

Metodologia de avaliação laboratorial do sêmen congelado bovino

Methods of assessments of frozen-thawed bull semen

C.P. Freitas-Dell'Aqua¹, A.M. Crespilho, F.O. Papa, J.A. Dell'Aqua Junior

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, UNESP, Botucatu, SP, Brasil

¹Correspondência: cpaulafreitas@yahoo.com.br

Resumo

Diversos métodos de análise laboratorial do sêmen congelado bovino têm sido desenvolvidos, no entanto a correlação entre os parâmetros espermáticos e os índices de fertilidade *in vivo* ainda são variáveis. Dentre os principais testes de análise espermática utilizados, pode-se destacar: análise subjetiva da motilidade, análise computadorizada do movimento espermático e morfologia, testes de separação, análise morfofuncional por meio de microscopia de fluorescência ou citometria de fluxo. Embora nenhuma técnica de avaliação tomada isoladamente apresente sensibilidade suficiente para a determinação da fertilidade, a combinação dos diversos métodos tem agregado maior precisão para a estimativa do potencial de fertilização das amostras de sêmen bovino congelado. Objetivou-se com esta revisão descrever os métodos de análise laboratorial do sêmen bovino congelado.

Palavras-chave: sêmen bovino, criopreservação, análise laboratorial, fertilidade.

Abstract

Several methods of laboratory analysis of frozen bovine semen have been developed, however the correlation between sperm parameters and fertility rates *in vivo* are still variable. Among the major sperm analysis we can found: sperm motion and morphology, separation tests and morphofunctional analysis by fluorescence microscopy or flow cytometry. Although no evaluation technique taken alone provide enough sensitivity for the fertility determination, the combination of many methods has added greater precision to estimate the potential fertility of frozen bovine semen samples. The objective of this review will be describe the methods of laboratory analysis of frozen bovine semen.

Keywords: bovine semen, cryopreservation, laboratory tests, fertility

Introdução

A utilização do sêmen congelado de bovino representa a principal biotécnica reprodutiva para o melhoramento genético animal. Entretanto, as demais metodologias de análise espermática pouco contribuem para uma predição do potencial fecundante de uma amostra.

Os primeiros trabalhos que investigaram a fertilidade de touros (Willians e Savage, 1927; Lagerlof, 1938) enfatizaram a produção de espermatozoides anormais em animais subfêrteis e estêreis, demonstrando uma relação entre a porcentagem de patologias e baixa fertilidade. Uma das primeiras técnicas a serem utilizadas na avaliação seminal foi a análise da morfologia espermática, técnica até hoje sem grandes modificações. Porém, a motilidade e a produção espermática (densidade e volume) estão relacionadas com a morfologia; isso porque sua análise pode indicar até que ponto a motilidade e a produção espermática estão dentro dos padrões fisiológicos (Barth e Oko, 1989). Assim, a análise de sêmen em diversas espécies foi baseada em técnicas de microscopia, tendo como principais parâmetros avaliados: motilidade, vigor, concentração e morfologia.

Atualmente os métodos de avaliação utilizados em centrais de colheita e processamento de sêmen consistem basicamente em análise subjetiva da motilidade (antes e após estresse térmico), concentração, morfologia e integridade das membranas plasmática e acrossomal (Crespilho et al., 2009). Os testes de inseminação artificial (IA) ou fertilização *in vitro* (FIV) representam as técnicas de maior sensibilidade para o acesso ao potencial de fertilização das amostras seminais (Crespilho et al., 2009), pois permitem a avaliação simultânea dos requisitos mais importantes da célula espermática para o processo de fertilização (Rodriguez-Martinez, 2005). No entanto, o alto custo e consumo de tempo das avaliações, aliados à complexidade e à dependência da estabilidade laboratorial imposta pela FIV (Hallap et al., 2004; Rodriguez-Martinez, 2005), tornam impraticável a adoção de tais métodos na rotina da análise do sêmen bovino. Por essa razão, diversos estudos têm sido conduzidos no sentido de se estabelecer a correlação de cada teste laboratorial ou suas associações com os índices de fertilidade *in vivo*, buscando-se, dessa maneira, predizer o potencial de fertilidade agregado às amostras seminais.

Os principais trabalhos desenvolvidos nas últimas duas décadas contemplam a adoção de técnicas

computadorizadas de avaliação do movimento espermático, testes de incubação e separação espermática e análise morfofuncional por meio de sondas fluorescentes para o acesso ao potencial de fertilização das amostras de sêmen congelado (Walthers et al., 2004; Crespilho, 2007; Rodriguez-Martinez, 2007; Rodriguez-Martinez e Barth, 2007).

Deste modo, na presente revisão, são abordados os métodos atuais utilizados para a avaliação de sêmen congelado de bovinos.

Morfologia espermática

Como apenas os espermatozoides viáveis são capazes de interagir com o ovócito e iniciar o processo de fertilização (Walters et al., 2004), sabe-se que os defeitos específicos na morfologia estrutural das células espermáticas correlacionam-se com a sub e a infertilidade masculina (Saacke et al., 1999; Pesh e Bergmann, 2006). Assim, a análise da morfologia espermática (Fig. 1) permite a identificação de touros com baixo potencial de fertilidade, evitando a entrada desses animais nos programas de congelamento de sêmen e nos testes de progênie (Januskauskas e Zilinskas, 2002).

