

# Avaliação da integridade cromatínica de espermatozóides de galos (*Gallus gallus*, Linnaeus, 1758) de linhagem pesada em duas idades

Jaqueline Melo SOARES<sup>1</sup>  
Marcelo Emílio BELETTI<sup>1</sup>

1 - Centro de Ciências Biomédicas da Universidade Federal de Uberlândia,  
Umuarama - MG

**Correspondência para:**  
JAQUELINE MELO SOARES  
Centro de Ciências Biomédicas.  
Universidade Federal de Uberlândia  
Av: Pará, 1720  
38405-320 - Umuarama - MG  
soaresjaqueline@uol.com.br  
mebeletti@centershop.com.br

Recebido para publicação: 06/10/2003  
Aprovado para publicação: 15/03/2005

## Resumo

Na avicultura, a avaliação de fertilidade em machos é de extrema importância, para garantir uma melhor produção de ovos férteis. As técnicas para avaliação de fertilidade em galos são pouco exploradas, sendo que na maioria das vezes, a avaliação é feita por amostragem e levando em consideração, apenas fatores morfofisiológicos, diretamente relacionados com o espermatozóide. Mas é sabido que, em outras espécies, além dos fatores morfofisiológicos, existem problemas intrínsecos ao espermatozóide, como a baixa compactação da cromatina, que pode levar a distúrbios de fertilidade, que na maioria das vezes não são diagnosticados. O objetivo desse trabalho foi a adaptação de técnicas de avaliação da cromatina, já descritas em outras espécies, para aves de linhagem pesada (*Gallus gallus*, Linnaeus, 1758), correlacionando as alterações cromatínicas com as alterações morfológicas e com a fertilidade. Para tanto, sêmen de galo com diferentes níveis de fertilidade, foram utilizados em diferentes métodos para identificação de alterações na cromatina, utilizando os corantes azul de toluidina e alaranjado de acridina. As avaliações demonstraram que esfregaços de sêmen fresco de galo com posterior fixação geram artefatos que levam a alterações na forma da cabeça e na integridade da cromatina, não sendo indicados em métodos de avaliação de fertilidade. Apesar de todos os métodos testados apresentarem falhas metodológicas e um certo grau de subjetividade, o método que gerou melhores resultados foi a mistura de uma gota de sêmen conservado em formol salina e uma gota do alaranjado de acridina sobre lâmina de microscopia, com posterior secagem e observação em microscopia de fluorescência com filtro de excitação azul. Pelo método verificou-se que alterações na compactação da cromatina de espermatozóides de galo geralmente não são acompanhadas por alterações morfológicas e que geralmente as alterações morfológicas de espermatozóides de galo são acompanhadas por alterações na compactação da cromatina e que esse é um importante fator na determinação da fertilidade de galos.

## Palavras-chave:

Galo.  
Espermatozóide.  
Compactação de cromatina.  
Azul de toluidina.  
Alojarjado de acridina.

## Introdução

A franca expansão da avicultura e a necessidade de abastecimento dos mercados consumidores de proteína de origem animal, levaram ao avanço no melhoramento genético das aves, elevando seu potencial produtivo. A garantia de volume de aves

comerciais para o abate depende principalmente de matrizes de linhagem pesada (*Gallus gallus*, Linnaeus, 1758). Partindo dessa realidade, as matrizes são exploradas ao máximo em seus recursos reprodutivos, sendo a fertilidade dos machos, de fundamental importância na produção de ovos férteis.

Um lote de aves reprodutoras geralmente entra em pico de produção de ovos na 30<sup>a</sup> à 35<sup>a</sup> semana de vida e são descartadas por volta da 58<sup>a</sup> semana, podendo essa idade de abate ser prorrogada, de acordo com a necessidade do mercado. Com o passar do tempo, a produção e a fertilidade do lote diminuem consideravelmente<sup>1</sup>, havendo inclusive necessidade de reposição de parte dos machos, recurso utilizado para melhorar a fertilização. Assim, a avaliação da fertilidade de cada reprodutor é de extrema relevância, sendo necessários métodos precisos e de baixo custo.

As técnicas para diagnóstico de fertilidade em galos são pouco exploradas. Muitas vezes, os parâmetros fisiológicos como peso corporal, peso testicular, dieta alimentar e idade da ave são correlacionados a virilidade. Fatores morfofisiológicos facilmente evidenciados na microscopia de luz em preparados de sêmen fresco e diretamente relacionados com o espermatozóide, tais como motilidade, densidade, vitalidade e morfologia espermiática, também são usados para a avaliação da fertilidade do macho. Este tipo de metodologia vem sendo utilizado na rotina de avaliação da fertilidade de machos em mamíferos, contudo estudos têm demonstrado que esta avaliação não é suficiente para identificar algumas alterações espermiáticas que podem levar à subfertilidade, tais como alterações na compactação da cromatina dos espermatozóides. Como esta patologia não é evidenciada num exame de rotina, são necessários métodos específicos de avaliação dessa anomalia.

