



## **Biotécnicas aplicadas à avaliação do potencial de fertilidade do sêmen equino<sup>1</sup>**

*Biotechniques used to assessment of fertility potential of equine semen*

**Rubens Paes de Arruda<sup>2</sup>, André Furugen Cesar de Andrade, Karen Regina Peres, Claudia Fernandes Raphael, Juliana Nascimento, Eneiva Carla Carvalho Celeghini**

Centro de Biotecnologia em Reprodução Animal, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São de Paulo/USP. 13635-900, Pirassununga, SP, Brasil

<sup>2</sup>Correspondência: [arrudarp@usp.br](mailto:arrudarp@usp.br)

### **Resumo**

A fertilidade varia entre os garanhões, mesmo quando estes reúnem as qualidades seminais mínimas. Neste contexto vários métodos laboratoriais para avaliação do sêmen vêm sendo utilizados. Estes em conjunto, podem ajudar a predizer seu potencial fecundante. Dentre estes citamos as análises computadorizadas do movimento e morfologia espermáticos, composição do plasma seminal, integridade da membrana plasmática e acrossomal, função mitocondrial, desnaturação da cromatina, peroxidação das membranas espermáticas, entre outros. No entanto, até o momento, nenhum teste laboratorial isolado pode estimar este potencial.

**Palavras-chave:** equínos. avaliação do sêmen. sondas fluorescentes. citometria de fluxo. casa.

### **Abstract**

*The fertility varies among the stallions, same when these possess the minimum seminal qualities. In this context several laboratory methods for assessment of the semen have been used. These together could help to predict the fertility potential. Among these we mentioned the computerized analyses of the sperm movement and morphology, composition of the seminal plasma, integrity of the plasma and acrosomal membranes, mitochondrial function, chromatin denaturation, lipid peroxidation, among others. However, until the moment, no laboratorial assay isolated can esteem this potential.*

**Keywords:** equine. semen assessment. fluorescents probes. flow cytometry. casa.

### **Introdução**

Motilidade, concentração e morfologia espermáticas são os parâmetros clássicos na avaliação de amostras de sêmen (fresco, resfriado ou congelado). Usualmente, a motilidade espermática é estimada em análise do sêmen entre lâmina e lamínula, enquanto as anormalidades espermáticas são avaliadas em esfregaços corados. Ambas as técnicas são realizadas sob uso de microscopia óptica. Entretanto, estudos reportam que este tipo de análise manual é impreciso, mesmo quando executada por investigadores experientes, as análises são influenciadas por uma alta variação entre observações e observadores. Esta imprecisão deriva, em parte, da natureza subjetiva dos testes usados, da variabilidade entre técnicos e das diferenças na implementação de padrões para a avaliação.

Com o propósito de obter uma técnica que demonstre maior repetibilidade tanto para motilidade quanto para morfometria, diversos sistemas que utilizam a análise computadorizada de imagens têm sido desenvolvidos e empregados. Em tese, programas computadorizados para a avaliação espermática podem ser mais objetivos e imprimir maior repetibilidade às avaliações do que a habilidade humana em identificar padrões de motilidade ou de normalidade espermáticas. O poder de análise deste tipo de teste é dado pela avaliação precisa e acurada dos espermatozoides com alto grau de objetividade, podendo assim aperfeiçoar o processo de avaliação seminal em animais (Arruda, 2000).

Para que a inseminação artificial possa apresentar melhores resultados na espécie equina, é necessário um estudo mais amplo sobre os vários aspectos relacionados à fisiologia da célula espermática e à melhoria dos testes aplicados para analisar a viabilidade dos espermatozoides submetidos à refrigeração, congelamento e descongelamento, uma vez que os danos ocasionados pela criopreservação causam prejuízos das funções celulares, resultando em redução da fertilidade. Dentre essas funções, a integridade da membrana espermática parece ser mais afetada e pode exercer papel crítico na sobrevivência do espermatozoide no trato genital da fêmea. Nas espécies que possuem espermatozoides com acrossomo muito pequeno (rato, homem e cavalo), não é possível visualizar danos acrossomais usando microscopia óptica. Assim, técnicas de marcações específicas têm sido usadas para visualizar o acrossomo com microscópio óptico ou microscopia de fluorescência. Os métodos de coloração empregando corantes fluorescentes (sondas fluorescentes ou fluorocromos) aumentaram a possibilidade de uma análise mais criteriosa da integridade estrutural dos espermatozoides. As sondas

<sup>1</sup>Palestra apresentada no XVII Congresso Brasileiro de Reprodução Animal, 31 de maio a 02 de junho de 2007, Curitiba, PR.

fluorescentes vêm sendo utilizados isoladamente ou em combinação para determinar a integridade e a viabilidade celular. Alguns corantes fluorescentes específicos para DNA (ácido desoxirribonucleico), por serem impermeáveis às membranas intactas, coram apenas células com membrana plasmática lesada. As lecitinas fluorescentes se ligam de forma específica a glicoconjugados presentes no acrossomo, e também têm sido utilizadas para avaliar integridade do acrossomo em diversas espécies.

Embora o uso de sondas fluorescentes através de microscopia venha sendo um método para a avaliação da célula e do acrossomo, o número de espermatozoides normalmente examinados por análise não excede 200. A citometria de fluxo surge como uma técnica vantajosa sobre as outras clássicas para a avaliação da viabilidade e integridade espermática, uma vez que este sistema automatizado tem a capacidade de examinar 10.000 espermatozoides em menos de um minuto, permitindo maior exatidão nos resultados e diminuição no tempo de preparação requerido em outras técnicas fluorescentes (Arruda, 2000).

#### **Avaliação computadorizada da motilidade espermática (Computer-Assisted Semen Analyses - CASA)**

A avaliação automatizada da motilidade dos espermatozoides é de grande interesse devido ao fato da cinética espermática ter relevância na determinação do potencial de fertilidade dos espermatozoides. Dentre esses parâmetros, a velocidade progressiva e os padrões de movimentação celular têm sido correlacionados com penetração no muco cervical, penetração em oócitos de hamster e resultados de fertilização *in vitro* (Centola, 1996; Januskauskas *et al.*, 1999).

