

# Avanço na avaliação espermática de equinos: revisão

*Advances in evaluation of equine semen: review*

---

Priscilla Ricabone Muradas<sup>[a]</sup>, Romildo Romualdo Weiss<sup>[b]</sup>, Luiz Ernandes Kozicki<sup>[c]</sup>

<sup>[a]</sup> Médica veterinária, Mestre em Ciências Veterinárias e professora do Centro Universitário das Faculdades Evangélica, Curitiba, PR - Brasil, e-mail: muradaspritty@hotmail.com

<sup>[b]</sup> Médico veterinário, professor, Doutor da Universidade Federal do Paraná (UFPR), Curitiba, PR - Brasil, e-mail: rrweiss@bol.com.br

<sup>[c]</sup> Médico veterinário, Professor da Escola de Ciências Agrárias e Medicina Veterinária da Pontifícia Universidade Católica do Paraná (PUCPR), Curitiba, PR - Brasil, e-mail: kozicki.l@pucpr.br

---

## Resumo

O objetivo da revisão é o de proporcionar um panorama geral das técnicas utilizadas correntemente na avaliação da capacidade fecundante de espermatozoides equinos. No decurso dos tempos, a fertilidade dos garanhões firmou-se como um dos principais parâmetros de seleção e utilização. Neste contexto foram desenvolvidos métodos laboratoriais para a avaliação do sêmen. Tais métodos em conjunto podem ajudar a prever o potencial fecundante. O espermograma convencional tem-se caracterizado como o principal método de diagnóstico de fertilidade do macho. Dentre as várias características espermáticas a serem avaliadas no espermograma, a motilidade e a morfologia dos espermatozoides destacam-se como as mais importantes. Contudo, isso por si só, pode não ser suficiente, uma vez que não avaliam a estrutura interna da célula espermática, como a cromatina (DNA e proteínas específicas), indicadores essenciais da funcionalidade dos espermatozoides, da habilidade de fecundação e do desenvolvimento embrionário. As avaliações convencionais executadas pela análise visual do examinador carregam consigo graus de subjetividade, não correspondendo muitas vezes à realidade. Visando reduzir as falhas do examinador e melhorar a repetibilidade entre os examinadores, tem sido proposta a utilização de análise de imagem por computador para a avaliação da motilidade e da morfologia dos espermatozoides, além da composição do plasma seminal, integridade da membrana plasmática e acrossomal, função mitocondrial, desnaturação da cromatina e peroxidação das membranas espermáticas dentre outras. Porém o teste mais representativo de avaliação da capacidade de fertilização dos espermatozoides é a própria fertilização seja *“in vitro”* ou *“in vivo”*.

**Palavras-chave:** Equinos. Espermograma. Avaliação espermática computadorizada. Fertilidade.



## Abstract

*The purpose of the present review is to overview of the techniques currently used to evaluate the fertilization ability of equine spermatozoa. Many years ago, the fertility of stallions constituted one of the main parameters for selection and use. In this context, many methods were developed for laboratorial evaluation of semen. These methods together can help to predict the fertilization potential of samples. The conventional semen analysis has been characterized as the main diagnosis method of male fertility. Among several sperm characteristics to evaluate the semen, motility and morphology stand out as the most important. However these characteristics alone may not be enough, since they do not assess the internal structure of the cell, such as the sperm chromatin (specific DNA and protein), which are essential indicators of sperm functionality, ability of fertilization and embryo development. Evaluations performed by conventional visual analysis carry different levels of subjectivity and often do not correspond with the reality. In order to reduce the shortcomings of the examiner and to improve the repeatability, it has been proposed the use of computerized image analysis for assessing the motility and morphology of spermatozoa, the composition of seminal plasma, plasma membrane and acrosome integrity, mitochondrial function, denaturation of chromatin, peroxidation of sperm membranes and others. However, the most representative assessment for the fertilization capacity of spermatozoa is the fertilization itself, either "in vitro" or "in vivo".*

**Keywords:** Stallion. Sperm evaluation. Computerized sperm evaluation. Fertility.

---

## Introdução

O Brasil possui o terceiro maior rebanho equino do planeta, com plantel de 5,9 milhões de animais, atrás apenas da China (8,2 milhões) e do México (6,2 milhões) (CNA, 2003).

Técnicas como a inseminação artificial (IA), coleta e transferência de embriões (TE) são bastante utilizadas na equinocultura, porém técnicas como a superovulação, congelamento de embriões, fertilização *in vitro* (FIV), injeção intracitoplasmática de espermatozoide (ICSI) (LANGE-CONSIGLIO et al., 2009; SMITS et al., 2012a; ZANIBONI et al., 2012), transferência de oócitos (HINRICHS, 2010), transferência intrafalopiana de gametas (GIFT) e congelamento de oócitos, são biotécnicas emergentes.

Apesar da maturação "*in vitro*" (MIV) e a FIV serem biotécnicas usuais na espécie humana e em algumas espécies domésticas, reduzido sucesso tem sido obtido na espécie equina (CARNEIRO, 2002). A clonagem equina igualmente sofreu um processo lento, nascendo, em 2003, o primeiro clone equino (NICACIO, 2007).

As maiores barreiras para atingir o sucesso na FIV em equinos são o pouco conhecimento sobre sistemas de maturação e cultivo embrionário *in vitro*, assim como a padronização de uma técnica eficiente de capacitação espermática *in vitro*

(SQUIRES, 1996; CARNEIRO, 2002; HINRICHS et al., 2002; SIEME et al., 2003; SQUIRES et al., 2003). Para ocorrer a capacitação dos espermatozoides, o primeiro passo é determinar se apresentam capacidade fecundante. Vários métodos laboratoriais para avaliação do sêmen vêm sendo utilizados. Estes, em conjunto, podem ajudar a prever o potencial fecundante das células espermáticas. O espermograma constitui o principal método de diagnóstico de fertilidade do macho utilizado na rotina (ARRUDA et al., 2003a; BRITO et al., 2011). Dentre várias características espermáticas avaliadas no espermograma incluem-se a motilidade e a morfologia dos espermatozoides (SIEME et al., 2003; EHLERS et al., 2011; HOOGEWIJS et al., 2012). A obtenção de sêmen equino é executada mediante vagina artificial. Na avaliação não computadorizada do sêmen este passa por avaliações subjetivas de concentração (determinada com auxílio da câmara de Neubauer), motilidade para verificar o percentual de espermatozoides móveis e com movimentos retilíneos e morfologia baseada em exames microscópicos de contraste de fase além de exames com colorações de Cerovski, trypan-blue/Giemsa (CBRA, 1998). Essas análises podem não ser suficientes, porque não avaliam a estrutura interna da célula espermática (ex. a cromatina, (DNA e as proteínas específicas), que pode indicar a funcionalidade, a habilidade de fecundação

e o desenvolvimento embrionário) (KANAYAMA; BELETTI, 2011).

As avaliações de rotina pela análise visual do examinador possuem certo grau de subjetividade (BRITO et al., 2011), podendo ser tendenciosa. Para reduzir as imperfeições do examinador e aumentar a repetibilidade entre os examinadores, tem sido proposto o uso de análise de imagem por computador para a avaliação da motilidade, concentração (LOVE, 2002; EHLERS et al., 2011; HOOGEWIJS et al., 2012) e morfologia dos espermatozoides (BRITO et al., 2011), composição do plasma seminal, integridade da membrana plasmática e acrossomal, função mitocondrial, desnaturação da cromatina, peroxidação das membranas espermáticas, dentre outras (RODRIGUES; ROCHA; BELETTI, 2009; MORRELL; DALIN; RODRIGUEZ-MARTINEZ, 2008). O teste mais representativo de avaliação da capacidade fecundante dos espermatozoides é a própria fertilização “*in vitro*” e “*in vivo*”, em que se verificará a capacidade do sêmen em promover a prenhez (MORRELL; DALIN; RODRIGUEZ-MARTINEZ, 2008; HINRICH, 2010; GOUDET, 2011; SMITS et al., 2012 a,b).