O objetivo desse trabalho procura adaptar técnicas de avaliação da compactação da cromatina, já descritas em outras espécies, para aves de linhagem pesada (*Gallus gallus*, Linnaeus, 1758), correlacionando as alterações cromatínicas com as alterações morfológicas e com a fertilidade.

## **Materiais e Métodos**

Foram obtidos 20 amostras de sêmen

de galo (*Gallus gallus*, Linnaeus, 1758) de duas diferentes idades, coletadas através de massagem cloacal, de acordo com a técnica descrita por Wilson<sup>2</sup>. Dez amostras foram de aves pertencentes a um lote com 35 semanas de idade, peso médio de 4,9 Kg e taxa de fertilidade de 99.43% de ovos férteis (Grupo I). As demais amostras foram coletadas de aves pertencentes a um lote com 60 semanas de idade, peso médio de 5,3 Kg e taxa de fertilidade de 96.41% de ovos férteis (Grupo II).

De cada amostra de sêmen foram produzidos 20 esfregaços com posterior fixação em mistura álcool-ácido acético 3:1 durante 1 minuto e lavadas em álcool 70% por 3 minutos. O restante de cada amostra foi conservado em formol-salina<sup>3</sup>.

### **Métodos Utilizando AT:**

#### **Método usual para sêmen de mamífero:**

1.1- Metade dos esfregaços foi avaliada segundo método de Beletti e Mello<sup>4</sup>, ou seja, após hidrólise ácida com HCl 4N por 15 minutos, coloca-se uma gota de solução de AT a 0,025% a pH 4 em tampão MacIlvaine, cobre-se com lamínula observa-se através de microscopia óptica.

Métodos alternativos também foram testados como estão descritos a seguir:

1.2- Mistura de uma gota de sêmen conservado em formol salina e uma gota do corante sobre lâmina de microscopia. Após homogeneização a mistura foi coberta com lamínula, sendo feita a observação após 5 minutos em microscopia óptica.

1.3- Mistura de uma gota de sêmen conservado em formol salina e uma gota do corante sobre lâmina de microscopia com posterior secagem e observação em microscopia de luz comum.

1.4- Mistura de uma gota de sêmen conservado em formol salina e uma gota do corante sobre lâmina de microscopia, com posterior secagem, desidratação em álcool, diafanização em xilol e montagem da lâmina com Entellan<sup>®</sup> e lamínula, para observação em microscopia de luz comum.

1.5- Mistura de uma gota de sêmen conservado em formol salina e uma gota do corante sobre lâmina de microscopia, com posterior secagem, lavagem em água destilada, secagem, diafanização e montagem da lâmina, com Entellan® e lamínula, para observação em microscopia de luz comum.

#### **Métodos Utilizando AO:**

##### **Método usual para sêmen de mamífero:**

2.1- Na coloração com AO a metodologia modificada de Tejada et al<sup>5</sup> é a mais indicada para esfregações de mamífero. Foi utilizada uma solução “stock” constituída de 1g de alaranjado de acridina diluído em 1000 ml de água destilada. A solução de coloração foi preparada tomando-se 10 ml da solução “stock” e adicionando 40 ml de ácido cítrico a 0,1 M e 2,5 ml de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O a 0,3 M. O pH final da solução preparada foi de 2,5 com concentração de corante de 0,019%. O método consistia na coloração do esfregaço por 5 minutos, com posterior secagem e observação em microscopia de fluorescência com filtro de excitação azul.

Métodos alternativos também foram testados como estão descritos a seguir:

2.2- Mistura de uma gota de sêmen conservado em formol salina e uma gota de AO sobre lâmina de microscopia com posterior secagem e observação em microscopia de fluorescência com filtro de excitação azul.

2.3- Desnaturação da cromatina, através de tratamento térmico a 60° C em solução fisiológica por cinco minutos. Em seguida foi colocada uma gota de corante, com posterior homogeneização, secagem e observação em microscopia de fluorescência com filtro de excitação azul.

2.4- Mistura de uma gota de sêmen conservado em formol salina e uma gota do corante sobre lâmina de microscopia. Após homogeneização a mistura foi coberta com lamínula, sendo feita a observação após 5 minutos em microscopia de fluorescência com filtro de excitação azul.

As lâminas foram observadas em fotomicroscópio Polyvar-Reichert Jung, em modo de operação transiluminação e fluorescência com filtro azul, no Laboratório de Histologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade Federal de Uberlândia.

Foram calculados os Coeficientes de Variação das 10 avaliações realizadas para cada animal e posteriormente o coeficiente de variação médio, incluindo grupo I e II. Foi realizado teste “t” não pareado comparando os grupos I e II para diferenças quanto à quantidade de espermatozoides com anomalias na cromatina e espermatozoides com anomalias morfológicas. Foram calculados os coeficientes de correlação entre a quantidade de espermatozoides com anomalias morfológicas e os com anomalias cromatínicas de duas diferentes maneiras: levando em consideração todos os espermatozoides avaliados e considerando somente os espermatozoides com defeitos morfológicos. Também foi realizado teste “p” pareado comparando a quantidade de espermatozoides morfológicamente anômalos com alterações de cromatina e espermatozoides morfológicamente anômalos e sem defeito de cromatina. Em todos os testes estatísticos foi utilizado nível de significância  $\alpha = 0,05$ .

