

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

NAYARA DELFIM ISIDORO

MÉTODOS ALTERNATIVOS PARA ANÁLISE DE CROMATINA
ESPERMÁTICA DE GARANHÕES

UBERLÂNDIA

2026

NAYARA DELFIM ISIDORO

**MÉTODOS ALTERNATIVOS PARA ANÁLISE DE CROMATINA
ESPERMÁTICA DE GARANHÕES**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado a Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal de Uberlândia como requisito parcial para obtenção do título de bacharelado em Medicina Veterinária.

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Emílio Beletti

UBERLÂNDIA

2026

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

I81
2026 Isidoro, Nayara Delfim, 2003-
Métodos alternativos para análise de cromatina espermática de
ganhões [recurso eletrônico] / Nayara Delfim Isidoro. - 2026.

Orientador: Marcelo Emílio Beletti.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) - Universidade
Federal de Uberlândia, Graduação em Medicina Veterinária.

Modo de acesso: Internet.

Inclui bibliografia.

Inclui ilustrações.

1. Veterinária. I. Beletti, Marcelo Emílio, 1994-, (Orient.). II.
Universidade Federal de Uberlândia. Graduação em Medicina
Veterinária. III. Título.

CDU: 619

Bibliotecários responsáveis pela estrutura de acordo com o AACR2:

Gizele Cristine Nunes do Couto - CRB6/2091

Nelson Marcos Ferreira - CRB6/3074

NAYARA DELFIM ISIDORO

Métodos alternativos para análise de cromatina espermática de garanhões

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado a Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal de Uberlândia como requisito parcial para obtenção do título de bacharelado em Medicina Veterinária.

Uberlândia, 17 de março de 2026.

Banca Examinadora:

Marcelo Emílio Beletti - Doutor (UFU) - orientador

Italvan Milfont Macêdo - Doutor (UFU)

Heitor Pereira Marquez - Mestre (UFU)

Dedico este trabalho aos meus pais, por tudo.

AGRADECIMENTOS

Agradeço, com todo o meu amor, aos meus pais, Erika e Emerson. O apoio incondicional, a dedicação diária e os inúmeros sacrifícios feitos ao longo da minha vida foram fundamentais para que eu chegasse até aqui. Tudo o que sou e conquistei carrega um pouco de vocês.

Ao professor Dr. Marcelo Emílio Beletti, agradeço pelo acolhimento, pela confiança e pela inspiração constante.

Ao meu parceiro, Uiliam, agradeço o apoio, o carinho e o amor. Caminhar ao seu lado tornou essa jornada leve e significativa.

Aos meus amigos, minha eterna gratidão. Obrigada pelo incentivo, pelas conversas e pelos momentos divertidos que devolveram leveza aos dias mais exigentes. Nada disso teria o mesmo significado sem vocês.

Por fim, agradeço à FAPEMIG (processo APQ-01881-22) e ao CNPq (processo 306482/2022-3) pelo apoio financeiro.

RESUMO

A cromatina espermática, composta por DNA e proteínas nucleares compactadas, assegura a estabilidade genômica. A importância da integridade do DNA espermático estende-se ao desenvolvimento embrionário, visto que falhas na compactação ou na incorporação adequada de proteínas nucleares levam à fragmentação do DNA e podem resultar em abortos ou falhas no desenvolvimento fetal. Animais que apresentam motilidade e morfologia espermática normais podem, ainda assim, apresentar danos no DNA. Embora o Ensaio de Estrutura da Cromatina Espermática (SCSA) seja considerado o método padrão para essa avaliação, sua aplicação é limitada pelo alto custo e pela necessidade de citometria de fluxo, o que justifica a investigação de métodos alternativos. Nesse contexto, o presente trabalho teve como objetivo avaliar a possível associação entre alterações na compactação e estabilidade do DNA espermático, identificadas por testes de coloração com laranja de acridina (LA), azul de toluidina (AT), reação de Feulgen (RF) e a concepção de éguas inseminadas. Foram analisadas noventa e sete amostras de sêmen resfriado de garanhões das raças Quarto de Milha e Mangalarga Marchador, coletadas entre agosto de 2023 e dezembro de 2025, todas previamente aprovadas por avaliação convencional de sêmen. A avaliação incluiu análise visual em microscopia de fluorescência para LA. Para os testes com AT e RF, foi realizada análise computacional das imagens obtidas por microscopia de luz transmitida dos esfregaços corados. Nessas análises foram identificados padrões regionais de descompactação da cromatina, a heterogeneidade e a diferença percentual de descompactação da cromatina. A concepção foi verificada por ultrassonografia quinze dias após a ovulação das éguas inseminadas. Os resultados demonstraram ausência de correlação estatisticamente significativa entre a maioria das variáveis de integridade da cromatina e a concepção, independentemente do teste utilizado. Apenas as categorias de descompactação base-ápice e descompactação total apresentaram correlação negativa moderada com a concepção em alguns testes, sugerindo que alterações cromatínicas mais extensas possam ter maior potencial de impacto biológico. No entanto, de forma geral, as alterações detectadas mostraram-se de baixa magnitude e possivelmente abaixo do limiar necessário para comprometer a fertilização inicial. Conclui-se que a avaliação da cromatina espermática pelos métodos alternativos em esfregaço de sêmen pode ser utilizada como ferramenta complementar à análise seminal convencional, e não como marcador isolado de fertilidade em garanhões.

Palavras-chave: concepção; DNA; equino; espermatozoide.