Os parâmetros da motilidade computadorizada dos espermatozoides de garanhões foram estudados após duas colheitas consecutivas (Ferreira *et al.*, 1997). Os resultados obtidos não apresentaram diferença significativa ( $P > 0,05$ ) entre o primeiro e o segundo ejaculado dos garanhões. Os autores concluíram que o método de análise computadorizada mostrou-se prático, rápido e de fácil execução. Contudo, segundo os autores, surge como desafio, determinar qual ou quais dos parâmetros analisados podem contribuir para a inferência do potencial fecundante do sêmen.

Com o intuito de avaliar a integridade do acrossomo e também os parâmetros da motilidade por sistema computadorizado, Blach *et al.* (1989) congelaram o sêmen de garanhões com diluidor à base de EDTA-lactose-gema de ovo (4% de glicerol). Após a descongelação, a quantidade de acrossomos intactos foi de 75,8%; motilidade progressiva 23,3%; velocidade curvilínea 62,6  $\mu\text{m/s}$ ; velocidade progressiva 37,6  $\mu\text{m/s}$ ; linearidade 6,1; amplitude lateral de cabeça 2,1  $\mu\text{m}$  e frequência de batimentos 17,3 Hz. Para a maioria dos parâmetros estudados, houve diferença estatística entre garanhões e entre ejaculados colhidos do mesmo garanhão.

#### **Avaliação automatizada da morfometria espermática (Automated Sperm Morphometry Analyses - ASMA)**

As avaliações da morfometria espermática pelo sistema computadorizado, são realizadas, normalmente, por esfregaços corados, em aumento de 1.000 vezes. As imagens destinadas à avaliação da morfometria da cabeça dos espermatozoides são avaliadas pelo *software* Metrix (Hamilton Thorne Research, Beverly, MA, USA), instalado no aparelho Hamilton Thorne Research Motility Analyser.

Recentemente, a morfometria espermática de algumas espécies animais tem sido estudada com auxílio de instrumentos automatizados. Davis *et al.* (1993) desenvolveram o método padrão para a análise automatizada da morfometria espermática em equinos. Segundo os autores, o sêmen pode ser analisado a fresco ou centrifugado e ressuspendido à concentração de  $200 \times 10^6$  espermatozoides/mL sem que haja danos à análise morfométrica. Não houve variações expressivas na morfometria espermática de cada garanhão (variação de 1,1 a 3,7%;  $P > 0,01$ ), mas uma diferença altamente significativa nas mensurações entre os garanhões foi detectada (variação de 4,6 a 6,9%;  $P < 0,01$ ). A frequência de erros de digitalização de imagens foi de apenas 1,7% e os padrões morfométricos médios obtidos para as cabeças espermáticas de equinos foram de 5,85  $\mu\text{m}$  de comprimento, 2,97  $\mu\text{m}$  de largura, 13,15  $\mu\text{m}^2$  de área, 14,85  $\mu\text{m}$  de perímetro e 0,51  $\mu\text{m}$  para o coeficiente largura/comprimento.

Ball e Mohammed (1995), também trabalhando com equinos, estudaram a morfometria de células espermáticas, comparando dados de avaliação de células vivas não fixadas com dados de células fixadas e coradas pelo corante de Feulgen. Os valores de comprimento e largura dos espermatozoides vivos não fixados foram maiores ( $P < 0,01$ ) do que os de espermatozoides fixados e corados por Feulgen (comprimento =  $6,3 \pm 0,4$  vs  $5,08 \pm 0,44$   $\mu\text{m}$ ; largura =  $3,08 \pm 0,34$  vs  $2,71 \pm 0,28$   $\mu\text{m}$ , respectivamente). A relação entre largura/comprimento (alongamento) originados de espermatozoides corados com Feulgen foi significativamente maior ( $P < 0,01$ ) do que para os vivos não fixados ( $0,53 \pm 0,07$  vs  $0,43 \pm 0,07$ ; respectivamente). O resultado da frequência de erro de digitalização de espermatozoides corados com Feulgen foi de 5,4% (variação de 1,7 a 9%). O erro mais comum de digitalização apresentou-se como a sobreposição de espermatozoides que são medidos e identificados como um único espermatozoide. O comprimento e a largura das cabeças dos espermatozoides vivos não fixados tiveram baixa correlação com as medidas correspondentes na técnica de lâmina corada ( $r = 0,03$  e  $0,08$ , respectivamente), sendo que tanto comprimento quanto largura foram significativamente maiores para as

células não fixadas ( $P < 0,01$ ). Esta redução no tamanho celular também foi relatada em células de humanos e é atribuída ao processo de fixação e coloração, o qual envolve etapas de hidrólise e desidratação. A relação largura/comprimento derivada de ambos os métodos apresentou correlação moderada ( $r = 0,66$ ). Apesar de nenhuma associação com fertilidade ter sido feita neste estudo, os autores concluíram que a técnica pode ter aplicação futura como método de avaliação da fertilidade de garanhões, baseados na diferença de tamanho da cabeça espermática entre machos ou no coeficiente de variação do tamanho da cabeça espermática derivado de um mesmo animal.

Em garanhões, a morfometria da cabeça dos espermatozoides vem sendo padronizada, possibilitando relacionar clinicamente as diferenças morfométricas entre animais férteis ou subférteis. Com o objetivo de estudar os parâmetros morfométricos da cabeça dos espermatozoides de garanhões férteis e subférteis, usando o sistema automatizado de análises espermáticas por computador, Gravance *et al.* (1996) utilizaram 10 garanhões férteis ( $\geq 60\%$  taxa de concepção) e 10 subférteis ( $< 40\%$  taxa de concepção). A média das medidas das cabeças dos espermatozoides entre o grupo de garanhões férteis e subférteis, foram respectivamente de 5,35 e 5,81  $\mu\text{m}$  de comprimento; 2,79 e 2,90  $\mu\text{m}$  de largura; 11,43 e 12,66  $\mu\text{m}^2$  de área e 13,76 e 14,68  $\mu\text{m}$  de perímetro. Os valores foram significativamente maiores ( $P < 0,001$ ) para o grupo subfertil. As variações dos valores das medidas da cabeça espermática do maior agrupamento de garanhões férteis foram para comprimento 4,9-5,7  $\mu\text{m}$ , largura 2,5-3,0  $\mu\text{m}$ , área 10,3-12,1  $\mu\text{m}^2$  e perímetro 12,9-14,2  $\mu\text{m}$ . O resultado médio da morfometria da cabeça dos espermatozoides de garanhões subférteis foi significativamente maior para comprimento, largura, área e perímetro, mas não para a relação largura/comprimento, indicando uma tendência dos espermatozoides serem mais delgados no grupo subfertil. Ocorreram diferenças morfométricas notáveis entre as duas populações de células estudadas, de forma que os autores consideraram o método bastante objetivo e auxiliar nas avaliações clínicas para a detecção da subfertilidade.

