

Métodos de avaliação da morfologia e função espermática: momento atual e desafios futuros

Methods of the assessment of morphology and function of sperm: actual moment and future challenges

**R.P. Arruda¹, E.C.C. Celeghini, M.A. Alonso, H.F. Carvalho, L.Z. Oliveira, J. Nascimento,
D.F. Silva, F.J. Affonso, K.M Lemes, J.D. Jaimes**

¹Centro de Biotecnologia em Reprodução Animal, Laboratório de Biotecnologia do Sêmen e Andrologia, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo (USP), Pirassununga, SP, Brasil.

¹Autor para correspondência: arrudarp@usp.br

Resumo

Com o propósito de obter resultados que demonstrem maior repetibilidade na avaliação da morfologia tanto quanto na função espermática, diversas técnicas laboratoriais tem sido desenvolvidas. Surgiram sistemas que utilizam a análise computadorizada de imagens, métodos de “coloração” empregando corantes fluorescentes (sondas fluorescentes) em microscopia de epifluorescência ou citometria de fluxo, que aumentaram a possibilidade de uma análise mais criteriosa da integridade estrutural dos espermatozoides. Os autores descrevem experiências, por mais de uma década, com a utilização destas biotécnicas, fazendo uma análise crítica, bem como apontando os desafios futuros, inclusive na área de biologia molecular espermática.

Palavras chave: espermatozoide, morfologia, CASA, sondas fluorescentes.

Abstract

In order to obtain results showing greater repeatability in morphology and sperm function assessment, several laboratorial techniques have been developed continuously. Systems that utilize computerized image analysis, staining methods using fluorescent dyes (fluorescent probes) in epifluorescence microscopy or flow cytometry, that allowed a more judicious evaluation of sperm structure integrity arose. Authors describe experiences, over a decade, with the use of these biotechniques, critically analyzing and pointing out future challenges, including the field of sperm molecular biology.

Keywords: CASA, fluorescent probes morphology, sperm.

Introdução

Não restam dúvidas que a monta natural é o método mais seguro para mensurar a fertilidade do sêmen, por meio da taxa de prenhez ou taxa de não retorno ao estro, mas esse processo é demorado e tem custo elevado (Larsson e Rodriguez-Martinez, 2000; Arruda et al., 2010b). Neste sentido, desde o início do século, cientistas têm procurado intensamente desenvolver ensaios laboratoriais que predigam acuradamente a fertilidade do sêmen. No entanto, tais metas têm sido de difícil obtenção, uma vez que a maior parte dos problemas reside nos diferentes atributos que o espermatozoide deve possuir para fertilizar o ovócito, e em como a fertilização é definida. Infelizmente, nenhum teste isolado é capaz de prever a fertilidade de uma amostra de sêmen, mas o exame de várias características pode determinar uma maior fertilidade potencial (Arruda, 2000; Arruda et al., 2004, 2005, 2006a, b).

No momento da monta, o macho deposita bilhões de espermatozoides no fundo da vagina da fêmea. Na inseminação artificial (IA), o sêmen é depositado diretamente no útero, ultrapassando a cérvix e permitindo o uso de um número reduzido de espermatozoides. Após a IA, o sêmen é exposto a uma série de ambientes distintos que alteram significativamente o número e a função espermática. Muitos espermatozoides são perdidos no trato genital pelo movimento retrógrado (Saake et al., 1995; Sartori, 2004). Espermatozoides depositados no trato genital da fêmea devem atravessar o útero, passar para o oviduto, pela junção útero-tubárica, interagir com o epitélio do oviduto e fertilizar o ovócito (Berger, 1996; Sartori, 2004). Para que o espermatozoide seja considerado qualitativamente viável e potencialmente fértil é necessário que possua morfologia, atividade metabólica e membranas plasmáticas normais. A presença de membranas íntegras é pré-requisito para que os eventos relacionados ao processo de fertilização, como a capacitação espermática, penetração nos revestimentos do ovócito, ligação à zona pelúcida e fusão com o oolema possam ocorrer (Yanagimachi, 1994; Rodriguez-Martinez et al., 1997; Arruda et al., 2004, 2006b).

A motilidade, a concentração e a morfologia espermáticas são características avaliadas classicamente nas amostras de sêmen. Usualmente, a motilidade espermática é estimada em análise do sêmen entre lâmina e

lamínula, enquanto as anormalidades espermáticas são avaliadas em esfregaços corados. Ambas as técnicas são realizadas sob uso de microscopia óptica. Entretanto, estudos reportam que este tipo de análise é imprecisa, mesmo quando executada por investigadores experientes, as análises são influenciadas por uma alta variação entre observações e observadores. Esta imprecisão deriva, em parte, da natureza subjetiva dos testes usados, da variabilidade entre técnicos e das diferenças na implementação de padrões para a avaliação (Arruda, 2000; Arruda et al., 2004, 2005, 2006b, Celeghini, 2005).