O objetivo da revisão foi abordar algumas novas tecnologias utilizadas na avaliação da capacidade fecundante de espermatozoides de equinos.

### **Enzimas, macro e microelementos no plasma seminal como parâmetros de referência para a qualidade do sêmen equino**

O plasma seminal equino é constituído por enzimas, macro e microelementos, oriundos principalmente das secreções (fluidos) das glândulas acessórias, *rete testis* e epidídimo (EDWARDS; TOLLAKSEN; ANDERSON, 1981).

Pesch, Bergmann e Bostedt (2006) estudaram ejaculados de 72 garanhões, medindo o volume do plasma seminal centrifugado além de examinarem espermatozoides, visando a motilidade, a concentração, a morfologia e o percentual de mortos. No plasma seminal foram mensuradas as atividades de aspartato-amino-transferase (AST), a gama-glutamyl-transferase (GGT), a fosfatase alcalina (AIP), a fosfatase ácida (AcP), a lactato-desidrogenase (LDH) assim como concentração de sódio (Na), potássio (K), cálcio total e iônico, magnésio, fosfato, cloretos, cobre, Ferro e zinco. Significativas correlações foram observadas

entre o volume de sêmen com a concentração de AST, GGT, AIP, AcP e LDH assim como com ferro e zinco. Além disso foram verificadas correlações entre a GGT e a motilidade sinalizando sua função na proteção celular contra radicais livres. A atividade da LDH esteve altamente correlacionada com a motilidade progressiva do sêmen assim como a relação espermatozoides vivos:mortos e a patologia espermática. No estudo, os autores propõem que a enzima LDH seria o melhor parâmetro para se avaliar a qualidade do sêmen equino. Zemanova et al. (2007) analisaram a concentração de níquel no sêmen de garanhões e a relação com a qualidade e encontraram elevado número de garanhões com patologia espermática total, dentre os quais cauda enrolada e cauda desprendida, quando tinham concentração de 0,02 mg/kg. Giesecke et al. (2011) escolheram a angiotensina conversora de enzima (ACE), a proteína seminal autoantigênica 17 (SP17) e o hormônio folículo estimulante (FSHB) para determinar a fertilidade de garanhões associando o nucleotídeo polimorfismo intragênico simples (SNPs), *flanking microsatellites* e o gen-ligado a haplotipos com a taxa de prenhez por estro (PRO), em 179 garanhões da raça Hanoveriana. Ao término da análise foi observado que haplotipos de todos os três gens tiveram uma correlação significativa com a fertilidade do garanhão e a taxa embrionária com a taxa de prenhez por estro.

### **Avaliação automatizada da motilidade e da morfometria espermática**

A avaliação automatizada da motilidade dos espermatozoides desperta grande interesse graças à relevância que a cinética espermática possui na determinação do potencial de fertilidade dos espermatozoides. Dentre os parâmetros, a velocidade progressiva e os padrões de movimentação celular têm sido correlacionados com a penetração no muco cervical, penetração em oócitos de hamster e nos resultados de fertilização “*in vitro*” (CENTOLA, 1996; JANUSKAUSKAS et al., 1999).

O método da análise do sêmen por computação assistida (computer-assisted semen analyses – CASA) tem sido primariamente utilizado para a obtenção da acurácia e medidas objetivas da movimentação espermática (EHLERS et al., 2011; BOLANOS et al., 2012).

A motilidade espermática é considerada um dos pontos característicos da avaliação do sêmen, sendo frequentemente executada pelo método CASA. Contudo a análise do sêmen pelo CASA pode tornar-se inexato ao fornecer estimativas da concentração e pode indicar hiper-motilidade, ao se colocar o sêmen em lâmina-laminula. (HOOGEWIJS et al., 2012). A qualidade do sêmen tem uma função muito importante na fertilidade. Em um estudo conduzido por Love (2011) utilizou-se o CASA para avaliar a motilidade do sêmen e a microscopia de contraste de fase diferencial para avaliar as características de morfologia espermática de garanhões. A fertilidade foi mensurada utilizando-se três parâmetros: a taxa de prenhez da temporada reprodutiva (PR), a porcentagem de prenhez por ciclo (PC) e a porcentagem de prenhez no primeiro ciclo. Ele concluiu que a porcentagem de prenhez no primeiro ciclo foi a única medida capaz de discriminar entre elevada, média e baixa fertilidade, baseado na motilidade progressiva espermática.

Os parâmetros da motilidade computadorizada dos espermatozoides de garanhões foram estudados após duas colheitas consecutivas (FERREIRA et al., 1997). Os resultados obtidos não apresentaram diferença significativa entre o primeiro e o segundo ejaculado. Os autores concluíram que o método de análise computadorizada mostrou-se prático, rápido e de fácil execução. Contudo não se sabe quais dos parâmetros analisados podem contribuir na interferência do potencial fecundante do sêmen.

Para avaliar a integridade do acrossoma e da motilidade espermática pelo sistema computadorizado, Blach et al. (1989) congelaram sêmen de garanhões com diluidor a base de EDTA-lactose-gema de ovo (4% de glicerol). Após a descongelação, a quantidade de acrossomos intactos foi de 75,8%; motilidade progressiva 23,3%; velocidade curvilínea 62,6  $\mu\text{m/s}$ ; velocidade progressiva 37,6  $\mu\text{m/s}$ ; linearidade 6,1; amplitude lateral de cabeça 2,1  $\mu\text{m}$  e frequência de batimentos 17,3 Hz. Nos parâmetros estudados, houve diferença ( $P < 0,05$ ) entre garanhões e entre ejaculados do mesmo garanhão.

Sieme et al. (2003) pesquisaram diferentes técnicas de resfriamento e congelamento de sêmen equino, utilizando sêmen fresco e sêmen congelado, visando, dentre outros parâmetros analisar a motilidade progressiva e as anormalidades de cabeça. Os pesquisadores utilizaram diferentes técnicas

para a seleção e a preparação do sêmen. Foi utilizado a técnica do swim-up, Glass wool filtration (GW), Glass wool Sephadex filtration (GWS) leucosorb e o Percoll para testar diferenças entre as técnicas e os procedimentos de diluição de rotina. A técnica do swim-up, a GW e a GWS mostraram-se melhores que as técnicas rotineiras de diluição, aumentando o percentual de espermatozoides com motilidade progressiva, assim como houve redução do percentual de anormalidades de cabeça. Concluiu-se que a técnica Glass wool sephadex e a filtração leucosorb proporcionaram melhoria da qualidade do sêmen. Em outro estudo, Sieme, Harrison e Petrunkina (2008) relatam que diferentes fatores afetam a criopreservação de espermatozoides, ao detalharem alguns fatores fundamentais da função do esperma e os mecanismos de ação que a crioinjúria e a crioproteção acarretam, enfatizando que o prejuízo às funções das células espermáticas é resultante do frio e do choque osmótico no congelamento convencional. Em outro estudo, Morrell, Dalin e Rodriguez-Martinez (2008) compararam uma nova e simples técnica de centrifugação coloidal denominada de centrifugação de camada única (SLC) com a técnica gradiente de densidade de espermatozoides de garanhões. Em questão de relevância, as duas técnicas mostraram-se equivalentes ao melhorar a qualidade dos espermatozoides, mas o método da SLC demonstrou ser mais prático e conveniente para o uso na rotina de campo. Anos mais tarde Lindahl et al. (2012) confirmaram os relatos de Morell et al. (2008) ao utilizarem a técnica de centrifugação de camada simples no ejaculado de garanhões, ao verificarem a capacidade de fertilização de espermatozoides de garanhões estocados por até 96h, indicando o uso da técnica na prática de campo.

