



## Técnicas para avaliação laboratorial da integridade estrutural e funcional do sêmen congelado de touros

*Techniques for assessment of structural and functional integrity of cryopreserved bull sperm*

R.L. Arruda<sup>1</sup>, I.R. Orro<sup>1</sup>, T.S. Passos<sup>1</sup>, E.V. Costa e Silva<sup>2</sup>, C.E.S.N. Zúccari<sup>3,4</sup>

<sup>1</sup>Aluno de Pós-Graduação em Ciência Animal, FAMEZ, Universidade Federal do Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS, Brasil.

<sup>2</sup>Departamento de Medicina Veterinária, FAMEZ, Universidade Federal do Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS, Brasil.

<sup>3</sup>Departamento de Zootecnia, FAMEZ, Universidade Federal do Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS, Brasil.

<sup>4</sup>Correspondência: [zuccari@nin.ufms.br](mailto:zuccari@nin.ufms.br)

### Resumo

A fertilidade do touro tem grande impacto no desempenho reprodutivo do rebanho, principalmente com o uso de biotecnologias como a inseminação artificial, a transferência e a produção *in vitro* de embriões. Na busca de prever a capacidade fecundante dos espermatozoides, pesquisadores têm buscado a melhor associação de testes estruturais e funcionais, que permita estimar sua integridade e apresente alta correlação com as taxas de prenhez. A presente revisão de literatura teve como objetivo abordar alguns testes laboratoriais usados na avaliação das membranas plasmática e acrossomais e da integridade da cromatina, para estimar a habilidade fecundante do sêmen congelado de touros.

**Palavras-chave:** acrossomo, cromatina, espermatozoide, membrana plasmática.

### Abstract

*Bull fertility has great impact on reproductive performance of the herd, mainly by using biotechnologies as artificial insemination, in vitro production and transfer of embryos. In order to predict the fertility ability of sperm, researchers have sought the best combination of structural and functional tests, which makes it possible to estimate the spermatozoa integrity and presents a high correlation with pregnancy rates. This literature review aimed to gather some laboratory tests used in evaluation of plasmatic and acrosomal membranes besides the integrity of chromatin, used to estimate the fertility skill of frozen semen from bulls.*

**Keywords:** acrosome, chromatin, plasmatic membrane, spermatozoa.

### Introdução

A criopreservação do sêmen sofreu uma grande revolução há, aproximadamente, cinquenta anos, com a descoberta do glicerol como agente crioprotetor (Polge et al., 1949), o que permitiu que o espermatozoide fosse congelado e armazenado por longos períodos (Holt, 2000). O mecanismo de criopreservação é adverso para o espermatozoide, podendo promover desestabilização da membrana plasmática e elevação da concentração de cálcio intracelular, semelhante ao que ocorre durante a capacitação espermática (Cormier et al., 1997). Considerando-se que o espermatozoide capacitado e/ou com acrossomo reagido possui um limitado tempo de vida, tal fato resulta em diminuição da fertilidade (Yanagimachi, 1994). Portanto, mesmo com as técnicas atuais de congelamento, há uma redução expressiva da população espermática viável pós-descongelamento (Nagy et al., 2004).

A reprodução é um importante pilar dos sistemas de produção, e as biotécnicas de multiplicação animal, como a inseminação artificial (IA), a transferência (TE) e a produção *in vitro* de embriões (PIVE), têm contribuído expressivamente com os programas de melhoramento genético animal. Na aplicação dessas biotecnologias, é possível, o uso de sêmen criopreservado, e este deve ser submetido a controle rigoroso de qualidade para assegurar o sucesso do processo reprodutivo.

A monta natural é o método mais seguro para mensurar a fertilidade do touro, por meio da taxa de prenhez ou da taxa de não retorno ao estro, mas esse processo é demorado e tem custo elevado (Larsson e Rodriguez-Martinez, 2000). Diante disso, há a necessidade de se adotar métodos eficientes para estimar *in vitro* a fertilidade de touros doadores de sêmen. Sob este aspecto, o desenvolvimento de provas laboratoriais, visando avaliar com maior acurácia os resultados da congelamento de partidas de sêmen, tem sido a meta de numerosos programas de pesquisa no campo da IA. Desse modo, testes complementares foram desenvolvidos para avaliar integridade da membrana plasmática, condição acrossomal, integridade da cromatina, dentre outros que consideram, além do exame do reprodutor, análises em níveis celular e molecular (Kastelic e Thundathil, 2008).



A avaliação de somente um atributo espermático não garante a condição de normalidade dos demais, portanto uma análise multifatorial é mais apropriada para o diagnóstico da funcionalidade e da integridade estrutural do espermatozoide (Larsson e Rodríguez-Martínez, 2000; Parkinson, 2004).

A presente revisão de literatura teve como objetivo abordar alguns testes laboratoriais usados na identificação das lesões estruturais e funcionais das membranas plasmática e acrossomais, bem como da integridade da cromatina, visando estimar a habilidade fecundante do sêmen congelado de touros.

### **Membrana plasmática**

As membranas biológicas são estruturas laminares, assimétricas, constituídas por lipídeos e proteínas aos quais se ligam os glicídeos. A sua integridade estrutural se deve às propriedades dos lipídeos constituintes, às proteínas que são as principais responsáveis pela ocorrência da maioria dos processos dinâmicos, e aos carboidratos, que desempenham importante papel nas interações entre células (Stryer et al., 2004).

As membranas espermáticas são estruturas especializadas e exercem funções fundamentais na fecundação. Durante a maturação espermática, no epidídimo, ocorrem modificações tanto na superfície celular quanto no interior da membrana, caracterizadas pela alteração de sua fluidez, permeabilidade e mobilidade das proteínas integrais (Watson, 1995).

Os lipídeos das membranas celulares desempenham funções biológicas, como moléculas alimentares, depósitos de energia altamente concentrados, e promovem a sua integridade estrutural. Dentre as mais importantes classes de lipídeos da membrana, os fosfolipídeos são os mais abundantes, sendo os principais a fosfatidilcolina, esfingomiéline, fosfatidilserina e fosfatidiletanolamina, que, juntas, representam mais de 50% dos lipídeos constituintes (Nelson et al., 2009).

Condições como a refrigeração, que altera a orientação dos lipídeos, podem afetar a estabilidade da membrana ou induzir a um rearranjo (fase hexagonal-II) das moléculas formando pontos de fragilidade, promovendo, assim, uma permeabilidade excessiva ou mesmo a ruptura da membrana (Amann e Graham, 1993). A fase hexagonal-II possui forma cilíndrica, em que as cabeças dos grupos polares dos lipídeos se voltam para o centro, e as caudas hidrocarbonadas ficam orientadas para o exterior, constituindo a menor forma de agregação lipídica. Essa estrutura fragiliza a barreira de permeabilidade, mas pode ter importante função durante a fusão fisiológica de membranas, como na reação do acrossomo e na fecundação (Hammerstedt et al., 1990).

Membranas espermáticas com baixa relação colesterol:fosfolipídeo são mais fusogênicas, portanto os gametas necessitam de menos tempo para se capacitar e estão mais propensos a sofrerem a reação acrossomal (Yanagimachi, 1994; Hoshi et al., 1990).

Cross (1998) relatou que a relação colesterol:fosfolipídeo, existente na membrana espermática, exerce importante papel regulador no processo de capacitação. Trocas de colesterol e fosfolipídeos entre a membrana plasmática e o meio externo, diminuindo o conteúdo de colesterol e aumentando, assim, sua fluidez, desencadeiam a reação acrossomal por diminuir a microviscosidade da membrana plasmática, reduzir a adesão entre os fosfolipídeos e, possivelmente, permitir maior influxo de cálcio. Todas estas etapas que intermediam a fusão da membrana plasmática com a membrana acrossomal externa determinam o processo fusogênico conhecido por reação do acrossomo.

As proteínas de membrana desempenham muitas funções, dentre elas: transportam nutrientes, metabólitos ou íons através da bicamada lipídica; atuam como receptores que detectam sinais químicos no meio ambiente da célula e os transmitem ao seu interior; e, ainda, catalisam reações específicas por meio de enzimas (Stryer et al., 2004).

A terceira categoria de substâncias que integram a membrana plasmática são os carboidratos, localizados no lado extracelular. Por meio de ligações com as proteínas e lipídeos de membrana, os carboidratos formam glicoproteínas e glicolipídeos, respectivamente, constituindo uma cobertura glicídica denominada de glicocálix. Dessa forma, ajudam a proteger a superfície celular contra lesões mecânicas e químicas, além de participarem da interação entre células (Alberts et al., 1998).

### **Mecanismos de lesão celular durante a congelação e a descongelação**

Os espermatozoides podem sofrer danos durante a congelação e/ou descongelação, e essas lesões têm sido atribuídas às mudanças na temperatura, à formação de cristais de gelo, a injúrias oxidativas, a alterações na membrana do espermatozoide, a lesões no DNA e ao estresse osmótico, além da toxicidade dos crioprotetores. Como consequência, há redução da proporção de células viáveis assim como da capacidade funcional espermática (Watson, 2000).

Se a refrigeração é realizada de modo inadequado, os espermatozoides sofrem o choque térmico pelo frio, definido como o conjunto de alterações que ocorrem em situações de redução acelerada da temperatura. Deste modo, podem resultar danos irreversíveis, como perda acelerada da motilidade, presença de movimento circular ou retrógrado, lesões nas membranas plasmática e acrossomais, diminuição do metabolismo e perda de



estruturas intracelulares, geralmente associados às disfunções da membrana plasmática (Pickett e Amann, 1993).

No processo de refrigeração, o sêmen passa por diminuição da temperatura de 37°C, correspondente à corporal, para a temperatura ambiente de 20°C, e, a seguir, esta é reduzida para aproximadamente 4 a 5°C, sofrendo o primeiro estresse térmico. A membrana, então, passa do estado líquido cristalino (fluida) para o de gel, devido a um rearranjo dos fosfolípidos de cadeias poli-insaturadas. Esses fosfolípidos estão localizados ao redor das proteínas integrais, que evitam a ocorrência da fase hexagonal II, mas, na refrigeração, essas proteínas se movem para regiões mais fluidas, permitindo que ocorra a formação de uma micela invertida, na qual as porções apolares hidrofóbicas se voltam para o exterior. Portanto, esse processo fragiliza a barreira de permeabilidade, promovendo alterações físicas e estruturais das membranas plasmática e acrossomais (Hammerstedt et al., 1990).

Entre -5 e -10°C, começam a se formar cristais de gelo no meio extracelular, enquanto a água intracelular permanece super-refrigerada. O equilíbrio químico entre os líquidos extra e intracelulares é obtido pela desidratação das células. Neste ponto, a curva de congelação deve ser suficientemente lenta para que haja efluxo de água, evitando que esta se congele no meio intracelular, mas rápida o suficiente para impedir o contato da célula com o meio hiperosmótico. Uma desidratação severa leva à injúria celular pelo efeito de solução, que promove a desnaturação das macromoléculas e o enrugamento extremo da célula, até ocorrer colapso irreversível da membrana (Medeiros et al., 2002). A desidratação é um evento desejável, pois reduz a probabilidade de se formarem grandes cristais de gelo dentro da célula, os quais causariam danos às estruturas internas e/ou à membrana plasmática (Squires et al., 1999).

