



Novas técnicas para avaliação da qualidade do sêmen caprino

New techniques for the assessment of goat semen quality: a review

A.M. Batista¹, M.M.P. Guerra

¹Laboratório de Andrologia, Departamento de Medicina Veterinária, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, PE, Brasil.

¹Correspondência: mariannob@yahoo.com.br

Resumo

Até recentemente, a avaliação do sêmen caprino era rotineiramente realizada por meio de técnicas de microscopia de luz convencional. As limitações destes métodos incluem subjetividade, variabilidade, reduzido número de espermatozoides analisados e pobre correlação com o potencial fertilizante. Nos últimos anos, novas técnicas de avaliação *in vitro* têm sido utilizadas para avaliação do sêmen caprino, permitindo o conhecimento mais detalhado de várias características espermáticas. Numerosas técnicas de coloração fluorescente têm sido desenvolvidas, tornando possível a análise mais ampla da qualidade do sêmen em níveis ultra-estrutural, funcional e bioquímico. Além disso, por meio da citometria de fluxo, um grande número de espermatozoides marcados com fluorescência pode ser analisado em um curto intervalo de tempo. Após completa padronização e validação, sistemas de análises computadorizadas proveem informações objetivas e detalhadas sobre várias características de motilidade e dimensões morfométricas que não podem ser identificadas pelas análises em microscopia de luz. Adicionalmente, recentes pesquisas têm introduzido testes para avaliar o grau pelos quais os espermatozoides têm sofrido estresse oxidativo. No entanto, apesar dos avanços na avaliação do sêmen caprino, poucos parâmetros, isoladamente, são correlacionados com a fertilidade *in vivo*. Por conseguinte, o uso associado de várias técnicas de avaliação *in vitro* pode possibilitar a predição da fertilidade *in vivo* em caprinos.

Palavras-chave: CASA, citometria de fluxo, fertilidade *in vivo*, sondas fluorescentes.

Abstract

Until recently, goat semen assessment was routinely performed by conventional light microscopic techniques. The limitations of these methods include subjectivity, variability, the small number of spermatozoa analyzed, and poor correlation with fertilizing potential. The last years, new *in vitro* techniques have been utilized for goat semen assessments that enable a more detailed evaluation of several sperm characteristics. Numerous fluorescent staining techniques have been developed, made possible a more widespread analysis of semen quality at biochemical, ultrastructural and functional level. Moreover, by means of flow cytometry, large number of fluorescently labeled spermatozoa can be analysed in a short interval. Following thorough standardization and validation, computer-assisted sperm analysis systems provided objective and detailed information on various motility characteristics and morphometric dimensions that cannot be identified by conventional light microscopic. Additionally, recent researches have introduced tests to assess the degree to which spermatozoa have suffered oxidative stress. However, in spite of improvement in goat semen evaluation, few parameters, isolately, have been correlated with *in vivo* fertility. Thus, the associated use of several *in vitro* evaluation techniques possibility can predict the *in vivo* fertility in goats.

Keywords: CASA, flow cytometry, fluorescent probes, *in vitro* fertility.

Introdução

A avaliação *in vitro* do sêmen é uma ferramenta importante na determinação da capacidade reprodutiva de um macho como reprodutor, em virtude de complementar as informações obtidas durante a realização do exame clínico. Tal contribuição tem valor diagnóstico na avaliação da função testicular, epididimária e de todo sistema reprodutor do macho, auxiliando na identificação de casos de subfertilidade ou infertilidade. Além disso, a análise do ejaculado é fundamental para determinar o grau de normalidade das células espermáticas antes de serem processadas para uso na inseminação artificial (IA) ou fertilização *in vitro* (FIV; Rodríguez-Martínez, 2006, 2007).

Tradicionalmente, além de volume e aspecto, a análise do sêmen inclui a determinação de concentração, motilidade e morfologia espermáticas, rotineiramente realizada por microscopia de luz convencional. As limitações destes métodos incluem subjetividade, variabilidade, reduzido número de espermatozoides analisados e pobre correlação com o potencial fertilizante destes gametas (Verstegen et al., 2002).

Nos últimos anos, novas técnicas de avaliação *in vitro* do sêmen têm sido utilizadas e permitem o conhecimento mais detalhado de várias características espermáticas. Diferentes técnicas de coloração

fluorescente têm sido desenvolvidas, o que torna possível a análise mais ampla da qualidade do sêmen em níveis ultra-estrutural, funcional e bioquímico (Silva e Gadella, 2006). Para isso, muitas sondas fluorescentes vêm sendo utilizadas isoladamente ou em combinação visando examinar a integridade e a viabilidade espermática com o auxílio da microscopia fluorescente. Entretanto, a análise microscópica apenas mensura um pequeno número de espermatozoides dentro de determinada população de células. Por meio da adaptação desta avaliação para uso associado ao citômetro de fluxo, as sondas fluorescentes podem ser utilizadas com mais rapidez e acurácia para mensurar atributos espermáticos em larga escala (Graham, 2001; Gillan et al., 2005).

Sistemas de análises computadorizadas têm substituído a avaliação de sêmen por microscopia de luz convencional, uma vez que proporcionam informações mais detalhadas e objetivas sobre várias características da motilidade e da morfometria (Verstegen et al., 2002). Adicionalmente, recentes pesquisas têm introduzido testes para avaliar o grau pelos quais os espermatozoides têm sofrido estresse oxidativo (Aitken, 2006). Portanto, o objetivo desta revisão é discutir as técnicas de avaliação *in vitro* da qualidade do espermatozoide caprino, visando predizer com maior segurança a sua capacidade fertilizante.