Por sua vez, as avaliações da morfometria espermática pelo sistema computadorizado são realizadas por esfregaços corados em aumento de 1.000 vezes. As imagens destinadas à avaliação da morfometria da cabeça dos espermatozoides podem ser avaliadas pelo *software* Metrix instalado no aparelho Hamilton Thorne Research Motility Analyser (GOOVAERTS et al., 2006). A morfometria espermática de algumas espécies animais tem sido estudada com auxílio de instrumentos automatizados. Davis, Gravance e Casey (1993) desenvolveram o método padrão para a análise automatizada da morfometria espermática em equinos. Segundo os autores,

o sêmen pode ser analisado a fresco ou centrifugado e ressuspenso à concentração de  $200 \times 10^6$  espermatozoides/mL sem que haja danos à análise morfológica. Não houve variações expressivas na morfometria espermática de cada garanhão (variação de 1,1 a 3,7%;  $P > 0,001$ ), porém foi detectada uma diferença altamente significativa nas mensurações entre os garanhões (variação de 4,6 a 6,9%;  $P < 0,01$ ). A frequência de erros de digitalização de imagens foi de apenas 1,7% e os padrões morfométricos médios obtidos para as cabeças espermáticas de equinos foram de 5,85  $\mu\text{m}$  de comprimento, 2,97  $\mu\text{m}$  de largura, 13,15  $\mu\text{m}^2$  de área, 14,85  $\mu\text{m}$  de perímetro e 0,51  $\mu\text{m}$  para o coeficiente largura/comprimento.

Ball e Mohammed (1995) estudaram a morfometria de células espermáticas, comparando dados de avaliação de células vivas não fixadas com dados de células fixadas e coradas pelo corante de Feulgen. Os valores de comprimento e largura dos espermatozoides vivos não fixados foram maiores ( $P < 0,01$ ) do que os de espermatozoides fixados e corados por Feulgen (comprimento =  $6,3 \pm 0,4$  vs  $5,08 \pm 0,44$   $\mu\text{m}$ ; largura =  $3,08 \pm 0,34$  vs  $2,71 \pm 0,28$   $\mu\text{m}$ , respectivamente).

A relação entre largura/comprimento (alongamento) originados de espermatozoides corados com Feulgen foi significativamente maior ( $P < 0,01$ ) do que para os vivos não fixados ( $0,53 \pm 0,07$  vs  $0,43 \pm 0,07$ , respectivamente). O resultado da frequência de erros de digitalização de espermatozoides corados com Feulgen foi de 5,4% (variação de 1,7 a 9%). O erro mais comum de digitalização apresentou-se como sobreposição de espermatozoides que são medidos e identificados como um único espermatozoide. O comprimento e a largura das cabeças dos espermatozoides vivos não fixados tiveram baixa correlação com as medidas correspondentes na técnica de lâmina corada ( $r = 0,03$  e  $0,08$ , respectivamente), sendo que tanto comprimento quanto largura foram significativamente maiores para as células não fixadas ( $P < 0,01$ ). A redução no tamanho celular também foi relatada em células humanas e é atribuída ao processo de fixação e coloração, que envolve etapas de hidrólise e desidratação. A relação largura/comprimento derivada de ambos os métodos apresentou correlação moderada ( $r = 0,66$ ). Apesar de que nenhuma associação com a fertilidade tenha sido feita neste estudo, os autores concluíram que a técnica pode ter aplicação futura como método de avaliação da fertilidade de

ganhões, baseados na diferença de tamanho da cabeça espermática entre reprodutores ou no coeficiente de variação do tamanho da cabeça espermática derivado de um mesmo animal.

A morfometria da cabeça dos espermatozoides em ganhões vem sendo padronizada, possibilitando relacionar clinicamente as diferenças morfométricas entre animais férteis ou subférteis. Com este objetivo, estudaram-se os parâmetros morfométricos da cabeça dos espermatozoides de ganhões férteis e subférteis, usando o sistema automatizado de análises espermáticas por computador. Gravance et al. (1996) utilizaram dez ganhões férteis ( $\geq 60\%$  taxa de concepção) e dez subférteis ( $< 40\%$  taxa de concepção). A média das mensurações das cabeças dos espermatozoides entre o grupo de ganhões férteis e subférteis foi respectivamente de 5,35 e 5,81  $\mu\text{m}$  de comprimento; 2,79 e 2,90  $\mu\text{m}$  de largura; 11,43 e 12,66  $\mu\text{m}^2$  de área e 13,76 e 14,68  $\mu\text{m}$  de perímetro. Os valores foram significativamente maiores ( $P < 0,01$ ) para o grupo subfértil. As variações dos valores das medidas da cabeça espermática do maior agrupamento de ganhões férteis foram para comprimento 4,9-5,7  $\mu\text{m}$ , largura 2,5-3,0  $\mu\text{m}$ , área 10,3-12,1  $\mu\text{m}^2$  e perímetro 12,9-14,2  $\mu\text{m}$ . O resultado médio da morfometria da cabeça dos espermatozoides de ganhões subférteis foi significativamente maior para comprimento, largura, área e perímetro, mas não para a relação largura/comprimento, indicando uma tendência dos espermatozoides serem mais delgados no grupo subfértil. Ocorreram diferenças morfométricas notáveis entre duas populações de células estudadas, de forma que os autores consideraram o método bastante objetivo e auxiliar nas variações clínicas para a detecção da subfertilidade. Ressalte-se que esta técnica ainda é válida e muito empregada.

Mais recentemente, Severa et al. (2010) reportaram estudo sobre a quantificação e a variação de cabeça de espermatozoides de ganhões. Eles estudaram as características de cabeça, incluindo a relação do comprimento com a largura, inserção no centro de gravidade, curvatura e o grau esférico. As imagens foram analisadas mediante a descrição elíptica de Fourier e a transformação inversa de Fournir. O estudo confirmou quantitativamente que a relação comprimento da cabeça com a largura foram os parâmetros que mais contribuíram na variação entre espermatozoides normais e defeituosos.

## Avaliação espermática com a utilização de sondas fluorescentes

Todos os testes laboratoriais de análise de sêmen buscam a capacidade fertilizante do espermatozoide. Dentre estes, a técnica que utiliza sondas fluorescentes vem ganhando importância por sua característica de marcar estruturas específicas das células e de detectar a integridade estrutural ou funcionalidade de forma clara (CELEGHINI et al., 2005). Várias sondas fluorescentes podem ser utilizadas para a avaliação da integridade da membrana plasmática espermática, como o brometo de etídio (HALANGK; FRANK; BOHNENSACK, 1984), corantes supravitais Hoechst 33258 (H258), 33342 (H342) (CASEY et al., 1993; MAXWELL; WELCH; JOHNSON, 1997), SYBR-14 (GARNER; THOMAS; GRAVANCE, 1999; THOMAS et al., 1998) e diacetato de carboxifluoresceína (CFDA) (SOUZA, 2001). Todavia, o iodeto de propídio tem-se destacando em pesquisas pela facilidade de preparação e aplicação da técnica, estabilidade e eficiência na avaliação da integridade da membrana plasmática. Essa sonda possui afinidade ao DNA e cora em vermelho o núcleo de células com membrana plasmática lesada (ARRUDA, 2000; ARRUDA et al., 2003b; CELEGHINI et al., 2005).

Já a aglutinina de *Pisum sativum* (PSA), quando conjugada a isotiocionato de fluoresceína (FITC), marca com sucesso o acrossomo espermático na cor verde-amarelo, o que facilita a visualização e a identificação dos acrossomos lesados, sendo utilizado em espermatozoides humanos (CROSS et al., 1986; MENDOZA et al., 1992; TESARIK et al., 1993), bovinos (GRAHAM; KUNZE; HAMMERSTEDT, 1990; ARRUDA; CELEGHINI, 2003), equinos (ARRUDA, 2000; ARRUDA, 2003b, CASEY et al., 1993; FARLIN et al., 1992; CELEGHINI et al., 2004) e suínos (MATTIOLI et al., 1996).

