



Investigando a fragmentação não induzida e a susceptibilidade à fragmentação do DNA espermático: refinamento da avaliação espermática. Parte 2

Investigating not induced fragmentation and susceptibility of sperm DNA: refinement of sperm evaluation. Second part

M.B.R. Alves¹, M.L. Oliveira², R. Lançon³, S.A. Florez-Rodriguez¹, E.C.C. Celeghini¹,
R.P. Arruda³, A.F.C. Andrade^{4,5}

¹Laboratório de Pesquisa e Ensino em Patologia da Reprodução Animal (LEPPaR), Departamento de Reprodução Animal, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brasil.

²Laboratório de Fisiologia e Endocrinologia Molecular (LFEM), Departamento de Reprodução Animal, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brasil.

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

⁴Laboratório de Andrologia e Tecnologia de Embriões Suínos, Departamento de Reprodução Animal, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, Pirassununga, SP, Brasil.

Correspondência: andrefc@usp.br

Resumo

A integridade do DNA espermático está intimamente relacionada com a fertilidade. Técnicas que avaliam o DNA espermático possuem grande importância e potencial de serem aplicadas nas rotinas das avaliações andrológicas. No entanto, são necessários maiores conhecimentos sobre as técnicas e seus princípios para permitir que sejam empregadas apropriadamente de acordo com os objetivos e resultados esperados. Dessa forma, assim como abordado na Parte 1, nesta Parte 2 serão abordadas técnicas de avaliação do DNA espermático: TUNEL, laranja de acridina e *Sperm Chromatin Structure Assay* (SCSA). A técnica de TUNEL fundamenta-se na adição de nucleotídeos modificados marcados com fluorescência às fitas fragmentadas. A técnica avalia, portanto, diretamente a fragmentação de DNA da amostra. A sonda laranja de acridina é capaz de diferenciar, por meio de diferentes colorações, o DNA fragmentado do não fragmentado. Já a técnica de SCSA baseia-se na imposição de um desafio ao espermatozoide; esta técnica avalia a susceptibilidade dos espermatozoides à fragmentação de DNA, sendo, portanto, uma avaliação indireta. A presente revisão permite expor a opinião dos autores sobre as diferentes técnicas e suas aplicações, mostrando o potencial emprego delas nos exames de rotina e nas pesquisas.

Palavras-chave: laranja de acridina, material genético, núcleo, SCSA, TUNEL.

Abstract

Sperm DNA integrity is directly related to male fertility. Techniques to assess sperm DNA are important and have potential to be applied in routine evaluation of semen. However, the techniques and principles need to be further studied to apply them correctly and to get relevant results. Thus, as discussed in Part 1, Part 2 will address evaluation techniques of sperm DNA: TUNEL, acridine orange and Sperm Chromatin Structure Assay (SCSA). TUNEL is based on addition of modified nucleotides labeled with fluorescence to fragmented tapes evaluating, therefore, directly, the DNA fragmentation of the sample. Acridine orange differentiates fragmented DNA by different colors. On the other hand, SCSA are based on the imposition of a challenge to sperm. Thus, this technique assesses the susceptibility of sperm DNA fragmentation constituting indirect assessment. The review allows showing opinion of the authors about different techniques and their applications. Therefore, potential use of these techniques in routine exams and researches are addressed.

Keywords: acridine orange, genetic material, nuclei, SCSA, TUNEL.

Introdução

A avaliação do DNA espermático se faz essencial, uma vez que eventos relacionados à fecundação e ao desenvolvimento embrionário inicial dependem de sua integridade (Ahmadi e Soon-Chye, 1999). Os danos ao DNA podem ocorrer por uma série de fatores: temperatura ambiental elevada (Setchell, 1998; Love e Kenney, 1999; Hansen, 2009), criopreservação de sêmen (Martin et al., 2004) e substâncias químicas provenientes do tabagismo em humanos (Calogero et al., 2009). Estes levam ao aumento das espécies reativas de oxigênio, desencadeando o estresse oxidativo nas células do epitélio seminífero e a consequente fragmentação de DNA (Paul et al., 2008, 2009; Pérez-Crespo, 2008).



