

# ALTERAÇÕES DE CROMATINA EM ESPERMATOZÓIDES DE OVINOS E CAPRINOS AVALIADAS POR AZUL DE TOLUIDINA E ALARANJADO DE ACRIDINA

Chromatin alterations in ram and goat spermatozoa evaluated by toluidine blue and acridine orange

Cristina de Figueiredo Kamimura<sup>1</sup>, José Octávio Jacomini<sup>2</sup>,  
Marcelo Emílio Beletti<sup>3</sup>

## RESUMO

Reprodutores com espermograma normal podem se comportar como subférteis ou passarem por períodos de subfertilidade. As alterações na cromatina dos espermatozóides são possíveis explicações encontradas para tais comportamentos. Conduziu-se este trabalho, com o objetivo de testar a eficiência de azul de toluidina (AT) e do alaranjado de acridina (AA) na identificação de alterações na compactação de cromatina em espermatozóides de ovinos e caprinos, além de avaliar a correlação entre essas alterações e as de morfologia espermática. Para tal, foram avaliadas amostras de sêmen de 15 ovinos e de 15 caprinos, com dez repetições para cada método por animal. Calcularam-se a média, o desvio padrão (DP) e o coeficiente de variação (CV) para cada técnica e animal. Utilizou-se o teste t-Student para avaliar diferença entre as médias obtidas nos dois métodos. Também foram calculados a correlação de Pearson e os coeficientes kappa ponderado e não ponderado para avaliar a concordância entre os métodos com AT e AA. Foi verificado que nem sempre as anomalias morfológicas de cabeça são acompanhadas por alterações na cromatina identificáveis pelos métodos utilizados neste trabalho. O método AT é mais estável e possui maior sensibilidade do que AA para ambas as espécies, sendo o mais indicado para caprinos. Contudo, em razão de apresentar repetibilidade muito baixa, ambos os métodos não são indicados para avaliação espermática em ovinos.

**Termos para indexação:** Azul de toluidina, alaranjado de acridina, espermatozóide, cromatina, DNA.

## ABSTRACT

Males with normal spermogram can behave as subfertile or pass for periods of subfertility. Chromatin alterations of spermatozoa can account for such behavior. The objective of the present work was to test the efficacy of toluidine blue (TB) and acridine orange (AO) in the identification of alterations in chromatin compaction in spermatozoa from rams and goats, in addition to evaluate the correlation between those alterations and the ones of spermatid morphology. In order to do that, samples of semen from 15 rams and 15 goats were evaluated with 10 replications for each method. Mean, standard deviation and coefficient of variation were calculated for each animal and technique. Student's t-test was used to evaluate differences between the averages of two methods. Pearson correlation coefficient, weighted and non weighted kappa coefficient were also calculated to evaluate the agreement between methods with TB and AO. It was verified that morphological alterations of head not always are accompanied by alterations in chromatin identified by the methods used in this work. The TB method is more stable and sensitive than AO method for both species and this is most appropriate for goats. However, due to the very low repeatability, both methods are not indicated for evaluating ram spermatozoa.

**Index terms:** Toluidine blue, acridine orange, spermatozoon, chromatin, DNA.

(Recebido em 29 de maio de 2008 e aprovado em 30 de setembro de 2009)

## INTRODUÇÃO

Em mamíferos, nas fases finais da espermatogênese, as proteínas nucleares básicas, ricas em lisina, denominadas histonas, são substituídas, total ou parcialmente, por protaminas. Essas últimas são proteínas específicas dos espermatozóides e possuem um caráter mais básico em razão da riqueza em arginina (Bloch, 1969; Hofmann & Hilscher, 1991). Assim, forma-se uma cromatina (complexo

DNA-protamina), extremamente condensada e inerte decorrente da neutralização do esqueleto fosfodiéster do DNA pela interação dos grupos fosfatos da fita de DNA e amina das proteínas (Balhorn, 1982; Beletti & Mello, 1996).