O uso da FITC-PSA para avaliar a integridade do acrossomo de células espermáticas equinas *in natura* ou submetidas à criopreservação foi investigado (FARLIN et al. 1992; ARRUDA et al., 2003a). Para tanto, misturas de diferentes proporções de espermatozoides com cromossomo intacto (sêmen fresco) e espermatozoides com acrossomo danificado (sêmen criopreservado) foram avaliadas. Houve correlação positiva entre a porcentagem de espermatozoides ligados à FITC-PSA e a proporção de espermatozoides com acrossomo danificado nas

amostras ( $r = 0,98$ ;  $P < 0,05$ ), comprovando a eficiência de seu uso na determinação da integridade do acrossomo (FARLIN et al., 1992).

Para comprovar a eficiência e especificidade do FITC-PSA na avaliação da integridade de membrana acrossomal, Souza (2001) comparou quatro técnicas: câmara úmida por microscopia de contraste de fase, interferência diferencial, coloração por Trypan Blue/Giemsa e microscopia de epifluorescência, utilizando como marcador o FITC-PSA nas amostras de sêmen equino pós-descongelamento.

Quanto à peça intermediária do espermatozoide, existem sondas fluorescentes próprias para avaliação da funcionalidade mitocondrial, dentre as quais se destaca a carbocianina catiônica lipofílica, JC-1 (iodeto de 5,5', 6,6'-tetracloro 1,1', 3,3'-tetraetilbenzimidazolcarbocianina). Essa sonda possui baixa toxicidade, boa solubilidade e características fluorescentes apropriadas para detecção por sistema de filtros, comumente usada em microscopia de epifluorescência (SMILEY et al., 1991). Tal corante necessita de potencial de membrana mitocondrial altamente negativo para penetrar na organela e emitir fluorescência nos comprimentos de onda de luz vermelha ou verde, de acordo com sua concentração interna final. Em altas concentrações, o corante apresenta-se na forma de j-agregado (JC-1) e emite coloração vermelha, enquanto que em baixas concentrações encontra-se na forma de monômero e emite coloração verde. Então, em mitocôndrias funcionais, que apresentam potencial de membrana mitocondrial altamente negativo (-180 mV), o JC-1 penetra e acumula-se no interior desta organela e emite coloração vermelha (REERS; SMITH; CHEN, 1991). Assim, a formação e manutenção de j-agregados no interior da mitocôndria são dependentes do gradiente eletroquímico (SMILEY et al., 1991). O JC-1 possui absorvância máxima de 510 e 585 nm e uma fluorescência máxima de 520 e 585 nm para monômeros e j-agregados, respectivamente.

Para avaliar a eficiência do JC-1 e a funcionalidade da mitocôndria, ou seja, a capacidade desta organela em produzir ATP, Bradbury et al. (2000) coraram células leucêmicas humanas com fluocromo e encontraram alta correlação positiva ( $r = 0,87$ ;  $P < 0,01$ ) entre a quantidade de ATP intracelular e a porcentagem de células com alto potencial de membrana mitocondrial e alta correlação negativa ( $r = -0,88$ ;  $P < 0,01$ ) entre ATP e células com baixo potencial de

membrana mitocondrial. Este corante fluorescente também vem sendo utilizado com sucesso para estimar o potencial de membrana mitocondrial, em diferentes espécies, como a bovina (GARNER et al., 1997; THOMAS et al., 1998; CELEGHINI et al., 2005), equina (GRAVANCE et al., 2000; NASCIMENTO et al., 2008), ovina (MARTINEZ-PASTOR et al., 2004) e humana (TROIANO et al., 1998).

Assim, as associações de sondas fluorescentes permitem avaliar concomitantemente mais do que um compartimento da célula espermática. Dentre as técnicas validadas, a associação PI, FITC-PSA E JC-1 é a melhor, já que esta permite separar as populações de células com alto e baixo potencial de membrana mitocondrial de maneira mais clara (CELEGHINI et al., 2004; CELEGHINI et al., 2005).

### **Avaliação das proteínas do plasma seminal e membranas espermáticas**

O sucesso da reprodução animal depende de uma cascata de eventos, baseando-se na espermatogênese e na maturação espermática. Posteriormente durante a ejaculação, diferentes secreções provenientes das glândulas acessórias dos machos promoverão mudanças importantes na composição da membrana espermática e das proteínas de superfície. Na sequência, os espermatozoides deverão ser capacitados durante a passagem pelo trato genital feminino, para sofrerem a reação do acrossomo, até que um deles seja capaz de penetrar a zona pelúcida e finalmente se fundir com o oócito. Cada um destes passos é mediado por um número de proteínas e consequentemente por genes (LEEB; SIEME; TÖPFER-PETERSEN, 2005).

Proteínas específicas já são utilizadas como marcadores de fertilidade para humanos e bovinos. Nos equinos algumas também já foram identificadas, como a família de proteínas ricas em cisteína (CRISPs), a família das espermedesinas e a família de proteínas com número variável de domínios de fibronectina do tipo II (Fn-2) (LEEB; SIEME; TÖPFER-PETERSEN, 2005).

As proteínas CRISPs estão implicadas com várias funções relacionadas à fusão espermatozoide-oócito e são expressas sob controle androgênico. Em equinos, o gene da CRISP1, também chamada de AEG1 (glicoproteína acidífera epididimária 1), é expresso

ao longo do epidídimo, enquanto que o gene da CRISP2 (ou TPX1 – proteína equina específica do testículo 1) é expresso no testículo, epidídimo e glândulas vesiculares (GIESE et al., 2002). A CRISP 2 pode ter função na interação entre as células de Sertoli e os espermatozoides no testículo. A CRISP3 é expressa em grande quantidade no plasma seminal de garanhões, começando a ser expressa a partir do epidídimo até o resto do trato genital, com alta expressão na ampola (SCHAMBONY et al., 1998). As CRISPs se ligarão principalmente na região equatorial, pós-acrossomal e na peça intermediária dos espermatozoides (TÖPFER-PETERSEN et al., 2005). Segundo Töpfer-Petersen et al. (2005), também já foi observada a completa perda da expressão de CRISP2 no testículo e no epidídimo de um garanhão criptorquídico. O segundo grupo de proteínas importantes em equinos, são as espermedesinas, que possuem de 110 a 113 aminoácidos e compreendem um único domínio CUB estabilizado por duas pontes dissulfídicas. São proteínas multifuncionais que exibem habilidade para se ligar à heparina, a inibidores de proteinase, fosfolipídeos e a carboidratos (TÖPFER-PETERSEN et al., 2005). No equino, a HSP-7 é a representante, sendo que ela se liga à zona pelúcida intacta, mostrando sua função na interação espermatozoide-zona pelúcida (REINERT et al., 1996). A HSP-7 é secretada no trajeto do espermatozoide pelo epidídimo e se liga ao espermatozoide formando uma banda proeminente na região equatorial (TÖPFER-PETERSEN et al., 2005).

Em equinos, as proteínas Fn-2 são caracterizadas por dois módulos de fibronectina tipo II, sendo denominadas de EQ-12. Elas são produzidas no corpo e na cauda do epidídimo e exercem funções sobre a membrana plasmática, o que pode ajudar a explicar alterações nas propriedades de membrana, principalmente sobre o mecanismo da capacitação e que podem preceder o processo de capacitação induzido por heparina (MANJUNATH; THERIEN, 2002). Outras proteínas também estão envolvidas com a função flagelar, e, portanto, com a motilidade espermática. Recentemente, o gene AKAP4 (proteína 4 ligada à quinase A) foi parcialmente clonado e caracterizado no equino (TURNER et al., 2005), estando envolvido na compartimentalização da proteína quinase A no flagelo.

