



## Avaliação da qualidade do sêmen de cachaços: o que é possível ser feito?

*Evaluation of the boar semen quality: what can be done?*

André Furugen Cesar de Andrade<sup>1</sup>, Marina da Silva Passarelli, Mariana Andrade Torres, Matheus Saliba Monteiro, Simone Maria Massami Kitamura Martins

Núcleo de Pesquisa em Suínos, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, Pirassununga, SP, Brasil.

<sup>1</sup>Correspondência: [andrefc@usp.br](mailto:andrefc@usp.br)

### Resumo

A utilização de técnicas avançadas para a análise de sêmen de cachaços apesar de ainda ser restrita a determinados setores do sistema de produção de suínos, tem se tornado aplicável e de extrema importância dentro, tanto de centrais comerciais de sêmen como nos centros de pesquisas ao redor do mundo. Dentre tais tecnologias, pode-se citar as análises computadorizadas da motilidade associada a avaliação da morfometria espermática, além das avaliações por sondas fluorescentes averiguando-se as integridades dos mais diferentes compartimentos celulares, podendo tais técnicas serem realizadas não apenas por microscopia de epifluorescência, mas também por citometria de fluxo. Entretanto, deve-se destacar a não individualização das técnicas abordadas, devido a inter-relação das estruturas espermáticas perante o processo de fertilização. Assim, as diversas avaliações devem ocorrer simultaneamente, tendo em vista a necessidade da perfeita integridade deste conjunto de estruturas para a perfeita fisiologia da célula espermática.

**Palavras-chave:** cachaços, avaliação seminal, CASA, sondas fluorescentes, citometria de fluxo.

### Abstract

*The use of advanced boar semen analysis although it is restricting to certain sectors of the swine production system, it is becoming relevant and extremely important in both commercial AI and research centers around the world. Of all technologies available, one may mention the computerized motility analysis (CASA) combined with sperm morphology (ASMA), and the use of fluorescent probes to verify the integrity of the different cellular compartments by means of epifluorescence microscopy or flow cytometry. However, it should be emphasized the non-individualization of the techniques discussed, due to the necessity of the perfect integrity of this set of structures for the perfect sperm cell physiology.*

**Keywords:** boars, semen assesment, CASA, fluorescent probes, flow cytometry.

### Introdução

Considerado como um sistema de produção animal de grande importância a nível mundial, a suinocultura vem aplicando ao longo dos anos tecnologias que otimizam os aspectos reprodutivos dos rebanhos, elevando a busca por animais geneticamente superiores através do alto desempenho reprodutivos dos cachaços, e como consequência a aplicação em massa de inseminações artificiais.

De elevada especialização e complexidade, a célula espermática é composta por uma arquitetura de suma importância para o desempenho de suas funções e consequente fertilização do gameta feminino (Garner e Hafez, 2004). Entretanto, os espermatozoides da espécie suína possuem uma série de particularidades, especialmente aquelas relacionadas a composição de sua membrana plasmática (De Leeuw et al., 1990), sendo tal estrutura o primeiro sitio de ação deletéria de uma série de fatores intrínsecos (como as espécies reativas de oxigênio) e extrínsecos (como o choque térmico).

Diversas são as técnicas aplicadas para a avaliação funcional dos espermatozoides, objetivando-se a identificação de danos estruturais e funcionais que possam comprometer as atividades metabólicas da célula (Martínez-Pastor et al., 2010). Deste modo, a avaliação em especial da motilidade, concentração e morfologia são consideradas avaliações essenciais, porém, quando realizadas de forma subjetiva, especialmente o aspecto motilidade, podem tornar-se imprecisos.

Com o objetivo de obter exames apurados e detalhados quanto a determinados parâmetros desejáveis do sêmen, o desenvolvimento de análises computadorizadas que demonstrem maior repetibilidade e acurácia tanto para a motilidade como para a morfometria, foram de grande importância para o avanço da andrologia na espécie suína e atualmente são amplamente aplicadas dentro do campo da pesquisa e em centrais de reprodução para tal espécie.

Já do ponto de vista fisiológico, a compreensão individual das estruturas que compõe a célula espermática em si, bem como, a sua funcionalidade, é de grande valia, considerando a importância intrínseca da



integridade plena dos espermatozoides perante a sua funcionalidade no processo de fertilização (Maxwell e Johnson, 1997). Sendo assim, compostos denominados sondas fluorescentes são capazes de marcar de forma específica diversas estruturas celulares, apresentando a real situação dos danos causados, pela biotécnicas aplicadas a andrologia (refrigeração, criopreservação, sexagem e descongelamento).

Tal como a análise computadorizada da cinética espermática vem a ser para a análises subjetivas de motilidade, a citometria de fluxo aparece como uma ferramenta de ponta para a investigação dos danos estruturais espermáticos. Por se tratar de uma técnica acurada, as análises por citometria de fluxo garantem uma maior confiança dos resultados apresentados, além de uma redução no tempo de avaliação, quando comparada as técnicas que utilizam a análise de sondas fluorescentes por microscopia (Rieseberg et al., 2001).

Com isso, o presente trabalho tem por objetivo apresentar as diversas técnicas disponíveis para a análise do sêmen suíno. Demonstrando assim, o que é possível realizar com essas ferramentas quanto a análises espermática na espécie suína.

### **Avaliação computadorizada da motilidade espermática**

A avaliação computadorizada da motilidade espermática (CASA, em inglês) consiste em um sistema automático que avalia de forma precisa a cinética individual de cada espermatozoide, perante a apresentação detalhada de diferentes parâmetros, sendo de grande relevância frente a determinação do potencial de fertilidade de cachaco (Amann e Katz, 2004).