## **Resultados**

### **Esfregaços:**

Os esfregaços, independente da técnica de coloração utilizada, apresentaram todos os espermatozoides como tendo alterações na cromatina, ou seja, todos os espermatozoides ficaram violetas quando corados com AT (Método 1.1) e vermelhos quando corados com AO (Método 2.1). Outras observações indicaram que as cabeças dos espermatozoides apresentavam-se na forma de um bastão retilíneo e com pequenas fraturas transversais. (Figura 1A e 1B).

### **Sêmen preservado em formol-salina:**

Através dos preparados obtidos do

sêmen preservado em formol-salina foi possível observar que os espermatozoides possuem na realidade a cabeça levemente helicoidal.

#### Métodos com AT:

No método 1.2 os espermatozoides apresentaram-se corados em azul intenso. Outras observações indicaram a existência

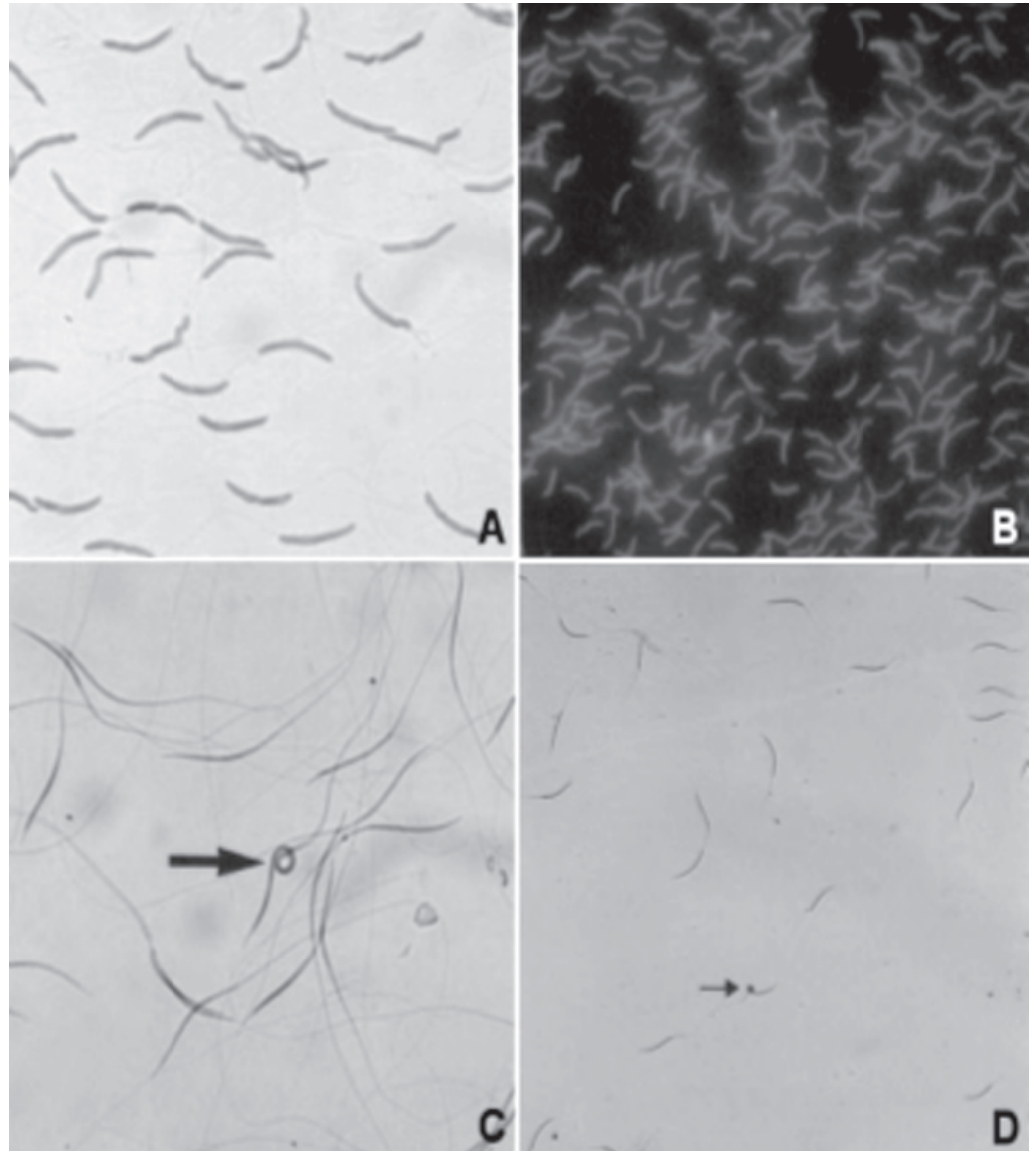


Figura 1 - A: Esfregação de espermatozói de corado com AT, com todas as células apresentando coloração violeta, devido às fraturas do núcleo e penetração abundante de corante. (Aumento de 1.200X) B: Esfregação de espermatozói de corado com AO, com todas as células apresentando coloração vermelha, devido às fraturas do núcleo e penetração abundante de corante. (Aumento de 500X) C: Método 1.2 (Mistura de uma gota de sêmen conservado em formol salina e uma gota de AT sobre lâmina de microscopia. Após homogeneização a mistura foi coberta com lamínula, sendo feita a observação após 5 minutos em microscopia de luz comum), apresentando os espermatozoides corados em azul intenso. Observa-se um espermatozói de com cabeça enrolada e levemente mais corada (seta). (Aumento de 1.200X) D: Método 1.3 (Mistura de uma gota de sêmen conservado em formol salina e uma gota de AT sobre lâmina de microscopia com posterior secagem e observação em microscopia de luz comum), apresentando os espermatozoides corados em azul intenso. Percebe-se espermatozói de apresentando dilatação na base da cabeça (seta). (Aumento de 500X)

