

## AVALIAÇÃO DA CROMATINA ESPERMÁTICA EM EQUINOS COM AZUL DE TOLUIDINA E “ACRIDINE ORANGE”

### *EVALUATION OF EQUINE SPERMATIC CHROMATIN WITH TOLUIDINE BLUE AND ACRIDINE ORANGE*

*Christiana Savastano NAVES<sup>1</sup>; Marcelo Emílio BELETTI<sup>2</sup>; Marcelo Barbanti DUARTE<sup>3</sup>; Rogério Chaves VIEIRA<sup>4</sup>; Elmo Gomes DINIZ<sup>4</sup>; José Octávio JACOMINI<sup>4</sup>*

**RESUMO:** Este trabalho teve por objetivo verificar a eficácia das colorações Azul de Toluidina (AT) e “Acridine Orange” (AO) na avaliação das anomalias no complexo DNA-proteína de sêmen equino. Foram utilizados 20 ejaculados de diferentes garanhões, de 3 a 12 anos, férteis, em sua maioria das raças Quarto de Milha, “Paint Horse” e Puro Sangue Inglês. As análises das anomalias foram efetuadas em microscopia de luz (1000x) e de fluorescência (400x) para AT e AO, respectivamente, com 10 repetições de cada coloração, diferenciando-se 1000 espermatozoides por lâmina. Os exames das morfologias espermáticas foram realizados em microscopia com contraste de fase, registrando-se defeitos de acrossomo (DA), formas teratológicas (FT), algumas anomalias de cabeça: piriforme (CP), subdesenvolvida (CS), contorno anormal (CCA), pequena anormal (CPA), isolada normal (CIN) e isolada patológica (CIP), bem como o total destes defeitos (TD), contando-se 200 espermatozoides por lâmina. As porcentagens médias de espermatozoides com alterações na condensação da cromatina verificadas com AT (6,18%) e AO (3,27%) diferiram ( $P < 0,05$ ). Observaram-se correlações ( $P < 0,05$ ) entre AT x TD ( $r = 0,49$ ), AT x DA ( $r = 0,67$ ), AT x CP ( $r = 0,70$ ) e AT x AO ( $r = 0,55$ ). Pode-se inferir que AT e AO são eficazes na identificação de anomalias no complexo DNA-proteína em espermatozoides de equinos, podendo ser utilizadas como técnicas complementares de avaliação seminal.

**UNITERMOS:** Espermatozoide, Cromatina, Garanhão, Fertilidade.

### INTRODUÇÃO

A fertilidade nos animais domésticos, determinada pela taxa de prenhez/ciclo, varia de 50 a 80% (DAVID, BISHOP, CEMBROWICS, 1971; HUNTER, 1977; POLGE, 1978), com a maioria das perdas de prenhez ocorrendo após a fertilização e anterior à terceira semana de gestação (BALL et al., 1989; DUARTE, VIEIRA, SILVA, 2002; ROCHE, 1986). Do ponto de vista de Love e Kenney (1998), muito embora o mecanismo exato da morte embrionária precoce seja desconhecido, a deposição de cromatina espermática anormal no oócito pode ser, provavelmente, uma causa relevante.

Proteínas nucleares associadas com DNA constituem a cromatina espermática, a qual é muito mais compacta que a verificada nos núcleos de células somáticas e de células da espermatoogênese, como espermatoogônias, espermátocitos

e espermátides redondas (EVENSON, DARZYNKEIWICZ, MELAMED, 1980). O marcado grau de compactação da cromatina espermática proporciona proteção e manutenção à integridade do DNA, tornando-o mais resistente à mutações e estresses ambientais, de tal modo que a fertilização do oócito e descondensação da cromatina possam ocorrer normalmente. Alterações na cromatina podem afetar a taxa de descondensação da mesma, fenômeno que parece ser espécie-específico podendo estar relacionado com o tipo de protamina presente e extensões das ligações dissulfeto (PERREAULT et al., 1988).

Muitas das características dos espermatozoides relacionam-se com a fertilidade, por exemplo, motilidade, alterações morfológicas e funcionalidade do acrossomo (ACOSTA et al., 1988; LINFORD et al., 1976; UWLAND, 1984). Em garanhões, a fertilidade tem sido associada com a morfologia espermática (JASKO, LEIN, FOOTE, 1990)

<sup>1</sup> Médica Veterinária, Mestranda do Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Produção Animal, Universidade Federal de Uberlândia.