Sondas fluorescentes

O desenvolvimento da tecnologia de coloração com utilização de sondas fluorescentes para enzimas intracitoplasmáticas, lecitinas ou potencial de membrana, proporciona novas ferramentas para avaliação da integridade de alguns componentes celulares, como membranas e cromatina, ou da condição funcional de organelas espermáticas, como acrossoma e mitocôndria (Graham, 2001; Silva e Gadella, 2006).

Integridade das membranas

A integridade das membranas e a estabilidade de seu aspecto semipermeável são pré-requisitos para a viabilidade do espermatozoide. Além disso, se a membrana plasmática está intacta, mas funcionalmente instável, o espermatozoide não é capaz de interagir com o ambiente do trato genital feminino e, conseqüentemente, fertilizar o ovócito (Rodríguez-Martínez, 2007). A integridade de membrana é usualmente avaliada após a exposição dos espermatozoides a corantes impermeáveis à membrana, de maneira que os gametas não corados são considerados vivos. Atualmente muitos corantes usados são fluoróforos que reagem com enzimas citoplasmáticas ou ligam-se ao DNA (Silva e Gadella, 2006).

Várias sondas fluorescentes têm sido usadas e validadas para análise da integridade de membrana em espermatozoides de caprinos, como: diacetato de carboxifluoresceína (DCF) em combinação com iodeto de propídio (IP; Coletto et al., 2002); SYBR[®]14 em combinação com IP (Peterson et al., 2007) e Hoechst 33258 (Marco-Jiménez et al., 2006). Coletto et al. (2002), utilizando o DCF em combinação com o IP para avaliação da viabilidade espermática de doses de sêmen descongeladas de reprodutores caprinos da raça Pardo Alpina, verificaram pequena correlação entre a técnica de fluorescência e a motilidade e o vigor espermáticos ($r = 0,1403$), demonstrando que, na espécie caprina, a motilidade e o vigor espermático não devem ser os únicos critérios de avaliação, sendo necessária a utilização de uma técnica mais específica para avaliar esse gameta, em decorrência de o sêmen congelado apresentar viabilidade espermática menor do que o sêmen *in natura*.

Recentemente, Peterson et al. (2007), usando uma combinação de sondas fluorescentes (SYBR[®]14/IP) presentes em um *kit* comercialmente vendido como LIVE/DEAD (Molecular Probes Inc., Eugene, OR, USA), estudaram a integridade das membranas de espermatozoides caprinos da raça Saanen e concluíram existir correlação entre a proporção de células com membranas intactas e a quantidade de espermatozoides móveis armazenados a 18 e 4°C ($r = 0,77$ e $0,98$, respectivamente).

Os resultados encontrados por Peterson et al. (2007) e Coletto et al. (2002) são contraditórios. Este fato pode ser explicado pela utilização de amostras de sêmen submetidas a diferentes métodos de criopreservação (refrigeração e congelamento, respectivamente). Portanto, é razoável afirmar que o processo de congelamento/descongelamento determina maior efeito deletério às células espermáticas.

Integridade da cromatina

A avaliação do grau de integridade do DNA é considerada importante em virtude de o desenvolvimento embrionário inicial depender da presença de DNA normal (Rodríguez-Martínez, 2007). Vários métodos podem ser utilizados para determinar danos ao DNA, entre eles as técnicas de TUNEL, as quais identifica quebras na fita de DNA pela incorporação enzimática de análogos de nucleotídeos fluorescentes por meio de uma transferase terminal em áreas de uma fita simples de DNA; a análise Cometa, por intermédio da eletroforese em gel do DNA de uma única célula, em que a discriminação pode ser feita entre DNA marcado com fluorescência de um núcleo espermático condensado normalmente (migração mínima) e DNA frouxamente compactado (cauda de DNA), após permitir a migração do DNA sobre um gel de agarose sob um campo elétrico (Silva e Gadella, 2006); ou ainda a avaliação por citometria de fluxo do grau de desnaturação do DNA, que utiliza as propriedades metacromáticas da Laranja de Acrídina, conhecido como *Sperm Chromatin Structure Assay* (SCSA; Evenson e

Wixon, 2006).

Souza et al. (2009), utilizando a técnica de coloração com Laranja de Acridina, constataram percentual reduzido de espermatozoides caprinos com danos no DNA, corroborando com os relatos de Ahmad et al. (2008), ao relatarem a ocorrência de poucos danos ao DNA espermático após congelação/descongelação de amostras de sêmen caprino, não evidenciando diferença significativa com as amostras de sêmen *in natura*. Segundo estes autores, tal resultado pode ser decorrente do fato de espermatozoides caprinos, assim como os de bovinos, possuírem configuração nuclear mais estável do que em outras espécies, como a suína.

Integridade acrossomal

A reação do acrossoma é um pré-requisito para a penetração do espermatozoide no ovócito. Após a fusão da membrana plasmática com a acrossomal externa, o espermatozoide libera seu conteúdo enzimático acrossomal por exocitose, permitindo a penetração deste gameta nas camadas externas de células e na zona pelúcida do ovócito (Flesch e Gadella, 2000).

