

USO DE LARANJA DE ACRIDINA E AZUL DE TOLUIDINA NA AVALIAÇÃO DA FERTILIDADE MASCULINA

THE USE OF ACRIDINE ORANGE AND TOLUIDINE BLUE IN THE EVALUATION OF MALE FERTILITY

Haroldo Luís Oliva Gomes ROCHA*

Marcelo Emílio BELETTI**

Túlio Tadeu MARCOLINI***

Divina Augusta Zardini AMORIM****

RESUMO: Sabendo que alterações no complexo DNA-proteína de espermatozóides humanos têm grandes repercussões sobre a fertilidade masculina, objetivou-se avaliar a eficácia das colorações com Laranja de Acridina (LA) e Azul de Toluidina (AT) na identificação de tais alterações, além de verificar possíveis relações com outros parâmetros seminais. Avaliou-se sêmen de indivíduos férteis e subférteis utilizando-se os seguintes parâmetros: concentração, morfologia, motilidade e anomalias do complexo DNA-proteína. As colorações utilizando AT obtiveram maior correlação com os parâmetros seminais convencionais quando comparados com as colorações utilizando LA. Obteve-se diferença significativa entre o grupo de pacientes férteis e subférteis quanto a concentração de espermatozóides, morfologia, motilidade e colorações com AT. Concluiu-se que, apesar de serem variáveis independentes, os parâmetros seminais convencionais e as metodologias de coloração com AT são úteis na avaliação da fertilidade masculina.

UNITERMOS: Laranja de Acridina, Azul de Toluidina, Espermatozóides humanos, Cromatina, DNA.

* Acadêmico do Curso de Medicina da Universidade Federal de Uberlândia

** Professor Doutor, Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade Federal de Uberlândia

*** Professor do Departamento de Ginecologia da Universidade Federal de Uberlândia

**** Biomédica da Fecunda – Instituto de Reprodução Humana

INTRODUÇÃO

Durante a espermiogênese dos mamíferos, as histonas somáticas, proteínas nucleares básicas, são substituídas em parte ou totalmente por nucleoproteínas específicas dos espermatozóides, denominadas protaminas ou proteínas queratinosas, as quais possuem caráter básico, ricas em arginina e cisteína oxidada (BLOCH, 1969). Essas proteínas formam cromatina extremamente condensada e inerte, devido a neutralização do esqueleto fosfodiéster do DNA pela interação dos resíduos amina das proteínas com grupos fosfatos das fitas do DNA (LOIR; LINNEAU, 1978; EVENSON; DARZYNKEIWICZ; MELAMED, 1980; COURTENS; LOIR, 1981; BALHORN, 1982; BELETTI; MELLO 1996), sendo esta interação denominada complexo DNA-proteína.

Para se verificar a fertilidade masculina em laboratório, geralmente, são usados parâmetros seminais convencionais tais como: densidade, motilidade, morfologia, vitalidade e contaminação. A detecção de anomalias no complexo DNA-proteína em espermatozóides é freqüentemente negligenciada (WANG et al., 1991; BELETTI; MELLO, 1996).

Sob circunstâncias normais de dano no complexo DNA-proteína, esse pode ser reparado pelo oócito. No entanto, quando o dano no DNA é mais

acentuado, esse persiste durante o desenvolvimento embrionário, induzindo apoptose e fragmentação do embrião recente ou levando à morte tardiamente (TWIGG, IRVINE; AITKEN, 1998).

Aumento na desnaturação do DNA está associada a infertilidade ou subfertilidade, porém não explica todas as falhas na fertilização (DURAN et al., 1998; BELETTI; MELLO, 1996). No entanto, em outros trabalhos (HAMMADEH et al., 1998; EGGERT-KRUSE et al., 1996; ANGELOPOULOS et al., 1998) não se encontrou correlação significativa entre esses parâmetros. Foram encontradas baixas correlações entre condensação da cromatina e outros parâmetros utilizados no espermograma de rotina (EGGERT-KRUSE et al., 1996; SPANÒ et al., 1998; ROCHA, BELETTI; COSTA, 1999), provando que testes de condensação de cromatina não estão necessariamente associados com os critérios convencionais, podendo ser um método independente de verificação de qualidade do sêmen (SPANÒ et al., 1998). Ao contrário, observou-se correlação significativa entre maturidade nuclear e morfologia dos espermatozóides (ANGELOPOULOS et al., 1998; MELLO, 1982; BALLACHEY; HOHENBOKE; EVENSON, 1987; BRITTO; MELLO, 1988).

