

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

ANDRÉ LUIZ OLIVEIRA DE SOUZA

**ANÁLISE DA INTEGRIDADE DA CROMATINA ESPERMÁTICA DE GARANHÕES
POR MEIO DE SCSA E TESTE DE NICOLETTI**

UBERLÂNDIA

2025

ANDRÉ LUIZ OLIVEIRA DE SOUZA

**ANÁLISE DA INTEGRIDADE DA CROMATINA ESPERMÁTICA DE GARANHÕES
POR MEIO DE SCSA E TESTE DE NICOLETTI**

Projeto de Pesquisa apresentado à Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – FMVZ da Universidade Federal de Uberlândia – UFU, como requisito parcial à aprovação na disciplina de Trabalho de Conclusão de Curso II.

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Emílio Beletti

UBERLÂNDIA

2025

ANDRÉ LUIZ OLIVEIRA DE SOUZA

**ANÁLISE DA INTEGRIDADE DA CROMATINA ESPERMÁTICA DE GARANHÕES
POR MEIO DE SCSA E TESTE DE NICOLETTI**

Projeto de Pesquisa apresentado à Faculdade de
Medicina Veterinária e Zootecnia – FMVZ da
Universidade Federal de Uberlândia – UFU, como
requisito parcial à aprovação na disciplina de
Trabalho de Conclusão de Curso II.

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Emílio Beletti

Uberlândia, 7 de maio de 2025

Banca Examinadora:

Marcelo Emílio Beletti – Doutor (UFU)

Pedro Sanches Oquendo Júnior– Mestre (UFU)

Matheus Vicente da Silva – Mestre (UFU)

RESUMO

A integridade da cromatina, uma estrutura composta por DNA e nucleoproteínas, é crucial para a preservação da informação genética do gameta masculino. Durante o processo de espermiogênese, a cromatina passa por um processo de compactação, envolvendo a substituição de histonas por protaminas para maior estabilidade do DNA. No entanto, alterações nesse processo de compactação podem comprometer a fertilidade, mesmo em um sêmen de boa qualidade aparente. Diversos fatores podem levar à fragmentação do DNA espermático, associando à problemas de fertilidade e desenvolvimento embrionário. Nesse contexto, a citometria de fluxo como plataforma de análise da instabilidade da cromatina espermática, emergiu como ferramenta de destaque para avaliar a cromatina espermática. Ambas as técnicas permitem a avaliação da integridade da cromatina e assim a identificação de garanhões com problemas de fertilidade. O “Sperm Chromatin Structure Assay” (SCSA), considerado padrão-ouro, usa a desnaturação ácida induzida in situ e o corante laranja de acridina para quantificar danos ao DNA através do “DNA Fragmentation Index” (DFI), sendo considerado confiável e rápido. Já o método de Nicoletti, originalmente criado para detectar apoptose em células somáticas, faz o uso de iodeto de propídio e apresenta um protocolo mais simples. Foi feito neste estudo uma correlação de Pearson entre os dados andrológicos de rotina, como motilidade concentração e vigor, entre os dados de DFI obtidos com o teste de Nicoletti e SCSA e com os resultados de prenhez resultantes da inseminação de éguas saudáveis. Neste estudo observou-se que o método de Nicoletti se correlaciona melhor com o SCSA quando eventos de alta fluorescência são interpretados como indicativos de fragmentação da cromatina, sendo um comportamento que pode ser justificado pela diferença celular existente entre os espermatozoides e as células somáticas, que foram o objeto de estudo originário da técnica. Portanto, recomendamos que sejam revisados os parâmetros de análise do método de Nicoletti para melhorar sua precisão na avaliação da fertilidade de garanhões.

Palavras-chave: Reprodução; equino; fertilidade; citômetro; DNA

ABSTRACT

The integrity of chromatin, a structure composed of DNA and nucleoproteins, is crucial for preserving the genetic information of the male gamete. During spermiogenesis, chromatin undergoes a compaction process involving the replacement of histones with protamines to enhance DNA stability. However, alterations in this compaction process can compromise fertility, even in semen that appears to be of good quality. Several factors can lead to sperm DNA fragmentation, which is associated with fertility issues and impaired embryonic development. In this context, flow cytometry has emerged as a prominent tool for analyzing sperm chromatin instability. It allows for the assessment of chromatin integrity and, consequently, the identification of stallions with potential fertility problems. The Sperm Chromatin Structure Assay (SCSA), considered the gold standard, uses in situ acid-induced denaturation and acridine orange staining to quantify DNA damage through the DNA Fragmentation Index (DFI), offering reliable and rapid results. The Nicoletti method, originally developed to detect apoptosis in somatic cells, uses propidium iodide and features a simpler protocol. In this study, a Pearson correlation was performed between routine andrological parameters—such as motility, concentration, and vigor—and DFI data obtained from both the Nicoletti test and the SCSA, along with pregnancy outcomes following the insemination of healthy mares. The results showed that the Nicoletti method correlates more closely with the SCSA when high fluorescence events are interpreted as indicators of chromatin fragmentation. This behavior may be explained by the cellular differences between spermatozoa and the somatic cells originally analyzed with the Nicoletti technique. Therefore, we recommend that the analytical parameters of the Nicoletti method be revised to improve its accuracy in assessing stallion fertility.

