1996).

No contexto da fertilização *in vitro*, foi avaliado um escore baseado no LA (Acridine Orange Score – AOS), incluindo leituras com e sem desnaturação térmica como forma de estimar a resistência cromatínica. Embora maior suscetibilidade à desnaturação tenha se associado a menor capacidade fecundante, o desempenho do AOS foi inferior ao da morfologia estrita como preditor isolado de fertilização. Apenas quando incorporado a modelos de regressão logística juntamente com a morfologia estrita o AOS contribuiu modestamente para melhorar a capacidade preditiva do conjunto. Os autores também destacaram limitações metodológicas relevantes, incluindo subjetividade na leitura microscópica e

desvanecimento da fluorescência, fatores que comprometem a robustez do método (Duran et al., 1998).

Limitações adicionais foram descritas em modelo experimental com sêmen equino liofilizado, no qual o LA detectou percentuais de dano ao DNA significativamente superior aos observados por métodos como SCD e Diff-Quick, além de apresentar correlações negativas com esses ensaios. Esses achados sugerem possível superestimação de danos em determinadas condições experimentais e reforçam a necessidade de interpretação cautelosa dos resultados obtidos por essa técnica (Olaciregui et al., 2016).

O contraste entre o LA em lâmina e abordagens citométricas como o Sperm Chromatin Structure Assay (SCSA) evidencia diferenças importantes em termos de padronização e reprodutibilidade. Embora ambos utilizem a laranja de acridina como fluorocromo, o SCSA emprega condições rigorosamente controladas de desnaturação e leitura automatizada por citometria de fluxo, com análise de milhares de células por amostra, reduzindo substancialmente a influência da subjetividade (Evenson et al., 1999). Em contrapartida, o método em lâmina permanece mais suscetível a variações técnicas e interpretativas, como também discutido no contexto da avaliação microscópica do LA (Duran et al., 1998; Evenson et al., 1999).

Dessa forma, o teste de LA constitui abordagem historicamente relevante para avaliação da suscetibilidade do DNA espermático à desnaturação. Contudo, a literatura indica que sua aplicação clínica isolada apresenta limitações relacionadas à variabilidade metodológica e ao poder preditivo inconsistente, devendo ser interpretado de maneira complementar a outros parâmetros laboratoriais e clínicos (Eggert-Kruse et al., 1996; Duran et al., 1998; Evenson et al., 1999; Olaciregui et al., 2016).

1.3.8 Reação de Feulgen

A reação de Feulgen foi descrita por Robert Feulgen e Heinrich Rossenbeck, em 1924, como um método citoquímico específico para a demonstração de DNA em núcleos celulares, produzindo coloração magenta após a hidrólise ácida do DNA e posterior ligação do reagente de Schiff aos grupos aldeídos expostos da desoxirribose. Desde sua proposição, consolidou-se como técnica capaz de revelar DNA de forma específica e estequiométrica, permitindo análises qualitativas e quantitativas em células individuais (Mello e Vidal, 2017). O princípio do método baseia-se em dois estágios fundamentais: a hidrólise ácida controlada, que promove depurinação e desmascaramento de resíduos de desoxirribose que passam a atuar como aldeídos, e a reação desses aldeídos com o reagente de Schiff, resultando na

coloração característica. A cinética da hidrólise segue uma curva típica, com aumento progressivo da intensidade da reação até um ponto máximo, seguido de declínio decorrente da degradação e solubilização do ácido apurínico, o que torna o procedimento altamente dependente de condições rigorosamente padronizadas de tempo, temperatura e concentração do ácido (Mello e Vidal, 2017).

Historicamente, a reação de Feulgen teve papel central na demonstração de que a replicação do DNA ocorre durante a fase S do ciclo celular, além de contribuir para o estabelecimento da constância do conteúdo médio de DNA por conjunto cromossômico haploide em diferentes organismos. A partir desses achados, passou a ser amplamente utilizada em estudos de ploidia, aneuploidias e quantificação absoluta de DNA nuclear por microscopia e microdensitometria, com reconhecida reprodutibilidade entre diferentes observadores e possibilidade de armazenamento prolongado das lâminas (Mello e Vidal, 2017).

Apesar de sua especificidade para DNA, a intensidade da reação não depende exclusivamente da quantidade de DNA presente, mas também da arquitetura da cromatina e da organização do complexo DNA-proteína (Gledhill, 1970; Mello e Vidal, 2017). Núcleos com o mesmo conteúdo genômico podem apresentar respostas à coloração distintas quando diferem na composição ou no grau de associação das proteínas nucleares, especialmente no contexto do complexo desoxirribonucleoproteico (Gledhill, 1970; Mello e Vidal, 2017). Estudos clássicos com espermatozoides bovinos demonstraram que alterações na associação entre DNA e proteínas nucleares podem modificar a cinética de hidrólise e a intensidade da coloração, mesmo na ausência de variações reais no conteúdo de DNA, evidenciando que a técnica é sensível a mudanças estruturais da cromatina (Gledhill, 1970; Mello e Vidal, 2017).

No campo da andrologia, essa sensibilidade estrutural fundamentou o uso da reação de Feulgen como ferramenta indireta para avaliação da integridade da cromatina espermática. Em espermatozoides, variações na compactação nuclear e na composição das proteínas básicas podem alterar a acessibilidade do DNA à hidrólise ácida, influenciando a intensidade da coloração obtida (Beletti e Mello, 2004; Mello e Vidal, 2017).

Entre as vantagens do método destacam-se sua especificidade para DNA, a possibilidade de análise estequiométrica em células individuais e a estabilidade das preparações ao longo do tempo, características que sustentaram sua ampla aplicação em citogenética e diagnóstico. Entretanto, a reação é altamente dependente de padronização rigorosa, pois variações nas condições de hidrólise podem comprometer a reprodutibilidade dos resultados (Mello e Vidal, 2017).

A escolha do fixador também influencia a acessibilidade do DNA à hidrólise, podendo alterar o perfil da curva reacional. Além disso, a presença de grupos aldeídos citoplasmáticos podem gerar reações inespecíficas, fenômeno descrito como reação “plasmal”, o que reforça a necessidade de controle técnico cuidadoso (Mello e Vidal, 2017). Em análises comparativas com outras técnicas de coloração nuclear, verificou-se que a reação de Feulgen é capaz de identificar alterações cromatínicas, porém apresenta menor capacidade de discriminar diferentes intensidades ou gradações de comprometimento quando comparada à coloração por azul de toluidina, cuja metacromasia facilita a distinção entre graus distintos de alteração. Ainda assim, ambas as técnicas demonstraram concordância na identificação de cromatina alterada, indicando que a reação de Feulgen permanece útil como método estrutural, embora com limitações na avaliação da intensidade das alterações (Beletti e Mello, 2004).

O advento da análise digital de imagens ampliou substancialmente o potencial interpretativo da reação de Feulgen, permitindo mensuração objetiva de densidade óptica, área nuclear e parâmetros texturais associados à organização da cromatina. A aplicação de algoritmos de segmentação e quantificação de intensidade possibilitou identificar contrastes entre regiões mais compactadas e menos compactadas do núcleo, aumentando a sensibilidade para alterações estruturais sutis não facilmente detectáveis por avaliação visual convencional. Abordagens baseadas em citometria de imagem também permitiram calcular índices derivados, como o contraste médio de absorbância (“Average Absorbance Ratio”), utilizado para caracterizar reorganizações cromatínicas em diferentes contextos biológicos (Mello e Vidal, 2017).

No âmbito da reprodução animal, a aplicação da reação de Feulgen associada à análise por imagem em espermatozoides de touros submetidos à degeneração testicular experimental permitiu identificar vacúolos nucleares e padrões de cromatina anormal, os quais se associaram a alterações nas taxas de desenvolvimento embrionário *in vitro*. Esses achados indicam que, quando combinada a métodos digitais de quantificação, a técnica pode revelar alterações estruturais relevantes mesmo em núcleos altamente compactados como os espermáticos (Fernandes et al., 2008).

Estudos comparativos recentes envolvendo RF, AT e LA demonstraram correlação significativa entre essas técnicas quando analisadas por processamento digital de imagens, indicando que identificam padrões semelhantes de comprometimento da integridade cromatínica. Esses resultados reforçam que, embora metodologicamente mais antiga, a

reação de Feulgen permanece capaz de fornecer informações estruturais consistentes, sobretudo quando integrada a ferramentas computacionais de análise (Silva et al., 2025).

De modo geral, a RF permanece como método específico para DNA, apto a evidenciar não apenas seu conteúdo, mas também alterações estruturais decorrentes de modificações na organização do complexo DNA-proteína, desde que suas condições experimentais sejam cuidadosamente controladas (Mello e Vidal, 2017). Apesar das limitações relacionadas à sensibilidade às condições de hidrólise e à menor capacidade de discriminação de intensidade em comparação a técnicas metacromáticas, sua integração com análise digital mantém o método atual e relevante para investigações sobre integridade, organização e dinâmica da cromatina em diferentes contextos celulares (Beletti e Mello, 2004; Mello e Vidal, 2017; Silva et al., 2025).

1.3.9 Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

A microscopia eletrônica de transmissão (MET) tem sido empregada na avaliação da qualidade seminal de garanhões como método complementar à microscopia óptica, especialmente em situações nas quais a análise convencional pode não discriminar adequadamente alterações associadas à subfertilidade ou infertilidade. Em estudo conduzido com 46 garanhões com fertilidade conhecida, a MET demonstrou ser adequada para o diagnóstico avançado, evidenciando associação entre alterações morfológicas ultraestruturais e desempenho reprodutivo (Pesch et al., 2006).

O objetivo da aplicação da MET na andrologia equina é aprofundar a investigação morfológica por meio da identificação de alterações ultraestruturais que não podem ser caracterizadas com precisão pela microscopia óptica. Nesse contexto, foram descritas alterações envolvendo acrossomo, núcleo, peça intermediária e flagelo, incluindo desprendimento do acrossomo, desvios no padrão microtubular e presença de múltiplas caudas, alterações que não são plenamente avaliáveis por métodos convencionais (Pesch et al., 2006).

A metodologia empregada para MET em espermatozoides equinos envolve protocolos padronizados de fixação e processamento, incluindo fixação inicial em glutaraldeído, pós-fixação em tetróxido de ósmio, desidratação em séries alcoólicas crescentes, inclusão em resina epóxi, obtenção de cortes ultrafinos e contraste com acetato de uranila e citrato de chumbo. Esses procedimentos permitem a análise de cortes longitudinais e transversais do flagelo, bem como a avaliação detalhada do acrossomo e da região nuclear (Pesch et al., 2006; Atroshchenko et al., 2019).

Na avaliação ultraestrutural de 46 garanhões classificados segundo suas taxas de concepção, diversas alterações foram identificadas, incluindo vacuolização nuclear, desvios do padrão microtubular e múltiplas caudas. Entretanto, dentre as alterações analisadas, apenas o desprendimento do acrossomo apresentou correlação estatisticamente significativa com a redução da fertilidade, indicando possível relevância funcional dessa alteração específica (Pesch et al., 2006).

Além da aplicação na investigação da fertilidade, a MET foi utilizada para avaliar o impacto da criopreservação sobre a integridade espermática. A comparação entre sêmen nativo e criopreservado demonstrou redução significativa da motilidade progressiva após o congelamento e descongelamento, acompanhada por aumento de alterações estruturais (Atroshchenko et al., 2019). Entre as alterações mais evidentes destacaram-se hipoplasia acrossomal, degradação do acrossomo, vacuolização nuclear e alterações mitocondriais, algumas das quais apresentaram incremento significativo após a criopreservação (Atroshchenko et al., 2019).

Observou-se ainda redução na proporção de espermatozoides com cabeças íntegras após a criopreservação, bem como diminuição na frequência de mitocôndrias estruturalmente normais, enquanto alterações do axonema apresentaram redução mais discreta. Esses achados reforçam que o processo de congelamento e descongelamento está associado a comprometimento estrutural mensurável em nível ultraestrutural, particularmente envolvendo a região acrossomal (Atroshchenko et al., 2019).

1.4 AVALIAÇÃO MORFOMÉTRICA

1.4.1 Análise computadorizada da morfometria espermática (ASMA)

A Análise Automatizada da Morfometria Espermática (ASMA) corresponde a um método computadorizado destinado à mensuração objetiva das dimensões e da forma da cabeça espermática. Seu princípio fundamenta-se na captura digital de imagens e na segmentação automatizada do contorno celular, permitindo a extração padronizada de parâmetros como comprimento, largura, área, perímetro e índices derivados (Davis et al., 1993). Essa abordagem surgiu como resposta à variabilidade inerente à avaliação morfológica subjetiva tradicional, cuja reprodutibilidade pode ser influenciada por fatores técnicos, pelo preparo da lâmina e pela experiência do avaliador, além do método de coloração empregado, comprometendo a objetividade dos resultados (Davis et al., 1993; Hidalgo et al., 2005).

O objetivo central da ASMA é substituir a observação visual por medições digitalizadas e reprodutíveis, aumentando a precisão analítica e reduzindo a interferência do observador (Davis et al., 1993). Na espécie equina, demonstrou-se que a metodologia é capaz de identificar diferenças sutis na morfometria da cabeça entre garanhões férteis e subférteis, além de revelar subpopulações espermáticas com características distintas associadas ao status reprodutivo dos animais. Essa capacidade discriminatória decorre da quantificação objetiva de descritores geométricos, como comprimento, largura, área e perímetro, tornando perceptíveis variações que podem não ser detectadas por métodos subjetivos (Gravance et al., 1996).