Com o propósito de obter técnicas que demonstre maior repetibilidade tanto para avaliar a morfologia quanto a função espermática, diversos sistemas que utilizam a análise computadorizada de imagens têm sido desenvolvidos e empregados nos últimos anos (Arruda, 2000; Celeghini, 2005; Matos et al., 2008; Celeghini et al., 2010a). Os programas computadorizados para a avaliação espermática procuram ser mais objetivos e imprimir maior repetibilidade às avaliações do que a habilidade humana em identificar padrões de motilidade ou de normalidade espermáticas (Arruda, 2000; Arruda et al., 2002; Matos et al., 2008). Por outro lado, para que a inseminação artificial possa apresentar melhores resultados, é necessário um estudo mais amplo sobre os vários aspectos relacionados à fisiologia da célula espermática e à melhoria dos testes aplicados para analisar a viabilidade dos espermatozoides submetidos à refrigeração, congelação e descongelação, uma vez que os danos ocasionados pela criopreservação causam prejuízos das funções celulares, resultando em redução da fertilidade. Assim, técnicas de marcações específicas para os diversos compartimentos do espermatozoide têm sido desenvolvidas (Andrade et al., 2007; Celeghini et al., 2007a, b, 2010a, b). Os métodos de “coloração” empregando corantes fluorescentes (sondas fluorescentes ou fluorocromos) aumentaram a possibilidade de uma análise mais criteriosa da integridade estrutural dos espermatozoides. As sondas fluorescentes vêm sendo utilizados isoladamente ou em combinação para determinar a integridade e a função celular.

Embora o uso de sondas fluorescentes por meio de microscopia venha sendo um método para a avaliação espermática, o número de espermatozoides normalmente examinados por análise não excede 200. A citometria de fluxo surge como uma técnica vantajosa sobre as outras clássicas para a avaliação da viabilidade e integridade espermática, uma vez que este sistema automatizado tem a capacidade de examinar em torno de 30.000 espermatozoides em menos de um minuto, permitindo maior exatidão nos resultados e diminuição no tempo de preparação requerido em outras técnicas fluorescentes (Arruda, 2000).

Nos últimos anos várias revisões de literatura referentes às técnicas de avaliações espermáticas foram publicadas aqui no Brasil (Arruda, 2000; Arruda et al., 2004, 2005, 2006b, 2007, 2010b; Freitas-Dell’Aqua et al., 2009; Batista e Guerra, 2010). Nossos estudos e experiências, utilizando análises computadorizadas da motilidade e da morfologia, bem como, com sondas fluorescentes por meio de microscopia de epifluorescência ou citometria de fluxo, iniciaram-se no ano de 1998 na Universidade da Califórnia-Davis, USA. Então, desde o ano de 2000, mais de uma década, no Laboratório de Biotecnologia do Sêmen e Andrologia, do Departamento de Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de São Paulo (FMVZ-USP), localizado em Pirassununga, SP, estamos procurando desenvolver técnicas que possam avaliar o potencial de fertilidade do sêmen.

Neste sentido, temos observado uma verdadeira “corrida” das universidades e dos centros de pesquisas, no intuito de equipar seus laboratórios com técnicas que apresentam maior objetividade às análises. Outro aspecto é a necessidade de tais técnicas para que possa auxiliar em publicações de artigos científicos em revistas de elevada política editorial, uma vez que, sem a utilização destas “ferramentas” se torna quase que impossível suas publicações.

Avaliação da motilidade espermática por técnicas microscópicas ou computadorizadas

A motilidade espermática é estimada de forma subjetiva, sendo analisada sob microscopia óptica, com uma gota do sêmen entre lâmina e lamínula, estimando-se sua porcentagem visualmente. No entanto, é a técnica mais utilizada na rotina laboratorial e continua tendo grande valor, principalmente para diferenciar sêmen de baixa e alta qualidade.

A avaliação automatizada da motilidade dos espermatozoides é importante devido ao fato da cinética espermática ter relevância na determinação do potencial de fertilidade dos espermatozoides (Arruda, 2000; Verstegen et al., 2002, Matos et al., 2008).