Keywords: Reproduction; equine; fertility; cytometer; DNA

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	7
2. REVISÃO DE LITERATURA	8
3. METODOLOGIA.....	11
3.1 Animais	11
3.2 Éguas.....	12
3.3 Obtenção e processamento das amostras	12
3.4 Citômetro de Fluxo	12
3.5 Análise SCSA.....	12
3.6 Análise conforme descrito por Nicoletti	13
3.7 Análises complementares.....	16
3.8 Análise estatística	16
4. RESULTADOS	17
5. DISCUSSÃO	18
6. CONCLUSÃO.....	21
7. REFERÊNCIAS.....	21

1. INTRODUÇÃO

O Brasil é o país com o terceiro maior rebanho de equinos do mundo (FAO, 2021), sendo que a reprodução desses animais é uma atividade de grande importância econômica, social e cultural no país, desempenhando um papel vital em várias áreas, incluindo esportes, segurança pública, trabalhos humanitários e lazer. A reprodução eficaz de equinos não apenas sustenta a indústria equestre, mas também contribui para a preservação de raças e para a geração de animais de alta qualidade. Nesse cenário, o emprego de biotecnologias na reprodução equina se tornou essencial, visando otimizar a eficiência do processo reprodutivo, aprimorar a seleção genética e superar desafios associados à fertilidade e à viabilidade dos embriões (Allen e Wilsher, 2017; Squires, 2020).

No entanto, para que essas biotecnologias sejam bem-sucedidas, é fundamental avaliar a qualidade do sêmen dos garanhões utilizados como doadores (Varner et al., 2014). Um dos aspectos mais importantes a serem analisados é a integridade da cromatina do espermatozoide equino. A cromatina é a estrutura do DNA levemente condensada na presença de proteínas histonas, que compõem o núcleo celular somático. No espermatozoide, a cromatina está altamente compactada na presença de protaminas e com pequena porcentagem de histonas retidas ao DNA, e assume a forma de toróides ou “donuts” (Ausió et al., 2014). A integridade da cromatina é essencial para garantir a fertilização do ovócito, o sucesso da transferência da carga genética e o desenvolvimento embrionário normal, uma vez que quando existem falhas no processo de condensação ou danos na estrutura da cromatina, o material genético fica mais exposto. (Montserrat Vallet-Buisan et al., 2023).

Danos à estrutura da cromatina podem ser causados por fatores ambientais, genéticos, nutricionais, infecciosos ou iatrogênicos (Héctor et al., 2016; Taha et al., 2012). Esses danos podem comprometer a qualidade dos embriões produzidos ou até resultar na infertilidade do macho (Cortés-Gutiérrez et al., 2007). Portanto, a avaliação da cromatina nos espermatozoides torna-se crucial em biotecnologias reprodutivas, visto que a qualidade do DNA espermático tem um impacto direto nas taxas de fertilização e nas taxas de concepção (Aitken; Lewis, 2023). A precisão e a eficiência das técnicas de avaliação da cromatina, neste contexto, se tornam uma preocupação central, uma vez que métodos inadequados podem levar a diagnósticos incorretos e decisões inapropriadas na escolha de garanhões.

Neste trabalho foi explorado duas técnicas de avaliação de cromatina espermática por citometria de fluxo, a “Sperm Chromatin Structure Assay” (SCSA) proposta por Evenson (2012) e a técnica descrita por Riccardi e Nicoletti (2006), analisando a capacidade dessas técnicas em determinar as alterações na cromatina espermática de garanhões. O objetivo central deste estudo foi contribuir para a melhoria das práticas reprodutivas em equinos, garantindo a seleção dos melhores garanhões e, conseqüentemente, o avanço da qualidade genética e reprodutiva desses animais.

2. REVISÃO DE LITERATURA

A cromatina é o complexo formado pelo DNA e pelas nucleoproteínas presentes no núcleo de células eucarióticas, que se associam a ele nos núcleos das células eucarióticas. A integridade da cromatina é essencial para a preservação da informação genética e para a regulação da expressão gênica (Beletti, 2013). No caso dos espermatozoides, a cromatina sofre um processo de compactação durante a espermatogênese, no qual as histonas são substituídas quase que totalmente por protaminas, conferindo maior compactação e também maior estabilidade e proteção ao DNA (Ausió et al., 2014; Bao e Bedford, 2016; Elango et al., 2022). No entanto, esse processo pode ser afetado por diversos fatores, como estresse oxidativo, infecções, exposição a agentes tóxicos ou radiações, entre outros, levando à fragmentação do DNA espermático. Um limite de 30% de espermatozoides com danos de cromatina é estabelecido para determinar a infertilidade. A fragmentação do DNA espermático está associada à redução da fertilidade, da taxa de implantação embrionária, do desenvolvimento fetal e do sucesso das técnicas de reprodução assistida (Juris Erenpreiss et al., 2001; Cortés-Gutiérrez et al., 2007; Aitken e Lewis, 2023; Montserrat Vallet-Buisan et al., 2023).

A Citometria de Fluxo é uma técnica com capacidade de análise multiparamétricas em células, e emergiu como uma ferramenta de vanguarda para avaliação da cromatina espermática. Sendo a técnica SCSA definida como padrão ouro para este tipo de análise. Esse equipamento permite a classificação de espermatozoides com base na integridade da cromatina, fornecendo resultados rápidos. O princípio básico deste equipamento é fazer com que as células ou partículas, previamente tratadas com uma sonda fluorescente, sejam sugadas por um capilar e passem individualmente por um laser que excita essa sonda e faz com que emita a fluorescência. Cada

sonda utilizada, a depender da célula, possui propriedades individuais, sendo que o laranja de acridina, por exemplo, se liga ao DNA de fita dupla ou simples e baseado nisso emitirá uma fluorescência verde ou vermelha, a qual será captada por canais (sensores). Através de reflexão dessa fluorescência e intensidade é possível obter dados de complexidade e tamanho da célula, além do comprimento de onda e intensidade de fluorescência, o qual são posteriormente interpretados baseado no ensaio utilizado. Para medir o conteúdo de DNA no núcleo dos espermatozoides são utilizados corantes nucleares como o laranja de acridina (LA) e iodeto de propídeo (IP), e assim permitindo a detecção de danos na cromatina, como por exemplo alterações na estrutura ou na estabilidade da cromatina, como fragmentação, desnaturação ou condensação anormal. Isso viabiliza a identificação de partidas de espermatozoides com maior potencial para fertilização e, conseqüentemente, otimiza o tempo e os recursos na seleção de garanhões para a reprodução. A vantagem da citometria de fluxo é que ela permite analisar um grande número de células em um curto período de tempo, fornecendo dados quantitativos (Evenson, 2012; Alves et al., 2015).

