



Citometria de Fluxo em andrologia: da pesquisa básica para a rotina clínica

Flow cytometry in andrology: from basic research to clinical routine

Ivan Cunha Bustamante-Filho¹, Arlindo Alencar Moura², Diego Bucci³

¹Laboratório de Biotecnologia, Universidade do Vale do Taquari, Lajeado, RS, Brasil

²Laboratório de Fisiologia Animal, Departamento de Zootecnia,
Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, CE, Brazil

³Department of Veterinary Medical Sciences, Alma Mater Studiorum e University of Bologna,
Ozzano dell'Emilia, BO, Itália

Resumo

Os primeiros estudos de espermatozoides com citometria de fluxo com espermatozoides iniciaram no final da década de 1970. Com os avanços tecnológicos, hoje contamos com equipamentos com alta sensibilidade e eficiência que, em conjunto com amplo catálogo de sondas fluorescentes, podemos mensurar com alta precisão características celulares. Como exemplo, destacam-se dano em membrana plasmática, atividade mitocondrial, produção de espécies reativas de oxigênio, dano ao DNA espermático e muito mais. Na presente revisão, as potencialidades e limitação para a implementação da citometria de fluxo na análise seminal de espécies domésticas são exploradas e comentadas.

Palavras-chave: mitocôndria, membrana plasmática, dano ao DNA, exame, espermatozoide

Abstract

The first flow cytometry studies with spermatozoa were published in the late 1970s. With the technological advances in the following years, today we have equipments with high sensitivity and efficiency that, together with a large number of commercially available fluorescent probes, allow us to measure different cell characteristics with high accuracy. Some of the most evaluated characteristics are plasma membrane damage, mitochondrial activity, production of reactive oxygen species, sperm DNA damage, and much more. In this review, the potentials and limitations for the implementation of flow cytometry in the seminal analysis of domestic species are explored and commented.

Keywords: mitochondria, plasma membrane, DNA damage, exam, spermatozoa

Introdução

Como toda ciência veterinária, a andrologia animal se beneficiou largamente dos avanços tecnológicos das últimas décadas. É incrível pensar que os primeiros programas de reprodução animal contavam com limitados recursos técnicos, incluindo microscópios ópticos com baixas resolução e ampliação, e poucos ou inexistentes instrumentais dedicados ao exame andrológico. O desenvolvimento da indústria da saúde humana e animal promoveu a expansão e modernização da fabricação de equipamentos e insumos para exames, diagnósticos e tratamento de animais. Isto ocorreu devido à importância econômica mundial das cadeias produtivas de proteína animal, que demandavam (e ainda demandam) o aprimoramento das diferentes etapas dos processos produtivos. Como resultado, a partir da metade do século XX, observou-se a contínua tecnificação da produção de animais de interesse zootécnico.

O manejo reprodutivo é o pilar de qualquer sistema de produção animal, uma vez que é o responsável pelo abastecimento contínuo da cadeia. Assim, é fácil compreender que a busca por índices reprodutivos cada vez mais eficientes está diretamente ligado com a rentabilidade e sustentabilidade da produção de qualquer espécie animal. Com a implementação da inseminação artificial (IA) associada a técnicas de preservação do sêmen, foram obtidos ganhos produtivos e de avanço genéticos dificilmente alcançáveis até então. Contudo, estas novas biotecnologias reprodutivas são, até hoje, dependentes da criteriosa avaliação seminal, não só para eliminar ejaculados ou animais inadequados ao sistema reprodutivo, mas também para identificar pontos críticos no manejo reprodutivo (Rodríguez-Martínez, 2013).