A relação entre morfometria e integridade cromatínica foi estudada em bovinos utilizando o azul de toluidina associado à análise computacional de imagens. Demonstrou-se que espermatozoides podem apresentar alteração de cromatina mesmo quando exibem morfologia aparentemente normal, assim como alterações morfológicas não implicam necessariamente descompactação cromatínica, evidenciando dissociação entre forma nuclear e estado da cromatina (Beletti et al., 2005). Observou-se ainda que alterações na compactação cromatínica podem influenciar, de forma variável entre indivíduos, parâmetros morfométricos como área, perímetro e simetria, sem que exista um padrão universal aplicável a todos os animais, o que reforça a variabilidade individual na expressão dessas alterações (Beletti et al., 2005).

Do ponto de vista metodológico, a padronização da coloração constitui requisito fundamental para a confiabilidade da ASMA. Em estudo comparativo envolvendo Diff-Quick, Hemacolor e Hematoxilina de Harris, verificou-se que esta última apresentou maior percentual de células corretamente segmentadas e menor coeficiente de variação, favorecendo a delimitação acurada dos contornos nucleares. Demonstrou-se também que diferentes protocolos de coloração geram diferenças sistemáticas nas dimensões mensuradas, exigindo consistência metodológica para comparações entre indivíduos ou estudos distintos (Hidalgo et al., 2005).

Avanços recentes ampliaram a compreensão da interação entre morfometria e cromatina ao classificar os tipos de descompactação segundo sua localização na cabeça espermática. Verificou-se que categorias como descompactação do eixo central e descompactação total apresentaram correlação negativa significativa com taxas de clivagem em produção in vitro de embriões, indicando que determinadas alterações cromatínicas podem impactar o desempenho embrionário inicial (Hiraiwa et al., 2021).

Outro estudo comparativo entre diferentes métodos de avaliação da cromatina — azul de toluidina, reação de Feulgen, laranja de acridina e microscopia eletrônica de transmissão — também demonstrou que alterações detectadas por essas técnicas podem correlacionar-se com taxas de clivagem e com o desenvolvimento embrionário, evidenciando que a avaliação da integridade cromatínica fornece informações funcionais relevantes (Silva et al., 2025). A incorporação de métodos objetivos na andrologia veterinária traz vantagens em relação aos exames tradicionais baseados exclusivamente em motilidade e morfologia subjetivas. A literatura destaca que parâmetros convencionais podem não revelar todas as alterações capazes de comprometer a fertilidade, reforçando a necessidade de ferramentas analíticas mais precisas, padronizadas e complementares (Varner, 2008).

Assim, a ASMA representa um avanço metodológico relevante ao proporcionar mensuração objetiva da forma espermática. Contudo, sua interpretação isolada apresenta limitações, especialmente diante da possível dissociação entre morfologia e integridade cromatínica, o que justifica a integração entre análise morfométrica e avaliação da cromatina em investigações reprodutivas contemporâneas (Beletti et al., 2005; Hiraiwa et al., 2021; Silva et al., 2025).

1.4.2 Harmônicas de Fourier

A aplicação de funções harmônicas de Fourier à análise da forma nuclear espermática foi proposta como alternativa às limitações das medidas lineares tradicionais, como área, perímetro, comprimento e largura, consideradas inadequadas para capturar variações sutis da curvatura do perímetro nuclear. O método baseia-se na digitalização do contorno nuclear e na conversão das coordenadas cartesianas em coordenadas polares, permitindo a decomposição do perímetro em séries harmônicas cujas amplitudes representam a contribuição de diferentes frequências para a forma final. Demonstrou-se que as amplitudes harmônicas são independentes da orientação da célula durante a captura da imagem e que as seis primeiras harmônicas (0–5) são suficientes para descrever a forma nuclear dentro dos limites técnicos da digitalização (Ostermeier et al., 2001).

Posteriormente, a utilização de descritores elípticos de Fourier permitiu a normalização quanto ao tamanho, rotação e ponto inicial do contorno, sendo demonstrado em gananhões que poucos componentes principais explicam a maior parte da variação morfológica. A razão comprimento/largura respondeu por aproximadamente 48–53% da variância entre ejaculados considerados normais e por mais de 70% em ejaculados com maior proporção

de cabeças defeituosas, evidenciando a sensibilidade do método para variações discretas e acentuadas do contorno nuclear (Severa et al., 2010).

A integração entre descritores de Fourier e avaliação cromatínica demonstrou que alterações de compactação podem ocorrer em espermatozoides com morfologia aparentemente normal, enquanto alterações morfológicas nem sempre correspondem a alterações detectáveis na cromatina, sendo essas relações variáveis entre indivíduos. Esses achados reforçam que a forma nuclear quantificada por Fourier representa um domínio estrutural parcialmente independente da integridade cromatínica (Beletti et al., 2005).

Em aplicação direcionada à predição de fertilidade, a Análise de Harmônicas de Fourier foi utilizada para classificar búfalos com fertilidade conhecida *in vivo* por meio de modelo discriminante baseado nas amplitudes harmônicas 0–5. Nesse estudo, a harmônica 1 foi o parâmetro utilizado para discriminação entre grupos de alta e baixa fertilidade, sendo os animais classificados como de alta fertilidade aqueles que apresentaram maior motilidade progressiva e maior taxa de eclosão embrionária *in vitro*. Esses resultados indicam associação entre características da curvatura nuclear e desempenho funcional espermático (Duran et al., 2020).

De modo geral, os estudos disponíveis demonstram que a análise harmônica de Fourier constitui ferramenta objetiva e reprodutível para quantificação da forma nuclear, permitindo identificar padrões morfológicos, explorar sua relação com a cromatina e, em determinados contextos, discriminar grupos com diferentes níveis de fertilidade (Ostermeier et al., 2001; Beletti et al., 2005; Severa et al., 2010; Duran et al., 2020).

1.5 CORRELAÇÃO ENTRE TESTES DE CROMATINA E MORFOMETRIA

A relação entre integridade de cromatina e morfometria espermática tem sido explorada em diferentes espécies, revelando que esses dois conjuntos de características nem sempre se manifestam de forma conjunta. A avaliação morfológica tradicional apresenta limitações bem documentadas, especialmente porque depende da interpretação do observador e do método de coloração utilizado, o que introduz variação significativa entre análises (Hidalgo et al., 2005). A introdução da análise computadorizada da morfometria espermática (ASMA) reduziu essa variabilidade ao fornecer medições objetivas e reprodutíveis (Davis, 1993).

Apesar deste avanço, estudos demonstram que a morfologia da cabeça espermática e a integridade da cromatina não são características que se desenvolvem necessariamente em

paralelo. Em bovinos, há evidências de que espermatozoides morfologicamente normais podem apresentar alterações cromatínicas, enquanto células morfologicamente alteradas podem exibir cromatina considerada normal dependendo dos métodos de avaliação, indicando independência parcial entre forma nuclear e organização do DNA. Ainda dependendo do padrão da descompactação cromatínica haverá influência nas variáveis morfométricas de maneira individualizada, sem um padrão uniforme entre animais, reforçando que as relações entre morfometria e cromatina variam conforme o indivíduo (Beletti et al., 2005).

Em equinos, análises de danos induzidos por estresse térmico e oxidativo demonstram que alterações de cromatina podem ocorrer na ausência de mudanças perceptíveis na morfologia espermática (Mesa et al., 2016). Estudos ultraestruturais mostram ainda que vacuolização nuclear e alterações acrossomais ou mitocondriais podem ser detectadas apenas por MET, permanecendo invisíveis à morfologia convencional. Esses achados reforçam que a integridade cromatínica pode estar comprometida mesmo quando análises rotineiras de forma não identificam anomalias (Atroshchenko et al., 2019).

Por outro lado, existem estudos que demonstram interações funcionais entre alterações de cromatina e desenvolvimento embrionário. Em bovinos, padrões específicos de descompactação cromatínica (alteração no eixo central e descompactação total) correlacionaram-se negativamente com a clivagem embrionária, mesmo quando a morfologia espermática permanecia aparentemente preservada. Essa observação indica que determinados danos nucleares têm impacto direto na capacidade de desenvolvimento, ainda que não produzam alteração morfológica detectável por métodos convencionais (Hiraiwa et al., 2021).

As metodologias baseadas em Fourier contribuíram para aprofundar o entendimento das relações entre forma e cromatina. A decomposição harmônica permite quantificar variações do contorno nuclear com sensibilidade superior a parâmetros lineares tradicionais (Ostermeier et al., 2001). Contudo, estudos apontam que, embora Fourier identifique padrões morfológicos característicos, seus coeficientes não necessariamente refletem o estado da cromatina (Beletti, 2005). Em equinos, descritores de Fourier não apresentaram correlação significativa com motilidade ou concentração, mostrando que apenas captam as propriedades geométricas, sem traduzir diretamente aspectos funcionais ou nucleares (Severa et al., 2009).

De acordo com estes trabalhos, a combinação entre testes de morfometria e testes de cromatina fornecem uma avaliação mais abrangente da qualidade espermática do que qualquer abordagem isolada.

1.6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A análise dos artigos evidencia que nenhuma metodologia isolada é capaz de descrever plenamente a qualidade espermática. A avaliação morfológica tradicional apresenta limitações importantes devido à subjetividade e à influência do método de coloração, o que justifica o uso de abordagens objetivas como ASMA (Hidalgo et al., 2005). Ainda assim, a morfometria não detecta anomalias nucleares essenciais para a função espermática, como demonstrado por danos cromatínicos e acrossomais que só se tornam evidentes em análises mais detalhadas (Atroshchenko et al., 2019).

Os estudos também demonstram que integridade da cromatina e morfologia da cabeça não apresentam relação obrigatória. Em bovinos, espermatozoides morfolologicamente normais podem exibir cromatina alterada, enquanto outros com alterações externas podem apresentar cromatina preservada, reforçando a independência parcial entre forma e organização nuclear (Beletti et al., 2005). Em equinos, danos ao DNA podem ocorrer sem alteração morfológica, como evidenciado em modelos de estresse térmico e oxidativo (Mesa et al., 2016).

Algumas alterações cromatínicas possuem impacto funcional direto, como à redução de clivagem em bovinos (Hiraiwa et al., 2021). Já métodos como Fourier e ASMA ampliam a precisão da análise do contorno nuclear, mas não substituem testes dedicados à avaliação do DNA (Ostermeier et al., 2001; Severa et al., 2009).

Considerando as publicações, podemos concluir que a avaliação integrada da cromatina e da morfometria fornece uma compreensão mais completa do estado funcional do espermatozoide do que qualquer método aplicado isoladamente. Cada técnica contribui de maneira distinta e complementar, permitindo caracterização mais sensível e detalhada da subfertilidade e dos efeitos do processamento seminal.

1.7 REFERÊNCIAS

- ABAH, K.O.; LIGOCKA-KOWALCZYK, Z.; ITODO, J.I. Association between sperm DNA fragmentation and fertility parameters in farm animals: a systematic review and meta-analysis. **BMC Veterinary Research**, v.21, p.204-219, 2025. <https://doi.org/10.1186/s12917-025-04652-9>
- ATROSHCHENKO, M.M.; BRAGINA E.E.; ZAITSEV, A.M.; KALASHNIKOV, V.V.; Conservation of genetic resources in horse breeding and major structural damages of sperm during semen cryopreservation in stallions. **Nature Conservation Research**, v. 4, n. Suppl.2, 2019. <http://dx.doi.org/10.24189/ncr.2019.024>
- 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, p.398–402, 2004. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2003.10.016>.
- BELETTI, M.E.; COSTA, L.F.; GUARDIEIRO, M.M. Morphometric features and chromatin condensation abnormalities evaluated by toluidine blue staining in bull spermatozoa. **Braz. J. morphol. Sci.**, v.22(2), p.85-90, 2005.
- BELETTI, M.E. Cromatina espermática: quebrando paradigmas. *Rev. Bras. Reprod. Anim.*, v.37(2), p.92-96, 2013. www.cbpa.org.br.
- BURNS, P. D.; HERICKHOFF, L.A. DNA Fragmentation as an Early Indicator of Extender Efficacy: A Preliminary Study. **Journal of Equine Veterinary Science**, v.34, n.3, p.375–379, 2014.
- CANISSO, F.C.; SOUZA, F.A.; SILVA, E.C.; CARVALHO, G.R.; GUIMARÃES, J.D.; LIMA, A.L. Artificial insemination in equines: diluted, cooled and transported race semen. **Cienc. Anim.**, v.6 (3), p.389-398, 2008. <https://doi.org/10.7213/cienciaanimal.v6i3.10622>.
- CARRETERO, M.I.; ARRAZTOA, C.C.; FERRANTE, A.; CALDEVILLA, M.; SANTA CRUZ, R.; NEILD, D. Evaluation of stallion sperm DNA during cryopreservation using the Toluidine Blue stain and the Sperm Chromatin Dispersion test. **J. Equine Vet. Sci.**, v.32, p.475-518, 2012. <https://10.1016/j.jevs.2012.06.031>.
- CORTÉS-GUTIÉRREZ, EI.; CRESPO, F.; SERRES-DALMAU, C.; ROZAS, A.G.; DÁVILA-RODRÍGUEZ, MI.; LÓPEZ-FERNANDEZ, C.; GÓSSALVEZ, J. Assessment of Sperm DNA Fragmentation in Stallion (*Equus caballus*) and Donkey (*Equus asinus*) Using the Sperm Chromatin Dispersion Test. **Reproduction in Domestic Animals**, v.44, n.5, p. 823–828, out. 2009. doi: 10.1111/j.1439-0531.2008.01091.x
- DAVIS, R. O.; GRAVANCE, C. G.; CASEY, P. J. Automated morphometric analysis of stallion spermatozoa. **American Journal of Veterinary Research**, v.54, n.11, p.1808–1811, 1993.