A técnica SCSA é um método para a detecção de danos no DNA espermático e alterações nas proteínas do núcleo espermático por meio da citometria de fluxo de espermatozoides corados com LA, sendo considerada uma técnica que eliminou o caráter subjetivo de outros ensaios que utilizam LA (Ortega López et al., 2010).

O princípio básico da SCSA é fazer com que os espermatozoides sejam submetidos a uma solução ácida que provoca a desnaturação do DNA nos locais de quebras ou descompactação. Em seguida, os espermatozoides são corados com LA, um corante fluorescente que se liga ao DNA simples ou duplo-filamento. O LA emite fluorescência verde quando se liga ao DNA duplo-filamento (DNA íntegro) e fluorescência vermelha quando se liga ao DNA simples-filamento (DNA desnaturado) (Evenson, 2016). O citômetro de fluxo permite quantificar a fluorescência emitida por cada célula e gerar gráficos representando a intensidade da fluorescência verde e a intensidade da fluorescência vermelha. A partir desse gráfico, é possível calcular o índice de fragmentação do DNA (DFI), que corresponde à porcentagem de células com fluorescência vermelha acima de um limiar pré-estabelecido (Evenson et al. 2020).

A SCSA fornece dois parâmetros principais para avaliar a cromatina espermática: o índice de fragmentação do DNA (DFI) e a alta dispersão da cromatina (HDS). O DFI representa a porcentagem de espermatozoides com DNA fragmentado em relação ao total de espermatozoides

analisados. O DFI representa a porcentagem de espermatozoides com baixa compactação da cromatina, indicando uma deficiência na substituição das histonas por protaminas durante a espermatogênese. O índice HIGR (High Green Fluorescence) é utilizado para avaliar o HDS. Ambos os parâmetros são calculados por software a partir dos dados de fluorescência verde e vermelha (Nagy et al., 2013; Evenson et al. 2020).

A SCSA tem sido utilizada para avaliar a qualidade do sêmen de garanhões utilizados como doadores em biotecnologias reprodutivas, como inseminação artificial e transferência de embriões. A SCSA tem demonstrado uma boa correlação entre o DFI e a fertilidade dos garanhões, sendo que valores elevados de DFI estão associados a uma redução nas taxas de fertilização, desenvolvimento embrionário e gestação. Além disso, a SCSA tem sido empregada para estudar os efeitos de fatores ambientais, genéticos, nutricionais, infecciosos ou iatrogênicos sobre a integridade do DNA espermático (Love e Kenney, 1999; Wach-Gygax et al., 2017).

O iodeto de propídio (IP) como marcador nuclear para análises de citometria foi primeiramente descrito por Nicoletti et al. (1991) com o objetivo de avaliar o nível de apoptose em timócitos, se demonstrando uma boa técnica. Esta técnica varia da SCSA ao utilizar o corante fluorescente IP em vez de LA para avaliar a cromatina espermática. O IP se liga ao DNA duplo-filamento, emitindo fluorescência vermelha. As células são submetidas a uma solução ácida e tensoativa com IP, que provoca a remoção e desnaturação do DNA, permitindo a ligação do corante e consequentemente a coloração. Após no mínimo uma hora, os espermatozoides são analisados por citometria de fluxo (Riccardi e Nicoletti, 2006).

A técnica descrita por Nicoletti fornece dois parâmetros principais para avaliar a cromatina espermática: o índice de descondensação do DNA (DDI) e o índice de fragmentação do DNA (DFI). O DDI representa a porcentagem de células com baixa compactação da cromatina, sendo que nos espermatozoides poderia indicar uma deficiência na substituição das histonas por protaminas durante a espermatogênese. O DFI representa a porcentagem de células com DNA fragmentado em relação ao total analisado. Ambos os parâmetros são calculados por software a partir dos dados de fluorescência vermelha (Gröbner et al., 2015).

A técnica descrita por Nicoletti tem sido utilizada para avaliar a fragmentação da cromatina de garanhões utilizados como doadores em biotecnologias reprodutivas, como inseminação artificial, transferência de embriões e fertilização in vitro (Kakasi et al., 2015). Esta técnica tem demonstrado uma boa correlação entre o DFI e a fertilidade, sendo que valores elevados de DFI

estão associados a uma redução nas taxas de fertilização, desenvolvimento embrionário e gestação. Além disso, a técnica descrita por Nicoletti tem sido empregada para estudar os efeitos de fatores ambientais, genéticos, nutricionais, infecciosos ou iatrogênicos sobre a integridade do DNA espermático (Gröbner et al., 2015).

Ambas as técnicas têm uma especificidade moderada, pois podem ser afetadas por fatores como a concentração e a viabilidade dos espermatozoides, o tempo e a temperatura de incubação com o corante, o tipo e a intensidade do laser e o ajuste dos filtros ópticos. A SCSA, utilizada como padrão ouro para avaliação de cromatina, possui baixa repetibilidade e alto custo, que restringem sua utilização na medicina veterinária (Beletti, 2013).

Objetivos específicos:

- a) Testar a utilização dessas duas técnicas com o sêmen equino, e demonstrar a aplicabilidade delas para a avaliação da cromatina espermática destes animais.
- b) Avaliar se existe correlação dos dois testes com a fertilidade do garanhão.

3. METODOLOGIA

3.1 Animais

Foram utilizadas 15 amostras de sêmen doadas de garanhões distintos, com idade entre três e quinze anos, peso entre 350 a 500kg e que estavam ativos durante a estação de monta. Os garanhões eram mantidos em manejo de baia, com área de 5x5m e alimentação de concentrado fornecidos 4 vezes ao dia, e soltos nos finais de semana em pasto Tifton (*Cynodon dactylon*), com água e sal mineralizado prontamente disponível, além disso eram situados em dois haras distintos da cidade de Uberlândia – Minas Gerais - Brasil.