O vigor, motilidade, concentração e morfologia espermática são os parâmetros tradicionais na avaliação do sêmen. Entretanto, reprodutores com espermograma normal podem se comportar como subférteis, ou passarem por períodos de subfertilidade. As alterações na

<sup>1</sup>Faculdade de Medicina Veterinária – Universidade Federal de Uberlândia – Uberlândia, MG

<sup>2</sup>Faculdade de Medicina Veterinária – Universidade Federal de Uberlândia – Uberlândia, MG

<sup>3</sup>Instituto de Ciências Biomédicas – Universidade Federal de Uberlândia – Av. Pará 1720 – 38400-902 – Uberlândia, MG – mebeletti@ufu.br

compactação da cromatina dos espermatozóides são possíveis explicações encontradas para tais comportamentos (Britto & Mello, 1988). Em razão da imperfeita compactação de cromatina, o DNA torna-se mais susceptível ao estresse oxidativo (Twigg et al., 1998).

Gledhill (1966) diferenciou, pela primeira vez, espermatozóides de touro com anomalia na compactação de cromatina, sendo que estes apresentavam uma resposta mais intensa à reação de Feulgen. Segundo Evenson et al. (1980) com a utilização de desnaturação ácida ou térmica, posterior coloração com Alaranjado de Acridina (AA) e análise em citofotômetro de fluxo com ultravioleta, os espermatozóides com cromatina normal coram-se em verde e os com alteração, em vermelho alaranjado. O método de Evenson et al. (1980) foi modificado por Tejada et al. (1984), que utilizaram coloração com AA em esfregaços de sêmen humano, obtendo bons resultados na diferenciação de espermatozóides normais e anormais. Essa metodologia, apesar de ser mais subjetiva que a de Evenson et al. (1980), dispensa o uso do citofotômetro de fluxo tornando seu custo menor. Mello (1982) desenvolveu o método da “metacromasia induzida” utilizando Azul de Toluidina, (AT) em pH 4,0, após hidrólise ácida, sendo que os espermatozóides normais coram-se de verde à azul claro e os anormais de azul escuro a magenta. Esse método, é ainda mais barato, pois dispensa o uso de microscopia de fluorescência. Como a avaliação visual de esfregaços de sêmen é de certa forma subjetiva, Beletti et al. (2004) desenvolveram software para avaliação de esfregaços corados com AT, utilizando-se imagens digitais capturadas em microscópio de luz acoplado à câmera ligada a microcomputador. Isto possibilitou uma avaliação mais objetiva, permitindo inclusive caracterizar diferentes tipos de alterações cromatínicas. No entanto, este tipo de avaliação é ainda pouco acessível aos profissionais de campo.

A cabeça dos espermatozóides dos mamíferos é quase que totalmente constituída de cromatina, portanto espera-se que alterações em tais estruturas sejam acompanhadas por anomalias morfológicas (Sailer et al., 1996; Ferrari et al., 1998; Ostermeier et al., 2001; Beletti et al., 2005).

Já que mesmo os animais com espermograma normal podem apresentar vários espermatozóides com alterações na cromatina e os dados sobre essas alterações são raros em ovinos e caprinos, neste trabalho objetivou-se testar a eficiência das colorações de esfregaços de sêmen com AT

e AA na identificação de alterações na compactação de cromatina em espermatozóides destas espécies, além de avaliar a correlação entre essas alterações e as anomalias de morfologia espermática.