### Uso de sondas fluorescentes na avaliação espermática

Todos os testes laboratoriais de análise de sêmen buscam a predição da capacidade fertilizante do sêmen. Dentre esses exames, a técnica que utiliza sondas fluorescentes vem ganhando importância por sua característica de marcar estruturas específicas das células e de detectar integridade estrutural ou funcionalidade de forma clara (Celeghini, 2005).

Várias sondas fluorescentes podem ser utilizadas para a avaliação da integridade da membrana plasmática espermática, como o brometo de etídio (Halangk *et al.*, 1984), corantes supravitais Hoechst 33258 (H258), 33342 (H342) (Casey *et al.*, 1993; Maxwell *et al.*, 1997), SYBR-14 (Garner *et al.*, 1999; Thomas *et al.*, 1998) e diacetato de carboxifluoresceína (CFDA) (Harrison e Vickers, 1990; Peña *et al.*, 1998; Souza, 2001; Valcárcel *et al.*, 1994); todavia, o iodeto de propídio (PI) vem se destacando em pesquisas pela sua facilidade de preparação e aplicação da técnica, estabilidade e eficiência na avaliação da integridade da membrana, seja isoladamente ou associada a outro corante fluorescente para avaliar membrana plasmática. Esta sonda possui afinidade ao DNA e cora em vermelho o núcleo de células com membrana plasmática lesada (Arruda, 2000; Arruda *et al.*, 2003b; Graham *et al.*, 1990; Maxwell *et al.*, 1997; Celeghini, 2005).

Já a aglutinina de *Pisum sativum* (PSA), quando conjugada a isotiocionato de fluoresceína (FITC), marca com sucesso o acrossomo espermático na cor verde amarelado, o que facilita a visualização e a identificação dos acrossomos lesados, sendo utilizado em espermatozoides humanos (Cross *et al.*, 1986; Mendoza *et al.*, 1992; Tesarik *et al.*, 1993), bovinos (Graham *et al.*, 1990; Arruda e Celeghini, 2003), eqüinos (Arruda, 2000; Arruda, 2003b; Casey *et al.*, 1993; Farlin *et al.*, 1992; Celeghini *et al.*, 2004) e suínos (Mattioli *et al.*, 1996).

O uso da FITC-PSA para avaliar a integridade do acrossomo de células espermáticas eqüinas *in natura* ou submetidas à crioinjúria foi investigado (Farlin *et al.*, 1992; Arruda *et al.*, 2003a). Para tanto, misturas de diferentes proporções de espermatozoides com acrossomo intacto (sêmen fresco) e espermatozoides com acrossomo danificado (sêmen criopreservado) foram avaliadas. Houve correlação positiva entre a porcentagem de espermatozoides ligados ao FITC-PSA e a proporção de espermatozoides com acrossomo danificado nas amostras ( $r = 0,98$ ;  $P < 0,05$ ), comprovando a eficiência de seu uso na determinação da integridade do acrossomo de espermatozoides (Farlin *et al.*, 1992).

Comprovando a eficiência e especificidade do FITC-PSA na avaliação da integridade de membrana acrossomal, Souza (2001) comparou quatro diferentes técnicas para exame da membrana acrossomal: câmara úmida por microscopia de contraste de fase e de interferência diferencial, coloração por Trypan Blue/Giemsa e microscopia de epifluorescência, utilizando como marcador o FITC-PSA para amostras de sêmen eqüino pós-descongelamento. Neste trabalho, verificou-se que a técnica de microscopia de epifluorescência com a sonda fluorescente FITC-PSA é a mais eficiente em detectar lesões de acrossomo.

Quanto à peça intermediária do espermatozoide, existem sondas fluorescentes próprias para avaliação da funcionalidade mitocondrial, dentre os quais destaca-se a carbocianina catiônica lipofílica, JC-1 (iodeto de 5,5',6,6'-tetracloro-1,1',3,3'-tetraetilbenzimidazolocarboianina). Esta sonda possui baixa toxicidade, boa solubilidade e características fluorescentes apropriadas para detecção por sistema de filtros, comumente usada em microscopia de epifluorescência (Smiley *et al.*, 1991). Este corante necessita de potencialmente de membrana mitocondrial altamente negativo para penetrar na organela e emitir fluorescência nos comprimentos de onda de luz vermelha ou verde, de acordo com sua concentração interna final. Em altas concentrações, o corante

apresenta-se na forma de j-agregado e emite coloração vermelha, enquanto que em baixas concentrações encontra-se na forma de monômero e emite coloração verde. Então, em mitocôndrias funcionais, que apresentam potencial de membrana mitocondrial altamente negativo (-180 mV), o JC-1 penetra e acumula-se no interior desta organela e emite coloração vermelha (Reers, 1991). Assim, a formação e manutenção de j-agregados no interior da mitocôndria são dependentes do gradiente eletroquímico (Smiley *et al.*, 1991).

O JC-1 possui uma absorvância máxima de 510 e 585 nm e uma fluorescência máxima de 520 e 585 nm para monômeros e j-agregados, respectivamente.

Para avaliar a eficiência do JC-1 em prever a funcionalidade da mitocôndria, ou seja, a capacidade desta organela em produzir ATP, Bradbury *et al.* (2000) coraram células leucêmicas humanas com este fluorocromo e encontraram alta correlação positiva ( $r = 0,87$ ;  $P < 0,01$ ) entre a quantidade de ATP intracelular e a porcentagem de células com alto potencial de membrana mitocondrial e alta correlação negativa ( $r = -0,88$ ;  $P < 0,01$ ) entre ATP e células com baixo potencial de membrana mitocondrial.

Quanto ao estudo da célula espermática, este corante fluorescente também vem sendo utilizado com sucesso para estimar o potencial de membrana mitocondrial, em diferentes espécies, como a bovina (Garner *et al.*, 1997; Thomas *et al.*, 1998; Celeghini *et al.*, 2005), equina (Gravance *et al.*, 2000, 2001; Nascimento *et al.*, 2005), ovina (Martinez-Pastor *et al.*, 2004) e humana (Troiano *et al.*, 1998).