Está bem estabelecido que, para a ótima sobrevivência celular, a taxa de descongelação a ser aplicada deve levar em consideração a taxa de congelação escolhida (Watson, 1995). As temperaturas de aquecimento dependem diretamente da velocidade da curva de congelação. Se esta foi lenta, a descongelação também deverá ser, para que ocorra a diluição dos solutos e, lentamente, haja a reidratação das células. Se o sêmen for descongelado rapidamente, os cristais extracelulares descongelam-se imediatamente e a água invade de forma brusca as células, causando ingurgitamento e danos à membrana plasmática. Se o sêmen tiver sido congelado rapidamente, os espermatozoides não terão sofrido desidratação e, portanto, à liquefação do gelo extracelular, não haverá grande influxo de água, devendo, então, ser descongelado rapidamente de modo que o gelo intracelular que se formou durante a congelação não tenha tempo para recrystalizar (Holt, 2000).

O choque térmico pelo frio pode ser minimizado pela adoção de uma curva lenta de refrigeração e pela adição de crioprotetores extracelulares aos diluidores de sêmen, como as proteínas do leite ou as lipoproteínas da gema de ovo. Na gema de ovo, as lipoproteínas de baixa densidade, principalmente a fosfatidilcolina, são as responsáveis pela ação protetora das membranas. Da mesma forma, os crioprotetores intracelulares, como glicerol, amidas, etilenoglicol e dimetilsulfóxido, conferem proteção, pois reduzem o ponto de congelação das soluções, portanto menos gelo se forma e a célula dispõe de mais tempo para se desidratar (Pickett, 1986). Com isso, a concentração de soluto no líquido residual se reduz porque aumenta o volume dos canais de solvente não congelado, diluindo as altas concentrações de soluto e minimizando o efeito solução (Graham, 1996). Sendo assim, de modo geral, os crioprotetores têm a função de proteger a célula da formação de cristais de gelo e auxiliar nas mudanças da composição do meio intracelular, assim como reduzir os efeitos causados pelas mudanças de temperatura (Watson, 1995).

### Exames laboratoriais de rotina

No Brasil, a avaliação da qualidade do sêmen congelado é realizada com testes laboratoriais preconizados pelo Ministério da Agricultura (Manual..., 1998), fixando-se na análise da motilidade e morfologia espermáticas assim como na concentração de espermatozoides viáveis.

A avaliação subjetiva da motilidade pós-descongelação é um parâmetro usado para determinar a qualidade do sêmen de touros destinados a IA. Assim, Correa et al. (1997) observaram correlação ( $r = 0,53$ ;  $P < 0,01$ ) entre a motilidade pós-descongelação e a fertilidade, com diferença significativa entre touros de baixa ( $r = 0,39$ ;  $P < 0,01$ ) e alta ( $r = 0,61$ ;  $P < 0,01$ ) fertilidade, indicando que essa diferença se deve às variações na qualidade dos espermatozoides.

Na busca de maior objetividade na avaliação da motilidade espermática pós-descongelação, pode ser usada a análise computadorizada (CASA). No entanto, Januskauskas et al. (2001) compararam a avaliação subjetiva e computadorizada, e os resultados não diferiram significativamente ( $62,8 \pm 6,5$  e  $72,4 \pm 9,9\%$ , respectivamente), havendo correlação entre motilidade espermática e fertilidade para ambas as avaliações ( $r = 0,66 - 0,67$ ;  $P < 0,001$  para subjetiva;  $r = 0,53 - 0,57$ ;  $P < 0,05$  para CASA). Christensen et al. (2005) observaram, para sêmen a fresco e congelado de touro, maior correlação entre motilidade, avaliada subjetivamente, e taxa de não retorno ao cio (TNR) aos 56 dias ( $r = 0,48$  e  $0,55$ , respectivamente) do que entre integridade da membrana plasmática, avaliada pelo citômetro de fluxo, e TNR aos 56 dias ( $r = 0,32$  e  $r = 0,41$ , respectivamente), enquanto Phillips et al. (2004), avaliando sêmen criopreservado de touros, não observaram correlação significativa entre motilidade e TNR ou taxa de concepção.



De fato, sabe-se que as correlações entre fertilidade a campo e motilidade variam consideravelmente ( $r = 0,12$  a  $0,84$ ; Graham, 2001). Diante disso e frente à disseminação do uso da análise computadorizada da motilidade, trabalhos recentes têm procurado tanto identificar subpopulações espermáticas no ejaculado que indiquem maior criorresistência quanto avaliar os efeitos que diferentes procedimentos laboratoriais adotados à análise computadorizada do sêmen bovino congelado têm sobre os resultados.

Muiño et al. (2008) analisaram ejaculados de touros Holandeses ( $n = 9$ ) e identificaram, pela análise de *cluster*, ou seja, pelo agrupamento por similaridade, quatro subpopulações espermáticas (Subpop.), com padrões definidos de movimento, sendo: Subpop. 1 – espermatozoide moderadamente lento, mas progressivo (23,2%); Subpop. 2 – espermatozoide altamente ativo, mas sem progressão (16,0%); Subpop. 3 – espermatozoide com baixa motilidade e sem progressão (35,5%); e Subpop. 4 – espermatozoides com alta motilidade progressiva (25,3%). A distribuição dos gametas dentro das subpopulações foi muito similar entre touros, sendo a maior diferença observada para a Subpop. 4. Os resultados indicaram que os ejaculados com maior proporção de espermatozoides de alta motilidade progressiva foram também os mais criorresistentes e de maior longevidade à incubação pós-decongelação.

Pesquisa atual (Contri et al., 2010) ressalta a necessidade de se padronizar os procedimentos laboratoriais adotados na análise objetiva do sêmen bovino congelado, pois os resultados de motilidade e padrões da cinética dos espermatozoides são significativamente afetados. Os autores recomendam que, para o equipamento Hamilton-Thorne IVOS 12.3, sejam adotados 60 *frames*/segundo e 30 *frames*/campo, com diluição da amostra em solução tampão fosfato (PBS), numa concentração mínima de  $20 \times 10^6$  espermatozoides/mL, devendo-se considerar o tipo de câmara usada (Makler ou Leja) e, independentemente da câmara, efetuar a leitura dentro de um ou dois minutos.

No que se refere à avaliação da morfologia, as causas de defeitos espermáticos podem ser de origem ambiental, genética ou a combinação de ambas (Chenoweth, 2005). Considerando-se a importância econômica e biológica de se estimar o potencial fecundante e de se monitorar a função testicular de touros usados nos programas de IA, faz-se a avaliação morfológica dos espermatozoides, devido à relação desta com a fertilidade (Januskauskas et al., 2001). Porém, essa correlação ( $0,06$  a  $0,86$ ) apresenta-se bastante variável, como relatou Rodriguez-Martinez (2005) em trabalho de revisão.

As anormalidades morfológicas, inicialmente, foram classificadas por Blom (1950), citado por Barth e Oko (1989), em primárias, as que têm origem nos testículos durante a espermatogênese, e secundárias, aquelas que se originam após a formação nos testículos. Esse sistema de classificação foi revisto por Blom (1973), citado por Barth e Oko (1989), e passou a ser dividido em defeitos maiores e menores, de acordo com o prejuízo causado à fertilidade.

Em trabalho de revisão, Chenoweth (2005) relata que a redução da fertilidade pode ocorrer por falhas dos espermatozoides em atingirem o local da fecundação, o que envolve motilidade e transporte no trato genital da fêmea, ou falhas na fecundação do ovócito e manutenção do desenvolvimento embrionário. No primeiro caso, os defeitos podem ser compensados com o aumento do número de células espermáticas na dose inseminante, enquanto, no segundo caso, as falhas não podem ser compensadas, porque o aumento da concentração de espermatozoides não levará à melhoria da taxa de fertilidade.

Com o objetivo de encontrar os limites de patologia espermática total, defeitos maiores e menores para sêmen congelado de touros, Casagrande et al. (1980b) trabalharam com 191 partidas de sêmen bovino em rebanhos de diferentes regiões do país e verificaram significativa ( $P = 0,001$ ) correlação negativa entre fertilidade e patologia total ( $r = -0,48$ ) e defeitos maiores ( $r = -0,51$ ). Também observaram correlação negativa entre fertilidade e defeitos menores ( $r = -0,16$ ;  $P = 0,005$ ). A maioria das partidas com boa fertilidade apresentou menos de 20% de patologia espermática e 15% de defeitos maiores, enquanto partidas acima de 30% de patologia espermática e 20% de defeitos maiores tiveram baixa fertilidade.

Dentre os fatores contribuintes para o sucesso da fecundação, está, também, o número necessário de espermatozoides por inseminação, visando obter resultados aceitáveis de fertilidade. Casagrande et al. (1980a), trabalhando com sêmen congelado distribuído em rebanhos de diferentes regiões do país, observaram correlação significativa ( $r = 0,25$ ;  $P = 0,001$ ) entre número de espermatozoides e fertilidade. Considerando-se a patologia espermática total de até 20%, defeitos maiores até 15% e menores até 10%, a fertilidade não variou entre as partidas contendo de  $7 \times 10^6$  a  $80 \times 10^6$  de células espermáticas. Foote e Kaproth (1997) testaram a fertilidade do sêmen de touros, envasado em palhetas de 0,5 mL contendo de  $10 \times 10^6$  a  $40 \times 10^6$  espermatozoides, e concluíram que, em boas condições de colheita, processamento e inseminação, a alta fertilidade se mantém com  $10 \times 10^6$  espermatozoides/palheta. Den Daas et al. (1998) estimaram o número mínimo de espermatozoides/palheta que não comprometesse os resultados da IA, utilizando os resultados de 20 touros com pelo menos 200 inseminações cada. Ao trabalharem com palhetas de 0,25 mL e número de espermatozoides variando entre  $2,1 \times 10^6$  e  $17,3 \times 10^6$ , a taxa de concepção se manteve entre 82 e 90%, portanto com índices satisfatórios mesmo quando o número de gametas na dose inseminante foi cerca de oito vezes menor.

#### Avaliação da integridade estrutural e funcional da membrana plasmática



A criopreservação pode causar danos irreversíveis às membranas espermáticas, tais como: edema e ruptura, mudanças na fluidez e alterações no influxo de cálcio e na ação enzimática, comprometendo suas funções (Watson, 1995).

Parâmetros seminais clássicos, como o número total de espermatozoides no ejaculado, a motilidade progressiva e a morfologia espermática, têm uma capacidade limitada para predizer o potencial fecundante dos gametas (Amann, 1989). Por serem de crucial importância para a função celular e durante o processo de fecundação, que envolve capacitação espermática, reação acrossomal, ligação à zona pelúcida e fusão dos gametas, a avaliação das membranas espermáticas tem um papel relevante. Na análise da estrutura das membranas espermáticas, são comumente utilizadas sondas fluorescentes (Harrison e Vickers, 1990), dupla coloração com eosina/nigrosina (Barth e Oko, 1989) e teste hiposmótico que, embora originalmente desenvolvido para verificar a funcionalidade da membrana plasmática de espermatozoides humanos (Jeyendran et al., 1984), pode ser aplicado para avaliar sêmen de touros (Correa e Zavos, 1994).

### *Sondas fluorescentes*

O desenvolvimento de técnicas de coloração usando fluorocromos tem fornecido novas ferramentas para avaliar o sêmen pós-descongelamento. Isolados ou em combinação, podem ser usados para determinar a integridade das membranas e ser visualizados simultânea ou separadamente, usando diferentes filtros (Rodríguez-Martínez, 2000; Januskauskas e Zilinskas, 2002; Gillan et al., 2005).

Os estudos iniciais para a avaliação da membrana plasmática dos espermatozoides de touros com diacetato de 6-carboxifluoresceína/iodeto de propídeo (CFDA/IP) foram realizados em citômetro de fluxo (Garner et al., 1986). Só em 1990, Harrison e Vickers adaptaram o uso com baixas concentrações de formaldeído, permitindo, assim, a avaliação em microscopia de epifluorescência e aumentando a aplicabilidade da técnica.