## MATERIAL E MÉTODOS

Foram coletadas amostras de sêmen de 15 ovinos e de 15 caprinos, entre 12 a 24 meses e várias raças. O sêmen ovino foi obtido na Fazenda Forquilha, município de Araxá – MG e o de caprino nos Laticínios Saanen Ltda e na Fazenda Capim Branco da Universidade Federal de Uberlândia, ambos no município de Uberlândia – MG. Somente os animais utilizados como reprodutores e sem problemas clínicos aparentes foram utilizados para coleta de sêmen. Confeccionaram-se 20 esfregaços a fresco de cada animal em lâminas de vidro. Após secagem em temperatura ambiente, os esfregaços foram fixados em solução Carnoys (etanol e ácido acético 3:1) durante 1 minuto e, em seguida, em etanol 70%, durante 3 minutos. Anteriormente à coloração, realizou-se uma hidrólise com ácido clorídrico 4N por 15 minutos, lavagem em água destilada corrente e secagem em temperatura ambiente, conforme o protocolo de Beletti & Mello (2004). Dos 20 esfregaços, 10 lâminas foram coradas com AT, colocando-se uma gota de solução do corante a 0,025% em tampão Mc Ilvaine, pH 4,0 entre lâmina e lamínula (Mello, 1982). As lâminas restantes foram coradas com AA distribuindo-se 1 ml de solução do corante a 0,02% em tampão Mc Ilvaine, pH 2,5 sobre o esfregaço seco por 5 minutos, com posterior lavagem em água destilada corrente e secagem em temperatura ambiente de acordo com o protocolo de Tejada et al. (1984).

Para ambas as colorações, foram avaliados 500 espermatozóides por lâmina em microscópio Reichert-Jung Polyvar. Nas lâminas coradas com AT, utilizou-se objetiva de imersão de 100X com o microscópio no modo de operação normal e com AA objetiva de 40X em modo de operação fluorescência (filtro de excitação azul).

Algumas gotas do sêmen foram armazenadas em 1 ml de solução de 2,94 % de citrato de sódio e formol a 4% (Awad & Graham, 2004) e utilizadas nas avaliações morfológicas dos espermatozóides por meio de preparados úmidos observados em objetiva de 100 X em microscópio de fase Reichert Jung Polyvar. Foram contados 200 espermatozóides por animal, sendo que as anomalias morfológicas encontradas foram agrupadas em anomalias de cauda (ACD) e de cabeça (ACB).

Calcularam-se a média, o desvio padrão (DP) e o coeficiente de variação (CV) para cada técnica e animal. Utilizou-se o teste t-Student para avaliar diferença entre as médias obtidas nos dois métodos. Também foram calculados a correlação de Pearson e os coeficientes kappa ponderado e não ponderado para avaliar a concordância entre os métodos com AT e AA (Palmer & Barth, 2003).

### RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos nas avaliações das alterações na cromatina de espermatozoides de ovino e caprino estão apresentados nas Tabelas 1 e 2, respectivamente. Houve diferença ( $p < 0,05$ ) entre as médias de AT (1,96 %) e AA (0,26 %) para ovinos. Já, nos caprinos, não ocorreu diferença ( $p > 0,05$ ) entre as médias de AT (1,54 %) e AA (1,33 %).

As porcentagens de espermatozoides de ovinos e caprinos com anomalias morfológicas de cauda e cabeça encontram-se nas Tabelas 3 e 4, respectivamente. As correlações entre as alterações de cromatina e anomalias morfológicas de cauda e cabeça de espermatozoides de ovino e caprino estão apresentadas nas Tabelas 5 e 6, respectivamente.

Os índices de kappa entre os métodos que utilizam AT e AA para avaliação de alterações na cromatina de

espermatozoides de ovinos foi zero. Já, na avaliação de espermatozoides de caprinos, o índice kappa não ponderado foi 0,03 e o ponderado foi 0,35.

Nas espécies estudadas, os CV do método que utiliza AT foram menores. Isso demonstra que ele é mais confiável do que aquele com AA, estando de acordo com as conclusões obtidas por Machado & Beletti (2002) e Machado et al. (2003), ao trabalharem com esses métodos para identificar anomalias na compactação de cromatina em sêmen de búfalos e suínos, respectivamente.