Utilizando JC-1, Troiano *et al.* (1998) encontraram que a quantidade de espermatozoides humano com mitocôndria despolarizada correlaciona positivamente com a porcentagem de células imóveis ( $r = 0,52$ ;  $p = 0,004$ ) e negativamente com a motilidade progressiva rápida ( $r = -0,55$ ;  $p = 0,002$ ).

Martinez-pastor *et al.* (2004), trabalhando com espermatozoides descongelados de carneiro, encontraram correlações médias significativas entre a porcentagem de células com alto potencial de membrana mitocondrial e motilidade total ( $r = 0,33$ ;  $P < 0,05$ ) e com motilidade progressiva ( $r = 0,40$ ;  $P < 0,01$ ); no entanto, as correlações de alto potencial de membrana mitocondrial e VSL (velocidade progressiva), VCL (velocidade curvilínea), VAP (velocidade do trajeto) e ALH (deslocamento lateral de cabeça) foram baixas.

Assim, as associações de sondas fluorescentes permitem avaliar concomitantemente mais do que um compartimento da célula espermática. Celeghini e colaboradores preconizando a avaliação simultânea da integridade das membranas plasmática e acrossomal e o potencial da membrana mitocondrial de uma mesma célula espermática, de forma clara e fácil, testaram e validaram técnicas de associação de sondas. Dentre as técnicas validadas (PI, FITC-PSA e MitoTracker GreenFM ou CMXRos ou JC-1), a associação PI, FITC-PSA e JC-1 é a melhor, já que esta permite separar as populações de células com alto e baixo potencial de membrana mitocondrial de maneira mais clara (Celeghini *et al.*, 2004; Celeghini, 2005)

### **Avaliação das proteínas do plasma seminal e membranas espermáticas**

O sucesso da reprodução depende de uma cascata de eventos, primeiro da espermatogênese, da espermiogênese e da maturação espermática. Depois, durante a ejaculação, diferentes secreções provenientes das glândulas acessórias dos machos promoverão mudanças importantes na composição da membrana espermática e nas proteínas de superfície. Na seqüência, os espermatozoides deverão ser capacitados, durante sua passagem pelo trato genital feminino, e sofrerem a reação do acrossoma até que um deles seja capaz de penetrar a zona pelúcida e finalmente se fundir com o ócito. Cada um destes passos é mediado por um número de proteínas e, conseqüentemente, por genes (Leeb *et al.*, 2005).

Proteínas específicas já são utilizadas como marcadores de fertilidade para humanos e para bovinos; para equinos algumas também já foram identificadas, como a família de proteínas ricas em cisteína (CRISPs), a família das espermedesinas e a família de proteínas com número variável de domínios de fibronectina do tipo II (Fn-2) (Leeb *et al.*, 2005).

As proteínas CRISPs implicam várias funções relacionadas com a fusão espermatozoide-ócito e são expressas sob controle androgênico. Em equinos, o gene da CRISP1, também chamada de AEG1 (glicoproteína acidífera epididimária 1), é expresso ao longo do epidídimo, enquanto que o gene da CRISP2 (ou TPX1 – proteína equina específica do testículo 1) é expresso no testículo, epidídimo e glândulas vesiculares (Giese *et al.*, 2002). A CRISP 2 pode ter um papel na interação entre as células de Sertoli e os espermatócitos no testículo. A CRISP3 é expressa em grande quantidade no plasma seminal de garanhões, começando a ser expressa a partir do epidídimo até o resto do trato genital, com alta expressão na ampola (Schambony *et al.*, 1998). As CRISPs se ligarão principalmente na região equatorial, pós-acrossomal e na peça intermediária dos espermatozoides (Töpfer-Petersen *et al.*, 2005). Segundo Töpfer-Petersen *et al.* (2005) também já foi observada a completa perda da expressão de CRISP2 no testículo e no epidídimo de um garanhão criptorquídico.

O segundo grupo de proteínas importante em equinos, são as espermedesinas, que possuem de 110 a 113 aminoácidos e compreendem um único domínio CUB estabilizado por duas pontes dissulfídicas. São proteínas multifuncionais que exibem habilidade para se ligar a heparina, a inibidores de proteinase, fosfolipídeos e a carboidratos (Töpfer-Petersen *et al.*, 2005). No equino, a HSP-7 é a representante, sendo que ela se liga à zona pelúcida intacta, mostrando seu papel na interação espermatozoide-zona pelúcida (Reinert *et al.*, 1996). A HSP-7 é secretada durante o trajeto do espermatozoide pelo ducto epididimário e se liga ao

espermatozóide formando uma banda proeminente na região equatorial (Töpfer-Petersen, 2005).

Em eqüinos, as proteínas Fn-2 são caracterizadas por dois módulos de fibronectina tipo II, sendo denominadas de EQ-12. Elas são produzidas no corpo e na cauda do epidídimo e exercem funções sobre a membrana plasmática, o que pode ajudar a explicar alterações nas propriedades de membrana, principalmente sobre o mecanismo da capacitação e que podem preceder o processo de capacitação induzido por heparina (Manjunath *et al.*, 2002).

Outras proteínas também estão envolvidas com a função flagelar, e, portanto, com a motilidade espermática. Recentemente, o gene AKAP4 (proteína 4 ligada a a quinase A) foi parcialmente clonado e caracterizado no eqüino (Turner *et al.*, 2005), estando envolvida na compartimentalização da proteína quinase A no flagelo.

### Avaliação da estrutura da cromatina espermática

O plasma seminal é uma complexa mistura de substâncias orgânicas e inorgânicas com muitas propriedades que melhoram a qualidade espermática, incluindo a ativação da motilidade espermática e a proteção dos espermatozoides das espécies oxigênio reativas (EROS), mas, pode alterar a integridade do DNA espermático. Em um estudo conduzido por Love *et al.* (2005) ficou demonstrado que o aumento da quantidade de plasma seminal em garanhões altamente férteis, pode levar um declínio na integridade do DNA, sem, contudo, serem observadas queda na motilidade.