Embora os oócitos possuam a capacidade de reparar os danos do DNA do espermatozoide após a fecundação (Ménézo et al., 2010), os mecanismos de reparação dessas células não são capazes de reparar os danos do DNA com elevada fragmentação. Assim, espermatozoides com altas taxas de fragmentação de DNA resultam em baixas taxas de fecundação e no comprometimento do desenvolvimento embrionário inicial (Ménézo et al., 2010). Ademais, o comprometimento do DNA espermático possui importância transgeracional, visto que alterações no DNA podem modificar padrões de metilação e desmetilação, ocasionando doenças e alterações nas gerações seguintes (Reik et al., 2001; Aitken et al., 2013; Hackett et al., 2013; Peters, 2014).

Dessa forma, a avaliação do DNA espermático se faz essencial. No entanto, existem diversas técnicas com diferentes princípios. A aplicação dessas técnicas corriqueiramente é limitada pelos altos custos demandados, pelo pouco conhecimento dos princípios de ação e pela laboriosidade. Assim, esta segunda parte da revisão aborda as técnicas de avaliação direta da fragmentação de DNA (TUNEL e laranja de acridina), dando continuidade à abordagem feita na primeira parte, e a técnica de avaliação indireta da fragmentação de DNA, *Sperm Chromatin Structure Assay* (SCSA). A revisão tem por objetivo esclarecer o funcionamento das técnicas e permitir que estas sejam mais acessíveis. Com isso, acredita-se que estas possam ser mais empregadas nos laboratórios de avaliações andrológicas de rotina bem como nas pesquisas. Serão discutidos os principais resultados encontrados na literatura e o potencial de aplicação da técnica.

Técnica de TUNEL

A técnica de TUNEL (do inglês, *terminal deoxynucleotidyl transferase mediated dUTP nick end labeling assay*) consiste basicamente na adição, por meio da enzima terminal deoxynucleotidil transferase (TdT), de nucleotídeos modificados e marcados com moléculas fluorescentes às fitas fragmentadas. A técnica é capaz de identificar fragmentações tanto nas fitas simples quanto nas fitas duplas. No entanto, apesar de possuir alta sensibilidade e especificidade, é considerada um laboriosa (Krayevsky et al., 2000; Gillan et al., 2005; Motea e Berdis, 2010; Shamsi et al., 2011).

O ensaio TUNEL tem como princípio a adição de nucleotídeos marcados com moléculas fluorescentes na extremidade livre 3'OH da fita de DNA simples ou dupla. A TdT é responsável pela incorporação dos nucleotídeos; esta possui a característica peculiar de não necessitar de moldes para adição destes. Esta enzima polimeriza os nucleotídeos marcados na extremidade livre, onde há fragmentação, e a reação é amplificada por reações enzimáticas secundárias (Krayevsky et al., 2000). A fluorescência é então emitida, podendo ser pelo método direto ou pelo método indireto. No método direto, os nucleotídeos estão ligados diretamente nos fluoróforos (Waterhouse et al., 2006), enquanto no método indireto, os nucleotídeos estão ligados a anticorpos ou a um composto químico que emite fluorescência por reação antígeno-anticorpo ou por uma reação química (Sutovsky et al., 2002).

Inicialmente, o TUNEL era utilizado para identificar morte celular por apoptose (Negoescu et al., 1998), função que teria grande importância, visto que as taxas de apoptose espermática correlacionam-se negativamente com a fertilidade (Walters et al., 2005). No entanto, a técnica deixou de ter essa finalidade por não ser capaz de diferenciar as células que estão em apoptose daquelas em necrose (Samejima e Earnshaw, 2005). A identificação de amostras com altos índices de apoptose tem sido feita com sucesso pela técnica Anexina-V, que identifica a translocação da fosfatidilserina (Dogan et al., 2013; Zhao et al., 2014). O TUNEL, por sua vez, limita-se à mensuração da fragmentação de DNA (Negoescu et al., 1998; Dogan et al., 2013) e possui a vantagem de a leitura poder ser em microscopia de fluorescência ou em citometria de fluxo (Gillan et al., 2005).