<sup>2</sup> Professor Doutor do Instituto de Ciências Biomédicas. Universidade Federal de Uberlândia.

<sup>3</sup> Médico Veterinário, Mestre, Autônomo.

<sup>4</sup> Professor Doutor da Faculdade de Medicina Veterinária. Universidade Federal de Uberlândia.

e motilidade (JASKO et al., 1992). A técnica de citometria de fluxo, chamada “sperm chromatin structure assay” (SCSA), vem sendo usada para avaliar *in vitro* a susceptibilidade do DNA à desnaturação em touros (BALLACHEY, HOHENBOKEN, EVENSON, 1987; KARABINUS et al., 1990), cachacos (EVENSON, THOMPSON, JOST, 1994), homens (EVENSON, DARZYNKEIWICZ, MELAMED, 1980) e garanhões (KENNEY et al., 1995; LOVE; KENNEY, 1998). Por outro lado, falhas no complexo DNA-proteína podem ser investigadas por técnicas mais simples, como por exemplo colorações de fluorescência com “acridine orange” (AO) (TEJADA et al., 1984), e “metacromasia induzida” com azul de toluidina (AT) (BELETTI; MELLO, 1996; MELLO, 1982).

O método denominado de “metacromasia induzida” é baseado no tratamento ácido (HCl 4N a 25 °C) seguido de coloração com AT a pH 4,0, na qual há uma larga variedade de tonalidades expressadas conforme a disponibilidade e proximidade de grupos fosfato do DNA não ligados à proteína, aptos a ligarem moléculas do corante (BELETTI, 1992). Por sua vez, o teste com fluorocromo AO é um método citoquímico que permite a diferenciação entre fita dupla e simples do DNA devido às propriedades metacromáticas desse corante (ICHIMURA, 1975; RIGLER et al., 1969), cujas moléculas se intercalam entre as bases nitrogenadas do DNA nativo não desnaturado (fluorescência verde-amarelada) ou se ligam aos grupos fosfato no DNA desnaturado (fluorescência vermelho-alaranjada) (MELLO, 1982; PRETORIUS; KRUGER, 1990).

Este trabalho teve como objetivo verificar a eficácia das colorações AT e AO na avaliação da cromatina espermática de garanhões.

## MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados 20 garanhões, em sua maioria das raças Quarto de Milha, “Paint Horse” e Puro Sangue Inglês, com idades entre 3 e 12 anos. Os animais foram considerados férteis, sem histórico prévio de subfertilidade em programas de monta natural. As colheitas de sêmen (1 ejaculado / animal) foram efetuadas por meio de vagina artificial, com auxílio de égua em cio.

Para avaliação da morfologia espermática, adicionou-se 0,5 ml de sêmen fresco a 1,0 ml de solução de citrato de sódio formolada a 4% (WEITZE, 1977), retirando-se desta uma gota para preparação úmida entre lâmina e lamínula. Efetuou-se a contagem diferencial de 200 células, obedecendo-se às recomendações do Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA, 1998), em microscópio de contraste de fase (ZEISS Standard 20, aumento 1000x), registrando-se os valores em porcentagem. Considerou-se,

para efeito desta investigação, apenas os percentuais de formas teratológicas (FT), defeitos de acrossomo (DA), algumas anomalias de cabeça: piriforme (CP), subdesenvolvida (CS), contorno anormal (CCA), pequena anormal (CPA), isolada normal (CIN) e isolada patológica (CIP), bem como o total desses defeitos (TD).

Com objetivo de processar as colorações AO e AT foram confeccionados, logo após as colheitas de sêmen, 20 esfregaços em lâminas para microscopia (76 x 26 mm), compreendendo 10 repetições/coloração, secos em temperatura ambiente e encaminhados ao Laboratório de Histologia da Universidade Federal de Uberlândia. Efetuou-se a fixação dos esfregaços mergulhando-os por um minuto em solução de etanol-ácido acético 3:1 (Carnoy's), seguido de lavagem em etanol a 70% durante 3 minutos (BELETTI; MELLO, 1996).