A integridade acrossomal pode ser mensurada por diferentes métodos, todavia os mais comumente usados são aqueles que utilizam isotiocianato de fluoresceínas conjugadas a lecitinas, tais como: *Peanut Agglutinin* (FITC-PNA) ou *Pisum Sativum Agglutinin* (FITC-PSA; Szasz et al., 2000; Herrera et al., 2002). Estas lecitinas ligam-se especificamente a conteúdos acrossomais por meio da interação com glicoconjugados da membrana acrossomal externa (FITC-PNA) ou com grupos sacarídeos da glicoproteína pró-acrosina (FITC-PSA; Gillan et al., 2005; Silva e Gadella, 2006).

Recentemente o uso do FITC-PNA foi validado para análise da integridade acrossomal em amostras de sêmen caprino submetidas a processos de preservação e armazenamento, refrigeração ou congelação (Aboagla e Terada, 2003; Marco-Jiménez et al., 2006; Peterson et al., 2007), mostrando similaridade à avaliação realizada com o FITC-PSA (Aboagla e Terada, 2004).

Atividade mitocondrial

A mitocôndria provê a maior parte do ATP necessário ao metabolismo total do espermatozoide, incluindo aquele necessário à motilidade. Diferentes sondas fluorescentes têm sido utilizadas para avaliar a função mitocondrial espermática. Estas sondas são ativamente transportadas nas mitocôndrias que possuem respiração ativa. Portanto, quanto mais ativa a respiração mitocondrial, mais corante é acumulado nesta organela (Graham e Mocé, 2005).

Os fluorocromos Rodamina 123 (R123) e MitoTracker™ (MITO), usados para avaliar a função mitocondrial do espermatozoide (Garner et al., 1997; Gadella e Harrison, 2002), são transportados nas mitocôndrias que possuem respiração ativa, cujo acúmulo faz com que estas organelas celulares fluoresçam em verde, não havendo distinção entre as diferentes taxas respiratórias exibidas pelos espermatozoides (Gillan et al., 2005; Silva e Gadella, 2006). Em contrapartida, o JC-1 utilizado para avaliar a função mitocondrial do espermatozoide (Thomas et al., 1998), quando encontrado em baixas concentrações, permanece no seu estado monomérico e fluoresce em verde. Entretanto, em elevadas concentrações, o JC-1 forma agregados que fluorescem em laranja. Desta forma, este fluorocromo não apenas tem a habilidade para distinguir a mitocôndria funcional daquela não funcional como permite que os diferentes níveis de função mitocondrial sejam observados pela intensidade da cor laranja na mitocôndria, por meio do citômetro de fluxo (Graham e Mocé, 2005).

Hemachand e Shaha (2003), trabalhando com espermatozoides caprinos obtidos do epidídimo ou do ejaculado, submetidos a estresse oxidativo, relataram haver relação entre o padrão de coloração com o JC-1 e a motilidade espermática. Por sua vez, Marco-Jiménez et al. (2006) mostraram que o processo de congelação/descongelação de espermatozoides caprinos da raça Murciano-granadina determina considerável redução do número de células com alto potencial mitocondrial (59,0 vs. 27,7%), utilizando-se o JC-1.

Análises espermáticas computadorizadas

Análises espermáticas convencionais por microscopia de luz podem ser influenciadas pelo observador, bem como necessitar de muito tempo na preparação das amostras ou na análise, resultando em um número relativamente pequeno de espermatozoides avaliados. Nos últimos anos, foram desenvolvidas técnicas para avaliar os mesmos atributos espermáticos por sistemas automatizados de alta tecnologia (Verstegen et al., 2002; Graham e Mocé, 2005).

Cinética espermática

Recentemente, vários sistemas de análise computadorizada das células espermáticas (CASA) comerciais, como Hamilton Thorn (Hamilton Thorn Research, Bervely, USA); IMAGESP® (Vimas IMAGESP®,

Barcelona, Espanha); Hobson Sperm Tracker (Hobson Tracking Systems Ltda., Sheffield, Inglaterra) e Sperm Class Analyzer[®] (Microptic SL, Barcelona, Espanha), baseados predominantemente na avaliação individual do espermatozoide, foram validados para uso em caprinos (Aboagla e Terada, 2003, 2004; Sundaraman e Dewin, 2005; Cox et al., 2006; Hidalgo et al., 2006; Marco-Jiménez et al., 2006).

Estes sistemas oferecem informações sobre a cinética espermática, com a utilização de campos de vídeo contendo imagens de espermatozoides eletronicamente digitalizados, bem como a determinação da posição central de cada cabeça espermática. Os parâmetros fornecidos por este equipamento são: motilidade total (MT), motilidade progressiva (MP), linearidade (LIN), retilinearidade (STR) e índice de oscilação ou wobble (WOB), expressos em percentual; velocidade curvilinear (VCL), velocidade em linha reta (VSL) e velocidade média do percurso (VAP), expressos em $\mu\text{m/s}$; frequência de batimento flagelar cruzado (BCF), expresso em Hertz; amplitude do deslocamento lateral da cabeça do espermatozoide (ALH), expresso em micrômetros (Mortimer, 2000; Verstegen et al., 2002).