Sabendo das grandes repercussões que a compactação do complexo DNA-proteína têm sobre

a fertilidade, é de grande valia diagnosticar anomalias nesse complexo, tanto para uso de técnicas de inseminação artificial como para rastreamento de possíveis causas de infertilidade. Para realização desse diagnóstico existem vários métodos, dentre os quais podemos citar a “metacromasia induzida” com Azul de Toluidina (AT) e coloração com Laranja de Acridina (LA).

Tendo em vista que testes que permitem a identificação de anormalidades no complexo DNA-proteína não são realizados nos espermogramas de rotina, e que esses tipos de anomalias podem ter grande repercussões sobre a fertilidade, objetivou-se neste trabalho avaliar a eficácia das colorações com LA e AT. Além disso verificou-se possíveis correlações entre outras alterações espermáticas e anormalidades no complexo DNA-proteína, pois o assunto ainda é controverso e poderá possibilitar avaliação mais completa da subfertilidade ou infertilidade humana.

MATERIAL E MÉTODOS

Todo o protocolo deste estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Uberlândia.

Pacientes

Todos os pacientes e voluntários assinaram um termo de consentimento permitindo a utilização das amostras de sêmen doadas em exames convencionais e nos experimentos propostos por este estudo.

Um total de 31 casais foram divididos em 2 grupos. As amostras do grupo controle (Grupo 1), composto por 7 integrantes, foram obtidas de homens cujas esposas tivessem engravidado há 1 ano, no máximo. Vale ainda ressaltar que no período compreendido entre a última gravidez da esposa e a coleta das amostras de sêmen utilizadas neste trabalho, os homens do Grupo 1 relataram não ter passado por nenhuma cirurgia nem ter sido acometido por qualquer doença nas gônadas ou genitália, bem como não ter sofrido febre nos últimos 60 dias.

Já as amostras de sêmen do grupo de pacientes (Grupo 2), composto por 24 integrantes, foram obtidas de homens que, juntamente com suas esposas, procuraram auxílio médico para terem filhos.

Análise convencional do sêmen

As amostras de sêmen foram coletadas através de masturbação, com abstinência sexual de 2 a 7 dias, em frasco de plástico (poliestireno) estéril, no próprio laboratório.

A concentração e a motilidade foram avaliadas segundo os critérios da Organização Mundial da Saúde (WORD HEALTH ORGANIZATION, 1992).

Já a avaliação da morfologia foi feita de acordo com critério estrito (KRUGER, 1986). Utilizou-se para a avaliação microscópio de luz Reichert-Jung modelo Polyvar com objetiva de 100X e óleo de imersão.

Coloração com Laranja de Acridina e Azul de Toluidina

Os esfregaços foram confeccionados utilizando 10 ml de sêmen com ou sem lavagem prévia. A lavagem consistiu na diluição de 0,5 ml de sêmen em 9,5 ml de solução contendo 0,15M de NaCl e 0,001M de EDTA (v/v) e centrifugação a 1000 rpm durante 10 minutos à temperatura ambiente. Retirou-se o sobrenadante por inversão e repetiu-se o procedimento.

Após a secagem dos esfregaços, esses foram fixados utilizando um dos seguintes métodos: a) formol a 10 % por 1 min.; b) álcool ácido: permanência por 1 min. em solução etanol - ácido acético 3:1 (Carnoy's) e, posteriormente, lavagem em etanol a 70% por 3 min.

Após a fixação, foram aplicados os métodos de identificação de anomalias do complexo DNA-proteína utilizando LA ou AT.

Com relação a coloração com LA, a metodologia foi modificada de Tejada et al. (1984), consistindo na preparação de solução "stock" (1g de "Laranja 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 0,1M e 2,5 ml de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ a 0,3M. O pH final da solução preparada foi de 2,5 com concentração de 0,019%. Após 5 min. de coloração, lavou-se os esfregaços por 1 min em solução pós coloração (10 ml de água destilada, 40 ml de ácido cítrico a 0,1M, 2,5 ml de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ a 0,3M e 0,1M de MgCl_2).