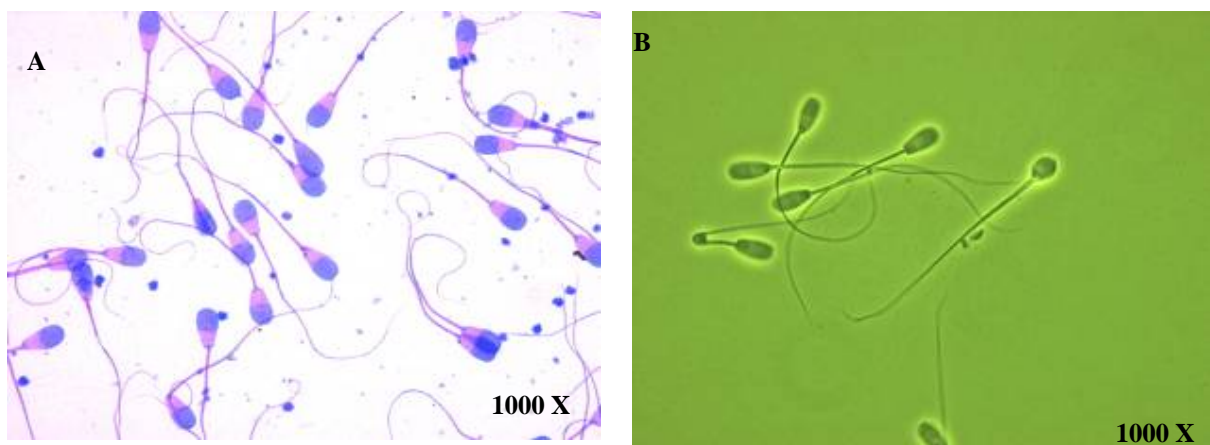


Figura 1. Avaliação da morfológica de espermatozoides bovinos. A: coloração de Karras Modificada por Papa et al. (1988). B: microscopia de contraste de fase evidenciando diversos defeitos espermáticos.

Nos estudos realizados por Phillips et al. (2004b), das 30 análises laboratoriais conduzidas na tentativa de prever os índices de fertilidade do sêmen bovino congelado, isoladamente apenas morfologia espermática pós-descongelamento apresentou correlação significativa com a taxa de concepção após inseminação artificial. No mesmo trabalho, foi possível concluir que as melhores equações preditivas encontradas foram derivadas dos resultados referentes à morfologia espermática, permitindo, dessa forma, a identificação dos touros com maior ou menor potencial de fertilidade.

Quando os defeitos morfológicos se expressam por alterações em escala nanométrica (nm), podem ocorrer falhas nos métodos tradicionais de avaliação (Joshi et al., 2001). Por exemplo, embora a identificação de espermatozoides portadores de defeitos de cabeça seja possível por meio de microscopia de interferência e diferencial (DIC; Saacke et al., 1998), a observação de elementos, como o formato da cabeça do espermatozóide, requer o emprego de métodos mais objetivos, como a análise computadorizada da morfometria espermática (ASMA), técnica que pode proporcionar a identificação de touros com problemas de fertilidade (Parrish e Foote, 1987).

Análise computadorizada do movimento espermático

O movimento espermático representa uma das características mais importantes associadas ao potencial de fertilização de uma amostra seminal, reportando-se uma clara associação entre a ausência de movimento e os quadros de infertilidade (Olds-Clarke, 1996). Usualmente, motilidade dos espermatozoides é estimada de forma subjetiva, por meio da avaliação visual das células sob microscopia óptica convencional, representando a principal análise laboratorial utilizada pelas centrais de coleta e congelamento de sêmen (Arruda et al., 2005; Crespilho et al., 2006)

Com o propósito da obtenção de uma técnica de maior repetibilidade, o sistema computadorizado de análise espermática (CASA) representa um método objetivo que gera informações importantes a respeito das propriedades cinéticas de um ejaculado baseando-se na avaliação individual das células (Ferreira et al., 1997; Januskauska e Zilinskas, 2002), o que permite a identificação de diferentes subpopulações espermáticas em uma

amostra (Verstegen et al., 2002).

Este detalhamento da cinética celular proporcionada por CASA reflete a atividade metabólica espermática (Gil et al., 2000) e a qualidade dos espermatozoides presentes em uma amostra seminal (Farrel et al., 1996). Entretanto, surge como desafio determinar qual ou quais dos parâmetros analisados podem contribuir para a inferência do potencial fecundante do sêmen (Ferreira et al., 1997).

Apesar da grande controvérsia existente a respeito da correlação dos padrões de movimento espermático com os índices de fertilidade *in vivo*, são observadas diferenças significativas no padrão de movimento desempenhado por espermatozoides que alcançam altas e baixas taxas de fertilização (Verstegen et al., 2002). Nesse sentido, algumas variáveis geradas pela técnica CASA, como a linearidade espermática, parecem apresentar maior correlação com fertilidade (Zhang et al., 1999; Rodriguez-Martinez, 2005). Ainda, a associação de múltiplas variáveis de movimento geradas pela técnica CASA mostra maior correlação com fertilidade *in vivo* em relação à utilização de apenas um atributo de movimento (Farrel et al., 1998).

No entanto, mesmo a avaliação computadorizada do movimento espermático proporciona inconsistente correlação com os índices de concepção animal quando utilizada isoladamente, visto que a motilidade espermática representa apenas um dos vários pré-requisitos básicos indispensáveis para que os espermatozoides concluam com êxito sua função biológica representada pela fertilização do ovócito (Graham e Mocé, 2005).

Testes de separação espermática

Os procedimentos de separação espermática permitem a recuperação de espermatozoides de melhor qualidade, exibindo maior proporção de movimento progressivo e de células morfológicamente normais (Verstegen et al., 2002), o que justifica a ampla utilização das diversas técnicas nos trabalhos de fertilização *in vitro* (Samarzija et al., 2006).

Dentre os principais métodos utilizados para separação espermática, destacam-se *swim-up*, separação por gradiente descontínuo de BSA, filtração em coluna de lã de vidro, técnica do sedimento (*swim-down*), filtração em coluna de sefadex/filtro de troca iônica, separação por gradiente descontínuo de Percoll e lavagem mediante centrifugação (Coelho et al., 2000). Particularmente os métodos de separação baseados em lavagens e centrifugações podem resultar, direta ou indiretamente, em danos irreversíveis aos espermatozoides (Centola et al., 1998), havendo, portanto, a preferência por técnicas de separação baseadas na própria capacidade de migração espermática para efeito de avaliação da qualidade das amostras seminais.

Nesse contexto, o *swim-up* pode ser definido como um teste multifuncional que avalia a capacidade espermática em transpor diferentes barreiras fluidas, semelhante ao processo que ocorre durante o transporte espermático no trato reprodutor feminino, representando uma alternativa valiosa no acesso à fertilidade do sêmen bovino congelado. Este mimetiza laboratorialmente o processo de seleção espermática que ocorre naturalmente na junção útero-tubárica do aparelho reprodutor feminino, avaliando o número de espermatozoides presentes em uma amostra que se encontram aptos ao processo de fertilização (Rodriguez-Martinez, 2005).

