



## Investigando a compactação e a fragmentação não induzida do DNA espermático: refinamento da avaliação espermática – parte 1

*Investigating condensation and not induced fragmentation of sperm DNA:  
Refinement of sperm evaluation – first part*

M.B.R. Alves<sup>1</sup>, M.L. Oliveira<sup>2</sup>, R. Lançoni<sup>3</sup>, S.A. Florez-Rodriguez<sup>1</sup>, E.C.C. Celeghini<sup>1</sup>, R.P. Arruda<sup>3</sup>,  
A.F.C. Andrade<sup>4,5</sup>

<sup>1</sup>Laboratório de Pesquisa e Ensino em Patologia da Reprodução Animal, Departamento de Reprodução Animal, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brasil.

<sup>2</sup>Laboratório de Fisiologia e Endocrinologia Molecular, Departamento de Reprodução Animal, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brasil.

<sup>3</sup>Laboratório de Biotecnologia do Sêmen e Andrologia, Departamento de Reprodução Animal, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brasil.

<sup>4</sup>Laboratório de Andrologia e Tecnologia de Embriões Suínos, Departamento de Reprodução Animal, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, Pirassununga, SP.

<sup>5</sup>Correspondência: andrefc@usp.br

### Resumo

O DNA espermático possui papel essencial na reprodução, visto que danos no material genético podem prejudicar os processos de fecundação e desenvolvimento embrionário. Ademais, há evidências de que danos ao DNA podem ser causados por alterações epigenéticas. Entretanto, embora ainda não seja aplicada nas avaliações andrológicas de rotina, faz-se essencial a avaliação do *status* de integridade do DNA espermático. Existem diversas técnicas de avaliação com diferentes princípios e objetivos. A aplicação destas irá depender dos equipamentos disponíveis, do treinamento da equipe e das respostas a serem obtidas. Ainda, para a interpretação dos resultados obtidos, é necessário o conhecimento do princípio de análise de cada técnica. Assim, a presente revisão, dividida em duas partes, tem por objetivo abordar diferentes técnicas de avaliação. As técnicas abordadas na parte 1 estão relacionadas às avaliações de compactação da cromatina (azul de toluidina, azul de anilina e cromomicina A3) e à avaliação direta da fragmentação de DNA (ensaio Cometa e teste de dispersão da cromatina modificado). Na parte 2, serão abordadas as técnicas de TUNEL, laranja de acridina e “*Sperm Chromatin Structure Assay*” (SCSA). Nesta revisão, serão abordados os princípios dos testes e a interpretação dos resultados baseados na literatura e nas pesquisas do grupo.

**Palavras-chave:** cometa, cromatina, fertilidade, integridade, técnicas.

### Abstract

*Sperm DNA has an important role on reproduction. Injuries in genetic material can impair the fertilization processes and embryonic development. Furthermore, there is evidence that DNA damage can be caused by epigenetic alterations. Although DNA evaluation in sperm analysis routine assessments is essential, it is not yet performed. There are numerous techniques of DNA evaluation with different principles and objectives. Application of these techniques will depend on the equipment available, the staff training and answers to be required. To interpret the results, however, knowledge of each analysis technique is required. Therefore, this review, divided in two parts, aims to consider different techniques. The techniques that will be considered throughout the first part of review are: toluidine blue, aniline blue, A3 chromomycin, Comet assay and dispersion test of modified chromatin. In the second part, it will be approached TUNEL, acridine orange and Sperm Chromatin Structure Assay (SCSA) techniques. We will discuss the testes and the main results based on literature and researches of our group.*

**Keywords:** chromatin, cometa, fertility, integrity, technique.

### Introdução

O potencial de fertilidade do macho pode ser determinado com base na análise do sêmen, por meio de um conjunto de avaliações, entre elas estão as avaliações de motilidade, morfologia, atividade metabólica e integridade das membranas espermáticas (Arruda et al., 2011; Celeghini et al., 2007; Oliveira et al., 2014). No entanto, essas avaliações, feitas de maneira isolada, são ineficientes em prever a fertilidade. Nesse contexto, destaca-se o DNA, importante para a fecundação e o desenvolvimento embrionário e responsável pela transmissão das informações genéticas paternas.

A avaliação do DNA espermático pode ser feita por diversas técnicas: azul de toluidina, azul de anilina, cromomicina A3, ensaio Cometa, teste de dispersão da cromatina modificado, TUNEL, laranja de acridina e SCSA (*Sperm Chromatin Structure Assay*). Entretanto, estas não são rotineiramente empregadas devido ao alto custo, à laboriosidade exigida pelos testes e ao desconhecimento do funcionamento delas. Dessa forma, esta revisão, dividida em duas partes, compila os principais testes de avaliação do DNA espermático: desde os testes mais simples até os mais sofisticados. Na revisão, serão abordados os princípios dos testes, os resultados obtidos e as interpretações deles, com a finalidade de tornar mais acessível a aplicação dessas técnicas nas avaliações espermáticas de rotina.