Em 1992, surgiu o HTM-IVOS Sperm Analyzer®, um sistema integrado de computador e microscópio que permitia a aquisição de imagens digitalizadas, fornecendo classificação automática dos movimentos espermáticos, informando porcentagem de móveis, média de velocidade e porcentagem de progressivos (Iguer-Ouada e Verstegen, 2001). Diversos sistemas de análises computadorizadas da motilidade espermática (Computer Assisted Sperm Analyses - CASA) têm sido propostos e aplicados na tentativa de minimizar os efeitos da avaliação convencional do sêmen, além de incrementar o estudo da andrologia humana e das espécies animais (Malmgren, 1997; Tardif et al., 1997; Verstegen et al., 2002; Amann e Katz, 2004; Matos et al., 2008). Segundo Amann e Katz (2004), CASA refere-se a um sistema automatizado (*Hardware e Software*) para visualizar e digitalizar imagens sucessivas dos espermatozoides, processando, analisando e fornecendo informações acuradas, precisas e significativas da cinética individual das células, e também valores estatísticos

médios sumarizados da população global. Os espermatozóides móveis observados são posteriormente identificados em imagens sucessivas, que permitem estabelecer suas trajetórias. Finalmente as trajetórias obtidas são matematicamente processadas permitindo a definição dessas trajetórias de forma numérica. Os resultados desses processamentos são refletidos em uma série de parâmetros que definem precisamente o exato movimento de cada espermatozóide.

Os equipamentos utilizados no sistema CASA variam largamente entre as máquinas, ópticas e *software* usados na identificação espermática e reconstrução de sua trajetória (Verstegen et al., 2002). Atualmente vários sistemas de análises computadorizadas das células espermáticas (CASA) estão disponíveis comercialmente, como: Hamilton Thorn (Hamilton Thorn Research, Beverly, USA); IMAGESP® (Vimas IMAGESP®, Barcelona, Espanha); Hobson Sperm Tracker (Hobson Tracking Systems Ltda., Sheffield, Inglaterra) e Sperm Class Analyzer® (Microptic SL, Barcelona, Espanha), SM-CMATM (MTM Medical Technologies, Montreux, Switzerland), QualiSpermTM, 1.3 (Biophos, Pfäffikon, Switzerland), entre outros. Os parâmetros gerados da motilidade espermática pelo sistema são: Motilidade Total (%), referente à população de células que estão se movendo com uma velocidade mínima determinada no *setup*, sendo a proporção de células móveis do total; Motilidade Progressiva (%), refere à porcentagem de células movendo-se progressivamente; Velocidade de Trajeto (VAP, $\mu\text{m/s}$), é a velocidade média ininterrupta do trajeto da célula; Velocidade Progressiva (VSL, $\mu\text{m/s}$), é a velocidade média percorrida em linha reta entre os pontos inicial e final do trajeto; Velocidade Curvilinear (VCL, $\mu\text{m/s}$), que é a velocidade média mensurada de ponto a ponto do trajeto percorrido pela célula; Amplitude do Deslocamento Lateral da Cabeça (ALH, μm), é a largura média da oscilação da cabeça conforme a célula se move; Frequência de Batimentos (BCF, Hz), é a frequência com que a cabeça do espermatozóide move-se para trás e para frente durante um trajeto percorrido; Retilinearidade (STR, %), é o valor médio da proporção entre VSL/VAP; Linearidade (LIN, %), é o valor médio da proporção entre VSL/VCL; e Velocidade Rápida (%; Arruda, 2000).

Ainda não está bem claro qual das características do movimento espermático determinada pelo sistema CASA é capaz de prever a fertilidade ou a taxa de fertilização (Ferreira et al., 1997). Apesar da grande controvérsia existente a respeito da correlação dos padrões de movimento espermático com os índices de fertilidade *in vivo*, são observadas diferenças significativas no padrão de movimento desempenhado por espermatozóides que alcançam altas e baixas taxas de fertilização (Verstegen et al., 2002). Nesse sentido, algumas variáveis geradas pela técnica CASA, como a linearidade espermática, parecem apresentar maior correlação com fertilidade (Zhang et al., 1999; Matos et al., 2008). Ainda, a associação de múltiplas variáveis de movimento geradas pela técnica CASA mostra maior correlação com fertilidade *in vivo* em relação à utilização de apenas uma característica de movimento (Farrel et al., 1996).

O grande desafio para se trabalhar com o sistema CASA será padronizar os procedimentos laboratoriais adotados para a análise objetiva do sêmen. Manter a concentração espermática (25 a 50×10^6 espermatozóides/ml), no momento da avaliação, se torna tarefa difícil, principalmente para algumas amostras do sêmen *in natura*. A diluição da amostra com meios que não interfiram nas avaliações causando diminuição da motilidade (tampão fosfato PBS e meio *Talp* e outros), por depressão do sistema gerador de ATP da célula, ou por formação de debris (por exemplo: diluentes contendo gema de ovo). Quando existem partículas no meio (sêmen), do tamanho da cabeça dos espermatozóides, o sistema reconhece como uma célula imóvel, alterando, com isso, a motilidade. Com o uso da ferramenta IDENT contida em alguns aparelhos é possível reduzir erros de contagem do sistema para menos de 2%. O sistema IDENT baseia-se no uso de sonda fluorescente (Hoeschst 33342) para fazer a contagem dos espermatozóides, identificando somente os espermatozóides que estão emitindo uma quantidade previamente padronizada de absorvância; esta quantidade emitida é obtida pelo uso de uma sonda fluorescente específica para o DNA, desta forma só são contadas as células com DNA corado.