ABSTRACT

Sperm chromatin, composed of DNA and compacted nuclear proteins, ensures genomic stability. The importance of sperm DNA integrity extends to embryonic development, as failures in compaction or proper incorporation of nuclear proteins lead to DNA fragmentation and can result in miscarriages or fetal development failures. Animals with normal sperm motility and morphology may still have DNA damage. Although the Sperm Chromatin Structure Assay (SCSA) is considered the standard method for this assessment, its application is limited by high cost and the need for flow cytometry, which justifies the investigation of alternative methods. In this context, the present study aimed to evaluate the possible association between changes in sperm DNA compaction and stability, identified by staining tests with acridine orange (AO), toluidine blue (TB), and Feulgen reaction (FR), and the conception of inseminated mares. Ninety-seven cooled semen samples from Quarter Horse and Mangalarga Marchador stallions were analyzed, collected between August 2023 and December 2025, all previously approved by conventional semen evaluation. The evaluation included visual analysis under fluorescence microscopy for AO. For the TB and FR tests, computational analysis was performed on images obtained by transmitted light microscopy of stained smears. These analyses identified regional patterns of chromatin decompaction, heterogeneity, and the percentage difference in chromatin decompaction. Conception was verified by ultrasound fifteen days after ovulation in inseminated mares. The results showed no statistically significant correlation between most chromatin integrity variables and conception, regardless of the test used. Only the categories of base-apex decompaction and total decompaction showed a moderate negative correlation with conception in some tests, suggesting that more extensive chromatin changes may have greater potential for biological impact. However, in general, the changes detected were of low magnitude and possibly below the threshold necessary to compromise initial fertilization. It is concluded that sperm chromatin evaluation by alternative methods in semen smears can be used as a complementary tool to conventional semen analysis and should not be considered an isolated marker of fertility in stallions.

Keywords: conception; DNA; equine; spermatozoon.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	9
2 REFERENCIAL TEÓRICO	11
2.1 Cromatina espermática e organização nuclear	11
2.2 Relação entre integridade da cromatina espermática e fertilidade	11
2.3 Limitações da avaliação espermática convencional	12
2.4 Métodos de avaliação da cromatina espermática.....	13
2.4.1 Ensaio de Estrutura da Cromatina Espermática (SCSA)	13
2.4.2 Laranja de Acridina.....	13
2.4.3 Azul de Toluidina.....	13
2.4.4 Reação de Feulgen	14
2.5 Impacto da integridade do DNA espermático no desenvolvimento embrionário.....	14
3 METODOLOGIA.....	16
3.1 Animais	16
3.1.1 Garanhões.....	16
3.1.2 Éguas	16
3.2 Obtenção e processamento de amostras.....	16
3.3 Laranja de Acridina.....	17
3.3.1 Avaliação visual	17
3.4 Azul de Toluidina	18
3.5 Reação de Feulgen	18
3.6 Avaliação	19
3.7 Análise computacional de imagens.....	20
3.8 Análise estatística.....	21
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	22
5 CONCLUSÕES.....	26
REFERÊNCIAS	27

1 INTRODUÇÃO

A cromatina espermática é composta por DNA e proteínas nucleares, predominantemente protaminas, sendo extremamente compactada, estando localizada no núcleo, que por sua vez compõe a maior parte da cabeça do espermatozoide (Evenson; Darzynkiewicz; Melamed, 1980). Esta compactação protege o material genético, garantindo a integridade do genoma (Lismer; Kimmins, 2023). A integridade da cromatina espermática em equinos, assim como em outras espécies, está relacionada com a fertilidade, visto que incorporação defeituosa ou alterada de proteínas nucleares é associada à fragmentação do DNA e a falhas reprodutivas, impactando na viabilidade de embriões (Lismer; Kimmins, 2023).

Garanhões que apresentam boa motilidade, vigor e morfologia espermática podem apresentar danos no DNA, o que leva à necessidade da realização de testes para a avaliação da cromatina para determinar a qualidade do sêmen e avaliar a fertilidade dos animais (Naves *et al.*, 2004). Essa avaliação é importante em programas de reprodução assistida, como a inseminação artificial e transferência de embriões, pois a integridade genética do espermatozoide influencia diretamente nas taxas de fertilização, desenvolvimento embrionário e, conseqüentemente, no sucesso reprodutivo (Moura, 2023).

Existem diferentes testes para a avaliação da cromatina espermática que podem ser feitos em sêmen de garanhão. O ensaio de estrutura da cromatina espermática (SCSA) avalia a susceptibilidade à desnaturação do DNA, por meio de marcação com laranja de acridina (LA) e avaliação por citometria de fluxo (Kenney *et al.*, 1995; Serafini *et al.*, 2017). Testes como a coloração fluorescente com LA avaliada em microscopia de fluorescência (Tejada *et al.*, 1984) e metacromasia induzida com azul de toluidina (AT) são formas mais simples de avaliação da cromatina espermática (Naves *et al.*, 2004; Beletti, 2013). A reação de Feulgen é uma ferramenta citoquímica clássica para quantificar o DNA e pode ser usada para avaliar a estabilidade do empacotamento genômico paterno (Beletti, 2013).

O teste com LA tem a capacidade de diferenciar DNA de fita simples e dupla. O LA se liga ao DNA espermático dupla fita, localizado na cabeça do espermatozoide, fluorescendo em verde. Quando há alterações na cromatina, existe a desnaturação do DNA (abertura da dupla fita), total ou parcialmente, fazendo com que surja fita simples, que quando ligada ao LA fluoresce em vermelho (Tejada *et al.*, 1984). O LA é útil em testes rápidos de microscopia de fluorescência, permitindo uma análise visual eficiente da integridade cromatínica (Tejada *et al.*, 1984).

O teste com AT é relevante na avaliação de alterações em cromatina espermática, visto que a descompactação do DNA está associada à maior exposição de grupos fosfato aniônicos, que interagem eletrostaticamente com o azul de toluidina em pH 4,0, corante básico catiônico, permitindo a detecção de alterações na integridade e no grau de compactação da cromatina (Mello, 1982).

A reação de Feulgen baseia-se na hidrólise ácida do DNA para identificar complexos DNA-proteína anômalos na cabeça do espermatozoide. O ácido promove a depurinação (remoção de bases purinas), formando grupos aldeídos que reagem com o reagente de Schiff, o que resulta em uma coloração magenta (Biggiogera; Cavallo; Casali, 2024).

A integridade da cromatina do espermatozoide é importante na fertilidade masculina e na contribuição para o início do desenvolvimento embrionário (Zini *et al.*, 2001). A fragmentação do DNA pode comprometer o desenvolvimento embrionário, causando abortos ou problemas no desenvolvimento fetal. Isso ocorre porque, mesmo que o espermatozoide danificado consiga fertilizar o óvulo, a qualidade do DNA pode ser insuficiente para o desenvolvimento adequado do embrião (Hekmatdoost *et al.*, 2009; Beletti, 2013).