### Técnicas de avaliação da compactação do DNA espermático

O DNA espermático, diferentemente do DNA de células somáticas, está ligado a proteínas chamadas protaminas. A substituição das histonas por protaminas ocorre durante o processo de protaminação. Neste, são formadas estruturas denominadas toroides, que permitem que o DNA espermático alcance compactação 10 vezes maior do que o DNA de uma célula somática (Miller et al., 2010). No entanto, a deficiência de protaminas faz com que o DNA fique mais susceptível à fragmentação (De Iuliis et al., 2009). Existem técnicas que avaliam o processo de protaminação, entre elas estão o azul de toluidina, o azul de anilina e a cromomicina A3, que são abordadas a seguir.

#### Técnica de azul de toluidina (AT)

A técnica de azul de toluidina (AT), também chamada de metacromasia induzida, é bastante antiga, sendo relatada por Mello no ano de 1982. Possui a vantagem de ser uma técnica simples, sensível e prática (Erenpreiss et al., 2001). Esta se baseia na susceptibilidade dos grupos fosfatos livres de DNA espermático e não ligados a protaminas em se ligarem aos corantes básicos (Shamsi et al., 2011). Assim, quanto mais grupos fosfatos livres, mais corado ficará o DNA: espermatozoides corados em azul-claro têm condensação normal da cromatina; a variação de azul-claro para azul-escuro denota aqueles que são moderadamente descondensados; de azul-escuro até violeta, aqueles altamente descondensados, como mostrado na Fig. 1 (Beletti et al., 2005; Florez-Rodriguez, 2013; Florez-Rodriguez et al., 2014).

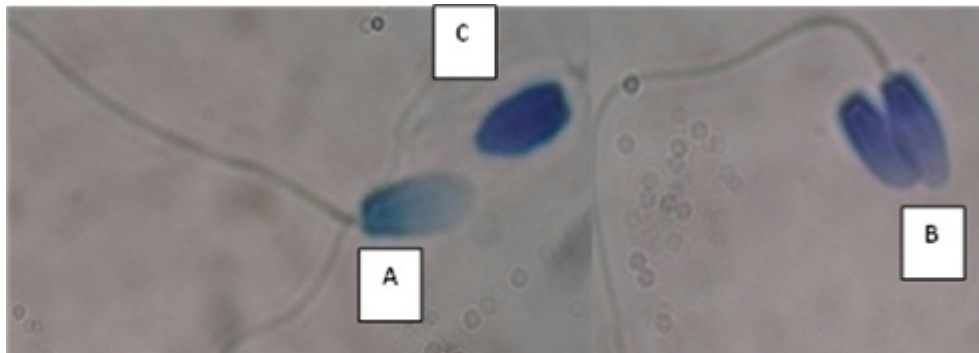


Figura 1. Espermatozoides equinos corados com o azul de toluidina. Em **A** está indicada célula com cromatina normal, em **B** as células com cromatina moderadamente descondensada e em **C** célula com cromatina altamente descondensada (Florez-Rodriguez, 2014).

Em espermatozoides humanos, o AT tem sido usado como um teste sensível para análise de DNA (Kim et al., 2013). Em touros, a avaliação da cromatina espermática pelo AT também tem apresentado relação com a fertilidade (Oliveira et al., 2012). Em lhamas, a técnica de AT mostrou susceptibilidade dos espermatozoides à refrigeração (Carretero et al., 2011). A técnica para espermatozoides caprinos é confiável, apresentando-se mais sensível que a técnica de laranja de acridina. Já para espermatozoides ovinos, em razão de apresentarem repetitividade muito baixa, a técnica não é indicada (Kamimura et al., 2010). O AT também foi aplicado em espermatozoides de coelhos (Beletti e Mello, 2004) e galos (Rodrigues et al., 2009). Em equinos, alterações na cromatina espermática avaliadas pelo AT foram de 6,18% e correlacionaram-se com anormalidades espermáticas totais, defeitos de acrossomo, cabeça piriforme e com os resultados do laranja de acridina (Naves et al., 2004). Em trabalho realizado pelo grupo, após o processo de refrigeração, a taxa de espermatozoides com alterações na cromatina espermática foi semelhante às avaliadas por Naves et al. (2004) (Florez-Rodriguez et al., 2014). Ainda nesta espécie, o AT mostrou que há aumento significativo na descondensação da cromatina de espermatozoides após o processo de criopreservação (Sardoy et al., 2008).