3.2 Éguas

Todas as 15 partidas coletadas foram utilizadas para inseminar éguas que estavam ativas na rotina de reprodução, com útero saudável, livre de infecções e ciclos regulares. As éguas estavam em manejo rotacionado de pasto, suplementadas com sal mineralizado e água prontamente disponível.

3.3 Obtenção e processamento das amostras

As coletas foram realizadas com uso de manequim e vagina artificial (Botupharma®). A época de coleta foi durante as estações de monta, entre agosto de 2023 e maio de 2025. O sêmen foi entregue na diluição de 2:1 com BotuSÊMEN, resfriado e armazenado com caixas BotuFLEX® (Botupharma®). Todos os procedimentos foram realizados de acordo com aprovação da Comissão de Ética na Utilização de Animais (CEUA - UFU, PARECER Nº 33/2023/CEUA/PROPP/REITO) da Universidade Federal de Uberlândia. Todas as amostras de sêmen avaliadas foram utilizadas para inseminação de pelo menos uma égua. Após a realização da inseminação, foi confirmada a prenhez das éguas com até 14 dias de inseminadas.

3.4 Citômetro de Fluxo

As amostras foram todas analisadas em um mesmo citômetro de fluxo, CytoFLEX (Beckman Coulter), com no máximo 24 horas após a coleta, conforme é utilizado na rotina prática do Médico Veterinário. Todas as amostras foram padronizadas para 20.000 eventos.

3.5 Análise SCSA

As amostras foram centrifugadas com PBS 1X na proporção 1:1 a 400G, por três minutos, três vezes seguidas, para diminuir a quantidade de partículas e sujidades indesejadas. Foram utilizadas as seguintes soluções: tampão TNE (0.01 M Tris-HCl, 0.15 M NaCl, 1 mm EDTA), solução detergente ácido pH 1,2 (0,08 N HCl, 0.15M NaCl, 0.1% Triton-X 100), solução de LA tamponado para coloração pH 6,0 (0,1 M ácido cítrico, 0,2 M Na₂PO₄, 1 mm EDTA, 0,15 M NaCl) e solução estoque de LA, protegida em papel alumínio (Laranja de Acridina 0,1%). Todas

as soluções foram preparadas e estocadas previamente às análises. No dia das análises foram colocadas pequenas porções de TNE, LA e detergente ácido em tubos eppendorf 2,0 mL. Foi preparada uma solução diluindo a solução de coloração com o corante LA na proporção 9 μ L de LA para 1,5 mL da solução para coloração, cobrindo o eppendorf com papel alumínio. Na última centrifugação o sobrenadante foi descartado, e então foi adicionado 1,5 mL de tampão TNE. Para análise foram realizados os seguintes tratamentos: o controle, onde foi feita a análise da amostra com tampão TNE, sem corante e sem detergente ácido; o tratamento 1 (T1) sem detergente ácido, consistindo em 0,5 mL de sêmen + TNE adicionados 150 μ L de LA e feita a análise após 150 segundos; o tratamento 2 (T2) com detergente ácido em tempo curto, consistindo em 0,5 mL de sêmen + TNE adicionados 50 μ L de detergente ácido e após 30 segundos foi adicionado 150 μ L de LA, sendo feita a citometria após 150 segundos; e o tratamento 3 (T3) que consistia em detergente ácido em tempo longo, onde em 0,5 mL de sêmen + TNE foram adicionados 50 μ L de detergente ácido, e após 5 minutos foi adicionado 150 μ L de LA, sendo a citometria feita após 150 segundos também. Os dados foram gravados nos canais FITC-A (525/40) e ECD (585/42), e foram posteriormente analisados através de um software (CytoExpert).

Para as análises de SCSA (Sperm Chromatin Structure Assay) foram primeiramente criados histogramas de dispersão utilizando os parâmetros Foward Scatter (FSC) e Side Scatter (SSC) da citometria, gerando um histograma FSC x 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 (Figura 1). Posteriormente, a partir desta seleção, foi criado um histograma de fluorescência utilizando os canais FITC-H para a coloração verde e ECD-A para a coloração vermelha, gerando um histograma de tamanho por complexidade. A partir deste gráfico o DFI era calculado criando um gate a partir das células com maior fluorescência vermelha (Figura 1).

3.6 Análise conforme descrito por Nicoletti

Foram utilizadas amostras contendo $1-2 \times 10^6$ células, colocadas em um Eppendorf contendo 1 mL de PBS e centrifugadas (400g/10 minutos). Após lavagem foram ressuspensas com 1 mL da solução de fluorocromo (preparada previamente) contendo: 0,1% de citrato sódico, 0,1% Triton X-100, 50 mg 1-1 de iodeto de propídio em água destilada. As amostras foram

encubadas em temperatura ambiente (20°C) por uma hora, e após esse prazo mensuradas no citômetro de fluxo. Foi registrada a intensidade da fluorescência do iodeto de propídio (Em FL3, 620 nm SP, em detector com escala logarítmica). A população espermática foi separada de outros eventos baseado na propriedade da dispersão da luz (FSC x SSC) e desta forma um histograma unidimensional FL3 foi gerado. Segundo Nicoletti et al. (1991) e Gröbner et al. (2015), a fragmentação do DNA é identificada pela diminuição da intensidade abaixo do principal pico de intensidade do iodeto de propídio.