Quando comparado a outras técnicas de avaliação do DNA espermático, o TUNEL mostra-se superior à técnica do laranja de acridina na detecção de fragmentação de DNA de espermatozoides de touros (Martins et al., 2007a). Em espermatozoides humanos, a técnica apresentou correlação positiva com a avaliação de DNA feita pelo azul de toluidina ($r = 0,80$; $P < 0,001$) e pelo SCSA ($r = 0,63$; $P = 0,005$; Ereinpress et al., 2004). Ademais, a técnica foi eficiente em distinguir homens férteis de inférteis (Ribas-Maynou et al., 2013) e prever o potencial de fertilidade de touros (Martins et al., 2007b; Erickson et al., 2015). No entanto, diante de todos esses resultados, o método apresenta a limitação de não possuir ainda a padronização do limiar de dano ao DNA que possa determinar o potencial de fertilidade dos animais domésticos. Embora diversos estudos tenham sido realizados com o objetivo de estabelecer esses valores, ainda não há um consenso. Dessa forma, há necessidade de mais estudos focados nesse limiar para que a técnica, cuja aplicação demanda profissionais treinados e exige alto investimento, possa ser aplicada com maior efetividade na rotina clínica.

Laranja de acridina

A técnica pelo laranja de acridina (LA) é prática e pode ser utilizada na microscopia de fluorescência e na citometria de fluxo. A sonda LA é classificada como metacromática e, dessa forma, pode emitir fluorescência em 530nm com a colocação verde ou em 640nm com a coloração vermelha. Quando o DNA espermático está



íntegro, a LA se intercala entre os ácidos nucleicos e emite a fluorescência verde. O contrário ocorre quando há fragmentação; a sonda se liga aos grupos fosfatos das fitas simples e emite a fluorescência vermelha (McMaster e Carmichael, 1977; Tejada et al., 1984). Pode ser considerada como uma técnica de avaliação da descondensação do DNA espermático ou de avaliação da integridade do DNA espermático.

No fim da década de 80 e durante a década de 90, foram publicados diversos trabalhos que investigaram a correlação dos resultados encontrados com a utilização da LA e outras técnicas de avaliação espermática (Ibrahim e Pedersen, 1988; Sterzik et al., 1989; Roux e Dadoune, 1989; Eggert-Kruse et al., 1996; Hoshi et al., 1996). Entretanto, em 2000, a técnica foi adaptada por Evenson, sendo utilizada na citometria de fluxo e, assim, não necessitando do uso de esfregaços. A adaptação da técnica passou a apresentar grande correlação com a fertilidade e recebeu a denominação de *Sperm Chromatin Structure Assay* (SCSA), que será descrita no próximo tópico da revisão (Evenson e Jost, 2000).

A LA na década de 80 apresentou-se como uma importante ferramenta para indicar o potencial de fertilidade humano (Tejada et al., 1984). Na mesma década, estudos mostraram que a presença de espermatozoides positivos ao LA, isto é, corados em vermelho, apresentou correlação positiva com espermatozoides morfológicamente anormais ($P \leq 0,001$; Ibrahim e Pedersen, 1988). Da mesma forma, a integridade de DNA detectada pela técnica apresentou correlação positiva com a motilidade espermática e quantidade de espermatozoides morfológicamente normais (Sterzik et al., 1989). A técnica apresentou ainda correlação positiva com a técnica do azul de anilina (Roux e Dadoune, 1989). Entretanto, apresentou-se inferior à técnica de azul de toluidina na detecção de compactação do DNA espermático de homens férteis e subférteis (Rocha et al., 2002). Eggert-Kruse et al. (1996) testaram a LA para determinar a infertilidade em homens e concluíram que a técnica não tinha expressão para a detecção da qualidade e capacidade funcional do espermatozoide, sendo baixo seu valor clínico durante a investigação de infertilidade. Os mesmos resultados foram encontrados por Kazerooni et al. (2009), que não viram relação da técnica com a fertilidade em homens.