O número de espermatozoides recuperados ao *swim-up* apresenta uma alta correlação com a quantidade de células viáveis presentes em uma amostra seminal (Parrish e Foote, 1987), sendo reportadas correlações significativas entre a quantidade de espermatozoides separados pela técnica (número de espermatozoides móveis), os resultados ao teste de ligação à zona pelúcida e a taxa de formação de blastocistos na fertilização *in vitro* (Zhang et al., 1999). Todos os parâmetros gerados com base na técnica de *swim-up* correlacionam-se positivamente com a taxa de não retorno ao estro das fêmeas bovinas, destacando-se o número de espermatozoides normais, a concentração espermática recuperada e a motilidade total e o número de células exibindo movimento progressivo pós *swim-up* (Phillips et al., 2004a, b). No entanto, parâmetros como número de espermatozoides recuperados e integridade de membrana plasmática após *swim-up* sofrem influência significativa da concentração de células espermáticas originalmente presentes nas amostras seminais submetidas ao teste (Crespilho, 2007), condição que pode determinar uma baixa sensibilidade às avaliações.

Avaliação morfofuncional

Integridade de membrana plasmática

A integridade de membrana plasmática é um pré-requisito para que ocorram os eventos fisiológicos relacionados ao processo de fertilização, que incluem capacitação espermática, ligação à zona pelúcida, reação acrossomal e fusão dos gametas (Papa et al., 2000). Os diversos domínios de membrana dos espermatozoides mostram-se altamente vulneráveis à criopreservação, observando-se, frequentemente, a queda significativa da viabilidade espermática em função do processamento. Em virtude das características intrínsecas aos espermatozoides, desprovidos de atividade biossintética, reparadora, de crescimento e divisão (Yoshida, 2000), observa-se uma grande vulnerabilidade celular ao processo de congelamento/decongelamento, resultando, particularmente, na ruptura e desestabilização das membranas durante a criopreservação.

Vários testes têm sido empregados para a determinação da integridade da membrana plasmática, como

as colorações supravitais, incluindo Tripan-Blue-Giensa e Eosina-Nigrosina, testes hiposmóticos e, mais recentemente, o uso das sondas fluorescentes que atuam através de reações com enzimas citoplasmáticas ou de ligação com o DNA espermático (Brito et al., 2003; Arruda et al., 2005; Rodriguez-Martinez, 2005). As preparações empregando a combinação de sondas fluorescentes ou fluocromos, avaliadas por meio de microscopia de epifluorescência ou citometria de fluxo, destacam-se como as mais estudadas e utilizadas na determinação da integridade da membrana plasmática dos espermatozoides, gerando resultados quantitativos sobre a permeabilidade relativa das membranas e conferindo especificidade na diferenciação entre células funcionais e afuncionais (Rodriguez-Martinez, 2003). As principais sondas utilizadas para avaliação da viabilidade espermática são o iodeto de propídeo (PI), SYBR-14, Diacetato de Carboxifluoresceína (CFDA), Hoeschst 33258 (H258) e 33342 (H342), e a Concanavalina A (Conc A) associada ao isotiocionato de fluoresceína (Arruda et al., 2005).

Embora existam relatos indicando grande variabilidade entre a correlação dos índices de fertilidade e a integridade de membrana plasmática do sêmen bovino congelado (Rodriguez-Martinez, 2003), trabalhos sinalizam para a efetividade da técnica como ferramenta de análise das amostras seminais. Tartaglione e Ritta (2004), associando os valores obtidos para a integridade da membrana plasmática determinada por colorações supravitais e teste hiposmótico, conseguiram explicar 82,4% das variações encontradas nas taxas de fertilização *in vitro*. O número de espermatozoides viáveis expressos por meio da integridade da membrana plasmática correlaciona-se positivamente com fertilidade ($r = 0,68$), representando a variável de maior impacto isolado na predição da fertilidade seminal (Januskauskas et al., 2003).

Índice de apoptose

Estudos conduzidos com sêmen de humanos e de touros demonstram que os espermatozoides apresentam certas características apoptóticas semelhantes às das células somáticas, como a fragmentação de DNA ou a translocação de fosfatidilserina (Gorczyca et al., 1993; Anzar et al., 2002). Durante o início da apoptose, a célula perde sua simetria de membrana plasmática. A fosfatidilserina, normalmente presente no interior da membrana das células saudáveis, é translocada e exposta ao meio extracelular, distúrbio que progressivamente pode levar às lesões de membrana (Martin et al., 1995).

Anzar et al. (2002), utilizando a associação de anexina V-FITC e iodeto de propídeo, encontraram quatro diferentes populações espermáticas no sêmen de bovino: necróticas, seminecróticas, apoptóticas e vivas. A anexina V permite a identificação de células com integridade de membrana numa fase inicial de deterioração em relação à utilização de uma sonda supravital (Vermes et al., 1995).

Do mesmo modo, foram encontradas caspases ativadas, principalmente a 3 e a 7, que são precursoras da cascata apoptótica (Martí et al., 2006). Estas enzimas são consideradas como as maiores transdutoras e efetoras dentro dos diferentes percursos de sinalização de apoptose em células somáticas. Elas pertencem à família de proteases altamente específicas, as quais contêm o aminoácido cisteína em seus sítios ativos (Paasch et al., 2004).

Anzar et al. (2002) mostraram que a fertilidade de touros não foi correlacionada com a taxa de apoptose de sêmen fresco ou congelado, mas com a porcentagem de células necróticas no sêmen fresco ($r = 0,98$). O aumento do número de células em apoptose pode interferir na longevidade seminal (Ortega-Ferrusola et al., 2008). Esta diminuição da longevidade do sêmen pode influir negativamente em programas de inseminação artificial.

Condição da membrana acrossomal

O acrossomo, derivado do complexo de Golgi, é composto por enzimas hidrolíticas organizadas em um tipo de matriz (Ramalho-Santos et al., 2002). A ligação do espermatozoide com a zona pelúcida provoca reação acrossômica, resultando na liberação e ativação das enzimas acrossomais. Estes eventos, em conjunto com a hiperativação da motilidade, ajudarão o espermatozoide a penetrar a zona pelúcida (Honda et al., 2002). Assim, o acrossomo deve permanecer intacto antes e durante o trânsito pelo trato reprodutivo da fêmea até ocorrer a ligação com a zona pelúcida. Quando a reação acrossômica ocorre prematuramente, pode-se observar uma queda na fertilidade do sêmen (Silva e Gadella, 2006).