Podemos assumir que um dos grandes saltos tecnológicos na andrologia foi o desenvolvimento e implantação dos sistemas computadorizados de análise seminal (CASA, do inglês *computer-assisted*

¹Correspondência: ivanbustamante@univates.br

Recebido: 04 de janeiro de 2022

Aceito: 28 de dezembro de 2021

semen analysis) (Boersma e Braun, 1999). Estes equipamentos trouxeram soluções para limitações importantes relacionadas a análise seminal de rotina como a avaliação subjetiva da motilidade espermática, dificuldades de padronização de processos e protocolos entre laboratórios, erros de contagem e interpretação de dados. De fato, a análise computadorizada da concentração, motilidade, morfologia espermáticas (entre outras avaliações possíveis), tornou a análise objetiva, trazendo mais confiabilidade ao exame do sêmen (Amann e Waberski, 2014).

Hoje, o CASA é uma realidade, contudo, no Brasil sua aplicação ainda é restrita a uma parcela das centrais e laboratórios de pesquisa (Moore e Hasler, 2017). Destaca-se ainda que nem todas as cadeias produtivas das espécies de animais domésticos adotaram de forma ampla e definitiva o uso do CASA devido a fatores como custo de aquisição e manutenção (Eljarah *et al.*, 2013). De qualquer forma, o laboratório que tenha um dos diferentes modelos de CASA comercialmente disponíveis instalado, seguramente, pode gerar laudos e análises com maior segurança e com informações mais completas, em especial com relação a motilidade espermática (Vincent *et al.*, 2012).

Mas afinal, se este artigo é sobre citometria de fluxo, porque estamos falando de CASA? Simples, pelo motivo de que a Citometria de fluxo aplicada ao exame seminal poderá ter o mesmo impacto - e talvez as mesmas limitações, que o CASA teve. E neste breve artigo discutiremos porquê.

Como funciona a citometria de fluxo

Desenvolvida em grande parte com foco em hematologia, a citometria de fluxo é uma técnica em que células são analisadas individualmente por meio de um feixe primário de laser com um determinado comprimento de onda de excitação (Melamed, 2001). Este, ao incidir sobre a célula, sofre desvio ou refração, sendo os feixes secundários captados por detectores independentes que farão mensurações individuais. Cada mensuração é convertida em dados que são veiculados a cada célula avaliada (evento). Com isso, as informações são transmitidas a um software em um computador acoplado ao aparelho, que irá permitir o manuseio, processamento, leitura e interpretação dos dados (Givan, 2001) (figura 1).

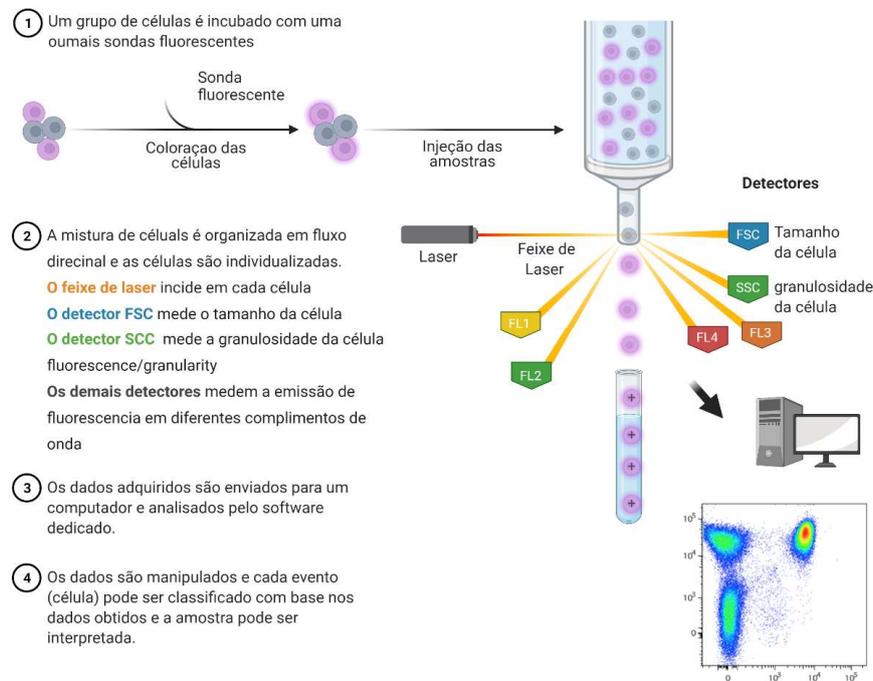


Figura 1: Representação esquemática da técnica de citometria de fluxo. FSC – Forward scatter, SSC – Side scatter. Criado com Biorender.