A coloração com AO foi baseada na técnica proposta por Tejada et al. (1984) que consiste, inicialmente, no preparo de uma solução estoque (1 g de AO diluído em 1000 ml de água destilada). A solução corante foi preparada adicionando-se 10 ml da solução estoque a 40 ml de ácido cítrico 0,1 M e 2,5 ml de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O 0,3 M. O pH final desta solução foi de 2,5 com concentração de 0,19 mg/ml. Os esfregaços foram cobertos com 4 ml da solução corante por 5 minutos, seguido de lavagem com água destilada corrente e secagem em temperatura ambiente. Contaram-se, aleatoriamente, 1000 células em microscópio de fluorescência (Polyvar, Reichert-Jung) com filtro de excitação azul e aumento de 400x, por no máximo 40 segundos por campo, determinando-se a porcentagem de espermatozoides com DNA nuclear desnaturado. Células com condensação alterada da cromatina apresentam fluorescência vermelho-alaranjada e as normais, com cromatina íntegra, fluorescem em verde-amarelado (Figura 1).

A metodologia seguida na coloração com AT foi a descrita por Mello (1982), porém com diminuição no tempo de hidrólise ácida (HCl 4N) de 10 a 30 minutos para 5. A solução do corante foi preparada tomando-se AT 0,0025g / 100ml de água destilada, ácido cítrico 0,1 M e Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,2M (tampão de Mc Ilvaine; pH 4,0) conforme Mello e Vidal (1980). Após hidrólise, lavagem com água destilada corrente e secagem em temperatura ambiente, procedeu-se a coloração do esfregaço utilizando uma gota de solução do corante entre lâmina e lamínula (BELETTI; MELLO, 1997). Foram avaliados 1000 espermatozoides ao acaso, em microscópio de luz (Polyvar, Reichert-Jung; aumento 1000x), estabelecendo a porcentagem de células com metacromasia nuclear. Neste método, células normais coram-se em azul claro, enquanto aquelas com anomalias na condensação de cromatina coram-se de azul escuro a violeta, fenômeno este denominado de metacromasia (Figura 2).

Para as análises estatísticas as médias dos defeitos espermáticos e de espermatozoides com cromatina alterada foram comparadas por meio do teste t de Student. Utilizou-se o coeficiente de correlação linear de Pearson para

verificar possíveis associações entre os defeitos espermáticos e anormalidades no complexo DNA-proteína. Para efeito de significância considerou-se  $P < 0,05$ .

**Figura 1.** Esfregação de sêmen eqüino corado com “Acridine Orange”. Setas indicam espermatozoides com DNA nuclear desnaturado (aumento 400x).

**Figura 2.** Esfregação de sêmen eqüino tratado com HCl 4N por 5 minutos e corado com Azul de Toluidina. Setas indicam espermatozoides metacromáticos (aumento 1000x).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

As porcentagens médias de espermatozoides com alterações na cromatina detectadas por AT e AO foram de 6,18% e 3,27%, respectivamente ( $P < 0,05$ ; Tabela 1). Dado que os animais investigados eram férteis, esses valores podem ser considerados baixos, ainda que superiores aos relatados por Machado (2002) em búfalos de 3,05% e 1,60% para AT e AO, respectivamente. No trabalho de Rocha et al. (2002), em humanos, seguindo essa mesma seqüência de colorações, os valores encontrados foram de 71,88% e 24,33%, enquanto que Machado et al. (2003), em suínos, relataram 11,68% e 2,82%. Tais diferenças devem-se, provavelmente, à heterogeneidade da cromatina espermática existente entre espécies, mensurada pela extensão da desnaturação do DNA nuclear espermático *in situ* (EVENSON, DARZYNKEWICZ, MELAMED, 1980).

A superioridade de AT em relação à AO sugere ser esta coloração mais sensível na identificação de alterações no complexo DNA-proteína em espermatozoides de eqüinos, concordando com o observado em sêmen de humanos (ROCHA et al., 2002), bubalinos (MACHADO, 2002) e de suínos (MACHADO et al., 2003). Do ponto de vista de Rocha et al. (2002), alterações mais leves são identificadas com AT provavelmente pelo fato dos espermatozoides apresentarem metacromasia com proporção menor de moléculas desse corante ligadas ao complexo DNA-proteína.