A congelação e a descongelação provocam alterações mecânicas na membrana plasmática que induzem à capacitação parcial ou completa das células espermáticas (Cormier et al., 1997), abreviando o tempo de sobrevivência desses gametas (Rodriguez-Martinez, 2003). Nesse sentido, corantes fluorescentes, como Merocianina-540 ou Clortetraciclina, têm sido utilizados para monitorar o grau de capacitação espermática e sua associação com a fertilidade do sêmen bovino congelado (Graham e Mocé, 2005).

Cerca de 30% dos espermatozoides bovinos congelados apresentam alterações compatíveis com capacitação (Verstegen et al., 2002), sendo observada uma correlação positiva entre porcentagem de espermatozoides não capacitados e taxa de não retorno ao estro após inseminação artificial (Thundathil et al., 1999). As membranas acrossomais são “pré-programadas” para sofrerem a fusão natural que resulta na reação

acrossomal, característica que determina maior sensibilidade aos processos de refrigeração e congelamento em relação aos outros domínios da membrana dos espermatozoides (Graham, 2001). Nesse sentido, a integridade do acrossomo e a capacidade das células espermáticas em reagir *in vitro* à estimulação para reação acrossomal podem ser utilizadas para fins prognósticos no acesso à qualidade das amostras congeladas.

Para a determinação da integridade do acrossomo, tem sido popularizada a combinação de sondas fluorescentes, como o isotiocianato de fluoresceína (FITC) associado a aglutininas como a do *Ricinus communis* (RCA) e *Psium sativum* (PSA), os quais apresentam capacidade de ligação a glicoproteínas específicas da membrana acrossomal (Arruda et al., 2005), permitindo, dessa forma, a visualização das estruturas sob microscopia de epifluorescência. Já a indução de reação do acrossomo pode ser avaliada *in vitro* por meio da incubação com glicosaminoglicanos, cálcio ionóforo (Hoescht A23187) ou solubilizado de proteínas de zona pelúcida (Rodríguez-Martínez, 2000; Gil et al., 2000), sendo descritas correlações significativas ($r = 0,60$) entre a responsividade à reação e as taxas de não retorno ao estro animal (Januskauskas et al., 2000).

Estrutura da cromatina

Nos estudos em humanos e eqüinos; observa-se correlação negativa entre fertilidade e integridade de DNA (Agarwal e Said, 2003; Love, 2005; Morrell et al., 2008). Assim, a concepção depende, entre outros fatores, da habilidade da cromatina espermática previamente condensada em se descondensar e formar o pronúcleo masculino durante a interação com o ovócito (Madrid-Bury et al., 2005).

O aumento da susceptibilidade à desnaturação do DNA denota a heterogeneidade da estrutura da cromatina, relacionando-se a distúrbios da espermatogênese e teratozoospermia (Evenson et al., 1980). Como o desenvolvimento embrionário inicial depende da integridade do DNA espermático (Rodrigues-Martínez, 2005), o acesso à estabilidade do material genético dos espermatozoides pode proporcionar informações adicionais sobre a qualidade das amostras seminais.

A análise estrutural da cromatina espermática é realizada submetendo a célula a um ambiente ácido e verificando a susceptibilidade do DNA à desnaturação, entre outros métodos, com o uso da acridina laranja. O corante se intercala à dupla fita de DNA e fluoresce em verde quando esta se apresenta íntegra. Todavia, quando associada a uma porção desnaturada da fita de DNA ou ao RNA, a acridina emite fluorescência laranja, permitindo a quantificação de desnaturação do DNA das células de uma amostra (Love, 2005).

Evenson e Jost (2000) classificaram o potencial de fertilidade de diferentes espécies de acordo com o índice de fragmentação de DNA (IFD), sendo baixo potencial quando IFD for maior ou igual a 30%, moderado quando maior que 16% e menor que 30% e alto quando menor ou igual a 15%. Em casos de esterilidade, os valores de IFD ficaram entre 80 e 90%.

Bochenek et al. (2001) mostraram que ocorre de 1,2 a 3% de danos na cromatina em sêmen congelado com alta fertilidade e uma correlação negativa entre os danos na cromatina e a fertilidade ($r = -0,50$). São descritas outras correlações significativas, porém variáveis ($r = 0,33$ a $0,94$), entre o grau de desnaturação do DNA e os índices de fertilidade de amostras de sêmen bovino congelado, utilizadas em programas de inseminação artificial (Rodríguez-Martínez, 2005).

Avaliação da função mitocondrial

Cerca de 100 mitocôndrias encontram-se dispostas helicoidalmente à peça intermediária de cada espermatozoide, apresentando como função principal a produção do ATP celular, matriz energética para os batimentos flagelares. Em virtude do seu papel biológico, a integridade e a funcionalidade das mitocôndrias espermáticas relacionam-se positivamente com a motilidade (Rodrigues-Martínez, 2005) e a viabilidade dos espermatozoides (Januskauskas e Zilinskas, 2002), embora a correlação com fertilidade *in vivo* apresente-se variável (Hallap et al., 2005). A função mitocondrial é de extrema importância, pois representa a viabilidade espermática a respeito da respiração celular e produção de energia em forma de ATP (Cosson, 1996).

Atualmente a função mitocondrial pode ser avaliada sob microscopia de fluorescência por meio de sondas, como Rodamina 123, Mito Tracker Green FM e Mito Tracker Reed, que permitem a identificação de mitocôndrias em células vivas (Arruda et al., 2005). Outra possibilidade corresponde à utilização da sonda 5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazolyl-carbocyanine iodide (JC-1), que permite a distinção entre espermatozoides com baixa e alta função mitocondrial (Gadella e Harrison, 2002). JC-1 é uma sonda fluorescente carbocianina lipofílica catiônica, que é internalizada pelo funcionamento das mitocôndrias. Quando em baixa função mitocondrial, (baixo potencial de membrana mitocondrial), fluoresce em verde. Quando em alta função mitocondrial a concentração de JC-1 dentro das mitocôndrias aumenta, e a coloração forma agregados que fluorescem em laranja (Gillian et al., 2005).