Foi utilizado para a coloração com AT, variações do método proposto por Costa; Beletti (1996), porém sem hidrólise prévia. A solução dessa coloração foi preparada tomando-se AT 0,025 g/100ml de água destilada, ácido cítrico a 0,1M e Na_2HPO_4 a 0,2M (tampão McIlvaine), tendo a solução final pH = 4,0. Adicionou-se à solução de coloração 0,15M de MgCl_2 . Corou-se os esfregaços em cubetas por 1 min. com posterior desidratação em álcool absoluto e xilol, e vedação com etelan entre lâmina e lamínula.

Avaliou-se 200 espermatozoides usando-se objetiva de 40X, sendo que na coloração com LA utilizou-se Microscópio de luz (M.L.) de fluorescência Reichert-Jung modelo Polyvar e a contagem foi realizada em 5 min. no máximo. Já na coloração com

AT utilizou-se M.L. convencional Reichert-Jung modelo Polyvar.

Em todas as avaliações realizadas o examinador desconhecia a origem das amostras.

Estatística

Para o tratamento estatístico das médias utilizou-se a Análise de Variância e o Teste de Tukey. Utilizou-se também o Coeficiente de Correlação de Pearson para verificar possíveis correlações entre as variáveis do espermograma e as anormalidades no complexo DNA-proteína. Utilizou-se em todos os testes $\alpha = 5\%$.

RESULTADOS

Os esfregaços que não foram lavados previamente mostraram-se irregulares. Essas irregularidades se traduziram em campos onde as porcentagens de espermatozoides verde-amarelados e vermelho-alaranjados variaram amplamente, sendo que no início do esfregaço, onde a concentração de plasma seminal é maior, houve concentração intensa de espermatozoides verde-amarelados comparado ao final do esfregaço, não permitindo contagem segura. Já os esfregaços que foram confeccionados com a lavagem prévia do sêmen, apresentaram-se

regulares em toda a sua extensão com “background” contrastado e limpo.

As médias e os desvios padrões das avaliações do complexo DNA-proteína, utilizando as colorações com LA ou AT estão apresentados na Tabela 1. Comparou-se essas médias obtendo-se diferença estatística entre: AT Carnoys e AT Formol ($p=0,0355$); LA Carnoys e AT Carnoys ($p=0,0001$); LA Formol e AT Formol ($p=0,0001$). Somente as médias dos dados da coloração com LA Carnoys e LA Formol foram estatisticamente iguais.

Correlacionou-se os parâmetros convencionais do espermograma com os métodos de avaliação do complexo DNA-proteína, dados demonstrados na Tabela 2.

Comparou-se as médias dos parâmetros seminais convencionais entre os dois grupos demonstrado na Tabela 3.

Não se obteve diferença estatisticamente significativa entre a média de idade dos Grupos 1 e 2, que foram de 35,57 e 35,58 anos, respectivamente. Vale ainda ressaltar que todos os pacientes do Grupo 2 apresentaram pelo menos um dos parâmetros a seguir alterados: Concentração $< 20.000.000$; Morfologia normal $< 14\%$; Motilidade A $< 25\%$ ou Motilidade A + B $< 50\%$.

DISCUSSÃO

A irregularidade nos esfregaços em que o sêmen não foi previamente lavado é explicada pelo fato de que o plasma seminal influencia como barreira física no acesso do corante aos espermatozóides, ao contrário do que foi mostrado por Angelopoulos et al. (1998). Esclarece-se com tal teoria a grande quantidade de espermatozóides verde-amarelados nos locais onde a concentração do plasma seminal é maior, em concordância com Rocha, Beletti e Costa (1999).

Após análise da Tabela 1 verificou-se diferença entre a sensibilidade e a especificidade dos métodos de coloração. Ambos os métodos que utilizaram coloração com AT têm a média de espermatozóides normais menor que os métodos que utilizam coloração com LA, provavelmente devido ao AT apresentar metacromasia com número menor de moléculas ligadas ao complexo DNA-proteína quando comparado ao LA. Portanto alterações mais leves são identificadas pelo AT. Observou-se também que as fixações com Formol tiveram as médias de espermatozóides normais maior comparado às fixações com Carnoy em ambas as colorações. Tal fato pode ser explicado pela maior fixação do complexo DNA-proteína pelo Formol (MELLO, 1982), diminuindo o acesso do corante ao DNA e por conseguinte a sensibilidade daquele.