DURAN, E.H.; GURGAN, T.; GUNALP, S.; ENGINSU, M.E.; YARALI, H.; AYHAN, A. A logistic regression model including DNA status and morphology of spermatozoa for prediction of fertilization in vitro. **Human Reproduction**, v.13, n.5, p.1235–1239, 1998.

DURAN, P.G.; HUFANA-DURAN, D.; PERALTA, M.D.B.; VENTURINA, E.V.; VENTURINA, H.V.; PARRISH, J.J. Efficiency of fourier harmonic analysis of sperm nuclear shape in predicting fertility in water buffalo bulls. **Philipp J Vet Anim Sci**, v.46, p.124-135, 2020.

EGGERT-KRUSE, W.; ROHR, G.; KERBEL, H.; SCHWALBACH, T.D.; KLINGA, K.; TILGEN, W.; RUNNEBAUM, B. The Acridine Orange test: a clinically relevant screening method for sperm quality during infertility investigation? **Human Reproduction**, v.11, n.4, p.784–789, 1996.

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.
<https://doi.org/10.1126/science.7444440>.

EVENSON, D. P. Utility of the sperm chromatin structure assay as a diagnostic and prognostic tool in the human fertility clinic. **Human Reproduction**, v.14, n.4, p.1039–1049, 1999.

EVENSON, D.P.; LARSON, K.L.; JOST, L.K. Sperm Chromatin Structure Assay: Its Clinical Use for Detecting Sperm DNA Fragmentation in Male Infertility and Comparisons With Other Techniques. **Journal of Andrology**, v.23, n.1, p.25–43, 2002.

EVENSON, D.P.; WIXON, R. Clinical aspects of sperm DNA fragmentation detection and male infertility. **Theriogenology**, v.65, n.5, p.979–991, 2006.

FERNANDES, C. E.; DODE, M.A.; PEREIRA, D.; SILVA, A.E.D.F. Effects of scrotal insulation in Nelore bulls (*Bos taurus indicus*) on seminal quality and its relationship with in vitro fertilizing ability. **Theriogenology**, v.70, n.9, p.1560–1568, 2008.

FONTE, J.S.; ALONSO, M.A.; JUNIOR, M.P.M.; GONÇALVES, M.A.; PONTES, J.H.; BORDIGNON, V.; FLEURY, P.D.C.; FERNANDES, C.B. Successful equine in vitro embryo production by ICSI - effect of season, mares' age, breed, and phase of the estrous cycle on embryo production. **Theriogenology**, v.223, p.47-52, 2024.

GIBB, Z.; LAMBOURNE, S.R.; AITKEN, R. J. The Paradoxical Relationship Between Stallion Fertility and Oxidative Stress. **Biology of Reproduction**, v.91, n.3, 2014.

GLEDHILL, B.L. Enigma of spermatozoal deoxyribonucleic acid and male infertility: a review. **Am. J. Vet. Res.**, v.31, n.3, p.539-545, 1970.

GRAVANCE, C.G.; LIU, I.KIM; DAVIS, R.O.; HUGHES, J.P.; CASEY, P.J. Quantification of normal head morphometry of stallion spermatozoa. **Reproduction**, v.108, n.1, p.41–46, 1996.

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

HIDALGO, M.; RODRIGUEZ, I.; DORADO, J.; SANZ, J.; SOLER, C. Effect of sample size and staining methods on stallion sperm morphometry by the Sperm Class Analyzer.

Veterinární medicína, v.50, n.1, p.24–32, 2005.

HIRAIWA, S.H.; ALVEZ, 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, p.e37028, 2021. <https://doi.org/10.14393/BJ-v37n0a2021-47967>

KAKASI, B.; NAGY, S.; PAL, L.; CZIMBER, G.E.; HUSVÉTH, F. A comparison of alternative assays to measure DNA damage in stallion spermatozoa: TUNEL test versus ‘Nicoletti assay’. **Acta Veterinaria Hungarica**, v.63, n.1, p.118–124, 2015.

Lima, R.A.S.; Cintra, A.G. Revisão do estudo do complexo do Agronegócio do cavalo. Confederação da agricultura e pecuária do Brasil p.1-56, 2016.

LOOMIS, P.R.; GRAHAM, J.K. Commercial semen freezing: Individual male variation in cryosurvival and the response of stallion sperm to customized freezing protocols. **Animal Reproduction Science**, v.105, p.119–128, 2008.

LÓPEZ-FERNÁNDEZ, C.; CRESPO, F.; ARROYO, F.; FERNÁNDEZ, J.L.; ARANA, P.; JOHNSTON, S.D.; GOSÁLVEZ, J. Dynamics of sperm DNA fragmentation in domestic animals. **Theriogenology**, v.68, n.9, p.1240–1250, 2007.

LÓPEZ-FERNÁNDEZ, C.; GAGE, M.J.G.; ARROYO, F.; GOSÁLBEZ, A.; LARRÁN, A.M.; FERNÁNDEZ, J.L.; GOSÁLVEZ, J. Rapid rates of sperm DNA damage after activation in tench (*Tinca tinca*: Teleostei, Cyprinidae) measured using a sperm chromatin dispersion test. **Reproduction Research**, n.138, p.257-266, 2009.

LOVE, C.C.; KENNEY, R.M. The relationship of increased susceptibility of sperm dna to denaturation and fertility in the stallion. **Theriogenology**, v.50, p.955-972, 1998.

LOVE, C.C. The sperm chromatin structure assay: A review of clinical applications. **Animal Reproduction Science**, v.89, n.1–4, p.39–45, 2005.

LOVE, C. C. Relationship between sperm motility, morphology and the fertility of stallions. **Theriogenology**, v.76, n.3, p.547–557, 2011.

LUCIO, A.C.; ALVES, B.G.; ALVES, A.K.; MARTINS, M.C.; BRAGA, L.S.; MIGLIO, L.; ALVES, B.G.; SILVA, T.H.; JACOMINI, J.O.; BELETTI, M.E. Selected sperm traits are simultaneously altered after scrotal heat stress and play specific roles in in vitro fertilization and embryonic development. **Theriogenology**, v.86, n.4, p.924–933, 2016.

MELLO, M. L. S. Induced metachromasia in bull spermatozoa. **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*, 2017. <http://dx.doi.org/10.1016/j.acthis.2017.07.002>

- MESA, A.M.; ROBERSON, R.L.; CHUN, R.L.; MORTENSEN, C.J. Stallion Semen Incubated with Hydrogen Peroxide Decreased DNA Fragmentation as Measured by the TUNEL Assay. **Journal of Equine Veterinary Science**, v.49, p.81–86, 2016. doi: 10.1016/j.evs.2016.09.007
- MORRELL, J.M.; JOHANNISSON, A.; DALIN, A.M.; HAMMAR, L.; SANDEBERT, T.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Sperm morphology and chromatin integrity in Swedish warmblood stallions and their relationship to pregnancy rates. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v.50, n.1, p.2, 2008.
- MORRELL, J.M. Stallion Sperm Selection: Past, Present, and Future Trends. **Journal of Equine Veterinary Science**, v.32, n.8, p.436–440, 2012.
- NAVES, C.S.; BELETTI, M.E.; DUARTE, M.B.; VIEIRA, R.C.; DINIZ, G.D.; JACOMINI, J.O. Avaliação da cromatina espermática em equinos com azul de toluidina e "acridine orange". **Biosci. J.**, v.20, n.3, p.117-124, 2004.
- NEUHAUSER, S.; BOLLWEIN, H.; SIUDA, M.; HANDLER, J. Effects of different freezing protocols on motility, viability, mitochondrial membrane potential, intracellular calcium level, and dna integrity of cryopreserved equine epididymal sperm. **Journal of Equine Veterinary Science**, v.82, p.102801, 2019.
- NICOLETTI, I.; MIGLIORATI, G.; PAGLIACCI, M.C.; GRIGNANI, F.; RICCARDI, C. A rapid and simple method for measuring thymocyte apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. **Journal of Immunological Methods**, v.139, p.271-279, 1991.
- OLACIREGUI, M.; LUÑO, V.; MARTÍ, J.I.; ARAMAYONA, J.; GIL, L. Freeze-dried stallion spermatozoa: evaluation of two chelating agents and comparative analysis of three sperm DNA damage assays. **Andrologia**, v.48, n.9, p.988–994, 2016.
- OSTERMEIER, G.C.; SARGEANT, G.A.; YANDELL, B.S.; PARRISH, J.J. Measurement of Bovine Sperm Nuclear Shape Using Fourier Harmonic Amplitudes. **Journal of Andrology**, v.22, n.4, p.584–594, 2001. <https://doi.org/10.1002/j.1939-4640.2001.tb02218.x>
- PESCH, S.; BOSTEDT, H.; FAILING, K.; BERGMANN, M. Advanced fertility diagnosis in stallion semen using transmission electron microscopy. **Animal Reproduction Science**, v.91, n.3–4, p.285–298, 2006.
- RESTREPO, G.; VARELA, E.; DUQUE, J.E.; GÓMEZ, J.E.; ROJAS, M. Freezing, Vitrification, and Freeze-Drying of Equine Spermatozoa: Impact on Mitochondrial Membrane Potential, Lipid Peroxidation, and DNA Integrity. **Journal of Equine Veterinary Science**, v.72, p. 8–15, 2018. doi: 10.1016/j.jevs.2018.10.006
- RIVEROS, J.A.N.; PEREIRA, I.C.; TEIXEIRA, A.C.B.; DINIZ, J.H.W.; BORGES, A.M.; DÍAZ, J.F.G.; BELETTI, M.E.; OLIVEIRA, L.Z. Sperm head morphometry and chromatin alterations in bulls with different conception rates. **Animal Reproduction Science**, v. 255, p.107275, 2023. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2023.107275>

SERAFINI, R.; VARNER, D.D.; BISSET JR, W.; BLANCHARD, T.L.; TEAGUE, S.R.; LOVE, C.C. Sperm DNA quality evaluated by comet assay and sperm chromatin structure assay in stallions after unilateral orchiectomy. **Theriogenology**, v.84, n.5, p.833–837, 2015. <https://dx.doi.org/10.1016/j.theriogenology.2015.05.024>

SEVERA, L.; MÁCHAL, L.; SVÁBOVÁ, L.; MAMICA, O. Evaluation of shape variability of stallion sperm heads by means of image analysis and Fourier descriptors. **Animal Reproduction Science**, v.119, n.1–2, p 50–55, 2009. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2009.12.007>

SIEME, H.; HARRISON, R.A.P.; PETRUNKINA, A.M. Cryobiological determinants of frozen semen quality, with special reference to stallion. **Animal Reproduction Science**, v.107, n.3–4, p.276–292, 2008. doi:10.1016/j.anireprosci.2008.05.001

SILVA, M.V.; ROCHA, L.O.; TRAVENÇOLO, B.A.N.; GUIMARÃES, E.C.; BELETTI, M.E. Methods Used to Assess Bull Sperm Chromatin Integrity and Its Correlation with In Vitro Embryo Production Efficiency. **Veterinary Sciences**, v.12, n.2, p. 84, 2025. <https://doi.org/10.3390/vetsci12020184>

SPEIT, G.; HARTMANN, A. The Comet Assay: A Sensitive Genotoxicity Test for the Detection of DNA Damage and Repair. *In: Methods in Molecular Biology: Mammalian Systems*, 2ed., Totowa, NJ: Humana Press, p. 275–286, 2012.

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. [https://doi.org/10.1016/s0015-0282\(16\)47963-x](https://doi.org/10.1016/s0015-0282(16)47963-x)

TICE, R. R.; AGURELL, E.; ANDERSON, D.; BURLINSON, B.; HARTMANN, A.; KOBAYASHI, H.; MIYAMAE, Y.; ROJAS, E.; RYU, J.C.; SASAKI, Y, F. Single cell gel/comet assay: Guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v.35, n.3, p.206–221, 2000.

VARNER, D.D.; BLANCHARD, T.L.; BRINSKO, S.P.; LOVE, C.C.; TAYLOR, T.S.; JOHNSON, L. Techniques for evaluating selected reproductive disorders of stallions. **Animal Reproduction Science**, v.60–61, p.493–509, 2000.

VARNER, D. D. Developments in stallion semen evaluation. **Theriogenology**, v.70, n.3, p. 448–462, 2008. doi:10.1016/j.theriogenology.2008.04.023

VARNER, D.D.; GIBB, Z.; AITKEN, R.J. Stallion fertility: A focus on the spermatozoon. **Equine Veterinary Journal**, v.47, n.1, p.16–24, 2014.