Existe uma divergência sobre a análise quantitativa da porcentagem de células com alto potencial mitocondrial, pois é conhecido que a capacitação espermática leva a uma hiperpolarização das membranas espermáticas, incluindo a mitocondrial, devido ao aumento dos níveis de íons Ca^{++} (Hernandez-Gonzales et al., 2006), provocando uma hiperativação. A base molecular do processo de capacitação espermática é a remoção de

colesterol e a alteração da distribuição dos fosfolípidos de membrana, as quais resultam na abertura dos canais de Ca^{++} . Modificações semelhantes podem acontecer na crioinjúria, causando uma capacitação espermática prematura. Este processo não é desejável por diminuir a longevidade espermática. Desta forma, valores de alto potencial de membrana mitocondrial, aliados a diferentes padrões de motilidade, tais como valores elevados de velocidade de trajeto (VAP), velocidade linear (VSL), velocidade curvilínea (VCL) e amplitude lateral de cabeça (ALH), correspondem aos parâmetros frequentemente relacionados ao processo de hiperativação (Yanagimachi, 1994; Ho e Suarez, 2001; Verstegen et al., 2002; Freitas, 2007).

Análise seminal de múltiplos parâmetros

A combinação de vários parâmetros de qualidade do sêmen bovino pós-descongelamento, avaliado por meio de baterias de testes específicos, pode explicar de maneira mais fidedigna as possíveis diferenças de fertilidade observadas entre touros em relação a qualquer avaliação espermática tomada isoladamente (Hallap et al., 2004). A observação de um único atributo espermático não permite mensurar adequadamente o potencial de fertilidade de uma amostra seminal, que depende, sobretudo, da funcionalidade de diversos componentes da célula espermática (Braundmeier e Miller, 2001). As amostras de sêmen devem ser submetidas *in vitro* a testes funcionais capazes de distinguir a habilidade dos espermatozoides em superar etapas específicas relacionadas ao processo de fertilização, ativando o desenvolvimento embrionário inicial (Rodriguez-Martinez, 2003).

A combinação de diversas sondas fluorescentes possibilita a avaliação simultânea de diferentes estruturas espermáticas (Arruda et al., 2005). Atualmente existe uma grande quantidade de sondas fluorescentes capazes de avaliar quase todas as estruturas e funções celulares. Assumpção et al. (2002) utilizaram a associação das sondas iodeto de propídio, JC-1 e FITC-PSA para a avaliação da capacitação espermática (Fig. 2), comparando-a com a coloração tripla de vermelho congo, vermelho neutro e giemsa, e chegaram à conclusão que a epifluorescência mostrou-se mais eficiente na avaliação.

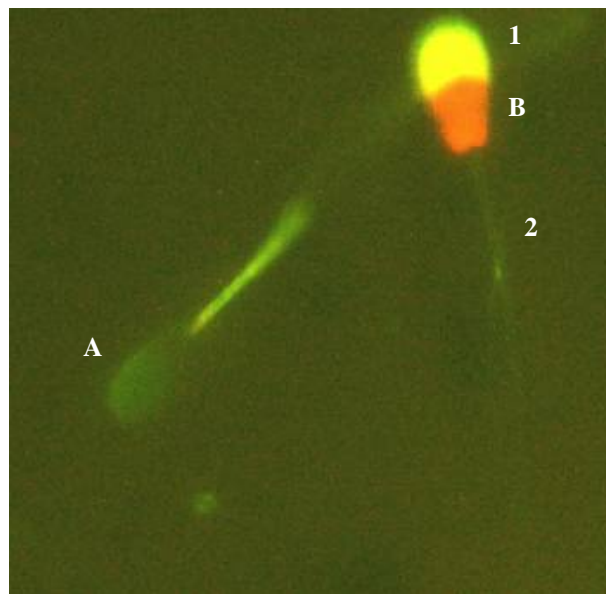


Figura 2. Micrografia de espermatozoides bovinos corados com a associação de sondas fluorescentes Iodeto de Propídeo, FITC-PSA e JC-1 permitindo a avaliação simultânea da integridade das membranas plasmática e acrossomal, além do potencial mitocondrial. A: espermatozoide apresentando integridade de membrana plasmática, acrossomal e baixo potencial de membrana mitocondrial. B: célula espermática apresentando membranas plasmática e acrossomal lesadas e baixo potencial mitocondrial. Onde: 1 – acrossomo; 2 – peça intermediária (região mitocondrial).

Graham (2001) obteve correlações próximas a 80% quando comparou diversas análises espermáticas (motilidade total, integridade de membrana plasmática e de membrana acrossomal) com os índices de fertilidade gerados por essas amostras. Quanto maiores os valores destas variáveis encontrados nas amostras analisadas maiores foram as taxas de gestação obtidas.

Phillips et al. (2004b) verificaram que amostras de sêmen com altos valores de integridade de membrana plasmática após descongelamento e após o *swim-up* associado a boas taxas de clivagem *in vitro* apresentavam altas taxas de prenhez quando utilizadas em teste de fertilidade a campo. Zhang et al. (1999), associando sete parâmetros espermáticos diferentes (motilidade total, padrão de movimentação linear, circular e não linear fertilização *in vitro*, separação por *swim-up* e ligação à zona pelúcida), observaram alta correlação ($r =$

0,94) entre os índices de fertilidade obtidos em testes *in vivo*, indicando que uma avaliação multiparamétrica proporciona maior relação com os índices de fertilidade animal.

Avaliação por citometria de fluxo

Uma série de características da célula espermática, como integridade das membranas plasmática e acrossomal, viabilidade e função celular podem ser avaliadas pela citometria de fluxo. Esta técnica possibilita a contagem, a classificação e o isolamento das células espermáticas que, após serem marcadas com um corante fluorescente específico, são individualmente movidas por meio de um sistema detector óptico em fluxo laminar e, então, contadas.

A descoberta de uma variedade de fluorocromos e compostos conjugados com sondas fluorescentes tornou possível uma análise mais generalizada da qualidade do sêmen em níveis bioquímicos, ultraestruturais e funcionais. A maior parte destes ensaios usando fluorocromos tem sido desenvolvida para a utilização na microscopia de epifluorescência. No entanto, apenas a análise microscópica de um pequeno número de espermatozoides dentro de uma população pode ser subjetiva e, geralmente, não contempla toda a população espermática. A adaptação destas avaliações para uso em citometria de fluxo com marcadores fluorescentes representa uma forma rigorosa e rápida para avaliar atributos de uma amostra seminal (Gillian et al., 2005).