É oportuno salientar que o corante AA é mais frequentemente utilizado para avaliações com citofotômetro de fluxo (Evenson et al., 1980; Sailer et al., 1996; Ostermeier et al., 2001) e que, neste trabalho, os esfregaços corados com AA foram avaliados em microscopia de fluorescência (Tejada et al., 1984; Hamamah et al., 1990; Erenpreiss et al., 2001). O citofotômetro permite uma avaliação objetiva e rápida. Já, na avaliação de esfregaços que utiliza microscópio de fluorescência, os espermatozoides anômalos são identificados visualmente por meio da cor da fluorescência. É sabido que o fenômeno da fluorescência é alterado durante a observação em razão da incidência da luz, o que faz com que essa avaliação tenha que ser feita

Tabela 1 – Porcentagem média, desvio padrão e coeficiente de variação dos espermatozoides com alterações na cromatina identificados com azul de toluidina (AT) e alaranjado de acridina (AA) em ovinos.

Animal	Azul de Toluidina		Alaranjado de Acridina	
	Média ± DP	CV (%)	Média ± DP	CV (%)
1	0,78±0,44	57	0,40±0,48	120
2	2,56±0,41	16	0,42±0,44	104
3	3,58±0,51	14	0,20±0,30	150
4	1,16±0,37	32	0,27±0,20	75
5	1,24±0,40	32	0,11±0,11	95
6	0,93±0,58	63	0,13±0,14	106
7	7,71±1,35	18	1,31±0,40	30
8	1,20±0,44	36	0,11±0,18	157
9	1,20±0,32	26	0,16±0,22	140
10	1,91±0,50	26	0,14±0,22	156
11	2,04±0,48	23	0,29±0,16	55
12	1,13±0,33	29	0,17±0,18	105
13	1,17±0,35	30	0,02±0,07	300
14	1,51±0,25	17	0,11±0,15	130
15	1,34±0,41	31	0,11±0,11	95
Média	1,96±0,48	30	0,26±0,22	121

muito rapidamente (Beletti & Mello, 1996). Além disso, como a cor da fluorescência varia de verde a vermelho, passando por todas as nuances intermediárias, a avaliação visual é muito subjetiva.

Na avaliação do método com AT, utiliza-se microscopia de luz normal e, portanto, pode ser realizada mais lenta e cuidadosamente. Como a identificação dos espermatozóides também é feita por diferença de coloração, sendo que os espermatozóides normais aparecem variando de verde a azul claro e os anômalos aparecem variando de azul escuro a magenta, a avaliação também é subjetiva (Mello, 1982). Isso explicaria porque, mesmo sendo menores, os coeficientes de variação deste método também foram relativamente altos.

As diferentes repetibilidades, obtidas nas duas espécies para um mesmo método, são explicadas por variações na constituição e estrutura da cromatina existente entre elas, levando às diferentes respostas de coloração. Portanto, ambos os métodos foram mais eficientes na avaliação de alterações na cromatina de espermatozóides de caprinos, em que o CV foi menor. A baixa repetibilidade obtida nas avaliações dos

espermatozóides de ovinos indica que estes métodos são pouco confiáveis e devem ter seu uso desaconselhado nesta espécie, diferindo do que foi encontrado por Tejada et al. (1984) e Erenpreiss et al. (2001) que trabalharam com sêmen humano avaliado com AA e com AA e AT, respectivamente. Estes autores consideraram seus resultados suficientemente bons para estimar na prática a integridade do DNA em sêmen humano. Já Machado & Beletti (2002) testaram AT e AA em sêmen de búfalo e conseguiram melhores resultados com AT.

Os coeficientes de correlação entre os métodos que avaliam a cromatina do espermatozóide também variaram, sendo alto para ovino ( $r=0,89$ ) e baixo para caprino ( $r=0,35$ ). Como foi considerado que somente em caprinos esses métodos são confiáveis, a correlação positiva, embora baixa, demonstra que os dois métodos identificam anomalias semelhantes, contudo o AT consegue identificar outras alterações, além daquelas identificadas pelo AA. Rocha et al. (2002) também verificaram que o AT identifica alterações mais leves ligadas ao complexo DNA- proteína em espermatozóides humanos quando comparado ao AA.