Por avaliar em tons de azul, a técnica apresenta-se subjetiva. Para contornar essa limitação, Beletti et al. (2005) desenvolveram um *software* que avalia os esfregaços corados com AT, tornando a avaliação mais objetiva. No entanto, apesar de ter muitos estudos com a técnica em diferentes espécies de animais domésticos, o AT ainda é pouco utilizado pelos profissionais de campo (Kamimura et al., 2010).

#### *Técnica de azul de anilina (AA)*

O azul de anilina (AA), descrito por Terquem e Dadoune (1983), é um método de coloração capaz de evidenciar a persistência das histonas no DNA espermático. Essa técnica é simples, barata e requer um microscópio de luz. O AA é um corante ácido que tem alta permeabilidade e afinidade para o aminoácido lisina. Esses aminoácidos estão presentes nas histonas. Espermatozoides não corados são considerados com pouca quantidade de histonas, enquanto espermatozoides parcialmente ou totalmente corados estão associados com deficiência no processo de protaminação (Shamsi et al., 2011).

Há poucos relatos na literatura com o uso desse teste em animais. Em amostras espermáticas com alta e baixa qualidade e congelabilidade de bovinos e bubalinos, a persistência de histonas detectada pelo teste foi menor que 10%. Embora tenha sido detectada diferença entre as amostras de qualidade e congelabilidade distintas pelo ensaio Cometa, não foi observado o mesmo fato pelo AA (Mukhopadhyay et al., 2011). Entretanto, o AA apresentou alta correlação negativa ( $r=-0.90$ ) com a fertilidade em touros (Oliveira et al., 2013). Dessa forma e ainda por ser uma técnica rápida e de baixo custo, o AA, assim como o AT, tem grande potencial em se tornar um procedimento de rotina para avaliação dos defeitos da cromatina.

#### *Técnica da cromomicina A3 (CMA3)*

O CMA3 liga-se reversivelmente aos pares de base guanina-citosina ocorrendo competição pelos mesmos sítios de ligação que as protaminas. Assim, quanto mais sítios livres, mais o CMA3 se ligará e corará a amostra, como mostrado na Fig. 2. Portanto, a técnica identifica aqueles espermatozoides que possuem persistência das histonas no DNA (Bianchi et al., 1993; Manicardi et al., 1995; Shamsi et al., 2011).

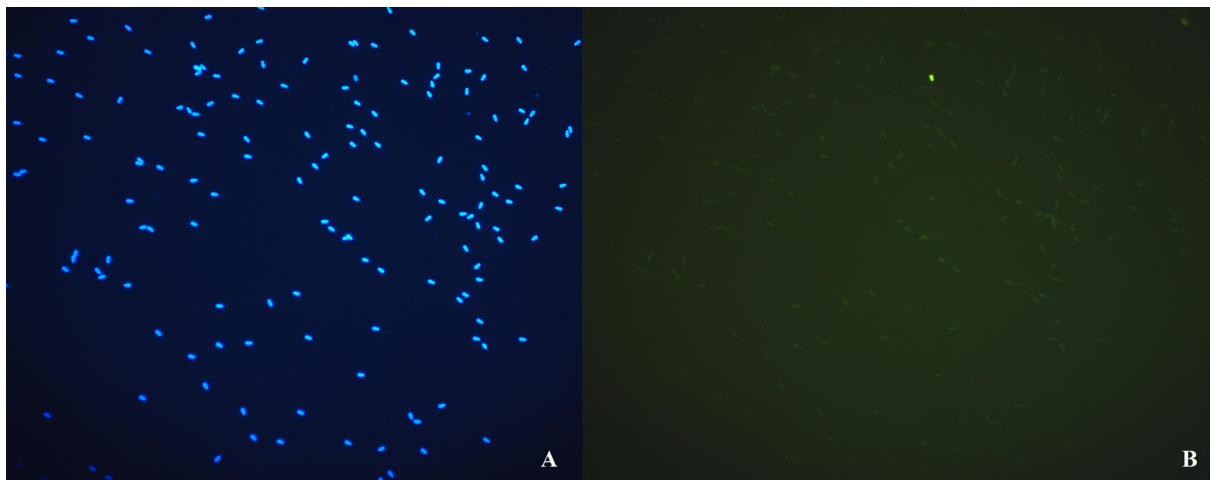


Figura 2. Espermatozoides bovinos corados com Hoescht 33342 e cromomicina A3 (CMA3). Em **A**, estão as células coradas com Hoescht 33342 para contagem do número total de células; em **B**, as células coradas com cromomicina A3, apresentando somente uma com persistência de histonas (Imagens cedidas gentilmente pela Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Renata Simões, da Universidade Federal do ABC).