Assim, a realização de testes para avaliação da integridade da cromatina espermática pode contribuir para uma caracterização mais abrangente da qualidade seminal, aumentando a chance de sucesso reprodutivo, tanto em métodos naturais quanto em tecnologias de reprodução assistida. Sendo assim, testes como laranja de acridina, azul de toluidina e reação de Feulgen constituem ferramentas relevantes para a avaliação da integridade da cromatina espermática (Tejada *et al.*, 1984; Silva *et al.*, 2025), visto que o SCSA, considerado método padrão para avaliação da cromatina, depende de citometria de fluxo, equipamento de alto custo, o que torna o seu uso limitado na prática clínica rotineira (Evenson, 2016).

Portanto, o presente trabalho teve como objetivo avaliar a possível associação entre alterações na compactação e estabilidade do DNA espermático, identificadas pelos testes de coloração com laranja de acridina (LA), azul de toluidina (AT) e reação de Feulgen (RF), e a concepção de éguas inseminadas.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Cromatina espermática e organização nuclear

A organização da cromatina espermática em mamíferos, como equinos e bovinos, representa um estado de compactação genômica extrema, necessário para garantir que o material genético chegue intacto ao ovócito (Hiraiwa *et al.*, 2015; Esteves *et al.*, 2021). Durante a fase de diferenciação da espermatogênese, ocorre um remodelamento complexo no qual as histonas somáticas, que empacotam o DNA de forma mais frouxa em células comuns, são substituídas inicialmente por proteínas de transição e, finalmente, pelas protaminas (Beletti, 2013). As protaminas são proteínas básicas ricas em arginina e cisteína oxidada, permitindo que o DNA ocupe um volume até seis vezes menor do que se estivesse na forma de nucleossomas, por meio da formação de pontes de dissulfeto intermoleculares (Hiraiwa *et al.*, 2015).

Essa compactação visa três funções fundamentais: a proteção do material genético contra agentes mutagênicos e nucleases, a garantia da estabilidade genômica essencial para a formação de uma prole normal e a facilitação do transporte do material genético, reduzindo o volume nuclear para tornar o espermatozoide mais hidrodinâmico. Essa estrutura protege o DNA durante o transporte pelos tratos reprodutivos masculino e feminino, assegurando a entrega do genoma haploide (Rocha *et al.*, 2002). Falhas nesse processo de empacotamento resultam em cromatina frouxa, o que predispõe o DNA a danos e instabilidade nuclear (Beletti, 2013).

2.2 Relação entre integridade da cromatina espermática e fertilidade

A integridade da cromatina está intrinsecamente ligada ao potencial reprodutivo, visto que falhas na compactação ou a presença de fragmentação do DNA estão associadas à queda da eficiência reprodutiva. Embora o ovócito possua capacidade limitada de reparo após a fecundação, danos extensos no DNA paterno não podem ser corrigidos, resultando em baixas taxas de fecundação e comprometimento do desenvolvimento inicial (Alves *et al.*, 2015). A fragmentação pode ser originada por falhas na protaminação, processos de apoptose abortiva ou pelo estresse oxidativo causado por espécies reativas de oxigênio (ROS) (Esteves *et al.*, 2021).

Em equinos, fatores como o estresse térmico escrotal e os procedimentos de criopreservação promovem aumentos significativos na fragmentação do DNA (Serafini *et al.*, 2017). O embrião resultante da fertilização por um espermatozoide com cromatina descompactada, frequentemente sofre fragmentação celular e morte precoce. Consequentemente, a estabilidade do complexo DNA-proteína é considerada um pré-requisito não apenas para a concepção, mas para a viabilidade do embrião a longo prazo (Beletti, 2013).

Assim, a avaliação da cromatina torna-se um biomarcador essencial para prever o potencial de fertilidade de garanhões (Alves *et al.*, 2015). Contudo, a magnitude da alteração cromatínica necessária para impactar a concepção ainda é variável e pode depender do grau de comprometimento estrutural (Evenson, 2016).

2.3 Limitações da avaliação espermática convencional

A análise seminal convencional, baseada em parâmetros como motilidade, morfologia, vigor e concentração, possui limitações diagnósticas importantes, pois avalia majoritariamente fatores externos e funcionais (Egyptien *et al.*, 2023). Animais com parâmetros andrológicos considerados normais, como motilidade espermática $\geq 60\%$, vigor ≥ 3 e concentração espermática entre 100 e 200×10^6 espermatozoides/MI (CBRA, 2013), podem ainda comportar-se como subférteis devido à presença de danos genômicos internos não detectáveis pela microscopia de luz convencional (Hiraiwa *et al.*, 2015). O espermograma tradicional mede a capacidade de transporte da célula, mas não a qualidade da "carga" genética que ela carrega (Evenson, 2022).

Dessa maneira, a avaliação complementar da cromatina apresenta fundamentação metodológica ao suprir lacunas no conhecimento acerca da fertilidade masculina, uma vez que possibilita a identificação de indivíduos normozoospermicos que, apesar disso, apresentam instabilidade nuclear (Egyptien *et al.*, 2023; Beletti, 2013).

Portanto, torna-se fundamental a incorporação de análises da integridade genômica às avaliações funcionais tradicionalmente empregadas, uma vez que essa associação amplia a eficiência e a confiabilidade dos programas de reprodução assistida (Beletti, 2013).

2.4 Métodos de avaliação da cromatina espermática

2.4.1 Ensaio de Estrutura da Cromatina Espermática (SCSA)

O SCSA, reconhecido como o teste padrão de referência pela sua rapidez e precisão diagnóstica, utiliza citometria de fluxo para analisar milhares de células individualmente. O método baseia-se na susceptibilidade do DNA à desnaturação induzida por ácido, empregando o corante laranja de acridina para diferenciar DNA de fita dupla intacta (fluorescência verde) de DNA de fita simples desnaturado (fluorescência vermelha) (Evenson, 2022).