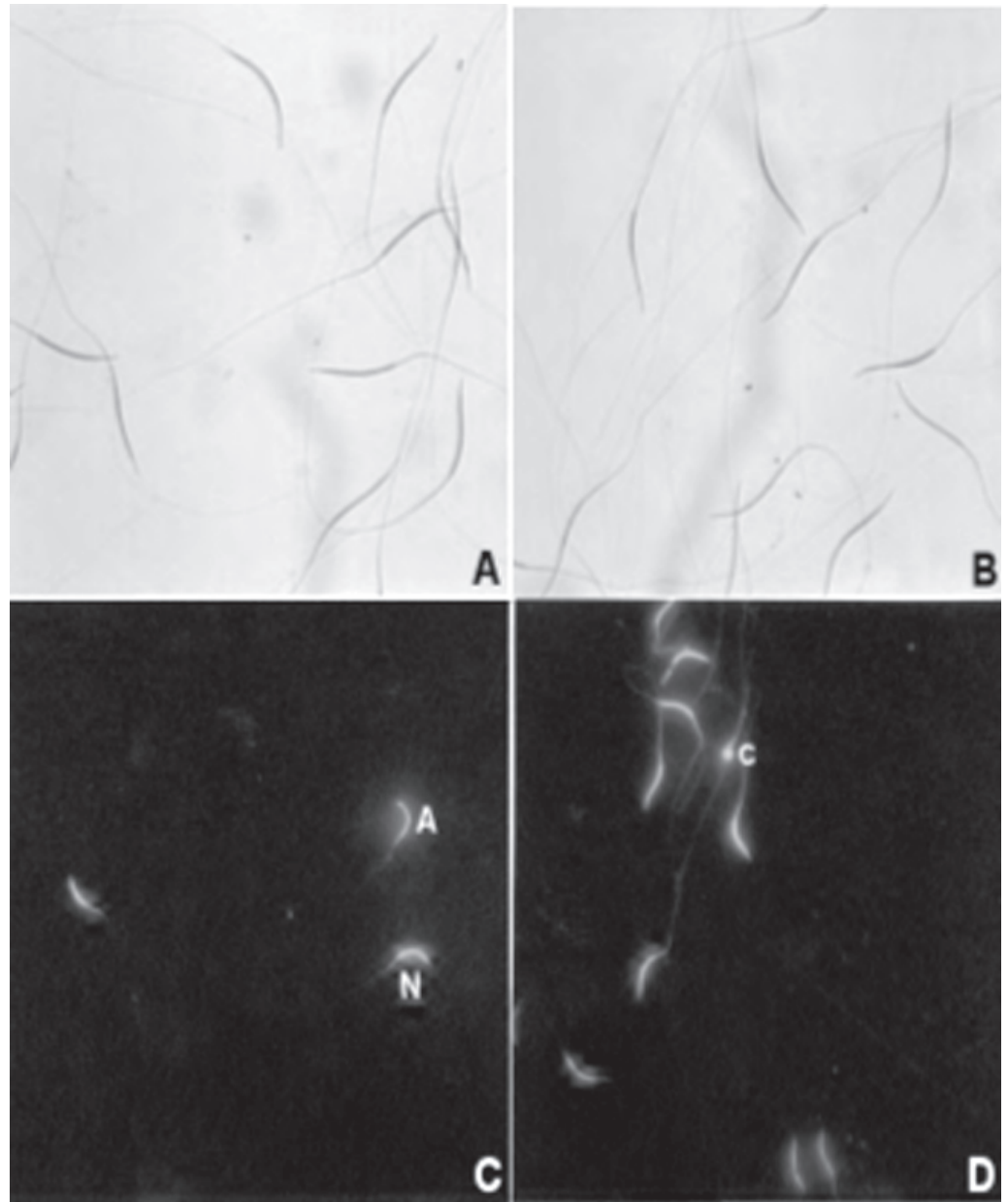


Figura 2 - A: Método 1.4 (Mistura de uma gota de sêmen conservado em formol salina e uma gota de AT sobre lâmina de microscopia, com posterior secagem, desidratação em álcool, diafanização em xilol e montagem da lâmina com Entellan® e lamínula, para observação em microscopia de luz comum), com espermatozoides corados em azul mais claro. (Aumento de 1.200X) B: Método 1.5 (Mistura de uma gota de sêmen conservado em formol salina e uma gota de AT sobre lâmina de microscopia, com posterior secagem, lavagem em água destilada, secagem, diafanização e montagem da lâmina, com Entellan® e lamínula, para observação em microscopia de luz comum), com espermatozoides corados em azul mais claro. (Aumento de 1.200X) C: Método 2.2 (Mistura de uma gota de sêmen conservado em formol salina e uma gota de AO sobre lâmina de microscopia com posterior secagem e observação em microscopia de fluorescência com filtro de excitação azul) mostrando parte dos espermatozoides corados em verde (cromatina normal-N) e parte em vermelho (cromatina anormal-A). (Aumento de 500X) D: Método 2.2 (Mistura de uma gota de sêmen conservado em formol salina e uma gota de AO sobre lâmina de microscopia com posterior secagem e observação em microscopia de fluorescência com filtro de excitação azul), parte da lâmina, onde a diferenciação estava dificultada, apresentando espermatozóide com cabeça arredondada (C), pequena, fortemente corada em vermelho e brilhante. (Aumento de 500X)