Desde o início da utilização desta técnica, vários questionamentos vêm sendo realizados, como os diferentes equipamentos disponíveis, as calibrações, as informações oferecidas pelos operadores ao sistema e a qualificação técnica destes operadores (Verstegen et al., 2002). As diferenças estruturais da célula espermática entre as espécies estudadas (Pesch e Bergmann, 2006) são outros fatores que determinam limitações na expansão do sistema CASA, uma vez que se faz necessário fornecer ao programa informações específicas de cada célula espermática, como tamanho celular, por exemplo, para a eficácia dos resultados (Matos et al., 2008).

O registro de dados quantitativos obtidos pelo sistema CASA permite a detecção de súbitas mudanças na cinética espermática e, desse modo, melhora a avaliação do uso de novos processos de criopreservação, refrigeração, bem como de sêmen fresco em relação aos tratamentos laboratoriais, como diluidores, crioprotetores e outros processos (Amann e Katz, 2004). Baseado nisto, tem sido sugerido que os procedimentos de congelamento e descongelamento reduzem a cinemática dos espermatozoides caprinos, mensurados objetivamente por métodos computadorizados (Dorado et al., 2005, 2007; Sundaraman e Dewin, 2005), bem como de todos os mamíferos (Thurston et al., 2001; Martínez-Pastor et al., 2005).

A migração espermática *in vitro* no muco cervical relaciona-se com a concentração espermática na junção úterotubária e com a fertilização *in vivo* em caprinos (Cox et al., 2002). Cox et al. (2006) constataram haver correlação significativamente alta entre os valores da velocidade curvilinear, da velocidade média da trajetória e da velocidade em linha reta com a eficiência de migração dos espermatozoides de caprinos das raças Saanen, British Alpine e Boer através do muco cervical. Baseada no arranjo natural exibido pelo muco cervical aspirado em tubos capilares, a abordagem experimental realizada por estes autores parece promissora para definir a relativa importância dos parâmetros de movimento espermático, obtidos pela análise com o sistema CASA, com o potencial de os espermatozoides colonizarem a junção úterotubária e, eventualmente, fertilizarem os ovócitos.

Morfometria espermática

As pesquisas por métodos acurados, objetivos e repetitivos de avaliação da fertilidade espermática continuam sendo objetos de alguns estudos. Recentemente, a introdução do sistema de análise da morfometria espermática automatizada (ASMA) tenta superar os problemas da subjetividade dos métodos de avaliação visual. Embora originalmente desenvolvida para espermatozoides humanos (De Montserrat et al., 1995), esta técnica tem sido validada para várias espécies animais, como bovina, caprina, ovina, suína, canina e equina (Gravance et al., 1995, 1996, 1998; Thurston et al., 2001; Rijsselaere et al., 2004; Rodríguez et al., 2004).

O sistema ASMA determina o comprimento, a largura e a área da cabeça, e possibilita realizar associações destes dados, como largura/comprimento e perímetro, visando categorizar garanhões e coelhos subfêrteis (Casey et al., 1997; Marco-Jiménez, 2005). A análise da morfometria espermática proporciona estudar uma série de parâmetros objetivos que facilita a padronização da avaliação morfológica destes gametas. Entretanto, alguns problemas decorrentes da preparação das amostras, procedimentos de coloração e montagem do analisador da morfometria espermática limitam a sua utilização (Gravance et al., 1995; Boersma et al., 1999), sendo necessária a padronização de algumas variáveis da morfometria espermática para cada espécie.

Neste contexto, Hidalgo et al. (2006), utilizando sêmen de caprinos da raça Florida, avaliaram a influência de três procedimentos de coloração (Diff-Quik, Hemacolor e Harri's Haematoxilina) sobre a acurácia do processamento da imagem e da morfometria espermática, o efeito do número de células analisadas e a repetibilidade do método. Estes autores observaram que os métodos de coloração afetam significativamente as dimensões espermáticas, sendo que o Diff-Quik foi o que obteve maior acurácia, com maiores percentuais de cabeças espermáticas analisadas corretamente (86,66%) e menores coeficientes de variação no processamento da imagem e nas mensurações morfométricas. Além disso, nenhuma diferença nos parâmetros morfométricos foi estabelecida quando 100, 150, 175 ou 200 espermatozoides foram analisados.

Estudos prévios usando o sistema ASMA demonstraram que a criopreservação afeta as dimensões da cabeça de espermatozoides de humanos (Thompson et al., 1994), bovinos (Gravance et al., 1998), garanhões (Arruda et al., 2002) e cervos (Esteso et al., 2003), com valores menores após a descongelamento. No entanto,

Gravance et al. (1997) constataram que a congelação não evidenciou diferenças significativas na morfometria da cabeça de espermatozoides caprinos, embora o processo de congelação e descongelação tenha determinado efeitos individuais nos ejaculados dos reprodutores.

Marco-Jiménez et al. (2006), avaliando os efeitos do processo de congelação sobre as características morfométricas da cabeça de espermatozoides caprinos, desenvolveram um método simples para mensurar a cabeça deste gameta sem utilização de coloração. A avaliação foi realizada por meio do sistema de análise da morfometria da cabeça espermática automatizada (ASMA), utilizando-se um microscópio de contraste de fase sem coloração, o qual minimizou a possibilidade de que as dimensões da cabeça espermática fossem influenciadas por artefatos dos procedimentos de coloração.

Estes autores evidenciaram que as dimensões da cabeça dos espermatozoides congelados em meio com glicose e leite desnatado são menores do que aquelas encontradas no sêmen *in natura*, como consequência da fase de equilíbrio a que estas células são submetidas e não ao processo de congelação. Adicionalmente, estes autores afirmaram que os espermatozoides mortos apresentaram menor tamanho de cabeça do que os vivos, como consequência da perda da funcionalidade de membrana.