Para as análises conforme descrito por Nicoletti, era utilizado o mesmo histograma FSC x SSC criado para o SCSA, utilizando a mesma seleção de eventos. A partir dessa seleção era gerado um gráfico de intensidade, utilizando o canal ECD-A para a coloração vermelha no eixo X e contagem de eventos para o eixo Y. Nas primeiras análises, denominadas Nicoletti 1, o DFI foi calculado conforme descrito por Riccardi e Nicoletti (2006), onde era criado um gate dos eventos à esquerda do segundo pico, que eram considerados como fragmentados (Figura 2). Foi observado que quando considerados todos os eventos aparecia claramente um segundo pico no gráfico de intensidade (Count x ECD-A), representando um conjunto de estruturas com maior intensidade de fluorescência. Foi então criado um segundo gate isolando estes eventos. Deste gate foram retirados dois valores: um considerando todos os eventos (Nicoletti 2) e outro considerando apenas os eventos selecionados no histograma FSC x SSC, quando teoricamente foi excluída a população de estruturas maiores que o tamanho normal de uma cabeça de espermatozoide (Nicoletti 3).

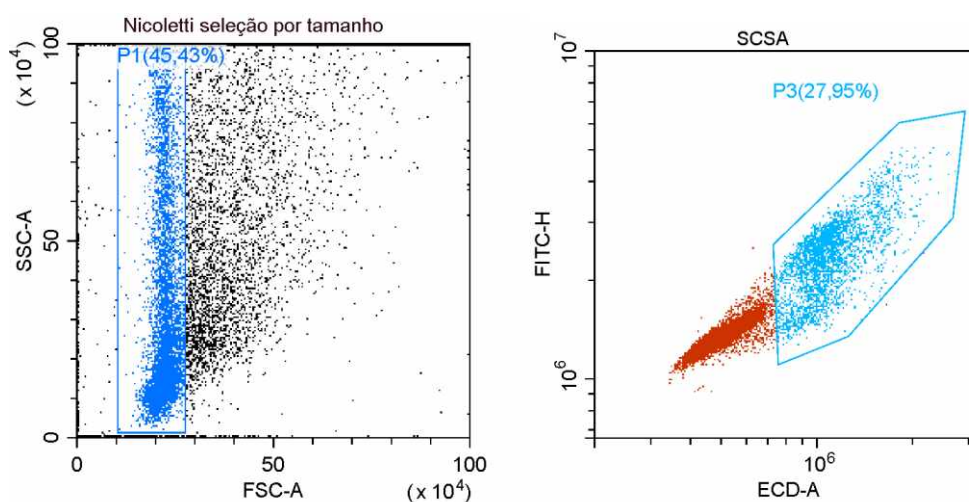


Figura 1 – À esquerda histograma de dispersão (FSC x SSC) de uma amostra, onde foi criado um gate (P1) selecionando os eventos de tamanho semelhante, assim diminuindo os eventos anormais para análise de DFI. À direita

o dot plot (ECD x FITC) que representa a técnica de SCSA, foi criado um gate selecionando os eventos com maior fluorescência vermelha (ECD-A) para geração do DFI (DFI = 27,95%).

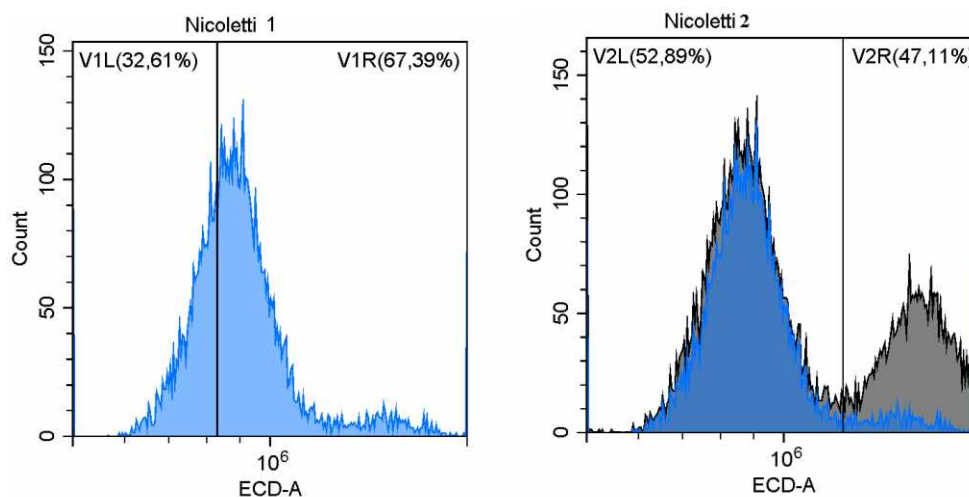


Figura 2 – Técnica descrita por Nicoletti. O gráfico da esquerda representa o gráfico de intensidade de fluorescência (ECD-A x contagem de eventos) para o teste Nicoletti 1, onde os eventos à esquerda do pico (V1L) eram considerados como DFI (DFI = 32,61%). O gráfico da direita representa o teste Nicoletti 2, onde foi gerado um gate à direita do pico de fluorescência, e os eventos V2R foram considerados como DFI (DFI = 47,11%).

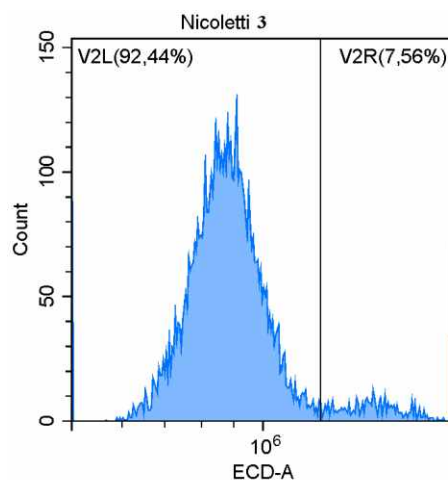


Figura 3 – Gráfico do teste Nicoletti 3, onde o mesmo gate criado em Nicoletti 2 era utilizado, porém apenas considerando os eventos de P1 que foram selecionados no histograma de dispersão FSC x SSC, os eventos à direita do gate eram considerados como DFI (DFI = 7,56%).

3.7 Análises complementares

Todas as amostras de sêmen também foram avaliadas quanto concentração, motilidade e vigor, segundo as avaliações tradicionalmente realizadas no espermograma de rotina (Hafez e Hafez, 2000).

