

Novas estratégias para avaliação seminal em garanhões subférteis

Yamê Fabres Robaina Sancler-Silva¹, Edjalma Rodrigues Silva-Junior², Marcela Souza e Freitas^{1,3},
Cristian Silva Teixeira¹, Camila de Paula Freitas-Dell'Aqua⁴

¹Departamento de Zootecnia, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, Brasil;

²Faculdade de Medicina Veterinária, FMVA, Universidade Estadual Paulista, UNESP, Araçatuba, SP, Brasil.

³Departamento de Veterinária, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, Brasil;

⁴Departamento de Cirurgia Veterinária e Reprodução Animal, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, UNESP, Botucatu, SP, Brasil

Resumo

A subfertilidade em garanhões pode ser de difícil detecção por meio da análise seminal tradicional, que, apesar de seu valor, apresenta limitações na identificação de alterações funcionais sutis nos espermatozoides. Nenhuma avaliação isolada é capaz de prever com precisão o potencial fértil de um reprodutor, requerendo o máximo de testes possíveis. Diante disso, este artigo revisa estratégias modernas de avaliação seminal, como a análise de subpopulações cinemáticas, testes de funcionalidade espermática por citometria de fluxo, abordagens ômicas (transcriptômica e proteômica) e ensaios de reação acrossomal. Quando integradas, essas ferramentas proporcionam uma compreensão mais abrangente e sensível da qualidade espermática. A abordagem multiparamétrica, que combina diferentes biomarcadores e tecnologias, é fundamental para identificar causas ocultas de subfertilidade e orientar de forma mais precisa o uso de biotécnicas reprodutivas.

Palavras-chave: citometria de fluxo, análises ômicas, disfunção acrossomal, fertilidade, equino.

Abstract

Subfertility in stallions can be difficult to detect using traditional semen analysis, which, despite its value, has limitations in identifying subtle functional alterations in spermatozoa. No single test can accurately predict a stallion's fertile potential, making it essential to apply as many complementary assessments as possible. In this context, the present article reviews modern strategies for semen evaluation, including the analysis of sperm kinematic subpopulations, functional assessments via flow cytometry, omics approaches (transcriptomics and proteomics), and acrosome reaction assays. When integrated, these tools provide a more comprehensive and sensitive understanding of sperm quality. A multiparametric approach, combining various biomarkers and technologies, is essential for uncovering hidden causes of subfertility and guiding the more effective application of reproductive biotechnologies.

Keywords: flow cytometry, omics analyses, acrosomal dysfunction, fertility, equine.

Introdução

A subfertilidade em garanhões é um desafio clínico e econômico na reprodução equina, uma vez que muitos animais apresentam parâmetros seminais aparentemente normais pelos métodos tradicionais, entretanto demonstram fertilidade abaixo do esperado. Naturalmente, os garanhões tendem a apresentar taxas de concepção por ciclo inferiores às de outras espécies domésticas, muitas vezes devido à ausência de seleção reprodutiva rigorosa e à detecção tardia de problemas de fertilidade, geralmente após fracassos de cobertura (Aurich, 2016). Além disso, estima-se que entre 12% e 20% dos garanhões reprodutores em atividade sejam subférteis, com 0,5% a 3% mostrando subfertilidade grave, apresentando taxas de prenhez por ciclo inferiores a 10% (Battut et al., 2016; Varner et al., 2022). Dentre os garanhões subférteis, cerca de 2% a 20% são classificados como idiopáticos, já que não há uma causa aparente detectável por exames convencionais (Losinno et al., 2023). Esse cenário reforça a demanda por ferramentas laboratoriais robustas e precisas para a avaliação da fertilidade.

Embora a análise seminal tradicional – padronizada por Kenney et al. (1983) – permaneça um pilar na avaliação da fertilidade, ela pode falhar em detectar alterações sutis ou disfunções espermáticas funcionais (Peña et al., 2024). Diante disso, as pesquisas mais recentes têm se voltado à compreensão dos

mecanismos que sustentam as competências espermática, como análises de funcionalidade do acrossoma, estresse oxidativo, capacitação espermática, potencial mitocondrial, integridade do DNA, proteoma, perfil de RNA, e painéis que integram essas informações (Hernández-Avilés et al., 2019; Ing et al., 2024; Egyptien et al., 2023). O objetivo é identificar biomarcadores que possam embasar novos testes preditivos de fertilidade.