Em touros, estudos com a LA, feitos pelo grupo desta revisão, mostraram que, após o processo de criopreservação, pode haver aumento da descondensação da cromatina ante o uso de diferentes diluidores (Celeghini et al., 2008). Da mesma forma, Khalifa et al. (2008) verificaram aumento da quantidade de células positivas ao laranja de acridina após processo de criopreservação de espermatozoides de touros. Lymberopoulos e Khalifa (2010) verificaram ainda que as células positivas ao LA influenciaram as taxas de fertilidade.

A técnica possui vantagens e desvantagens e apresenta poucos resultados em animais domésticos. Além disso, devido ao seu princípio de ação, a técnica possui elevada subjetividade em decorrência da mistura de cores que pode ocorrer dentro das células espermáticas, ocasionando confusão na leitura. Ademais, segundo conclusões dos estudos realizados pelo grupo da revisão, a LA perde a fluorescência rapidamente e pode haver um acúmulo de espermatozoides nas extremidades durante a confecção da lâmina, o que também dificulta a leitura dessas células.

Técnica de avaliação indireta da fragmentação de DNA espermático

Nessa avaliação, encontra-se a técnica SCSA, do inglês *Sperm Chromatin Structure Assay*. Essa técnica promove um desafio à célula espermática, e, portanto, aquelas células que apresentarem susceptibilidade à fragmentação de DNA apresentarão positividade na leitura. Como impõe um desafio à célula, é muito útil para verificar espermatozoides que não apresentam a fragmentação de DNA, mas que são susceptíveis a possíveis danos.

Sperm Chromatin Structure Assay (SCSA)

A técnica SCSA impõe um desafio ao DNA espermático ao utilizar a sonda laranja de acridina associada à citometria de fluxo. Por esta técnica, é possível ser determinada a porcentagem de espermatozoides susceptíveis à fragmentação de DNA (Evenson e Jost, 2000). Pelo fato de ser realizada no citômetro de fluxo, a técnica permite a análise de um grande número de células, conferindo expressividade aos resultados obtidos (Love, 2005). Ademais, a técnica tem se mostrado rápida e precisa na identificação da subfertilidade e infertilidade de homens e animais domésticos (Evenson e Jost, 2000; Evenson e Wixon, 2005; Love, 2005; Waterhouse et al., 2006).

Os primeiros estudos com a técnica datam da década de 80 e, desde então, vários estudos têm sido feitos utilizando-se o SCSA (Evenson et al., 2002). Pela técnica, determina-se a proporção de espermatozoides com alta fluorescência vermelha, cujo DNA está como fita simples e, portanto, fragmentado, bem como a alta fluorescência verde, cujo DNA está normal, sem fragmentação (Love, 2005). Com base nos dados obtidos, é possível ser obtido o índice de fragmentação de DNA (DFI), encontrado dividindo-se a quantidade de células com fluorescência vermelha pelo total de células (Evenson et al., 2002). Além disso, pode-se determinar o HDS, do inglês *High DNA-stainable*, isto é, aqueles espermatozoides que possuem um DNA com alta capacidade de ser marcado. O HDS denota a população de espermatozoides imaturos e possui grande influência sobre a



fertilidade (Evenson et al., 2002).