## Avaliação da cromatina espermática

O plasma seminal é uma complexa mistura de substâncias orgânicas e inorgânicas com muitas propriedades que melhoram a qualidade espermática, incluindo a ativação da motilidade espermática e a proteção dos espermatozoides das espécies oxigênio reativas (EROS), mas pode alterar a integridade do DNA espermático. Em um estudo conduzido por Love et al. (2005), ficou demonstrado que o aumento da quantidade de plasma seminal em ganhões altamente férteis pode levar a um declínio na integridade do DNA, sem, contudo serem observadas queda na motilidade. Estudos têm demonstrado que a qualidade do DNA espermático de alguns ganhões de menor fertilidade pode declinar a uma taxa maior do que a observada em ganhões férteis com condições de estocagem similares (LOVE, 2005). A desnaturação da cromatina é mais alta no sêmen de ganhões subférteis em comparação a ganhões férteis (32% versus 16%) e o escore de desnaturação é negativamente correlacionado com a taxa de prenhez (KENNEY et al., 1995). A análise da estrutura da cromatina do espermatozoide (SCSA) é um método para se determinar a susceptibilidade do DNA espermático à desnaturação, a qual é relacionada à fertilidade. Esse teste usa uma sonda metacromática, laranja de acridina, para avaliar a relação do DNA simples (anormal) e duplo-filamento (nativo) presente em um espermatozoide, por meio da fluorescência verde ou laranja emitida por cada espermatozoide. A SCSA pode ser utilizada para avaliar a integridade do DNA no sêmen fresco, resfriado ou congelado (LOVE, 2005). Normalmente, alguns ganhões que exibem elevação do número de DNA comprometido em sêmen fresco, também têm uma taxa acelerada na queda da qualidade do DNA quando o sêmen é resfriado ou estocado por longo tempo (LOVE et al., 2002).

## Avaliação espermática por citometria de fluxo

A integridade da membrana plasmática é essencial para o funcionamento do espermatozoide. Diferentes métodos de avaliação da integridade das membranas plasmática e acrossomal têm sido testados. Entre esses testes podemos citar os que usam fluorocromos (citados anteriormente).

As avaliações, quando analisadas por microscopia de fluorescência, apenas avaliam de 100 a 200 células. Entretanto há um ganho considerável quando o uso de sondas fluorescentes para a análise das organelas é combinada com o uso da citometria de fluxo já que a citometria permite a análise de milhares de células por segundo (PEÑA; JOHANNISSON; LINDEFORSBERG, 1999). Diferentes sondas fluorescentes têm sido utilizadas em conjunto à citometria de fluxo para mensurar a viabilidade espermática de diferentes espécies (GRAHAM; KUNZE; HAMMERSTEDT, 1990; GARNER; JOHNSON, 1995; PAPAIOANNOU et al., 1997). Em ganhões, a citometria de fluxo tem sido aplicada para avaliar a integridade da membrana plasmática (BOLANOS et al., 2012) e o iodeto de propídeo (PI) para verificar o estado do acrossoma (PAPAIOANNOU et al., 1997), PI e SYBR-14 (MERKIES et al., 2000; BOE-HANSEN et al., 2001; LANDIM-ALVARENGA et al., 2001; KIRK et al., 2001), PI e FITC-PNA (RATHI et al., 2001), PI e PE-PSA (WILHELM; GRAHAM; SQUIRES, 1996), PI e FITC-PSA (ANDRADE et al., 2006).

Além da análise da integridade das membranas plasmática e acrossomal, a citometria de fluxo (BOLANOS et al., 2012; GARNER; EVANS; SEIDEL, 2013) combinada ao uso de fluoróforos permite a avaliação do potencial de membrana mitocondrial, integridade do DNA, peroxidação lipídica, capacitação e reação acrossômica, apoptose dentre outros. A peroxidação lipídica da membrana plasmática é uma das causas que prejudicam a função espermática no sêmen, tanto a fresco como pós-criopreservação. A sonda lipofílica fluorescente C11-BODIPY581/591 pode ser usada para avaliar as mudanças causadas pela peroxidação lipídica no espermatozoide equino. Essa sonda é um análogo de ácidos graxos polissaturados, que se incorpora na membrana celular. Enquanto este fluoróforo está intacto, é observada uma fluorescência vermelha e com a sua peroxidação há uma mudança de fluorescência para verde, que pode ser detectada pelo citômetro de fluxo (BALL; VO, 2002; NEILD et al., 2005).

Mais recentemente, a citometria de fluxo tem sido preconizada na sexagem de espermatozoides de mamíferos incluindo bovinos, suínos, equinos, pequenos ruminantes, caninos e felinos e até em humanos visando à separação de espermatozoides X e Y. O método é baseado na precisa coloração do DNA do espermatozoide com o específico fluorófono ácido nucleico (Hoechst 33342), visando diferenciar as



subpopulações de espermátides X e Y. Os espermatozoides coloridos por fluorescência são então separados, utilizando-se uma especial e elevada velocidade de separação, recolhidos em meio biológico antes de reconcentrar e criopreservar em quantidade necessária ao uso da inseminação artificial para algumas espécies ou para a fertilização *in vitro*. Isso já foi usado em espermatozoides em escala comercial tendo a acurácia de 90 % (GARNER; EVANS; SEIDEL, 2013).

### **Fecundação *in vitro* (FIV) como parâmetro de avaliação da capacidade de fecundação dos espermatozoides**

Somente espermatozoides capacitados e com reação acrossômica (RA) estão aptos a penetrar na zona pelúcida e fecundar o oócito. Entretanto na fecundação *in vitro* outros fatores são importantes, como a concentração de espermatozoides a ser utilizada e o período em que esses espermatozoides vão permanecer em contato com os oócitos. O excesso de espermatozoides pode gerar um ambiente hostil aos oócitos e aos zigotos recém-formados durante o cultivo para fecundação, provocado principalmente pela presença de maior quantidade de enzimas hidrolíticas e radicais livres, liberados no meio de cultivo pelos espermatozoides (REHMAN et al., 1994). Um período de cultivo excessivo também pode ter ação semelhante por proporcionar maior tempo de contato dos oócitos com essas substâncias tóxicas.

Ramos et al. (2000), trabalhando com sêmen de bovinos, avaliaram duas concentrações espermáticas ( $2$  e  $4 \times 10^6$  espermatozoides/mL) e dois períodos de incubação (12 e 18h) não observando porém diferença na taxa de penetração espermática, fecundação monoespermática, polispermia e clivagem. Entretanto a utilização de concentrações menores ( $1 \times 10^6$  espermatozoides/mL) pode reduzir a taxa de polispermia, quando comparada com a concentração de  $4 \times 10^6$  espermatozoides/mL, sem afetar a taxa de fecundação (CAMARGO et al., 2001).

### **Conclusões**

Diversos pontos desafiadores ainda persistem dentro da reprodução equina, principalmente em relação aos avanços das biotécnicas da reprodução.

Comparativamente às dificuldades a serem suplantadas em relação à espécie bovina, há um longo caminho a percorrer. Vários grupos de pesquisadores têm se dedicado à reprodução equina mais aprofundada, atuando nas dificuldades inerentes ao não convencional. Pesquisadores têm procurado intensamente desenvolver ensaios laboratoriais que venham a alavancar 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 oócito. O oócito por si só, após ser liberado do ovário ou ser retirado, deve passar por uma série de eventos complexos nos ovidutos ou nos meios enriquecidos (FIV). Somando-se a isso o espermatozoide deve estar capacitado, pronto para se fundir ao oócito e levar adiante as sucessivas clivagens dos blastômeros. Infelizmente, isolados testes laboratoriais não conseguem estimar o potencial de fertilidade do sêmen, apesar do empenho de pesquisadores e de laboratórios bem equipados.