Avaliação da morfologia espermática por técnicas microscópicas ou computadorizadas

De forma geral, as características morfológicas espermáticas são analisadas usualmente utilizando-se esfregaços corados (corantes: Wright, Rosa de Bengala, Giemsa e eosina-nigrosina, Karras e outros) ou a técnica da câmara úmida. Como o espermatozóide é uma célula translúcida sua visualização sob microscopia óptica comum não é muito nítida para avaliação do contorno celular, por isso, quando se dispõe somente de microscopia óptica comum deve-se fazer uso da técnica de esfregaço corado. A técnica da câmara úmida, na qual os espermatozóides não são corados, deve ser realizada utilizando-se microscopia capaz de destacar os contornos celulares, como microscopia de contraste de fase ou microscopia de contraste de interferência diferencial, DIC (Manual..., 1998; Johnson et al., 1997; Celeghini, 2005).

A alta frequência de espermatozóides morfológicamente anormais ou a alta incidência de um único defeito podem reduzir a fertilidade; em nossa opinião e, também, baseando-se em literatura, alteração morfológica é uma das características que mais se correlaciona com fertilidade. As anormalidades morfológicas são classificadas de diversas formas, sendo que algumas classificações dividem as alterações de acordo com a região da célula onde a mesma ocorreu como: cabeça, peça intermediária ou cauda. Outras simplesmente dividem os defeitos em primários e secundários, ou defeitos maiores e menores (Howard e Pace, 1988;

Manual..., 1998). Embora esta técnica apresente grande validade, ela não é capaz mensurar a funcionalidade na célula espermática.

As avaliações da morfometria espermática pelo sistema computadorizado (Automated Sperm Morphometry Analyses - ASMA) são realizadas, normalmente, por esfregaços corados, em aumento de 1.000 vezes. As imagens destinadas à avaliação da morfometria da cabeça dos espermatozoides são avaliadas pelo *software* Metrix (Hamilton Thorne Research, Beverly, MA, USA), instalado no aparelho Hamilton Thorne Research Motility Analyser (Arruda, 2000; Hirai et al., 2001; Arruda et al., 2002). Esta análise tem sido aplicada em várias espécies incluindo a bovina (Gravance et al., 1996), caprina (Gravance et al., 1995), ovina (Gravance et al., 1998), humana (Davis e Katz, 1993) e equina (Arruda et al., 2002).

Esses sistemas são programados para classificar objetos e diferenciar imagens das células espermáticas do detrito seminal e/ou superposição de células, medindo parâmetros como diâmetro máximo, diâmetro mínimo, área da cabeça, porcentagem de acrossomo (obtido dividindo área do acrossomo pela área da cabeça) e fator de elipse (obtido dividindo-se o diâmetro mínimo da cabeça pelo máximo), que são utilizados para classificar as células segundo sua forma em: normal (formato de cabeça regular), afilada, redonda, macro, micro ou amorfo (cabeça irregular).

Mesmo sendo uma avaliação objetiva, o sistema ASMA apresenta variação nos resultados entre 11 e 23%, o que pode ser atribuída a fatores como preparação da amostra incluindo técnica de fixação e técnica de coloração, bem como fatores como correta iluminação, foco, aumento, sistema de classificação, interpretação e experiência do profissional (Hirai et al., 2001; Versteegen et al., 2002).

Avaliação da função espermática pelo teste hiposmótico

As membranas biológicas são as responsáveis pela homeostase celular, através de suas trocas com o meio externo (Jeyedran et al., 1984; Vazquez et al., 1997; Dell'Aqua et al., 2002). Uma das propriedades da membrana celular é a habilidade de permitir o transporte seletivo de moléculas, principalmente aquelas com baixo peso molecular (Takahashi et al., 1990, Revell e Mrode, 1994). Quando colocada em uma solução hiposmótica, a água entra no espermatozoide na tentativa de se alcançar o equilíbrio osmótico (Jeyedran et al., 1984). O influxo de água irá aumentar o volume espermático e a membrana plasmática provocando uma turgidez, diminuindo a razão volume/superfície. O flagelo do espermatozoide, por apresentar uma membrana mais frágil do que a presente na região da cabeça, parece ser suscetível a estas condições de teste hiposmótico (Jeyedran et al., 1984; Vazquez et al., 1997). Esta capacidade do flagelo de se dobrar na presença de uma solução hiposmótica indica que o transporte de água através da membrana ocorre normalmente e que esta se encontra íntegra e com funcionalidade (Fuse et al., 1993). Em nossa opinião o hiposmótico é um teste simples, prático e confiável; nós utilizamos como rotina em nosso laboratório.