Em humanos, o DFI e o HDS são determinados como limiares para a fertilidade (Evenson et al., 1999; Bungum et al., 2004). Entretanto, em espécies de animais domésticos, ainda são necessários mais estudos para que esses limiares sejam estabelecidos. Kenney et al. (1995) avaliaram 106 garanhões férteis e subférteis durante a estação de monta. Os garanhões subférteis apresentaram 32% de células positivas ao SCSA enquanto os férteis apresentaram 16%. Morrel et al. (2008) mostraram que o DFI e a fertilidade em equinos apresentaram alta correlação ($r = -0,63$; $P < 0,05$). Dessa forma, a técnica apresenta potencial em ser utilizada para prever a fertilidade dos garanhões.

Em touros Holandeses, alterações na estrutura da cromatina detectadas pelo SCSA foram notadas três dias após a indução de estresse térmico testicular (Karabinus et al., 1997). Ainda, em touros, foi notada alta correlação entre SCSA e TUNEL ($r = 0,82$; $P < 0,001$), sendo as duas técnicas úteis para prever a fertilidade nessa espécie (Waterhouse et al., 2006). Em estudo com sêmen de touros de alta e baixa qualidade, o SCSA e o Cometa foram capazes de distinguir esses grupos (Serafini et al., 2015). Além disso, a taxa de fragmentação verificada pelo SCSA, quando comparada à integridade de DNA verificada pelo SCD modificado, apresentou correlação negativa ($r = -0,26$; $P = 0,04$ Fortes et al., 2012). D'Occhio et al. (2013) mostraram que 91% dos touros estudados apresentaram DFI $< 15\%$, 4% apresentaram DFI entre 15 e 27%, e 5% apresentaram DFI maior que 27%. No entanto, os autores não sabem se os valores podem ser comparados aos valores encontrados para humanos nem como estes podem influenciar a fertilidade dos touros, sendo necessários mais estudos.

Entretanto, apesar de ter alta repetibilidade em seus resultados e correlacionar-se com diferentes técnicas de avaliação do DNA espermático, o SCSA tem a desvantagem de necessitar de um citômetro de fluxo para sua execução, tornando-o limitado a grandes centros de pesquisa e/ou laboratórios que possuam o equipamento, cujo investimento e manutenção são caros e cuja manipulação deve ser feita por equipe treinada. Por outro lado, o SCSA possui grande capacidade de prever a fertilidade tanto em humanos quanto em animais domésticos. Mais estudos, portanto, são necessários para que sejam estabelecidos os limiares do DFI e HDS correspondentes aos reprodutores com diferentes potenciais reprodutivos. Assim, acredita-se que a técnica possa ser empregada na rotina dos laboratórios de avaliação espermática com maior facilidade.

Considerações finais

Existem diversas técnicas para a avaliação do DNA espermático, entretanto elas devem ser empregadas conforme o objetivo da análise. Trabalhos com reprodutores altamente selecionados para a fertilidade observam baixas taxas de fragmentação de DNA espermático. No entanto, o estresse térmico ou fatores relacionados à idade podem resultar em maior susceptibilidade de fragmentação do DNA espermático. Nesses casos, as técnicas de avaliação da susceptibilidade à fragmentação de DNA seriam de grande pertinência. Assim, o conhecimento das técnicas e de seus diferentes princípios se faz fundamental para que possa ser realizada a aplicação na rotina. Ademais, é muito importante que mais estudos sejam realizados para estabelecer o impacto sobre a fertilidade dos resultados encontrados. Dessa forma, as técnicas de DNA poderão ser utilizadas para prever a fertilidade com maior segurança e confiabilidade.