Inicialmente, a citometria de fluxo avaliava cada célula individualmente com base no seu tamanho e complexidade, informações captadas pelos detectores FSC (*forward scatter*) e SSC (*side*

scatter). Em seguida, detectores de sondas fluorescentes, as mesmas utilizadas em microscopia de epifluorescência, foram incorporados aos equipamentos (Herzenberg *et al.*, 2002). Tal avanço permitiu novas análises, inclusive análises multiplex, onde várias sondas são adicionadas ao mesmo tempo a amostra, permitindo a obtenção de várias informações simultâneas de cada célula analisada (Givan, 2001). Além dos avanços da parte óptica, a parte hidráulica do equipamento também foi aperfeiçoada, permitindo análises de centenas de células por segundo, tornando rotina a avaliação de 20.000 células ou mais por análise. Estes números claramente mostram as vantagens da citometria frente a microscopia, economizando significativamente tempo de trabalho.

A citometria de fluxo aplicada a andrologia

Apesar de ter sido desenvolvida para estudos em hematologia, rapidamente, a citometria de fluxo começou a ser utilizada também em tecidos sólidos, desde que estes fossem dissociados para separação e análise individual das células. Logo a citometria de fluxo se tornaria não só uma sólida ferramenta de pesquisa, mas também uma ferramenta facilmente encontrada em laboratórios de análises clínicas (Shapiro, 2018).

Devido a sua natureza tissular similar ao sangue, ou seja, o fato da matriz extracelular de ambos tecidos serem líquidas, logo percebeu-se a oportunidade de avaliar o sêmen através da citometria de fluxo (Dean *et al.*, 1978; Otto *et al.*, 1979; Pinkel *et al.*, 1979; Spano e Evenson, 1991). Com os avanços da técnica na saúde humana, já na década de 1990, diversas sondas fluorescentes já estavam disponíveis no mercado, necessitando apenas serem validadas (Morrell, 1991). Aliás, esta é sempre uma limitação quando técnicas são transladadas da medicina humana, uma vez que diferenças anatomo-fisiológicas interespecíficas podem inviabilizar o uso da técnica.

Hoje a aplicação de sondas fluorescentes em citometria de fluxo de espermatozoides está bem estabelecida, e em especial em diferentes espécies (Boe-Hansen e Satake, 2019; Hossain *et al.*, 2011; Nagy *et al.*, 2016; Ortega-Ferrusola *et al.*, 2017; Pena *et al.*, 2016; Vishwanath e Moreno, 2018). Na pesquisa, a citometria de fluxo vem sendo aplicada extensivamente para aprofundar a avaliação seminal *in vitro*, permitindo a obtenção de dados estruturais e funcionais que possam dialogar com os resultados do CASA e de ensaios morfológicos. Ainda, ela vem sendo empregada para a obtenção de mais informações sobre o ejaculado que também é testado *in vivo*, dando mais segurança nas interpretações acerca da fertilidade masculina. A Figura 2 apresenta algumas das sondas fluorescentes mais utilizadas e sua aplicação em andrologia. Recomenda-se buscar atualização no site dos fabricantes das sondas e equipamentos de citometria de fluxo para verificar a lista atualizada de reagentes e a compatibilidade entre citômetros e sondas.