3.8 Análise estatística

Os resultados foram obtidos utilizando-se os dois métodos para avaliação da cromatina espermática, bem como os resultados das avaliações de rotina. Todos os resultados foram correlacionados entre si e com os resultados de prenhez das éguas. Sendo os resultados de prenhez apenas qualitativos, foi utilizado o teste de correlação não paramétrico de Spearman. Com os coeficientes de correlação foi possível determinar qual método de avaliação de sêmen tem maior importância para determinar a fertilidade do sêmen de garanhão.

4. RESULTADOS

A tabela 1 mostra os resultados de todas as análises realizadas.

Tabela 1: Resultados das avaliações realizadas em cada uma das 15 amostras de sêmen

Amostra	Nicoletti 1 (DFI%)	Nicoletti 2 (DFI%)	Nicoletti 3 (DFI%)	SCSA (DFI%)	Prenhez	Vigor	Motilidade (%)	Concentração (milhões/ml)
1	32,0	31,1	10,8	40,7	sim	4	80	224
2	17,9	17,3	7,2	13,3	sim	3	55	407
3	22,8	33,0	7,3	24,0	sim	4	90	502
4	32,7	11,2	2,8	7,4	sim	4	80	342
5	18,1	45,5	10,9	29,6	não	4	65	204
6	21,4	19,0	4,0	9,5	não	4	85	272
7	26,6	18,7	4,9	7,3	sim	4	80	433
8	31,7	20,3	6,0	6,9	não	4	80	267
9	34,8	21,8	5,6	15	sim	4	80	267
10	47,2	37,8	8,2	12,5	sim	4	85	242
11	37,1	32,1	12,3	23,2	não	4	70	363
12	28,6	32,2	11,2	19,4	sim	4	70	152
13	28,9	21,8	9,0	17,4	sim	3	40	259
14	32,6	47,1	7,6	28	sim	4	65	330
15	31,9	27,8	9,5	14,7	sim	3	70	125

A tabela 2 mostra os coeficientes de correlação de Spearman (r) entre cada uma das avaliações realizadas.

Tabela 2: Coeficiente de correlação (r) do teste de Spearman entre todas as variáveis avaliadas.

	Nicoletti 1	Nicoletti 2	Nicoletti 3	SCSA	Prenhez	Vigor	Motilidade	Concentração
Nicoletti 1	1,00							
Nicoletti 2	0,20	1,00						
Nicoletti 3	0,11	0,68*	1,00					
SCSA	0,00	0,73*	0,70*	1,00				
Prenhez	0,17	-0,03	-0,10	0,07	1,00			
Vigor	0,27	0,29	-0,12	0,08	-0,30	1,00		
Motilidade	0,19	-0,07	-0,44	-0,31	-0,04	0,59	1,00	
Concentração	-0,14	-0,35	-0,53	-0,24	0,02	0,15	0,23	1,00

* representa os valores de r significativos ($p < 0,05$)

Observando a tabela 2 pode-se verificar que existiu apenas correlação significativa entre SCSA e Nicoletti 2, SCSA e Nicoletti 3 e entre Nicoletti 2 e 3. Importante salientar que não houve correlação significativa entre a prenhez e qualquer uma das avaliações do sêmen.

5. DISCUSSÃO

Hoje com o avanço das biotecnologias da reprodução, a avaliação da cromatina espermática em garanhões é uma ferramenta que se demonstra essencial para a seleção de animais geneticamente superiores. A cromatina espermática, ao contrário de células somáticas, é extremamente compactada e estabilizada por meio da substituição das histonas por protaminas, formando uma estrutura altamente condensada e resistente. Essa compactação é fundamental para a proteção do material genético durante o transporte pelo trato reprodutivo masculino e, posteriormente, durante a fecundação. No entanto, alterações nesse processo de compactação, como a substituição incompleta das histonas por protaminas, a presença de quebras no DNA ou a

desorganização estrutural da cromatina, podem ocorrer e assim comprometer a fertilidade do animal, mesmo em amostras de sêmen com boa morfologia e motilidade. Sendo assim, a análise da integridade desta estrutura pode ser fundamental para identificar possíveis danos no material genético, que podem afetar a fertilidade do animal e a viabilidade do embrião. Estudos em humanos demonstram que danos na cromatina afetam diretamente as taxas de sucesso para ICSI e FIV (Larson-Cook et al., 2003). No presente trabalho não houve correlação significativa com alterações da cromatina em nenhum dos métodos utilizados. Isso provavelmente deve ter ocorrido devido ao pequeno número de amostras e a boa qualidade do sêmen de todas as amostras.

A técnica conhecida como “Sperm Chromatin Structure Assay” (SCSA), proposta por Evenson (2019) se destaca como a mais consolidada para a análise da integridade da cromatina espermática. Ela é baseada na desnaturação controlada do DNA por meio de um tratamento ácido e posterior coloração com o corante laranja de acridina (AO), a técnica permite que o citômetro de fluxo diferencie células com DNA intacto daquelas com cromatina fragmentada. O laranja de acridina se liga ao DNA e, dependendo do grau de desnaturação, emite fluorescência verde ou vermelha. Assim, é possível quantificar a proporção de espermatozoides com cromatina danificada, sendo essa proporção denominada DNA Fragmentation Index (DFI). Este método é consagrado pela repetibilidade e a rapidez da análise, que tornaram o SCSA uma técnica atrativa, principalmente para análise de garanhões que apresentam problemas de fertilidade. No entanto, no presente trabalho não apresentou correlação significativa com a prenhez.