### **Referências**

- ANDRADE, A. F. C. et al. Seminal plasma reduce acrosome reaction in post-thawed equine spermatozoa. **Animal Reproduction Science**, v. 3, n. 2, p. 266, 2006.
- ARRUDA, R. P. **Avaliação dos efeitos de diluidores e crioprotetores para o espermatozoide equino pelo uso de microscopia de epifluorescência, citometria de fluxo, análises computadorizadas da motilidade (CASA) e da morfometria (ASMA)**. 2000. 121 f. Tese (Livre Docência) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2000.
- ARRUDA, R. P. et al. Determinação da integridade da membrana plasmática e acrossomo de espermatozoides de garanhões pela técnica de citometria de fluxo. In: XVII REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE TECNOLOGIA DE EMBRIÕES, 2003, Beberibe, CE. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 31, p. 226-227, 2003b.
- ARRUDA, R. P.; CELEGHINI, E. C. C. Validação de técnica para avaliação simultânea das membranas plasmática, acrossomal e mitocondrial de espermatozoides bovinos. In: XVII REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE TECNOLOGIA DE EMBRIÕES, 2003, Beberibe, CE. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 31, p. 230-231, 2003.

- ARRUDA, R. P. et al. Avaliação dos efeitos de diluidores e crioprotetores para espermatozoides de garanhões utilizando análises computadorizada da motilidade (CASA) e citometria de fluxo. In: XVII REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE TECNOLOGIA DE EMBRIÕES, 2003, Beberibe, CE. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 31, p. 228-229, 2003a.
- BALL, B. A.; MOHAMMED, H. O. Morphometry of stallion spermatozoa by computer-assisted image analysis. **Theriogenology**, v. 44, n. 3, p. 367-77, 1995. doi:10.1016/0093-691X(95)00191-A.
- BALL, B. A.; VO, A. Detection of lipid peroxidation in equine spermatozoa based upon the lipophilic fluorescent dye C11-BODIPY581/591. **Journal of Andrology**, v. 23, n. 2, p. 259-269, 2002. PMID:11868820.
- BLACH, E. L. et al. Change in quality of stallion spermatozoa during cryopreservation: plasma membrane integrity and motion characteristics. **Theriogenology**, v. 31, n. 2, p. 283-298, 1989. doi:10.1016/0093-691X(89)90533-5.
- BOE-HANSEN, G. et al. Using flow cytometry for assessment of the quality of frozen-thawed stallion semen. **Animal Reproduction Science**, v. 68, n. 3-4, p. 328-329, 2001. doi:10.1016/S0378-4320(01)00163-4.
- BOLAÑOS, J. M. G. et al. Autophagy and apoptosis have a role in the survival or death of stallion spermatozoa during conservation in refrigeration. **PLoS One**, v. 7, n. 1, p. e30688, 2012. doi:10.1371/journal.pone.0030688.
- BRADBURY, D. A. et al. Measurement of the ADP:ATP ratio in human leukaemic cell lines can be used as an indicator of cell viability, necrosis and apoptosis. **Journal of Immunological Methods**, v. 240, n. 1-2, p. 79-92, 2000. doi:10.1016/S0022-1759(00)00178-2.
- BRITO, L. F. C. et al. Effect of method and clinician on stallion sperm morphology evaluation. **Theriogenology**, v. 76, n. 4, p. 745-750, 2011. doi:10.1016/j.theriogenology.2011.04.007.
- CAMARGO, L. S. A. et al. Fecundação *in vitro* com sêmen de touros da raça Gir. **Cadernos Técnicos de Veterinária e Zootecnia**, n. 35, p. 89-96, 2001.
- CARNEIRO, G. F. Maturação *in vitro* de oócitos equinos. **Ciência e Tecnologia Veterinária**, v. 2, n. 2, p. 5-10, 2002.
- CASEY, P. J. et al. Validation of an acrosomal stain for equine sperm that differentiates between living and dead sperm. **Journal of Andrology**, v. 14, n. 4, p. 289-297, 1993. doi:10.1002/j.1939-4640.1993.tb03367.x.
- COLÉGIO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL - CBRA. **Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal**. 2. ed. Belo Horizonte: CBRA, 1998.
- CELEGHINI, E. C. C. et al. Simultaneous evaluation of the plasmatic, acrosomal and, mitochondrial membranes in equine spermatozoa. In: INTERNATIONAL CONGRESS ON ANIMAL REPRODUCTION, 15., 2004, Porto Seguro, BA. **Proceedings...** Porto Seguro: ICAR, 2004. p. 511.
- CELEGHINI, E. C. C. et al. Uso de CMXRos e JC-1 na avaliação da função mitocondrial, associadas a sondas fluorescentes para avaliação da membrana plasmática e acrossomal em espermatozoides bovinos. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 33, supl. 1, p. 321, 2005.
- CENTOLA, G. M. Comparison of manual microscopic and computer-assisted methods for analysis of sperm count and motility. **Archives of Andrology**, v. 36, n. 1, p. 1-7, 1996. PMID:8824662.
- CONFEDERAÇÃO NACIONAL DA AGRICULTURA – CNA. **CNA cria comissão para tratar do agronegócio do cavalo**. 2003. Disponível em: <<http://www.cna.org.br/AgropecuariaAgora/Agora03/ag297.htm>>. Acesso em: abr. 2013.
- CROSS, N. L. et al. Two simple methods for detecting acrosome-reacted human sperm. **Gamete Research**, v. 15, n. 3, p. 213-226, 1986. doi:10.1002/mrd.1120150303.
- DAVIS, R. O.; GRAVANCE, C. G.; CASEY, P. J. Automated morphometric analysis of stallion spermatozoa. **American Journal of Veterinary Research**, v. 54, n. 11, p. 1808-1811, 1993. PMID:8291755.
- EDWARDS, J. J.; TOLLAKSEN, S. L.; ANDERSON, N. G. Proteins of human semen. I. Two-dimensional mapping of human seminal fluid. **Clinical Chemistry**, v. 27, n. 8, p. 1335-1340, 1981. PMID:7273394.
- EHLERS, J. et al. Standardization of computer-assisted semen analysis using an e-learning application. **Theriogenology**, v. 76, n. 3, p. 448-454, 2011. doi:10.1016/j.theriogenology.2011.02.021.