Os estudos têm demonstrado que a qualidade do DNA espermático de alguns garanhões de menor fertilidade pode declinar a uma taxa maior do que a observada em garanhões férteis com condições de estocagem similares (Love, 2005). A desnaturação da cromatina é mais alta no sêmen de garanhões sub-férteis em comparação a garanhões férteis (32% versus 16%) e o escore de desnaturação é negativamente correlacionado com a taxa de prenhez (Kenney *et al.*, 1995).

A análise da estrutura da cromatina do espermatozóide (SCSA) é um método para se determinar a susceptibilidade do DNA espermático à desnaturação, a qual é relacionada à fertilidade. Este teste usa um sonda metacromática, laranja de acridina, para avaliar a relação do DNA simples (anormal) e duplo-filamento (nativo) presente em um espermatozóide, através da fluorescência verde ou laranja emitida por cada espermatozóide. A SCSA pode ser utilizada para avaliar a integridade do DNA no sêmen fresco, resfriado ou congelado (Love, 2005). Normalmente, alguns garanhões que exibem elevação do número de DNA comprometido em sêmen fresco, também têm uma taxa acelerada na queda da qualidade do DNA quando o sêmen é resfriado ou estocado por longo tempo (Love *et al.*, 2002).

### Avaliação espermática por citometria de fluxo

A integridade da membrana plasmática é essencial para o funcionamento do espermatozóide. Diferentes métodos de avaliação da integridade das membranas plasmática e acrossomal tem sido testadas, entre estes testes podemos citar os que usam fluorocromos (citados no tópico 4). Estas avaliações, quando analisadas por microscopia de fluorescência, apenas avaliam de 100 a 200 células. Entretanto há um ganho considerável quando o uso de sondas fluorescentes para a análise das organelas é combinada com o uso da citometria de fluxo, já que a citometria permite a análise de milhares de células por segundo (Peña *et al.*, 1999). Diferentes sondas fluorescentes tem sido utilizadas, em conjunto a citometria de fluxo, para mensurar a viabilidade espermática de diferentes espécies (Garner e Johnson, 1995; Graham *et al.*, 1990; Papaioannou *et al.*, 1997). Em garanhões, a citometria de fluxo, têm sido aplicada para avaliar a integridade da membrana plasmática e o estado do acrossoma com o uso do Iodeto de propídeo (PI) (Papaioannou *et al.*, 1997), PI e SYBR-14 (Merkies *et al.*, 2000; Boe-Hansen *et al.*, 2001; Landim-Alvarenga *et al.*, 2001; Kirk *et al.*, 2001), PI e FITC-PNA (Rathi *et al.*, 2001), PI e PE-PSA (Wilhelm *et al.*, 1996), PI e FITC-PSA (Andrade *et al.*, 2006).

Além da análise da integridade das membrana plasmática e acrossomal a citometria de fluxo combinada ao uso de fluoróforos permite a avaliação do potencial de membrana mitocondrial, integridade do DNA, peroxidação lipídica, capacitação e reação acrossômica, apoptose, entre outros.

A peroxidação lipídica da membrana plasmática é uma das causas que prejudicam a função espermática no sêmen, tanto a fresco quanto após criopreservação. A sonda lipofílica fluorescente C11-BODIPY<sup>581/591</sup> pode ser usada para avaliar as mudanças causadas pela peroxidação lipídica no espermatozóide eqüino. Esta sonda é um análogo de ácidos graxos polissaturados, que se incorpora na membrana celular. Enquanto este fluoróforo está intacto, é observada uma fluorescência vermelha e com a sua peroxidação há uma mudança de fluorescência para verde, que pode ser detectada pelo citômetro de fluxo (Ball e Vo, 2002; Neild *et al.*, 2005).

O Laboratório de Biotecnologia do Sêmen e Andrologia (Departamento de Reprodução Animal/Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia/Universidade de São Paulo-LBSA/VRA/FMVZ/USP) tem realizado análises que utilizam esta tecnologia. Atualmente o laboratório trabalha com a avaliação da integridade das membranas plasmática e acrossomal (Fig. 1), a avaliação do potencial de membrana mitocondrial (Fig. 2) e a análise da peroxidação lipídica da membrana plasmática. A análise da integridade das membranas plasmática e acrossomal é realizada com o uso do PI e do FITC-PSA enquanto que a análise do potencial de membrana mitocondrial é realizada com o uso do JC-1.

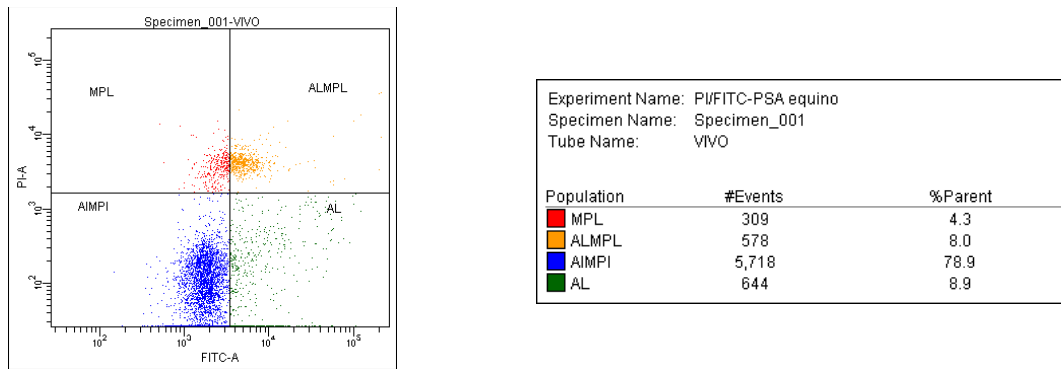


Figura 1. “Dot plot” mostrando a população espermática apresentando AIMPI=membrana acrossomal íntegra e membrana plasmática íntegra; AL=membrana acrossomal Lesada e membrana plasmática íntegra; MPL=membrana acrossomal íntegra e membrana plasmática lesada; ALMPL=membrana acrossomal lesada e membrana plasmática íntegra  
 Fonte: LBSA/VRA/FMVZ/USP.