Todas as metodologias estudadas apresentaram correlação positiva com parâmetros seminais convencionais (Tabela 2). De acordo com dados já explicitados no presente trabalho, as colorações com AT apresentaram-se mais sensíveis na detecção de anomalias do complexo DNA-proteína. Essas anomalias podem estar acompanhadas por alterações nos parâmetros seminais convencionais, explicando uma maior correlação entre esses parâmetros e as colorações com AT. Eggert-Kruse et al. (1996) e Rocha, Beletti e Costa (1999) também encontraram baixas correlações entre parâmetros seminais convencionais e anomalias do complexo DNA-proteína identificadas pelo LA, concordando com o presente trabalho. Já Angelopoulos et al. (1998) encontrou correlação significativa entre maturidade nuclear identificada pelo LA e morfologia da cabeça dos espermatozóides.

Obteve-se diferença estatisticamente significativa entre as concentrações de espermatozóides dos dois grupos (Tabela 3), concordando com Ombelet et al. (1997), Irvine et al. (2000) e Bonde et al. (1998). Encontrou-se diferença significativa comparando a morfologia entre os grupos, concordando com Ombelet et al. (1997), o qual também utilizou o método proposto por Kruger (1986) para avaliação morfológica. Observou-se ainda diferença estatisticamente significativa na motilidade

A entre os dois grupos, estando de acordo com Ombelet et al. (1997) e Irvine et al. (2000), os quais encontraram diferença de motilidade entre um grupo controle fértil e outro subfértil. Tais dados mostram que indivíduos subférteis podem ser identificados utilizando tais parâmetros.

Comparou-se os métodos de avaliação do complexo DNA-proteína (Tabela 3). Houve diferença estatisticamente significativa entre os Grupos 1 e 2 utilizando colorações com AT Carnoys e AT Formol. Esses dados concordam Costa; Beletti (1996), que utilizando como corante o AT, encontraram uma associação entre o aumento na desnaturação do DNA de espermatozóides humanos e infertilidade ou subfertilidade. No entanto, não obteve-se diferença estatisticamente significativa entre os Grupos 1 e 2, utilizando as colorações com LA Carnoys e LA Formol. Estes dados podem novamente ser explicados pela diferença de sensibilidade das colorações com LA e AT, sendo essa última mais sensível. Eggert-Kruse et al. (1996) e Angelopoulos et al. (1998) também não encontraram correlação significativa entre a desnaturação do DNA e a infertilidade ou subfertilidade masculina. Já Gopalkrishnan (1999), utilizando da mesma metodologia do presente trabalho, encontrou diferença significativa entre um grupo de homens férteis e um de inférteis

CONCLUSÃO

As colorações com AT são mais sensíveis na detecção de baixa compactação do complexo DNA-proteína que as colorações com LA. O Formol fixa mais o complexo DNA-proteína que o Carnoys, diminuindo a sensibilidade de ambos os métodos testados. Além disso o plasma seminal influencia na atuação dos corantes LA e AT no DNA de espermatozóides humanos.

Os métodos de avaliação do complexo DNA-proteína não estão necessariamente associados a todos os parâmetros seminais convencionais podendo ser um fator preditivo independente.

Concluimos que as metodologias de coloração somente com AT, juntamente com os parâmetros seminais convencionais como concentração, morfologia e motilidade A, são úteis na avaliação rotineira da fertilidade masculina.

AGRADECIMENTOS

FECUNDA – Instituto de Reprodução Humana, pelas amostras de sêmen, pelos dados dos pacientes utilizados neste estudo e pelo apoio da equipe.

Instituto de Patologia Clínica de Uberlândia - IPAC, pelo espaço físico e pelos equipamentos cedidos.

Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de Minas Gerais - FAPEMIG, pelo suporte financeiro.

ABSTRACT: It is known that alterations in DNA-protein complex of human sperms have repercussions on male fertility. This paper aimed at evaluating the efficacy of coloration using Acridine Orange (AO) and Toluidine Blue (TB), and also at verifying possible connections with other. Semen of fertile and subfertile patients were evaluated using the following parameters: concentration, morphology, motility and DNA-protein complex anomalies. TB coloring had more correlation with conventional seminal parameters than AO coloring. As to the sperm concentration, morphology, motility A and TB colorings, a significant difference between fertile and subfertile patient groups was found. It was concluded that the conventional seminal parameters and TB coloration methods are independent variables. However, both are useful in evaluating male fertility.