- FARLIN, M. E. et al. Assessment of *Pisum sativum* agglutinin in identifying acrosomal damage in stallion spermatozoa. **Molecular Reproduction Development**, v. 32, n. 1, p. 23-27, 1992. doi:10.1002/mrd.1080320105.
- FERREIRA, J. C. P.; NEVES NETO, J. R.; PAPA, F. O. Avaliação computadorizada das características espermáticas de garanhões com fertilidade comprovada. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 21, n. 3, p. 131-32, 1997.
- GARNER, D. L.; EVANS, K. M.; SEIDEL, G. E. Sex-sorting sperm using flow cytometry/cell sorting. **Methods in Molecular Biology**, v. 927, p. 279-295, 2013. PMID:22992923.
- GARNER, D. L.; JOHNSON, L. A. Viability assessment of mammalian sperm using SYBR-14 and propidium iodide. **Biology of Reproduction**, v. 53, n. 2, p. 276-284, 1995. PMID:7492679.
- GARNER, D. L.; THOMAS, A. C.; GRAVANCE, C. G. The effect of glycerol on the viability, mitochondrial function and acrosomal integrity of bovine spermatozoa. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 34, n. 5, p. 399-404, 1999. doi:10.1111/j.1439-0531.1999.tb01392.x.
- GARNER, D. L. et al. Fluorometric assessments of mitochondrial function and viability in cryopreserved bovine spermatozoa. **Biology of Reproduction**, v. 57, n. 6, p. 1401-1406, 1997. PMID:9408246.
- GIESE, A. et al. Molecular characterization of the equine testis-specific protein 1 (TPX1) and acidic epididymal glycoprotein 2 (AEG2) genes encoding members of the cysteine-rich secretory protein (CRISP) family. **Gene**, v. 299, n. 1-2, p. 101-109, 2002. doi:10.1016/S0378-1119(02)01018-1.
- GIESECKE, K. et al. Evaluation of ACE, SP17, and FSHB as candidates for stallion fertility in Hanoverian warmblood horses. **Animal Reproduction Science**, v. 126, n. 3-4, p. 200-206, 2011. doi:10.1016/j.anireprosci.2011.05.007.
- GOOVAERTS, I. G. F. et al. Evaluation of epididymal semen quality using the Hamilton-Thorne analyzer indicates variation between the two caudae epididymides of same bull. **Theriogenology**, v. 66, n. 2, p. 323-30, 2006. doi:10.1016/j.theriogenology.2005.11.018.
- GOUDET, G. Fertilisation in the horse and paracrine signalling in the oviduct. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 23, n. 8, p. 941-951, 2011. doi:10.1071/RD10285.
- GRAHAM, J. K.; KUNZE, E.; HAMMERSTEDT, R. H. Analysis of sperm cell viability, acrosomal integrity, and mitochondrial function using flow cytometry. **Biology of Reproduction**, v. 43, n. 1, p. 55-64, 1990. PMID:2393693.
- GRAVANCE, C. G. et al. Assessment of equine sperm mitochondrial function using JC-1. **Theriogenology**, v. 53, n. 9, p. 1691-1703, 2000. doi:10.1016/S0093-691X(00)00308-3.
- GRAVANCE, C. G. et al. Quantification of normal head morphometry of stallion spermatozoa. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 108, n. 1, p. 41-46, 1996. PMID:8958826.
- HALANGK, W.; FRANK, K.; BOHNENSACK, R. Zur Bestimmung der Menge intakter Spermien in Bullenejakulaten. **Archiv für experimentelle Veterinärmedizin**, v. 38, n. 1, p. 105-114, 1984.
- HINRICHS, K. *In vitro* production of equine embryos: state of the art. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 45, suppl. 2, p. 3-8, 2010. doi:10.1111/j.1439-0531.2010.01624.x.
- HINRICHS, K. et al. *In vitro* fertilization of *in vitro*-matured equine oocytes: Effects of maturation medium, duration of maturation, and sperm calcium ionophore treatment, and comparison with rates of fertilization *in vivo* after oviductal transfer. **Biology of Reproduction**, v. 67, n. 1, p. 256-262, 2002.
- HOOGEWIJS, M. K. et al. Influence of counting chamber type on CASA outcomes of equine semen analysis. **Equine Veterinary Journal**, v. 44, n. 5, p. 542-549, 2012. doi:10.1111/j.2042-3306.2011.00523.x.
- JANUSKAUSKAS, A. et al. Effect of cooling rates on post-thaw sperm motility, membrane integrity, capacitation status and fertility of dairy bull semen used for artificial insemination in Sweden. **Theriogenology**, v. 52, n. 4, p. 641-58, 1999. doi:10.1016/S0093-691X(99)00159-4.
- KANAYAMA, C. Y.; BELETTI, M. E. Avaliação computacional da compactação da cromatina e de características morfométricas da cabeça de espermatozoides de coelho (*oryctolagus cuniculus*). **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 63, n. 1, p. 94-99, 2011. doi:10.1590/s0102-09352011000100015.
- KENNEY, R. M. et al. Relationship between sperm chromatin structure, motility and morphology of ejaculated sperm and seasonal pregnancy rate. In: SHARP, D. C.; BAZER, F. W. (Ed.). **Equine reproduction VI**. Madison, WI: Society for the Study of Reproduction, 1995. p. 647-653. (Biology of Reproduction, Monograph series 1).

- KIRK, E. S. et al. Evaluation frozen semen by flow cytometry. **Animal Reproduction Science**, v. 68, n. 3-4, p. 348-349, 2001. doi:10.1016/S0378-4320(01)00163-4.
- LANDIM-ALVARENGA, F. C. et al. Viability and ultrastructure of stallion spermatozoa cryopreserved with glycerol and DMSO. **Animal Reproduction Science**, v. 68, n. 3-4, p. 341-342, 2001. doi:10.1016/S0378-4320(01)00163-4.
- LANGE-CONSIGLIO, C. A. et al. Effects of leptin on *in vitro* maturation, fertilization and embryonic cleavage after ICSI and early developmental expression of leptin (Ob) and leptin receptor (ObR) proteins in the horse. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 7, p. 113-123, 2009. doi:10.1186/1477-7827-7-113.
- LEEB, T.; SIEME, H.; TÖPFER-PETERSEN, E. Genetic markers for stallion fertility – lessons from humans and mice. **Animal Reproduction Science**, v. 89, n. 1-4, p. 21-29, 2005. PMID:16054786.
- LINDAHL, J. et al. Stallion spermatozoa selected by single layer centrifugation are capable of fertilization after storage for up to 96 h at 6 °C prior to artificial insemination. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v. 54, p. 40, 2012. doi:10.1186/1751-0147-54-40.
- LOVE, C. C. et al. Relationship of seminal plasma level and extender type to sperm motility and DNA integrity. **Theriogenology**, v. 63, n. 6, p. 1584-1591, 2005. PMID:15763103.
- LOVE, C. C. et al. Effect of storage time and temperature on stallion sperm DNA and fertility. **Theriogenology**, v. 57, n. 3, p. 1135-1142, 2002. doi:10.1016/S0093-691X(01)00689-6.
- LOVE, C. C. The sperm chromatin structure assay: a review of clinical applications. **Animal Reproduction Science**, v. 89, n. 1-4, p. 39-45, 2005. doi:10.1016/j.anireprosci.2005.06.019.
- LOVE, C. C. Stallion semen evaluation and interpretation. In: ANNUAL CONFERENCE OF SOCIETY FOR THERIOGENOLOGY & AMERICAN COLLEGE OF THERIOGENOLOGISTS, 2002, Colorado Springs, CO. **Proceedings...** Colorado Springs: SFT/ACT, 2002. p. 93-102.
- LOVE, C. C. Relationship between sperm motility, morphology and the fertility of stallions. **Theriogenology**, v. 76, n. 3, p. 547-557, 2011. doi:10.1016/j.theriogenology.2011.03.007.
- MANJUNATH, P.; THERIEN, I. Role of seminal plasma phospholipid-binding proteins in sperm membrane lipid modification that occurs during capacitation. **Journal of Reproduction Immunology**, v. 53, n. 1-2, p. 109-119, 2002. doi:10.1016/S0165-0378(01)00098-5.
- MARTINEZ-PASTOR, F. et al. Use of chromatin stability assay, mitochondrial stain JC-1, and fluorometric assessment of plasma membrane to evaluate frozen-thawed ram semen. **Animal Reproduction Science**, v. 84, n. 1-2, p. 121-133, 2004. PMID:15302392.
- MATTIOLI, M. et al. Identification of capacitation in boar spermatozoa by chortetetracycline staining. **Theriogenology**, v. 45, n. 2, p. 373-381, 1996.
- MAXWELL, W. M. C.; WELCH, G. R.; JOHNSON, L. A. Viability and membrane integrity of spermatozoa after dilution and flow cytometric sorting in the presence or absence of seminal plasma. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 8, n. 8, p. 1165-1178, 1997. PMID:8981641.
- MENDOZA, C. et al. Distinction between true acrosome reaction and degenerative acrosome loss by a one-step staining method using *Pisum sativum* agglutinin. **Journal of Reproduction Fertility**, v. 95, n. 3, p. 755-763, 1992. PMID:1383539.
- MERKIES, K. et al. Assessment of stallion spermatozoa viability by flow cytometry and light microscope analyses. **Theriogenology**, v. 54, n. 8, p. 1215-1224, 2000. doi:10.1016/S0093-691X(00)00428-3.
- MORRELL, J. M.; DALIN, A. M.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Comparison of density gradient and single layer centrifugation of stallion spermatozoa: yield, motility and survival. **Equine Veterinary Journal**, v. 41, n. 1, p. 53-58, 2009. doi:10.2746/042516408X322139.
- NASCIMENTO, J. et al. Effects of sperm concentration and straw volume on motion characteristics and plasma, acrosomal, and mitochondrial membranes of equine cryopreserved spermatozoa. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 28, n. 6, p. 351-358, 2008. doi:10.1016/j.jevs.2008.04.010.
- NEILD, D. M. et al. Lipid peroxide formation in relation to membrane stability of fresh and frozen thawed stallion spermatozoa. **Molecular Reproduction and Development**, v. 72, n. 2, p. 230-238, 2005. PMID:15948163.