As variações dos equipamentos utilizados no sistema CASA podem diferenciar perante as máquinas, a óptica e o software utilizado na identificação espermática e na construção da trajetória realizada pela célula (Verstegen et al., 2002). Dentre os sistemas de análises computadorizadas utilizados atualmente no mercado estão: Hamilton Thorn<sup>®</sup> (Hamilton Thorn Research, Bervely, USA); Sperm Class Analyzer<sup>®</sup> (Microptic SL, Barcelona, Espanha); AndroVision<sup>®</sup> (Minitube, Tiefenbach, Germany); Hobson Sperm Tracker<sup>®</sup> (Hobson Tracking Systems Ltda., Sheffield, Inglaterra); QualiSpermTM<sup>®</sup>, 1.3 (Biophos, Pfäffikon, Switzerland); além do SQA-Vp<sup>®</sup> - Sperm Quality Analyser Version Pig - (Medical Eletronics Systems - A-Tech, Los Angeles USA), sendo este último específico para a avaliação dos padrões de motilidade e morfologia dos espermatozoides suínos.

Os sistemas computadorizados de análise espermática além de possuírem a vantagem de retirar a subjetividade da avaliação, também são capazes de caracterizar subpopulações de células, através da associação de alguns dos diversos padrões de cinética espermática. Uma subpopulação passível de ser analisada é a de espermatozoides hiperativados, a qual pode ser caracterizada, por exemplo, pelo aumento da velocidade curvilinear (VCL, em inglês) e da amplitude de deslocamento lateral da cabeça (ALH, em inglês), uma vez que, após o processo de hiperativação espermática os espermatozoides adquirem uma movimentação não linear (Yanagimachi et al., 1994). O padrão de motilidade e consecutivamente de hiperativação é diferente entre as distintas espécies domésticas.

No início dos anos 2000 foi descrito que os espermatozoides suínos hiperativados se caracterizam por  $ALH > 3,5 \mu\text{m}$ ,  $VCL > 97 \mu\text{m/s}$ , linearidade (LIN) menor que 32% e wobble (WOB =  $VAP/VCL$ ) menor que 71% (Schmidt e Kamp, 2004). Por outro lado, os padrões de hiperativação dependem do software utilizado, uma vez que alguns softwares realizam as aferições dos parâmetros espermáticos de maneira diferente. Schmidt e Kamp (2004) utilizaram o SM-CMA (GAMBIT Technologies AG, 6330 Cham, Suíça), que é um software com baixa distribuição atualmente, o que dificulta que esses resultados sejam utilizados para a seleção de subpopulação de espermatozoides suínos hiperativados. Utilizando o sistema SCA (Sperm Class Analyzer<sup>®</sup>) Pavaneli et al (dados não publicados) descreveram que, com base nos parâmetros mensurados por esse sistema, os espermatozoides suínos são considerados hiperativados quando possuem a seguinte caracterização: retilinearidade (STR) menor que 60%,  $LIN < 40\%$ ,  $WOB < 54\%$  e  $ALH > 10 \mu\text{m}$  (Fig 1A e B).

### **Avaliação automatizada da morfometria espermática**

A análise da morfologia espermática é considerada básica para a avaliação inicial da qualidade espermática, juntamente com a concentração e a motilidade e a morfologia (Gonçalves et al. 2008). Do mesmo modo, que foi desenvolvido e aplicado um sistema computadorizado para análise da motilidade, acima citado, também foi desenvolvido um sistema computadorizado a fim de minimizar a subjetividade da avaliação morfológica da estrutura espermática.

Para a avaliação automatizada da morfometria espermática (ASMA, em inglês) são necessários alguns passos após a coleta da amostra: o preparo da amostra que inclui a diluição e/ou lavagem dos espermatozoides, a realização do esfregaço, a fixação e a coloração das amostras; a aquisição das imagens; e o processamento por software específico (Sancho et al., 1998). Atualmente, existem softwares que realizam a processamento simultâneo à aquisição das imagens, que facilitam e agilizam as análises. Na literatura são descritos vários protocolos de coloração de esfregaços espermáticos para a realização de ASMA, entretanto a utilização de Hematoxilina foi descrita como a melhor coloração para espermatozoides suínos nessa técnica (García-Herreros et al., 2006).