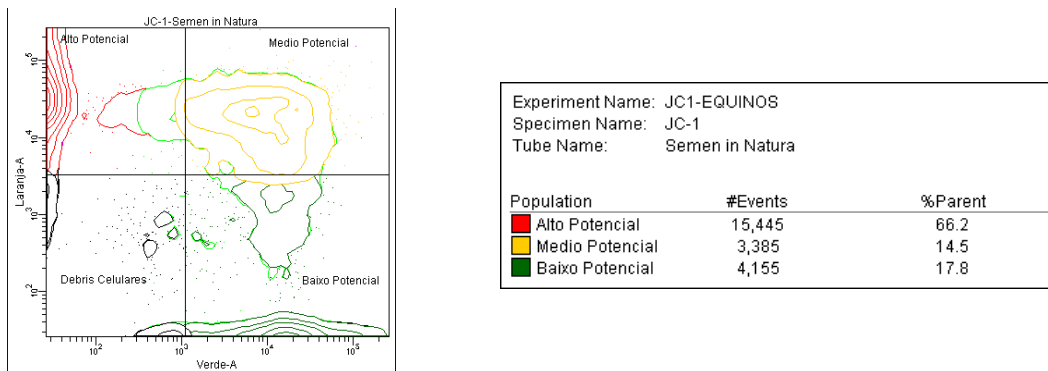


Figura 2. “Dot plot” mostrando a população espermática apresentando Alto Potencial de membrana mitocondrial; Médio Potencial de membrana mitocondrial; Baixo potencial de membrana mitocondrial.  
 Fonte: LBSA-VRA/FMVZ/USP.

A análise da peroxidação lipídica da membrana plasmática é realizada com o uso do C11-BODIPY<sup>581/591</sup>. Resultados preliminares, ainda não publicados, sugerem que no sêmen equino há um baixo índice de peroxidação, mesmo após o resfriamento por até 72 horas. Porém, mais estudos são necessários para resultados mais conclusivos. A seguir encontra-se um gráfico originado no citômetro de fluxo de uma análise sobre peroxidação lipídica no espermatozóide equino (Fig. 3).

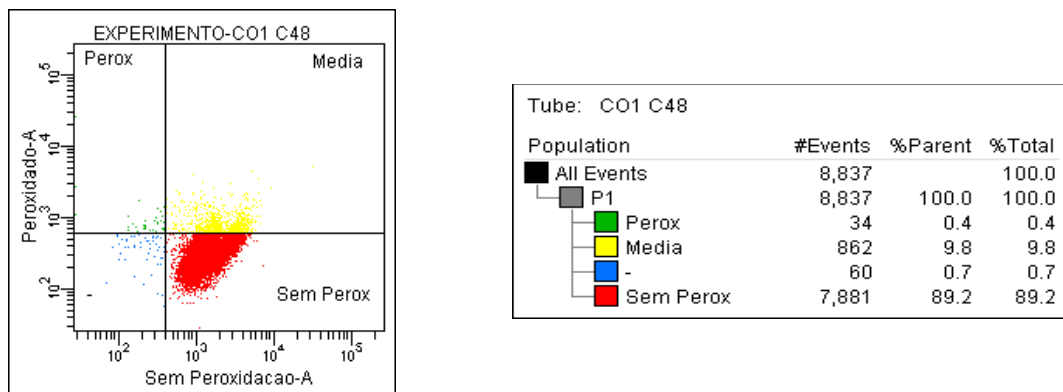


Figura 3. “Dot Plot” mostrando a população espermática apresentando Perox=alta Peroxidação Lipídica da membrana plasmática; Media=média Peroxidação Lipídica da membrana plasmática; Sem Perox=população espermática sem peroxidação da membrana plasmática.  
 Fonte: LBSA/VRA/FMVZ/USP.



### Considerações finais

Resta então citar que, cientistas têm procurado intensamente desenvolver ensaios laboratoriais que predizem acuradamente a fertilidade do sêmen. No entanto, tais metas têm sido de difícil obtenção, uma vez que a maior parte dos problemas residem nos diferentes atributos que o espermatozóide deve possuir para fertilizar o oócito, e em como a fertilização é definida. Infelizmente, nenhum teste laboratorial isolado pode estimar o potencial de fertilidade do sêmen.

### Agradecimentos

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP (Processos 01/13940-4, 04/09028-6, 04/11463-2, 05/60591-6, 05/60592-2 e 06/60966-2).