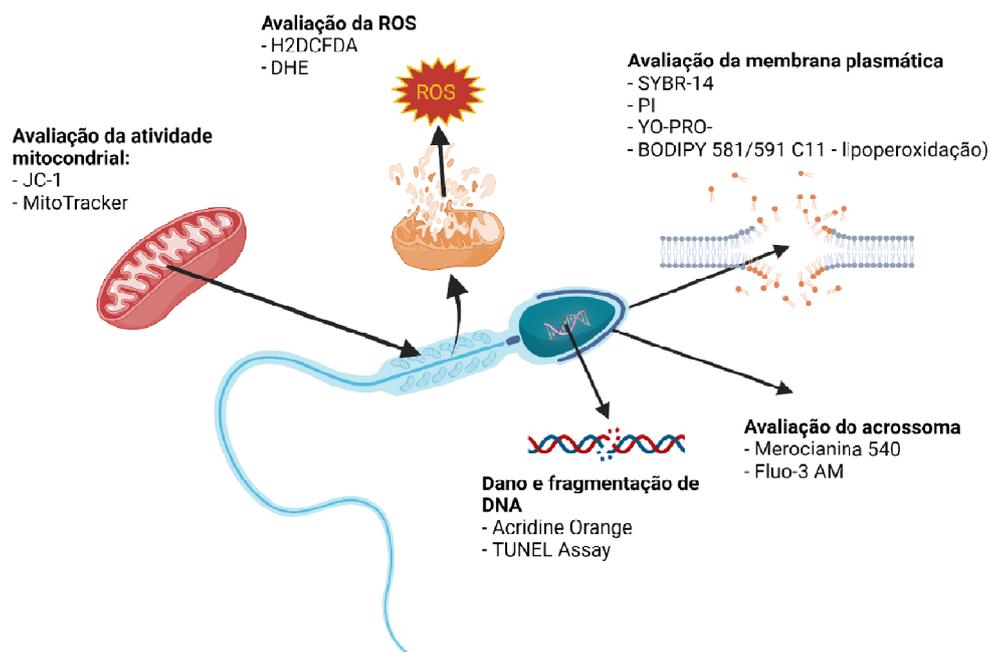




Figura 2: Exemplos de sondas fluorescentes utilizadas para identificar diferentes características estruturas e funcionais em espermatozoides. Para referencias as sondas e detalhes, referir-se a Martinez-Pastor *et al.*, (2010). Criado com Biorender.

Considerações Finais

A citometria de fluxo é uma ferramenta com grande potencial na andrologia veterinária e já vem sendo amplamente utilizada na pesquisa em reprodução animal (Pena *et al.*, 2018). Limitações como custo de aquisição, instalação e manutenção, bem como o treinamento adequado de técnicos para operar o equipamento impõe barreiras no seu uso como rotina clínica. De fato, tais barreiras foram as mesmas encontradas pelo CASA, quando da sua chegada no Brasil. Porém, hoje grandes centrais e empresas da área de reprodução de suínos e bovinos já possuem o CASA, o que aponta para um futuro semelhante ao citômetro. Ressalta-se a necessidade da padronização de ensaios (concentração de sondas, combinação entre elas, e número de células analisadas), desenvolvimento de modelos matemáticos de análises de dados para otimização da implementação da técnica (Barrier Battut *et al.*, 2016; Gliozzi *et al.*, 2017; Sellem *et al.*, 2015) e para a geração de índices de fácil utilização e compreensão.