Avaliação da função espermática por sondas fluorescentes (microscopia ou citometria de fluxo)

Recentes avanços nas biotécnicas aplicadas à andrologia têm fornecido novos meios de se avaliar a capacidade funcional de espermatozoides em várias espécies (Garner e Johnson, 1995). Dessa forma, a funcionalidade de organelas dos espermatozoides ou seus compartimentos têm sido monitorados por procedimentos específicos de coloração, tecnicamente conhecidos como *sondas fluorescentes*. Estas sondas possuem a capacidade de se ligar a pontos específicos das células, diferindo assim dos corantes, permitindo um diagnóstico mais fácil e direto, na dependência de suas características físicas. Atualmente uma variedade muito grande de sondas fluorescentes tem sido usadas isoladamente ou em associações em andrologia; pois a combinação de várias sondas fluorescentes possibilita a avaliação de diversos compartimentos espermáticos simultaneamente. Portanto, com o uso de sondas fluorescentes em microscopia de epifluorescência, ou citometria de fluxo, podemos avaliar: a integridade de membranas plasmática e acrossomal, o potencial mitocondrial, a translocação de fosfolípidios de membrana, o índice de caspase-ativada, o índice de fragmentação de DNA, a integridade do flagelo, a peroxidação lipídica, fosforilação da tirosina, reação acrossomica, entre outros (Arruda et al., 2003, 2008, 2010a; Gardes et al., 2010).

Em nosso laboratório temos obtido resultados promissores na associação de sondas fluorescentes para diferentes espécies (Andrade et al., 2007; Celeghini et al., 2007a, b, 2010a, b), nas quais foi possível uma visualização fácil das estruturas coradas e repetibilidade dos resultados, todavia, estas técnicas foram validadas utilizando-se sêmen fresco. Quando estas associações foram realizadas com sêmen criopreservado foram necessárias alterações nos protocolos utilizados (Celeghini et al., 2008; Nascimento et al., 2008), mas nem sempre estas alterações foram suficientes para manter o padrão de emissão de fluorescência, sendo que algumas vezes, dependendo da constituição do diluidor utilizado, não foi possível realizar a leitura das amostras. Provavelmente, ocorre uma interação entre os componentes dos meios de diluição do sêmen e as sondas fluorescentes, que mascara a emissão da fluorescência de determinadas sondas e impede a leitura, seja por microscopia de epifluorescência ou por citometria de fluxo. Podemos aferir, por testes laboratoriais realizados, que se as amostras de sêmen congelado, cujas análises apresentaram fluorescência fora do padrão, quando

submetidas à centrifugação para a remoção do diluidor e então coradas com a associação de sondas fluorescentes, a leitura se tornou possível dentro do padrão esperado. Contudo, a centrifugação do sêmen pode causar lesões nas células, as quais podem gerar dúvidas no resultado sobre o status real da amostra de sêmen.

Outras limitações que devem ser consideradas para o uso de sondas fluorescentes é a necessidade de equipamentos de custo mais alto como um microscópio de epifluorescência ou um citômetro de fluxo. As sondas fluorescentes não são produzidas aqui no Brasil, sendo assim, para seu uso ficamos na dependência de importação, o que na maioria das vezes é um trâmite demorado. Caberia a reflexão sobre a importância de se estudar a possibilidade de se produzir estas sondas em território nacional, visto o grande potencial de nossos pesquisadores e os benefícios que teríamos para sua utilização tanto na pesquisa como de uso rotineiro.

Entretanto, deve-se destacar a praticidade de execução desta técnica e a facilidade de treinamento de pessoal para a leitura.

Tem-se, portanto, que os avanços nos testes laboratoriais têm tido grande utilidade para excluir amostras de sêmen de animais com baixo potencial fecundante, no entanto, fica como grande desafio apontar, dentre os animais férteis, quais os mais aptos a proporcionar as maiores taxas de prenhez (Arruda et al., 2010b).

Nossa equipe vem trabalhando com o intuito de relacionar a avaliação do sêmen por sondas fluorescentes com a fertilidade a campo. Em nosso último experimento foram comparadas as taxas de prenhez de fêmeas bovinas submetidas a inseminação artificial com três partidas de sêmen de um mesmo touro, as quais foram avaliadas e apresentaram percentuais diferentes de células com membrana plasmática íntegra, acrosoma íntegro e com potencial mitocondrial (PIAIC) por associações de sondas fluorescentes, apesar de estarem dentro dos padrões preconizados para comercialização. A taxa de prenhez foi mais baixa ($P < 0,05$) no grupo de vacas inseminadas com o sêmen apresentando 8,5% de espermatozoides PIAIC do que as inseminadas com partidas apresentando 23,0 e 44,5% de espermatozoides PIAIC (dados não publicados). Ainda faltam mais pesquisas para confirmar os resultados e para uma provável definição do que seria o “ponto de corte” de percentual destas células numa palheta de sêmen para garantir uma prenhez.