Verificaram-se diferenças ( $P < 0,05$ ) entre as médias de AT x AO; AT x DA; AT x FT; AT x CP; AT x CS; AT x CCA; AT x CPA; AT x CIP; AT x CIN; AO x TD; AO x DA; AO x FT; AO x CP; AO x CS; AO x CCA; AO x CPA e AO x CIP (Tabela 1). A diferença entre AT x AO pode ser explicada pelo fato das colorações detectarem fatores distintos que contribuem para a heterogeneidade da estrutura da cromatina ou seja, enquanto AT detecta a quantidade de grupos fosfato livres, AO detecta a proporção de fitas simples e duplas do DNA. Vale ressaltar que o tratamento químico com HCl 4N, utilizado na coloração de AT, pode ter contribuído na detecção de maior porcentagem de anormalidades na estrutura da cromatina espermática.

Na Tabela 1, pode-se visualizar os coeficientes de correlação ( $r$ ) entre os defeitos espermáticos e as colorações utilizadas. Constataram-se correlações ( $P < 0,05$ ) entre AT x TD ( $r = 0,49$ ), AT x DA ( $r = 0,66$ ) e AT x CP ( $r = 0,70$ ). A correlação ( $r = 0,49$ ) entre AT x TD justifica-se pela alta afinidade desse corante com alterações da cromatina. Neste sentido, sabe-se que durante a espermiogênese as espermátides diferenciam-se em espermatozoides e concomitantemente com mudanças morfológicas observam-se modificações na organização e composição da cromatina, sendo as histonas substituídas por protaminas (GLEDHILL et al., 1966; McPHERSON; LONGO, 1993; RISLEY,

EINHEBER, BUMCROT, 1986). Ao contrário, foi constatada correlação não significativa ( $r = 0,11$ ) entre AO x TD, corroborando relatos de Dobrinski, Hugues e Barth (1994), segundo o qual alterações na condensação da cromatina podem ocorrer na ausência de defeitos morfológicos ou mesmo sem o aumento desses.

Verificou-se correlação entre AT x AO ( $r = 0,55$ ;  $P < 0,05$ ), concordando com o observado por Machado (2002) em espermatozoides de búfalos. Não obstante, Machado et al. (2003) utilizaram ambas colorações para avaliar a integridade da cromatina em espermatozoides de suínos, não encontrando correlação significativa entre os métodos. Isto evidencia a necessidade de cautela quando do uso dessas colorações no exame seminal de diferentes espécies.

A coloração de esfregaços com AO e exame em microscopia de fluorescência é um método simples de avaliação da cromatina espermática quando comparado ao citômetro de fluxo, porém sua interpretação é mais subjetiva. No trabalho de Love e Kenney (1998), no qual utilizaram esta última técnica, foi encontrado índice de 16% de espermatozoides com alterações na cromatina, proporcionando os ganhões, entretanto, taxa de prenhez de 89%. Segundo esses autores, nos eqüinos o número de células espermáticas anormais pode ser maior que nos bovinos sem prejuízos à fertilidade. Assim, quando comparado aos resultados desses autores, o percentual de células com anomalias detectadas no presente experimento com AO (3,27%; Tabela 1) pode ser considerado normal para os padrões de sêmen eqüino.

Ainda em relação à AO, os esfregaços mostraram-se irregulares, apresentando campos em que as porcentagens de espermatozoides verde-amarelados e vermelho-alaranjados variaram amplamente. No início do esfregaço houve concentração intensa de espermatozoides verde-amarelados comparado ao final do mesmo, não permitindo contagem segura neste ponto. Deste modo, a leitura foi realizada do meio para o final dos esfregaços.

No trabalho de Mello (1982), em touros, o tempo de hidrólise ácida para indução da metacromasia, previamente à coloração com AT, foi de 10 a 30 minutos, enquanto que neste experimento tal tempo foi reduzido para 5 minutos. Essa modificação foi efetuada pelo fato de que ao submeter-se os esfregaços ao tratamento químico por mais de 5 minutos, todas as células coravam-se em violeta, não sendo possível diferenciar espermatozoides anômalos de normais. A partir do trabalho de Mello (1982), alterações no tempo de hidrólise ácida têm sido investigada por outros autores. Costa e Beletti (1996), em humanos, utilizaram hidrólise por 3 minutos, enquanto que Rocha et al. (2002), também em humanos, não utilizaram este tratamento químico. Por seu turno, Machado (2002), em bubalinos, utilizaram hidrólise por 15 minutos, ao passo que Machado et al. (2003), em suínos, estabeleceram o tempo de 8 minutos. O pequeno

tempo de hidrólise utilizado neste trabalho, necessário para indução da metacromasia, indica que os espermatozoides de eqüinos possuem cromatina pouco compactada quando

comparada aos de bovinos, suínos e bubalinos, porém mais compactada que os de humanos.