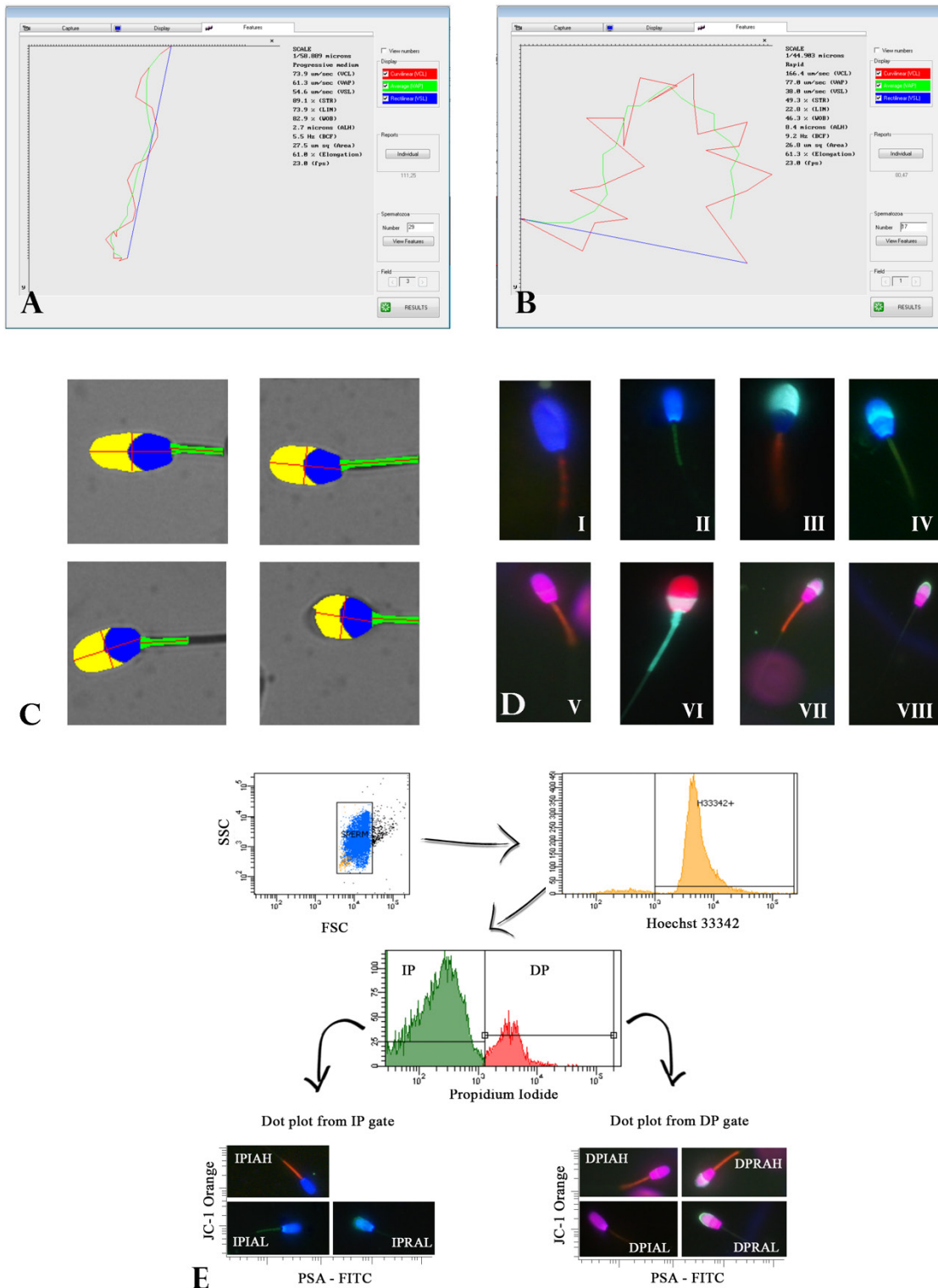


Figura 1. Representação gráfica de algumas avaliações da qualidade dos espermatozoides suínos. Espermatozoides suínos não hiperativados (A) e hiperativados (B) segundo Pavaneli et al. (dados não publicados); (C) diferentes morfometrias de cabeça dos espermatozoides suínos; (D) técnica de coloração simultânea para determinação do potencial de membrana mitocondrial e integridade das membranas plasmática e acrossomal descrita por Andrade et al. (2007); (E) técnica de coloração quádrupla dos espermatozoides suínos, descrita por Torres et al. (2016a).

Fonte: Figuras A, B, C e D – NPS/FMVZ/USP;

Figura E – Reproduzido com autorização de Torres et al. (2016a).

Os softwares de morfometria espermática permitem a avaliação das estruturas espermáticas, variando de acordo com cada software quais estruturas podem ser analisadas. Entretanto, no geral, é possível analisar a

morfometria da cabeça, do núcleo, do acrossoma, da peça intermediária e do flagelo (Yániz et al., 2015). Apesar de ser possível analisar várias estruturas espermáticas, a grande maioria dos trabalhos com sêmen suíno que utiliza ASMA realiza apenas a morfometria da cabeça dos espermatozoides, como por exemplo, os trabalhos de Peña et al. (2005), García-Herreros et al. (2006), Saravia et al. (2007) e Morales et al. (2012), entre outros.

Em relação a morfometria da cabeça dos espermatozoides diferentes parâmetros tem sido utilizado para descrever essa variável (Fig1C). A priori, os softwares realizam mensurações dos parâmetros primários (dimensões) da cabeça dos espermatozoides, essas dimensões são as seguintes: comprimento ( $C$ ), largura ( $L$ ), área ( $A$ ), e perímetro ( $P$ ). E a partir desses parâmetros primários o formato da cabeça dos espermatozoides é aproximado por parâmetros derivados através de fórmulas matemáticas. Entre esses estão a Elipticidade =  $C/L$ , a Rugosidade =  $4\pi A/P^2$ , Elongação =  $(C-L)/(C+L)$ , Regularidade =  $\pi CL/4A$ , entre outros (Yániz et al., 2015).

A técnica de morfometria de cabeça pode ser utilizada com sucesso tanto para a predição da congelabilidade dos ejaculados (Yániz et al., 2015) quanto para comparar diferenças entre crioprotetores penetrantes, uma vez que Núñez-Martínez et al. (2007) postularam que as variações no formato (incluindo os parâmetros derivados), volume e área dos espermatozoides podem estar relacionadas à variações na velocidade de troca de água entre o meio externo e o meio interno, durante os processos de congelamento e descongelamento dos espermatozoides. Essas variações de velocidade de troca de água geram variações de gradiente osmóticos nessas diferentes populações celulares.

### Uso de sondas fluorescentes e da citometria de fluxo na avaliação espermática

Com o objetivo de avaliar a capacidade fertilizante de um determinado indivíduo, a análise da integridade total da célula espermática passou a ser ainda mais detalhada, a partir de pesquisas baseadas em compostos capazes de marcar de forma individual os diferentes compartimentos espermáticos. Sabendo das funções de cada região estrutural dos espermatozoides nos mais diferentes eventos fisiológicos, aos quais essa célula se encontra envolvida, sabe-se que uma série de sondas fluorescentes podem ser aplicadas, baseando-se na técnica de escolha para a avaliação sendo por microscopia ou citometria de fluxo.

Primeiramente, tanto à nível de microscopia (epifluorescência ou confocal) quanto de citometria de fluxo, é necessário utilizar um contra-corante, que seja capaz de identificar as células mesmo que nenhuma das outras sondas interaja com os espermatozoides, para que os espermatozoides 'não-corados' também sejam analisados. Em microscopia é necessária a utilização de um contra-corante, uma vez que, as amostras são analisadas em campo escuro, e caso os espermatozoides não reajam com nenhuma outra sonda o campo escuro dificultará a sua visualização e consecutivamente esse pode não ser analisado (Casey et al., 1993).