2.4.2 Laranja de Acridina (LA)

Este teste utiliza o mesmo fluorocromo metacromático do SCSA, mas é realizado sob microscopia de fluorescência. Quando o DNA está íntegro, a molécula de LA intercala-se entre os ácidos nucleicos e emite cor verde, enquanto em DNA fragmentado a sonda liga-se aos grupos fosfatos expostos, emitindo fluorescência amarelo-alaranjada a vermelha. Apesar de prático, o método apresenta como limitações a subjetividade visual do examinador e a perda rápida de fluorescência (fotobranqueamento), o que dificulta a leitura precisa e a repetibilidade dos resultados. Em bovinos, há correlação entre indivíduos com baixa fertilidade e porcentagem alta de cabeças de espermatozoides coradas em vermelho, já que essas são associadas a cromatina desnaturada (Tejada *et al* 1984).

2.4.3 Azul de Toluidina (AT)

O teste com AT é uma técnica citoquímica baseada na ligação entre o corante catiônico e os grupos fosfatos ionizados do DNA (Rocha *et al.*, 2002). O fenômeno de metacromasia induzida revela que a variação da coloração está diretamente associada ao grau de descompactação do material genético. Células com cromatina altamente compactada, em que os fosfatos estão bloqueados por protaminas, a coloração varia de verde a azul-claro; espermatozoides com material genético descompactado exibem coloração que varia de azul-escuro a magenta (Beletti; Costa; Guardieiro, 2005).

O aumento da sensibilidade do método ocorre a partir da hidrólise ácida das amostras antes da coloração, pois com a alteração de pH a cromatina com baixa descompactação tem

suas protaminas extraídas, o que permite a ligação entre o corante e os grupos fosfato do DNA (Beletti; Costa; Guardieiro, 2005).

2.4.4 Reação de Feulgen (RF)

A reação de Feulgen foi a metodologia pioneira na identificação de complexos DNA-proteína anômalos, baseando-se na cinética da hidrólise ácida do DNA (Mello, 1982). O princípio envolve a depurinação do ácido nucleico, formando grupos aldeídos reativos ao reagente de Schiff, resultando em uma coloração magenta, alterada a partir do grau de compactação. Cromatina menos compacta sofre depurinação mais rápida e, portanto, cora com maior intensidade, permitindo identificar espermatozoides com maturação proteica incompleta (Beletti; Costa; Guardieiro, 2005).

Espermatozoides com cromatina normal e altamente compactada são mais resistentes à hidrólise, enquanto cromatina mais frouxa ou instável sofre depurinação mais rápida e cora com maior intensidade. Em touros, esta técnica foi pioneira na diferenciação de animais subférteis, demonstrando que a maior intensidade de coloração está associada a anomalias estruturais do complexo nucleoproteico paterno, o que compromete a estabilidade nuclear e a fertilidade (Beletti, 2013).

2.5 Impacto da integridade do DNA espermático no desenvolvimento embrionário

O impacto do espermatozoide no embrião ultrapassa a entrega do genoma haploide, envolvendo o fornecimento de sinalizadores epigenéticos vitais logo após a fecundação (Beletti, 2013). O gameta masculino carrega diversos tipos de RNAs não codificadores (ncRNAs) e histonas residuais que são essenciais para o controle gênico no início da vida embrionária. Moléculas de RNA de origem espermática (*sperm-borne*) regulam as primeiras clivagens e a qualidade da ativação do genoma embrionário (Moura *et al.*, 2023).

Estudos em modelos experimentais demonstram que danos extensos no DNA espermático comprometem a replicação do genoma paterno no zigoto, resultando em atraso ou bloqueio do desenvolvimento embrionário antes da formação de blastocistos, o que apoia a associação entre dano na cromatina espermática e falhas de clivagem e perdas gestacionais (Gawecka *et al.*, 2013).

A contribuição funcional do genoma paterno torna-se mais evidente a partir da ativação do genoma embrionário, que ocorre entre os estágios de 8 e 16 células. Nesse período, os efeitos

decorrentes de elevadas cargas de dano ao DNA espermático passam a se manifestar de forma mais pronunciada no desenvolvimento embrionário (Tesarik; Greco; Mendoza, 2004).

Após a fecundação, o ovócito pode realizar o reparo do DNA espermático, atuando predominantemente por meio da via de excisão de bases, especialmente em danos associados ao estresse oxidativo. Contudo, essa capacidade de reparação é limitada, ou seja, incapaz de corrigir alterações extensas no material genético ou modificações epigenéticas, que podem persistir durante o desenvolvimento embrionário inicial e impactar a saúde da progênie a longo prazo (Aitken; Baker, 2006; Alves *et al.*, 2015).

Em programas de reprodução assistida, a avaliação rigorosa da cromatina é determinante para a produção de embriões de qualidade e o sucesso gestacional (Beletti, 2013). Assim, a integridade do DNA paterno funciona como um molde epigenético fundamental que influencia a probabilidade de concepção e o desenvolvimento saudável do neonato (Moura *et al.*, 2023).

3 METODOLOGIA

3.1 Animais

3.1.1 Garanhões

As 97 partidas (ejaculados) de sêmen utilizadas, coletadas entre agosto de 2023 e dezembro de 2025, foram provenientes de 23 garanhões das raças Quarto de Milha e Mangalarga Marchador, oriundos da Gallop, central de reprodução equina, localizada em Uberlândia, MG. Os animais apresentavam peso corporal entre 380 e 510 kg e idade entre quatro e 15 anos. Os cavalos foram mantidos em baias e, eventualmente, em regime de pastagem. Todos os animais foram submetidos à avaliação convencional do sêmen, que consiste na análise da motilidade, da morfologia e da concentração espermática. Os procedimentos que envolveram a utilização de animais foram realizados após aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Uberlândia, parecer 33/2023/CEUA/PROPP/REITO.