Neste contexto, este artigo revisa as estratégias modernas de avaliação da fertilidade seminal e detecção de subfertilidade em garanhões, incluindo citometria de fluxo avançada, análises ômicas e testes de capacidade acrossomal (Gacem et al., 2021; Hernández-Avilés et al., 2024), integrando o conhecimento dessas abordagens em uma compreensão abrangente da subfertilidade e destacando como cada nova estratégia pode complementar a avaliação tradicional e identificar causas antes despercebidas em casos idiopáticos.

Funcionalidades do espermatozoide: do epidídimo à fertilização

Maturação no epidídimo

Após serem produzidos nos túbulos seminíferos, os espermatozoides imaturos entram no epidídimo, onde ocorrerá sua maturação e armazenamento. No trajeto pelo epidídimo (ao longo dos segmentos da cabeça, corpo e cauda), os espermatozoides interagem intensamente com o epitélio e secreções epididimárias, com modificações graduais em sua morfologia e bioquímica estrutural e funcional. Dentre essas mudanças, destacam-se a condensação final da cromatina e a perda do corpúsculo citoplasmático, além de alterações na membrana plasmática e no perfil de proteínas e lipídios da superfície espermática. Tais modificações celulares ocorridas no epidídimo são essenciais para que o espermatozoide adquira motilidade e capacidade potencial de fertilizar o oócito no futuro (Gervasi & Visconti, 2017).

Ejaculação, interação com o endométrio e transporte uterino

No momento da ejaculação, os espermatozoides entram em contato com o plasma seminal na uretra pélvica. O plasma seminal fornece um meio nutritivo e protetor temporário, auxiliando no transporte dos espermatozoides pelo útero da égua e modulando a resposta imunológica materna. Após a cobertura ou inseminação, grande parte dos espermatozoides é eliminada do útero em poucas horas, seja por refluxo, fagocitose ou aprisionamento pelas armadilhas extracelulares liberadas pelos neutrófilos presentes no ambiente uterino – um mecanismo natural de seleção que remove células mortas ou anormais (Troedsson, 1999; Alghamdi et al., 2009). Apenas uma fração da população espermática, normalmente a mais viável e móvel, consegue chegar e transpor a junção útero-tubária e entrar na tuba uterina. Essa passagem pela junção útero-tubária atua como um filtro, retraindo espermatozoides com motilidade insuficiente ou defeitos morfológicos, de modo que somente os mais íntegros adentram o oviduto (Varner et al., 2015a, b).

Os espermatozoides recém-ejaculados não possuem a capacidade de fertilizar o oócito imediatamente, sendo necessário que ocorram modificações funcionais de capacitação no trato reprodutor feminino. Esses eventos continuam até os espermatozoides alcançarem a ampola da tuba uterina, e são influenciados por interações com o ambiente, como moléculas das secreções e da superfície celular que aderem à membrana espermática, promovendo a remodelação e estabilização temporária do espermatozoide até o momento da fertilização (Dobrinski et al., 1996).

Reservatório espermático e capacitação

Nas tubas uterinas, os espermatozoides se conectam ao epitélio do istmo, formando um reservatório espermático temporário. A interação íntima entre os espermatozoides e as células epiteliais ovidutárias é crucial para prolongar sua viabilidade e regular o momento da fertilização (Scott, 2000).

Durante a permanência na tuba uterina, os espermatozoides iniciam o processo de capacitação, que engloba uma série de modificações bioquímicas e de membrana que os preparam para fertilizar. Essas alterações incluem hiperpolarização de membrana, fosforilações de proteínas espermáticas, aumento da permeabilidade ao cálcio, entre outros. Como resultado, os espermatozoides adquirem uma motilidade hiperativada (movimentos flagelares mais vigorosos e assimétricos) e tornam-se preparados para a reação acrossomal (Breitbart, 2005).