Momento atual e perspectivas futuras no estudo da biologia molecular da célula espermática

Grandes avanços nas técnicas biomoleculares, bem como na sensibilidade e na precisão dos espectrômetros de massa, estão transformando a paisagem científica através dos progressos que estão sendo obtidos no campo da bioquímica analítica – a chamada revolução “ômica”. Esta revolução nos remete para o estudo dos genes (genômica), das transcrições (transcriptômica), das proteínas (proteômica) e dos seus metabólitos (metabolômica). Desta forma, atualmente é possível analisar os estoques de lipídios, proteínas, metabólitos e de espécies de RNA em populações de células purificadas e ainda, determinar a relação destes componentes com a função celular (Aitken e Henkel, 2011; Baker, 2011).

O inventário da lista de proteínas que está sendo gerado tem revelado proteínas transmembranas, proteínas quinases e carreadores protéicos nunca antes reconhecidos. A observação de que o espermatozoide produz novas proteínas através dos ribossomos mitocondriais tem sido demonstrado em diversas espécies (Premkumar e Bhargava, 1972; Gur e Breitbart, 2006). Assim, no presente momento, não se questiona mais se a mitocôndria espermática produz novas proteínas, mas sim quais novas proteínas estão sendo produzidas e como essas novas proteínas são utilizadas pelas células. Portanto, embora a criação de listas proteômicas nos forneça um “inventário” de proteínas presentes dentro da célula espermática, funcionalmente ainda é difícil determinar quais destas proteínas são, por exemplo, modificadas durante o trânsito epididimário para permitir a ligação espermatozoide-ovócito, ou iniciar a motilidade espermática (Baker, 2011).

Dentre as inúmeras informações que estão surgindo nessas áreas referentes a biologia molecular espermática, a vantagem de uma perspectiva global da proteômica quantitativa, é que o método é imparcial e capaz de gerar grandes quantidades de dados significativos em um período de tempo relativamente curto. A integração dos perfis das “ômicas” de espermatozoides pode ser a chave para a compreensão dos mecanismos moleculares que regulam a sua biologia. O desenvolvimento destas novas e poderosas ferramentas analíticas que incluem o seqüenciamento de DNA, os microarranjos de DNA, a espectrometria de massa e o estudo de matrizes de proteína nos permite acreditar que nos próximos anos iremos aprender mais sobre a biologia das células espermáticas do que temos aprendido nos últimos 50 anos (Aitken e Henkel, 2011; Baker, 2011)

Referências bibliográficas

- Aitken RJ, Henkel RR. Sperm cell biology: current perspectives and future Prospects. *Asian J Androl*, v.13, p.3-5, 2011.
- 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.
- Amann R, Katz DF. Reflections on CASA after 25 years. *J Androl*, v.25, p.317-325, 2004.
- Andrade AFC, Zaffalon FG, Merighe GKF, Nascimento J, Tarragó OFB, Meirelles FV, Arruda RP. Relation between tyrosine phosphorylation of the equine sperm surface proteins and acrosome reaction. *Anim*

Reprod Sci, v.107, p.304-305, 2008.

Arruda RP. *Avaliação dos efeitos de diluidores e crioprotetores para o espermatozóide equino pelo uso de microscopia de epifluorescência, citometria de fluxo, análises computadorizadas da motilidade (CASA) e da morfometria (ASMA).* 2000. 121f. Tese (Livre Docência) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, 2000.

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.

Arruda RP, Ball BA, Gravance CG, Liu IKM. Determinação da integridade da membrana plasmática e acrossomal de espermatozoides de garanhões pela técnica de citometria de fluxo. *Acta Sci Vet*, v.31, supl., p.226-227, 2003.

Arruda RP, Celeghini ECC, Andrade AFC, Garcia AR, Nascimento J, Raphael CF, Souza LWO. Importância da qualidade do sêmen em programas de IATF e TETF. In: Simpósio Internacional de Reprodução Animal Aplicada, 1, 2004, Londrina, PR. Londrina: [s.n.], 2004. v.1, p. 166-179,

Arruda RP, Celeghini ECC; Souza LWO, Nascimento J, Andrade AFC, Raphael CF, Garcia AR. Importance of semen quality in fixed-time artificial insemination and embryo transfer program. *Acta Sci Vet*, v.33, p.145-150, 2005.

Arruda RP, Celeghini ECC, Andrade AFC, Raphael CF, Nascimento J, Peres KR. Biotécnicas Aplicadas a la Evaluación de Sêmen Criopreservado Bovino. In: Seminário Internacional de Reproducción en Grandes Animales, 5, Bogotá, Colômbia. Bogotá: [s.n.], 2006a.