3.1.2 Éguas

As amostras seminais obtidas foram destinadas à inseminação de 68 éguas, das raças Quarto de Milha e Mangalarga Marchador, inseridas em programas reprodutivos ativos, previamente submetidas à avaliação ginecológica, apresentando trato reprodutivo íntegro, ausência de processos infecciosos e ciclicidade reprodutiva regular. As fêmeas foram mantidas sob sistema de pastejo rotacionado, com fornecimento de suplemento mineral e disponibilidade *ad libitum* de água. A concepção foi avaliada através de exame ultrassonográfico transretal aos 15 dias após a ovulação.

3.2 Obtenção e processamento de amostras

As coletas de sêmen foram realizadas durante as estações de monta entre agosto de 2023 e dezembro de 2025, com uso de manequim e vagina artificial. Cada amostra de sêmen obtida foi destinada à inseminação de uma determinada égua. Após a coleta, o sêmen foi diluído na proporção de 3:1 (diluyente:sêmen) utilizando o diluidor comercial BotuSemen®.

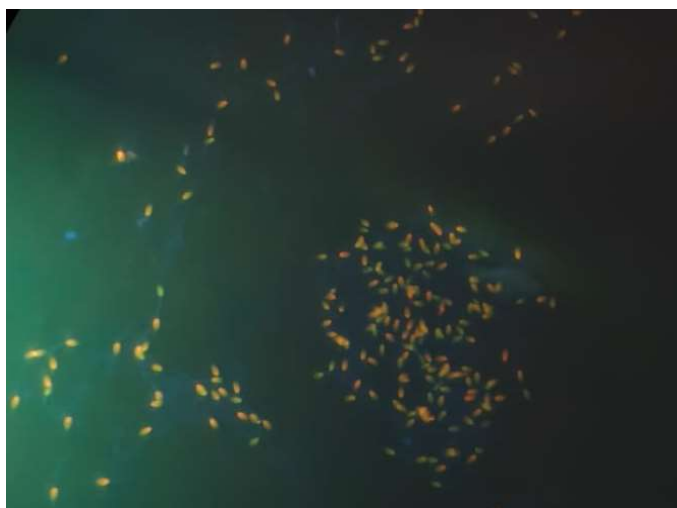
Após a realização dos esfregaços, contendo 20 µL da amostra de sêmen, as lâminas foram fixadas em ácido acético na proporção 3:1 por um minuto e posteriormente em etanol 70% por três minutos e guardadas em ambiente escuro e fresco.

3.3 Laranja de Acridina

Em sala escura, foi realizado o protocolo adaptado de Evenson e Jost (2000). As lâminas foram mergulhadas por 10 minutos em solução ácida de HCl 4N, lavadas com água destilada e coradas com solução de LA (ácido cítrico 0,1 M, Na₂HPO₄ 0,2 M, EDTA 0,001 M, NaCl 0,15 M, estoque LA 6 µg/mL em água destilada pH 6), depositando-se 3 a 5 mL da solução sobre a superfície da lâmina e deixando-a por 5 minutos.

Em seguida, os esfregaços foram delicadamente lavados por 5 minutos em água destilada. Este procedimento foi realizado três vezes. Antes que a superfície da lâmina secasse, foram depositadas duas gotas de glicerina sobre a lâmina, e uma lamínula foi colocada sobre ela. A lateral da lamínula foi selada com esmalte de unha.

Figura 1 - Avaliação da integridade da cromatina espermática por coloração com LA



Fonte: A autora (2026).

3.3.1 Avaliação visual

Após a coloração, as lâminas foram avaliadas visualmente em microscópio Zeiss® Axiovert 200 M (Zeiss®, Jena, Germany), de epifluorescência, que operava com lâmpada de mercúrio (HbO) e um filtro de excitação na faixa azul. A análise foi realizada a partir da contagem visual das cabeças de espermatozoides que fluoresceram em verde quando o LA

estava ligado ao ácido desoxirribonucleico (DNA) sem alterações (fita dupla) e totalmente ou parcialmente em vermelho (podendo variar de amarelo, passando por laranja, chegando em vermelho) quando ligado ao DNA desnaturado, de fita simples (Tejada *et al.*, 1984). Foram contados 200 espermatozoides por lâmina, e o resultado foi transformado em porcentagem de espermatozoides com alteração na cromatina.

3.4 Azul de Toluidina

Após a etapa de fixação, as lâminas foram submetidas à hidrólise ácida em solução de HCl 4 N, permanecendo por 10 minutos, em protocolo adaptado de Beletti e Mello (2004). Em seguida, as lâminas foram lavadas com água corrente, enxaguadas com água destilada e deixadas para secagem. Posteriormente, foram aplicadas de duas a três gotas de solução de azul de toluidina 0,025% em tampão McIlvaine (tampão fosfato, ácido cítrico) pH 4,0, sobre o esfregaço, procedendo-se à colocação de uma lamínula para garantir a distribuição homogênea da solução. O excesso de corante foi removido com papel toalha. As bordas da lamínula foram vedadas com esmalte para fixação, e a avaliação microscópica foi realizada no mesmo dia do preparo.

Figura 2 - Avaliação da integridade da cromatina espermática por coloração com AT



Fonte: A autora (2026).

3.5 Reação de Feulgen

O método da RF foi aplicado com adaptações em relação ao protocolo descrito por Beletti e Mello (2004), especialmente no que se refere às condições de hidrólise ácida,

adequadas à análise da cromatina espermática de garanhões. Foram utilizados 97 esfregaços previamente fixados, submetidos à hidrólise ácida em solução de HCl 4 N, preparada na proporção de duas partes de água para uma parte de ácido clorídrico fumegante, por 45 minutos à temperatura ambiente.

Posteriormente, as lâminas foram lavadas abundantemente em água corrente e, em seguida, enxaguadas com água destilada. A coloração foi realizada por meio da aplicação do reagente de Schiff, utilizando-se pipeta Pasteur, até a completa cobertura do esfregaço, permanecendo em incubação por 60 minutos à temperatura ambiente. Quando necessário, foram adicionadas novas gotas do reagente para evitar o ressecamento do material. Posteriormente, as lâminas foram submetidas à desidratação em séries crescentes de álcoois (70%, 85%, 95% e álcool absoluto I, II e III), seguidas de diafanização em xilol I, II e III. Por fim, as lâminas foram montadas com Entellan ou goma de Damar.