Reação acrossomal e fertilização

Após a ovulação da égua, o oócito envolto pelo *cumulus oophorus* é captado pelas fimbrias do infundíbulo e adentra a ampola da tuba uterina. Em seguida, os espermatozoides capacitados são liberados do reservatório do istmo e atraídos por fatores quimiotáticos presentes no gameta feminino. Assim, ao aproximar-se do oócito, o espermatozoide deve atravessar as células do *cumulus oophorus* e ligar-se à zona pelúcida do gameta feminino. Esse contato, juntamente com sinais moleculares do próprio oócito, como progesterona liberada pelas células do cúmulus, desencadeia a reação acrossomal no espermatozoide. Essa reação é um evento exocítico no qual as membranas acrossomal externa e plasmática do espermatozoide se fundem, liberando enzimas hidrolíticas contidas no acrossomo. A reação acrossomal é indispensável para que o espermatozoide dissolva localmente a zona pelúcida e penetre no oócito, possibilitando a fertilização (Varner et al., 2015a, b).

Inovações na avaliação espermática tradicional

Pesquisas recentes têm aprimorado as metodologias tradicionais, incorporando recursos como a análise computadorizada de espermatozoides para identificar subpopulações cinemáticas e a análise morfológica avançada.

Análise computadorizada de espermatozoides (CASA) e subpopulações espermáticas

Embora a análise computadorizada de espermatozoides (CASA – Computer-Assisted Sperm Analysis) seja uma ferramenta consolidada na avaliação objetiva da cinética espermática, avanços metodológicos recentes têm ampliado substancialmente seu poder interpretativo. Entre esses avanços, destacam-se as análises de subpopulações espermáticas baseadas em técnicas de clusterização multivariada, que permitem identificar grupos de espermatozoides com padrões cinemáticos distintos, os quais podem estar diretamente associados ao potencial fertilizante do ejaculado (Gacem et al., 2021).

Estudos em garanhões demonstraram que ejaculados férteis tendem a apresentar uma predominância de subpopulações compostas por espermatozoides com alta velocidade progressiva e baixa linearidade (Quintero-Moreno et al., 2003; Gacem et al., 2021), padrão cinemático compatível com a motilidade hiperativada observada durante a capacitação, que favorece o deslocamento através de fluidos viscosos e a penetração no oócito. Esses espermatozoides são considerados funcionalmente mais competentes e, em ejaculados com contagem total elevada ($\geq 20 \times 10^9$ por ejaculado), tendem a constituir a subpopulação majoritária. Por outro lado, subpopulações de baixa motilidade progressiva e trajetórias desorganizadas costumam ser observadas com maior frequência em ejaculados de garanhões subfêrteis, evidenciando padrões disfuncionais que podem passar despercebidos na análise convencional. A identificação desses subgrupos permite detectar padrões disfuncionais que podem não ser evidentes nos valores médios tradicionais, tornando-se especialmente útil no diagnóstico de casos de subfertilidade idiopática (Losinno et al., 2023).

Da mesma forma, dados produzidos pela avaliação no CASA podem se correlacionar a maiores taxas de produção embrionária (Blondin et al., 2009), assim como a microambientes em que os espermatozoides estão submetidos (Elsayed et al., 2015), visando otimizar programas de produção *in vitro* de embriões e injeção intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI), tópicos em evidência na reprodução equina atual.

Portanto, a análise refinada de subpopulações espermáticas contribui para uma avaliação mais precisa da qualidade funcional do espermatozoide, superando limitações das abordagens convencionais ao revelar perfis celulares com implicações diretas na fertilidade.