UNITERMS: Acridine Orange, Toluidine Blue, Human spermatozoa, Chromatin, DNA.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANGELOPOULOS, T.; MOSHEL, Y.A.; LU, L.; MACANAS, E.; GRIFO, J.A.; KREY, L. C. Simultaneous assessment of sperm chromatin condensation and morphology before and after separation procedures: effect on the clinical outcome after in vitro fertilization. **Fertility and Sterility**, Birmingham, v. 69, n. 4, p. 740-747, 1998.

BALHORN, R. A model for the structure of chromatin in mammalian sperm. **Journal of Cell Biology**, New York, v. 93, p. 298-305, 1982.

BALLACHEY, B. E.; HOHENBOKEN, W. D.; EVENSON, D. P. Heterogeneity of Sperm Nuclear Chromatin Structure and Its Relationship to Bull Fertility. **Biology of Reproduction**, New York, v. 36, p. 915-925, 1987.

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.

BLOCH, D. P. A catalog of sperm histones. Genetics, Austin, v.61, p.93-111, 1969. Supplement.

BONDE, J. P. E. ERNST, E.; JENSEN, T. K.; HJOLLUND, N. H.; KOLSTAD, H.; HENRIKSEN, T. B., SCHEIKE T.; GIWERCMAN, A.; OLSEN, J.; SKAKKEBAEK, N. E. Relation between semen quality and fertility: a population-based study of 430 first-pregnancy planners. **Lancet**, London, v. 352, p. 1172-1177, 1998.

BRITTO, C. M. C.; MELLO, M. L. S. Induced nuclear metachromasy evaluated in spermatozoa of "Pé-duro" bulls. **Brazilian Journal of Genetics**, Ribeirão Preto, v. 11, n. 2, p. 349-354, 1988.

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

COURTENS, J. L.; LOIR, M. A citochemical study of nuclear changes in boar, bull, goat, mouse, rat and stallion spermatides. **Journal of Ultrastructure**, New York, v.74, p.327-340, 1981.

DURAN, E. H.; GÜRGAN, T.; GÜNALP, S.; ENGINSU, M. E.; YRALI, H.; AYHAN, A. A logistic regression model including DNA status and morphology of spermatozoa for prediction of fertilization *in vitro*. **Human Reproduction**, Oxford, v. 13, n. 5, p. 1235-1239, 1998.

EGGERT-KRUSE, W.; RHOR, G.; KERBEL, H.; SCHWALBACH, B.; DEMIRACKA, T.; KLINGA, K.; TILGEN, W.; RUNNEBAUM, B. The acridine orange test: a clinically relevant screening method for sperm quality during infertility investigation? **Human Reproduction**, Oxford, v. 11, n. 4, p. 784-789, 1996.

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

GOPALKRISHNAN, K.; HURKADLI, K.; PADWAL, V.; BALAIAH, D. Use of acridine orange to evaluate chromatin integrity of human spermatozoa in different groups of infertile men. **Andrologia**, Berlim v. 31, n. 5, p.277-282, 1999.

HAMMADEH, M. E.; STIEBER, M.; HAIDL, G.; SCHMIDT, W. Association between sperm cell chromatin condensation, morphology based on strict criteria, and fertilization, cleavage and pregnancy rates in an IVF program. **Andrologia**, Berlim, v. 30, n. 1, p. 29-35, 1998.

IRVINE, D. S.; TWIGG, J. P.; GORDON, E. L.; FULTON, N.; MILNE, P. A.; AITKEN, R. J. DNA Integrity in Human Spermatozoa: Relationships With Semen Quality. **Journal of Andrology**, Champaing, v. 21, n. 1, p. 33-44, 2000.

KRUGER, T. F.; MENKVELD, R.; STANDER, F. S.; LOMBARD, C. J.; VAN DER MERWE, J. P. ; VAN ZYL, J. A.; SMITH, K. Sperm morphologic features as a prognostic factor in in vitro fertilization. **Fertility and Sterility**, Birmingham, v. 46, p. 1118-1123, 1986.

Kruger TF;

LOIR, M.; LINNEAU, M. Partial characterization of ram spermatid basic nuclear proteins. **Biochemical Biophysical Research Communications**, New York, v. 80, p. 974-982, 1978.

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

OMBELET, W.; BOSMANS, E.; JANSSEN, M.; COX, A.; VLASSELAER, J.; GYSELAERS, W.; VANDEPUT, H.; GIELEN, J.; POLLET, H.; MAES, M.; STEENO, O.; KRUGER, T. Semen parameters in

a fertile versus subfertile population: a need for change in the interpretation of semen testing. **Human Reproduction**, Oxford, v. 12, n. 5, p. 987-993, 1997.