A combinação do CFDA/IP permite determinar a viabilidade dos espermatozoides devido às suas características moleculares. A membrana plasmática intacta é permeável ao CFDA, e esterases intracelulares o convertem em composto fluorescente, a fluoresceína. Esta é incapaz de atravessar a membrana intacta, sendo retida no citoplasma (Holt e North, 1994; Gillan et al., 2005), corando o gameta em verde. Corantes para ácido nucleico, como o IP, identificam espermatozoides mortos, corando seu núcleo em vermelho, pois a membrana plasmática intacta impede sua entrada na célula (Garner et al., 1986). Assim, quando o CFDA é associado ao IP, três populações de células podem ser identificadas, como descrito por Harrison e Vickers (1990): vivas, se coram em verde; mortas, em vermelho e uma terceira população se cora com ambos – acrossomo em verde e núcleo em vermelho – e são consideradas lesadas com acrossomo intacto.

Pintado et al. (2000) ratificaram o papel do IP como um bom indicador de células lesadas, pois observaram correlação positiva com o Hoechst 33258 ( $r = 0,80$ ;  $P < 0,01$ ) e com a eosina/nigrosina/giemsa ( $r = 0,69$ ;  $P < 0,01$ ).

Garner et al. (1986), usando a associação CFDA/IP, observaram que, embora não significativa ( $P = 0,06$ ), houve correlação negativa ( $r = -0,57$ ) entre o aumento de células lesadas e a fertilidade (TNR aos 90 dias). Com o objetivo de verificar a existência de correlação entre os padrões observados de coloração espermática empregando fluorocromos e a fertilidade, medida por meio da TNR aos 75 dias, para sêmen bovino, Ericsson et al. (1989), empregando diferentes citômetros de fluxo (FACS Analyzer e EPICS V), constataram que a combinação do número de células íntegras pós-descongelamento e a população de lesadas, após 90 minutos de incubação a 39°C, propiciou a melhor estimativa da TNR aos 75 dias, com um coeficiente de correlação de 0,85 ( $P < 0,002$ ) quando usado o FACS Analyzer, enquanto para o EPICS, o número de espermatozoides lesados após incubação por 90 minutos apresentou correlação com a TNR aos 75 dias de 0,66 ( $P < 0,04$ ).

Por outro lado, Brito et al. (2003) não verificaram correlação entre a taxa de clivagem e a integridade da membrana plasmática. Da mesma forma, Phillips et al. (2004), avaliando a integridade de membrana (SYBR-14/IP) de espermatozoides congelados de touros, não observaram correlação significativa com a TNR e com a taxa de concepção.

Novas combinações de fluorocromos vêm sendo validadas e analisam diferentes estruturas espermáticas tanto sob o aspecto estrutural quanto funcional. Celeghini et al. (2007) disponibilizaram para sêmen bovino uma técnica de coloração que permite a avaliação simultânea da integridade das membranas plasmática e acrossomais, além da atividade funcional das mitocôndrias localizadas na peça intermediária. A associação de sondas foi composta pelos corantes IP, Hoechst 33342, isotiocianato de fluoresceína conjugado a aglutinina do *Pisum sativum* - FITC-PSA e 5,5',6,6'- tetracloro-1,1',3,3' iodeto de tetraetilbenzimidazol carbocianina - JC-1. Esta associação de corantes fluorescentes também foi usada com sucesso na avaliação do sêmen suíno por Andrade et al. (2007).



### *Eosina/Nigrosina*

A eosina é um corante supravital que não penetra em células com membrana plasmática intacta, mas, quando lesadas, estas são coradas em rosa. A nigrosina é responsável pelo contraste mais escuro de fundo da lâmina, o qual permite a visualização dos espermatozoides não corados. Portanto, este teste tem sido recomendado como uma avaliação adicional àquelas de rotina (Brito, 2007). Essa coloração foi descrita pela primeira vez em 1951 por Swanson e Bearden; desde então, vem sendo amplamente usada.

A habilidade da eosina/nigrosina em diferenciar células mortas foi confirmada por Pintado et al. (2000), que, avaliando sêmen de touro pós-descongelamento, observaram alta correlação entre eosina/nigrosina e iodeto de propídeo ( $r = 0,83$ ;  $P = 0,0009$ ).

Tartaglione e Ritta (2004), associando eosina ao teste hiposmótico para avaliar sêmen criopreservado de touros, observaram que estes testes laboratoriais foram melhores para prever a fertilidade *in vitro* do que a avaliação de morfologia e motilidade espermáticas. Mas, quando considerados separadamente, os testes não foram bons estimadores da fertilidade.

Tanghe et al. (2002), trabalhando com touros de alta (>60%) e baixa (20-35%) fertilidade *in vitro*, utilizaram o corante eosina/nigrosina após ter se submetido ao teste de seleção espermática por colóides para prever a habilidade de formação do pró-núcleo. Estes autores verificaram alta associação ( $R^2 = 0,81$ ;  $P < 0,05$ ) entre a porcentagem de espermatozoides vivos e a formação de pró-núcleos após a fecundação *in vitro*.

Brito et al. (2003), utilizando sêmen bovino criopreservado para comparar diferentes métodos de avaliação da membrana espermática, relataram alta correlação ( $r = 0,89$ ;  $P < 0,01$ ) entre membrana plasmática intacta, de acordo com as colorações pela eosina/nigrosina, *trypan blue* (corante vital que identifica espermatozoides mortos) e iodeto de propídeo, e a taxa de fecundação *in vitro*. Estes autores observaram que a proporção de células com membrana plasmática intacta foi superestimada pelos corantes eosina/nigrosina e *trypan blue*, quando comparados com o iodeto de propídeo combinado a outros corantes fluorescentes. Essa diferença pode ser atribuída ao tempo de exposição ao corante, que foi de apenas poucos segundos para a eosina/nigrosina, poucos minutos para o *trypan blue* e de 10 a 30 minutos para o iodeto de propídeo.

### *Teste hiposmótico*

O teste hiposmótico avalia a integridade funcional da membrana plasmática e, estando esta intacta, quando o espermatozoide é incubado em solução hiposmótica, ocorre o influxo de água até que seja atingido o equilíbrio osmótico. Como consequência desse processo, a membrana se expande, causando o enrolamento da cauda, um processo fisiológico; mas, se a membrana estiver danificada, essa reação não ocorrerá (Jeyendran et al., 1984).

A motilidade espermática depende das trocas que ocorrem através da membrana plasmática, por isso sua integridade é importante. Correa e Zavos (1994) encontraram correlação significativa entre motilidade espermática e enrolamento da cauda ( $r = 0,73$ ;  $P < 0,05$ ), após o teste hiposmótico. A proporção de espermatozoides com membrana intacta e bioquimicamente ativa após a congelamento foi 20% menor do que antes, indicando que a membrana foi danificada ou inativada no processo de congelamento e/ou descongelamento.

A divisão dos touros em reprodutores de alta e baixa fertilidade permitiu que Correa et al. (1997) classificassem o enrolamento de cauda espermática. Para touros de alta fertilidade, o aparecimento de células com cauda mais enrolada (tipo A) foi mais significativo ( $r = 0,53$ ;  $P < 0,01$ ). Por outro lado, em touros de baixa fertilidade, foi significativa a correlação ( $r = 0,20$ ;  $P < 0,05$ ) com células que apresentaram enrolamento apenas na extremidade da cauda (tipo C).

Anzar et al. (1997) trabalharam com sêmen congelado de touros para verificar a integridade da membrana plasmática de espermatozoides separados em coluna de Sephadex e a proteção conferida pelo glicerol durante a congelamento. As porcentagens de acrossomo normal, membrana plasmática intacta e enrolamento de cauda foram significativamente melhores nos espermatozoides filtrados do que nos não filtrados, sendo de  $52,1 \pm 10,5$  e  $35,0 \pm 7,4$  ( $P = 0,0001$ );  $35,3 \pm 6,9$  e  $23,3 \pm 3,9$  ( $P = 0,0008$ );  $19,3 \pm 3,8$  e  $13,0 \pm 1,3$  ( $P = 0,003$ ), respectivamente. Os resultados foram influenciados pela adição de glicerol, como pode ser visto ao se comparar as porcentagens médias dos espermatozoides filtrados com e sem glicerol:  $86,5 \pm 2,2$  e  $17,7 \pm 3,1$  ( $P < 0,01$ );  $56,5 \pm 3,9$  e  $14,0 \pm 4,1$  ( $P < 0,01$ );  $31,7 \pm 1,5$  e  $7,6 \pm 1,5$  ( $P < 0,05$ ), respectivamente.

Os espermatozoides são desafiados, sob condições hiperosmóticas, durante o processo de congelamento, quando a concentração intracelular de solutos aumenta muito, podendo afetar a integridade da membrana plasmática e a motilidade espermática de formas diferentes. O rompimento da membrana plasmática determina perda da viabilidade celular, mas uma membrana intacta não a garante. Liu e Foote (1998) trabalharam com sêmen bovino e observaram que, na solução com osmolaridade de 100 e 150 mOsm/L, a motilidade foi significativamente menor (5 e 19%, respectivamente) do que a porcentagem de espermatozoides não corados com vermelho congô (18 e 35%, respectivamente), mostrando que a membrana plasmática foi mais resistente a danos osmóticos do que os mecanismos responsáveis pela motilidade.

Rota et al. (2000) avaliaram o sêmen congelado de touros para verificar se os resultados do teste



hiposmótico se correlacionavam com a habilidade fecundante *in vitro*. As análises foram realizadas pós-descongelamento, pós-seleção em gradiente de Percoll e pós-capacitação em meio contendo heparina. O teste hiposmótico foi importante para identificar a integridade funcional da membrana plasmática. Apesar de os touros terem fertilidade *in vitro* semelhante, houve diferença ( $P < 0,01$ ) na resposta ao teste. Não houve correlação significativa entre a porcentagem de espermatozoides com cauda enrolada e a fertilidade *in vitro*.

A associação do corante supravital ao teste hiposmótico auxilia na avaliação do sêmen congelado de bovinos. A eosina/nigrosina detecta a integridade física da membrana plasmática, enquanto o teste hiposmótico avalia se ela está bioquimicamente ativa, uma vez que a capacitação espermática, a reação do acrossomo e a fusão do espermatozoide ao ovócito requerem a membrana estruturalmente intacta e bioquimicamente ativa. O teste hiposmótico fornece informações sobre a integridade da membrana plasmática na cauda, e a associação com a eosina permite avaliar também a região da cabeça. Correa e Zavos (1994) obtiveram, para a solução de 100 mOsm/L, o número máximo de caudas enroladas ( $48,0 \pm 4,7\%$ ), e os resultados do corante supravital indicaram uma média de  $56,6 \pm 5,4\%$  de células com membrana íntegra. Estes autores observaram também alta correlação entre as porcentagens de células com membrana intacta e de espermatozoides reativos ao teste hiposmótico ( $r = 0,81$ ;  $P < 0,05$ ).

Ducci et al. (2002), usando essa associação, avaliaram a integridade da membrana plasmática de espermatozoides de coelho em três momentos (zero, cinco e 30 minutos) pós-colheita. Houve aumento no percentual de caudas enroladas com o passar do tempo ( $T_0 = 67,86 \pm 4,28\%$ ;  $T_5 = 72,86 \pm 3,28\%$ ;  $P < 0,05$  e  $T_{30} = 75,14 \pm 6,5\%$ ;  $P < 0,05$ ). Estes autores sugeriram que a redução da fertilidade dos ejaculados com altas porcentagens de motilidade pode ser devido à presença de espermatozoides tipo 2 (cauda enrolada e cabeça corada), ou seja, aqueles que têm a membrana plasmática lesada na região da cabeça, permitindo a entrada do corante, mas íntegra na região da cauda, que respondem ao choque hiposmótico.