Já em relação à citometria de fluxo, uma vez que, a técnica analisa as partículas selecionadas por tamanho e complexidade interna, é possível que haja uma superestimação da amostra com partículas não-espermáticas de tamanho e complexidade interna semelhantes aos espermatozoides; portanto, faz-se necessário a utilização de uma sonda permeável à membrana plasmática e que se ligue seletivamente ao DNA para exclusão dessas partículas (Petrunkina et al., 2010) como as sondas SYBR-14, Hoechst 33342, a família das sondas Syto, sendo a sonda Syto 59 a mais específica para espermatozoides (Boguen et al., dados não publicados), entre outras.

Quanto a integridade da membrana plasmática, uma das primeiras sondas utilizadas foi o brometo de etídio (Halangk et al., 1984), um composto ao qual a membrana plasmática possui baixa seletividade, portanto é capaz de ingressar ao meio intracelular e se ligar ao DNA celular, porém, devido sua elevada toxicidade, caiu em desuso dentro da pesquisa andrológica. Hoje, podemos citar o iodeto de propídeo (PI) e o Hoechst 33258 (Cassey et al., 1993; Maxwell et al., 1997; Garner et al., 1999), como outras sondas que possibilitam a avaliação da lesão de membrana dos espermatozoides, entretanto, com variações perante sua forma de atuação na célula e colorações.

No acrossoma, o caráter glicoproteico da membrana acrossomal interna é o parâmetro de escolha para a aplicação das sondas mais utilizadas para avaliação da sua integridade. Algumas aglutininas, a saber: aglutinina oriunda de *Pisum sativum* (PSA), aglutinina de *Peanut* (PNA) ou Concanavalin A (ConA) ligando-se as  $\alpha$  e  $\beta$ -manoses, açúcares estes presentes na membrana interna do acrossoma (Cross et al., 1986) que quando associada ao isotiocitato de fluorosceína (FITC), emitem uma coloração verde (Mattioli et al., 1996; Arruda e Celeghini, 2003).

Já o metabolismo mitocondrial, pode ser avaliado por uma sonda de elevada complexidade, denominada como iodeto de 5,5', 6,6'-tetracloro 1,1', 3,3'- tetraetilbenzimidazolocarboaniana, comumente denominado como JC-1. Reconhecida por ser uma sonda metacromática, emitindo desta forma duas fluorescências, verde ou vermelho alaranjada. Tal sonda necessita que na membrana mitocondrial, haja íons negativos suspensos, devido a polarização desta, ou seja, trata-se de um agente dependente de um gradiente químico. Quando em elevadas concentrações no interior das mitocôndrias, o JC-1 apresenta-se na forma de j-agregados que emitem fluorescência vermelha alaranjada, representando desta forma o alto potencial mitocondrial, revelando organelas significativamente funcionais. Em contrapartida, quando em baixas concentrações, há a formação dos então j-mônômeros, emitindo coloração verde, apresentando um baixo potencial mitocondrial celular (Reers et al., 1991;



Smiley et al., 1991).

No geral, essas sondas são utilizadas em colorações duplas ou triplas (uma ou duas sondas para a avaliação da função espermática associadas à um contra-corante) que permite a avaliação simultânea de um ou dois compartimentos espermáticos simultaneamente, como por exemplo a avaliação da integridade da membrana plasmática (Garner et al., 1994), ou da avaliação simultânea das membranas plasmática e acrossomal (Andrade et al., 2011), ou da membrana plasmática e do potencial mitocondrial (Andrade et al., 2011; Fraser et al., 2014).

Por outro lado, quando se avalia mais compartimentos espermáticos simultaneamente, como é o caso da avaliação simultânea da integridade das membranas plasmática e acrossomal e do potencial de membrana mitocondrial descrito para suínos por microscopia de epifluorescência (Fig1D) por Andrade et al (2007) e por citometria de fluxo (Fig1E) por Torres et al. (2016a), a população alvo da análise é restringida apenas aos espermatozoides denominados potencialmente férteis. Torres et al. (2016a) compararam as colorações tripla e quádrupla e observaram uma diferença de 16% de células íntegras a mais na primeira que na segunda; essa diferença corresponde as células que possuem as membranas plasmática e acrossomal íntegras, porém, com baixo potencial mitocondrial, o que as torna potencialmente incapazes de fertilizar o oócito. Ou seja, sempre que possível, análises de parâmetros espermáticos associados sempre trazem resultados mais completos do ponto de vista de células potencialmente férteis.

Além das avaliações de integridade das membranas plasmática e acrossomal que são as mais amplamente realizadas, outras técnicas também são necessárias para avaliação global da funcionalidade espermática. Como por exemplo, a organização dos lipídios da membrana plasmática, que pode ser realizada com o auxílio da sonda Merocianina 540<sup>®</sup> (Andrade et al., 2012; Torres et al., 2016b), sendo esta alteração uma das que ocorre durante a capacitação espermática.

Ainda em relação aos lipídeos da membrana é possível avaliar a peroxidação destes através da sonda C11-Bodipy<sup>581/591</sup> (Andrade et al., 2012). Essa sonda é capaz de mensurar indiretamente o potencial de peroxidação dos lipídios de membrana, uma vez que, o C11-Bodipy<sup>581/591</sup> é um análogo dos lipídios de membrana e se incorpora a esta, peroxidando ou não, dependendo da concentração de radicais livres presentes no meio extracelular. Martins et al. (2015) utilizou essa técnica para verificar se a suplementação oral de cachaaos com selênio orgânico ou inorgânico alteraria a peroxidação dos lipídios da membrana espermática. Entretanto, esses pesquisadores não observaram diferenças entre seus tratamentos em relação a emissão de fluorescência do C11-Bodipy<sup>581/591</sup>.