O CMA3 emite fluorescência e, por muito tempo, foi utilizado por meio da microscopia de fluorescência (Franken et al., 1999). Pelo aumento da importância e pela maior aplicação da técnica, esta foi validada para a citometria de fluxo e aprimorada, sendo então utilizada combinada ao iodeto de propídio, o que permitiu a exclusão dos corpos apoptóticos (Tavalaee et al., 2010; Fathi et al., 2011).

São encontrados poucos estudos que utilizam essa técnica em espermatozoides de animais domésticos. Em espermatozoides de touros da raça Nelore, foi notado que estes não apresentavam problemas de falhas da protaminação (Simões et al., 2009). Ainda em touros, o CMA3 apresentou associação com o SCSA (Fortes et al., 2014). Em carneiros, baixas taxas de prenhez foram associadas com 4 a 9% de espermatozoides positivos ao CMA3 (Khalifa e Lymberopoulos, 2013). Dessa forma, mais estudos se fazem necessários para estabelecer a importância do CMA3 nas avaliações espermáticas dos animais domésticos. Acreditamos que, em casos de

disfunção da espermatogênese que provoquem a diminuição da fertilidade ou até mesmo a infertilidade, tal como ocorre na degeneração testicular, a avaliação espermática com CMA3 tenha grande relevância.

### Técnicas de avaliação direta da fragmentação de DNA espermático

As técnicas de avaliação direta da fragmentação do DNA espermático possuem grande importância, uma vez que verificam a fragmentação de DNA já presente no espermatozoide. Essas técnicas podem ser divididas em dois grupos: 1) fundamentado na prévia lise das membranas plasmática e nuclear com o objetivo de expor o DNA e realizar a marcação deste com sondas fluorescentes ou corantes (Donnelly et al., 2000); 2) fundamento na adição de nucleotídeos modificados e marcados com moléculas fluorescentes às fitas de DNA fragmentadas (Krayevsky et al., 2000).

O ensaio Cometa e o teste de dispersão da cromatina (SCD) modificado ou não são as técnicas mais conhecidas do primeiro grupo (Donnelly et al., 2000; Enciso et al., 2006). Neste grupo existe também a técnica com a sonda laranja de acridina que, com o SCSA e com a técnica de TUNEL, pertencente ao segundo grupo, será abordada na segunda parte desta revisão.

#### Ensaio cometa

O ensaio Cometa consiste basicamente na fixação das células espermáticas em gel de agarose e na submissão dessas células a soluções de lise, cujo objetivo é levar ao rompimento das membranas plasmática e nuclear e à exposição do DNA. As lâminas com os espermatozoides fixados e com o DNA disperso são colocadas em câmaras de eletroforese e submetidas a cargas. O DNA irá correr em direção a um dos polos e formará uma cauda, como mostrado na Fig. 3. Quanto mais DNA fragmentado, maior será a cauda formada, o que lembra um cometa e dá o nome à técnica (Donnelly et al., 2000).

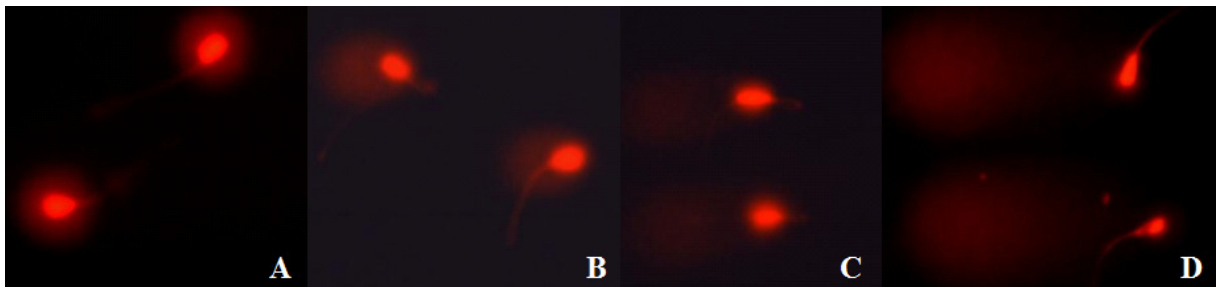


Figura 3. Espermatozoides bovinos submetidos ao ensaio Cometa Alcalino. Em **A**, células com núcleo bem corado e com halo ao redor do núcleo indicando pouca fragmentação de DNA. Em **B**, células com núcleo corado e pequena formação de cauda de Cometa indicando leve fragmentação do DNA. Em **C**, células com núcleo corado e cauda de Cometa bem evidente indicando moderada fragmentação do DNA. Em **D**, células com núcleo fracamente corado e com cauda de Cometa bem evidente indicando intensa fragmentação do DNA (Simões, 2010).