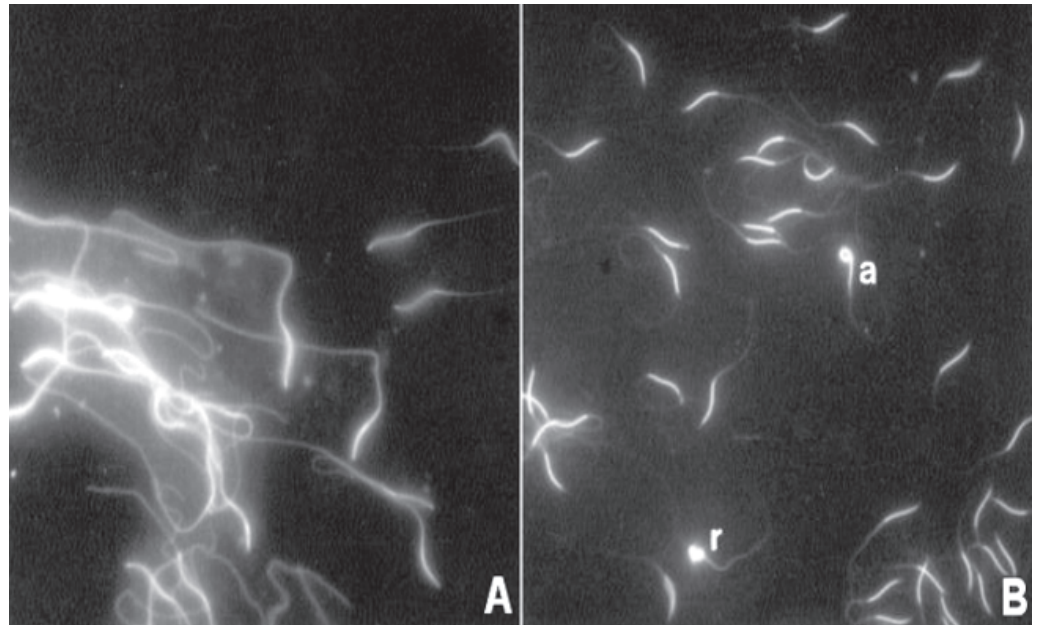


Figura 3 - A: Método 2.3 (Desnaturação da cromatina, através de tratamento térmico a 60° C em solução fisiológica por cinco minutos. Em seguida foi colocada uma gota de AO, com posterior homogeneização, secagem e observação em microscopia de fluorescência com filtro de excitação azul), com todos os espermatozoides corados em vermelho. (Aumento de 500X) B: Método 2.4 (Mistura de uma gota de sêmen conservado em formol salina e uma gota de AO sobre lâmina de microscopia. Após homogeneização a mistura foi coberta com laminula, sendo feita observação após 5 minutos em microscopia de fluorescência com filtro de excitação azul), com "background" levemente corado. Pode-se identificar dois defeitos morfológicos nessa figura: cabeça em anzol (a) e cabeça arredondada (r). (Aumento de 500X)

de cabeças coradas com diferentes intensidades, porém, devido às diferenças serem muito tênues, foi praticamente impossível quantificar os espermatozoides com cromatina normal dos com cromatina anormal (Figura 1C). O método 1.3 apresentou resultado foi bastante semelhante (figura 1D). Já nos métodos 1.4 e 1.5, os espermatozoides apresentaram-se corados em azul mais claro, mas ainda assim foi difícil a identificação de espermatozoides com cromatina anômala, não possibilitando a contagem diferencial dos espermatozoides (Figura 2A e 2B).