Figura 3 - Avaliação da integridade da cromatina espermática por RF



Fonte: A autora (2026).

3.6 Avaliação

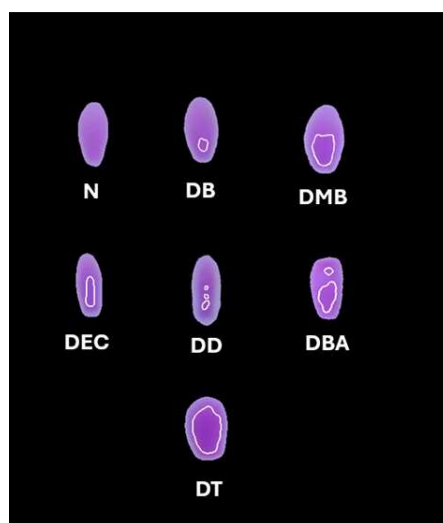
Para a análise, foram capturados 15 campos diferentes, por lâmina. Imagens digitais de cada esfregaço foram obtidas por meio do software S-EYE® 1.6.0.11, com resolução de 3840x2160 pixels. Utilizou-se um microscópio óptico trinocular Olympus® BX40 com objetiva de 40x e câmera Kaisi® 4K acoplada a um computador para captura e armazenamento das imagens.

3.7 Análise computacional de imagens

As imagens dos esfregaços corados com AT e RF foram avaliadas por meio de análise de imagem computacional. A partir das imagens digitais das lâminas coradas, as cabeças espermáticas foram individualizadas por meio de segmentação baseada em limiarização (*thresholding*) com auxílio de algoritmo desenvolvido em ambiente MATLAB e executado pelo programa *Octave* (Silva *et al.*, 2025). Assim, foram criadas imagens separadas de cada cabeça de espermatozoide.

Utilizando-se outro algoritmo desenvolvido em ambiente MATLAB e executado pelo programa *Octave*, foram selecionadas as 20 cabeças espermáticas mais compactadas, ou seja, mais claras, como referência para determinar o valor médio de pixels de uma cabeça sem alterações. Na coloração com AT, foram consideradas regiões de descompactação da cromatina, as áreas da cabeça espermática com valores de pixel 2,5% ou mais inferiores ao valor de referência da amostra. Para o teste com RF, o critério adotado foi valor de pixel 4% ou mais abaixo da referência. As alterações na integridade da cromatina foram classificadas conforme a localização, seguindo rigorosamente a metodologia descrita por Hiraiwa *et al.* (2021), nas seguintes categorias: descompactação de base (DB), descompactação da meia base (DMB), descompactação do eixo central (DEC), descompactação base-ápice (DBA), descompactação total (DT) e descompactação dispersa (DD). Todas as classificações foram realizadas por um único avaliador, assegurando padronização na análise.

Figura 4 – Classificação das alterações de integridade da cromatina



Fonte: Oquendo, P. S., 2026.

Adicionalmente, a cromatina foi avaliada quanto à diferença de compactação média entre as cabeças padrão e cada uma das cabeças analisadas. Para isso, foi utilizado um algoritmo desenvolvido em ambiente de programação Scilab, no qual as cabeças segmentadas foram convertidas em tons de cinza. De forma semelhante ao realizado no algoritmo para definir as regiões da cabeça com cromatina mais frouxa, a média dos valores de pixel das 10 cabeças mais compactas por amostra foi determinada e esse valor foi considerado padrão. Posteriormente, foi calculada a média dos valores de pixel de cada cabeça e determinada a diferença em relação ao valor médio das cabeças padrão, convertendo-se esse resultado em porcentagem de descompactação. A heterogeneidade da compactação também foi mensurada, sendo definida como o coeficiente de variação (%) dos valores de pixel de cada cabeça espermática (Beletti, 2005).

3.8 Análise estatística

Foi realizado teste de correlação de Spearman entre a porcentagem de espermatozoides com alteração de cromatina e a prenhez das éguas. Foi considerada correlação alta (significativa) quando $p < 0,05$. Foi considerada correlação moderada quando $0,15 > P > 0,05$. O teste de correlação de Spearman, por se tratar de um teste não paramétrico, foi utilizado, pois cada amostra de sêmen foi utilizada para inseminar uma única égua e, portanto, o resultado foi classificado como prenha ou vazia (não prenha). Assim, foi possível verificar se o método se relacionava com a fertilidade de garanhões utilizados em inseminação artificial.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Houve ausência de correlação alta entre as variáveis relacionadas à compactação da cromatina espermática e a taxa de concepção ($p > 0,05$), para os métodos AT, RF e LA, conforme demonstrado nas tabelas 1, 2 e 3. O teste de correlação de Spearman revelou, de maneira geral, coeficientes de correlação de baixa magnitude para praticamente todas as categorias de descompactação cromatínica (DD, DB, DBA, DEC, DMB e DT), bem como para os índices computacionais de heterogeneidade e diferença percentual dos níveis de cinza. Apenas descompactação base-ápice (DBA) e descompactação total (DT) com AT e descompactação base-ápice (DBA) com RF apresentaram correlação negativa moderada com a concepção.

Tabela 1 – Coeficiente de correlação de Spearman (R) entre a concepção e as variáveis de avaliação da cromatina identificadas por azul de toluidina

Variável	R	p-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

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.

* Correlação alta (significativa) entre os grupos prenhez positiva e prenhez negativa ($P < 0,05$)

** Correlação moderada entre os grupos prenhez positiva e prenhez negativa ($0,15 > P > 0,05$)

Fonte: A autora.

Tabela 2 – Coeficiente de correlação de Spearman (R) entre a concepção e as variáveis de avaliação da cromatina identificadas por reação de Feulgen

Variável	R	p-valor
% DD RF	0,062	0,5756
% DB RF	0,105	0,3456
% DBA RF**	- 0,168	0,1284**
% DEC RF	0,103	0,3541
% DMB RF	- 0,017	0,8798
% DT RF	0,124	0,2640
% Alterados RF	0,124	0,3541
Heterogeneidade RF	0,100	0,3688
% DIF RF	0,042	0,7079

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.