Os primeiros estudos com o ensaio Cometa em espermatozoides datam da década de 90 e foram realizados para verificar a validade desse ensaio em células espermáticas, uma vez que já era amplamente utilizado em células somáticas (Hughes et al., 1996; Hughes et al., 1997; Mckelvey-Martin et al., 1997). No primeiro estudo, Hughes et al. (1996) verificaram a susceptibilidade à fragmentação de DNA de espermatozoides de homens férteis com motilidade normal e de homens inférteis com motilidade normal e diminuída. Foi induzida a fragmentação de DNA espermático com diferentes doses de irradiação, utilizando-se o raio-X, e peróxido de hidrogênio, em diferentes concentrações. Assim, verificou-se que espermatozoides móveis de homens férteis eram mais resistentes à fragmentação de DNA do que espermatozoides com motilidade espermática normal ou diminuída de homens inférteis, sendo os espermatozoides de homens inférteis com motilidade diminuída mais susceptíveis ao peróxido de hidrogênio do que os inférteis com motilidade normal.

No ano seguinte, foi publicado um estudo que testou a reprodutibilidade da técnica Cometa em espermatozoides humanos. Nesse estudo, concluiu-se que a técnica possui baixo coeficiente de variação e, portanto, poderia ser utilizada para verificar a fragmentação de DNA espermático (Hughes et al., 1997). No mesmo ano, foi publicada pelo mesmo grupo de pesquisa uma revisão de literatura sobre a utilização da técnica como ferramenta para o diagnóstico de infertilidade em humanos (Mckelvey-Martin et al., 1997). Em 2000, Donnelly et al. (2000) associaram o ensaio com outra técnica utilizada para a verificação de fragmentação de DNA, o TUNEL. Nesse estudo, foi verificada correlação significativa ( $P < 0,001$ ) de 0,56 entre as duas técnicas (Donnelly et al., 2000). Todos esses estudos, no entanto, foram realizados com espermatozoides humanos.

Em animais, poucos estudos com o ensaio Cometa foram desenvolvidos. Simões (2010) padronizou a técnica para espermatozoides bovinos. No trabalho, não foi observada correlação entre a técnica e o SCSA. Ademais, foi necessária a adaptação da técnica para a espécie, pois o espermatozoide bovino parece possuir uma compactação do material genético muito maior que a encontrada em espermatozoides humanos (Simões, 2010). Os resultados com o ensaio Cometa em animais domésticos ainda são escassos e mostram que estes apresentam pouca fragmentação de DNA. Especula-se que isso ocorra pois há grande pressão de seleção para a fertilidade. Entretanto, a utilização da técnica em casos específicos, como na degeneração testicular ou na infertilidade de causa desconhecida, pode ser promissora. Além disso, novos estudos com células somáticas estão direcionando a associação do ensaio Cometa com a mensuração da suscetibilidade ao estresse oxidativo e com a hibridização *in situ* (Shaposhnikov et al., 2009; Collins, 2014).

#### *Teste de dispersão da cromatina modificado (SCD)*

O teste de dispersão da cromatina (SCD) também verifica a fragmentação de DNA de maneira direta. Quando realizado em meio ácido, haverá a desprotaminação, e, portanto, o DNA íntegro formará *loopings* em volta do espermatozoide, o que não ocorre com o DNA fragmentado (Enciso et al., 2006). Já quando processado sem ácido, não haverá a desprotaminação e, portanto, não haverá dispersão do DNA íntegro, ficando este contido no interior celular. Porém, neste caso o DNA fragmentado ficará disperso em volta da cabeça, formando um halo expressivo.

A técnica sem ácido, patenteada pelo grupo espanhol Halotech (Halotech DNA Madrid, Espanha), consiste na fixação dos espermatozoides em gel de agarose e na submissão deles a soluções de lise para a exposição do DNA. O espermatozoide com DNA fragmentado fica com um halo expressivo formado em volta da cabeça, enquanto o espermatozoide com DNA íntegro apresenta um halo muito pequeno em volta da cabeça, conforme ilustrado na Fig. 4 (Enciso et al., 2006).

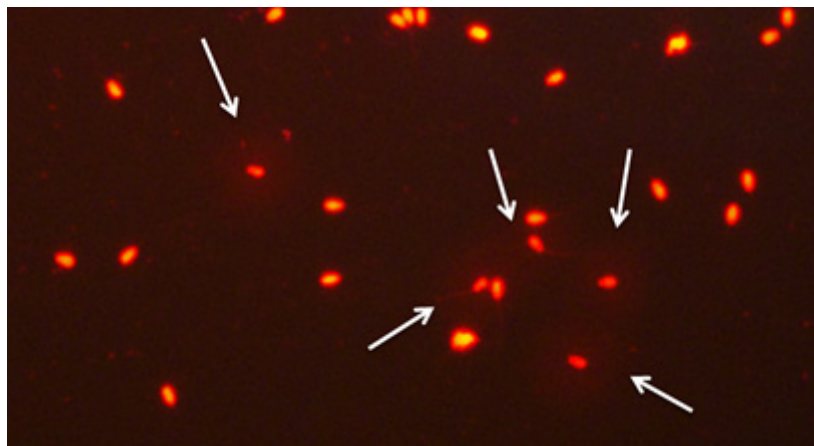


Figura 4. Espermatozoides ovinos submetidos à técnica SCD modificado com *kit* comercial Halomax<sup>®</sup> próprio para a espécie ovina (Halotech, Espanha). Nas setas estão indicados os espermatozoides com DNA fragmentado (Alves, 2014).