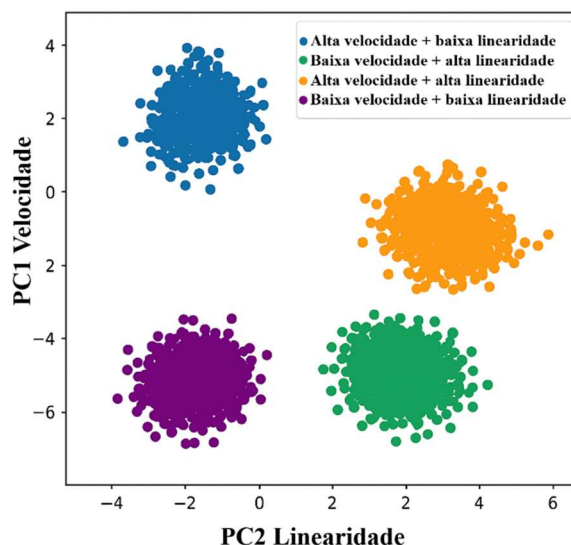


Figura 1. Imagem ilustrativa de uma análise de componentes principais para avaliação de subpopulações espermáticas, baseada nos parâmetros de velocidade e linearidade.

Avaliação morfológica avançada

A morfologia espermática, tradicionalmente avaliada por microscopia óptica após colorações como eosina-nigrosina, Karras modificado e kit panótico rápido ou por microscopia de contraste de fase, constitui um parâmetro fundamental na avaliação da qualidade seminal. No entanto, esses métodos convencionais apresentam limitações significativas, principalmente pela introdução de artefatos morfológicos decorrentes dos processos de fixação, desidratação e coloração, que podem mascarar ou distorcer estruturas espermáticas. Com o intuito de superar essas limitações, foram desenvolvidas tecnologias inovadoras, como o sistema Trumorph® (Gacem et al., 2021), que permite a análise de espermatozoides vivos em sêmen fresco, sem necessidade de fixação ou coloração, por meio de compressão controlada em câmara de microscopia de contraste de fase.

De acordo com Gacem et al. (2021), o uso do Trumorph® possibilitou uma avaliação mais fiel e acurada da morfologia espermática em equinos e asininos, revelando proporções significativamente maiores de espermatozoides morfolologicamente normais quando comparado ao método convencional de coloração. Essa diferença sugere que a técnica tradicional pode superestimar a frequência de defeitos devido à indução de alterações morfológicas artificiais durante o preparo da amostra. Além disso, o Trumorph® demonstrou ser uma ferramenta rápida, padronizável e menos subjetiva, facilitando a identificação precisa de anormalidades verdadeiras, como defeitos de cabeça, peça intermediária e cauda, com impacto direto na acurácia da seleção seminal e no diagnóstico da fertilidade.

Citometria de fluxo

A citometria de fluxo revolucionou a análise espermática ao possibilitar a avaliação individual de parâmetros celulares em grandes populações de espermatozoides. Mais recentemente, a citometria multiparamétrica expandiu esse potencial ao permitir a análise simultânea de múltiplos aspectos funcionais em uma única célula, como integridade de membrana plasmática, integridade acrossomal, potencial de membrana mitocondrial, geração de espécies reativas de oxigênio (ROS), entre outros. Isso é viabilizado pelo uso combinado de fluorocromos específicos e citômetros equipados com múltiplos canais de detecção, capazes de distinguir sinais fluorescentes com precisão espectral (Peña et al., 2024).

Nessa técnica, células marcadas com sondas fluorescentes passam individualmente por um feixe de laser, e os sinais emitidos por cada fluorocromo, vinculado a alvos específicos, são detectados, quantificados e convertidos em dados digitais. A possibilidade de utilizar diversos fluoróforos simultaneamente, desde que seus espectros não se sobreponham, permite avaliar de maneira abrangente a qualidade funcional do sêmen. Em contraste com a microscopia convencional, que analisa poucas centenas de células de forma subjetiva, a citometria de fluxo processa dezenas de milhares de espermatozoides com alta reprodutibilidade e robustez estatística (Love & Kenney, 2008).