Da mesma forma, Hidalgo et al. (2007) relataram que as dimensões da cabeça de espermatozoides caprinos da raça Florida, congelados em diferentes diluidores, foram distintas e significativamente menores do que aquelas do sêmen *in natura*. O número de parâmetros morfométricos da cabeça espermática que apresentaram alteração após a criopreservação foi menor nas amostras consideradas viáveis após a descongelação e com prenhez bem-sucedidas após IA, evidenciando maior resistência ao processo de congelação/descongelação.

Citometria de fluxo

A citometria de fluxo é uma poderosa ferramenta para análise celular, uma vez que, em poucos minutos, o citômetro de fluxo fornece dados sobre todas as subpopulações celulares de uma amostra, tornando-o ideal para avaliação de populações heterogêneas, como de espermatozoides (Graham, 2001; Gillan et al., 2005; Graham e Mocé, 2005). A adaptação do citômetro de fluxo para avaliação espermática teve início no estudo da mensuração do conteúdo de DNA (Evenson et al., 1980), mas sua aplicação para análise espermática tem aumentado consideravelmente nos últimos 15 anos.

A citometria de fluxo permite a observação de características, como tamanho da célula, forma e complexidade interna, assim como qualquer componente ou função do espermatozoide que pode ser detectado por um fluorocromo ou composto marcado com fluorescência (Graham, 2001). A análise é objetiva, tem um alto nível de repetibilidade experimental e possui a vantagem de estar apta a trabalhar com amostras de volume reduzido. Além disso, o citômetro de fluxo tem a capacidade de detectar marcadores por múltiplos fluorocromos associados a um único espermatozoide, o que significa que mais de um atributo espermático pode ser avaliado simultaneamente (Gillan et al., 2005). Aproximadamente 50.000 células podem ser avaliadas em um minuto, número substancialmente maior do que o total de 200 células geralmente analisadas por microscopia ótica (Gillan et al., 2005; Graham e Mocé, 2005).

Leboeuf et al. (2006), após submeter amostras de sêmen caprino a soluções com diferentes pressões osmóticas, avaliaram por citometria de fluxo as células espermáticas marcadas com IP e determinaram um modelo de análise que pode auxiliar na diferenciação dos métodos de armazenamento, ejaculados do próprio animal e entre reprodutores, contribuindo, portanto, para melhorar a tecnologia de sêmen.

A citometria de fluxo foi recentemente usada por Peterson et al. (2007) para avaliar simultaneamente atributos da qualidade de amostras refrigeradas ou congeladas/descongeladas de sêmen caprino, utilizando-se as sondas SYBR[®]14/IP para viabilidade espermática, e FITC-PNA/IP para integridade acrossomal e de membrana plasmática.

Critérios bioquímicos da função espermática

O desejo por testes diagnósticos rápidos, baratos e facilmente padronizáveis tem impulsionado as pesquisas por critérios bioquímicos para determinação da qualidade funcional do espermatozoide (Aitken, 2006). Um dos mais significantes avanços nesta área foi o recente reconhecimento de que defeitos na função espermática são frequentemente correlacionados com o estresse oxidativo causado pela excessiva produção de espécies reativas ao oxigênio (ROS) e/ou o prejuízo da proteção antioxidante dentro do sistema reprodutor masculino (Agarwal et al., 2003; Aitken, 2005).

A possível explicação para o estresse oxidativo nos espermatozoides baseia-se no fato de que, em mamíferos, as membranas espermáticas são ricas em ácidos graxos poli-insaturados, o que as torna muito fluidas e, ao mesmo tempo, muito susceptíveis a danos peroxidativos induzidos por ROS (De Lamirande e Gagnon, 1995; Guerra et al., 2004; Sikka, 2004), determinando perda de suas funções (Agarwal e Said, 2003; Christova et al., 2004) e da integridade do DNA (Aitken e Krausz, 2001; Baumber et al., 2003).

Produzidos em quantidades fisiológicas, os diferentes tipos de ROS (peróxido de hidrogênio e ânion

superóxido) são extremamente importantes ao espermatozoide no controle dos eventos da fosforilação da tirosina associados com a capacitação espermática (Aitken et al., 1998; Aitken, 1999). Entretanto, quando produzidas em quantidades excessivas, as ROS destroem a função espermática pela indução de danos peroxidativos na membrana plasmática do espermatozoide, prejudicando processos que dependem da membrana, como motilidade, exocitose acrossomal e fusão espermatozoide-ovócito. Além disso, o estresse oxidativo no espermatozoide está associado com a indução de danos ao DNA do genoma nuclear e mitocondrial (Sawyer et al., 2003; Guerra et al., 2004; Lewis e Aitken, 2005).

Com o objetivo de se estudar a correlação entre a produção de ROS pelo espermatozoide caprino e o potencial fertilizante destas células *in vivo* e *in vitro*, vários métodos têm sido utilizados para mensurar a quantidade de ROS na superfície da membrana celular, bem como intra ou extracelular. Entretanto, em caprinos, as análises realizadas envolvem a avaliação dos sinais quimiluminescentes gerados por populações de espermatozoides na presença de sondas como luminol (Gopalakrishnan e Shaha, 1998; Gogol et al., 2007), assim como análises indiretas de avaliação da ocorrência da peroxidação lipídica (Gopalakrishnan e Shaha, 1998; Hemachand e Shaha, 2003; Khalifa e El-Saidy, 2006) e das concentrações de antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos (Gopalakrishnan e Shaha, 1998; Hemachand e Shaha, 2003).