Os primeiros estudos com a técnica são muito recentes, e os resultados ainda são variáveis. Entretanto, foi mostrada correlação desta com o teste SCD clássico (com ácido) e com a técnica de hibridização fluorescente *in situ*, técnica FISH (Enciso et al., 2006). Por outro lado, outros estudos mostraram não haver correlação da técnica com o SCSA, mas as duas técnicas apresentaram correlação com a fertilidade. Essas duas técnicas avaliam diferentes aspectos da cromatina e, portanto, poderiam ser utilizadas em conjunto (García-Macias et al., 2007). Em estudo mais recente, foi mostrada correlação negativa ( $r=-0,26$ ;  $P=0,04$ ) entre as taxas de fragmentação detectadas pelo SCSA e a integridade de DNA verificada pelo SCD modificado (sem ácido) (Fortes et al., 2012). O grupo, em estudos recentes com carneiros, mediante a utilização da técnica de SCD modificado, mostrou que a taxa de fragmentação de DNA aumentou ( $P=0,0017$ ) após a insulação escrotal. Os carneiros foram submetidos à insulação com bolsas escrotais por 72h, sendo realizada a avaliação da fragmentação de DNA antes ( $1,10 \pm 0,28\%$ ) e após ( $8,50 \pm 2,20\%$ ) o estresse (Alves et al., 2015).

#### **Considerações finais**

As técnicas abordadas nesta primeira parte da revisão possuem diferentes formas de análise: azul de toluidina, azul de anilina e cromomicina A3 avaliam a protaminação do DNA espermático; já o Cometa e o SCD



modificado avaliam a fragmentação direta do DNA. A escolha da técnica a ser feita em determinada análise depende do objetivo a ser alcançado e das perguntas a serem respondidas. Assim, o conhecimento do princípio de cada técnica é essencial para esta ser aplicada da forma mais adequada. Entretanto, ainda são necessários mais estudos que correlacionem os resultados das diferentes técnicas abordadas com as taxas de fertilidade. Acreditamos que essas informações facilitarão a difusão dessas técnicas de avaliação de DNA na rotina dos laboratórios de análise de sêmen de animais domésticos.