### Referências

- Andrade AFC, Raphael CF; Martins SMMK, Peres KR, Bianconi LL, Arruda RP.** Seminal plasma reduce acrosome reaction in post-thawed equine spermatozoa. *Anim Reprod*, v.3, p.266, 2006. Resumo.
- Arruda RP.** Avaliação dos efeitos de diluidores e crioprotetores para o espermatozóide equino pelo uso de microscopia de epifluorescência, citometria de fluxo, análises computadorizadas da motilidade (CASA) e da morfometria (ASMA). 2000. 121f. Tese (Livre Docência) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2000.
- Arruda RP, Ball BA, Gravance CG, Liu IKM.** Avaliação dos efeitos de diluidores e crioprotetores para espermatozoides de garanhões utilizando análises computadorizadas da motilidade (CASA) e citometria de fluxo. *Acta Sci Vet Supl*, v.31, p.228-229, 2003a.
- Arruda RP, Ball BA, Gravance CG, Liu IKM.** Determinação da integridade da membrana plasmática e acrossomo de espermatozoides de garanhões pela técnica de citometria de fluxo. *Acta Sci Vet Supl*, v.31, p.226-227, 2003b.
- Arruda RP, Celeghini ECC.** Validação de uma técnica para avaliação simultânea das membranas plasmática, acrossomal e mitocondrial de espermatozoides bovinos. *Acta Sci Vet Supl*, v.31, p.230-231, 2003.
- Ball BA, Mohammed HO.** Morphometry of stallion spermatozoa by computer-assisted image analysis. *Theriogenology*, v.44, p.367-77, 1995.
- Ball BA, Vo A.** Detection of lipid peroxidation in equine spermatozoa based upon the lipophilic fluorescent dye C11-BODIPY581/591. *J Androl*, v.23, p.259-269, 2002.
- Blach EL, Amman RP, Bowen RA, Frantz D.** Change in quality of stallion spermatozoa during cryopreservation: plasma membrane integrity and motion characteristics. *Theriogenology*, v.31, p.283-298, 1989.
- Boe-Hansen G, Christensen P, Stryhn H, Nielsen JM, Lehn-Jensen.** Using flow cytometry for assessment of the quality of frozen-thawed stallion semen. *Anim Reprod Sci*, v.68, p.328-329, 2001.
- Bradbury DA, Simmons TD, Slater KJ, Crouch SPM.** Measurement of the ADP:ATP ratio in human leukaemic cell lines can be used as an indicator of cell viability, necrosis and apoptosis. *J Immunol Meth*, v.240, p.79-92, 2000.
- Casey PJ, Hillman RB, Robertson KR, Yudin AI, Liu IKM, Drobins, EZ.** Validation of an acrosomal stain for equine sperm that differentiates between living and dead sperm. *J Androl*, v.14, p.289-297, 1993.
- Celeghini ECC.** Efeitos da criopreservação do sêmen bovino sobre as membranas plasmática, acrossomal e mitocondrial e estrutura da cromatina dos espermatozoides utilizando sondas fluorescentes. 2005. 186f. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.
- Celeghini ECC, Arruda RP, Andrade AFC, Raphael CF, Nascimento J.** Simultaneous evaluation of the plasmatic, acrosomal and mitochondrial membranes in equine spermatozoa. In: International Congress of Animal Reproduction, 15, 2004, Porto Seguro. *Abstract ...* Belo Horizonte: CBRA, 2004. p.511. Resumo.
- Celeghini ECC, Nascimento J, Andrade AFC, Raphael CF, Souza LWO, Rodrigues PHM, Arruda RP.** Uso de CMXRos e JC-1 na avaliação da função mitocondrial, associadas a sondas fluorescentes para avaliação da membrana plasmática e acrossomal em espermatozoides bovinos. *Acta Sci Vet Supl*, v.33, p.321, 2005.
- Centola GM.** Comparison of manual microscopic and computer-assisted methods for analysis of sperm count and motility. *Arch Androl*, v.36, p.1-7, 1996.
- Cross NL, Morales P, Overstreet JW, Hanson FW.** Two simple methods for detecting acrosome - reacted human sperm. *Gamete Res*, v.15, p.213-226, 1986.
- Davis RO, Gravance CG, Casey PJ.** Automated morphometric analysis of stallion spermatozoa. *Am J Vet Res*, v.54, p.1808-1811, 1993.
- Farlin ME, Jasko DJ, Graham JK, Squires EL.** Assessment of *Pisum sativum* agglutinin in identifying acrosomal damage in stallion spermatozoa. *Mol Reprod Dev*, v.32, p.23-27, 1992.
- Ferreira JCP, Neves Neto JR, Papa FO.** Avaliação computadorizada das características espermáticas de garanhões com fertilidade comprovada. *RevBras Reprod Anim*, v.21, p.131-32, 1997.



- Garner DL, Johnson LA.** Viability assessment of mammalian sperm using SYBR-14 and propidium iodide. *Biol Reprod*, v.53, p.276-284, 1995.
- Garner DL, Thomas AC, Gravance CG.** The effect of glycerol on the viability, mitochondrial function and acrosomal integrity of bovine spermatozoa. *Reprod Domest Anim*, v.34, p.399-404, 1999.
- Garner DL, Thomas AC, Joerg HW, Dejarnette JM, Marshall CE.** Fluorometric assessments of mitochondrial function and viability in cryopreserved bovine spermatozoa. *Biol Reprod*, v.57, p.1401-06, 1997.
- Giese A, Jude R, Kuiper H, Raudsepp T, Piumi F, Schambony A, Guerin G, Chowdhary BP, Distl O, Töpfer-Petersen E, Leeb T.** Molecular characterization of the equine testis-specific protein 1 (TPX1) and acidic epididymal glycoprotein 2 (AEG2) genes encoding members of the cysteine-rich secretory protein (CRISP) family. *Gene*, v.299, p.101-109, 2002.
- Graham JK, Kunze E, Hammerstedt RH.** Analysis of sperm cell viability, acrosomal integrity, and mitochondrial function using flow cytometry. *Biol Reprod*, v.43, p.55-64, 1990.
- Gravance CG, Garner DL, Baumber J, Ball BA.** Assessment of equine sperm mitochondrial function using JC-1. *Theriogenology*, v.53, p.1691-1703, 2000.
- Gravance CG, Garner DL, Miller MG, Berger T.** Fluorescent probes and flow cytometry to assess rat sperm integrity and mitochondrial function. *Reprod Toxicol*, v.15, p.5-10, 2001.
- Gravance CG, Liu LKM, Davis RO, Hughes JP, Casey PJ.** Quantification of normal head morphometry of stallion spermatozoa. *J Reprod Fertil*, v.108, p.41-46, 1996.
- Halangk W, Frank K, Bohnensack R.** Zur bestimmung der menge intakter spermien in bullenejakulaten. *Arch Exp Vet Med*, v.38, p.105-114, 1984.
- Harrison RAP, Vickers SE.** Use of fluorescent probes to assess membrane integrity in mammalian spermatozoa. *J Reprod Fertil*, v.88, p.343-352, 1990.
- Januskauskas A, Gil J, Söderquist L, Haard MGM, Haard M, Johannisson A, Rodriguez-Martinez H.** Effect of cooling rates on post-thaw sperm motility, membrane integrity, capacitation status and fertility of dairy bull semen used for artificial insemination in sweden. *Theriogenology*, v.52, p.641-58, 1999.
- Kenney RM, Evenson DP, Garcia MC, Love CC.** Relationship between sperm chromatin structure, motility and morphology of ejaculated sperm and seasonal pregnancy rate. *Biol Reprod Mono*, n.1, p.647-653, 1995.
- Kirk ES, Graham JK, Bruemmer JE, Squires EL.** Evaluation frozen semen by flow cytometry. *Anim Reprod Sci*, v.68, p.348-349, 2001.
- Landim-Alvarenga FC, Alvarenga MA, Graham JK, Squires EL.** Viability and ultrastructure of stallion spermatozoa cryopreserved with glycerol and DMSO. *Anim Reprod Sci*, v.68, p.341-342, 2001.
- Leeb T, Sieme H, Töpfer-Petersen E.** Genetic markers for stallion fertility – lessons from humans and mice. *Anim Reprod Sci*, v.89, p.21-29, 2005.
- Love CC.** The sperm chromatin structure assay: A review of clinical applications. *Anim Reprod Sci*, v.89, p.39-45, 2005.
- Love CC, Brinsko SP, Rigby SL, Thompson JA, Blanchard TL, Varner DD.** Relationship of seminal plasma level and extender type to sperm motility and DNA integrity. *Theriogenology*, v.63, p.1584-1591, 2005.
- Love CC, Thompson JA, Lowry VK, Varner DD.** Effect of storage time and temperature on stallion sperm DNA and fertility. *Theriogenology*, v.57, p.1135-1142, 2002.
- Manjunath P, Therien I.** Role of seminal plasma phospholipids-binding proteins in sperm membrane lipid modification that occurs during capacitation. *J Reprod Immunol*, v.53, p.109-119, 2002.
- Martinez-Pastor F, Johannisson A, Gil J, Kaabi M, Anel L, Paz P, Rodriguez-Martinez H.** Use of chromatin stability assay, mitochondrial stain JC-1, and fluorometric assessment of plasma membrane to evaluate frozen-thawed ram semen. *Anim Reprod Sci*, v.84, p.121-133, 2004.
- Mattioli M, Barboni B, Lucidi P, Seren E.** Identification of capacitation in boar spermatozoa by chortetraciline staining. *Theriogenology*, v.45, p.373-381, 1996.
- Maxwell WMC, Welch GR, Johnson LA.** Viability and membrane integrity of spermatozoa after dilution and flow cytometric sorting in the presence or absence of seminal plasma. *Reprod Fertil Dev*, v.8, p.1165-1178, 1997.
- Mendoza C, Carreras A, Moos J, Tesarik J.** Distinction between true acrosome reaction and degenerative acrosome loss by a one-step staining method using *Pisum sativum* agglutinin. *J Reprod Fertil*, v.95, p.755-763, 1992.
- Merkies K, Chenier T, Plante C, Buhr MM.** Assessment of stallion spermatozoa viability by flow cytometry and light microscope analyses. *Theriogenology*, v.54, p.1215-1224, 2000.
- Nascimento J, Celeghini ECC, Raphael CF, Andrade AFC, Arruda RP.** Avaliação da integridade das membranas plasmática, acrossomal e potencial de membrana mitocondrial em diferentes concentrações e volumes de espermatozoides criopreservados equino. *Acta Sci Vet Supl*, v.33, p.298, 2005.
- Neild DM, Brouwers JFHM, Colenbrander B, Aguero A, Gadella BM.** Lipid peroxide formation in relation to membrane stability of fresh and frozen thawed stallion spermatozoa. *Mol Reprod Dev*, v.72, p.230-238, 2005.
- Papaioannou KZ, Murphy RP, Monks RS, Hynes N, Ryan MP, Boland MP, Roche JF.** Assessment of viability and mitochondrial function of equine spermatozoa using double staining and flow cytometry.