Referências

- Ahmadi A, Soon-Chye N. Developmental capacity of damaged spermatozoa. *Hum Reprod*, v.14, p.2279-2285, 1999.
- Aitken RJ, Bronson R, Smith TB, De Iulius GN. The source and significance of DNA damage in human spermatozoa; a commentary on diagnostic strategies and straw man fallacies. *Mol Hum Reprod*, v.19, p.475-485, 2013.
- Bungum M, Humaidan P, Spano M, Jepson K, Bungum L, Giwercman A. The predictive value of sperm chromatin structure assay (SCSA) parameters for the outcome of intrauterine insemination, IVF and ICSI. *Hum Reprod*, v.19, p.1401-1408, 2004.
- Calogero A, Polosa R, Perdichizzi A, Guarino F, La Vignera S, Scarfia A, Fratantonio E, Condorelli R, Bonanno O, Barone N, Burrello N, D'Agata R, Vicari E. Cigarette smoke extract immobilizes human spermatozoa and induces sperm apoptosis. *Reprod Biomed Online*, v.19, p.564-571, 2009.
- Celeghini EC, Arruda RP, Andrade AFC, Nascimento J, Raphael CF, Rodrigues PH. Effects that bovine sperm cryopreservation using two different extenders has on sperm membranes and chromatin. *Anim Reprod Sci*, v.104, p.119-131, 2008.
- D'Occhio MJ, Hengstberger KJ, Tutt D, Holroyd RG, Fordyce G, Boe-Hansen GB, Johnston SD. Sperm chromatin in beef bulls in tropical environments. *Theriogenology*, v.79, p.946-952, 2013.
- Dogan S, Mason MC, Govindaraju A, Belser L, Kaya A, Stokes J, Rowe D, Memili E. Interrelationships between apoptosis and fertility in bull sperm. *J Reprod Dev*, v.59, p.18-26, 2013.
- Eggert-Kruse W, Rohr G, Kerbel H, Schwalbach B, Demirakca T, Klinga K, Tilgen W, Runnebaum B.