Essa tecnologia tem sido amplamente aplicada na andrologia equina para investigar biomarcadores de fertilidade como viabilidade celular, status acrossomal, funcionalidade mitocondrial, estresse oxidativo, integridade do DNA espermático, dentre outros. Diante da complexidade dos dados gerados em análises multiparamétricas, a aplicação de algoritmos modernos de redução de dimensionalidade, como o UMAP (Uniform Manifold Approximation and Projection), tem proporcionado uma nova perspectiva interpretativa. O UMAP permite agrupar células com perfis funcionais semelhantes em projeções bidimensionais, evidenciando padrões complexos e sutis que passariam despercebidos em análises convencionais. Essa abordagem tem revelado subgrupos funcionais dentro da população espermática total, oferecendo novas hipóteses explicativas para casos de subfertilidade idiopática, mesmo em amostras com parâmetros tradicionais aparentemente normais (Peña et al., 2024).

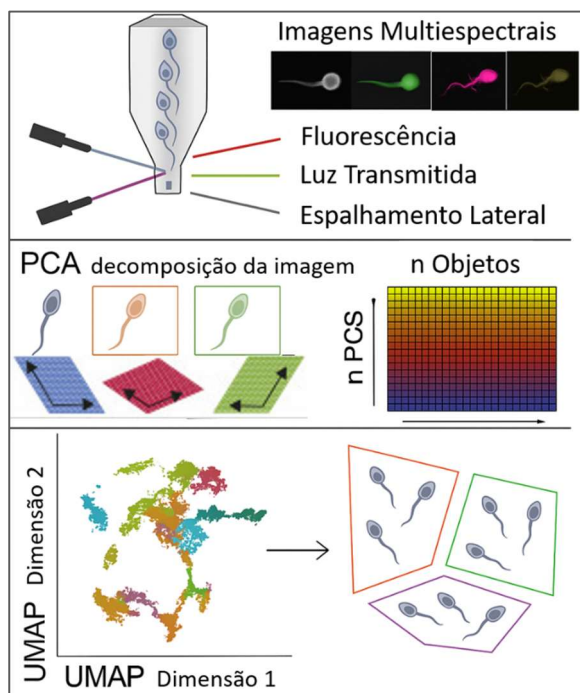


Figura 2. Representação gráfica do processo de análise multiparamétrica de dados de citometria de fluxo utilizando redução de dimensionalidade. No topo, células espermáticas em suspensão são analisadas enquanto passam por diferentes lasers, capturando sinais de fluorescência, luz transmitida e espalhamento lateral. Em seguida, as imagens são decompostas por Análise de Componentes Principais (PCA), extraindo características visuais relevantes. Esses dados são organizados em uma matriz (n Objetos $\times$ n Componentes Principais). Por fim, a técnica UMAP é aplicada para reduzir a dimensionalidade dos dados, permitindo a visualização em 2D e o agrupamento de células com morfologias e características semelhantes (adaptado de Stolarek et al., 2022).

Integridade de membrana plasmática

A viabilidade espermática é tradicionalmente associada à integridade da membrana plasmática, essencial para a manutenção da homeostase, motilidade e competência fecundante do espermatozoide. A citometria de fluxo revolucionou essa avaliação ao utilizar corantes de permeabilidade seletiva que permitem diferenciar, com alta precisão, células vivas e mortas. Protocolos clássicos empregam a combinação de fluorocromos com afinidade pelo DNA, como o iodeto de propídeo (PI) – que penetra apenas em espermatozoides com membranas danificadas, emitindo fluorescência vermelha ao intercalar-se ao DNA – e SYBR-14 permeável a membrana plasmática íntegra e emite fluorescência verde ao ligar-se com o DNA, ou ainda a associação com 6-carboxifluoresceína diacetato (CFDA), que atravessa membranas intactas e reagem com as esterasas citoplasmáticas formando um composto fluorescente impermeável a membrana plasmática que emite fluorescência verde. Nessa configuração, células viáveis exibem apenas o sinal verde, enquanto aquelas com membrana comprometida são duplamente marcadas ou apenas vermelhas, permitindo quantificação rápida e objetiva da porcentagem de espermatozoides com membrana íntegra (Garner et al., 1994).