A intensidade dos sinais quimiluminescentes gerados na presença do luminol está associada a alguns aspectos da função espermática, como motilidade e fusão espermatozoide-ovócito, bem como da natureza do sêmen, *in natura* ou congelado (Gopalakrishnan e Shaha, 1998; Gogol et al., 2007).

Hemachand e Shaha (2003) demonstraram o papel funcional da glutathione S-transferase presente na superfície espermática e da glutathione extracelular na inibição da perda de competência funcional de espermatozoides caprinos submetidos a estresse oxidativo, enquanto Khalifa e El-Saidy (2006) avaliaram os níveis de lipoperoxidação nos espermatozoides caprinos submetidos a diferentes taxas de diluição (1:2, 1:4 e 1:19) e métodos de descongelamento (descongelamento seco *vs.* descongelamento úmido), em amostras de espermatozoides congeladas em *pellets* e mensuradas pela produção de malonaldeído. A taxa de diluição de 1:19 aumentou a ocorrência de peroxidação lipídica, evidenciada pelo aumento na produção de malonaldeído. Além disso, os *pellets* de espermatozoides submetidos à descongelamento úmido também apresentaram grande produção de malonaldeído.

Considerações finais

Considerando que, *in vivo*, espermatozoides potencialmente férteis são continuamente submetidos a obstáculos no processo de seleção, antes e durante a fertilização, as informações proporcionadas pelos métodos laboratoriais de avaliação da integridade e da função espermática são de grande importância, por correlacionar os parâmetros de qualidade espermática com os resultados de fertilidade. Consequentemente, estas avaliações podem auxiliar nas aplicações comerciais, como seleção de animais de alto valor genético devido à alta qualidade espermática, visando a sua utilização em técnicas reprodutivas, na constituição de bancos de germoplasma, bem como da conservação de material genético de animais em vias de extinção.

Referências bibliográficas

- Aboagla EM, Terada T. Effects of egg yolk during the freezing step of cryopreservation on the viability of goat spermatozoa. *Theriogenology*, v.62, p.1160-1172, 2004.
- Aboagla EM, Terada T. Trehalose enhanced fluidity of the goat sperm membrane and its protection during freezing. *Biol Reprod*, v.69, p.1245-1250, 2003.
- Agarwal A, Said TM. Role of sperm chromatin abnormalities and DNA damage in male infertility. *Hum Reprod Update*, v.9, p.331-345, 2003.
- Agarwal A, Saleh RA, Bedaiwy MA. Role of reactive oxygen species in the pathophysiology of human reproduction. *Fertil Steril*, v.79, p.829-843, 2003.
- Ahmad MZAA, Chatagnon G, Amirat-Briand L, Moussa M, Tainturier D, Anton M, Fieni F. Use of glutamine and low density lipoproteins isolated from egg yolk to improve buck semen freezing. *Reprod Domest Anim*, v.43, p.429-436, 2008.
- Aitken RJ. Human spermatozoa, fruits of creations and seeds of doubt. *Reprod Fertil Dev*, v.16, p.655-664, 2005.
- Aitken RJ. Sperm function tests and fertility. *Int J Androl*, v.29, p.69-75, 2006.
- Aitken RJ. The human spermatozoon: a cell in crisis? *J Reprod Fertil*, v.115, p.1-7, 1999.
- Aitken RJ, Harkiss D, Knox W, Paterson M, Irvine DS. A novel signal transduction cascade in capacitating, cAMP-mediated induction of tyrosine phosphorylation. *J Cell Sci*, v.111, p.645-656, 1998.
- Aitken RJ, Krausz C. Oxidative stress, DNA damage and the Y chromosome. *Reproduction*, v.122, p.497-506, 2001.
- Amann RP, Katz DF. Reflections of CASA after 25 years. *J Androl*, v.25, p.317-325, 2004.
- Arruda RP, Ball BA, Gravance CG, Garcia AR, Liu IKM. Effects of extenders and cryoprotectants on