A citometria de fluxo é hoje utilizada para avaliar diferentes características da célula espermática, tais como: estrutura da cromatina (Love, 2005), viabilidade espermática (Garner et al., 1994; Garner e Johnson, 1995; Ferrara et al., 1997), função mitocondrial (Graham et al., 1990), *status* acrossomal (Graham et al., 1990; Thomas et al., 1998) e apoptose (Ricci et al., 2002).

Com a utilização da citometria de fluxo, é possível ainda a avaliação de múltiplos parâmetros em uma única amostra. A associação de sondas fluorescentes vai depender do tipo de laser, dos detectores de radiação e dos filtros presentes no citômetro. Alguns citômetros podem possuir até 16 detectores de radiação dispersa e fluorescente, o que permite analisar múltiplas possibilidades de características celulares (Rieseberg et al., 2001). Novas técnicas de associação de sondas fluorescentes são constantemente desenvolvidas para aplicação na citometria de fluxo visando à avaliação dos espermatozoides das mais diferentes espécies animais (Gillian et al., 2005).

Considerações finais

Como os espermatozoides representam células complexas que dependem da funcionalidade de múltiplos atributos para exercerem seu papel natural na reprodução, ocorrem falhas nos métodos tradicionais de avaliação, observando-se, geralmente, correlações baixas ou variações entre os padrões de qualidade das amostras seminais avaliadas laboratorialmente e os índices de fertilidade alcançados nos programas de inseminação artificial em bovinos. A descoberta de uma variedade de fluorocromos conjugados e compostos de sondas fluorescentes tem permitido uma análise mais ampla dos atributos dos espermatozoides e, em conjunto com a citometria de fluxo, permite a avaliação de um grande número de espermatozoides. A principal vantagem é a análise individual de milhares de células em poucos segundos, agregando maior repetibilidade às avaliações.

O maior entendimento da qualidade espermática em amostras seminais é fundamental para que, em um futuro próximo, as avaliações *in vitro* possam projetar de forma segura expectativas de fertilidade com sua aplicação em testes a campo.

Referências bibliográficas

- Agarwal A Said, TM.** Role of sperm chromatin abnormalities and DNA damage in male infertility. *Hum Reprod*, v.9, p.331-345, 2003.
- Anzar M, He L, Buhr MM, Kroetsch TK, Pauls KP.** Sperm apoptosis in fresh and cryopreserved bull semen detected by flow cytometry and its relationship with fertility. *Biol Reprod*, v.66, p.354-360, 2002.
- Arruda RP, Celeghini ECC, Souza LWO, Nascimento J, Andrade AFC, Raphael CF, Garcia AR.** Importância da qualidade do sêmen em programas de IATF e TETF. *Acta Sci Vet*, v.33, supl.1, p.145-150, 2005.
- Assumpção MEOD, Haipeck K, Lima AS, Mello MRB, Oliveira LJ, Oliveira VP, Tavares SLMT, Visintin JA.** Capacitação espermática *in vitro* com heparina e cálcio ionóforo e sua correlação com a fertilidade em touros. *Braz J Vet Res Anim Sci*, v.39, p.149-156, 2002.
- Barth AD, Oko RJ.** *Abnormal morphology of bovine spermatozoa*. Ames: Iowa State University Press, 1989. 285p.
- Bochenek M, Smorag Z, Pilch J.** Sperm chromatin structure assay of bulls qualified for artificial insemination. *Theriogenology*, v.56, p.557-567, 2001.
- Braundmeier AG, Miller DJ.** The search is on: finding accurate molecular markers of male fertility. *J Dairy Sci*, v.84, p.1915-1925, 2001.
- Brito LFC, Barth AD, Bilodeau-Goeseels S, Panich PL, Kastelic JP.** Comparison of methods to evaluate the