### Referências

- Alves MBR.** Tratamento da degeneração testicular em carneiros com suplementação de vitamina A ou laserterapia de baixa intensidade. 2014. 184f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, São Paulo, 2014.
- Alves MBR, Andrade AFC, Arruda RP, Batissaco L, Florez-Rodriguez SA, Lançoni R, Oliveira BMM, Torres MA, Ravagnani GM, Almeida TM, Vellone VS, Celeghini ECC.** An Efficient Technique to Detect Sperm Reactive Oxygen Species: The CellRox Deep Red<sup>®</sup> Fluorescent Probe. *Biochem Physiol: Open Access*, v.4, p.1-5, 2015.
- Arruda RP, Celeghini ECC, Alonso MA, Carvalho HF, Oliveira LZ, Nascimento J.** Métodos de avaliação da morfologia e função espermática: momento atual e desafios futuros. *Rev Bras Reprod Anim*, v.35, p.145-151, 2011.
- Beletti ME, Costa LF, Guardieiro MM.** Morphometric features and chromatin condensation abnormalities evaluated by toluidine blue staining in bull spermatozoa. *Braz. J. morphol. Sci*, v.22, p.85-90, 2005.
- Beletti ME, Mello MLS.** Comparison between the toluidine blue stain and the Feulgen reaction for evaluation of rabbit sperm chromatin condensation and their relationship with sperm morphology. *Theriogenology*, v.62, p.398-402, 2004.
- Bianchi PG, Manicardi GC, Bizzaro D, Bianchi U, Sakkas D.** Effect of deoxyribonucleic acid protamination on fluorochrome staining and in situ nick-translation of murine and human mature spermatozoa. *Biol Reprod*, v.49, p.1083-1088, 1993.
- Carretero MI, Giuliano SM, Casaretto CI, Gambarotta MC, Neild DM.** Evaluation of the effect of cooling and of the addition of collagenase on llama sperm DNA using toluidine blue. *Andrologia*, v.44, p.239-247, 2011.
- Celeghini EC, Arruda RP, Andrade AFC, Nascimento J, Raphael CF.** Practical techniques for bovine sperm simultaneous fluorimetric assessment of plasma, acrosomal and mitochondrial membranes. *Reprod Domest Anim*, v.42, p.479-488, 2007.
- Collins AR.** Measuring oxidative damage to DNA and its repair with the comet assay. *Biochim Biophys Acta*, v.1840, p.794-800, 2014.
- De Iuliis GN, Thomson LK, Mitchell LA, Finnie JM, Koppers AJ, Hedges A, Nixon B, Aitken RJ.** DNA damage in human spermatozoa is highly correlated with the efficiency of chromatin remodeling and the formation of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine, a marker of oxidative stress. *Biol Reprod*, v.81, p.517-524, 2009.
- Donnelly ET, O'Connell M, McClure N, Lewis SE.** Differences in nuclear DNA fragmentation and mitochondrial integrity of semen and prepared human spermatozoa. *Hum Reprod*, v.15, p.1552-1561, 2000.
- Enciso M, López-Fernández C, Fernández JL, García P, Gosálbez A, Gosálvez J.** A new method to analyze boar sperm DNA fragmentation under bright-field or fluorescence microscopy. *Theriogenology*, v.65, p.308-316, 2006.
- Erenpreiss J, Bars J, Lipatnikova V, Erenpreisa J, Janis Z.** Comparative Study of Cytochemical Tests for Sperm Chromatin Integrity. *J Androl*, v.22, p.45-53, 2001.
- Fathi Z, Tavalae M, Kiani A, Deemeh M, Modaresi M, Nasr-Esfahani M.** Flow Cytometry: A novel approach for indirect assessment of protamine deficiency by CMA3 staining, taking into account the presence of M540 or apoptotic bodies. *Int J Fertil Steril*, v.5, p.128-133, 2011.
- Florez-Rodriguez SA.** Efeitos de diferentes diluidores sobre a cinética, membranas, morfologia e cromatina espermática durante a refrigeração de sêmen equino. 2013. 100f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Pirassununga, 2013.
- Florez-Rodriguez SA, de Arruda RP, Alves MBR, Affonso FJ, Carvalho HF, Lemes KM, Lançoni R, Andrade AFC, Celeghini ECC.** Morphofunctional characterization of cooled sperm with different extenders to use in equine-assisted reproduction. *J Equine Vet Sci*, p.911-917, 2014.
- Fortes MRS, Satake N, Corbet DH, Burns BM, Moore SS, Boe-Hansen GB.** Sperm protamine deficiency correlates with sperm DNA damage in *Bos indicus* bulls. *Androl*, v.2, p.370-378, 2014.
- Fortes MRS, Holroyd RG, Reverter A, Venus BK, Satake N, Boe-Hansen GB.** The integrity of sperm chromatin in young tropical composite bulls. *Theriogenology*, v.78, p.326-333, 2012.
- Franken DR, Franken CJ, Guerre HD, Villiers AD.** Normal sperm morphology and chromatin packaging: comparison between aniline blue and chromomycin A3 staining. *Androl*, v.366, p.361-366, 1999.
- García-Macías V, de Paz P, Martínez-Pastor F, Alvarez M, Gomes-Alves S, Bernardo J, Anel E, Anel L.**



DNA fragmentation assessment by flow cytometry and Sperm-Bos-Halomax (bright-field microscopy and fluorescence microscopy) in bull sperm. *Int J Androl*, v.30, p.88-98, 2007.

**Hughes CM, Lewis SE, McKelvey-Martin VJ, Thompson W.** A comparison of baseline and induced DNA damage in human spermatozoa from fertile and infertile men, using a modified comet assay. *Mol Hum Reprod*, v.2, p.613-639, 1996.

**Hughes CM, Lewis SE, McKelvey-Martin VJ, Thompson W.** Reproducibility of human sperm DNA measurements using the alkaline single cell gel electrophoresis assay. *Mut Res*, v.374, p.261-268, 1997.

**Kamimura CDF, Jacomini JO, Beletti ME.** Alterações de cromatina em espermatozoides de ovinos e caprinos avaliadas por azul de toluidina e alaranjado de acridina. *Cienc Agrotec*, v.34, p.212-219, 2010.

**Khalifa T, Lymberopoulos A.** Changeability of sperm chromatin structure during liquid storage of ovine semen in milk-egg yolk- and soybean lecithin-based extenders and their relationships to field-fertility. *Cell Tissue Bank*, v.14, p.687-698, 2013.