A integridade da membrana plasmática vem sendo estudada por diferentes técnicas, e a combinação delas tem ajudado a explicar as variações encontradas. Tartaglione e Ritta (2004) explicaram 78% da variação na taxa de fecundação quando combinaram os resultados do teste hiposmótico com os da eosina/nigrosina, tendo sido encontrados 69,8% de espermatozoides vivos na avaliação com o corante supravital e 58,8% de células com cauda enrolada. Combinando-se os dois testes, foi possível reduzir o número de falsos positivos e aumentar a habilidade para detectar diferenças nas propriedades da membrana plasmática, obtendo-se 51,2% de espermatozoides vivos e com cauda enrolada (funcional).

Thundathil et al. (2002), partindo do pressuposto de que ejaculados com alta proporção de gametas com defeito de acrossomo têm baixa fertilidade, submeteram o sêmen congelado de touros ao teste hiposmótico e compararam os grupos controle e com alta porcentagem de defeitos de acrossoma ( $K_1 = 93\%$  de acrossomo achatado;  $K_2 = 84\%$  de acrossomo denteado). A resposta ao teste hiposmótico foi maior ( $P < 0,05$ ) no grupo controle ( $68,8 \pm 2,4\%$ ) do que no  $K_1$  ( $36,1 \pm 4,6\%$ ) e no  $K_2$  ( $40,2 \pm 4,7\%$ ). A perda da integridade funcional da membrana plasmática predispõe à capacitação prematura e à reação do acrossomo, logo o espermatozoide perde a habilidade de se ligar ao ovócito e penetrar na zona pelúcida, sugerindo que a explicação para a redução da fertilidade está associada ao defeito de acrossoma.

Desta forma, o uso do teste hiposmótico como técnica complementar é importante, pois tanto a refrigeração quanto a congelamento podem causar efeitos deletérios sobre a membrana, e sua utilização permite uma avaliação mais acurada do potencial fecundante da população de espermatozoides de uma dose de sêmen (Correa e Zavos, 1994; Rota et al., 2000).

### Capacitação espermática e reação acrossomal

Os espermatozoides passam pelo processo de maturação durante o transporte através do epidídimo. Para atingir a capacidade de fecundar, várias modificações sequenciais, parcialmente conhecidas, são necessárias e incluem capacitação espermática e reação acrossomal (Yanagimachi, 1994). Durante a ejaculação, o espermatozoide entra em contato com as secreções das glândulas sexuais acessórias, as quais inibem ou mascaram a habilidade do espermatozoide de fecundar o óvulo (decapacitação), prevenindo a ocorrência de capacitação prematura (Sidhu e Guraya, 1989).

Capacitação é um termo coletivo para as mudanças que um espermatozoide sofre quando entra em contato com o trato reprodutivo feminino, e essas incluem a reorganização de proteínas de membrana, efluxo de colesterol da bicamada lipídica com consequente aumento da fluidez da membrana, modulação da concentração iônica intracelular, aumento da atividade da tirosina quinase e desenvolvimento da motilidade hiperativada. Estas mudanças, seguidas da reação do acrossomo, um evento exocitótico irreversível, são essenciais para o espermatozoide se ligar e penetrar na zona pelúcida, para, então, fundir-se com a membrana plasmática do ovócito (Yanagimachi, 1994).

Embora a capacitação espermática tenha sido descoberta há mais de cinquenta anos por Austin e Chang, pouco se sabe sobre as bases moleculares desse evento. Pesquisas têm buscado esclarecer como alguns compostos atuam sobre a membrana, a transmembrana e o meio intracelular, sinalizando e desencadeando os



eventos relacionados à capacitação (Visconti et al., 1998). O desenvolvimento de estudos *in vitro* permitiu o melhor entendimento dos mecanismos básicos envolvidos. Desta forma, observou-se que algumas substâncias têm papel desencadeador deste processo, como o bicarbonato, a albumina, o cálcio e a heparina (Sidhu e Guraya, 1989; Flesch e Gadella, 2000).

O principal composto considerado desencadeador da capacitação é o bicarbonato. Esta substância encontra-se em baixa concentração na cauda do epidídimo (<1 mM), local onde ficam armazenados os espermatozoides por períodos longos. Quando chegam ao trato genital feminino, os espermatozoides entram em contato com concentrações superiores a 15 mM de bicarbonato. As concentrações intracelulares de bicarbonato também podem aumentar por meio dos canais iônicos presentes na membrana plasmática. Provavelmente, o bicarbonato se liga diretamente à adenilato ciclase, a qual aumenta as concentrações de cAMP, que, por sua vez, ativam as proteínas quinases, como a fosfoquinase A, e induzem à fosforilação da tirosina da proteína espermática. Essa fosforilação tem relação com o aumento da afinidade pela zona pelúcida e com o desencadeamento da motilidade hiperativada e da reação do acrossomo (Flesch e Gadella, 2000).

A presença da albumina sérica bovina (BSA) nos meios de capacitação *in vitro* está relacionada à extração do colesterol da membrana plasmática do espermatozoide (Sidhu e Guraya, 1989; Cross, 1998), com deslocamento dos fosfolípidos no plano lateral e transversal, levando a um desarranjo de sua arquitetura. Bovinos e humanos são espécies que possuem alta concentração de colesterol na membrana plasmática, o que implica a necessidade de maior tempo para a capacitação (seis e oito horas, respectivamente). Em suínos e ovinos, são necessárias apenas uma ou duas horas, pois possuem baixa concentração de colesterol (Flesch e Gadella, 2000).

O cálcio está envolvido no processo de capacitação e acredita-se que este neutralize cargas negativas na superfície externa da membrana acrossomal externa e na superfície interna da membrana plasmática, permitindo que estas se aproximem para a fusão. O cálcio também pode inibir a enzima magnésio-ATPase, envolvida em bombear água para fora do acrossomo. Um influxo de água no acrossomo pode aproximar as membranas acrossomal externa e plasmática, facilitando a fusão entre ambas (Sidhu e Guraya, 1989).

A heparina é um glicosaminoglicano, que tem como função estimular o aumento da concentração de cálcio intracelular, do pH e das concentrações de cAMP, que parecem ser necessárias para iniciar a capacitação (Cormier e Bailey, 2003), além de remover as proteínas do plasma seminal adsorvidas à superfície da membrana plasmática, as quais são consideradas inibidoras da capacitação (Miller et al., 1990; Therien et al., 1995).

A última alteração é a reação acrossomal, iniciada imediatamente após sua ligação à zona pelúcida, quando há a fusão entre as membranas plasmática e acrossomal externa. Durante a reação acrossomal, enzimas hidrolíticas e proteolíticas são liberadas, dissolvendo a matriz acelular da zona pelúcida, o que permite ao gameta masculino penetrar no espaço perivitelino e se fundir ao oolema (Flesch e Gadella, 2000).

Algumas técnicas laboratoriais já foram descritas visando fornecer informações sobre a condição acrossomal, dentre elas, a lecitina do amendoim conjugada ao isotiocianato de fluoresceína (FITC-PNA) e a dupla coloração *trypan blue*/Giemsa.

#### *FITC-PNA/IP*

O teste ideal para verificar a porcentagem de espermatozoides que sofreram reação acrossomal deve ser preciso, rápido, não deve comprometer a função espermática e deve ser capaz de distinguir a reação verdadeira (RAV) da falsa (RAF; Cross e Meizel, 1989).

As lecitinas são aglutininas que, conjugadas ao isotiocianato de fluoresceína (FITC), uma sonda fluorescente, são utilizadas para verificar a condição acrossomal (Suzuki et al., 2003). As lecitinas têm afinidade específica por determinadas moléculas sacarídicas (carboidratos) da matriz acrossomal ou da membrana acrossomal externa (Magargee et al., 1988; Flesch et al., 1998; Sirivaidyapong et al., 2000; Chan et al., 2002) e requerem permeabilidade celular (Cross e Meizel, 1989). Uma das lecitinas mais usadas é a *Arachis hypogaea* - aglutinina do amendoim (PNA), que se liga à membrana acrossomal externa (Chan et al., 2002; Kitiyanant et al., 2002).

Assim, a aglutinina de *Arachis hypogaea*, conjugada ao isotiocianato de fluoresceína (FITC-PNA), tem sido usada para avaliar a integridade do acrossomo em várias espécies, como humana (Cross e Meizel, 1989), ovina (Magargee et al., 1988), suína (Fazeli et al., 1997), canina (Sirivaidyapong et al., 2000) e equina (Cheng et al., 1996). O FITC-PNA foi usado pela primeira vez para verificar a condição acrossomal em espermatozoide bovino por Cross e Watson (1994). Mas só recentemente foi associado ao iodeto de propídeo (IP), distinguindo, assim, espermatozoides vivos e mortos, com reação acrossomal verdadeira e com reação acrossomal falsa (Nagy et al., 2003).

Uma membrana plasmática intacta e funcional se torna impermeável ao FITC-PNA, e nenhum sinal de fluorescência é observado. Quando o espermatozoide sofre reação acrossomal, ocorrem pontos de fusão entre a membrana plasmática e a membrana acrossomal externa, resultando na formação de poros, que dão acesso do fluorocromo às membranas acrossomais e a seu conteúdo, e o acrossomo apresenta-se corado em verde – reação



acrossomal verdadeira. Quando ocorre a fusão completa entre a membrana plasmática e a membrana acrossomal externa, isto resulta na completa perda do acrossomo, e o espermatozoide apresenta fluorescência apenas no segmento equatorial, ou simplesmente não exibe fluorescência (Cross e Meizel, 1989; Cheng et al., 1996; Kitiyanant et al., 2002; Hollinshead et al., 2004). Dependendo da membrana acrossomal externa restante, o FITC-PNA cora com várias intensidades de fluorescência e contraste e não gera dúvidas na leitura com as demais colorações (Cross e Meizel, 1989; Fazeli et al., 1997).

O FITC-PNA vem sendo comumente usado em combinação com o IP, que identifica em vermelho células mortas. Espermatozoides com IP e PNA positivo, ou seja, morto com acrossomo reagido, sofreram reação acrossomal falsa, pois podem ter perdido seu acrossomo com a morte celular (Fazeli et al., 1997; Kitiyanant et al., 2002). Esta técnica necessita de alternância entre microscopia de epifluorescência e campo claro, já que o espermatozoide vivo não se cora com o FITC-PNA e IP.

As membranas acrossomais são especialmente propensas a danos causados pela criopreservação (Risopatrón et al., 1996). Assim, a condição acrossomal de uma população espermática é de especial interesse, porque o número de espermatozoides que apresentam reação acrossomal, quando induzida com cálcio ionóforo A23187, tem correlação positiva com a fertilidade (taxa de não retorno ao estro aos 90 dias) do sêmen criopreservado de touro ( $r = 0,86$ ;  $P < 0,001$ ), de acordo com estudo realizado por Whitfield e Parkinson (1995). Porém, Assumpção et al. (2002), avaliando reação acrossomal induzida com heparina e cálcio ionóforo A23187, em bovinos, não observaram correlação com fertilidade *in vivo*.