- plasmalemma of bovine sperm and their relationship with in vitro fertilization rate. *Theriogenology*, v.60, p.1539-1551, 2003.
- Centola GM, Herko R, Andolina E.** Comparison of sperm separation methods: effect on recovery, motility, motion parameters, and hyperactivation. *Fertil Steril*, v.70, p.1173-1175, 1998.
- Coelho LA, Eesper CR, Garcia JM.** Fecundação *in vitro* de ovócitos bovinos com sêmen submetido a diferentes diluidores. *Rev Bras Zootec*, v.29, p.397-402, 2000.
- Cormier N, Sirard MA, Bailey JL.** Premature capacitation of bovine spermatozoa is initiated by cryopreservation. *J Androl*, v.18, p.461-468, 1997.
- Cosson JA.** A moving image of flagella: news and views on the mechanisms involved in axonemal beating. *Cell Biol Int*, v.20, p.83-94, 1996.
- Crespilho AM.** *Efeito do meio diluidor e da dose inseminante sobre a congelabilidade e fertilidade do sêmen bovino utilizado em programas de inseminação artificial em tempo-fixo (IATF)*. 2007. 124f. Dissertação (Mestrado, Área de Concentração: Reprodução Animal) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, SP.
- Crespilho AM, Landim-Alvarenga FC, Papa FO.** Infertilidade associada a defeito microtubular dos espermatozoides de jumento (*Equus asinus*) avaliados por microscopia eletrônica de transmissão. *Ciênc Rural*, v.36, p.1507-1510, 2006.
- Crespilho AM, Papa FO, Martins Junior A, Dell'Aqua Junior JA.** Evaluation of frozen bovine semen: How do semen collection and processing centers evaluate the quality of commercialized samples? *Vet Zootec*, v.16, p.335-342, 2009.
- Evenson DP, Darzynkiewicz Z, Melamed MR.** Relation of mammalian sperm chromatin heterogeneity to fertility. *Science*, v.210, p.1131, 1980.
- Evenson DP, Jost L.** Sperm chromatin structure assay is useful for fertility assessment. *Methods Cell Sci*, v.22, p.169-189, 2000.
- Farrel PB, Foote RH, McArdle MM, Trouern-Trend V, Tardif AL.** Media and dilution procedures tested to minimize handling effects on human, rabbit, and bull sperm for computer-assisted sperm analyses (CASA). *J Androl*, v.17, p.293-300, 1996.
- Farrel PB, Presicce GA, Brockett CC, Foote RH.** Quantification of bull sperm characteristics measured by Computer-Assisted Sperm Analysis (CASA) and the relationship to fertility. *Theriogenology*, v.49, p.871-879, 1998.
- Ferrara F, Daverio E, Mazzini G, Bonini P, Banfi G.** Automation of human sperm cell analysis by flow cytometry. *Clin Chem*, v. 43, p.801-807, 1997.
- Ferreira JCP, Neves Neto JR, Papa FO.** Avaliação computadorizada das características espermáticas de garanhões com fertilidade comprovada. *Rev Bras Reprod Anim*, v.21, p.131-132, 1997
- Freitas CP.** *Variações metodológicas na congelação de sêmen bovino sexado*. 2007. 87f. Dissertação (Mestrado, Área de Concentração: Reprodução Animal) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, SP.
- Gadella BM, Harrison RAP.** Capacitation induces cyclic adenosine 30,50-monophosphate-dependent, but apoptosis-unrelated, exposure of aminophospholipids at the apical head plasma membrane of boar sperm cells. *Biol Reprod*, v.67, p.340-350, 2002.
- 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, Johnson LA, Yue ST, Roth BL, Haugland RP.** Dual DNA staining assessment for bovine sperm viability using SYBR 14 and propidium iodide. *J Androl*, v.15, p.620-629, 1994
- Gil J, Januskauskas A, Håård MCH, Håård MGM, Johannisson A, Söderquist L, Rodriguez-Mártinez H.** Functional sperm parameters and fertility of bull semen extended in Biciphos-Plus® and Triladyl®. *Reprod Domest Anim*, v.35, p.69-77, 2000.
- Gillian L, Evans G, Maxwell WMC.** Flow cytometric evaluation of sperm parameters in relation to fertility potential. *Theriogenology*, v.63, p.445-457, 2005.
- Gorczya W, Traganos F, Jesionowska H, Darzynkiewicz Z.** Presence of DNA strand breaks and increase sensitivity of DNA in situ denaturation in abnormal human sperm cells: analogy to apoptosis of somatic cells. *Exp Cell Res*, v.207, p.202-205, 1993.
- Graham JK.** Assessment of sperm quality. In: Annual Convention of the AAEP, 47, 2001, San Diego, CA. *Proceedings...* San Diego, CA: AAEP, 2001. p.302-305.
- 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.
- Graham JK, Mocé E.** Fertility evaluation of frozen/thawed semen. *Theriogenology*, v.64, p.492-504, 2005.
- Hallap T, Haard M, Jaakma U, Larsson B, Rodriguez-Martinez H.** Does cleansing of frozen-thawed bull semen before assessment provide samples that relate better to potential fertility? *Theriogenology*, v.62, p.702-713, 2004.
- Hallap T, Nagy S, Haard M, Jaakma U, Johannisson A, Rodriguez-Martinez H.** Sperm chromatin stability

- in frozen-thawed semen is maintained over age in AI bulls. *Theriogenology*, v.63, p.1752-1763, 2005.
- Hernandez-Gonzales EO, Sosnik J, Edwards J, Acevedo JJ, Mendoza-Lujambio I, Lopez-Gonzalez I, Demarco I, Wertheimer E, Darzon A, Visconti PE.** Sodium and epithelial sodium channels participate in the regulation of the capacitation associated hyperpolarization in mouse sperm. *J Biol Chem*, v.281, p.5623-5633, 2006.
- Ho HC, Suarez SS.** An inositol 1,4,5-trisphosphato receptor-gated intracellular Ca^{++} store is involved in regulating, and acrosome reactions. *Biol Reprod*, v.65, p.1606-1615, 2001.
- Honda A, Siruntawineti J, Baba T.** Role of acrosomal matrix proteases in sperm-zona pellucida interactions. *Hum Reprod Update*, v.8, p.405-412, 2002.
- Januskauskas A, Gil J, Söderquist L, Hrd MGM, Hrd MCh, 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.641-658, 2000.
- Januskauskas A, Johannisson A, Rodriguez-Martinez H.** Subtle membrane changes in cryopreserved bull semen in relation with sperm viability, chromatin structure, and field fertility. *Theriogenology*, v.60, p.743-758, 2003.
- Januskauskas A, Zilinskas H.** Bull semen evaluation post-thaw and relation semen characteristics to bulls fertility. *Vet Zootech*, v.39, p.1-8, 2002.
- Joshi N, Medina H, Cruz I, Osuna J.** Determination of the ultrastructural pathology of human sperm by atomic force microscopy. *Fertil Steril*, v.75, p.961-966, 2001.
- Lagerlof N.** Infertility in male domestic animals. *Vet Med*, v.33, p.550-561, 1938
- Love CC.** The sperm chromatin structure assay: A review of clinical applications. *Anim Reprod Sci*, v.89, p.39-45, 2005.
- Madrid-Bury N, Pérez-Gutiérrez JP, Pérez-Garnelo S, Moreira P, Sanjuanbenito BP, Gutiérrez-Adán A, Martínez JF.** Relationship between non-return rate and chromatin condensation of deep frozen bull spermatozoa. *Theriogenology*, v.64, p.232-241, 2005.
- Martí E, Perez-Pe R, Muino-Blanco T, Cebrian-Perez JA.** Comparative study of four different sperm washing methods using apoptotic markers in ram spermatozoa. *J Androl*, v.27, p.746-753, 2006.
- Martin SJ, Reutelingersperger CP, McGahon AJ, Rader JA, van Schie RC, LaFace DM, Green DR.** Early redistribution of plasma membrane phosphatidylserine is a general feature of apoptosis regardless of the initiating stimulus: inhibition by overexpression of Bcl-2 and Abl. *J Exp Med*, v.182, p.1545-1556, 1995
- Morrel JM, Johannisson A, Dalin AM, Hammar L, Sandebert T, Rodriguez-Martinez H.** Sperm morphology and chromatin integrity in Swedish warmblood stallions and their relationship to pregnancy rates. *Acta Vet Scand*, v.50, p.2, 2008.
- Olds-Clarke P.** How does poor motility alter sperm fertilizing ability? *J Androl*, v.17, p.183-186, 1996.
- Ortega-Ferrusola C, Sotillo-Galan Y, Varela-Fernandez E, Gallardo-Bolanos JM, Muriel A, Gonzalez-Fernandez L, Tapia J, Pena FJ.** Detection of "Apoptosis-Like" changes during cryopreservation process in equine sperm. *J Androl*, v.29, p.213-221, 2008.
- Paasch U, Grunewald S, Agarwal A, Glandera H.** Activation pattern of caspase in human spermatozoa. *Fertil Steril*, v.81, p.802-809, 2004^a
- Papa FO, Gabaldi SH, Wolf A.** Viabilidade espermática pós-descongelamento de sêmen bovino criopreservados com meio diluente glicina-gema em quatro diferentes tempos de estabilização. *Rev Bras Reprod Anim*, v.24, p.39-44, 2000.
- Parrish JJ, Foote RH.** Quantification of bovine sperm separation by *swim-up* method – relationship to sperm motility, integrity of acrosomes, sperm migration in polyacrylamide gel and fertility. *J Androl*, v.8, p.259-266, 1987.
- Pesh S, Bergmann M.** Structure of mammalian spermatozoa in respect to viability, fertility and cryopreservation. *Micron*, v.37, p.597-612, 2006.
- Phillips NJ, Evans G, McGowan MR.** Measures used to assess frozen-thawed semen in Australian live-stock semen processing centers. *Aust Vet J*, v.82, p.309-310, 2004a.
- Phillips NJ, McGowan MR, Johnston SD, Mayer DG.** Relationship between thirty post-thaw spermatozoa characteristics and field fertility of 11 high-use Australian dairy AI sires. *Anim Reprod Sci*, v.81, p.47-61, 2004b.
- Ramallo-Santos J, Schatten G, Moreno RD.** Control of membrane fusion during spermiogenesis and the acrosome reaction. *Biol Reprod*, v.67, p.1043-1051, 2002.
- Ricci G, Perticarari S, Fragonas E, Giolo E, Canova S, Pozzobon C, Guaschino S, Presani G.** Apoptosis in human sperm: its correlation with sêmen quality and the presence of leukocytes. *Hum Reprod*, v.17, p.2665-2672, 2002.
- Rieseberg M, Kasper C, Reardon KF, Scheper T.** Flow cytometry in biotechnology. *Appl Microbiol Biotechnol*, v.56, p.350-260, 2001
- Rodriguez-Martinez H.** Evaluation of frozen semen: traditional and new approaches. In: Topics in bull fertility. Online. Disponível em: www.ivos.org/bull_fertility/2000/Martinez-Rodriguez. Acessado em: 20. ago. 2006.
- Rodriguez-Martinez H.** Laboratory semen assessment and prediction of fertility: still utopia? *Reprod Domest*