Tabela 2 – Porcentagem média, desvio padrão e coeficiente de variação dos espermatozóides com alterações na cromatina identificados com azul de toluidina(AT) e alaranjado de acridina (AA) em caprinos

Animal	Azul de Toluidina		Alaranjado de Acridina	
	Média $\pm$ DP	CV (%)	Média $\pm$ DP	CV (%)
1	1,40 $\pm$ 0,17	12	0,80 $\pm$ 0,24	31
2	2,40 $\pm$ 0,20	8	1,44 $\pm$ 0,36	25
3	1,38 $\pm$ 0,16	11	1,56 $\pm$ 0,38	25
4	1,53 $\pm$ 0,14	9	1,40 $\pm$ 0,28	20
5	1,49 $\pm$ 0,11	7	2,22 $\pm$ 0,25	11
6	1,80 $\pm$ 0,16	9	1,50 $\pm$ 0,22	14
7	1,14 $\pm$ 0,16	14	1,08 $\pm$ 0,32	29
8	1,38 $\pm$ 0,20	14	1,24 $\pm$ 0,23	18
9	1,52 $\pm$ 0,14	9	0,80 $\pm$ 0,27	33
10	1,12 $\pm$ 0,14	13	0,92 $\pm$ 0,21	23
11	1,70 $\pm$ 0,19	11	1,33 $\pm$ 0,28	21
12	1,33 $\pm$ 0,18	14	1,35 $\pm$ 0,19	13
13	1,32 $\pm$ 0,19	15	1,20 $\pm$ 0,24	20
14	1,28 $\pm$ 0,18	14	1,48 $\pm$ 0,15	10
15	2,28 $\pm$ 0,15	7	1,68 $\pm$ 0,10	6
Média	1,54 $\pm$ 0,16	11	1,33 $\pm$ 0,25	19

Tabela 3 – Porcentagem das anomalias morfológicas de cauda (ACD) e cabeça (ACB) em espermatozóides de ovinos

Animal	Anomalias de cauda (%)	Anomalias de cabeça (%)
1	19,5	4,5
2	7,5	4,0
3	13,0	2,5
4	16,0	4,5
5	12,5	2,5
6	3,5	0,5
7	21,0	7,5
8	3,5	0
9	7,0	0
10	7,5	4,0
11	4,0	3,0
12	6,0	0,5
13	22,0	3,0
14	5,5	1,5
15	10,5	1,0
Média	10,6	2,6

Tabela 4 – Porcentagem das anomalias morfológicas de cauda (ACD) e cabeça (ACB) em espermatozóides de caprinos

Animal	Anomalias de cauda (%)	Anomalias de cabeça (%)
1	5,0	1,5
2	23,0	1,0
3	2,0	0,5
4	5,0	1,5
5	13,0	12,5
6	3,0	0,0
7	6,5	0,5
8	12,5	0
9	0,5	0
10	1,0	1,0
11	8,0	2,0
12	0	0,5
13	11,5	1,0
14	0	1,0
15	5,0	1,0
Média	6,4	1,6

Tabela 5 – Correlação entre alterações na compactação de cromatina identificadas com azul de toluidina (AT) e alaranjado de acridina (AA) e anomalias morfológicas de cauda (ACD) e cabeça (ACB) em espermatozóides de ovinos

Variáveis	ACD	ACB	AT	AA
ACD	1,00			
ACB	0,69	1,00		
AT	0,37	0,67	1,00	
AA	0,44	0,76	0,89	1,00

Tabela 6 – Correlação entre alterações na compactação de cromatina identificadas com azul de toluidina (AT) e alaranjado de acridina (AA) e anomalias morfológicas de cauda (ACD) e cabeça (ACB) em espermatozóides de caprinos

Variáveis	ACD	ACB	AT	AA
ACD	1,00			
ACB	0,30	1,00		
AT	0,50	-0,01	1,00	
AA	0,29	0,67	0,35	1,00