*Theriogenology*, v.48, p.299-312, 1997.

**Peña AL, Johannisson A, Linde-Forsberg C.** Post-thaw evaluation of dog spermatozoa using new triple fluorescent staining and flow cytometry. *Theriogenology*, v.52, p.965-980, 1999.

**Peña AL, Quintela LA, Herradón PG.** Viability assessment of dog spermatozoa using flow cytometry. *Theriogenology*, v.50, p.1211-1220, 1998.

**Rathi R, Colenbrander B, Bevers MM, Gadella BM.** Evaluation of in vitro capacitation of stallion spermatozoa. *Biol Reprod*, v.65, p.462-470, 2001.

**Reers M, Smith TW, Chen LB.** J-aggregate formation of a carbocyanine as a quantitative fluorescent indicator of membrane potential. *Biochemistry*, v.30, p.4480-4486, 1991.

**Reinert M, Calvete JJ, Sanz L, Mann K, Töpfer-Petersen E.** Primary structure of stallion seminal plasma protein HSP-7, a zona-pellucida-binding protein of the spermadhesin family. *Eur J Biochem*, v.242, p.636-640, 1996.

**Schambony A, Hess O, Gentzel M, Töpfer-Petersen E.** Expression of CRISP proteins in the male equine genital tract. *J Reprod Fertil Suppl*, n.53, p.67-72, 1998.

**Smiley ST, Reers M, Mottola-Hartshorn C, Lin M, Chen A, Smith TW, Steele GDJr, Chen LB.** Intracellular heterogeneity in mitochondrial membrane potentials revealed by a J-aggregate-forming lipophilic cation JC-1. *Cell Biol*, v.88, p.3671-3675, 1991.

**Souza NL.** *Avaliação de técnicas para determinar a viabilidade e a integridade do acrossomo de espermatozoides criopreservados equinos.* 2001. 76p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2001.

**Tesarik J, Mendoza C, Carreras A.** Fast acrosome reaction measure: a highly sensitive method for evaluating stimulus-induced acrosome reaction. *Fertil Steril*, v.9, p.424-430, 1993.

**Thomas CA, Ganer DL, Dejarnete JM, Marshall CE.** Effect of cryopreservation on bovine sperm organelle function and viability as determined by flow cytometry. *Biol Reprod*, v.58, p.786-793, 1998.

**Töpfer-Petersen E, Ekhlasi-Hundrieser M, Kirchhoff C, Leeb T, Sieme H.** The role of stallion seminal proteins in fertilization. *Anim Reprod Sci*, v.89, p.159-170, 2005.

**Troiano L, Granata AR, Cossarizza A, Kalashnikova G, Bianchi R, Pini G, Tropea F, Carani C, Franceschi C.** Mitochondrial membrane potential and DNA stainability in human sperm cells: a flow cytometry analysis with implications for male infertility. *Exp Cell Res*, v.241, p.384-393, 1998.

**Turner RMO, Casas-Dolz R, Schlingmann KL, Hameed S.** Characterization of an A-kinase anchor protein in equine spermatozoa and examination of the effect of semen cooling and cryopreservation on the binding of that protein to the regulatory subunit of protein kinase-A. *Am J Vet Res*, v.66, p.1056-1064, 2005.

**Valcárcel A, De Las Heras MA, Pérez L, Moses DF, Baldassarre H.** Fluorescent staining as a method of assessing membrane damage and post-thaw survival of ram spermatozoa. *Theriogenology*, v.41, p.483-89, 1994.

**Wilhelm KM, Graham JK, Squires EL.** Comparison of the fertility of cryopreserved stallion spermatozoa with sperm motion analyses, flow cytometric evaluation, and zona-free hamster oocyte penetration. *Theriogenology*, v.46, p.559-578, 1996.