Referências bibliográficas

- Rodríguez-Martínez H.** Semen evaluation techniques and their relationship with fertility. *Animal Reproduction*, 10, p.148-159, 2013.
- Boersma A e Braun J.** [Computer-assisted analysis of sperm morphology in veterinary medicine]. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr*, 112. p.81-5, 1999.
- Amann RP e Waberski D.** Computer-assisted sperm analysis (CASA): capabilities and potential developments. *Theriogenology*, 81. p.5-17 e1-3, 2014.
- Moore SG e Hasler JF.** A 100-Year Review: Reproductive technologies in dairy science. *J Dairy Sci*, 100. p.10314-10331, 2017.
- Eljarah A, Chandler J, Jenkins JA, Chenevert J e Alcanal A.** Usefulness of hemocytometer as a counting chamber in a computer-assisted sperm analyzer (CASA). *Animal Reproduction*, 10. p.708-711, 2013.
- Vincent P, Underwood SL, Dolbec C, Bouchard N, Kroetsch T e Blondin P.** Bovine semen quality control in artificial insemination centers. *Animal Reproduction*, 9. p. 153-165, 2012.
- Melamed MR.** Chapter 1 A brief history of flow cytometry and sorting. In: (Ed.) *Cytometry*, 63. 2001, p.3-17.
- Givan AL.** Chapter 2 Principles of flow cytometry: An overview. In: (Ed.) *Cytometry*, 63. 2001, p.19-50.
- Herzenberg LA, Parks D, Sahaf B, Perez O, Roederer M e Herzenberg LA.** The history and future of the fluorescence activated cell sorter and flow cytometry: a view from Stanford. *Clin Chem*, 48. p.1819-27, 2002.
- Shapiro HM.** Flow Cytometry: The Glass Is Half Full. *Methods Mol Biol*, 1678. p. 1-10, 2018.
- Dean PN, Pinkel D e Mendelsohn ML.** Hydrodynamic orientation of sperm heads for flow cytometry. *Biophys J*, 23. p.7-13, 1978.
- Otto FJ, Hacker U, Zante J, Schumann J, Gohde W e Meistrich ML.** Flow cytometry of human spermatozoa. *Histochemistry*, 61. p.249-54, 1979.
- Pinkel D, Dean P, Lake S, Peters D, Mendelsohn M, Gray J, Van Dilla M e Gledhill B.** Flow cytometry of mammalian sperm: progress in DNA and morphology measurement. *J Histochem Cytochem*, 27. p.353-8, 1979.
- Spano M e Evenson DP.** Flow cytometric studies in reproductive toxicology. *Prog Clin Biol Res*, 372. p. 497-511, 1991.
- Morrell JM.** Applications of flow cytometry to artificial insemination: a review. *Vet Rec*, 129, p.375-8, 1991.
- Boe-Hansen GB e Satake N.** An update on boar semen assessments by flow cytometry and CASA. *Theriogenology*, 137. p.93-103, 2019.
- Hossain MS, Johannisson A, Wallgren M, Nagy S, Siqueira AP e Rodriguez-Martinez H.** Flow cytometry for the assessment of animal sperm integrity and functionality: state of the art. *Asian J Androl*, 13. p.406-19, 2011.
- Nagy ST, Kakasi B, Pal L, Havasi M, Bercesenyi M e Husveth F.** Effects of high ambient temperature on fish sperm plasma membrane integrity and mitochondrial activity - A flow cytometric study. *Acta Biol Hung*, 67. p.125-32, 2016.



Ortega-Ferrusola C, Gil MC, Rodriguez-Martinez H, Anel L, Pena FJ e Martin-Munoz P. Flow cytometry in Spermatology: A bright future ahead. *Reprod Domest Anim*, 52. p.921-931, 2017.

Pena FJ, Ortega Ferrusola C e Martin Munoz P. New flow cytometry approaches in equine andrology. *Theriogenology*, 86. p.366-72, 2016.

Vishwanath R e Moreno JF. Review: Semen sexing - current state of the art with emphasis on bovine species. *Animal*, 12, p.s85-s96, 2018.

Pena FJ, Ortiz Rodriguez JM, Gil MC e Ortega Ferrusola C. Flow cytometry analysis of spermatozoa: Is it time for flow spermetry? *Reprod Domest Anim*, 53 Suppl 2, p.37-45, 2018.

Barrier Battut I, Kempfer A, Becker J, Lebailly L, Camugli S e Chevrier L. Development of a new fertility prediction model for stallion semen, including flow cytometry. *Theriogenology*, 86. p.1111-1131, 2016.

Gliozzi TM, Turri F, Manes S, Cassinelli C e Pizzi F. The combination of kinetic and flow cytometric semen parameters as a tool to predict fertility in cryopreserved bull semen. *Animal*, 11, p.1975-1982, 2017.

Sellem E, Broekhuijse ML, Chevrier L, Camugli S, Schmitt E, Schibler L e Koenen EP. Use of combinations of in vitro quality assessments to predict fertility of bovine semen. *Theriogenology*, 84. p.1447-1454 e5, 2015.