Apesar do coeficiente de correlação entre AA e AT ter sido alto em ovinos, os índices kappa ponderado e não ponderado foram zero nesta espécie. Esses índices foram diferentes de zero em caprinos, porém baixos. Os índices kappa ponderado e não ponderado avaliam a concordância entre métodos que identificam um mesmo fenômeno (Palmer & Barth, 2003). Assim, vimos que somente em caprinos esses métodos possuem um mínimo de concordância, contudo os valores são muito baixos, demonstrando que possuem sensibilidades diferentes, conferindo com os relatos de Rocha et al. (2002) e Machado et al. (2003).

Como a cabeça do espermatozóide é quase que totalmente constituída por cromatina, é esperado que alterações nessas estruturas estejam acompanhadas ou levem a anomalias morfológicas de cabeça (Sailer et al., 1996; Ferrari et al., 1998; Ostermeier et al., 2001). Contudo, os coeficientes de correlação entre as anomalias morfológicas de cabeça e as alterações na cromatina variaram, chegando a ser negativo em caprinos, porém, muito próximo de zero. A quantidade de espermatozóides com anomalias de cabeça também foi muito diferente da quantidade daqueles com anomalias de cromatina. Isso demonstra que nem sempre as anomalias morfológicas de cabeça são acompanhadas por alterações na cromatina identificáveis pelos métodos utilizados neste trabalho. Segundo Machado et al. (2003) também pode haver anomalias morfológicas independentes das de cromatina e vice - versa. De maneira geral, as anomalias morfológicas

de cauda e cabeça possuem correlação positiva com as alterações na cromatina, o que sugere que essas podem possuir causas semelhantes.

### CONCLUSÕES

O método que utiliza AT para identificar anomalias na compactação da cromatina de espermatozóides de caprinos é mais estável do que AA, sendo o mais confiável e, portanto, o mais indicado para esta espécie.

Em razão de apresentarem repetibilidade muito baixa, ambos os métodos não são indicados para avaliar espermatozóides de ovinos.

Nem sempre as anomalias morfológicas de cabeça são acompanhadas por alterações na cromatina identificáveis pelos métodos aqui utilizados.

### AGRADECIMENTOS

À Fazenda Forquilha e Laticínios Saanen Ltda pelo fornecimento do sêmen, aos Médicos Veterinários Ronaldo Gonçalves de Azevedo e Fátima Isabel Antônio pela colaboração na realização desse trabalho. A CAPES, CNPq e FAPEMIG, pelo auxílio financeiro.

### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AWAD, M.M.; GRAHAM, J.K. A new pellet technique for cryopreserving ram and bull spermatozoa using the cold surface of cattle fat. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v.84, n.1/2, p.83-92, 2004.