O aminoácido tirosina está presente no interior da membrana espermática em uma célula não capacitada, entretanto, durante o processo de capacitação espermática, ou alterações semelhantes à capacitação, com o aumento da fluidez da membrana plasmática e a translocação de alguns fosfolipídios do folheto interno para o folheto externo da bicamada de fosfolipídios da membrana plasmática, é possível detectar resíduos de tirosina fosforilada na superfície da membrana plasmática com o auxílio do anticorpo anti-fosfotirosina (Andrade et al., 2012; Torres et al., 2016a).

Quando aplicadas a avaliação de sêmen suíno, as sondas aqui apresentadas podem ser utilizadas tanto em microscopia de epifluorescência e confocal (Cassey et al., 1993; Andrade et al., 2007), quanto em citometria de fluxo (Thomas et al. 1998; Torres et al. 2016a). Contudo, deve ser observado se o equipamento possui os lasers e detectores específicos para as sondas em questão. A microscopia de epifluorescência permite apenas a contagem de um baixo número de células e possui o caráter de subjetividade, já a citometria de fluxo, além de excluir o caráter de subjetividade da análise, realiza uma avaliação de 10000 eventos em aproximadamente 30 segundos, aumentando a acurácia e precisão das análises (Peña et al., 1999; Rieseberg et al., 2001).

Vários outros parâmetros espermáticos podem ser avaliados com auxílio de sondas fluorescentes, seja por microscopia (epifluorescência ou confocal) ou citometria de fluxo, com o cuidado de se compreender muito bem como o fluorocromo e os espermatozoides interagem, e se os equipamentos disponíveis possuem os requisitos necessário para a utilização das sondas escolhidas.

### Avaliação da estrutura do DNA espermático

Considerando o aspecto morfológico diferenciado e especializado da célula espermática, a integridade estrutural especialmente do compartimento nuclear é de grande valia, uma vez que, está associado de forma direta a constituição da unidade diploide formada após a fertilização (Gadea, 2005). Deste modo, a avaliação dos diferentes graus aos quais a cromatina celular está sujeita à desnaturação é uma das análises de interesse para a verificação da capacidade fecundante dos espermatozoides (Holt et al., 2007).

A cromatina dos espermatozoides suínos é uma estrutura altamente condensada, cujas protaminas encontram-se fortemente atuantes perante a proteção do material genético em questão, favorecendo assim a expressão do potencial de fertilidade da célula (Spano et al., 2000; Rodriguez-Martinez et al., 1990). Neste caso, quando se considera o armazenamento do espermatozoide, seja ele a partir de refrigeração ou até mesmo da criopreservação. Considera-se os danos relacionados a deterioração do DNA nuclear, relacionados a queda no potencial de fertilidade do sêmen suíno (Boe-Hansen et al., 2005; De Ambrogi et al., 2006; Peris et al., 2004).

Dentre a variedade de testes capazes de avaliar a estrutura da espermocromatina, o de maior



conhecimento abordado dentro da espécie suína, devido a praticidade e simplicidade de sua técnica, trata-se técnica de avaliação da estrutura da cromatina espermática (SCSA – sperm chromatin structure assay) com o uso da sonda fluorescente laranja de acridina, a qual é capaz de avaliar a estabilidade da cromatina com base na elevação da suscetibilidade do DNA alterado, à desnaturação *in situ*, quando a célula é exposta a um pH reduzido. O laranja de acridina emite fluorescência verde quando o DNA estiver íntegro, e fluorescência vermelha se o DNA estiver desnaturando, nos apresentando assim sua característica metacromática (Evenson et al., 2006; Fraser, 2004).

Em 2007, Saravia et al, avaliaram a relação entre a estrutura das cromatinas de espermatozoides suínos (por SCSA), com o formato das cabeças dos espermatozoides suínos (por ASMA). Entretanto, não foi encontrada uma relação entre o tamanho e o formato das cabeças dos espermatozoides suínos com as diferenças de integridade de cromatina.

Por outro lado, a fragmentação da cromatina espermática gera resultados contraditórios, sendo que muitas vezes é difícil de se detectar a fragmentação do DNA. A fim de contornar as dificuldades e inconsistências dessas análises, alguns pesquisadores tem optado por analisar alterações à nível de protamina-1 e histona H-1 nucleares, para detectar as possíveis alterações ocorridas no material genético espermático (Flores et al., 2008; Flores et al., 2011). As protaminas são as proteínas nucleares mais importantes para os mamíferos. Essas proteínas nucleares são caracterizadas por formarem uma estrutura complexa com o DNA, induzindo a uma forte compactação deste, ou seja, a manutenção da estrutura DNA-protamina garante o potencial fertilizante, uma vez que, garante a compactação do DNA (Wykes e Krawetz, 2003). Os espermatozoides suínos possuem apenas um tipo de protamina, a protamina-1 (Biegeleisen, 2006).

### Marcadores proteicos de fertilidade

As análises seminais *in vitro*, de um modo geral, não são capazes de fornecer a real fertilidade dos espermatozoides (Braundmeier e Miller, 2001). Com isso, a procura por marcadores de fertilidade seminais tem se tornado uma busca intensa, inclusive para a espécie suína.

A procura por marcadores proteicos de fertilidade na suinocultura é uma área ainda muito recente, sendo que seu começo foi no final dos anos 1990 com Flowers, (1998 - revisado por Strzezek et al., 2005), e até hoje poucas proteínas seminais são associadas a fertilidade *in vivo*. Flowers, em seu trabalho, descreve duas proteínas de importância biológica para a reprodução de suínos, a 26 kDa, pI 6,2 e a 55 kDa, pI 4,8, ambas quando em altas concentrações no ejaculado correspondem à altas taxas de partos e número de leitões nascidos vivos.