**Tabela 1.** Comparação entre porcentagens médias de anomalias do complexo DNA-proteína e defeitos espermáticos em sêmen de garanhões por meio do teste t e correlação linear (r).

G1 x G2	G1 (n=20)		G2 (n=20)		Valores de r
	Médias ± Desvios padrão		Médias ± Desvios padrão		
AT x AO	6,18 ± 3,90 <sup>a</sup>		3,27 ± 2,87 <sup>b</sup>		0,55*
AT x DA	6,18 ± 3,90 <sup>a</sup>		1,45 ± 1,66 <sup>b</sup>		0,66*
AT x FT	6,18 ± 3,90 <sup>a</sup>		0,37 ± 0,53 <sup>b</sup>		-0,38
AT x CP	6,18 ± 3,90 <sup>a</sup>		0,02 ± 0,11 <sup>b</sup>		0,70*
AT x CS	6,18 ± 3,90 <sup>a</sup>		0,02 ± 0,11 <sup>b</sup>		-0,01
AT x CCA	6,18 ± 3,90 <sup>a</sup>		0,95 ± 0,99 <sup>b</sup>		0,04
AT x CPA	6,18 ± 3,90 <sup>a</sup>		1,62 ± 1,62 <sup>b</sup>		0,44
AT x CIP	6,18 ± 3,90 <sup>a</sup>		0,67 ± 0,89 <sup>b</sup>		0,37
AT x CIN	6,18 ± 3,90 <sup>a</sup>		2,17 ± 2,17 <sup>b</sup>		0,16
AT x TD	6,18 ± 3,90		7,30 ± 4,92		0,49*
AO x DA	3,27 ± 2,87 <sup>a</sup>		1,40 ± 1,66 <sup>b</sup>		0,07
AO x FT	3,27 ± 2,87 <sup>a</sup>		0,37 ± 0,53 <sup>b</sup>		-0,15
AO x CP	3,27 ± 2,87 <sup>a</sup>		0,02 ± 0,11 <sup>b</sup>		0,28
AO x CS	3,27 ± 2,87 <sup>a</sup>		0,02 ± 0,11 <sup>b</sup>		0,01
AO x CCA	3,27 ± 2,87 <sup>a</sup>		0,95 ± 0,99 <sup>b</sup>		0,13
AO x CPA	3,27 ± 2,87 <sup>a</sup>		1,62 ± 1,62 <sup>b</sup>		0,24
AO x CIP	3,27 ± 2,87 <sup>a</sup>		0,67 ± 0,89 <sup>b</sup>		-0,04
AO x CIN	3,27 ± 2,87		2,17 ± 2,17		-0,01
AO x TD	3,27 ± 2,87 <sup>a</sup>		7,30 ± 4,92 <sup>b</sup>		0,11

G1 = anomalias do complexo DNA-proteína detectadas por AT e AO.

G2 = defeitos morfológicos.

n = número de garanhões.

AT = Azul de Toluidina; AO = "Acridine Orange"; DA = Defeitos de Acrossomo; FT = Formas Teratológicas; CP = Cabeça Piriforme; CS = Cabeça Subdesenvolvida; CCA = Cabeça com Contorno Anormal; CPA = Cabeça Pequena Anormal; CIP = Cabeça Isolada Patológica; CIN = Cabeça Isolada Normal; TD = Total de Defeitos.

(<sup>a,b</sup>) Letras distintas na mesma linha diferem ( $P < 0,05$ ).

\* Correlação significativa em nível de 5% de probabilidade.

## CONCLUSÕES

Em garanhões férteis, é baixa a incidência de alterações na condensação da cromatina espermática.