Arruda RP, Celeghini ECC, Andrade AFC, Raphael CF, Peres KR, Neves LC. Influência da qualidade do sêmen nos resultados de prenhez em programas de IATF e TETF. In: Simpósio Internacional de Reprodução Animal Aplicada, 2, 2006, Londrina, PR. Londrina: [s.n.], 2006b. p.157-164,

Arruda RP, Andrade AFC, Peres KR, Raphael CF, Nascimento J, Celeghini ECC. Biotécnicas aplicadas à avaliação do potencial de fertilidade do sêmen equino. *Rev Bras Reprod Anim*, v.31, p.8-16, 2007.

Arruda RP, Andrade AFC, Zaffalon FG, Celeghini ECC, Nascimento J, Tarragó OFB, Martins SMMK, Alonso MA. Addition of seminal plasma reduces tyrosine phosphorylation in post-thawed equine sperm. *Anim Reprod*, v.7. p.285-285, 2010a.

Arruda RL, Orros IR, Passos TS, Costa e Silva EV, Zúcarí CESN. Técnicas para avaliação laboratorial da integridade estrutural e funcional do sêmen congelado de touros. *Rev Bras Reprod Anim*, v.34, p.168-184, 2010b.

Baker MA. The omics revolution and our understanding of sperm cell biology. *Asian J Androl*, v.13, p.6-10, 2011.

Batista AM, Guerra MMP. Novas técnicas para avaliação da qualidade do sêmen caprino. *Rev Bras Reprod Anim*, v.34, n.3, p.125-132, 2010.

Berger T. Fertilization in ungulates. *Anim Reprod Sci*, v.42, p.351-360, 1996.

Celeghini ECC. *Efeitos da criopreservação do sêmen bovino sobre as membranas plasmática, acrossomal e mitocondrial e estrutura da cromatina dos espermatozoides utilizando sondas fluorescentes.* 186f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, 2005.

Celeghini ECC, Arruda RP, Albuquerque R, Silva FHA, Faria DE, Andrade AFC, Nascimento J, Raphael CF. Utilization of fluorescent probe association for simultaneous assessment of plasma, acrosomal and mitochondrial membranes in fowl spermatozoa. *Braz J Poult Sci*, v.9, p.143-149, 2007a.

Celeghini ECC, Arruda RP, Andrade AFC, Nascimento J, Raphael CF. Practical techniques for bovine sperm simultaneous fluorimetric assessment of plasma, acrosomal and mitochondrial membranes. *Reprod Domest Anim*, v.42, p.479-488, 2007b.

Celeghini ECC, Arruda RP, Andrade AFC, Nascimento J, Raphael CF, Rodrigues PHM. Effects that bovine sperm cryopreservation using two different extenders has on sperm membranes and chromatin. *Anim Reprod Sci*, v.104, p.119-131, 2008.

Celeghini ECC, Andrade AFC, Fernandes C, Nascimento J, Ticianelli JS, Arruda RP. Damage assessment of the equine sperm membranes by fluorimetric technique. *Braz Arch Biol Technol*, v.53, p.1285-1292, 2010a.

Celeghini ECC, Nascimento J, Raphael CF, Andrade AFC, Arruda RP. Simultaneous assessment of plasma, acrosomal and mitochondrial membranes of ram sperm by fluorescent probes. *Arq Bras Med Vet Zootec*, v.62, p.536-543, 2010b.

Davis RO, Katz DF. Operational standards for CASA instruments. *J Androl*, v.14, p.385-395, 1993.

Dell'Aqua JA, Papa FO, Zahn FS, Alvarenga MA, Leonardo H. Novo teste osmótico de avaliação da integridade da membrana plasmática de sêmen congelado equino. *Rev Bras Reprod Anim*, v.26, p.189-191, 2002.

Farrel PB, Foote RN, Mcardle MM, Trouern-Trend VL, Tardif AL. Media and dilution procedures tested to minimize handling effects on human, rabbit and bull sperm for computer-assisted sperm analysis (CASA). *J Androl*, v.17, p.293-300, 1996.

Ferreira, JCP, Neves Neto JR, Papa FO. Avaliação computadorizada das características espermáticas de garanhões com fertilidade comprovada. *Rev Bras Reprod Anim*, v.21, p.131-32, 1997.

Freitas-Dell'Aqua CP, Crespilho AM, Papa FO, Dell'Aqua Junior JA. Metodologia de avaliação laboratorial do sêmen congelado bovino. *Rev Bras Reprod Anim*, v.33, n.4, p.213-222, 2009.