A Lipooxigenase-15 (15-LOX) é uma proteína presente na gota citoplasmática de espermatozoides suínos e está envolvida na peroxidação dos lipídeos de membrana (Fischer et al., 2005). Essa proteína foi descrita como um possível marcador proteico de fertilidade suína (Lovercamp et al., 2007), sendo que, os baixos níveis da 15-LOX no ejaculado suíno foram correlacionados com os altos índices de total de leitões nascidos vivos ( $r = -0.32$ ,  $P < 0.05$ ).

Outra proteína descrita como marcador molecular de fertilidade suína é a Ubiquitina (UBI) que é correlacionada negativamente ( $r = -0.27$ ,  $P < 0.05$ ) com o total de leitões nascidos (Lovercamp et al., 2007).

A proteína PSP-I (pertencente ao grupo não ligantes a heparina da família das esparmodesinas) é uma proteína que atua na prevenção da capacitação precoce e reação acrossomal (Kwok et al. 1993). Por outro lado, foi descrito que essa proteína possui uma correlação negativa ( $r = -0.77$ ,  $P = 0.01$ ) com o número total de leitões nascidos (Novak et al., 2010).

Recentemente, Kwon et al. (2015) descreveram valores preditivos para algumas proteínas que podem ser consideradas biomarcadores de tamanho de leitegada para os espermatozoides suínos. Onze proteínas foram diferencialmente expressas, dentre elas TPI (Triosefosfato isomerase;  $r = -0.797$ ,  $P < 0.01$ ) e CALM (Calmodulina;  $r = 0.665$ ,  $P < 0.01$ ), sendo que a CALM possui os maiores valores de acurácia, especificidade e valor preditivo positivo dentre as proteínas avaliadas (85%, 88,89%, 90%, respectivamente).

A Triosefosfato isomerase (TPI) atua na via de degradação da glicose, atuando assim, na contribuição de ATP para o início das vias de capacitação e reação acrossomal (Fraser e Quinn, 1981). A Calmodulina (CALM) é localizada na região acrossomal e peça intermediária dos espermatozoides, sendo essencial para a reação acrossomal e motilidade espermática (Bendahmane et al., 2001), uma vez que, é responsável por modificar a interação de algumas proteínas alvo pela adição de moléculas de cálcio (Chin e Means, 2000).

Ainda hoje, depois de quase duas décadas de pesquisa acerca de marcadores proteicos de fertilidade suína, poucas são as proteínas descritas com alta correlação com os parâmetros de fertilidade suína, sendo esta uma área com grande potencial científico e comercial dentro da indústria suinícola.

### Considerações finais

A partir das informações discutidas no presente trabalho, pode-se afirmar que as técnicas voltadas para



as análises do sêmen suíno, estão amadurecendo a medida que tal sistema produtivo cresce. A aplicação à campo de muitas destas, são de elevada dificuldade, tendo em vista a necessidade de recursos financeiros elevados. Entretanto, a utilização destas em centrais de coleta de sêmen, tanto no que diz respeito à genética líquida, quanto em relação ao sêmen criopreservado não é uma realidade distante. Além do mais, quando se analisa sob o ponto de vista científico, tais técnicas podem ser assim aplicadas, conferindo um melhor conhecimento sobre a fisiologia dos espermatozoides suínos.

### Agradecimentos

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (Processos: 2011/23484-8, 2015/14258-5, 2015/17620-7, 2016/02186-2, 2016/09441-8) pelas bolsas e auxílios concedidos, e aos nossos parceiros DB Genética Suína, Agriness e Zoetis.

### Referências

- Amann R, Katz DF.** Reflections on CASA after 25 years. *J Androl*, v.25, p.317-325, 2004.
- Andrade AF, Arruda RP, Celeghini ECC, Nascimento J, Martins SMMK, Raphael C, 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.
- Andrade AFC, Zaffalon FG, Celeghini ECC, Nascimento J, Tarragó OFB, Martins SMM K, Alonso MA, Arruda RP.** Addition of Seminal Plasma to Post-thawing Equine Semen: What is the Effect on Sperm Cell Viability? *Reprod Domest Anim*, v.46, p.682-686, 2011.
- Andrade AFC, Zaffalon FG, Celeghini ECC, Nascimento J, Bressan FF, Martins SMMK, Arruda RP.** Post-thaw addition of seminal plasma reduces tyrosine phosphorylation on the surface of cryopreserved equine sperm, but does not reduce lipid peroxidation. *Theriogenology*, v.77, p.1866-1872, 2012.
- Arruda RP, Celeghini ECC.** Validação de uma técnica para avaliação simultânea das membranas plasmática, acrossomal e mitocondrial de espermatozoides bovinos. *Acta Sci Vet Supl*, v.31, p.230-231, 2003.
- Bendahmane M, Lynch C, Tulsiani DR.** Calmodulin signals capacitation and triggers the agonist-induced acrosome reaction in mouse spermatozoa. *Arch Biochem. Biophys*, v.390, p.1-8, 2001.
- Biegeleisen K.** The probable structure of the protamine-DNA complex. *J Theor Biol*, v. 241, p.533-540, 2006.
- Boe-Hansen GB, Ersboll AK, Greve T, Christensen P.** Increasing storage time of extended boar semen reduces sperm DNA integrity. *Theriogenology*, v.63, p.2006-2019, 2005.
- Boyle CA, Houry MJ, Katz DF, Anest JL, Kresnow M, Destefano F, Scradler SM.** The relationship of computer-based measures of sperm morphology and motility to male infertility. *Epidemiology*, v.3, p.239-246, 1992.
- Braundmeier AG, Miller DJ.** The search is on: finding accurate molecular markers of male fertility. *J Dairy Sci*, v.84, p.1915-1925, 2001.
- Casey PJ, Hillman RB, Robertson KR, Yudin AL, Liu LKM, Drobnis EZ.** Validation of an acrosomal stain for equine sperm that differentiates between living and dead sperm. *J Androl*, v.14, p.289-297, 1993.
- Chin D, Means AR.** Calmodulin a prototypical calcium sensor. *Trends Cell Biol*, v.10, p.322-328, 2000.
- Cross NL, Morales P, Overstreet JW, Hanson FW.** Two simple methods for detecting acrosome-reacted human sperm. *Gamete Research*, v.15, p.213-226, 1986.
- De Ambrogi M, Ballester J, Saravia F, Caballero I, Johannisson A, Walgren M, E Andersson M, Rodríguez-Martínez H.** Effect of storage in short- and long-term commercial semen extenders on the motility, plasma membrane and chromatin integrity of boar spermatozoa. *Int J Androl*, v.29, p.543-552, 2006.
- De Leeuw FE, Chen HC, Colenbrander B, Verkleij AJ.** Cold-induced ultrastructural changes in bull and boar sperm plasma membranes. *Cryobiology*, v.27, p.171-183, 1990.
- Evenson DP, Wixon R.** Clinical aspects of sperm DNA fragmentation detection and male infertility. *Theriogenology*, v.65, p.979-991, 2006.
- Fischer KA, Van Leyen K, Lovercamp KW, Manandhar G, Sutovsky M, Feng D, Safranski T, Sutovsky P.** 15-Lipoxygenase is a component of the mammalian sperm cytoplasmic droplet. *Reproduction*, v.130, p.213-222, 2005.
- Flores E, Cifuentes D, Fernández-Novell JM, Medrano A, Bonet S, Briz MD, Pinart E, Peña A, Rigau T, Rodríguez-Gil JE.** Freeze-thawing induces alterations in the protamine-1/DNA overall structure in boar sperm. *Theriogenology*, v.69, p.1083-1094, 2008.
- Flores E, Ramió-Lluch L, Bucci D, Fernández-Novell JM, Peña A, Rodríguez-Gil JE.** Freezing-thawing induces alterations in histone H1-DNA binding and the breaking of protein-DNA disulfide bonds in boar sperm. *Theriogenology*, v.76, p.1450-1464, 2011.
- Fraser LR, Quinn PJ.** A glycolytic product is obligatory for initiation of the sperm acrosome reaction and whiplash motility required for fertilization in the mouse. *J Reprod Fertil*, v.61, p.25-35, 1981.
- Fraser L.** Structural damage to nuclear DNA in mammalian spermatozoa: its evaluation techniques and