A incidência de alterações da cromatina foi maior nas amostras coradas com AT, indicando ser esta coloração mais sensível na detecção de anomalias do complexo DNA-proteína em espermatozoides de eqüinos.

**ABSTRACT:** The aim of this work was to verify the efficacy of Toluidine Blue (TB) and Acridine Orange (AO) stains to assessment of abnormal DNA-protein complexes in the equine semen. Twenty different semen samples from 3 to 12 years old fertile stallions, mostly Quarter Horse, Paint Horse and Thoroughbred races were collected. The analysis were carried out in light microscopy (1000x) and fluorescence microscopy (400x) to TB and AO respectively, with ten repetitions for each method, counting 1000 spermatozoa per smear. The examination of sperm morphology was carried out in phase contrast microscopy there being recorded acrosome defects (AD), teratologic forms (TF), the following head anomalies: pyriform head (PH), microcephalic head (MH), abnormal head shape (AHS), small abnormal head (SAH), normal detached heads (NDH), pathologic detached heads (PDH). The total of defects (TD) were verified counting 200 spermatozoa per smear. The average percentage of spermatid chromatin alterations to TB and AO obtained was 6.18 and 3.27% ( $P < 0.05$ ), respectively. Correlations ( $P < 0.05$ ) between TB x TD ( $r = 0.49$ ), TB x AD ( $r = 0.67$ ), TB x PH ( $r = 0.70$ ) and TB x AO ( $r = 0.55$ ) were found. Thus, it can be inferred that TB and AO are effective in identifying DNA-

protein complex anomalies in equine spermatic chromatin, and may be utilized as complementary techniques in semen evaluation.

**UNITERMS:** Sperm, Chromatin, Stallion, Fertility.

---

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACOSTA, A. A.; OEHNINGER, S.; MORSHEDI, M.; SWANSON, R. J.; SCOTT, R.; IRIANNI, F. Assisted reproduction in the diagnosis and treatment of male factor. **Obstetrical & Gynecological Survey**, Baltimore, v. 44, p. 1-18, 1988.

BALL, B. A.; LITTLE, T. V.; WEBER, J. A.; WOODS, G. L. Survival of day-4 embryos from young normal mares and aged subfertile mares after transfer to normal recipient mares. **Journal of Reproduction and Fertility**, Cambridge, v. 85, p. 187-194, 1989.

BALLACHEY, B. E.; HOHENBOKEN, W. D.; EVENSON, D. P. Heterogeneity of sperm nuclear chromatin structure and its relationship to bull fertility. **Biology of Reproduction**, Madison, v. 36, n. 4, p. 915-925, 1987.

BELETTI, M. E. **Anomalias em complexo DNA-Proteína de espermatozóides de touro:** contribuição metodológica. 1992. 45 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular) – Universidade de Campinas, Campinas, 1992.

BELETTI, M. E.; MELLO, M. L. S. Methodological variants contributing to detection of abnormal DNA-protein complexes in bull spermatozoa. **Brazilian Journal of Genetics**, Ribeirão Preto, v. 19, n. 1, p. 97-103, 1996.

BELETTI, M. E.; MELLO, M. L. S. Testicular and semen alteration after three days of experimental cryptorchidism in rabbit. **Brazilian Journal of Morphological Sciences**, Campinas, v. 14, p. 88, 1997.

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

COSTA, E. N.; BELETTI, M. E. Detecção de anomalias do complexo DNA-proteína em espermatozóides humanos através do método de metacromasia induzida. **Revista do Centro de Ciências Biomédicas da UFU**, Uberlândia, v. 12, n. 1, p. 27-32, 1996.

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

DOBRINSKI, I.; HUGUES, H. P. A.; BARTH, A. D. Flow cytometric and microscopic evaluation and effect on fertility of abnormal chromatin condensation in bovine sperm nuclei. **Journal of Reproduction and Fertility**, Cambridge, v. 101, n. 3, p. 531-538, 1994.

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

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

EVENSON, D. P.; THOMPSON, L.; JOST, L. Flow cytometric evaluation of boar semen by the sperm chromatin structure assay as related to cryopreservation and fertility. **Theriogenology**, New York, v. 41, n. 3, p. 637-651, 1994.