Já a técnica descrita por Nicoletti, embora inicialmente desenvolvida para a detecção de apoptose em células somáticas, vem sendo utilizada para a avaliação da cromatina espermática (Kakasi et al., 2015). Metodologicamente, essa técnica baseia-se na coloração do DNA celular com iodeto de propídio (PI), um corante fluorescente que se liga fortemente ao ácido nucleico, intercalando entre as bases nitrogenadas do DNA. Teoricamente, células com integridade cromatínica preservada apresentam padrão de fluorescência estável e previsível, enquanto células com DNA fragmentado, resultado de quebras na cromatina, exibem fluorescências variadas e diminuídas, devido à maior permeabilidade na membrana que permite que parte do núcleo seja perdido. O citômetro de fluxo, ao registrar essa fluorescência, permite a identificação e a quantificação das populações celulares com diferentes graus de fluorescência, podendo gerar uma medida de DFI. Diferentemente do SCSA, que exige tratamento ácido prévio e uso de laranja de

acridina, a técnica de Nicoletti apresenta um protocolo mais simples, com menor número de etapas e menor custo operacional, podendo ser uma alternativa viável, especialmente para laboratórios que dispõem de infraestrutura limitada.

Como explicado anteriormente, na metodologia proposta por Nicolletti (2006) devem ser consideradas as células de menor fluorescência como fragmentadas, que seriam os eventos à esquerda do pico principal no histograma de frequência de intensidade de fluorescência. Este comportamento estaria relacionado ao fato de que parte do DNA fragmentado seria perdido, e como o iodeto de propídio estabelece uma relação muito forte com o DNA, ocasionaria menor fluorescência dentro da célula. Porém a correlação observada utilizando esta metodologia não foi significativa com relação ao SCSA ($R = 0$). Por outro lado, quando considerada as células à direita do pico de contagem, foi observada uma correlação significativa positiva entre as análises de cromatina espermática realizadas pelo método de Nicoletti e pelo método padrão ouro, SCSA, sendo r de 0,73 para Nicoletti 2 e 0,70 para o Nicoletti 3. Portanto, ao contrário do que vem sendo considerado em outros trabalhos (Kakasi et al., 2015), o segundo pico à esquerda do pico principal do histograma de frequência de intensidade de fluorescência, não equivale às alterações de cromatina identificado pelo SCSA. Esta inconsistência pode ser explicada pela origem do teste de Nicoletti, que foi idealizado para avaliação de apoptose em células somáticas (timócitos) (Nicoletti et al., 1991). A cromatina das células somáticas é fracamente compactada, o que permite a perda de conteúdo nuclear (DNA) durante o período de incubação. Já os espermatozoides possuem cromatina altamente condensada pela protamina e, mesmo quando alterada, não deve ocorrer perda de conteúdo (DNA) nuclear durante o período de incubação do teste de Nicoletti. Essas afirmações são corroboradas pelos métodos de coloração com azul de toluidina (AT) e a reação de Feulgen.

Segundo Beletti e Mello (2004), a hidrólise ácida utilizada na coloração com AT e na reação de Feulgen não leva a perda de DNA, mas aumenta a acessibilidade dos corantes em espermatozoides com cromatina alterada (menos condensada), fazendo com que estes espermatozoides se coram mais intensamente. Portanto, provavelmente, é o que ocorre no método de Nicoletti durante o período de incubação. Isso sugere que a avaliação da cromatina espermática por meio do método de Nicolletti deve ser adaptada para abranger essas especificidades, a fim de fornecer resultados mais precisos e relevantes para a avaliação da fertilidade em garanhões.

Os valores maiores apresentados no Nicoletti 2 em relação ao 3 podem estar relacionados ao fato de que, como dito por Beletti e Mello (2004), espermatozoides com alterações (descompactação) de cromatina grave possuem cabeças mais volumosas. Como no Nicoletti 3 são excluídos os eventos com maior volume, essas cabeças não são consideradas.

O principal achado do presente trabalho foi a constatação de que a técnica de Nicoletti apresentou uma correlação mais significativa com o SCSA quando os eventos de alta fluorescência utilizando-se iodeto de propídio foram interpretados como indicativos de células com cromatina fragmentada. Esse resultado sugere que a metodologia de análise deste método para cromatina espermática deve ser alterada. Nós sugerimos que quanto maior o grau de fragmentação e desnaturação, maior a penetração e ligação do corante, resultando em sinais de fluorescência mais intensos. Isso indica que ajustes na análise estatística e nos parâmetros de interpretação da técnica de Nicoletti podem aprimorar sua sensibilidade e especificidade, tornando-a próxima ao SCSA em termos de acurácia diagnóstica.

6. CONCLUSÃO

Diante dos achados deste estudo, propõe-se que a técnica de Nicoletti seja reestruturada metodologicamente, especialmente no que se refere à definição dos eventos fluorescentes considerados relevantes. A recomendação é que, ao invés de considerar os eventos menos fluorescentes como indicativos de fragmentação, os eventos de maior fluorescência sejam considerados. Essa abordagem poderia melhorar a correlação com outras técnicas, como o SCSA, e também expandir o potencial diagnóstico da metodologia, oferecendo uma ferramenta acessível e com boa repetibilidade. Necessitam, ainda, mais estudos para que este comportamento de DFI observado na técnica proposta seja comprovado.

7. 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, n. 8, 19 out. 2023. Acesso em: 29 out. 2023.

ALLEN, W. R.; WILSHER, S. Half a century of equine reproduction research and application: A veterinary tour de force. **Equine Veterinary Journal**, v. 50, n. 1, p. 10–21, 3 nov. 2017. Acesso em: 30 out. 2023.

ALVES, M. B. R.; OLIVEIRA, M. L.; LANÇONI, R.; FLOREZ-RODRIGUEZ, S. A.; CELEGHINI, E. C. C.; ARRUDA, R. P.; ANDRADE, A. F. C. Investigando a fragmentação não induzida e a susceptibilidade à fragmentação do DNA espermático: refinamento da avaliação espermática. Parte 2. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 39, n. 3, p. 309–314, set. 2015.