- relationship with male infertility. *Pol J Vet Sci*, v.7, p.311-321, 2004.
- Fraser L, Strzerek J, Kordan W.** Post-thaw sperm characteristics following long-term storage of boar semen in liquid nitrogen. *Anim Reprod Sci*, v.147, p.119-127, 2014.
- Gadea J.** Sperm factors related to in vitro and in vivo porcine fertility. *Theriogenology*, v.63, p.431-444, 2005.
- Garcia-Herreros M, Aparicio IM, Baron FJ, Garcia-Marin LJ, Gil MC.** Standardization of sample preparation, staining and sampling methods for automated sperm head morphometry analysis of boar spermatozoa. *Int J Androl*, v.29, p.553-563, 2006.
- Garner DL, Hafez ESE.** Espermatozóide e plasma seminal. In: Hafez, E.S.E. *Reprodução Animal*. 7. ed. Barueri: Manole Ltda, 2004. Cap.7, p. 97-110.
- Garner DL, Johnson LA, Yue ST, Roth BL, Haugland RP.** Dual DNA staining assessment of bovine sperm viability using SYBR-14 and propidium iodide. *J Androl*, v.15, p.620-629, 1994.
- Garner DL, Thomas AC, Gravance CG.** The effect of glycerol on the viability, mitochondrial function and acrosomal integrity of bovine spermatozoa. *Reprod Domest Anim*, v.34, p.399-404, 1999.
- Gonçalves PBD, Figueiredo JR, Freitas JF.** *Biotecnias Aplicadas A Reprodução Animal*. 2 ed. São Paulo: Editora Roca, 2008.
- Halangk W, Frank K, Bohnensack R.** Zur bestimmung der menge intakter spermien in bullenejakulaten. *Arch Exp Vet Med*, v.38, p.105-114, 1984.
- Holt WV, Van Look KJ.** Concepts in sperm heterogeneity, sperm selection and sperm competition as biological foundations for laboratory tests of semen quality. *Reproduction*, v.127, p.527-535, 2004.
- Kwok SCM, Soares MJ, Mcmurtry JP, Yurewicz EC.** Binding characteristics and immunolocalization of porcine seminal protein, PSP-I. *Mol Reprod Develop*, v.35, p.244-250, 1993.
- Kwon W, Rahman MS, Lee J, Yoon S, Park Y, Pang M.** Discovery of predictive biomarkers for litter size in boar spermatozoa. *Mol Cel Proteomics*, v.14, p.1230-1240, 2015.
- Lovercamp KW, Safranski TJ, Fischer KA, Manandhar G, Sutovsky M, Herring W, Sutovsky P.** Arachidonate 15-lipoxygenase and ubiquitin as fertility markers in boars. *Theriogenology*, v.67, p.704-718, 2007.
- Martínez-Pastor F, Mata-Campuzano M, Álvarez-Rodríguez M, Álvarez M, Anel L, de Paz P.** Probes and techniques for sperm evaluation by flow cytometry. *Reprod Dom Anim*, v.45, suppl.2, p.67-78, 2010.
- Martins SMMK, Andrade AFC, Zaffalon FG, Bressan FF, Pugine SMP, Melo MP, Chiaratti MR, Marino CT, Moretti AS, Arruda RP.** Organic selenium supplementation increases PHGPx but does not improve viability in chilled boar semen. *Andrologia*, v.47, p.85-90, 2015.
- Mattioli M, Barboni B, Lucidi P, Seren E.** Identification of capacitation in boar spermatozoa by chortetraciline staining. *Theriogenology*, v.45, p.373-381, 1996.
- Maxwell WMC, Johnson LA.** Membrane status of boar spermatozoa after cooling or cryopreservation. *Theriogenology*, v.48, p.209-219, 1997.
- Morales B, Quintero-Moreno A, Osorio-Meléndez C, Rubio-Guillén J.** Valoración de la biometría de la cabeza del espermatozoide mediante análisis computadorizado en semen de cerdo recién colectado y refrigerado. *Rev Fac Agron*, v.29, p.413-431, 2012.
- Novak S, Ruiz-Sanchez A, Dixon WT, Foxcroft GR, Dyck MK.** Seminal plasma proteins as potential markers of relative fertility in boars. *J Androl*, v.31, p.188-200, 2010.
- Núñez-Martínez I, Morán JM, Peña FJ.** Sperm indexes obtained using computer assisted morphometry provide a forecast of the freezability of canine sperm. *Int J Androl*, v.30, p.182-189, 2007.
- Peña AL, Johannisson A, Linde-Forsberg C.** Post-thaw evaluation of dog spermatozoa using new triple fluorescent staining and flow cytometry. *Theriogenology*, v.52, p.965-980, 1999.
- Peña FJ, Saravia F, Garcia-Herreros M, Nunez-Martinez I, Tapia JA, Johannisson A, Wallgren M, Rodriguez-Martinez H.** Identification of sperm morphometric subpopulations in two different portions of the boar ejaculate and its relation to postthaw quality. *J Androl*, v.26, p.716-723, 2005.
- Peris SI, Morrier A, Dufour M, Bailey JL.** Cryopreservation of ram semen facilitates sperm DNA damage: relationship between sperm andrological parameters and the sperm chromatin structure assay. *J Androl*, v.25, p.224-33, 2004.
- Petrunkina AM, Waberski D, Bollwein H, Sieme H.** Identifying non-sperm particles during flow cytometric physiological assessment: a simple approach. *Theriogenology*, v.73, p.995-1000, 2010.
- Reers M, Smith TW, Chen LB.** J-aggregate formation of a carbocyanine as a quantitative fluorescent indicator of membrane potential. *Biochemistry*, v.30, p.4480-4486, 1991.
- Rieseberg M, Kasper C, Reardon KF, Scheper T.** Flow cytometry in biotechnology. *Appl Microbiol Biotechnol*, v.56, p.350-360, 2001.
- Rodriguez-Martinez H, Courtens JL, Kvist U, Ploen L.** Immunocytochemical localization of nuclear protamine in boar spermatozoa during epididymal transit. *J Reprod Fertil*, v.89, p.591-595, 1990.
- Sancho M, Perez-Sanchez F, Tablado L, de Monserrat JJ, Soler C.** Computer assisted morphometric analysis of ram sperm heads: evaluation of different fixative techniques. *Theriogenology*, v.50, p.27-37, 1998.
- Saravia F, Nunez-Martinez I, Morán JM, Soler C, Muriel A, Rodriguez-Martinez H, Peña FJ.** Differences