WACH-GYGAX, L.; BURGER, D.; MALAMA, E.; BOLLWEIN, H.; FLEISCH, A.; JEANNERAT, E.; THOMAS, S.; SCHULER, G.; JANETT, F. Seasonal changes of DNA fragmentation and quality of raw and cold-stored stallion spermatozoa. **Theriogenology**, v.99, p.98–104, 2017. <https://dx.doi.org/101016/j.theriogenology.2017.05.025>

WARD, S.; COFFEY, S. Minireview DNA Packaging and Organization in Mammalian Spermatozoa: Comparison with somatic cells. *Biology of Reproduction*, v.44, p.569-574, 1991.

CAPÍTULO 2 - INTEGRIDADE CROMATÍNICA E MORFOMETRIA DA CABEÇA DO ESPERMATOZOIDE AVALIADAS EM ESFREGAÇO DE SÊMEN E SUA RELAÇÃO COM A CONCEPÇÃO NA INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL EM ÉGUAS

RESUMO

A avaliação da cromatina e da morfometria espermática tem ganhado relevância para diagnóstico de subfertilidade em garanhões, especialmente quando parâmetros seminais convencionais não explicam falhas reprodutivas. Este estudo investigou se alterações de compactação da cromatina, detectadas por Azul de Toluidina, Reação de Feulgen e Laranja de Acridina, bem como variáveis morfométricas computacionais da cabeça espermática, correlacionam-se com a concepção de éguas inseminadas. Adicionalmente, comparou-se a morfometria espermática entre garanhões Quarto de Milha e Mangalarga a fim de avaliar possíveis diferenças entre raças e se havia correlação com a concepção. Foram analisadas 97 amostras de sêmen utilizadas para inseminação artificial. As características avaliadas da cromatina não apresentaram correlação com a concepção indicando baixa sensibilidade dos métodos de esfregaço para prever o desempenho reprodutivo quando os ejaculados se situam dentro do padrão mínimo de qualidade. Em contraste, variáveis morfométricas mostraram correlação significativa, destacando-se a razão largura/comprimento ($r = -0,226$; $P = 0,0398$) e elipticidade ($r = 0,226$; $P = 0,0400$), além de correlação moderada para fator de forma ($r = -0,211$; $P = 0,0556$) e Fourier 0 ($r = 0,172$; $P = 0,1210$). Diferenças importantes também foram observadas entre raças, embora sem impacto na concepção. Os resultados indicam que, enquanto os métodos cromatínicos avaliados não são preditores eficazes, a morfometria computacional da cabeça espermática mostra potencial como ferramenta objetiva complementar para estimar a fertilidade do garanhão.

Palavras-chave: Azul de Toluidina, Cromatina, Feulgen, Laranja de Acridina.

ABSTRACT

The evaluation of sperm chromatin and morphometry has gained relevance for diagnosing subfertility in stallions, especially when conventional seminal parameters do not explain reproductive failures. This study investigated whether changes in chromatin compaction, detected by Toluidine Blue, Feulgen Reaction, and Acridine Orange, as well as computational sperm head morphometric variables, correlate with conception in mares inseminated with fresh or cooled semen. Additionally, sperm morphometry was compared between Quarter Horse and Mangalarga stallions in order to evaluate possible differences between breeds and whether there was a correlation with conception. Ninety-seven semen samples used for artificial insemination were analyzed, and at least 150 sperm heads per sample were examined for chromatin compaction and morphometric variables. Chromatin characteristics evaluated showed no significant correlation with conception, indicating low sensitivity of these smear methods to predict reproductive performance when ejaculates meet minimum quality standards. In contrast, morphometric variables showed a significant correlation, with the width/length ratio ($r = -0,226$; $p = 0,0398$) and ellipticity ($r = 0,226$; $p = 0,0400$) standing out, in addition to a moderate correlation for form factor ($r = -0,211$; $p = 0,0556$) and Fourier 0 ($r = 0,172$; $p = 0,1210$). Significant differences were also observed between breeds, although these did not impact conception rates. The results indicate that, while the evaluated chromatin methods are not effective predictors, computational sperm head morphometry shows potential as a complementary objective tool for estimating stallion fertility.

Keywords: Toluidine Blue, Chromatin, Feulgen, Acridine Orange.

2.1 INTRODUÇÃO

A equideocultura apresenta expressiva relevância econômica e social em diversos países, incluindo o Brasil, onde o rebanho equino ultrapassa 5,8 milhões de animais e movimenta um importante setor do agronegócio nacional (Lima e Cintra, 2016). A eficiência reprodutiva é um dos pilares do desempenho deste setor, e as biotécnicas, em especial a inseminação artificial (IA), constituem ferramentas essenciais para o avanço genético, possibilitando que garanhões com maior valor zootécnico possam ser utilizados em uma rotina comercial onde suas doses espermáticas possa produzir um número muito maior de descendentes (Canisso et al., 2008).

Embora a análise seminal convencional, como motilidade, vigor e morfologia espermática permaneça como base da avaliação andrológica em garanhões, elas apresentam capacidade limitada de prever fertilidade. Estudos demonstram que resultados de análises seminais aparentemente satisfatórios podem não refletir adequadamente o desempenho reprodutivo, evidenciando limitações diagnósticas da avaliação convencional (Varner, 2008; Love, 2011). Alterações na organização da cromatina e na integridade do DNA espermático, podem comprometer a competência fecundante mesmo na ausência de alterações detectáveis na avaliação seminal convencional. Por esse motivo, métodos complementares para avaliação da organização nuclear têm recebido maior atenção na andrologia (Morrell et al., 2008; Evenson, 2016).

Na prática, observa-se que éguas jovens, híginas e sem histórico reprodutivo desfavorável frequentemente permanecem vazias após IA com sêmen considerado normal, revelando a limitação dos parâmetros clássicos na detecção de subfertilidade (Coutinho da Silva, 2008).

Entre os fatores não revelados pela análise convencional, a integridade da cromatina espermática se destaca como um dos mais relevantes. Desde os trabalhos pioneiros de Evenson e colaboradores nas décadas de 70 e 80, demonstrou-se que a heterogeneidade cromatínica está diretamente associada à subfertilidade em diversas espécies, incluindo humanos, touros e equinos (Evenson et al., 1980; Evenson, 2016). A cromatina do espermatozoide apresenta um grau de compactação extremamente elevado, resultado da substituição progressiva das histonas por protaminas durante a

espermio gênese, formando estruturas altamente compactadas e estabilizadas por pontes de dissulfeto (Perreault et al., 1988). Alterações nesse processo, como falhas de protaminação, descompactação prematura do DNA, comprometem a proteção do material genético, afetando a fertilização, o desenvolvimento embrionário inicial e, potencialmente, a viabilidade da gestação (Carretero et al., 2012; Silva et al., 2025). A compactação da cromatina influencia diretamente a arquitetura do núcleo espermático e a conformação da cabeça do espermatozoide (Ward e Coffey, 1991; Ausió et al., 2014). Dessa forma, alterações na organização ou na compactação do material genético podem refletir-se em modificações mensuráveis na morfologia nuclear, estabelecendo uma relação funcional entre arquitetura cromatínica e morfometria da cabeça espermática (Beletti et al., 2005; Severa et al., 2010).

Apesar da relevância da integridade cromatínica, o método consagrado para sua avaliação o Sperm Chromatin Structure Assay (SCSA), depende de citometria de fluxo, equipamento de alto custo e pouco disponível na rotina clínica. Embora altamente sensível e considerado referência para avaliação da integridade do DNA espermático, a aplicabilidade do SCSA permanece restrita a centros especializados, uma vez que sua execução depende, além da citometria de fluxo, uma padronização técnica rigorosa, fatores que limitam sua utilização como ferramenta diagnóstica na rotina andrológica equina (Evenson, 2016). Em busca de alternativas, diferentes técnicas de coloração em esfregaços vêm sendo exploradas como Azul de Toluidina (AT), Reação de Feulgen (RF) e Laranja de Acridina (LA). Essas técnicas são acessíveis e de baixo custo, mas sua interpretação é majoritariamente subjetiva e seus resultados, inconsistentes entre estudos (Beletti e Mello, 2004; Naves et al., 2004; Silva et al., 2025). A aplicação de algoritmos de análise morfométrica, como desenvolvido por Beletti et al. (2005), pode reduzir essa subjetividade, permitindo quantificação objetiva de intensidade de coloração e da distribuição das áreas de descompactação na cromatina espermática.

Além da integridade cromatínica, a morfometria espermática tem se revelado um importante marcador da fertilidade em garanhões. Estudos utilizando análise automatizada (ASMA) e descritores de Fourier identificaram diferenças significativas na forma da cabeça espermática entre

garanhões férteis e subférteis, bem como entre subpopulações espermáticas dentro do mesmo ejaculado (Casey et al., 1997; Ostermeier et al., 2001; Severa et al., 2010). Alterações na elipticidade, na razão largura/comprimento ou nas harmônicas de Fourier podem refletir falhas simultâneas de compactação cromatínica, visto que a forma do núcleo está intrinsicamente relacionada à arquitetura interna da cromatina (Beletti, 2013). Assim, alterações morfométricas da cabeça espermática podem refletir alterações estruturais da cromatina nuclear, uma vez que alterações na compactação do DNA podem refletir-se em modificações mensuráveis na forma da cabeça espermática (Beletti et al., 2005; Ostermeier et al., 2001). Entretanto, permanece incerto se métodos acessíveis baseados em esfregaço espermático, associados à análise computacional de imagem, são capazes de detectar alterações estruturais com relevância funcional suficiente para prever a concepção em programas de reprodução assistida em equinos (Love, 2005; Morrell et al., 2008; Evenson, 2016).

Diante desse contexto, este estudo parte da hipótese de que alterações na compactação da cromatina e na forma da cabeça espermática, identificadas por métodos aplicados em esfregaços de sêmen, estão correlacionadas à concepção em éguas inseminadas com sêmen fresco ou refrigerado. Especificamente, propõe-se que alterações morfométricas da cabeça espermática possam refletir modificações subjacentes na organização da cromatina nuclear, potencialmente associadas a alterações na competência fecundante dos espermatozoides. Adicionalmente, buscou-se comparar de forma objetiva a morfometria da cabeça espermática entre garanhões das raças Quarto de Milha e Mangalarga, a fim de investigar possíveis diferenças raciais na conformação nuclear.

Com isso, pretende-se fornecer subsídios práticos para aprimorar a avaliação andrológica na rotina clínica e fortalecer o uso da morfometria computacional como ferramenta complementar para estimativa da fertilidade em equinos. Adicionalmente, este estudo busca contribuir para a compreensão da relação entre organização estrutural da cromatina, morfologia nuclear e fertilidade funcional em garanhões e a possibilidade de aplicação na avaliação do desempenho reprodutivo em programas de inseminação artificial equina.

2.2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.2.1 Animais e amostras de sêmen

Este estudo foi aprovado pela comissão de ética na utilização de animais (CEUA) da Universidade Federal de Uberlândia (processo nº 23117.035316/2023-13). Foram utilizadas 96 amostras de sêmen equino destinadas à inseminação artificial e transferência de embriões de éguas das raças Quarto de Milha e Mangalarga presentes em uma central de reprodução equina localizadas em Uberlândia, Minas Gerais, Brasil. Doses de sêmen refrigerado foram acondicionadas em caixas de transporte própria (Botuflex®) capaz de manter a temperatura em torno de 5°C com auxílio de duas barras de gelo reciclável, e utilizadas em até 12 horas após a coleta. Todas as doses de sêmen utilizadas apresentavam motilidade progressiva, classificada através de observação em microscópio de luz, variando entre 45 e 85 %, de acordo com o mesmo avaliador, no momento da sua utilização. Foi adicionado às amostras diluente à base de leite desnatado (Botusêmen®) na proporção 3:1 (três partes de diluente e uma do ejaculado). As concentrações espermáticas mínimas para inseminação com sêmen fresco eram 500×10^6 e para sêmen refrigerado 1×10^9 . As inseminações, realizadas no corpo uterino, ocorreram entre 18 e 24 horas após a indução da ovulação com gonadotrofina coriônica humana (hCG), sendo a ovulação confirmada 24 horas após a inseminação por exame ultrassonográfico. Quando a ovulação não ocorreu nesse intervalo, a amostra correspondente foi excluída do estudo.

Foram utilizados 23 garanhões, clinicamente saudáveis, da raça Quarto de Milha e Mangalarga ativos durante a estação de monta, com idade entre quatro e quinze anos e peso corporal variando entre 380 e 510 kg. Os animais eram mantidos em diferentes centrais de reprodução parcialmente estabulados, recebendo concentrado, feno de Tifton (*Cynodon dactylon*) com acesso à água e sal mineralizado próprio *ad libitum*. Entre agosto de 2023 e dezembro de 2025, foram avaliadas 96 amostras de sêmen destinadas à IA e TE em 68 éguas diferentes mantidas na mesma central de reprodução, sendo 79 inseminações em diferentes ciclos realizadas em éguas Quarto de Milha e 17 em éguas Mangalarga. Como o

estudo foi conduzido ao longo de três diferentes estações de monta, algumas éguas voltaram a ser utilizadas nas estações subsequentes após a parição e por isso foi utilizado um número maior de amostras em relação às éguas do estudo. As amostras foram analisadas em microscópio óptico de luz para avaliação da concentração (câmara de Neubauer), motilidade e vigor (realizados por um único avaliador). A concepção foi avaliada através de exame ultrassonográfico transretal aos 15 dias após a ovulação nas éguas destinadas à gestação e no 7º dia após a ovulação quando a inseminação tinha finalidade de transferência de embrião (TE) sendo considerado como concepção positiva quando houve a recuperação embrionária.