Kitiyanant et al. (2002), usando FITC-PNA e ethidium homodimer-1 (EthD-1) para avaliar reação acrossomal induzida com heparina e cálcio ionóforo em sêmen criopreservado de búfalo, obtiveram 78% de espermatozoides vivos com acrossomo intacto e 9% de reação acrossomal verdadeira, enquanto usando FITC-PNA/TBG, obtiveram 80% de vivos e 10% de reação acrossomal verdadeira, tanto pela heparina quanto pelo cálcio ionóforo. Além disso, alta correlação foi observada entre as duas técnicas de coloração ( $r > 0,90$ ), reforçando a capacidade do FITC-PNA em avaliar a ocorrência de reação acrossomal. Em contrapartida, Prathalingam et al. (2006), avaliando a integridade do acrossomo com FITC-PNA/IP, encontraram  $1,16 \pm 0,9\%$  de reação acrossomal verdadeira em sêmen de touro pós-descongelamento.

Cheng et al. (1996), utilizando FITC-PNA para avaliar a condição e a reação acrossomal durante a interação do gameta equino no teste da hemizona, observaram que espermatozoides com acrossomo intacto, reagindo ou reagido, podem iniciar a ligação à zona pelúcida. Portanto, o FITC-PNA é uma sonda fluorescente confiável para avaliar a condição acrossomal de espermatozoide de garanhão.

Gillan et al. (2008), avaliando a integridade acrossomal do sêmen criopreservado de touros da raça Holandesa, pós-descongelamento e pós-swim up, pela técnica do FITC-PNA, observaram que o percentual de espermatozoides com membrana acrossomal intacta não diferiu entre os momentos, sendo  $80,2 \pm 1,3$  e  $79,0 \pm 1,9$ , respectivamente. Não foi observada correlação entre integridade da membrana acrossomal e fertilidade *in vivo*.

#### *Trypan blue/Giemsa*

A primeira descrição do uso do *trypan blue*/Giemsa (TBG) para avaliar simultaneamente viabilidade espermática e condição acrossomal foi feita por Didion et al. (1989). Desde então, tem sido usado por ser uma técnica acessível, simples, eficiente e de baixo custo (Kitiyanant et al., 2002), podendo ser empregado para estimar o potencial fecundante de amostras de sêmen bovino destinadas à fecundação *in vitro* ou à inseminação artificial (Tartaglione e Ritta, 2004).

O *trypan blue* é um corante vital que detecta espermatozoides mortos, com membrana lesada, corando-os em azul, enquanto espermatozoides intactos (vivos) não se coram (Talbot e Chacon, 1981; Suttiyotin e Thwaites, 1994), enquanto o Giemsa indica ausência ou presença do acrossomo, corando em roxo ou rosa escuro o acrossomo intacto (Way et al., 1995; Tartaglione e Ritta, 2004). Essa coloração é útil para estudar a ocorrência da reação acrossomal (Suttiyotin e Thwaites, 1991), pois permite a diferenciação de espermatozoides que sofreram reação acrossomal verdadeira daqueles que sofreram reação falsa e tem sido usada em várias espécies, como bovino, suíno, ovino e equino (Didion et al., 1989).

Quando o sêmen é corado com TBG, quatro categorias são consideradas: a) vivo com acrossomo intacto; b) morto com acrossomo intacto; c) vivo sem acrossomo; e d) morto sem acrossomo. O acrossomo de espermatozoides mortos é corado mais intensamente que o acrossomo de vivos, e a região sem acrossomo de espermatozoides mortos também é mais escura do que a mesma área nos vivos (Didion et al., 1989).

A porcentagem de espermatozoides corados com *trypan blue* se eleva com o aumento da concentração do corante, o aumento da temperatura de incubação de 30 a 40°C, sendo ótima entre 37 e 40°C, e tempo de exposição ao corante, que deve ser o menor possível, de até 15 minutos. A exposição ao corante por mais de 60 minutos resultou no aumento de células coradas em 6,1% ( $P < 0,01$ ). Entre um e 15 minutos, não houve diferença significativa, mas o número de espermatozoides corados com *trypan blue* foi maior aos 30 minutos do que com um minuto (55,7 e 50,5%;  $P < 0,05$ ) (Suttiyotin e Thwaites, 1991). Da mesma forma, Talbot e Chacon



(1981), avaliando sêmen humano a fresco, observaram que a incubação deve ser de, no mínimo, 15 minutos antes da lavagem e fixação.

Didion et al. (1989) observaram que a motilidade foi semelhante à porcentagem de espermatozoides vivos, não corados com *trypan blue*, e a associação com o Giemsa não modificou sua habilidade de diferenciar vivos e mortos. Além disso, os resultados do TBG foram iguais ao contraste diferencial de interferência na avaliação da ocorrência da reação acrossomal, confirmando a validade da técnica. Suttiyotin e Thwaites (1991), avaliando sêmen fresco de ovino, observaram correlação significativa entre a porcentagem conhecida de espermatozoides mortos e células coradas com *trypan blue* ( $r = 0,95$ ;  $P < 0,05$ ).

Tartaglione e Ritta (2004) trabalharam com o TBG para avaliar a condição acrossomal de espermatozoides criopreservados de touros e observaram que este apresentou alta correlação ( $r = 0,62$ ;  $P < 0,05$ ) com a fertilidade; portanto, sendo considerado apto em prever a fertilidade *in vitro*.

Fernandes et al. (2008), avaliando as características seminais de touros Nelore submetidos à insulação escrotal e respectivo desempenho na fecundação *in vitro*, verificaram que a variável acrossomo intacto, analisada pelo TBG, explicou as variações nas taxas de clivagem ( $R^2 = 0,30$ ) e de blastocisto ( $R^2 = 0,44$ ).

Correa et al. (1997), verificando a correlação entre parâmetros espermáticos no sêmen congelado e fertilidade a campo, analisaram a integridade acrossomal de touros Holandeses com alta e baixa fertilidade, pela associação dos corantes naftol amarelo S e eritrosina B. Estes autores observaram que os valores médios para concentração e motilidade espermáticas foram semelhantes entre os grupos de fertilidade, mas touros de alta fertilidade apresentaram maior porcentagem de acrossomos intactos ( $83,7 \pm 4,6\%$ ), quando comparados àqueles de baixa fertilidade ( $78,2 \pm 5\%$ ).

Martins et al. (2007) avaliaram a fertilidade *in vitro* de espermatozoides epididimários criopreservados, obtidos de três touros *post-mortem*. Os autores correlacionaram a integridade do acrossomo (Giemsa) com as taxas de clivagem e blastocisto, obtidas nos dias dois e sete, respectivamente, do cultivo *in vitro*. Estes autores concluíram que os touros A1 e A2, com 66 e 68% de acrossomos intactos, respectivamente, tiveram taxas semelhantes de blastocisto (33 e 54%), enquanto o touro A3, com 60% de espermatozoides com acrossomo intacto, apresentou uma taxa menor (21,48%).

A técnica possui várias vantagens, pois os esfregaços são observados em microscópio de campo claro, podem ser lidos em momento conveniente, fixados com rápida secagem sob coluna de ar quente de secador, e as lavagens não influenciam a condição acrossomal. Uma desvantagem é que não diferencia espermatozoide morto, o qual perdeu o acrossomo após a morte celular de espermatozoide que sofreu a reação acrossomal verdadeira e morreu antes da fixação (Didion et al., 1989).

### Avaliação da integridade da cromatina espermática

Durante o processo de espermiogênese, as espermátides arredondadas são transformadas em espermatozoides, passando da forma esférica para achatada e alongada, devido a uma série de modificações morfológicas, que incluem a condensação da cromatina nuclear, a formação da cauda do espermatozoide e o desenvolvimento do capuchão do acrossomo (Barth e Oko, 1989; Hafez e Hafez, 2004).

É também durante a espermiogênese que as histonas, ricas em lisina, são substituídas pela protamina, rica em arginina. As protaminas se tornam altamente alfa-helicoidadas e se ligam ao DNA, possibilitando que as duplas hélices se compactem e, assim, confirmem estabilidade ao núcleo do espermatozoide, para que o complexo desoxirribonuclear-protéico (DNP) seja resistente à desnaturação. Portanto, a cromatina espermática resulta da associação entre o DNA e as protaminas (Unanian, 2000).

Beletti et al. (2005) explicam que, na maioria dos mamíferos, a cromatina espermática possui dois tipos de protamina (P1 e P2) e que alterações na proporção destas protaminas são importante causa de anormalidades na cromatina. No entanto, as células espermáticas dos bovinos têm somente um tipo de protamina, o que sugere que as alterações na cromatina desta espécie tenham outras causas.

As alterações na estrutura da cromatina aumentam a suscetibilidade do DNP em sofrer desnaturação. Desta forma, quando a condensação é incompleta, tal fato resulta em um núcleo menos estável, podendo haver a quebra da dupla hélice do DNA em qualquer fase da maturação, o que provoca a formação de espermatozoides imaturos (Evenson et al., 1980).

A cromatina espermática é uma estrutura complexa e altamente organizada, que protege o DNA para que ocorra a transmissão precisa da informação genética às gerações futuras. Têm-se observado, em humanos, correlação negativa entre fertilidade, *in vivo* ou *in vitro*, e a porcentagem de DNA danificado. Qualquer anormalidade no DNA pode resultar em infertilidade do macho, tendo já sido observado o decréscimo progressivo na fertilidade quando mais de 30% das células espermáticas apresentam lesões (Agarwal e Said, 2003).

O citômetro de fluxo vem sendo usado para avaliar motilidade, concentração total e morfologia espermática com o uso de sondas fluorescentes específicas, que se ligam aos diferentes compartimentos do espermatozoide (Evenson et al., 1980; Ellington et al., 1998; Januskauskas et al., 2001, 2003; Christensen et al.,



2005). Na avaliação da estrutura da cromatina espermática (*sperm chromatin structure assay* - SCSA), o corante usado é o laranja de acridina, para determinar a suscetibilidade do DNA à desnaturação ácida. De acordo com Love (2005), por meio dos gráficos gerados os resultados são interpretados como a população principal, formada por espermatozoides com cromatina íntegra, que fluorescem em verde, e graficamente sua distribuição tem forma elíptica; e a porcentagem de COMPat, representa as células fora da população principal, que fluorescem em vermelho e aparecem à direita da população principal. Recentemente, passou a ser chamada de índice de fragmentação do DNA (células vermelhas + [vermelhas/vermelhas + verdes]).

Evenson e Jost (2000), em estudo com humanos, touros, garanhões e cachorros, relataram que a porcentagem de espermatozoides com DNA desnaturado, expressa pelo índice de fragmentação do DNA (DFI), permitiu classificar o potencial de fertilidade em baixo ( $\leq 30\%$ ), moderado (16 – 29%) e alto (0 – 15%), e, em casos de esterilidade, os valores foram de 80 – 90%. Os autores ressaltaram que, quando o sêmen é submetido a técnicas de seleção, como o *swim-up*, há aumento da porcentagem de células móveis e remoção das mortas, e se  $\geq 27\%$  dos espermatozoides estiverem com DNA lesado, não resultará em gestação.

Em trabalho de revisão, Erenpreiss et al. (2006) relataram que a fragmentação do DNA é frequente em homens subfêrteis, mas o efeito biológico de anormalidades na estrutura da cromatina espermática depende também da capacidade do ovócito em reparar alguns danos. Durante a espermatogênese, as quebras no DNA são necessárias para a substituição das histonas por protaminas. No entanto, se essas quebras temporárias não forem devidamente reparadas, os espermatozoides terão DNA fragmentado. As causas mais frequentes de anormalidades na estrutura da cromatina são: deficiência na recombinação durante a espermatogênese, conduzindo a apoptose da célula; maturação anormal da espermatíde; e estresse oxidativo (Agarwal e Said, 2003).