* Correlação alta (significativa) entre os grupos prenhez positiva e prenhez negativa ($P < 0,05$)

** Correlação moderada entre os grupos prenhez positiva e prenhez negativa ($0,15 > P > 0,05$)

Fonte: A autora.

Tabela 3 – Coeficiente de correlação de Spearman (R) entre a concepção e porcentagem de espermatozoides com alterações de cromatina identificadas por Laranja de acridina

Variável	R	p-valor
% Laranja de acridina	0,027	0,8028

* Correlação significativa entre os grupos prenhez positiva e prenhez negativa ($P < 0,05$)

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

Fonte: A autora.

No caso do AT (Tabela 1), a porcentagem total de células alteradas apresentou $r = 0,068$ ($p = 0,5303$), enquanto a heterogeneidade cromatínica apresentou $r = 0,052$ ($p = 0,6345$), evidenciando ausência de associação estatisticamente relevante com a concepção. Resultados semelhantes foram observados para a RF (Tabela 2), em que % Alterados ($r = 0,124$; $p = 0,3541$) e heterogeneidade ($r = 0,100$; $p = 0,3688$) também não demonstraram correlação significativa.

Correlação negativa moderada foi observada entre descompactação base-ápice (DBA) detectada por AT ($r = -0,165$; $p = 0,1240$) (Tabela 1) e RF ($r = -0,168$; $p = 0,1284$) (Tabela 2), e para a descompactação total (DT) avaliada por AT ($r = -0,169$; $p = 0,1149$). Esses achados podem sugerir que alterações mais extensas tenham maior potencial de impacto, visto que comprometimentos globais tendem a ser potencialmente mais prejudiciais do que alterações regionais discretas (Aitken, 2010).

Enquanto o azul de toluidina se baseia na basofilia e metacromasia, a reação de Feulgen foca na estabilidade química do polímero de DNA, fornecendo visões complementares da organização nuclear. Ou seja, a reação de Feulgen e o azul de toluidina avaliam a estabilidade do complexo nucleoproteico e a acessibilidade do DNA após tratamento ácido. Ambas as técnicas apresentam eficácia similar na detecção de anormalidades cromatínicas em diversas espécies, como coelhos e touros (Beletti, Mello, 2004). No presente trabalho, os resultados das duas técnicas foram semelhantes, confirmando que, assim como em coelhos e touros, ambas as técnicas apresentam eficácia similar na detecção de anormalidades cromatínicas em espermatozoides de garanhão.

A magnitude da alteração cromatínica necessária para impactar a concepção pode variar conforme o grau de comprometimento estrutural e a capacidade de reparo do ovócito. Alterações intensas na cromatina ou no DNA tendem a exceder essa capacidade reparadora (Aitken; De Iuliis, 2010) e a partir de um determinado limiar crítico de fragmentação, verifica-se redução consistente nos índices reprodutivos. Em contrapartida, alterações cromatínicas de baixa intensidade tendem a não exercer impacto significativo sobre a fertilização ou sobre o desenvolvimento embrionário inicial (Evenson, 2016). As alterações identificadas neste estudo (Tabelas 1, 2 e 3) podem estar situadas abaixo do nível biologicamente relevante para interferir na concepção.

Os índices computacionais de heterogeneidade cromatínica e diferença percentual de níveis de cinza (% DIF) apresentados, também não demonstraram associação significativa com a concepção. A ausência de correlação indica que pequenas flutuações estruturais detectadas por processamento digital de imagens podem não representar comprometimento funcional suficiente para afetar o estabelecimento da gestação. O impacto do dano cromatínico depende do grau em que a estabilidade genômica é afetada durante as primeiras divisões embrionárias, e não apenas da presença de alterações detectáveis (Lewis, 2015).

Assim, alterações estruturais no DNA espermático podem não interferir diretamente na fertilização, mas manifestar seus efeitos durante divisões celulares subsequentes, comprometendo a viabilidade embrionária (Aitken; Baker, 2006). Como no presente trabalho a

confirmação de prenhez se deu aos 15 dias de gestação, pode ser que estas alterações influenciem o restante da gestação e mesmo, a integridade genética da prole.

Dessa forma, os achados sugerem que, na população estudada, as alterações cromatínicas detectadas por AT, RF e LA não constituem fator de muita relevância. Importante salientar que todos os garanhões utilizados no presente trabalho eram animais aprovados no exame andrológico tradicional e, portanto, teoricamente férteis. No entanto, em garanhões com alterações seminais mais abrangentes, provavelmente a magnitude das alterações cromatínicas pode ser superior, tornando essas técnicas potencialmente mais relevantes.

5 CONCLUSÕES

Conclui-se que a avaliação da cromatina espermática pelos métodos alternativos em esfregaço de sêmen pode ser utilizada como ferramenta complementar à análise seminal convencional, e não como marcador isolado de fertilidade em garanhões.

REFERÊNCIAS

- AITKEN, R. J.; BAKER, M. A. Oxidative stress, sperm survival and fertility control. **Molecular and cellular endocrinology**, v. 250, n. 1–2, p. 66–69, 2006. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.mce.2005.12.026>.
- AITKEN, R. J.; DE IULIIS, G. N. On the possible origins of DNA damage in human spermatozoa. **Molecular Human Reproduction**, v. 16, n. 1, p. 3–13, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1093/molehr/gap059>.
- ALVES, M. B. R. *et al.* Investigando a fragmentação não induzida e a susceptibilidade à fragmentação do DNA espermático: refinamento da avaliação espermática. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 39, p. 218–225, 2015. DOI: [http://cbra.org.br/pages/publicacoes/rbra/v39/n3/p309-314%20\(RB574b\)](http://cbra.org.br/pages/publicacoes/rbra/v39/n3/p309-314%20(RB574b)).
- ALVES, M. B. R. *et al.* Oxidative stress and sperm DNA damage: implications for male fertility and assisted reproduction. **Reproduction**, v. 149, n. 5, p. R93–R104, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1530/REP-14-0319>.
- BELETTI, M. E. Cromatina espermática: quebrando paradigmas. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 37, n. 2, p. 92–96, 2013. [s. l.]
- BELETTI, M. E.; COSTA, L. F.; GUARDIEIRO, M. Morphometric features and chromatin condensation abnormalities evaluated by toluidine blue staining in bull spermatozoa. **Brazilian Journal of Morphological Sciences**, v. 22, n. 2, p. 85–90, 2005. [s. l.]
- BELETTI, M. E.; MELLO, M. L. S. Comparison between the toluidine blue stain and the Feulgen reaction for evaluation of rabbit sperm chromatin condensation and their relationship with sperm morphology. **Theriogenology**, v. 62, n. 3–4, p. 398–402, 2004. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2003.10.016>.
- BIGGIOGERA, M.; CAVALLO, M.; CASALI, C. A brief history of the Feulgen reaction. **Histochemistry and Cell Biology**, v. 162, n. 1–2, p. 3–12, 2024. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00418-024-02279-9>.
- COLÉGIO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL (CBRA). Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal. 3. ed. Belo Horizonte: CBRA, 2013.