GLEDHILL, B. L.; GLEDHILL, M. P.; RIGLER, R. J.; RINGERTZ, N. R. Atypical changes of deoxyribonucleoprotein during spermiogenesis associated with a case of infertility in the bull. **Journal of Reproduction and Fertility**, Cambridge, v. 12, p. 575-578, 1966.

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

ICHIMURA, S. Differences in the red fluorescence of Acridine Orange bound to single stranded RNA and DNA. **Biopolymers**, New York, v. 14, p. 1033-1047, 1975.

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

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

KARABINUS, D. S.; EVENSON, D. P.; JOST, L. K.; BAER, R. K. Comparison of semen quality in young and mature Holstein bulls measured by light microscopy and flow cytometry. **Animal Science**, Lothian, v. 73, p. 2364-2371, 1990.

KENNEY, R. M.; EVENSON, D. P.; GARCIA, M. C.; LOVE, C. C. Relationship between sperm chromatin structure, motility, and morphology of ejaculated sperm and seasonal pregnancy rate. *Biology of Reproduction Monography Series 1*. **Equine Reproduction**, Madison, v. 6, p. 647-653, 1995.

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

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

MACHADO, M. M. **Condensação da Cromatina em Espermatozoides de Búfalos (*Bubalus bubalis*)**. 2002. 22 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2002.

MACHADO, E. R.; KAMIMURA, C. F.; BELETTI, M. E.; JACOMINI, J. O. Diagnóstico de alterações na compactação da cromatina em espermatozoides de suíno através de azul de toluidina e alaranjado de acridina. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 27, n. 3, p. 381-382, 2003.

McPHERSON, S.; LONGO, F. J. Chromatin structure-function alterations during mammalian spermatogenesis: DNA nicking and repair in elongating spermatids. **European Journal of Histochemistry**, Pavia, v. 37, p. 109-128, 1993.

MELLO, M. L. S. Induced metachromasia in bull spermatozoa. **Histochemistry**, Heidelberg, v. 74, p. 387-392, Mar., 1982.

MELLO, M. L. S.; VIDAL, B. C. Métodos: In: MELLO, M. L. S.; VIDAL, B. C. **Práticas de biologia celular**. São Paulo: Edgard Blucher, 1980. p. 57-69.

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. **Biology of Reproduction**, Madison, v. 39, p. 157-167, 1988.

- POLGE, C. Fertilization in pig and horse. **Journal of Reproduction and Fertility**, Cambridge, v. 54, p. 461-470, 1978.
- PRETORIUS, E.; KRUGER, T. Fluorochrome acridine orange test. In: ACOSTA, A. A.; SWANSON, R. J.; ACKERMAN, S. B.; KRUGER, T. F.; VAN ZYL, J. A.; MENDVELD, R. (Ed.). **Human spermatozoa in assisted reproduction**. Baltimore: Williams & Wilkins, 1990, p. 233.
- RIGLER, R.; KILLANDER, D.; BOHIND, S.; RINGERTZ, N. R. Cytochemical characterization of desoxyribonuclein in individual cell nuclei. **Experimental Cell Research**, San Diego, v. 55, p. 215-224, 1969.
- RISLEY, M. S.; EINHEBER, S.; BUMCROT, D. A. Changes in DNA topology during spermatogenesis. **Chromosoma**, Martinsried, v. 94, p. 217-227, 1986.
- ROCHA, H. L. O. G.; BELETTI, M. E.; MARCOLINI, T. T.; AMORIM, D.A.Z. Uso de laranja de acridina e azul de toluidina na avaliação da fertilidade masculina. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v. 18, n. 1, p. 65-77, Jun., 2002.
- ROCHE, J. F. Early embryonic loss in cattle. In: MORROW, E. (Ed.). **Current therapy in theriogenology**. 2. ed. Philadelphia: Saunders, 1986. 200 p.
- 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**, Birmingham, v. 42, n. 1, p. 87-91, Jul., 1984.
- UWLAND, J. Possibilities and limitations of semen evaluation for the prognosis of male fertility. In: COUROT, M. (Ed.). **The male in farm animal reproduction**. Boston: Martinus Nijhoff, Oct., 1984.
- WEITZE, K. F. **Untersuchungen zur Tiefgefrierkonservierung von Kaninchensperma**. 1977. 165 f. Tese (Livre-Docência) – Tierärztliche Hochschule Hannover, Hannover, 1977.