#### Métodos com AO:

O método 2.2 mostrou parte dos espermatozoides corados em verde e parte em vermelho, porém as lâminas apresentaram partes onde a diferenciação foi mais evidente (Figura 2C). Estes preparados foram utilizados para a contagem de 500 espermatozoides, diferenciando-se esperma-

tozoides com ou sem alterações de cromatina e com ou sem alterações morfológicas, sendo que os resultados obtidos estão demonstrados nas tabelas 1 e 2. Durante as observações foram verificadas colorações variando de verde ao vermelho intenso, sendo que geralmente os espermatozoides com anomalias morfológicas eram corados em vermelho. Os defeitos morfológicos observados foram cabeça em anzol, enrolada (Figura 1C), dobrada, com dilatação na base (Figura 1D) e arredondada, sendo que na maioria das vezes este último tipo apresentava cabeça pequena, fortemente corada em vermelho e brilhante (Figura 2D). No método 2.3 todos os espermatozoides apresentaram-se vermelhos (Figura 3A). Já no método 2.4 o fundo ficou levemente fluorescente e os espermatozoides apresentaram intensa variação na cor das cabeças dependendo da região da lâmina observada. Isto impossibilitou a contagem diferencial dos espermatozoides (Figura 3B).

Tabela 1- Média dos espermatozoides com anomalia cromatínica e coeficiente de variação (CV) das 10 avaliações feitas em cada animal. Uberlândia, Maio de 2004

Animais	Média de espermatozói- de com anomalias de cromatina	CV
Grupo I		
1	132	13.9
2	148	19.5
3	145	18.1
4	165	10.4
5	158	12.7
6	148	16.8
7	159	13.9
8	163	16
9	180	12.9
10	172	9.8
Grupo II		
1	212	8.8
2	214	12.3
3	189	4.8
4	207	8.3
5	211	12.6
6	235	11.6
7	191	11.8
8	253	10.5
9	255	7.2
10	227	8.4
Médias Totais.	188	12.02

Tabela 2- Médias dos espermatozoides com anomalia cromatínica e com anomalias morfológicas. Uberlândia, Maio de 2004

	Galos Novos	Galos Velhos
Anomalias de cromatínicas	156.8 <sup>a</sup>	219.4 <sup>b</sup>
Anomalias morfológicas	6.6 <sup>a</sup>	4.7 <sup>b</sup>

Letras diferentes na mesma linha indicam valores estatisticamente diferentes ( $\alpha=0,05$ ).

O coeficiente de correlação entre os espermatozoides com anomalias na cromatina e os espermatozoides com anomalias morfológicas foi -0,54, quando considerado o total de espermatozoides avaliados. Já quando foram considerados somente os espermatozoides anômalos morfológicamente, o coeficiente de correlação foi 0,97. O teste “t” pareado demonstrou que existe diferença na quantidade de espermatozoides

morfologicamente anômalos com alterações de cromatina e espermatozoides morfológicamente anômalos e sem defeito de cromatina (média de 5,52 e 1,16 respectivamente).

## Discussão

### Esfregaços:

Os métodos de coloração utilizando

esfregaços (Métodos 1.1 e 2.1) apresentaram todos os espermatozóides com alterações na cromatina. Isto evidentemente não é um resultado aceitável, pois as aves utilizadas neste experimento eram férteis. Portanto, este resultado é devido a algum tipo de artefato provocado pelo método utilizado. A outra parte do sêmen que foi preservado em formol-salina para posteriormente ser preparado, mostrou que a cabeça dos espermatozóides de galo possui uma forma levemente helicoidal<sup>6</sup>, diferente da forma em bastão observada nos esfregaços. Apesar destas observações diferirem de Gilbert<sup>7</sup>, que afirma que a cabeça do espermatozóide de galo é curva, a estrutura levemente helicoidal explicaria as observações dos esfregaços. Quando depositada em superfície plana, a cabeça helicoidal acaba tomando a forma em bastão, exibindo pequenas fraturas transversais provocada pela alteração da forma. Isto provavelmente alterou o acesso das moléculas de corante, fazendo com que todos os espermatozóides fossem corados como possuindo alterações na cromatina. Na realidade estas alterações existem, porém foram provocadas pela metodologia utilizada. Assim, foram testados métodos alternativos, utilizando o material preservado em formal-salina (Métodos: 1.2, 1.3, 1.4, 1.5, 2.1, 2.2, 2.3). Esses preparados foram montados com uma gota de sêmen homogeneizada a uma gota de corante, havendo algumas variantes, sendo essa mistura distribuída levemente sobre a lâmina, sem danos para as células.