- BALHORN, R. A model for the structure of chromatin in sperm. **The Journal of Cell Biology**, New York, v.93, n.2, p.298-305, 1982.
- BELETTI, M.E.; COSTA, L.F.; GUARDIEIRO, M.M. Morphometric features and chromatin condensation abnormalities evaluated by toluidine blue staining in bull spermatozoa. **Brazilian Journal of Morphological Science**, Campinas, v.22, n.2, p.85-90, 2005.
- BELETTI, M.E.; COSTA, L.F.; VIANA, M.P. A computational approach to the characterization of bovine sperm chromatin alterations. **Biotechnic & Histochemistry**, Baltimore, v.79, n.1, p.17-23, 2004.
- 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. Comparison between the toluidine blue stain and the feulgen reaction for evaluation of rabbit sperm chromatin condensation and their relationship with sperm morphology. **Theriogenology**, Los Altos, v.62, n.3/4, p.398-402, 2004.
- BLOCH, D.P. A catalog of sperm histones. **Genetics**, Austin, v.61, n.1, p.93-111, 1969.
- BRITTO, C.M.C.; MELLO, M.L. . Induced nuclear metachromasy evaluated in spermatozoa of “ pé duro” bulls. **Brazilian Journal of Genetics**, Ribeirão Preto, v.11, n.3, p.349-354, 1988.
- ERENPREISS, J.; BARS, J.; LIPATNIKOVA, V.; ERENPREISA, J.; ZALKALNS, J. Comparative study of cytochemical tests for sperm chromatin integrity. **Journal of Andrology**, Philadelphia, v.22, n.1, p.45-53, 2001.
- EVENSON, D.P.; DARZYNKEIWICZ, Z.; MELAMED, M.R. Relation of mammalian sperm chromatin heterogeneity to fertility. **Science**, Washington, v.210, n.4474, p.1131-1133, 1980.
- FERRARI, M.R.; SPIRITO, S.E.; GIULIANO, S.M.; FERNÁNDEZ, H.A. Chromatin cytophotometric analysis of abnormal bovine spermatozoa. **Andrologia**, Berlin, v.30, n.2, p.85-89, 1998.
- GLEDHILL, B.L. Studies on the DNA content, dry mass and optical area of morphologically normal and abnormal bull spermatozoa heads. **Acta Veterinaria Scandinavica**, Copenhagen, v.7, n.1, p.1-20, 1966.
- HAMAMAH, S.; ROYÈRE, D.; NICOLLE, J.C.; PAQUIGNON, M.; LANSAC, J. Effects of freezing-thawing on the spermatozoon nucleus: a comparative chromatin cytophotometric study in the porcine and human species. **Reproduction, Nutrition, Development**, Paris, v.30, n.1, p.59-64, 1990.
- HOFMANN, N.; HILSCHER, B. Use of aniline blue to assess chromatin condensation in morphologically normal spermatozoa in normal and infertile men. **Human Reproduction**, Oxford, v.6, n.7, p.979-982, 1991.
- MACHADO, E.R.; KAMIMURA, C.F.; BELETTI, M.E.; JACOMINI, J.O. Diagnóstico de alterações na compactação da cromatina em espermatozóide de suíno através de azul de toluidina e alaranjado de acridina. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v.27, p.381-382, 2003. Suplemento.
- MACHADO, M.M.; BELETTI, M.E. Methods for abnormal spermatozoa chromatin condensation identification in buffaloes (*Bubalus bubalis*). **Bubalus bubalis**, Salerno, v.8, n.1, p.57-65, 2002.
- MELLO, M.L.S. Induced metachromasy in bull spermatozoa. **Histochemistry**, Berlin, v.74, n.3, p.387-392, 1982.
- OSTERMEIER, C.G.; SARGEANT, G.A.; YANDELL, B.S.; EVENSON, D.P.; PARRISH, J.J. Relationship of bull fertility to sperm nuclear shape. **Journal of Andrology**, Philadelphia, v.22, n.4, p.595-603, 2001.
- PALMER, C.W.; BARTH, A.D. Comparison of the BullMate™ sperm quality analyzer with conventional means of assessing the semen quality and breeding soundness of beef bulls. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v.77, n.3/4, p.173-185, 2003.
- ROCHA, H.L.O.G.; BELETTI, M.E.; MARCOLINI, T.T.; AMORIN, 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, 2002.

SAILER, B.L.; JOST, L.K.; EVENSON, D.P. Bull sperm head morphometry related to abnormal chromatin structure and fertility. **Cytometry**, New York, v.24, n.2, p.167-173, 1996.

TEJADA, R.I.; MITCHELL, J.C.; NORMAN, A.; MARIK, J.J.; FRIEDMAN, S. A test for the practical evaluation of

male fertility by acridine (AO) fluorescence. **Fertility and Sterility**, New York, v.42, n.1, p.87-91, 1984.

TWIGG, J.P.; IRVINE, D.S.; AITKEN, R.J. Oxidative damage to DNA in human spermatozoa does not preclude pronucleus formation at intracytoplasmic sperm injection. **Human Reproduction**, Oxford, v.13, n.7, p.1864-1871, 1998.