A baixa condensação da cromatina pode causar danos no DNA, como a presença de fitas quebradiças, que pode ser, em parte, devido ao estresse oxidativo. No entanto, alguns espermatozoides com anormalidades na cromatina fecundam ovócitos *in vitro* e *in vivo*, porém, se o defeito no DNA persistir durante o período embrionário, pode induzir à morte embrionária e ao aborto (Ellington et al., 1998).

As espécies reativas ao oxigênio incluem os radicais livres, que são agentes oxidativos produzidos pelo espermatozoide por um processo fisiológico, necessário para que ocorram a capacitação e a reação do acrossomo. No entanto, Lopes et al. (1998) observaram que o sêmen de baixa qualidade tem maior produção de espécies reativas ao oxigênio e é mais suscetível às lesões no DNA em consequência do estresse oxidativo, podendo afetar a fertilidade. Quando o sêmen foi exposto por mais de uma hora à xantina/xantina oxidase, observou-se aumento significativo ( $P = 0,0001$ ) dos defeitos no DNA, mas o tratamento prévio com antioxidantes os diminuiu significativamente ( $P < 0,04$ ).

Madrid-Bury et al. (2005), trabalhando com touros, não encontraram correlação entre condensação da cromatina, avaliada com iodeto de propídeo, e fertilidade a campo, expressa pela taxa de não retorno ao estro aos 90 dias (60 – 80%). No entanto, utilizando agentes como o EDTA, que quela a protamina, e detergentes como SDS, que rompem ligação não covalente, obtiveram correlação significativa ( $r = 0,66$ ;  $P < 0,001$ ) entre fertilidade e estabilidade da cromatina. Isso mostra que a avaliação da cromatina pode ser uma ferramenta complementar nos trabalhos de rotina e identificação de reprodutores com anormalidades espermáticas.

#### *Técnicas laboratoriais para avaliação da cromatina espermática*

As avaliações laboratoriais são importantes porque têm ajudado a identificar e a eliminar da inseminação artificial reprodutores com baixa qualidade espermática (Amann e Hammerstedt, 1993; Graham e Mocé, 2005).

Testes laboratoriais com azul de toluidina (ATOL) e laranja de acridina foram concebidos para obter informações sobre a estabilidade da cromatina em sêmen humano e animal (Evenson et al., 1980; Tejada et al., 1984; Unanian, 2000).

Na coloração com ATOL, os espermatozoides são submetidos à hidrólise ácida antes de serem corados. No espermatozoide anormal, a cromatina está pouco condensada, e o complexo DNP, estando alterado, terá maior número de grupos fosfato disponível para a ligação com o corante, sendo, então, observada coloração azul escura à violeta. No entanto, se a cromatina estiver íntegra, a coloração produzida será azul clara, porque, no espermatozoide normal, ela mesma está altamente compactada (Mello, 1982).

A propriedade metacromática do ATOL é interessante para avaliar alterações na cromatina espermática. As amostras de sêmen são coradas em pH 4,0 para evitar que as moléculas do corante se liguem a outros sítios que não os grupos fosfato do DNA. A hidrólise ácida, antes da coloração, tem por objetivo aumentar a sensibilidade do processo, extraindo as proteínas nucleares da cromatina alterada, o que expõe os grupos fosfato do DNA para a ligação com o corante, pois, na célula normal, a cromatina altamente compactada é pouco afetada pela hidrólise e se cora em azul claro (Beletti et al., 2004).

Mello (1982) avaliou o sêmen bovino com ATOL e observou que reprodutores de baixa fertilidade apresentaram os núcleos espermáticos 12 vezes mais metacromáticos, quando comparados aos animais de alta



fertilidade.

A estrutura da cromatina espermática é normalmente resistente à desnaturação do DNA, mas, quando alterada, torna-se suscetível. O corante fluorescente laranja de acridina, intercalado à fita dupla íntegra de DNA, fluoresce em verde; no entanto, se lesada, emitirá fluorescência vermelha-alaranjada, permitindo contar o número de células com DNA desnaturado (Evenson et al., 1980; Tejada et al., 1984).

Evenson et al. (1980) relataram que o nível de desnaturação do DNA pode ser determinado dividindo-se o número de espermatozoides que fluorescem em vermelho pelo número total (verdes + vermelhos), e o resultado varia de 0,1 (íntegros) a 0,9 (altamente desnaturados). Os autores encontraram, para touros de alta fertilidade, valores de  $0,1 \pm 0,04$  para o sêmen não tratado pelo calor, e de  $0,16 \pm 0,12$  quando o sêmen foi tratado pelo calor.

O laranja de acridina vem sendo usado para testar a integridade do DNA, no entanto Eggert-Kruse et al. (1996), fazendo uso dessa coloração, avaliaram 103 amostras de sêmen humano e encontraram baixo coeficiente de correlação ( $r = 0,15$ ;  $P < 0,05$ ) da morfologia normal com a porcentagem de células que fluoresceram em verde. Não havendo diferença significativa entre o sêmen de pobre ou excelente qualidade, os autores não recomendaram o uso desta coloração na avaliação da qualidade e capacidade funcional do espermatozoide.

Januskauskas et al. (2001) avaliaram, com laranja de acridina, a qualidade da cromatina dos espermatozoides descongelados de touros e sua relação com a fertilidade a campo, por meio da taxa de não retorno ao estro aos 56 dias. Houve correlação negativa entre viabilidade espermática e cromatina anormal ( $r = -0,71$ ;  $P < 0,01$ ), e correlação negativa ( $P < 0,05$ ) entre fertilidade a campo e população de espermatozoides que fluoresceram em laranja, representada pelas células lesadas na avaliação pelo citômetro de fluxo ( $r = -0,35$  a  $-0,53$ , respectivamente).

Khalifa et al. (2008) testaram alguns fatores que poderiam afetar a estabilidade da cromatina nuclear de espermatozoides de touros. Os autores constataram efeito negativo da taxa de diluição do sêmen e do processo de criopreservação, o qual aumentou a vulnerabilidade do DNA à desnaturação. Consequentemente obtiveram correlação negativa significativa entre taxa de fertilização e desenvolvimento embrionário vs. frequência de alterações na estabilidade da cromatina.

Utilizando a técnica do laranja de acridina para avaliar a preservação da estabilidade da cromatina nuclear de touros sob diferentes condições *in vitro*, Lymberopoulos e Khalifa (2010) constataram a superioridade do diluente Bioxcell<sup>®</sup> sobre o Andromed<sup>®</sup> ( $P < 0,05$ ). Estes autores verificaram que agentes antioxidantes ou estimulantes da motilidade não afetaram a estabilidade da cromatina. Mas, durante incubação *in vitro* por 240 minutos, houve efeito significativo ( $P < 0,001$ ) da temperatura sobre o percentual de cromatina instável, passando de  $3,47 \pm 0,48\%$  e  $4,50 \pm 0,41\%$  pós-descongelação para  $6,70 \pm 0,36\%$  e  $9,71 \pm 0,53\%$  pós-incubação, nas temperaturas de 25 e 39°C, respectivamente. O fluido folicular, como agente capacitante, também promoveu a desestabilização da estrutura da cromatina ( $P < 0,001$ ). Da mesma forma, a cromatina vulnerável teve impacto negativo na fertilidade do sêmen congelado. Frente aos resultados obtidos, os autores concluíram que a manipulação *in vitro* pode ser um fator determinante de alterações na estabilidade da cromatina e que se deve observar o efeito individual na escolha dos procedimentos laboratoriais adotados na criopreservação seminal.

Alguns estudos vêm sendo realizados para comparar as avaliações da cromatina espermática com laranja de acridina e ATOL, abordando as vantagens e as desvantagens de cada uma. Machado et al. (2003), trabalhando com 15 reprodutores suínos para avaliar a eficiência dos métodos no diagnóstico das alterações de compactação da cromatina, detectaram baixa correlação com as alterações morfológicas de cauda e cabeça. A média de células com anomalia na compactação da cromatina detectada pelo método do ATOL foi de  $11,68 \pm 4,18\%$ , e pelo laranja de acridina de  $2,82 \pm 2,25\%$ . Essa diferença foi significativa ( $P < 0,05$ ) e mostra melhor desempenho do método do ATOL. Quanto à repetibilidade observada em dez avaliações de uma mesma amostra, os autores relataram como baixa, justificando que isto pode ser decorrente da utilização de sêmen de animais férteis, o que resulta em baixas médias de espermatozoides com cromatina lesada, fato que talvez não acontecesse se reprodutores subférteis tivessem sido avaliados.

Beletti et al. (2004) destacaram, como desvantagem da coloração pelo laranja de acridina, o fato de as amostras precisarem ser lidas rapidamente, porque a emissão de fluorescência se dá por curto período de tempo. Em contrapartida, as amostras coradas com ATOL podem ser lidas em microscópio óptico, sem risco de alterar a coloração, e com redução dos custos.

Na avaliação das anomalias no complexo DNA-proteína, Naves et al. (2004), utilizando sêmen equino a fresco, verificaram que as colorações diferiram ( $P < 0,05$ ) na identificação dos espermatozoides com lesão na cromatina (3,27 e 6,18% para laranja de acridina e ATOL, respectivamente). A maior incidência de lesões detectadas pelo ATOL indica esta técnica como mais sensível na avaliação das anomalias do complexo DNA-proteína. Apesar dos baixos valores encontrados, estes autores sugerem o seu uso como técnicas complementares na avaliação seminal.

A literatura tem indicado a maior utilização da técnica do laranja de acridina nos estudos da estabilidade da cromatina nuclear do espermatozoide de diferentes espécies como: ovino (Kasimanickam et al., 2006), suíno (Tsakmakidis et al., 2010) e humano (Yagci et al., 2010).



### Considerações finais

A fecundação é um processo multifatorial, ao qual se soma a complexidade estrutural e funcional individual dos gametas. No caso dos espermatozoides, busca-se avaliar vários de seus atributos visando obter maior acurácia na estimativa da sua capacidade fecundante. No entanto, os testes laboratoriais têm tido grande utilidade para excluir, dos programas reprodutivos, touros de baixo potencial fecundante, mas, até o momento, não fornecem subsídios para apontar, dentre os férteis, quais os mais aptos a proporcionar as maiores taxas de prenhez. Uma grande variedade de técnicas encontra-se disponível para avaliação dos espermatozoides e elas podem ser usadas separadamente ou em associação, buscando-se sempre aquelas com alta correlação com a fertilidade *in vivo*. O uso desses protocolos tem tido especial valor nas pesquisas que avaliam os melhores procedimentos para refrigeração, congelamento ou manipulação do sêmen. Mas, sob o aspecto laboratorial, deve-se considerar a inexistência de padronização dos procedimentos tanto de criopreservação, por parte das centrais de coleta e processamento de sêmen, quanto da aplicação dos testes de avaliação *in vitro*, por parte das instituições de pesquisa que são geradoras e usuárias desses métodos. Portanto, a ampla variação observada entre resultados se deve a inúmeros fatores, e a aplicabilidade da seleção *in vitro* das doses de sêmen, como certificação de seu bom desempenho em nível de campo, permanece como um objetivo a ser atingido.