in boar sperm head shape and dimensions recorded by computer-assisted sperm morphometry are not related to chromatin integrity. *Theriogenology*, v.68, p.196-203, 2007.

**Schmidt H, Kamp G.** Induced hyperactivity in boar spermatozoa and its evaluation by computer-assisted sperm analysis. *Reproduction*, v.128, p.171-179, 2004.

**Smiley ST, Reers M, Mottola-Hartsborn C, Lin M, Chen A, Smith TW, Steele GD Jr, Chen L B.** Intracellular heterogeneity in mitochondrial membrane potentials revealed by a J-aggregate-forming lipophilic cation JC-1. *Cell Biol*, v.88, p.3671-3675, 1991.

**Spano M, Bonde JP, Hjollund HL, Kolstand HA, Cordelli, Leter G.** Sperm chromatin damage impairs human fertility. The Danish First Pregnancy Planner Study Team. *Fertil Steril*, v.73, p.43-50, 2000.

**Strzerek J, Wysocki P, Kordan W, Kuklińska M.** Proteomics of boar seminal plasma - current studies and possibility of their application in biotechnology of animal reproduction. *Reprod Biol*, v.5, p.279-290, 2005.

**Thomas CA, Garner DL, Dejarnete JM, Marshall CE.** Effect of cryopreservation on bovine sperm organelle function and viability as determined by flow cytometry. *Biol Reprod*, v.58, p.786-793, 1998.

**Torres MA, Díaz R, Boguen R, Martins SMMK, Ravagnani GM, Leal DF, Oliveira ML, Muro BBD, Parra BM, Meirelles FV, Papa FO; Dellaqua JA, Alvarenga MA, Moretti AS, Sepúlveda N, De Andrade AFC** Novel Flow Cytometry Analyses of Boar Sperm Viability: Can the Addition of Whole Sperm-Rich Fraction Seminal Plasma to Frozen-Thawed Boar Sperm Affect It? *Plos One*, v.11, p.e0160988, 2016a.

**Torres MA, Ravagnani GM, Leal DF, Martins SMMK, Meirelles FV, Papa FO, Andrade AFC.** Seminal plasma arising from the whole boar sperm-rich fraction increases the stability of sperm membrane after thawing. *J Anim Sci*, v.94, p.1906-1912, 2016b.

**Verstegen J, Iguer-Ouada M, Onclin K.** Computer assisted semen analyzers in andrology research and veterinary practice. *Theriogenology*, v.57, p.149-179, 2002.

**Wykes SM, Krawetz A.** The structural organization of sperm chromatin. *J Biol Chem*, v.278, p.29471-29474, 2003.

**Yanagimachi R, Knobil E, Neill JD.** Mammalian fertilization. In: Knobil E, Neill JD (Ed.). *The physiology of reproduction*. New York, NY: Raven Press, p.189-317, 1994.

**Yániz JL, Soler C, Santolaria P.** Computer assisted sperm morphometry in mammals: A review. *Anim Reprod Sci*, v. 156, p.1-12, 2015.

---