#### Métodos com AT

Os preparados realizados com AT entre lâmina e lamínula (Método 1.2) ou com posterior secagem da lâmina e observação sem o uso da lamínula (Método 1.3), mostraram todos os espermatozóides com coloração azul intensa. Isto demonstra que os espermatozóides de galo possuem cromatina mais frouxa que o da maioria dos mamíferos, pois para se obter visualização semelhante nestes animais é necessário tratamento ácido ou térmico antes da

coloração. Este tratamento prévio disponibiliza grupos fosfatos que posteriormente se ligam ao corante, aumentando a intensidade de coloração e mesmo provocando metacromasia<sup>3,8,9,10,11,12</sup>. Em espermatozóides de galo o tratamento prévio não foi necessário porque grande número de fosfatos estão livres para se ligarem às moléculas de corante, mesmo na cromatina normal. Contudo, com uma observação cuidadosa foi possível perceber a existência de espermatozóides que se coravam um pouco mais intensamente. Esta diferença era muito tênue, não permitindo a contagem diferencial de espermatozóides com cromatina normal (mais claros) e com cromatina anômala (mais escuros). Devido a tênue diferença entre espermatozóides anômalos e normais, foram feitas tentativas de montagem dos preparados, através de desidratação e diafanização (Método 1.4). Porém não houve separação adequada dos espermatozóides normais dos anômalos, corando todos em azul claro, não possibilitando assim a contagem diferencial. Outra tentativa de montagem foi feita sem desidratação, apenas com lavagem da lâmina em água destilada e diafanização (Método 1.5). Nesse caso, o resultado foi muito semelhante ao anterior. Portanto, os métodos utilizando AT não se mostraram satisfatórios na avaliação da compactação de cromatina de espermatozóides de frango.

#### Métodos com AO

Dentre os métodos alternativos realizados com AO, a mistura de uma gota de sêmen conservado em formol salina e uma gota do corante sobre lâmina de microscopia com posterior secagem e observação em microscopia de fluorescência (Método 2.2) foi o que apresentou melhor resultado, possibilitando a contagem diferencial dos espermatozóides com alteração de cromatina. Contudo, ainda permaneceu longe do ideal, pois numa mesma lâmina existiam regiões onde a diferenciação era evidente e outras onde era praticamente impossível. A contagem



diferencial foi realizada nas regiões onde a diferenciação era mais evidente.

Objetivando, potencializar a diferenciação entre cromatina anômala e normal, foi realizada a desnaturação térmica antes da coloração com AO (Método 2.3). Nesse método todos os espermatozoides apresentaram-se corados em vermelho. A desnaturação da cromatina possibilitou a ligação de grande quantidade de moléculas de corante aos fosfatos do DNA, permitindo a ressonância dos elétrons entre elas, tornando a coloração de todas os espermatozoides vermelha, característica de DNA desnaturado. Isto também demonstra que a cromatina de espermatozoides de galo é mais frouxa que a cromatina de espermatozoide da maioria dos mamíferos, pois quando este tratamento é feito com espermatozoides destes animais, somente aqueles com alteração na cromatina coram-se em vermelho.

Na utilização da lamínula cobrindo a mistura de sêmen e AO (Método 2.4) o “background” ficou levemente corado e os espermatozoides apresentaram intensa variação na cor das cabeças dependendo da região da lâmina observada. Isto impossibilitou a contagem diferencial dos espermatozoides.

Apesar dos métodos com AO também apresentarem falhas, eles foram melhores que os métodos com AT na identificação de alterações na cromatina de espermatozoides de galo. O coeficiente de variação médio em dez avaliações para cada amostra foi de 12,02, demonstrando que apesar das lâminas não corarem homogeneamente em toda sua extensão, o método possui uma razoável repetibilidade, viabilizando seu uso.

#### **Avaliação geral**

Segundo Hammadeh et al.<sup>13</sup>, submetendo sêmen humano a exames com Azul de Anilina, não obtiveram correlação entre condensação cromatínica do espermatozoide e defeitos de morfologia. Assim, concluíram que compactação da cromatina é parâmetro adicional para a avaliação da fertilidade no macho, sendo este independente de outros

parâmetros convencionais. No presente trabalho também fica evidente a necessidade da análise na compactação de cromatina, em sêmen de galo, obtendo resultados independentes de outros parâmetros convencionais de avaliação de sêmen. Como descrito em Material e Métodos, a porcentagem de ovos férteis 99.43% do grupo I é maior do que 96.41% do grupo II. Por isso era esperado que o número de espermatozoides anômalos no grupo II fosse maior. Contudo, como demonstrado na tabela 2, o número de espermatozoides morfológicamente anômalos foi maior no grupo I. Já o número de espermatozoides com alterações na cromatina foi muito maior no grupo II. Isto reafirma ainda mais a necessidade de se utilizar métodos de identificação de alterações cromatínicas quando se avalia a fertilidade de galos.

Quando considerado o total de espermatozoides avaliados, o coeficiente de correlação entre os espermatozoides com anomalias na cromatina e os espermatozoides com anomalias morfológicas foi -0,54. Isto indica que nas amostras avaliadas existe uma correlação negativa entre estas duas patologias, ou seja, geralmente quando o número de espermatozoides com anomalias morfológicas aumenta, o número de espermatozoides com anomalias de cromatina diminui. Isto poderia indicar que os espermatozoides com anomalias morfológicas geralmente possuem cromatina normal. Porém, quando são levados em consideração somente os espermatozoides com anomalias morfológicas, o coeficiente de correlação entre essas anomalias é de 0,97 e o número de espermatozoides com anomalias de cromatina é maior dos que os com cromatina normal, deixando claro que geralmente os espermatozoides anômalos morfológicamente possuem alterações cromatínicas.