2.2.2 Avaliação da cromatina espermática

A cromatina espermática das amostras de sêmen foi submetida à avaliação por meio de uma abordagem metodológica variada. A quantificação da diferença de intensidade de coloração nos testes AT e RF foi realizada por processamento computacional de imagem utilizando o algoritmo desenvolvido por Beletti et al. (2005). Adicionalmente, empregou-se análise visual de esfregaços corados com LA, utilizando microscopia de epifluorescência. Para cada ejaculado, uma alíquota representativa da dose inseminante (diluída na proporção 3:1 diluente/ejaculado) foi utilizada para preparar os esfregaços imediatamente antes de cada inseminação.

2.2.2.1 Preparação da lâmina

Esfregaços finos e homogêneos foram confeccionados imediatamente antes da inseminação com 20 µl da amostra em lâminas desengorduradas. Após secagem à temperatura ambiente, as lâminas foram submetidas ao processo de fixação. Inicialmente, foram imersas em uma solução de etanol e ácido acético (proporção 3:1) por um período de um

minuto e posteriormente mergulhadas em solução de álcool 70% por três minutos. As lâminas assim fixadas foram reservadas para as colorações de AT, RF e LA.

2.2.2.2 Captura de imagem dos esfregaços corados com Azul de Toluidina

O procedimento para coloração com AT, aplicado às lâminas previamente fixadas, seguiu a metodologia descrita por Hiraiwa et al. (2021). Este processo inclui a hidrólise ácida do HCL 4 N por 10 minutos seguidas por uma lavagem delicada em água destilada. Após a secagem à temperatura ambiente, foram adicionadas 3 gotas da solução de AT pH 4,0 e cobertas por uma lamínula cujas bordas foram seladas com esmalte de unha. Para a aquisição das imagens, foi utilizado um sistema composto por um microscópio óptico trinocular Olympus® BX40 com objetiva de 40x, com uma câmera Kaisi® 4K acoplada a um PC por conexão HDMI. Para a captura das imagens foi utilizado o software S-EYE® 1.6.0.11, com resolução de 3840x2160 pixels. Foram capturados 15 campos diferentes de cada lâmina.

2.2.2.3 Captura de imagem dos esfregaços corados com Reação de Feulgen

As lâminas previamente fixadas foram submetidas RF como descrito por Silva et al. (2025) iniciando com hidrólise ácida em 4N HCl em temperatura ambiente por 45 minutos. Após a hidrólise, as lâminas foram delicadamente lavadas em água e coradas com reagente de Schiff's por 60 minutos à temperatura ambiente. Em seguida, as lâminas foram mergulhadas em soluções com concentrações crescentes de álcool e xileno e a montagem da lâmina foi finalizada com Entellan® (Merk®). As amostras finalizadas foram utilizadas para captura de imagens no mesmo sistema utilizado para os esfregaços corados com AT.

2.2.2.4 Análise computacional de imagens com Azul de Toluidina e Reação de Feulgen

As imagens dos esfregaços corados com AT e RF foram submetidas à análise de imagem

quantitativa. Após a etapa de aquisição, as cabeças espermáticas foram isoladas através de um processo de segmentação que utilizou a técnica de limiarização baseada em histograma. Este procedimento gerou uma imagem binária (máscara) individualizada para cada cabeça espermática, com o propósito de excluir elementos indesejáveis da imagem original, como caudas e artefatos de coloração (Silva et al., 2025).

A avaliação das cabeças segmentadas foi realizada em um programa (algoritmo) de análise de imagem desenvolvido e implementado no ambiente de programação Scilab®. Neste software, foi obtido o valor médio de pixel para cada cabeça espermática. Para a padronização e o estabelecimento da referência normal (máxima compactação), o programa executou uma seleção automática das dez cabeças mais claras e homogêneas dentro das centenas segmentadas por esfregaço. Essa seleção foi baseada nos critérios de maior valor médio de pixel (indicativo de maior clareza/compactação) e menor coeficiente de variação do valor de pixel (indicativo de maior homogeneidade) e uma vez que todas as amostras utilizadas no experimento possuíam bons parâmetros de qualidade, não houve prejuízo relacionado a sensibilidade diagnóstica. (Hiraiwa et al., 2021).

Foram classificadas como regiões de descompactação da cromatina as áreas da cabeça espermática onde o valor do pixel fosse 2,5% ou mais baixo que o valor de referência da amostra para a coloração AT. Para o teste RF, esta região foi definida quando o valor do pixel estava 4% ou mais baixo do que a referência determinada pela avaliação prévia das dez cabeças espermáticas mais claras e homogêneas de cada amostra indicando suscetibilidade cromatínica.

As alterações na integridade da cromatina foram classificadas de acordo com sua localização, seguindo estritamente a metodologia de Hiraiwa et al. (2021). As categorias incluíram: descompactação de base (DB), descompactação da meia base (DMB), descompactação do eixo central (DEC), descompactação base-ápice (DBA), descompactação total (DT), descompactação dispersa (DD) (figura 1). Todas as análises de classificação foram executadas pelo mesmo técnico, garantido a consistência do avaliador.

A cromatina também foi avaliada quanto a diferença de compactação média de todas as cabeças em relação às cabeças padrões. Para isso foi feito a média dos valores de pixel de cada cabeça analisada e calculada a diferença desse valor em relação ao valor médio dos valores de pixel das cabeças padrões. Esta diferença foi transformada em percentagem (% de descompactação) do valor da média das cabeças padrões. Também foi avaliada a heterogeneidade da compactação da cromatina, a qual foi definida como sendo o coeficiente de variação (heterogeneidade %) do valor dos níveis de cinza de cada cabeça (Beletti, 2005).

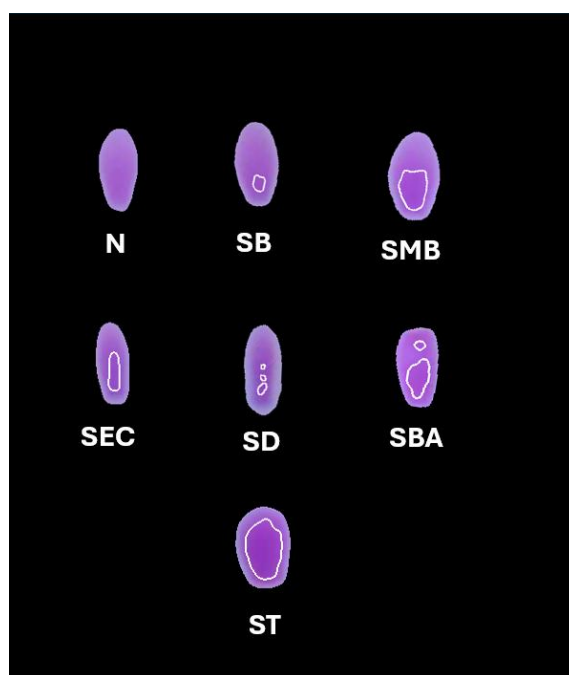


Fig. 1. Análise computacional da compactação de cromatina em espermatozoides de garanhão submetidos a reação de Feulgen (magnificação 400x). As áreas circuladas em branco indicam regiões de suscetibilidade cromatínica identificadas pelo software Scilab. Essas áreas foram nomeadas de acordo com o semento da cabeça espermática afetado. N: normal; SB: suscetibilidade de base; SMB: suscetibilidade de meia base; SEC: suscetibilidade eixo central; SD: suscetibilidade dispersa; SBA: suscetibilidade base-ápice; ST: suscetibilidade total.

2.2.2.5 Microscopia de epifluorescência com Laranja de Acridina

Uma avaliação visual (subjetiva) adicional foi conduzida empregando microscopia de epifluorescência dos esfregaços coradas com LA. O protocolo de coloração foi realizado de

acordo como o método estabelecido por Evenson e Jost (2000) onde os esfregaços foram expostos a solução de LA (ácido cítrico 0,1M, Na₂HPO₄ 0,2M, EDTA 0,001M, NaCl 0,15M estoque AO 6µg/ml em água destilada pH 6) depositando-se entre 3 e 5 ml da solução sobre a superfície da lâmina e incubando por cinco minutos. Posteriormente os esfregaços foram delicadamente lavados por cinco minutos em água destilada, procedimento este repetido por três vezes. Antes que a superfície da lâmina estivesse totalmente seca foram instiladas duas gotas de glicerina e uma lamínula posicionada sobre ela que então foi selada com esmalte. Para cada esfregaço foram analisadas 150 cabeças espermáticas, nas quais foi contabilizado o percentual de células que exibiam fluorescência amarela ou alaranjada. Tais cores indicam a presença de DNA desnaturado (caracterizado pela sobreposição do espectro vermelho sobre o verde). Esta análise foi realizada em um microscópio Zeiss® Axiovert 200 M (Zeiss®, Jena, Germany), que operava com lâmpada de mercúrio (HbO) e um filtro de excitação na faixa azul.

2.2.3 Análise morfométrica das cabeças dos espermatozoides

O mesmo algoritmo desenvolvido para avaliação da descompactação e heterogeneidade da cromatina citado no item 2.2.4, também realiza análise morfométrica da cabeça dos espermatozoides. Para isso foram utilizadas as mesmas imagens capturadas dos esfregaços corados com RF para análise de cromatina. Foram mensuradas as seguintes variáveis: área, perímetro, largura, comprimento, razão largura/comprimento, elipticidade, fator de forma, harmônica de Fourier 0 (zero), 1 e 2, simetria lateral e simetria ântero-posterior. Detalhes de como funciona tal algoritmo pode ser acessados no trabalho de Beletti et al. (2005).

2.2.4 Análise estatística

As amostras foram categorizadas de acordo com os seguintes grupos experimentais: concepção positiva ou negativa, raça (Quarto de Milha ou Mangalarga) e técnica reprodutiva empregada

(inseminação artificial ou transferência de embriões).

A normalidade da distribuição dos dados foi avaliada por meio do teste de Kolmogorov– Smirnov. Para a comparação entre grupos, foram empregados testes paramétricos, utilizando-se análise de variância unidirecional (ANOVA) ou teste *t* não pareado, conforme o número de grupos comparados.

Adicionalmente, foi realizada análise de correlação de Spearman para investigar a associação entre as variáveis seminais avaliadas e os índices de concepção, sendo considerado como significativo $P < 0,05$.

2.3 RESULTADOS

As variáveis clássicas de avaliação seminal – vigor, motilidade e concentração – não apresentaram diferenças estatísticas entre os grupos concepção positiva e concepção negativa (tabela 1). Ambos os grupos exibiram valores médios dentro da faixa considerada normal para garanhões utilizados em programas de inseminação artificial, e nenhuma dessas variáveis mostrou correlação significativa com a concepção (tabela 2).

A análise de Spearman aplicada aos parâmetros clássicos confirmou a ausência de correlação significativa entre vigor ($P=0,5829$), motilidade ($P =0,9125$), e concentração ($P = 0,8299$) com a concepção (tabela 1).

Tabela 1 - Coeficiente de correlação de Spearman (R) e valor de *P* das variáveis clássicas de avaliação de sêmen em relação à concepção

Variáveis Clássicas	R	P-valor
Vigor	- 0,056	0,5829
Motilidade	-0,011	0,9125
Concentração	0,022	0,8299

Tabela 2 - Média e desvio padrão (DP) das variáveis clássicas de avaliação de sêmen

Variáveis Clássicas	Concepção Positiva	Concepção Negativa
	Média (DP)	Média (DP)
Vigor	3,742 ± 0,651	3,714 ± 0,519
Motilidade	70,661 ± 15,438	71,000 ± 12,765
Concentração	205,369 ± 136,398	221,100 ± 132,498

Quando avaliamos a concepção em relação às éguas destinadas a levar a gestação a termo em comparação com àquelas no programa de transferência de embrião não foi observada diferença estatística significativa entre os grupos.

Da mesma forma, as variáveis relacionadas à compactação da cromatina, suscetibilidade cromatínica e desnaturação de cromatina, obtidas por AT, RF e LA, também não diferiram entre os grupos. Os percentuais de descompactação (DD, DB, DBA, DEC, DMB e DT) e suscetibilidade (SD, SB, SBA, SEC, SMB e ST) classificados por região, bem como os índices computacionais de diferença de níveis de cinza e heterogeneidade de cromatínica, não apresentaram correlação significativa com a concepção (tabelas 3 e 4).

Observou-se apenas tendência de correlação negativa moderada para a descompactação base-ápice detectada por AT ($r = -0,165$; $P = 0,1240$) e suscetibilidade base-ápice detectada por RF ($r = -0,168$; $P = 0,1284$), além da descompactação total identificada por AT ($r = -0,169$; $P = 0,1149$), embora sem significância estatística.

Tabela 3 - Coeficiente de correlação de Spearman (R) e *P*-valor das variáveis de alteração de cromatina identificadas pela coloração Azul Toluidina, Reação de Feulgen e Laranja de Acridina em relação à concepção.