### Referências bibliográficas

- Alberts B, Bray D, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P.** Estrutura da membrana. In: Alberts B et al. *Fundamentos da biologia celular*. Porto Alegre: Artmed, 1998. p.354-377.
- Agarwal A, Said TM.** Role of sperm chromatin abnormalities and DNA damage in male infertility. *Hum Reprod*, v.9, p.331-345, 2003.
- Amann RP.** Can the fertility potential of a seminal sample be predicted accurately? *J Androl*, v.10, p.89-98, 1989.
- Amann RP, Graham JK.** Spermatozoal function. In: Mckinnon AO, Voss JL (Ed.). *Equine reproduction*. Philadelphia: Lea & Febiger, 1993. p.715-745.
- Amann RP, Hammerstedt RH.** *In vitro* evaluation of sperm quality: an opinion. *J Androl*, v.14, p.397-406, 1993.
- Andrade AFC, Arruda RP, Celeghini ECC, Nascimento J, Martins SMMK, Raphael CF, Moretti AS.** Fluorescent stain method for the simultaneous determination of mitochondrial potential and integrity of plasma and acrosomal membranes in boar sperm. *Reprod Domest Anim*, v.42, p.190-194, 2007.
- Anzar M, Graham EF, Iqbal N.** Post-thaw plasma membrane integrity of bull spermatozoa separated with a sephadex ion-exchange column. *Theriogenology*, v.47, p.845-856, 1997.
- Assumpção MEODA, Haipeck K, Lima AS, Mello MRB, Oliveira LJ, Oliveira VP, Tavares LMT, 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, n.3, p.149-156, 2002.
- Barth AD, Oko RJ.** Preparation of semen for morphological evaluation. In: *Abnormal morphology of bovine spermatozoa*. Ames, IA: Iowa State University Press, 1989. p.285.
- Beletti ME, Costa LF, Guardieiro MM.** Morphometric features and chromatin condensation abnormalities evaluated by toluidine blue staining in bull spermatozoa. *Braz J Morphol Sci*, v.22, p.85-90, 2005.
- Beletti ME, Costa LF, Viana MP.** A computational approach to characterization of bovine sperm chromatin alterations. *Biotech Histochem*, v.79, p.17-23, 2004.
- Blom E.** The ultrastructure of some characteristic sperm defects and a proposal for a new classification of the bull spermogram. *Nord Veterinaermed*, v.25, p.383-391, 1973.
- Brito LFC.** Evaluation of stallion sperm morphology. *Clin Techn Equine Pract*, v.6, p.249-264, 2007.
- 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.
- Casagrande JF, Pinheiro LEL, Almeida CA, Ferraz JBS.** Influência do número de espermatozoides, associado com os percentuais da patologia espermática classificada segundo Blom (1972) sobre a fertilidade do sêmen. *Rev Bras Reprod Anim*, v.4, p.38-44, 1980a.
- Casagrande JF, Pinheiro LEL, Almeida CA, Ferraz JBS.** Patologia espermática agrupada segundo Blom (1972) na avaliação de sêmen para congelamento. *Rev Bras Reprod Anim*, v.3, p.19-23, 1980b.
- Celeghini ECC, Arruda RP, Andrade AFC, Nascimento J, Raphael CF.** Practical techniques for bovine sperm simultaneous fluorometric assessment of plasma, acrosomal and mitochondrial membranes. *Reprod Domest Anim*, v.42, p.479-488, 2007.
- Chan JZ, Krause W, Bohring C.** Computer-assisted analysis of sperm morphology with the aid of lectin staining. *Andrologia*, v.34, p.379-383, 2002.



- Cheng FP, Fazeli A, Voorhout WF, Marks A, Bevers MM, Colenbrander B.** Use of peanut agglutinin to assess the acrosomal status and the zona pellucida-induced acrosome reaction in stallion spermatozoa. *J Androl*, v.17, p.674-682, 1996.
- Chenoweth PJ.** Genetic sperm defects. *Theriogenology*, v.64, p.457-468, 2005.
- Christensen P, Boelling D, Pedersen KM, Korsgaard IR, Jensen J.** Relationship between sperm viability as determined by flow cytometry and nonreturn rate of dairy bulls. *J Androl*, v.26, p.98-106, 2005.
- Contri A, Valorz C, Faustini M, Wegher L, Carluccio A.** Effect of semen preparation on CASA motility results in cryopreserved bull spermatozoa. *Theriogenology*, v.74, p.424-435, 2010.
- Cormier N, Bailey JL.** A differential mechanism is involved during heparin- and cryopreservation-induced capacitation of bovine spermatozoa. *Biol Reprod*, v.69, p.177-185, 2003.
- Cormier N, Sirard M-A, Bailey JL.** Premature capacitation of bovine spermatozoa is initiated by cryopreservation. *J Androl*, v.18, p.461-468, 1997.
- Correa JR, Pace MM, Zavos PM.** Relationships among frozen-thawed sperm characteristics assessed via the routine semen analysis, sperm functional tests and fertility of bulls in an artificial insemination programs. *Theriogenology*, v.48, p.721-731, 1997.
- Correa JR, Zavos PM.** The hypoosmotic swelling test: its employment as an assay to evaluate the functional integrity of the frozen-thawed bovine sperm membrane. *Theriogenology*, v.42, p.351-360, 1994.
- Cross NL, Watson SK.** Assessing acrosomal status of bovine sperm using fluoresceinated lectins. *Theriogenology*, v.42, p.89-98, 1994.
- Cross N.** Role of cholesterol in sperm capacitation. *Biol Reprod*, v.59, p.7-11, 1998.
- Cross N, Meizel S.** Methods for evaluating the acrosomal status of mammalian sperm. *Biol Reprod*, v.41, p.635-641, 1989.
- Den Daas JHG, De-Jong G, Lansbergen LMTE, Van Wagtenonk-De Leeuw AM.** A differential mechanism is involved during heparin- and cryopreservation-induced capacitation of bovine spermatozoa. *J Dairy Sci*, v.81, p.1714-1723, 1998.
- Didion BA, Dobrinski JR, Giles JR, Graves CN.** Staining procedure to detect viability and the true acrosome reaction in spermatozoa of various species. *Gamete Res*, v.22, p.51-57, 1989.
- Ducci M, Gazzano A, Villani C, Cela V, Artini PG, Martelli F, Genazzani AR.** Membrane integrity evaluation in rabbit spermatozoa. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, v.102, p.53-56, 2002.
- Eggert-Kruse W, Rohr G, Kerbel H, Schwalbach B, Demirakca T, Klinga K, Tilgen W, Runnebaum B.** The acridine orange test: a clinically relevant screening method for sperm quality during infertility investigation? *Hum Reprod*, v.11, p.784-789, 1996.
- Ellington JE, Evenson DP, Fleming JE, Brisbois RS, Hiss GA, Broder SJ, Wright RW Jr.** Coculture of human sperm with bovine oviduct epithelial cells decreases sperm chromatin structural changes seen during culture in media alone. *Fertil Steril*, v.69, p.643-649, 1998.
- Erenpreiss J, Spano M, Erenpreisa J, Bungum M, Giwercman A.** Sperm chromatin structure and male fertility: biological and clinical aspects. *Asian J Androl*, v.8, p.11-29, 2006.
- Ericsson SA, Garner DL, Redelman D, Ahmad K.** Assessment of the viability and fertilizing potential of cryopreserved bovine spermatozoa using dual fluorescent staining and two-flow cytometric systems. *Gamete Res*, v.22, p.355-368, 1989.
- Evenson DP, Darzynkiewicz Z, Melamed MR.** Relation of mammalian sperm chromatin heterogeneity to fertility. *Science*, v.210, p.1131-1133, 1980.
- Evenson DP, Jost L.** Sperm chromatin structure assay is useful for fertility assessment. *Methods Cell Sci*, v.22, p.169-189, 2000.
- Fazeli A, Hage WG, Cheng FP, Voorhout WF, Marks A, Bevers MM, Colenbrander B.** Acrosome intact boar spermatozoa initiate binding to the homologous zona pelucida in vitro. *Biol Reprod*, v.56, p.430-438, 1997.
- Fernandes CE, Dode MAN, Pereira D, Silva AEDF.** Effects of scrotal insulation in Nellore bulls (*BosTaurus indicus*) on seminal quality and its relationship with in vitro fertilizing ability. *Theriogenology*, v.70, p.1560-1568, 2008.
- 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.
- Flesch FM, Voorhout WF, Colenbrander B, Van Golde LMG, Gadella BM.** Use of lectins to characterize plasma membrane preparations from boar spermatozoa: A novel technique for monitoring membrane purity and quantity. *Biol Reprod*, v.59, p.1530-1539, 1998.
- Foote RH, Kaproth MT.** Sperm numbers inseminated in dairy cattle and nonreturn rates revisited. *J Dairy Sci*, v.80, p.3072-3076, 1997.
- Garner DL, Pinkel D, Johnson LA, Pace MM.** Assessment of spermatozoal function using dual fluorescent staining and flow cytometric analyses. *Biol Reprod*, v.34, p.127-138, 1986.
- Gillan L, Evans G, Maxwell WMC.** Flow cytometric evaluation of sperm parameters in relation to fertility potential. *Theriogenology*, v. 63, p. 445-457, 2005.