A combinação SYBR-14/PI é amplamente reconhecida como o padrão-ouro para avaliação da viabilidade espermática de equinos e bovinos, e sua aplicação está bem estabelecida na rotina laboratorial,

inclusive por meio de kits comerciais. Estudos indicam que a viabilidade avaliada por essa técnica geralmente excede 70% em ejaculados normais, correlacionando-se positivamente com parâmetros clássicos de motilidade. Além disso, sondas alternativas como Hoechst 33342 ou ethidium homodimer-1 (EthD-1) podem ser utilizadas para refinar a discriminação entre espermatozoides viáveis e inviáveis, especialmente em ensaios multiparamétricos. Avanços recentes incorporaram o uso de sondas fixáveis, como Fixable Live/Dead Red, Zombie Green ou calceína AM, que mantêm a marcação mesmo após a fixação celular. Isso viabiliza análises diferidas com mínima perda de qualidade analítica, sendo particularmente útil em laboratórios com limitações de tempo ou infraestrutura, ou em casos que exigem transporte da amostra ou análise dinâmica em diferentes tempos (Peña et al., 2018).

Integridade acrossomal

O acrossomo é uma organela essencial para a fertilização, pois contém enzimas hidrolíticas responsáveis pela penetração do espermatozoide na zona pelúcida do oócito. Sua integridade estrutural e funcional é, portanto, um parâmetro crítico na avaliação da competência fecundante dos espermatozoides. A citometria de fluxo permite avaliar o status acrossomal com alta resolução, por meio da utilização de lectinas fluorescentes, como a PNA (*Arachis hypogaea*) e a PSA (*Pisum sativum*), ambas conjugadas a fluorocromos como FITC, que emite fluorescência verde. A PNA-FITC reconhece resíduos de beta-galactose expostos na face interna da membrana acrossomal externa, tornando-se fortemente fluorescente após a reação acrossomal, quando essa estrutura é exposta. Já a PSA-FITC liga-se preferencialmente à matriz do acrossomo e também permite identificar células que já passaram pela reação. Em espermatozoides com acrossomo intacto, essas lectinas não conseguem atravessar a membrana plasmática e não marcam significativamente a célula. Em contraste, nos espermatozoides que sofreram reação acrossomal, a exposição de componentes internos permite a ligação da lectina, resultando em fluorescência intensa (Cheng et al., 1996).

A marcação simultânea com sondas de viabilidade, como iodeto de propídeo (PI) ou Hoechst 33342, é essencial para evitar interpretações errôneas, já que apenas espermatozoides vivos são fisiologicamente capazes de sofrer a reação acrossomal. Essa abordagem de dupla ou tripla marcação (viabilidade + integridade acrossomal $\pm$ DNA) permite categorizar os espermatozoides em quatro subpopulações: (1) viáveis com acrossomo intacto, (2) viáveis com acrossomo lesionado, (3) não viáveis com acrossomo intacto e (4) não viáveis com acrossomo lesionado. Essa classificação confere maior robustez ao diagnóstico funcional do sêmen (Peña et al., 2018).