- The Acridine Orange test: a clinically relevant screening method for sperm quality during infertility investigation? *Hum Reprod*, v.11, p.784-789, 1996.
- Erenpreiss J, Jepson K, Giwercman A, Tsarev I, Erenpreisa J, Spano M.** Toluidine blue cytometry test for sperm DNA conformation: comparison with the flow cytometric sperm chromatin structure and TUNEL assays. *Hum Reprod*, v.19, p.2277-2282, 2004.
- Erickson L, Kroetsch T, Anzar M.** Relationship between sperm apoptosis and bull fertility: in vivo and in vitro studies. *Reprod Fertil Dev*, 2015. doi: 10.1071/RD14417.
- Evenson D, Jost L.** Sperm chromatin structure assay is useful for fertility assessment. *Methods Cell Sci*, v.22, p.169-189, 2000.
- Evenson DP, Jost LK, Marshall D, Zinaman MJ, Clegg E, Purvis K, de Angelis P, Claussen OP.** Utility of the sperm chromatin structure assay as a diagnostic and prognostic tool in the human fertility clinic. *Hum Reprod*, v.14, p.1039-1049, 1999.
- Evenson DP, Larson KL, Jost LK.** Sperm chromatin structure assay: its clinical use for detecting sperm DNA fragmentation in male infertility and comparisons with other techniques. *J Androl*, v.23, p.25-43, 2002.
- Evenson DP, Wixon R.** Environmental toxicants cause sperm DNA fragmentation as detected by the Sperm Chromatin Structure Assay (SCSA). *Toxicol Appl Pharmacol*, v.207, p.S532-S537, 2005.
- 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.
- Gillan L, Evans G, Maxwell WM.** Flow cytometric evaluation of sperm parameters in relation to fertility potential. *Theriogenology*, v.63, p.445-457, 2005.
- Hackett JA, Sengupta R, Zylicz JJ, Murakami K, Lee C, Down TA, Surani MA.** Germline DNA demethylation dynamics and imprint erasure through 5-hydroxymethylcytosine. *Science*, v.339, p.448-452, 2013.
- Hansen PJ.** Effects of heat stress on mammalian reproduction. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, v.364, p.3341-3350, 2009.
- Hoshi K, Katayose H, Yanagida K, Kimura Y, Sato A.** The relationship between acridine orange fluorescence of sperm nuclei and the fertilizing ability of human sperm. *Fertil Steril*, v. 66, p. 634-639, 1996.
- Ibrahim ME, Pedersen H.** Acridine orange fluorescence as male fertility test. *Arch Androl*, v.20, p.125-129, 1988.
- Karabinus DS, Vogler CJ, Saacke RG, Evenson DP.** Chromatin structural changes in sperm after scrotal insulation of holstein bulls. *J Androl*, v.18, p.549-555, 1997.
- Kazerooni T, Asadi N, Jadid L, Kazerooni M, Ghanadi A, Ghaffarpasand F, Kazerooni Y, Zolghadr J.** Evaluation of sperm's chromatin quality with acridine orange test, chromomycin A3 and aniline blue staining in couples with unexplained recurrent abortion. *J Assist Reprod Genet*, v.26, p.591-596, 2009.
- Kenney RM, Evenson DP, Garcia MC, Love CC.** Relationships between sperm chromatin structure, motility, and morphology of ejaculated sperm, and seasonal pregnancy rate. *Biol Reprod Mono*, n.1, p.647-653, 1995.
- Khalifa TA, Rekkas CA, Lymberopoulos AG, Sioga A, Dimitriadis I, Papanikolaou T.** Factors affecting chromatin stability of bovine spermatozoa. *Anim Reprod Sci*, v.104, p.143-163, 2008.
- Krayevsky AA, Victorova LS, Arzumanov AA, Jasko MV.** Terminal deoxy nucleotidyl transferase : catalysis of DNA (oligodeoxynucleotide) phosphorylation. *Pharmacol Ther*, v.85, p.165-173, 2000.
- Love CC.** The sperm chromatin structure assay: a review of clinical applications. *Anim Reprod Sci*, v.89, p.39-45, 2005.
- Love CC, Kenney RM.** Scrotal heat stress induces altered sperm chromatin structure associated with a decrease in protamine disulfide bonding in the stallion. *Biol Reprod*, v.620, p.615-620, 1999.
- Lymberopoulos AG, Khalifa TA.** Sperm chromatin stability during in vitro manipulation of beef bull semen. *Reprod Domest Anim*, v.45, p.307-314, 2010.
- McMaster GK, Carmichael GG.** Analysis of single- and double-stranded nucleic acids on polyacrylamide and agarose gels by using glyoxal and acridine orange. *Proc Natl Acad Sci USA*, v.74, p.4835-4838, 1977.
- Martin G, Sabido O, Durand P, Levy R.** Cryopreservation induces an apoptosis-like mechanism in bull sperm. *Biol Reprod*, v.71, p.28-37, 2004.
- Martins CF, Dode MN, Bão SN, Rumpf R.** Método do TUNEL: uma ferramenta alternativa para avaliar a integridade do DNA de espermatozoides bovinos. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2007a. 26p.
- Martins CF, Dode MN, Bão SN, Rumpf R.** The use of the acridine orange test and the TUNEL assay to assess the integrity of freeze-dried bovine spermatozoa DNA. *Genet Mol Res*, v.6, p.94-104, 2007b.
- Ménézo Y, Dale B, Cohen M.** DNA damage and repair in human oocytes and embryos: a review. *Zygote*, v.18, p.357-365, 2010.
- Morrell JM, Johannisson A, Dalin AM, Hammar L, Sandebert T, Rodriguez-Martinez H.** Sperm morphology and chromatin integrity in Swedish warmblood stallions and their relationship to pregnancy rates. *Acta Vet Scand*, v.50, 2008. doi: 10.1186/1751-0147-50-2.
- Motea EA, Berdis AJ.** Terminal deoxy nucleotidyl transferase: the story of a misguided DNA polymerase.



Biochim Biophys Acta, v.1804, p.1151-1166, 2010.

Negoescu A, Guillermet C, Lorimier P, Brambilla E, Labat-Moleur F. Importance of DNA fragmentation in apoptosis with regard to TUNEL specificity. *Biomed Pharmacother*, v.52, p.252-258, 1998.