Variáveis Cromatina	R	<i>P</i> -valor
% DD AT	0,054	0,6164
% DB AT	0,005	0,9603
% DBA AT**	- 0,165	0,1240**
% DEC AT	0,077	0,4749
% DMB AT	0,103	0,3411
% DT AT**	- 0,169	0,1149**
% Alterados AT	0,068	0,5303
Heterogeneidade AT	0,052	0,6345
% DIF AT	0,068	0,5308
% SD RF	0,062	0,5756
% SB RF	0,105	0,3456
% SBA RF**	- 0,168	0,1284**
% SEC RF	0,103	0,3541
% SMB RF	- 0,017	0,8798
% ST RF	0,124	0,2640
% Alterados RF	0,124	0,3541
Heterogeneidade RF	0,100	0,3688
% DIF RF	0,042	0,7079
% Laranja de acridina	0,027	0,8028

DD - descompactação dispersa, DB - descompactação de base, DBA - descompactação base-ápice, DEC - descompactação eixo central, DMB - descompactação de meia base, DT - descompactação total, Dif. - diferença percentual nos níveis de cinza. SD - suscetibilidade dispersa, SB - suscetibilidade de base, SBA - suscetibilidade base-ápice, SEC - suscetibilidade eixo central, SMB - suscetibilidade de meia base, ST - suscetibilidade total.

* Correlação significativa entre os grupos concepção positiva e negativa ($P \leq 0,05$)

** Correlação moderada entre os grupos concepção positiva e negativa ($0,05 < P < 0,13$)

Tabela 4 - Média e desvio padrão (DP) das variáveis de alteração de cromatina identificadas pela coloração Azul Toluidina, Reação de Feulgen e Laranja de Acridina nos grupos concepção positiva e negativa.

Variáveis Cromatina	Concepção Positiva	Concepção Negativa
	Média (DP)	Média (DP)
% DD AT	0,758 ± 1,136	0,63 ± 1,114
% DB AT	16,369 ± 14,425	16,206 ± 15,529
% DBA AT**	0,038 ± 0,225	0,130 ± 0,331
% DEC AT	7,073 ± 9,648	5,721 ± 6,284
% DMB AT	9,771 ± 11,323	7,561 ± 8,897
% DT AT**	0,013 ± 0,094	0,067 ± 0,220
% Alterados AT	34,013 ± 27,216	30,327 ± 25,416
Heterogeneidade AT	3,927 ± 1,760	3,762 ± 1,169
% DIF AT	7,886 ± 2,980	7,496 ± 2,500
% SD RF	0,706 ± 1,180	0,568 ± 0,892
% SB RF	15,590 ± 13,538	12,687 ± 13,397
% SBA RF**	0,033 ± 0,135	0,113 ± 0,334
% SEC RF	43,971 ± 23,213	38,848 ± 25,855
% SMB RF	17,077 ± 15,575	17,626 ± 16,562
% ST RF	0,887 ± 1,551	0,552 ± 0,747
% Alterados RF	78,263 ± 33,969	70,400 ± 42,087
Heterogeneidade RF	6,384 ± 4,364	5,513 ± 4,040
% DIF RF	10,584 ± 3,578	10,255 ± 4,289
% Laranja de acridina	21,638 ± 22,761	20,400 ± 20,353

DD - descompactação dispersa, DB - descompactação de base, DBA - descompactação base-ápice, DEC - descompactação eixo central, DMB - descompactação de meia base, DT - descompactação total, Dif. - diferença percentual nos níveis de cinza. SD - suscetibilidade dispersa, SB - suscetibilidade de base, SBA - suscetibilidade base-ápice, SEC - suscetibilidade eixo central, SMB - suscetibilidade de meia base, ST - suscetibilidade total.

** Correlação moderada entre os grupos concepção positiva e negativa ($0,05 < P < 0,13$)

Em contraste, a análise morfométrica da cabeça espermática revelou associações relevantes. A razão largura/comprimento apresentou correlação negativa significativa com a concepção ($r = -0,226$; $P = 0,0398$), enquanto a elipticidade exibiu correlação positiva significativa ($r = 0,226$; $P = 0,0400$). Além disso, foram observadas correlações moderadas para o fator de forma ($r = -0,211$; P

= 0,0556) e para harmônica de Fourier 0 ($r= 0,172$; $P = 0,1210$), indicando tendência de influência sobre a concepção (tabelas 5 e 6).

Tabela 5 – Coeficiente de correlação de Spearman (R) e valor de P das variáveis morfométricas em relação à concepção

Variáveis Morfométricas	R	P-valor
Área μm^2	0,056	0,6174
Perímetro μm	0,082	0,4638
Largura μm	-0,016	0,8853
Comprimento μm	0,113	0,3103
Largura/Comprimento μm^*	- 0,226	0,0398*
Elipticidade*	0,226	0,0400*
Fator de Forma**	- 0,211	0,0556**
Fourier 0**	0,172	0,1210**
Fourier 1	0,136	0,2207
Fourier 2	0,036	0,7450
Simetria Lateral	- 0,008	0,9458
Simetria Ântero-Posterior	-0,055	0,6213

* Correlação significativa entre os grupos concepção positiva e negativa ($P \leq 0,05$)

** Correlação moderada entre os grupos concepção positiva e negativa ($0,05 < P < 0,13$)

Tabela 6 – Média e desvio padrão (DP) das variáveis morfométricas nos grupos concepção positiva e negativa

Variáveis Morfométricas	Concepção Positiva	Concepção Negativa
	Média (DP)	Média (DP)
Área μm^2	26,711 $\pm$ 4,085	26,241 $\pm$ 4,216
Perímetro μm	15,677 $\pm$ 1,281	15,461 $\pm$ 1,301
Largura μm	3,286 $\pm$ 0,309	3,296 $\pm$ 0,318
Comprimento μm	6,032 $\pm$ 0,491	5,918 $\pm$ 0,490
Largura/Comprimento μm^*	0,545 $\pm$ 0,026	0,557 $\pm$ 0,023
Elípticidade*	0,296 $\pm$ 0,022	0,286 $\pm$ 0,019
Fator de Forma**	0,889 $\pm$ 0,010	0,893 $\pm$ 0,009
Fourier 0**	1646,905 $\pm$ 263,167	1555,598 $\pm$ 245,561
Fourier 1	98,265 $\pm$ 18,780	93,165 $\pm$ 17,201
Fourier 2	213,727 $\pm$ 40,033	210,764 $\pm$ 39,966
Simetria Lateral	0,966 $\pm$ 0,004	0,966 $\pm$ 0,004
Simetria Ântero-Posterior	0,967 $\pm$ 0,004	0,967 $\pm$ 0,005

* Correlação significativa entre os grupos concepção positiva e negativa ($P \leq 0,05$)

** Correlação moderada entre os grupos concepção positiva e negativa ($0,05 < P < 0,13$)

A comparação morfométrica entre garanhões Quarto de Milha e Mangalarga evidenciou apenas tendências em praticamente todas as variáveis analisadas (tabela 7). As diferenças incluíram área, perímetro, largura, comprimento, razão largura/comprimento, elípticidade, fator de forma, Fourier 2 e 0, simetria ântero-posterior, simetria lateral, enquanto Fourier 1 foi a única que não apresentou diferença. Apesar disso, tais diferenças morfométricas entre raças não se refletiram na concepção entre éguas.

Tabela 7 –Médias e desvios-padrão das variáveis morfométricas das raças mangalarga e quarto de milha.

Variáveis Morfométricas	Valores MM	Valores QM	P
Área μm^2	23,29 $\pm$ 4,82	27,37 $\pm$ 3,49	0,72
Perímetro μm	14,69 $\pm$ 1,56	15,83 $\pm$ 1,10	0,55
Largura μm	2,98 $\pm$ 0,37	3,37 $\pm$ 0,24	0,80
Comprimento μm	5,68 $\pm$ 0,58	6,07 $\pm$ 0,44	0,38
Largura/Comprimento μm	0,53 $\pm$ 0,03	0,56 $\pm$ 0,02	0,05
Elipticidade	0,31 $\pm$ 0,02	0,29 $\pm$ 0,02	0,05
Fator de Forma	0,88 $\pm$ 0,01	0,89 $\pm$ 0,01	0,07
Fourier 0	1518,13 $\pm$ 286,84	1637,19 $\pm$ 247,91	0,15
Fourier 1	91,74 $\pm$ 22,55	97,55 $\pm$ 17,00	0,20
Fourier 2	175,16 $\pm$ 42,56	222,27 $\pm$ 33,01	0,83
Simetria Lateral	0,97 $\pm$ 0,00	0,97 $\pm$ 0,00	0,67
Simetria Ântero-Posterior	0,96 $\pm$ 0,00	0,97 $\pm$ 0,00	0,52

P<0,05: existe diferença entre as raças

0,10>P>0,05: existe tendência a diferença

2.4 DISCUSSÃO

Nossos resultados evidenciam que, em garanhões com sêmen dentro dos padrões mínimos de qualidade espermática, variáveis clássicas da avaliação seminal, como motilidade e concentração espermática, apresentam capacidade limitada de predizer a concepção em éguas. Esses achados estão de acordo com Voss et al. (1981), que observaram fraca relação entre motilidade e fertilidade, e com Amann (2005), que destacou a influência de múltiplos fatores extrínsecos, incluindo momento da inseminação, manejo reprodutivo e fertilidade inerente da fêmea sobre a taxa de prenhez. Testes baseados em análises visuais, como os esfregaços corados com laranja de acridina, possuem dificuldade de padronização e mesmo concordância entre diferentes observadores. Além disso, quando o ejaculado apresenta valores acima do limiar mínimo necessário para fertilização, diferenças sutis entre amostras tendem a não se refletir no resultado reprodutivo, fenômeno também observado no presente estudo.

De forma semelhante, as técnicas de avaliação da integridade da cromatina, AT, RF e LA, não demonstram correlação significativa com a concepção. Embora amplamente acessíveis e economicamente vantajosas, técnicas baseadas em esfregaço apresentam maior grau de subjetividade e sensibilidade limitada na detecção de alterações discretas da compactação nuclear, especialmente quando comparadas a métodos de maior acurácia como SCSA e microscopia eletrônica de transmissão (Evenson, 2016; Silva et al., 2025). Os achados deste estudo sugerem que, em ganhões com ejaculado de boa qualidade, pequenas variações de compactação, suscetibilidade e desnaturação cromáticas identificadas por AT, RF e LA provavelmente não são suficientemente intensas para impactar a fertilidade. Entretanto, esses métodos ainda podem ser úteis em ganhões com alterações seminais mais acentuadas, condição na qual alterações cromáticas mais marcantes podem exercer influência fisiológica relevante.

Adicionalmente, deve-se considerar o delineamento experimental adotado resultou em grupos relativamente homogêneos quanto à qualidade seminal, uma vez que apenas ejaculados dentro dos padrões mínimos para utilização em IA foram incluídos no estudo. A inclusão de ejaculados dentro dos padrões mínimos para IA provavelmente reduziu a variabilidade entre os grupos.

Em contraste às avaliações cromáticas, a análise morfométrica computacional revelou variáveis significativamente associadas à concepção, destacando-se a razão largura/comprimento e a elipticidade, além das correlações moderadas para o fator de forma e Fourier 0. Esses achados estão em consonância com os estudos de Ostermeier et al. (2001) e Severa et al. (2010), que demonstraram que a conformação da cabeça espermática representa um marcador sensível de defeitos estruturais do núcleo e da arquitetura da cromatina. Espermatozoides com cabeças mais largas e menos alongadas podem refletir alterações na condensação nuclear e na organização estrutural do núcleo, defeitos no processo de protaminação ou desvio na organização do citoesqueleto nuclear, todos fatores potencialmente capazes de comprometer a hidrodinâmica e a competência fecundante (Beletti, 2013).

A relação negativa entre concepção e razão largura/comprimento, observada no presente estudo, sugere que espermatozoides com cabeças mais curtas e largas são menos eficientes, possivelmente devido à pior hidrodinâmica, menor capacidade de penetração ou imperfeições estruturais do núcleo. A elipticidade, por sua vez, comportou-se de maneira inversa, reforçando a interpretação de que cabeças

mais alongadas são mais compatíveis com a normalidade estrutural. Os resultados sugerem que a morfometria computacional pode complementar a avaliação andrológica convencional, uma vez que é capaz de quantificar diferenças na intensidade da cor que são imperceptíveis ao olho humano.

Em relação às diferenças morfométricas observadas entre garanhões Quarto de Milha e Mangalarga, os resultados indicam que essas distinções refletem características raciais inerentes e não comprometem a concepção. Essa interpretação está de acordo com a ideia de que a morfometria espermática possui importante componente genético, estando relacionada à linhagem e ao padrão racial. Diferenças morfométricas entre raças já foram descritas em garanhões, sendo sugerido que parte dessa variabilidade decorra de efeitos genotípicos (Phetudomsinsuk et al., 2008).

Uma limitação do presente estudo é que as medidas morfométricas obtidas a partir de espermatozoides submetidos à reação de Feulgen podem não corresponder completamente às obtidas em preparações de células vivas ou em microscopia de contraste de fase, uma vez que a hidrólise ácida e as condições de coloração podem influenciar a organização da cromatina e as interações DNA-proteína. Ainda assim, a reação de Feulgen é considerada um método específico e reprodutível para avaliação da cromatina nuclear, sendo amplamente empregada em estudos da estrutura da cromatina e da morfologia nuclear (Beletti e Mello, 2004; Mello e Vidal, 2017).