- stallion sperm head morphometry. *Theriogenology*, v.58, p.253-256, 2002.
- Baumber J, Ball BA, Linfor JJ, Meyers SA.** Reactive oxygen species and cryopreservation promote DNA fragmentation in equine spermatozoa. *J Androl*, v.24, p.621-628, 2003.
- Boersma AA, Braun J, Stolla R.** Influence of random factors and two different staining procedures on computer-assisted sperm head morphometry in bulls. *Reprod Domest Anim*, v.34, p.77-82, 1999.
- Casey PJ, Gravance CG, Davis RO, Chabot DD, Liu, IKM.** Morphometric differences in sperm head dimensions of fertile and subfertile stallions. *Theriogenology*, v.47, p.575-582, 1997.
- Christova Y, James PS, Jones R.** Lipid diffusion in sperm plasma membrane exposed to peroxidative injury from oxygen free radical. *Mol Reprod Dev*, v.68, p.365-372, 2004.
- Coletto ZF, Guerra MMP, Batista AM.** Avaliação do sêmen congelado de caprinos com drogas fluorescentes. *Rev Bras Med Vet*, v.24, p.101-104, 2002.
- Cox JF, Alfaro V, Montenegro V, Rodríguez-Martínez H.** Computer-assisted analysis of sperm motion in goats and its relationship with sperm migration in cervical mucus. *Theriogenology*, v.66, p.860-867, 2006.
- Cox JF, Zavala A, Saraiva F, Rivas C, Gallardo p, Alfaro V.** Differences in sperm migration through cervical mucus in vitro relates to sperm colonization of the oviduct and fertilization ability in goat. *Theriogenology*, v.58, p.9-18, 2002.
- De Lamirande E, Gagnon C.** Impact of reactive oxygen species on spermatozoa: a balancing act between beneficial and detrimental effects. *Hum Reprod*, v.10, suppl.1, p.15-21, 1995.
- De Montserrat JJ, Pérez-Sánchez F, Tablado L, Soler C.** The Sperm Class Analyzer[®]: a new automated system for human sperm morphometry and classification. *Cont Fertil Sex*, v.23, p.S126, 1995.
- Dorado J, Rodríguez I, Hidalgo M.** Cryopreservation of goat spermatozoa: Comparison of two freezing extenders base don post-thaw sperm quality and fertility rates after artificial insemination. *Theriogenology*, v.68, p.168-177, 2007.
- Dorado J, Rodriguez I, Hidalgo M, Sanz J.** Computer-assisted analysis of goat sperm motility and velocity before and after cryopreservation. *Reprod Domest Anim*, v.40, p.401-402, 2005.
- Esteso MC, Fernandez-Santos MR, Soler AJ, Garde JJ.** Head dimensions of cryopreserved red deer spermatozoa are affected by thawing procedure. *CryoLetters*, v.24, p.261-268, 2003.
- Evenson DP, Darzynkiewicz Z, Melamed MR.** Relation of mammalian sperm chromatin heterogeneity to fertility. *Science*, v.210, p.1131-1133, 1980.
- Evenson DP, Wixon R.** Clinical aspects of sperm DNA fragmentation detection and male infertility. *Theriogenology*, v.65, p.979-991, 2006.
- Flesch FM, Gadella BM.** Dynamics of the mammalian sperm plasma membrane in the process of fertilization. *Biochim Biophys Acta*, v.1469, p.197-235, 2000.
- Gadella BM, Harrison RA.** Capacitation induces cyclic adenosine 3', 5'-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, Thomas CA, Joerg HW, DeJarnette JM, Marshall CE.** Fluorometric assessment of mitochondrial function and viability in cryopreserved bovine spermatozoa. *Biol Reprod*, v.57, p.1401-1406, 1997.
- Gillan L, Evans G, Maxwell WMC.** Flow cytometric evaluation of sperm parameters in relation to fertility potential. *Theriogenology*, v.63, p.445-457, 2005.
- Gogol P, Wierzechs-Hilczek A, Cegla M.** Iron-induced luminescence as a method for assessing lipid peroxidation of frozen-thawed goat spermatozoa. *Animal*, v.1, p.844-848, 2007.
- Gopalakrishnan B, Shaha C.** Inhibition of sperm glutathione S-transferase leads to functional impairment due to membrane damage. *FEBS Letters*, v.422, p.296-300, 1998.
- Graham JK.** Assessment of sperm quality: a flow cytometric approach. *Anim Reprod Sci*, v.68, p.239-247, 2001.
- Graham JK, Mocé E.** Fertility evaluation of frozen/thawed semen. *Theriogenology*, v.64, p.492-504, 2005.
- Gravance CG, Champion ZJ, Casey PJ.** Computer-assisted sperm head morphometry analysis (ASMA) of cryopreserved ram spermatozoa. *Theriogenology*, v.49, p.1219-1230, 1998.
- Gravance CG, Lewis KM, Casey PJ.** Computer automated sperm-head morphometry analysis (ASMA) of goat spermatozoa. *Theriogenology*, v.44, p.989-1002, 1995.
- Gravance CG, Vishwanath R, Pitt C, Casey PJ.** Computer automated morphometry analysis of bull sperm heads. *Theriogenology*, v.46, p.1205-1215, 1996.
- Gravance CG, White C, Robertson KR, Champion ZJ, Casey PJ.** The effects of cryopreservation on the morphometric dimensions of caprine sperm heads. *Anim Reprod Sci*, v.49, p.37-43, 1997.
- Guerra MMP, Evans G, Maxwell WMC.** Papel de oxidantes e anti-oxidantes na andrologia: Revisão de Literatura. *Rev Bras Reprod Anim*, v. 28, p.187-195, 2004.
- Hemachand T, Shaha C.** Functional role of sperm surface glutathione S-transferases and extracellular glutathione in the haploid spermatozoa under oxidative stress. *FEBS Lett*, v.538, p.14-18, 2003.
- Herrera J, Fierro R, Zayas H, Conejo J, Jiménez I, García A, Betancourt M.** Acrosome reaction infertile and subfertile boar sperm. *Arch Androl*, v.48, p.133-139, 2002.
- Hidalgo M, Rodríguez I, Dorado J.** Influence of staining and sampling procedures on goat sperm morphometry