Paul C, Murray AA, Spears N, Saunders PT. A single, mild, transient scrotal heat stress causes DNA damage, subfertility and impairs formation of blastocysts in mice. *Reproduction*, v.136, p.73-84, 2008.

Paul C, Teng S, Saunders PT. A single, mild, transient scrotal heat stress causes hypoxia and oxidative stress in mouse testes, which induces germ cell death. *Biol Reprod*, v.80, p.913-919, 2009.

Pérez-Crespo M, Pintado B, Gutiérrez-Adán A. Scrotal heat stress effects on sperm viability, sperm DNA integrity, and the offspring sex ratio in mice. *Mol Reprod Dev*, v.75, p.40-47, 2008.

Peters J. The role of genomic imprinting in biology and disease: an expanding view. *Nat Rev Genet*, v.15, p.517-530, 2014.

Reik W, Dean W, Walter J. Epigenetic reprogramming in mammalian development. *Science*, v.293, p.1089-1093, 2001.

Ribas-Maynou J, García-Peiró A, Fernández-Encinas A, Abad C, Amengual MJ, Prada E, Navarro J, Benet J. Comprehensive analysis of sperm DNA fragmentation by five different assays: TUNEL assay, SCSA, SCD test and alkaline and neutral Comet assay. *Andrology*, v.1, p.715-722, 2013.

Rocha HLOG, Belletti, ME, Marcolini TT, Amorim DAZ. Uso de laranja de acridina e azul de toluidina na avaliação da fertilidade masculina. *Biosci J*, v.18, p.67-77, 2002.

Roux C, Dadoune JP. Use of the acridine orange staining on smears of human spermatozoa after heat-treatment: evaluation of the chromatin condensation. *Andrologia*, v.21, p.275-280, 1989.

Samejima K, Earnshaw WC. Trashing the genome: the role of nucleases during apoptosis. *Nat Rev Mol Cell Biol*, v.6, p.677-688, 2005.

Serafini R, Romano JE, Varner DD, Di Palo R, Love CC. Sperm DNA assays and their relationship to sperm motility and morphology in bulls (*Bos Taurus*). *Anim Reprod Sci*, v.159, p.77-86, 2015.

Setchell BP. The Parkes Lecture. Heat and the testis. *J Reprod Fertil Suppl*, n.114, p.179-194, 1998.

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.1073-1085, 2011.

Sterzik K, Rosenbusch B, Sasse V, Wild E, Hütter W, Wolf A. The acridine orange test. A new parameter in assessing the fertilizing capacity of spermatozoa. *Zentralbl Gynakol*, v.111, p.1361-1367, 1989.

Sutovsky P, Neuber E, Schatten G. Ubiquitin-dependent sperm quality control mechanism recognizes spermatozoa with DNA defects as revealed by dual ubiquitin-TUNEL assay. *Mol Reprod Dev*, v.61, p.406-413, 2002.

Tejada RI, Mitchell JC, Norman A, Marik JJ, Friedman S. A test for the practical evaluation of male fertility by acridine orange (AO) fluorescence. *Fertil Steril*, v.42, p.87-91, 1984.

Walters AH, Saacke RG, Pearson RE, Gwazdauskas FC. The incidence of apoptosis after IVF with morphologically abnormal bovine spermatozoa. *Theriogenology*, v.64, p.1404-1421, 2005.

Waterhouse KE, Haugan T, Kommisrud E, Tverdal A, Flatberg G, Farstad W, Evenson DP, De Angelis PM. Sperm DNA damage is related to field fertility of semen from young Norwegian Red bulls. *Reprod Fertil Dev*, v.18, p.781-788, 2006.

Zhao XM, Ren JJ, Zhao SJ, Cui LS, Hao HS, Wang HY, Du WH, Qin T, Liu Y, Wang D, Zhu HB. Apoptosis-like events and in vitro fertilization capacity of sex-sorted bovine sperm. *Reprod Domest Anim*, v. 49, p.543-549, 2014.