**Kim H, Kang MJ, Kim SA, Oh SK, Kim H, Ku S, Kim SH, Moon SY, Choi YM.** The Utility of sperm DNA damage assay using toluidine blue and aniline blue staining in routine semen analysis. *Clin Exp Reprod Med*, v.40, p.23-28, 2013.

**Krayevsky AA, Victorova LS, Arzumanov AA, Jasko MV.** Terminal deoxynucleotidyl transferase : catalysis of DNA (oligodeoxynucleotide) phosphorylation. *Pharmacol Ther*, v.85, p.165-173, 2000.

**Manicardi GC, Bianchi PG, Pantano S, Azzoni P, Bizzaro D, Bianchi U, Sakkas D.** Presence of endogenous nicks in DNA of ejaculated human spermatozoa and its relationship to chromomycin A3 accessibility. *Biol Reprod*, v.52, p.864-867, 1995.

**McKelvey-Martin VJ1, Melia N, Walsh IK, Johnston SR, Hughes CM, Lewis SE, Thompson W.** Two potential clinical applications of the alkaline single-cell gel electrophoresis assay: (1). Human bladder washings and transitional cell carcinoma of the bladder; and (2). Human sperm and male infertility. *Mut res*, v. 375, p. 93-104, 1997.

**Miller D, Brinkworth M, Iles D.** Paternal DNA packaging in spermatozoa: more than the sum of its parts? DNA, histones, protamines and epigenetics. *Reproduction*, v.139, p.287-301, 2010.

**Mukhopadhyay CS, Gupta AK, Yadav BR, Chauhan IS, Gupta A, Mohanty TK, Raina VS.** Effect of cryopreservation on sperm chromatin integrity and fertilizing potential in bovine semen. *Livestock Science*, v.136, p.114-121, 2011.

**Naves CS, Beletti ME, Duarte MB, Vieira RC, Diniz EG, Jacomini JO.** Avaliação da cromatina espermática em equinos com azul de toluidina e Acridine Orange. *Biosci J*, v.20, p. 117-124, 2004.

**Oliveira BM, Arruda RP, Thomé HE, Maturana Filho M, Oliveira G, Guimarães C, Nichi M, Silva LA, Celeghini ECC.** Fertility and uterine hemodynamic in cows after artificial insemination with semen assessed by fluorescent probes. *Theriogenology*, v.82, p.767-772, 2014.

**Oliveira LZ, Arruda RP, Andrade AFC, Celeghini ECC, Santos RM, Beletti ME, Peres RFG, Oliveira CS, Hossepian VFM.** Assessment of field fertility and several in vitro sperm characteristics following the use of different Angus sires in a timed-AI program with suckled Nelore cows. *Livestock Science*, v.146, p.38-46, 2012.

**Oliveira RV, Dogan S, Belser LE, Kaya A, Topper E, Moura A, Thibaudeau G, Memili E.** Molecular morphology and function of bull spermatozoa linked to histones and associated with fertility. *Reproduction*, v.146, p.263-272, 2013.

**Rodrigues ACN, Rocha JV, Beletti ME.** Análise computacional da compactação da cromatina de espermatozoides de galo. *Arq Bras Med Vet Zoo*, v.61, p.1302-1307, 2009.

**Sardoy MC, Carretero MI, Neild DM.** Evaluation of stallion sperm DNA alterations during cryopreservation using toluidine blue. *Anim Reprod Sci*, v.107, p.349-350, 2008.

**Shamsi MB, Imam SN, Dada R.** Sperm DNA integrity assays: diagnostic and prognostic challenges and implications in management of infertility. *J Assist Reprod Genet*, v.28, p.1073-85, 2011.

**Shaposhnikov S, Frengen E, Collins AR.** Increasing the resolution of the comet assay using fluorescent in situ hybridization-a review. *Mutagenesis*, v.24, p.383-389, 2009.

**Simões R.** Influência da fragmentação de DNA espermático na produção in vitro de embriões bovinos. 2010. 106f. Tese (Doutorado em Ciências) - Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, São Paulo, 2010.

**Simões R, Feitosa WB, Mendes CM, Marques MG, Nicacio AC, Barros FRO, Visintin JA, Assumpção, MEOA.** Use of chromomycin A3 staining in bovine sperm cells for detection of protamine deficiency. *Biotech Histochem*, v.84, p.79-83, 2009.

**Tavalaee M, Kiani A, Arbabian M, Deemeh MR, Esfahani MHN.** Flow Cytometry: A New Approach for Indirect Assessment of Sperm Protamine Deficiency. *Int J Fertil Steril*, v.3, p.177-184, 2010.

**Terquem T, Dadoune JP.** Aniline blue staining of human spermatozoa chromatin. Evaluation of nuclear maturation. In: Andre J., ed. *The Sperm Cell*. The Hague, The Netherlands: Martinus Nijhoff Publishers; 1983: p. 249-252.

---