Anim, v.38, p.312-318, 2003.

Rodriguez-Martinez H. Methods for semen evaluation and their relationship to fertility. In: Congresso Brasileiro de Reprodução Animal, 16, 2005, Goiânia, GO. *Anais:Palestra...* Belo Horizonte, MG: CBRA, 2005. 8p.CD-ROM. 2005

Rodriguez-Martinez H. State of art in farm sperm evaluation. *Reprod Fertil Dev*, v.19, p.91-101, 2007.

Rodriguez-Martinez H, Barth AD. In vitro evaluation of sperm quality related to in vivo function and fertility. In: *Reproduction in Domestic Animals* vol. VI Nottingham, UK: Nottingham University Press, p. 39-54, 2007.

Saacke D, Mariethoz E, St John JC. Abnormal sperm parameters in humans are indicative of an abortive apoptotic mechanism linked to the Fas-mediated pathway. *Exp Cell Res*, v.251, p.350-355, 1999

Saacke RG, Dejarnette JM, Bame JH, Karabinus DS, Whitman SS. Can spermatozoa with abnormal heads gain access to the ovum in artificially inseminated super- and single-ovulation cattle. *Theriogenology*, v.50, p.117-128, 1998.

Samardzija M, Karadjole M, Matkovic M, Cergolj M, Getz I, Dobranic T, Tomaskovic A, Petric, J, Surina J, Grizelj J, Karadjole T. A comparison of BoviPure® and Percoll® on bull sperm separation protocols for IVF. *Anim Reprod Sci*, v.91, p.237-247, 2006.

Silva PFN, Gadella BM. Detection of damage in mammalian sperm cells. *Theriogenology*, v.65, p.958-978, 2006.

Tartaglione CM, Ritta MN. Prognostic value of spermatological parameters as predictors of in vitro fertility of frozen-thawed bull semen. *Theriogenology*, v.62, p.1245-1252, 2004.

Thomas CA, Garner DL, DeJarnette 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.

Thundathil J, Gil J, Januskauskas A, Larsson B, Söderquist L, Mapletoft, R, Rodriguez-Martinez H. Premature capacitation and fertility of frozen-thawed bull semen used in artificial insemination. *Theriogenology*, v.51, p.351, 1999. Abstract.

Vermes I, Haanen C, Reutelingsperger CPM. A novel assay for apoptosis: flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescence labelled annexin V. *J Immunol Methods*, v.180, p.39-52 1995

Verstegen J, Iguer-Ouada M, Onclin K. Computer assisted semen analyzers in andrology research and veterinary practice. *Theriogenology*, v.57, p.149-179, 2002.

Walters AH, Eyestone WE, Saacke RG, Pearson RE, Gwazdauskas FC. Sperm morphology and preparation method affect bovine embryonic development. *J Androl*, v.25, p.554-563, 2004.

Willians WW, Savage A. Methods of determining the reproductive health and fertility of bulls: a review with additional notes. *Cornell Vet*, v.17, p.374-385, 1927.

Yanagimachi R. Fertility of mammalian spermatozoa: its development and relativity. *Zygote*, v.2, p.371-372, 1994

Yoshida M. Conservation of sperms: current status and new trends. *Anim Reprod Sci*, v.60/61, p.349-355, 2000.

Zhang BR, Larsson B, Lundeheim N, Håård MGH, Rodriguez-Martinez H. Prediction of bull fertility by combined in vitro assessments of frozen-thawed semen from young dairy bulls entering an IA-programme. *Int J Androl*, v.22, p.253-260, 1999.