- NICACIO, A. **Clonagem de equinos**. Revista Dinheiro Rural. Seção Agrotecnologia. Edição 37, 2007. Disponível em: <<http://revistadinheiorural.terra.com.br/secao/agrotecnologia/clonagem-de-equinos>>. Acesso em: abr. 2013.
- PAPAIANOOU, K. Z. et al. Assessment of viability and mitochondrial function of equine spermatozoa using double staining and flow cytometry. **Theriogenology**, v. 48, n. 2, p. 299-312, 1997. doi:10.1016/S0093-691X(97)84077-0.
- PEÑA, A. L.; JOHANNISSON, A.; LINDE-FORSBERG, C. Post-thaw evaluation of dog spermatozoa using new triple fluorescent staining and flow cytometry. **Theriogenology**, v. 52, n. 6, p. 965-980, 1999. PMID:10735104.
- PESCH, S.; BERGMANN, M.; BOSTEDT, H. Determination of some enzymes and macro- and microelements in stallion seminal plasma and their correlations to semen quality. **Theriogenology**, v. 66, n. 2, p. 307-313, 2006. PMID:16413936.
- RAMOS, A. A. et al. Fecundação *in vitro* com sêmen de bovinos da raça Gir. **Arquivos brasileiros de medicina veterinária e zootecnia**, v. 52, n. 4, p. 360-365, 2000. doi:10.1590/s0102-09352000000400013.
- RATHI, R. et al. Evaluation of *in vitro* capacitation of stallion spermatozoa. **Biology of Reproduction**, v. 65, n. 2, p. 462-470, 2001. PMID:11466214.
- REERS, M.; SMITH, T. W.; CHEN, L. B. J-aggregate formation of a carbocyanine as a quantitative fluorescent indicator of membrane potential. **Biochemistry**, v. 30, n. 18, p. 4480-4486, 1991. doi:10.1021/bi00232a015.
- REHMAN, N. et al. Effect of sperm exposure time on *in vitro* fertilization and embryo development of oocytes matured *in vitro*. **Theriogenology**, v. 41, n. 7, p. 1447-1452, 1994. doi:10.1016/0093-691X(94)90195-0.
- REINERT, M. et al. Primary structure of stallion seminal plasma protein HSP-7, a zona-pellucida-binding protein of the spermadhesin family. **European Journal of Biochemistry**, v. 242, n. 3, p. 636-640, 1996. PMID:9022691.
- RODRIGUES, A. C. N.; ROCHA, J. V.; BELETTI, M. E. Análise computacional da compactação da cromatina de espermatozoides de galo. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 61, n. 6, p. 45-49, 2009. doi:10.1590/s0102-09352009000600008.
- SCHAMBONY, A. et al. Expression of CRISP proteins in the male equine genital tract. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 53, p. 67-72, 1998. PMID:10645267.
- SEVERA, L. et al. Evaluation of shape variability of stallion sperm heads by means of image analysis and Fourier descriptors. **Animal Reproduction Science**, v. 119, n. 1-2, p. 50-55, 2010. doi:10.1016/j.anireprosci.2009.12.007.
- SIEME, H.; HARRISON, R. A.; PETRUNKINA, A. M. Cryobiological determinants of frozen semen quality, with special reference to stallion. **Animal Reproduction Science**, v. 107, n. 3-4, p. 276-292, 2008. doi:10.1016/j.anireprosci.2008.05.001.
- SIEME, H. et al. Application of techniques for sperm selection in fresh and frozen-thawed stallion semen. **Reproduction in Domestic Animal**, v. 38, n. 2, p. 134-40, 2003. PMID:12654024.
- SMILEY, S. T. et al. Intracellular heterogeneity in mitochondrial membrane potentials revealed by a J-aggregate-forming lipophilic cation JC-1. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 88, n. 9, p. 3671-3675, 1991. PMID:2023917.
- SMITS, K. et al. A pilot comparison of laser-assisted vs piezo drill ICSI for the *in vitro* production of horse embryos. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 47, n. 1, p. e1-3, 2012a. doi:10.1111/j.1439-0531.2011.01814.x.
- SMITS, K. et al. Influence of the uterine environment on the development of *in vitro*-produced equine embryos. **Reproduction**, v. 143, n. 2, p. 173-181, 2012b. doi:10.1530/REP-11-0217.
- SOUZA, N. L. **Avaliação de técnicas para determinar a viabilidade e a integridade do acrossomo de espermatozoides criopreservados equinos**. 2001. 76 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2001.
- SQUIRES, E. L. Maturation and fertilization of equine oocytes. **The Veterinary Clinics of North America (Equine Practice)**, v. 12, n. 1, p. 31-45, 1996. PMID:8726448.
- SQUIRES, E. L. et al. Embryo technologies in the horse. **Theriogenology**, v. 59, n. 1, p. 151-170, 2003. doi:10.1016/S0093-691X(02)01268-2.

- TESARIK, J.; MENDONZA, C.; CARRERAS, A. Fast acrosome reaction measure: a highly sensitive method for evaluating stimulus-induced acrosome reaction. **Fertility and Sterility**, v. 59, n. 2, p. 424-430, 1993. PMID:7678822.
- THOMAS, C. A. et al. Effect of cryopreservation on bovine sperm organelle function and viability as determined by flow cytometry. **Biology of Reproduction**, v. 58, n. 3, p. 786-793, 1998. PMID:9510967.
- TÖPFER-PETERSEN, E. et al. The role of stallion seminal proteins in fertilisation. **Animal Reproduction Science**, v. 89, n. 1-4, p. 159-170, 2005. doi:10.1016/j.anireprosci.2005.06.018.
- TROIANO, L. et al. Mitochondrial membrane potential and DNA stainability in human sperm cells: a flow cytometry analysis with implications for male infertility. **Experimental Cell Research**, v. 241, n. 2, p. 384-393, 1998. doi:10.1006/excr.1998.4064.
- TURNER, R. M. et al. Characterization of an A-kinase anchor protein in equine spermatozoa and examination of the effect of semen cooling and cryopreservation on the binding of that protein to the regulatory subunit of protein kinase-A. **American Journal of Veterinary Research**, v. 66, n. 6, p. 1056-1064, 2005. PMID:16008231.
- WILHELM, K. M.; GRAHAM, J. K.; SQUIRES, E. L. Comparison of the fertility of cryopreserved stallion spermatozoa with sperm motion analyses, flow cytometric evaluation, and zona-free hamster oocyte penetration. **Theriogenology**, v. 46, n. 4, p. 559-578, 1996. PMID:16727923.
- ZANIBONI, A. et al. Expression of fluorescent reporter protein in equine embryos produced through intracytoplasmic sperm injection mediated gene transfer (ICSI-MGT). **Animal Reproduction Science**, v. 137, n. 1-2, p. 53-61, 2012. doi:10.1016/j.anireprosci.2012.12.010.
- ZEMANOVA, J. et al. Nickel seminal concentrations in various animals and correlation to spermatozoa quality. **Journal of Veterinary Medicine**, v. 54, n. 6, p. 281-286, 2007. doi:10.1111/j.1439-0442.2007.00930.x.

Recebido: 22/04/2013

Received: 04/22/2013

Aprovado: 11/09/2013

Approved: 09/11/2013