EGYPTIEN, S. *et al.* Sperm quality assessment in stallions: how to choose relevant assays to answer clinical questions. **Animals**, v. 13, n. 19, p. 3123, 2023. DOI: <https://doi.org/10.3390/ani13193123>

ESTEVEZ, S. C. *et al.* Sperm DNA fragmentation test: summary evidence and clinical practice recommendations. **Andrology**, v. 9, n. 2, p. 164–184, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1111/andr.12925>.

EVENSON, D. P. Sperm chromatin structure assay (SCSA®) for fertility assessment. **Current Protocols**, v. 2, n. 8, p. e508, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1002/cpz1.508>.

EVENSON, D. P. The sperm chromatin structure assay (SCSA®) and other sperm DNA fragmentation tests for evaluation of sperm nuclear DNA integrity as related to fertility. **Animal Reproduction Science**, v. 169, p. 56–75, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2016.01.017>.

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

EVENSON, D. P.; JOST, L. K. Sperm chromatin structure assay is useful for fertility assessment. **Methods in Cell Science**, v. 22, n. 2–3, p. 169–189, 2000. DOI: <https://doi.org/10.1023/A:1009844109023>.

GAWECKA, J. E. *et al.* Mouse zygotes respond to severe sperm DNA damage by delaying paternal DNA replication and embryonic development. **PLoS ONE**, v. 8, n. 2, e56385, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0056385>.

HEKMATDOOST, A.; LAKPOUR, N.; SADEGHI, M. R. Sperm chromatin integrity: etiologies and mechanisms of abnormality, assays, clinical importance, preventing and repairing damage. **Avicenna Journal of Medical Biotechnology**, v. 1, n. 3, p. 147–160, 2009. Acesso em: <https://link.gale.com/apps/doc/A304726482/HRCA?u=anon~1667265d&sid=googleScholar&xid=dae8fbf3>

HIRAIWA, S. H. *et al.* 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. 1–10, 2021. DOI: <https://doi.org/10.14393/BJ-v37n0a2021-47967>.

KENNEY, R. M. *et al.* Relationships between sperm chromatin structure, motility and morphology of ejaculated sperm and seasonal pregnancy rate. **Biology of Reproduction**, v. 52, p. 647–653, 1995. DOI: https://doi.org/10.1093/biolreprod/52.monograph_series1.647.

LEWIS, S. E. M. The impact of sperm DNA damage in assisted conception and beyond. **Reproduction**, v. 149, n. 3, p. R1–R12, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1530/REP-14-0343>.

LISMER, A.; KIMMINS, S. Emerging evidence that the mammalian sperm epigenome serves as a template for embryo development. **Nature Communications**, v. 14, p. 2142, 2023. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41467-023-37894-2>.

MELLO, M. L. S. Induced metachromasia in bull spermatozoa. **Histochemistry**, v. 74, n. 3, p. 387–392, 1982. DOI: <https://doi.org/10.1007/BF00493438>.

MOURA, A. B. B. *et al.* Mecanismos epigenéticos nos espermatozoides e o impacto sobre a fertilidade masculina. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 47, p. 598–606, 2023. Disponível em: <http://www.cbra.org.br/portal/downloads/publicacoes/rbra/v47/n3/RB%1099%Moura%p.598-606.pdf>.

NAVES, C. S. *et al.* Avaliação da cromatina espermática em equinos com azul de toluidina e acridine orange. **Bioscience Journal**, v. 20, n. 3, p. 117–124, 2004. [s. l.]

ROCHA, H. L. O. G. *et al.* Uso de laranja de acridina e azul de toluidina na avaliação da fertilidade masculina. **Bioscience Journal**, Uberlândia, 2002. Disponível em: <https://seer.ufu.br/index.php/biosciencejournal/article/view/6404>.

SERAFINI, R. *et al.* The effect of flash-freezing temperature on stallion sperm DNA structure. **Theriogenology**, v. 95, p. 113–117, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2017.03.010>.

SILVA, M. V. *et al.* Methods used to assess bull sperm chromatin integrity and its correlation with in vitro embryo production efficiency. **Veterinary Sciences**, v. 12, n. 2, p. 184, 2025. DOI: <https://doi.org/10.3390/vetsci12020184>.

TEJADA, R. I. *et al.* A test for the practical evaluation of male fertility by acridine orange fluorescence. **Fertility and Sterility**, v. 42, n. 1, p. 87–91, 1984. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0015-0282\(16\)47963-8](https://doi.org/10.1016/S0015-0282(16)47963-8).

TESARIK, J.; GRECO, E.; MENDOZA, C. Late, but not early, paternal effect on human embryo development is related to sperm DNA fragmentation. **Human Reproduction**, v. 19, n. 3, p. 611–615, 2004. DOI: <https://doi.org/10.1093/humrep/deh127>.

ZINI, A. *et al.* Correlations between two markers of sperm DNA integrity, DNA denaturation and DNA fragmentation, in fertile and infertile men. **Fertility and Sterility**, v. 75, n. 4, p. 674–677, 2001. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0015-0282\(00\)01796-9](https://doi.org/10.1016/S0015-0282(00)01796-9).