- using the Sperm Class Analyzer. *Theriogenology*, v.66, p.996-1003, 2006.
- Hidalgo M, Rodríguez I, Dorado J.** The effect of cryopreservation on sperm head morphometry in Florida male goat related to sperm freezability. *Anim Reprod Sci*, v.100, p.61-72, 2007.
- Khalifa TAA, El-Saidy BE.** Pellet-freezing of Damascus goat semen in a chemically defined extender. *Anim Reprod Sci*, v.93, p.303-315, 2006.
- Leboeuf B, Le Vern Y, Furtoss V, Kerboeuf D, Guillouet P, Magistrini M.** Response of goat sperm to hypoosmotic steps modelled probit analysis. *Anim Reprod Sci*, v.91, p.265-274, 2006.
- Lewis SEM, Aitken RJ.** DNA damage to spermatozoa has impacts on fertilization and pregnancy. *Cell Tissue Res*, v.322, p.33-41, 2005.
- Marco-Jimenez F, Balasch S, Vicente JS, Lavara R, Viudes-de-Castro MP, Mocé E.** Detection of sub-fertile rabbits by means of sperm head morphometry analysis. *J Androl Suppl*, p.80, 2005. (Annual Meeting of American Society of Andrology, 30, 2005, Seattle, WA. Poster 124).
- Marco-Jiménez F, Viudes-De-Castro MP, Balasch S, Mocé E, Silvestre MA, Gomez EA, Vicente JS.** Morphometric changes in goat sperm heads induced by cryopreservation. *Cryobiology*, v.52, p.295-304, 2006.
- Martinez-Pastor F, Garcia-Macias V, Alvarez M, Herraes P, Anel L, Paz P.** Sperm subpopulations in Iberian red deer epididymal sperm and their changes through the cryopreservation process. *Biol Reprod*, v.72, p.316-327, 2005.
- Matos DI, Araújo AA, Roberto LG, Toniolli R.** Análise computadorizada de espermatozoides: revisão de literatura. *Rev Bras Reprod Anim*, v.32, p.225-232, 2008.
- Mortimer ST.** CASA-practical aspects. *J Androl*, v.21, p.51-524, 2000.
- Pesch S, Bergmann M.** Structure of mammalian spermatozoa in respect to viability, fertility and cryopreservation. *Micron*, v.37, p.597-612, 2006.
- Peterson K, Kappen MAPM, Ursem PJF, Nöthling JO, Colenbrander B, Gadella BM.** Microscopic and flow cytometric semen assessment of Dutch AI-bucks: effect of semen processing procedures and their correlation to fertility. *Theriogenology*, v.67, p.863-871, 2007.
- Rijsselaere T, Soom AV, Hoffack G, Maes D, Kruif A.** Automated sperm morphometry and morphology analysis of canine semen by the Hamilton-Thorne analyzer. *Theriogenology*, v.62, p.1292-1306, 2004.
- Rodríguez I, Hidalgo M, Dorado J, Pérez C, Sanz J.** Effect of three staining procedures on the accuracy of image processing and stallion sperm head morphometry using Sperm Class Analyzer (SCA). *Reprod Domest Anim*, v.39, p.266, 2004. Resumo.
- Rodríguez-Martínez H.** Can we increase the estimative value of semen assessment? *Reprod Domest Anim*, v.41, suppl.2, p.2-10, 2006.
- Rodríguez-Martínez H.** State of the art in farm animal sperm evaluation. *Reprod Fertil Dev*, v.19, p.91-101, 2007.
- Sawyer DE, Mercer BG, Wiklendt AM, Aitken RJ.** Qualitative analysis of gene-specific DNA damage in human spermatozoa. *Mutation Res*, v.S29, p.21-34, 2003.
- Sikka SC.** Role of oxidative stress and antioxidants in andrology and assisted reproductive technology. *J Androl*, v.25, p.5-18, 2004.
- Silva PFN, Gadella BM.** Detection of damage in mammalian sperm cells. *Theriogenology*, v.65, p.958-978, 2006.
- Souza AF, Gomes Leitão MC, Batista AM, Porto ALF, Lima Filho JL, Guerra MMP.** Proteínas do plasma seminal de caprinos relacionadas com o índice pluviométrico e a qualidade do sêmen. *Ciênc Rur*, v.39, p.1166-1172, 2009.
- Sundaraman MN, Dewin MJ.** Evaluation of pre-freeze and post-thaw sperm motion characteristics of goat spermatozoa by computer-assisted semen analysis. *Ind J Small Rum*, v.11, p.92-95, 2005.
- Szász F, Sirivaidyapong S, Cheng FP, Voorhout WF, Marks A, Colenbrander B, Solti And L, Gadella BM.** Detection of calcium ionophore induced membrane changes in dog sperm as a simple method to predict the cryopreservability of dog semen. *Mol Reprod Dev*, v.55, p.289-298, 2000.
- 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.
- Thompson LA, Brook PF, Warren M, Barrat C, Cooke I.** A morphometric comparison of the nuclear morphology of fresh and frozen-thawed human zona-bound and unbound sperm. *J Androl*, v.15, p.337-342, 1994.
- Thurston LM, Watson PF, Mileham AJ, Holt WV.** Morphologically distinct subpopulations defined by Fourier shape descriptors in fresh ejaculates correlate with variation in boar semen quality following cryopreservation. *J Androl*, v.22, p.382-394, 2001.
- Verstegen J, Iguer-Ouada M, Onclin K.** Computer assisted semen analyzers in andrology research and veterinary practice. *Theriogenology*, v.57, p.149-179, 2002.