AUSIÓ, J.; GONZÁLEZ-ROMERO, R.; WOODCOCK, C. L. Comparative structure of vertebrate sperm chromatin. **Journal of Structural Biology**, v. 188, n. 2, p. 142–155, nov. 2014.

BAO, J.; BEDFORD, M. T. Epigenetic regulation of the histone-to-protamine transition during spermiogenesis. **Reproduction**, v. 151, n. 5, p. R55–R70, maio 2016.

BELETTI, M. E. Cromatina espermática: quebrando paradigmas. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 37, n. 2, p. 92–96, jun. 2013. Disponível em: <www.cbpa.org.br>. Acesso em: 30 out. 2023.

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.

CORTÉS-GUTIÉRREZ, E. I.; DÁVILA-RODRÍGUEZ, M. I.; LÓPEZ-FERNÁNDEZ, C.; JOSÉ LUÍS FERNÁNDEZ; J. GOSÁLVEZ. Evaluación del daño en el DNA espermático. **Actas Urológicas Españolas**, v. 31, n. 2, p. 120–131, 1 jan. 2007. Acesso em: 30 out. 2023.

ELANGO, K.; KUMARESAN, A.; TALLURI, T. R.; RAVAL, K.; PAUL, N.; PETER, E. S. K. J.; SINHA, M. K.; PATIL, S.; VERMA, A. Impact of sperm protamine on semen quality and fertility. **Journal of Reproductive Healthcare and Medicine**, v. 3, 20 jul. 2022. Acesso em: 1 nov. 2022.

EVENSON, D. P. Sperm Chromatin Structure Assay (SCSA®). **Methods in Molecular Biology**, v. 927, p. 147–164, 9 ago. 2012.

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, jun. 2016. Acesso em: 24 maio. 2019.

EVENSON, D. P.; DJIRA, G.; KASPERSON, K.; CHRISTIANSON, J. Relationships between the age of 25,445 men attending infertility clinics and sperm chromatin structure assay (SCSA®) defined sperm DNA and chromatin integrity. **Fertility and Sterility**, v. 114, n. 2, p. 311–320, ago. 2020.

GRÖBNER, S.; FRANZ, M.; HOBERG, U.; B. WETZKA; SCHWEIZER, T. Flow cytometric detection of subhaploid nuclei in human sperm as a measure of dna fragmentation and apoptosis. **Journal of Biological Regulators & Homeostatic Agents**, v. 29, n. 2, p. 317–26, 1 jul. 2015. Acesso em: 30 out. 2023.

HÉCTOR NAVA-TRUJILLO; QUINTERO-MORENO, A.; ADIRMO HERNÁNDEZ-FERNÁNDEZ; OSORIO-MELENDEZ, C. Espermatozoides con cromatina dañada e inmadura en semen criopreservado de toros Brahman. **Revista científica**, v. 26, n. 1, p. 20–25, 12 abr. 2016. Acesso em: 30 out. 2023.

JURIS ĒRENPREISS; BARS, J.; VIKA LIPATNIKOVA; JEKATERINA ĒRENPREISA; JĀNIS ZAĻKALNS. Comparative study of cytochemical tests for sperm chromatin integrity. **Journal of Andrology**, v. 22, n. 1, p. 45–53, 24 fev. 2001. Acesso em: 30 out. 2023.

KAKASI, B.; NAGY, S.; PÁL, L.; CZIMBER, G.; 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, 1 mar. 2015.

LARSON-COOK, K. L.; BRANNIAN, J. D.; HANSEN, K. A.; KASPERSON, K. M.; AAMOLD, E. T.; EVENSON, D. P. Relationship between the outcomes of assisted reproductive techniques and sperm DNA fragmentation as measured by the sperm chromatin structure assay. **Fertility and Sterility**, v. 80, n. 4, p. 895–902, out. 2003.

LOVE, C. C.; KENNEY, R. M. Scrotal Heat Stress Induces Altered Sperm Chromatin Structure Associated with a Decrease in Protamine Disulfide Bonding in the Stallion. **Biology of Reproduction**, v. 60, n. 3, p. 615–620, 1 mar. 1999. Acesso em: 30 out. 2023.

MONTSERRAT VALLET-BUISAN; MECCA, R.; JONES, C.; COWARD, K.; YESTE, M. Contribution of semen to early embryo development: fertilization and beyond. **Human Reproduction Update**, v. 29, n. 4, p. 395–433, 7 mar. 2023. Acesso em: 25 out. 2023.

NAGY, S.; JOHANNISSON, A.; WAHLSTEN, T.; IJÄS, R.; ANDERSSON, M.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Sperm chromatin structure and sperm morphology: Their association with fertility in AI-dairy Ayrshire sires. **Theriogenology**, v. 79, n. 8, p. 1153–1161, maio 2013.

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, n. 2, p. 271–279, jun. 1991.

ORTEGA LÓPEZ, L.; VILA, E. O.; DOMÍNGUEZ, P. L.; SEGOVIA, A. G.; GÓMEZ, I. O.; CALONGE, R. N.; PEREGRÍN, P. C. Comparación entre el test de fragmentación de ADN espermático mediante la técnica de SCD y el índice de vitalidad medida con el test de naranja de acridina. **Revista Internacional de Andrología**, v. 8, n. 3, p. 114–121, jul. 2010.

RICCARDI, C.; NICOLETTI, I. Analysis of apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. **Nature protocols**, v. 1, n. 3, p. 1458–61, 2006.

SQUIRES, E. Current Reproductive Technologies Impacting Equine Embryo Production. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 89, p. 102981, mar. 2020.

TAHA, E. A.; EZ-ALDIN, A. M.; SAYED, S. K.; GHANDOUR, N. M.; MOSTAFA, T. Effect of Smoking on Sperm Vitality, DNA Integrity, Seminal Oxidative Stress, Zinc in Fertile Men. **Urology**, v. 80, n. 4, p. 822–825, 1 out. 2012.

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, 18 ago. 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, set. 2017.