- Fuse H; Ohta S; Sakamoto M; Kazana T; Katayama,** Hypoosmotic swelling test with a medium of distilled water, *Archives of Andrology*, v.30, p.111-116, 1993.
- Gardes TP, Cardoso RNR, Arruda RP, Nascimento J, Silva DF, Gallego AM, Andrade AFC.** Comparação da eficiência de meios para a capacitação dos espermatozoides através das análises por citometria de fluxo e computadorizada da motilidade. In: Simpósio de Pesquisa e Pós-Graduação do Departamento de Reprodução Animal, 3, 2010, Pirassununga-SP. *Anais...* Pirassununga, SP: USP/FMVZ, 2010.
- Garner DL, Johnson LA.** Viability assessment of mammalian sperm using SYBR-14 and Propidium iodide. *Biol Reprod*, v.53, p.276-284, 1995.
- 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.
- Gur Y, Breitbart H.** Mammalian sperm translate nuclear-encoded proteins by mitochondrial-type ribosomes. *Genes Dev*, v.20, p.411-416, 2006.
- Hirai M, Boersma A, Hoeflich A, Wolf E, Foll J, Aumuller R, Braum J.** Objectively measured sperm motility and sperm head morphometry in boars (*Sus scrofa*): relation to fertility and seminal plasma growth factors. *J Androl*, v.22, p.104-110, 2001.
- Howard TW, Pace MM.** Seminal evaluations and artificial examination. In: Fertility and infertility in veterinary practice. 4.ed. London: Bailliere Tindall, 1988. p.39-51.
- Iguer-Ouada M, Verstegen JP.** Evaluation of the Hamilton-Thorn computer-based automated system for dog semen analysis. *Theriogenology*, v.55, p.733-749, 2001.
- Jeyendran RS, Van Der Ven HH, Perez-Pelaez M, Crabo BG, Zaneveld LID.** 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.219-225, 1984.
- Johnson W.** The significance to bull fertility of morphologically abnormal sperm. *Vet Clin North Am*, v.13, p.255-270, 1997.
- Larsson B, Rodríguez-Martínez H.** Can we use in vitro fertilization tests to predict semen fertility? *Anim Reprod Sci*, v.60/61, p.327-336, 2000.
- Malmgren L.** Assessing the quality of raw semen: a review. *Theriogenology*, v.48, p.523-530, 1997.
- Manual para exame andrológico e avaliação do sêmen animal.** 2.ed. Belo Horizonte: Colégio Brasileiro de Reprodução Animal, 1998. 49p.
- Matos DL, Araújo AA, Roberto IG, Toniolli R.** Análise computarizada de espermatozoides: revisão de literatura. *Rev Bras Reprod Anim*, v.32, p.225-232, 2008.
- Nascimento J, Raphael CF, Andrade AFC, Alonso MA, Celeghini ECC, Arruda RP.** Effects of sperm concentration and straw volume on motion characteristics and plasma, acrosomal, and mitochondrial membranes of equine cryopreserved spermatozoa. *J Equine Vet Sci*, v.28, p.351-358, 2008.
- Premkumar E, Bhargava PM.** Transcription and translation in bovine spermatozoa. *Nat New Biol*, v.240: p.139-143, 1972.
- Revell SG, Mrode RA.** An osmotic resistance test for bovine semen. *Anim Reprod Sci*, v.36, p.77-86. 1994.
- Rodríguez-Martínez H, Zhang BR, Larsson B.** Bovine semen quality and the ability to produce embryos *in vivo* and *in vitro*. *Arq Fac Vet UFRGS*, v.25, supl, p.108-126, 1997.
- Saacke RG, Nadir S, Dalton J, Nebel RL, Bame J.** Involvement of the bull and artificial insemination in fertility and embryo quality. In: Reunião Anual da Sociedade Brasileira de transferência de Embriões, 10, 1995, São Paulo, SP. p.1-17.
- Takahashi K, Uchida A, Kitao M.** Hypoosmotic swelling test of sperm. *Arch Androl*, v.25, p.225-242, 1990.
- Sartori R.** Fertilização e morte embrionária em bovinos. In: *Acta Sci Vet*, v.32, supl, p.35-50, 2004.
- Tardif AL, Farrel PB, Trouern-Trend V, Foote RH.** Computer-assisted sperm analysis for assessing initial semen quality and changes during storage at 5°C. *J Dairy Sci*, v.80, p.1606-1612, 1997.
- Vazquez JM; Martinez EA; Martinez P; Garcia AC; Roca J.** Hypoosmotic swelling of boar spermatozoa compared to other methods for analysing the sperm membrane, *Theriogenology*, v.47, p. 913-922, 1997.
- Verstegen J, Iguer-Ouada M, Oclin K.** Computer assisted semen analyzers in andrology research and veterinary practice. *Theriogenology*, v.57, p.149-179, 2002.
- Yanagimachi R.** Mammalian fertilization. In: Knobil E, Neill JD. *The physiology of reproduction*. New York: Raven Press, p.189-317. 1994
- Zhang BR, Larsson B, Lundeheim N, Håård MG, Rodríguez-Martínez H.** Prediction of bull fertility by combined in vitro assessments of frozen-thawed semen from young dairy bulls entering an IA-program. *Int J Androl*, v.22, p.253-260, 1999.
-