ROCHA, H. L. O. G.; BELETTI, M. E.; COSTA, E. N. Comparação entre a eficiência da coloração com “Acridine Orange” e Azul de Toluidina na identificação de anomalias no complexo DNA-proteína de espermatozoides humanos. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 22, n. 3, p. 258-259, 1999. Suplemento.

SPANÒ, M.; KOLSTAD, A. H.; LARSEN, S. B.; CORDELLI, E.; LETER, G.; GIWERCMAN, A.; BONDE, J. P.; ASCLEPIOS. The applicability of the flow cytometric sperm chromatin structure assay in epidemiological studies. **Human Reproduction**, Oxford, v. 13, n. 9, p. 2495-2505, 1998.

TEJADA, R. I.; MITCHELL, J. C.; NORMAN A.; MARIK J. J.; FRIEDMAN, S. A test for the practical evaluation of male fertility by acridine orange (LA) fluorescence. **Fertility and Sterility**, Birmingham, v. 42, 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.

WANG, F. N.; HONG, C. Y.; CHOU, T. S.; HSIUNG, C. H. C.; KAROW, W. G.; PESIC, M. C. Techniques for selection of normal-chromatin sperm preparations. **Archives of Andrology**, London, v. 27, n.2, p. 87-92, 1991.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **WHO laboratory manual for the examination of human semen and semen-cervical mucus interaction**. Cambridge: Cambridge University, 1992.

TABELA 1

PORCENTAGEM DE ESPERMATOZÓIDES NORMAIS, AVALIADOS NOS MÉTODOS DE COLORAÇÃO COM LA OU AT E FIXADOS COM FORMOL OU CARNOYS (N=31).

Métodos de Coloração	Média de espermatozóides normais (%)	Desvio Padrão (%)
LA Carnoys	75,77	18,41
LA Formol	82,40	15,68
AT Carnoys	28,12	32,43
AT Formol	45,77	30,64

LA Carnoys: Lâminas fixadas com Carnoys e coradas com LA

LA Formol: Lâminas fixadas com Formol e coradas com LA

AT Carnoys: Lâminas fixadas com Carnoys e coradas com AT

AT Formol: Lâminas fixadas com Formol e coradas com AT

TABELA 2

CORRELAÇÕES ENTRE OS PARÂMETROS CONVENCIONAIS DO ESPERMOGRAMA E OS MÉTODOS DE AVALIAÇÃO DO COMPLEXO DNA-PROTEÍNA (N=31).

Parâmetros Seminais	LA Carnoys	LA Formol	AT Carnoys	AT Formol
Concentração	0,4157*	0,2734	0,5005*	0,5919*
Morfologia	0,3124	0,3559*	0,2320	0,4283*
Motilidade A	0,2285	0,2294	0,4870*	0,6808*
Motilidade A + B	0,0284	0,0589	0,0241	0,3973*

* Coeficiente de Correlação de Pearson significativa com $p < 0,05$

TABELA 3

COMPARAÇÃO DOS PARÂMETROS CONVENCIONAIS DO ESPERMOGRAMA E DAS ANOMALIAS NO COMPLEXO DNA-PROTEÍNA ENTRE O GRUPO CONTROLE (GRUPO 1) E O GRUPO DE PACIENTES (GRUPO 2).

Avaliação Espermática	Grupo 1 (n=7)		Grupo 2 (n=24)	
	Média	Desvio Padrão	Média	Desvio Padrão
Espermograma				
Concentração (n ^o de espermatozoides)	206.142.857*	82.789.750	71.154.166*	63.172.957
Morfologia normal (%)	11,86*	2,27	5,42*	2,67
Motilidade A (%)	20,57*	16,69	5,25*	6,35
Motilidade A+ B (%)	52,71	8,75	45,00	18,22
Complexo DNA-proteína				
LA Carnoys (%)	83,00	16,60	73,66	18,69
LA Formol (%)	85,85	17,66	81,39	15,32
AT Carnoys (%)	54,50*	36,65	20,43*	27,35
AT Formol (%)	68,85*	26,27	39,04*	28,89

* Médias dos Grupo 1 e Grupo 2 estatisticamente diferentes, com $p < 0,05$