#### **Conclusões**

A coloração com AO apesar de possuir falhas que levam a um certo grau de subjetividade, mostrou-se útil na avaliação da compactação da cromatina.

A coloração com AT foi pouco eficiente na avaliação da compactação da cromatina.

Esfregaços de sêmen fresco de galo com posterior fixação geram artefatos que levam a alterações na forma da cabeça e na integridade da cromatina, não sendo

indicados em métodos de avaliação de fertilidade.

Os espermatozoides anômalos morfológicamente, geralmente possuem alterações cromatínicas, mas nem sempre os que possuem alterações cromatínicas apresentam alterações morfológicas.

## Evaluation of chromatin integrity of fowl spermatozoa (*Gallus gallus*, Linnaeus, 1758) from meat chicken in two ages

### Abstract

In poultry breeding, male fertility has extreme importance to assure a better production of fertile eggs. Evaluation techniques for fertility of fowls are not well explored and in most cases, the evaluation is done through sampling considering only morphophysiological factors directly related with the spermatozoon. It's known that in other species, besides morphophysiological factors, there are intrinsic problems to the spermatozoon such as less chromatin condensation that can lead to fertility problems that in most cases are not diagnosed. The purpose of this work was the adaptation of techniques of chromatin evaluation for chicken (*Gallus Gallus*, Linnaeus, 1758) which have already been described in other species, correlating the chromatin alterations with the morphological alterations and the fertility. Fowl semen samples with different levels of fertility were used for test different methods to identify chromatin alterations using toluidine blue and acridine orange die. Evaluations have shown that smears of fresh semen with posterior fixation generate artifacts that change the head shape and the chromatin integrity not being indicated in methods of fertility evaluation. Although all the tested methods have presented methodology imperfections and some certain degree of subjectivity, the method that has generated best results was the mixture of one semen drop conserved in buffered phormol and a drop of acridine orange on microscopy slide with posterior staining and observation in fluorescence microscopy with blue excitation filter. Through this method it was verified that alterations in the chromatin condensation of fowl spermatozoa are generally not followed by morphological alterations and that generally the morphologic alterations of fowl spermatozoa are generally followed by alterations in chromatin condensation. This is an important factor in the determination of the fowl fertility.

### Key-words:

Fowl.  
Spermatozoon.  
Chromatin condensation.  
Toluidine blue.  
Acridine orange.

### Referências

- 1 LEESON, S.; SUMMERS, J. D. **Comercial poultry nutrition**. 2. ed. Guelph, Ontario: University Books, 1997. 342 p.
- 2 WILSON, J. L. Métodos para valorar la capacidad reproductiva en gallos reproductores. **Avicultura Profesional**, v. 6, n. 3, p. 76-81, 1988.
- 3 WEITZE, K. F. **Untersuchung zur tiefgefrierkon-**

**servierung von kaninchensperma**. 1977. 165 f. Tese (Livre docência)-Tierärztliche Hochschule, Hannover, 1977.

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

5 TEJADA, R. I. et al. A test the practical evaluation of male fertility by acridine orange (LA) fluorescence. **Fertility and Sterility**, v. 42, p. 87-91, 1984.

- 6 GOES, R. M.; DOLDER, H. Cytological steps during spermiogenesis in the house sparrow (*Passer domesticus*, Linnaeus). **Tissue & Cell**, v. 34, n. 4, p. 273-282, 2002.
- 7 GILBERT, A. B. Ciclos reprodutivos: aves domésticas. In: HAFEZ, E.S.Z. **Reprodução animal**. São Paulo: Manole, 1982. p. 488-515.
- 8 MELLO, M. L. S. DNP variants in morphologically normal spermatozoa. In CONGRESSO LATINO-AMERICANO DE GENÉTICA,3;1977, Montevideu. **Resumos...1977**,p. 250.
- 9 EVENSON, D. P.; DARZYNKIEWICZ, Z; MELAMED, M. R. Relation of mammalian sperm chromatin heterogeneity to fertility. **Science**, v. 210, p. 1131-1133, 1980.
- 10 BELETTI, M. E. MELLO, M. L. S. Methodological variants contributing to detection of abnormal DNA-protein complexes in bull spermatozoa. **Brazilian Journal of Genetics**, v. 19, n. 1, p. 73-90, 1996.
- 11 EVENSON, D.P.; LARSON, K.L.; JOST, LK. Sperm chromatin structure assay is useful for fertility assessment. **Methods Cell Science**, v. 22, n.2-3, p.169-89, 2002.
- 12 ROCHA, H. L. O. G.; BELETTI, M. E.; MARCOLINI, T.T.; AMORIM, D. A. Z. The use of acridine orange and toluidine blue in the evaluation of male fertility. **Bioscience Journal**, v. 18, n. 1, p. 65-77, 2002
- 13 HAMMADEH, ME. et al. Predictive value of sperm chromatin condensation (aniline blue staining) in the assessment of male fertility. **Archives of Andrology** v. 46, n. 2, p. 99-104, Mar-Apr, 2001.