Desta forma, os resultados reforçam que métodos simples baseados em esfregaços, embora úteis, possuem valor limitado para predição da fertilidade em animais com sêmen de boa qualidade. Por outro lado, a morfometria espermática computacional emerge como uma ferramenta promissora para aprimorar o prognóstico andrológico, fornecendo dados objetivos capazes de revelar desvios estruturais relevantes da cabeça espermática e, possivelmente, da integridade nuclear.

2.5 CONCLUSÃO

Em garanhões com sêmen dentro dos padrões mínimos para inseminação artificial, os parâmetros clássicos da avaliação seminal e os métodos de coloração para avaliação da cromatina (AT, RF e LA) não apresentaram associação significativa com a concepção em éguas. Em contraste, a

morfometria computacional da cabeça espermática mostrou associação com o sucesso reprodutivo, destacando-se a razão largura/comprimento e a elipticidade como variáveis relacionadas à concepção. Esses resultados indicam que a análise morfométrica da cabeça espermática pode representar uma ferramenta complementar útil para a avaliação do potencial fertilizante de garanhões.

2.6 REFERÊNCIAS

- AMMAN, R. Weaknesses in report of “fertility” for horses and other species. **Theriogenology**, v.63, p.698-715, 2005. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2004.04.010>.
- 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, p.398-402, 2004. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2003.10.016>.
- BELETTI, M.E., COSTA, L.F., GUARDIEIRO, M.M. Morphometric features and chromatin condensation abnormalities evaluated by toluidine blue staining in bull spermatozoa. **Braz. J. morphol. Sci**, v.22(2), p.85-90, 2005.
- BELETTI, M.E. Cromatina espermática: quebrando paradigmas. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, v.37(2), p.92-96, 2013. www.cbpa.org.br.
- CALISKAN, Z., KUCUKGERGIN, C., AKTAN, G., KADIOGLU, A. Evaluation of sperm DNA fragmentation in male fertility. **Andrologia**, e14587, 2022. <https://doi.org/10.1111/and.14587>.
- CANISSO, F.C., SOUZA, F.A., SILVA, E.C., CARVALHO, G.R., GUIMARÃES, J.D., LIMA, A.L. Artificial insemination in equines: diluted, cooled and transported race semen. **Cienc. Anim.**, v.6 (3), p.389-398, 2008. <https://doi.org/10.7213/cienciaanimal.v6i3.10622>.
- CARRETERO, M.I., ARRAZTOA, C.C., FERRANTE, A., CALDEVILLA, M., SANTA CRUZ, R., NEILD, D. Evaluation of stallion sperm DNA during cryopreservation using the Toluidine Blue stain and the Sperm Chromatin Dispersion test. **J. Equine Vet. Sci.**, v.32, p.475- 518, 2012. <https://10.1016/j.jevs.2012.06.031>.
- CASEY, P.J., GRAVANCE, C.G., DAVIS, R.O., CHABOT, D.D., LIU, I.K.M. Morphometric differences in sperm head dimensions of fertile and subfertile stallions. **Theriogenology**, v.47, p.575-582, 1997. [https://10.1016/S0093-691X\(97\)00015-0](https://10.1016/S0093-691X(97)00015-0).

COUTINHO DA SILVA, M.A. When should a mare go for assisted reproduction.

Theriogenology, v.70, p.441-444, 2008. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2008.05.039>.

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

<https://doi.org/10.1126/science.7444440>.

EVENSON, D.P. The sperm chromatin assay (SCSA®) and other sperm DNA fragmentation tests for evaluation of sperm nuclear DNA integrity as related to fertility. **Anim. Reprod. Sci.**, n.169, p.56-75,

2016. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2016.01.017>.

EVENSON, D., JOST, L. Sperm chromatin structure assay is useful for fertility assessment.

Methods Cell Sci., v.22, p.169-189, 2000. <http://doi.org/10.1023/A:1009844109023>.

HIRAIAWA, 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. **Biosci. J.**, v.37, p.1-10, 2021. <https://doi.org/10.14393/BJ-v37n0a2021-47967>.

LIMA, R.A.S.; CINTRA, A.G. Revisão do estudo do complexo do agronegócio do cavalo.

MAPA, Brasília, p.1-56, 2016. <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/camaras-setoriais/equideocultura/anos-anteriores/revisao-do-estudo-do-complexo-do-cavalo>.

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

NAVES, C.S., BELETTI, M.E., DUARTE, M.B., VIEIRA, R.C., DINIZ, E.G., JACOMINI,

J.O. Avaliação da cromatina espermática em equinos com azul de toluidina e “acridine Orange”.

Biosci. J. v.20, p.117-124, 2004.

OSTERMEIER, G.C., SARGEANT, G.A., YANDELL, B.S., PARRISH, J.J. Measurement of Bovine Sperm Nuclear Shape Using Fourier Harmonic Amplitudes. **J. Androl.**, v.22(4), p.584- 594, 2001. <https://doi.org/10.1002/j.1939-4640.2001.tb02218.x>.

PERREAULT, S.D., BARBEE, R.R., ELSTEIN, K.H., ZUCKER, R.M., KEEFER, C.L.

Interspecies differences in the stability of mammalian sperm nuclei assessed in vivo by sperm microinjection and in vivo by flow cytometry. **Biol. Reprod.**, v.39, p.157-167, 1988. <https://doi.org/10.1095/biolreprod39.1.157>.

PHETUDOMSINSUK, K., SIRINARUMITR, K., LAIKUL, A., PINYOPUMMIN A. Morphology and head morphometric characters of sperm in Thai native crossbred stallions. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v.50 (41), 2008. <https://doi.org/10.1186/1751-0147-50-41>

SEVERA, L., MÁCHAL, L., SVÁBOVÁ, L., MAMICA, O. Evaluation of shape variability of stallion sperm heads by means of image analyses and Fourier descriptors. **Anim. Reprod. Sci.**, v.119, p.50-55, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2009.12.007>.

SILVA, M.V., ROCHA, L.O., TRAVENÇOLO, B.A.N., GUIMARÃES, E.C., BELETTI, M.E.

Methods used to assess bull sperm chromatin integrity and its correlation with in vitro embryo production efficiency. **Vet. Sci.**, v.184 (12), p.1-16, 2025. <https://doi.org/10.3390/vetsci12020184>.

VOSS, J.L., PICKETT, B.W., SQUIRES, E.L. Stallion Spermatozoal Morphology and Motility and Their Relationship to Fertility. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, v.178 (3), p.287-289, 1981.

CAPÍTULO 3 - Reinterpretação do método de Nicoletti para avaliação de integridade da cromatina espermática equina: análise comparativa com SCSA

RESUMO

A integridade da cromatina espermática é fundamental para a fertilidade. O “Sperm Chromatin Structure Assay (SCSA) é considerado o padrão-ouro para sua avaliação, baseando-se na desnaturação ácida do DNA, coloração com Laranja de Acridina e análise por citômetro de fluxo. Uma alternativa ao SCSA é método de Nicoletti, desenvolvido originalmente para identificar timócitos em apoptose pela detecção de perda de DNA (pico sub-diploide) usando Iodeto de Propídio. Neste estudo, buscou-se avaliar a aplicabilidade do método de Nicoletti para análise da cromatina espermática equina por meio da correlação de seus resultados com o SCSA utilizando o teste de Spearman. Durante a análise pelo método de Nicoletti, foi observada uma subpopulação de espermatozoides com maior intensidade de fluorescência. A análise tradicional de Nicoletti, que identifica células com perda de DNA que formariam uma subpopulação com menor intensidade de fluorescência, não apresentou correlação com o SCSA. No entanto, foi observado alta correlação entre o SCSA e a subpopulação de espermatozoides com maior intensidade de fluorescência (SCSA com Nicoletti 2: $r = 0,73$; $p < 0,05$ e Nicoletti 3: $r = 0,70$; $p < 0,05$ e entre Nicoletti 2 e 3: $r = 0,68$; $p < 0,05$). Esses resultados sugerem que, devido à elevada compactação da cromatina espermática, o dano cromatínico em espermatozoides não se manifesta predominantemente por perda de DNA detectável, mas por aumento da acessibilidade do corante ao material genético. Dessa forma, a interpretação tradicional do método de Nicoletti pode não ser adequada para espermatozoides de garanhões, indicando a necessidade de reinterpretar o método para essa espécie.

Palavras-chave: Espermatozoide, Garanhão, Fragmentação de DNA, Iodeto de propídio

3.1 INTRODUÇÃO

A arquitetura nuclear do espermatozoide distingue-se drasticamente das células somáticas pela organização do DNA em toróides extremamente compactos, estabilizados por protaminas ricas em pontes dissulfeto, uma estrutura singular que confere resistência e proteção ao genoma paterno (Ward e Coffey, 1991; Ausió et al., 2014). Falhas nesse processo de compactação comprometem a integridade nuclear e estão diretamente ligadas à infertilidade masculina (Aitken e Lewis, 2023). Para detectar tais defeitos, o SCSA estabeleceu-se como a técnica de referência, utilizando a metacromasia do laranja de acridina (LA) para quantificar a suscetibilidade da cromatina à desnaturação ácida (Evenson, 2012).

O princípio do SCSA fundamenta-se na exposição dos espermatozoides a um tampão de baixo pH (1,2), o qual induz a desnaturação parcial da dupla hélice de DNA exclusivamente em células com cromatina alterada ou deficiência de proteínas nucleares (Evenson, 2016; Evenson et al., 2020). A subsequente coloração com LA permite a distinção simultânea do DNA íntegro, onde o corante se intercala emitindo fluorescência verde (515-530 nm), e do DNA desnaturado (fita simples), onde o empilhamento eletrostático do corante gera fluorescência vermelha (≥ 630 NM) (Evenson, 2012). A extensão do dano é expressa pelo índice de fragmentação de DNA (DFI), calculado pela razão entre a fluorescência vermelha e a fluorescência total determinados pela citometria de fluxo (Evenson, 2016).

Em contrapartida, o método de Nicoletti utiliza iodeto de propídio (IP) em tampão hipotônico para identificar células apoptóticas, baseando-se na premissa de que a fragmentação do DNA em células somáticas resulta na extração de fragmentos nucleares (Nicoletti et al., 1991; Riccardi e Nicoletti, 2006). A técnica submete as células a uma solução contendo 50 µg/ml de IP, 0,1% de citrato de sódio e 0,1% de Triton X-100, onde o detergente permeabiliza a membrana plasmática, permitindo que fragmentos de DNA lisados por endonucleases se

difundam para o meio extracelular (Darzynkiewicz et al., 1992). Como consequência, núcleos apoptóticos apresentam conteúdo reduzido de DNA e emitem fluorescência inferior ao pico diploide normal, formando a região conhecida como “sub-G1” a esquerda do pico principal de hiperfluorescência diploide (Nicoletti et al., 1991; Riccardi e Nicoletti, 2006).

Embora este método tenha sido extrapolado para uso em espermatozoides, é questionável se a premissa de perda de DNA pela extração de fragmentos é biologicamente aplicável a uma cromatina altamente protaminada e insolúvel (Kakasi et al, 2015). Diante disso, o objetivo deste estudo foi validar o método de Nicoletti em garanhões comparando-o ao padrão-ouro SCSA, testando diferentes interpretações dos histogramas de intensidade de fluorescência para determinar sua eficácia diagnóstica nesta espécie.

3.2 MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido de acordo com aprovação da Comissão de Ética na Utilização de Animais (CEUA – UFU, PARECER N° 33/2023/CEUA/PROPP/REITO).

3.2.1 Animais

Foram avaliadas 15 amostras de sêmen refrigerado de garanhões com idade variando entre três e quize anos, sendo regularmente utilizados durante a estação de monta. Os ejaculados possuíam características seminais normais avaliadas por microscopia de luz.

3.2.2 Citômetro de fluxo

As amostras foram analisadas em um citômetro de fluxo, CytoFLEX® (Beckman Coulter), em até 24 horas após a coleta. Todas as amostras foram padronizadas para 20.000 eventos.

3.2.3 Análise SCSA

Para análise de SCSA foi seguida a metodologia descrita por Evenson et al. (2020). As amostras foram lavadas por centrifugação (400G, 3 minutos) repetida três vezes com PBS 1X (1:1) para remoção de debris, sendo o sedimento final ressuspendido em 1,5 ml de tampão TNE (0,01 M Tris-HCL, 0,15 M NaCl, 1mM EDTA). As soluções utilizadas incluíram: detergente ácido pH 1,2 (0,08 N HCL, 0,15 M NaCl, 0,1% Triton-X 100) e solução de LA tamponado pH 6,0 (0,1 M ácido cítrico, 0,2 M Na₂PO₄, 1 mM EDTA, 0,15 M NaCl). Imediatamente antes das análises, foi preparada a solução de LA diluindo-se a solução estoque (0,1%) na solução de coloração (9µl: 1,5 ml).

Para análise de cromatina, alíquotas de 0,5 ml da suspensão de espermatozoides em TNE foram submetidas ao protocolo padrão: adição de 50µl de detergente ácido por 30 segundos, seguida de 150 µl de solução LA, com leitura após 150 segundos.

A aquisição dos dados foi realizada em citômetro de fluxo, registrando-se nos canais FIT-A (525/40 nm) e ECD (584/42 nm). A análise posterior utilizou software CytoExpert.