- Gillan L, Kroetsch T, Maxwell WMC, Evans G.** Assessment of *in vitro* sperm characteristics in relation to fertility in dairy bulls. *Anim Reprod Sci*, v.103, p.201-214, 2008.
- Graham JK.** Assessment of sperm quality. In: International Symposium on Stallion Reproduction, 3, 2001, Fort Collins, CO. Fort Collins, CO: Colorado State University, 2001. 88p.
- Graham JK.** Cryopreservation of stallion spermatozoa. *Vet Clin North Am Equine Pract*, v.12, p.131-147, 1996.
- Graham JK, Mocé E.** Fertility evaluation of frozen/thawed semen. *Theriogenology*, v.64, p.492-504, 2005.
- Hafez B, Hafez ESE. *Reprodução animal*. 7.ed. São Paulo: Manole, 2004. p.512.
- Hammerstedt RH, Graham JK, Nolan JP.** Cryopreservation of mammalian sperm: what we ask them to survive. *J Androl*, v.11, p.73-86, 1990.
- Harrison RAP, Vickers SE.** Use of fluorescent probes to assess membrane integrity in mammalian spermatozoa. *J Reprod Fertil*, v.88, p.343-352, 1990.
- Hollinshead FK, O'Brien JK, Maxwell WMC, Evans G.** Assessment of *in vitro* sperm characteristics after flow cytometric sorting of frozen-thawed bull spermatozoa. *Theriogenology*, v.62, p.958-968, 2004.
- Holt WV, North RD.** Effects of temperature and restoration of osmotic equilibrium during thawing on the induction of plasma membrane damage in cryopreserved ram spermatozoa. *Biol Reprod*, v.51, p.141-424, 1994.
- Holt WV.** Basic aspects of frozen storage of semen. *Anim Reprod Sci*, v.62, p.3-22, 2000.
- Hoshi K, Aita T, Yanagida K, Yoshimatus N, Sato A.** Variation in the cholesterol/phospholipid ratio in human spermatozoa and its relation with capacitation. *Hum Reprod*, v.5, p.71-74, 1990.
- Januskauskas A, Johannisson A, Rodriguez-Martinez H.** Assessment of sperm quality through fluorometry and sperm chromatin structure assay in relation to field fertility of frozen-thawed semen from swedish AI bulls. *Theriogenology*, v.55, p.947-981, 2001.
- 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 of semen characteristics to bull's fertility. *Vet Zootech*, v.17, n.39, p.1-8, 2002.
- Jeyendran RS, Van Der Ven HH, Perez-Pelaez M, Crabo BG, Zaneveld LJD.** Development of an assay to assess the functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to other semen characteristics. *J Reprod Fertil*, v.70, p.219-228, 1984.
- Kasimanickam R, Pelzer KD, Kasimanickam V, Swecker WS, Thatcher CD.** Association of classical semen parameters, sperm DNA fragmentation index, lipid peroxidation and antioxidant enzymatic activity of semen in ram-lambs. *Theriogenology*, v.65, p.1407-1421, 2006.
- Kastelic JP, Thundathil JC.** Breeding soundness evaluation and semen analysis for predicting bull fertility. *Reprod Domest Anim*, v.43, p.368-373, 2008.
- Khalifa TA, Rekkas CA, Lymberopoulos AG, Sioga A, Dimitriadis I, Papanikolaou T.** Factors affecting chromatin stability of bovine spermatozoa. *Anim Reprod Sci*, v.104, p.143-163, 2008.
- Kitiyant Y, Chaisalee B, Pavasuthipaisit K.** Evaluation of the acrosome reaction and viability in buffalo spermatozoa using two staining methods: the effects of heparin and calcium ionophore A23187. *Int J Androl*, v.25, p.215-222, 2002.
- Larsson B, Rodriguez-Martinez H.** Can we use *in vitro* fertilization tests to predict semen fertility? *Anim Reprod Sci*, v.60/61, p.327-336, 2000.
- Liu Z, Foote RH.** Bull sperm motility and membrane integrity in media varying in osmolality. *J Dairy Sci*, v.81, p.1868-1873, 1998.
- Lopes S, Jurisicova A, Sun JG, Casper RF.** Reactive oxygen species: potential cause for DNA fragmentation in human spermatozoa. *Hum Reprod*, v.13, p.896-900, 1998.
- Love CC.** The sperm chromatin structure assay: a review of clinical applications. *Anim Reprod Sci*, v.89, p.39-45, 2005.
- Lymberopoulos AG, Khalifa TA.** Sperm chromatin stability during *in vitro* manipulation of beef bull semen. *Reprod. Domest. Anim.*, v.45, p.307-314, 2010.
- Machado ER, Kamimura CF, Beletti ME, Jacomini JO.** Diagnóstico de alterações na compactação da cromatina em espermatozoides de suíno através de azul de toluidina e alaranjado de acridina. *Rev Bras Reprod Anim*, v.27, p.381-382, 2003.
- Madrid-Bury N, Pérez-Gutiérrez F, 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.
- Magargee SF, Kunze E, Hammerstedt RH.** Changes in lectin-binding features of ram sperm surfaces associated with epididymal maturation and ejaculation. *Biol Reprod*, v.38, p.667-685, 1988.
- Manual** para exame andrológico e avaliação de sêmen animal. 2.ed. Belo Horizonte: CBRA, 1998. p.65 (Elaborado conforme Convênio CBRA/MA No. 021/1997).
- Martins CF, Dode MN, Baó SN, Rumpf R.** The use of acridine orange test and TUNEL assay to assess DNA



- integrity of bovine freeze-dried spermatozoa. *Genet Mol Res*, v.6, p.94-104, 2007.
- Medeiros CMO, Forell F, Oliveira ATD, Rodrigues JL.** Current status of sperm cryopreservation: why isn't it better? *Theriogenology*, v.57, p.327-344, 2002.
- Mello MLS.** Induced metachromasia in bull spermatozoa. *Histochemistry*, v.74, p.387-392, 1982.
- Miller DJ, Winer MA, Ax RL.** Heparin-binding proteins from seminal plasma bind to bovine spermatozoa and modulate capacitation by heparin. *Biol Reprod*, v.42, p.899-915, 1990.
- Muñoz R, Tamargo C, Hidalgo CO, Pena AI.** Identification of sperm subpopulations with defined motility characteristics in ejaculates from Holstein bulls: effects of cryopreservation and between-bull variation. *Anim Reprod Sci*, v.109, p.27-39, 2008.
- Nagy S, Hallap T, Johannisson A, Rodriguez-Martinez H.** Changes in plasma membrane and acrosome integrity of frozen-thawed bovine spermatozoa during a 4 h incubation as measured by multicolor flow cytometry. *Anim Reprod Sci*, v.80, p.225-235, 2004.
- Nagy S, Jansen J, Topper EK, Gadella BM.** A triple-stain flow cytometric method to assess plasma- and acrosome-membrane integrity of cryopreserved bovine sperm immediately after thawing in presence of egg-yolk particles. *Biol Reprod*, v.68, p.1828-1835, 2003.
- Naves CS, Beletti ME, Duarte MB, Vieira RC, Diniz EG, Jacomini JO.** Avaliação da cromatina espermática em eqüinos com azul de toluidina e acridine orange. *Biosci J*, v.20, p.117-124, 2004.
- Nelson KY, Lehninger AL, Cox MM.** *Princípios de bioquímica*. 4.ed. São Paulo: Sarvier, 2009. 1202p.
- Parkinson TJ.** Evaluation of fertility and infertility in natural service bulls. *Vet J*, v.168, p.215-229, 2004.
- Phillips NJ, McGowan MR, Johnston SD, Mayer DG.** Relationship between thirty post-thaw spermatozoal characteristics and the field fertility of 11 high-use australian dairy AI sires. *Anim Reprod Sci*, v.81, p.47-61, 2004.
- Pickett BW.** Principles of cryopreservation. In: *Techniques for freezing mammalian embryos*, Fort Collins: Colorado State University, 1986. p.1-5.
- Pickett BW, Amann RP.** Cryopreservation of semen. In: Mckinnon AD, Voss SL. (Ed.). *Equine reproduction*. Malvern: Lea & Febiger, 1993, p.769-789.
- Pintado B, De La Fuente J, Roldan ERS.** Permeability, of boar and bull spermatozoa to the nucleic acid stains propidium iodide or Hoechst 33258, or to eosin: accuracy in the assessment of cell viability. *J Reprod Fertil*, v.118, p.145-152, 2000.
- Polge C, Smith AU, Parkes AS.** Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures. *Nature*, v.164, p.666, 1949.
- Prathalingam NS, Holt WV, Revell SG, Mirczuk S, Fleck RA, Watson PF.** Impact of antifreeze proteins and antifreeze glycoproteins on bovine sperm during freeze-thaw. *Theriogenology*, v.66, p.1894-1900, 2006.
- Risopatrón J, Sánchez R, Sepúlveda N, Peña P, Villagran E, Miska W.** Migration/sedimentation sperm selection method used in bovine in vitro fertilization: comparison with washing/centrifugation. *Theriogenology*, v.46, p.65-73, 1996.
- Rodriguez-Martinez H.** Evaluation of frozen semen: traditional and new approaches. In: Chenoweth PJ. Topics in bull fertility, 2000. Disponível em: <http://www.ivos.org>. Acesso em: 15 fev. 2006.
- Rodriguez-Martinez H.** Methods for sperm evaluation and their relationship to fertility. In: Congresso Brasileiro de Reprodução Animal, 16, 2005, Goiânia, GO. *Anais...* Belo Horizonte, MG: CBRA, 2005. CD-ROM.
- Rota A, Penzo N, Vicenti L, Mantovani R.** Hypoosmotic swelling (HOS) as a screening assay of testing in vitro fertility of bovine spermatozoa. *Theriogenology*, v.53, p.1415-1420, 2000.
- Sidhu KS, Guraya SS.** Cellular and molecular biology of capacitation and acrosome reaction in mammalian spermatozoa. *Int Rev Citol*, v.118, p.231-269, 1989.
- Sirivaidyapong S, Cheng FP, Marks A, Voorhout WF, Bevers MM, Colenbrander B.** Effect of sperm diluents on the acrosome reaction in canine sperm. *Theriogenology*, v.53, p.789-802, 2000.
- Squires EI, Pickett BW, Graham JK, Vanderwall DK, McCue PM, Bruemmer JE.** Cooled and frozen stallion semen. *Anim Reprod Biotechnol Lab Colorado State Univ Bull*, n.9, p.1-47, 1999.
- Stryer L, Tymoczko JL, Berg JM.** *Bioquímica*. 5.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. 1059p.
- Suttiyotin P, Thwaites CJ.** Effect of storage of smears on the staining of ram spermatozoa by eosin or trypan blue. *Aust Vet J*, v.71, p.87, 1994.
- Suttiyotin P, Thwaites CJ.** The ability of trypan blue to differentiate live and dead ram spermatozoa. *Anim Reprod Sci*, v.25, p.209-224, 1991.
- Suzuki K, Geshi M, Yamaguchi N, Nagai T.** Functional changes and motility characteristics of japanese black bull spermatozoa separated by percoll. *Anim Reprod Sci*, v.77, p.157-172, 2003.
- Swanson EW, Bearden HJ.** An eosin/nigrosin stain for differentiating live and dead spermatozoa. *J Anim Sci*, v.10, p.981-987, 1951.
- Talbot P, Chacon RS.** A triple-stain technique for evaluating normal acrosome reactions of human sperm. *J Exp Zool*, v.215, p.201-208, 1981.



- Tanghe S, Van Soom A, Sterckx V, Maes D, Kruif A.** Assessment of different sperm quality parameters to predict *in vitro* fertility of bulls. *Reprod Domest Anim*, v.37, p.127-132, 2002.
- 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.
- Tejada RI, Mitchell JC, Norman A, Marik JJ, Friedman S.** A test for the practical evaluation of male fertility by acridine orange (AO) fluorescence. *Fertil Steril*, v.42, p.87-91, 1984.
- Therien I, Bleau G, Manjunath P.** Phosphatidylcholine-binding proteins of bovine seminal plasma modulate capacitation of spermatozoa by heparin. *Biol Reprod*, v.52, p.1372-1379, 1995.
- Thundathil J, Palasz AT, Barth AD, Maplettoft RJ.** Plasma membrane and acrosomal integrity in bovine spermatozoa with the knobbed acrosome defect. *Theriogenology*, v.58, p.87-102, 2002.
- Tsakmakidis IA, Lymberopoulos AG, Khalifa TA.** Relationship between sperm quality traits and field-fertility of porcine semen. *J. Vet. Sci.*, v.11, p.151-154, 2010.
- Unanian MM.** Integridade da cromatina: método complementar para avaliação da qualidade do sêmen bovino. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2000, p.21 (Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Documentos, 56).
- Visconti PE, Galantinohomer H, Moore GD, Bailey JL, Ning X, Fornes M, Kopf GS.** The molecular basis of sperm capacitation. *J Androl*, v.19, p.242-248, 1998.
- Watson PF.** Recent development and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function. *Reprod Fertil Dev*, v.7, p.871-891, 1995.
- Watson PF.** The causes of reduced fertility with criopreserved semen. *Anim Reprod Sci*, v.60, p.481-492, 2000.
- Way AL, Henault MA, Killian GJ.** Comparison of four staining methods for evaluating acrosome status and viability of ejaculated and cauda epididymal bull spermatozoa. *Theriogenology*, v.43, p.1301-1316, 1995.
- Whitfield CH, Parkinson TJ.** Assessment of the fertilizing potential of frozen bovine spermatozoa by *in vitro* induction of acrosome reaction with calcium ionophore (A 23187). *Theriogenology*, v.44, p.413-422, 1995.
- Yagci A, Murk W, Stronk J, Huszar G.** Spermatozoa bound to solid state hyaluronic acid show chromatin structure with high DNA chain integrity: an acridine orange fluorescence study. *J Androl*, 2010, doi:10.2164/jandrol.109.008912.
- Yanagimachi R.** Mammalian fertilization. In: Knobil E, Neill J. (Ed.): *The physiology of reproduction*. 2.ed. New York: Raven Press, 1994. p.189-317.
-