Inicialmente, a população espermática foi isolada de debris celulares através de um gate morfológico em dot-plot de tamanho, “Forward Scatter” (FSC) versus granulosidade, “Side Scatter” (SSC). A partir desse histograma foi selecionada a população de eventos que possuía menor dispersão de tamanho (FSC) para excluir outros eventos e anormalidades que não fossem espermatozoides. Então foi gerado um histograma de fluorescência verde (DNA integro) versus vermelho (DNA desnaturado). O índice de fragmentação de DNA (DFI) foi calculado quantificando-se a proporção de células com fluorescência vermelha aumentada, correspondente à cromatina desnaturada.

3.2.4 Análise pelo método Nicoletti

O protocolo de preparação das amostras para análise através da metodologia de Nicoletti seguiu a metodologia descrita por Riccardi e Nicoletti (2006). Aliquotas contendo $1-2 \times 10^6$ espermatozoides foram lavadas por centrifugação em PBS (400G, 10 minutos) e ressuspensas em 1 ml de solução fluorocromo (0,1% de citrato sódico, 0,1% de Triton X-100 50 mg l⁻¹ de IP em água destilada). Após incubação por 60 minutos a 20°C, a fluorescência vermelha foi analisada por citometria de fluxo em escala logarítmica (canal FL3, 620 nm).

A população espermática foi isolada de debris através de gating em gráfico de dispersão FSC x SSC, similar ao procedimento do SCSA. A partir destes eventos, geraram-se histogramas unidimensionais de intensidade de fluorescência do IP, sobre os quais foram aplicadas três estratégias distintas de análise para cálculo do DFI:

1. Nicoletti (tradicional): baseado no protocolo de Riccardi e Nicoletti (2006), quantificou-se a proporção de eventos hipodiploides, localizados à esquerda do pico principal (baixa fluorescência), interpretados classicamente como células com DNA fragmentado.
2. Nicoletti 2 (modificado – alta fluorescência global): tendo-se observado uma subpopulação distinta com intensidade de fluorescência superior ao pico principal, criou-se um gate para quantificar esses eventos hiperhaploides, considerando a totalidade dos eventos adquiridos sem restrição morfológica.

3. Nicoletti 3 (modificado – alta fluorescência Gated): Quantificou-se a mesma população de alta fluorescência descrita em Nicoletti 2, porém restringindo a análise exclusivamente aos eventos previamente selecionados no gate morfológico (FSC x SSC), visando excluir agregados ou células somáticas maiores que a cabeça espermática.

3.2.5 Análise estatística

Utilizando-se o teste de Kolmogorov-Smirnov verificou-se que os dados não possuíam distribuição normal (Gaussiana). Assim sendo, para verificar a relação entre SCSA e as variações do teste de Nicoletti, foi aplicado o teste de correlação de Spearman. Para interpretação da intensidade das associações observadas, considerou-se a correlação alta quando $r \geq 0,216$ ($P \leq 0,05$), correlação moderada quando r entre 0,167 e 0,216 ($0,05 < P \leq 0,15$) e fraca quando $r < 0,167$ ($P > 0,15$).

3.3 RESULTADOS

As análises demonstraram correlação distintas entre o método SCSA e as diferentes variações do método de Nicoletti.

A comparação entre o método SCSA e Nicoletti 1 não apresentou correlação ($r = 0,000$). Em contrapartida, foram observadas correlações positivas significativas entre SCSA e Nicoletti 2 ($r = 0,73$; $p < 0,05$) e 3 ($r = 0,70$; $p < 0,05$) e entre Nicoletti 2 e 3 ($r = 0,68$; $p < 0,05$).

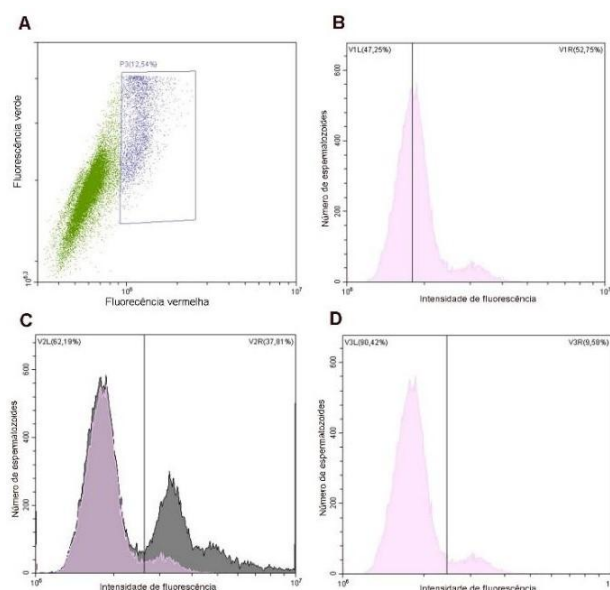


Fig. 1 Resultados provenientes da amostra de um único garanhão. A- SCSA representado em dot plot da fluorescência verde (DNA fita dupla) versus fluorescência vermelha (DNA desnaturado), com delimitação da população espermática com DNA fragmentado (12,54%); B-D Histogramas de intensidade de fluorescência obtidos pelo método de Nicoletti. B – Nicoletti 1 quantificando a proporção de Hipodiploides à esquerda (47,25%); C – Nicoletti 2 considerando o pico hiperhaploides à direita (37,81%); D – Nicoletti 3 Excluindo agregados e células somáticas maiores que as cabeças espermáticas (9,58%).

3.4 DISCUSSÃO

A falta de correlação entre o SCSA e a técnica de Nicoletti 1 (tradicional) demonstra que o fenômeno biológico observado em timócitos (Ricciardi e Nicoletti, 2006) não se replica em espermatozoides de garanhões. A técnica original depende da difusão de fragmentos de DNA para fora do núcleo de timócitos com apoptose (Darzynkiewicz et al., 1992). Contudo, a cromatina espermática é insolúvel e estruturada em cristais líquidos de complexo DNA-protamina (Ward e Coffey, 1991). Portanto, interpreta-se que, devido a essa compactação extrema descrita por Ausió et al. (2014), mesmo na presença de fragmentação, os fragmentos permanecem retidos na matriz nuclear, impedindo a formação do pico hipodiploide característico de perda de DNA. Deve-se ainda considerar que as análises por SCSA e pela técnica de Nicoletti foram realizadas simultaneamente nas mesmas amostras, de modo que eventuais variações relacionadas à qualidade ou estabilidade do DNA afetariam ambos os

testes de maneira equivalente, reforçando que a ausência de correlação observada decorre das diferenças conceituais entre os princípios biológicos dos métodos.

Por outro lado, a forte correlação positiva encontrada com o Nicoletti 2 e 3, e destes em si, sugere um mecanismo oposto para o espermatozoide. Com base em Beletti e Mello (2004), tratamentos ácidos ou líticos em espermatozoides não removem o DNA, mas descompactam a cromatina. Em espermatozoides com integridade comprometida (ex.: pontes dissulfeto reduzidas ou substituição deficiente de histonas), a solução de Nicoletti promove um relaxamento da estrutura nuclear superior ao das células normais. Isso aumenta a acessibilidade do IP, resultando em eventos de alta fluorescência. A associação entre as populações hiperfluorescentes (2 e 3) reforça que ambas refletem graus distintos dessa mesma descompactação.

Portanto, a inconsistência observada em estudos prévios pode decorrer da extrapolação direta do modelo somático para os espermatozoides. Enquanto em células somáticas o dano resulta em perda de sinal (menos fluorescência), no gameta masculino a patologia se manifesta estruturalmente como descompactação de cromatina, levando a um aumento da intensidade de fluorescência.

3.5 CONCLUSÃO

O método de Nicoletti não foi eficiente para avaliar a integridade da cromatina espermática equina quando interpretado segundo os critérios originais de apoptose somática (baixa fluorescência), pois a compactação por protaminas impede a perda de DNA. No entanto, o método demonstrou alta correlação com o padrão-ouro SCSA quando reinterpretado para detectar eventos de alta fluorescência. Isso indica que, no espermatozoide, o dano à cromatina

reflete-se em uma maior acessibilidade ao fluorocromo, validando “Nicoletti Modificado” como uma ferramenta potencial para a andrologia equina.

3.6 REFERÊNCIAS

- AITKEN, R.J.; LEWIS, S.E.M. DNA damage in testicular germ cells and spermatozoa. When and how is it induced? How should we measure it? What does it mean? **Andrology**, v.11, p.1545-1557, 2023. <https://doi.org/10.1111/andr.13375>
- AUSIÓ, J.; GONZÁLEZ-ROMERO, R.; WOODCOCK, C.L. Comparative structure of vertebrate sperm chromatin. **J. Struct. Biol.**, v.188, p.142-155, 2014. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jsb.2014.09.004>
- 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, p.398-402, 2004. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2003.10.016>.
- DARZYNKIEWICZ, Z.; BRUNO, S.; DEL BINO, G.; GOREZYCA, W.; HOTZ, M.A.; LASSOTA, P.; TRAGANOS, F. Features of apoptotic cells measured by flow cytometry. **Cytometry**, v.13, p.795-808, 1992.
- EVENSON, D.P. Sperm Chromatin Structure Assay (SCSA®). **Methods Mol. Biol.**, v.927, p.147-164, 2012. doi: 10.1007/978-1-62703-038-0_14
- EVENSON, D.P. The sperm chromatin assay (SCSA®) and other sperm DNA fragmentation tests for evaluation of sperm nuclear DNA integrity as related to fertility. **Anim. Reprod. Sci.** v.169, p.56-75, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2016.01.017>.
- EVENSON, D.P.; DJIRA, G.; KASPERSON, K.B.S.; CHRISTIANSON, J.A.A.S. Relationships between the age of 25,445 men attending infertility clinics and sperm chromatin

structure assay (SCSA®) defined sperm DNA and chromatin integrity. **Andrology**, 2020.

<https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2020.03.028>

KAKASI, B.; NAGY, S.; PAL, L.; CZIMBER, G.E.; HUSVÉTH, F. A comparison of alternative assay to measure DNA damage in stallion spermatozoa: Tunel test versus “Nicoletti Assay”. **Acta Vet. Hung.**, v.63, p.118-124, 2015. doi: 10.1556/Avet.2015.010

NICOLETTI, I.; MIGLIORATI, G.; PAGLIACCI, M.C.; GRIGNANI, F.; RICCARDI, C. A rapid and simple method for measuring thymocyte apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. **J. Immunol. Methods**, v.139, p.271-279, 1991.

RICCARDI C.; NICOLETTI, I. Analysis of apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. **Nat. Protoc.**, v.1, p.1458-1461, 2006. Doi: 10.1038/nprot.2006.238

WARD, W.S.; COFFEY, D.S. Minireview DNA packing and organization in mammalian spermatozoa: comparison with somatic cells. **Biol. Reprod.**, v.44, p.569-574, 1991.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Nesta tese, a cromatina espermática equina foi avaliada a partir de uma perspectiva integrada, considerando sua organização estrutural, a integridade do DNA e as características morfológicas do núcleo espermático. Os resultados obtidos ao longo do estudo reforçam que a cromatina espermática deve ser compreendida como uma estrutura altamente especializada, cuja avaliação exige abordagens que vão além dos parâmetros seminais tradicionais.

Os testes histoquímicos empregados, como a azul de toluidina, o laranja de acridina e a reação de Feulgen, permitiram evidenciar diferentes aspectos da organização da cromatina e do estado do DNA. Cada método contribuiu de forma complementar, fornecendo informações relacionadas à compactação, à acessibilidade e a distribuição do material genético no núcleo espermático. Esses resultados demonstram que métodos clássicos, quando corretamente aplicados e interpretados, continuam sendo ferramentas relevantes para a avaliação estrutural da cromatina.

A utilização dos testes fluorométricos e citométricos, como o método de Nicoletti e SCSA, ampliou a análise da integridade do DNA espermático, permitindo a obtenção de dados quantitativos relacionados à fragmentação e à estabilidade do material genético. A associação desses testes com as colorações histoquímicas mostrou-se útil para uma compreensão mais ampla do núcleo espermático, evidenciando que diferentes técnicas acessam diferentes níveis de organização do DNA e da cromatina.

Um aspecto central deste trabalho foi a incorporação de análises morfométricas e computacionais aplicadas ao núcleo espermático. A quantificação objetiva de parâmetros morfológicos, associada à análise digital de imagens coradas pela reação de Feulgen e pelo azul de toluidina, contribuiu para reduzir a subjetividade da avaliação visual e aumentar a consistência das análises. A aplicação de descritores matemáticos de forma, como as harmônicas de Fourier, mostrou-se particularmente sensível para identificar alterações na forma nuclear, reforçando o valor da morfometria avançada como ferramenta complementar na avaliação da organização nuclear.

A integração entre colorações específicas para DNA, análises morfométricas e descritores de forma permitiu relacionar, de maneira indireta, alterações na forma do núcleo espermático com a organização interna do material genético. Embora essas abordagens não avaliem diretamente a composição molecular da cromatina, os resultados indicam que mudanças estruturais detectadas por métodos morfométricos podem refletir variações na compactação e na distribuição do DNA, especialmente quando interpretadas em conjunto com testes específicos da cromatina.

Assim, este trabalho contribui para o aprofundamento do conhecimento sobre a cromatina espermática e reforça a importância de abordagens variadas na avaliação da qualidade espermática. Ao integrar diferentes métodos e níveis de análise, a presente tese oferece uma base consistente para estudos futuros na área, encerrando-se com a perspectiva de que a

compreensão da organização nuclear do espermatozoide continua sendo um campo relevante e promissor dentro da biologia reprodutiva equina.