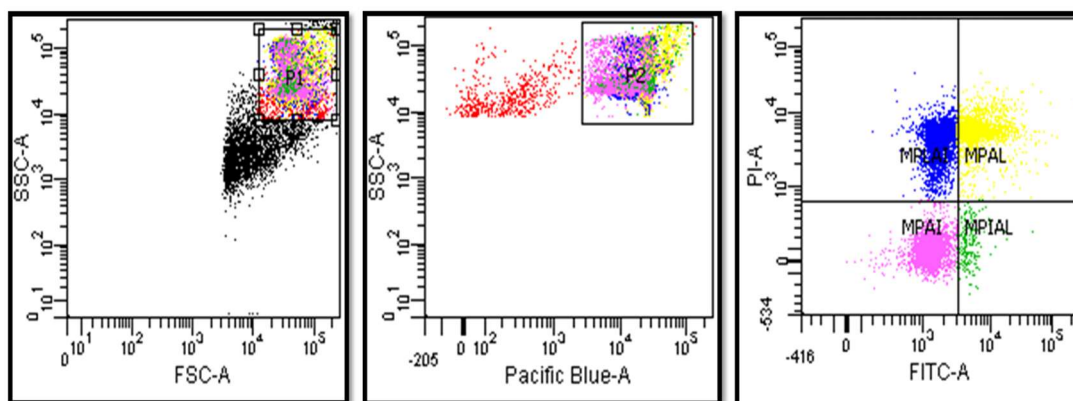


Figura 2. Dotplot da avaliação espermática utilizando os fluorocromos Hoechst 33342, permeável a membrana plasmática e com afinidade pelo DNA, assim separa as células dos debris; Iodeto de propídeo, impermeável a membrana plasmática íntegra, também com afinidade pelo DNA, identificando células com a membrana lesada; e FITC-PSA para avaliação de lesão acrossomal. MPLAI: membrana plasmática lesada e acrossomal íntegra ($PI^+FITC^-PSA^-$), MPAL: membrana plasmática e acrossomal lesadas ($PI^+FITC^-PSA^-$), MPAL: membrana plasmática e acrossomal íntegras ($PI^-FITC^-PSA^-$), e MPIAL: membrana plasmática íntegra e acrossomal lesada ($PI^-FITC^-PSA^+$).

Capacitação espermática

A capacitação espermática envolve modificações bioquímicas que preparam o espermatozoide para a fertilização, destacando-se o aumento de cálcio intracelular como sinal-chave para a hiperativação e

reação acrossomal; por isso, seu monitoramento é um marcador funcional indireto desse processo (Correia et al., 2015).

A citometria de fluxo permite avaliar o influxo de Ca^{2+} de forma precisa e quantitativa com a utilização de corantes fluorescentes sensíveis ao cálcio, como o Fluo-3 AM e o Fluo-4 AM. Esses corantes penetram nas células e se acumulam no citoplasma, onde emitem fluorescência verde ao se ligarem ao cálcio. A intensidade do sinal fluorescente se correlaciona diretamente com a concentração de Ca^{2+} livre na célula, fornecendo uma medida funcional em tempo real da capacitação (Publicover et al., 2007).

Em espermatozoides equinos, o uso do Fluo-3 e Fluo-4 já foi validado para detectar alterações de Ca^{2+} durante a exposição a indutores da capacitação, como bicarbonato, albumina sérica bovina (BSA) e ionóforo de cálcio A23187. A citometria permite quantificar a porcentagem de espermatozoides que respondem a esses estímulos com aumento de cálcio, identificando subpopulações capacitadas e correlacionando-as com a competência fecundante. Essa abordagem se destaca por sua sensibilidade e por permitir análises multiparamétricas simultâneas, incluindo viabilidade e integridade acrossomal (Morrell & Rodriguez-Martinez, 2011).

Assim, a análise do influxo de cálcio com Fluo-3 ou Fluo-4 é uma ferramenta útil para investigar a capacitação espermática e causas funcionais de subfertilidade em garanhões, complementando outras avaliações na caracterização da qualidade espermática (López-Fernández et al., 2011).

O efluxo de colesterol da membrana plasmática também está associado à ativação de vias de transdução de sinais da membrana relacionadas à capacitação (Visconti et al., 1999), assim na citometria de fluxo também é possível a avaliação do efluxo de colesterol pela BODIPY-Cholesterol, que pode facilmente ser aplicada à pesquisa de capacitação *in vitro*. E ainda, como o efluxo do colesterol resulta em um aumento na capacitação e na fosforilação da proteína tirosina por meio da via AMPc/PKA (Visconti et al., 1999), outra forma de avaliação da capacitação por citometria de fluxo é com o uso do anticorpo antifosfotirosina conjugada a um fluorocromo. (Andrade et al., 2008).

Alterações de membrana plasmática semelhante a apoptose e ou capacitação

A citometria de fluxo também permite a detecção de marcadores moleculares associados a diferentes vias de morte celular nos espermatozoides. Um dos principais eventos de apoptose é a translocação da fosfatidilserina (FS) do folheto interno para o externo da membrana plasmática, o que pode ser detectado com precisão por meio de sondas de anexina V conjugadas a fluorocromos (geralmente FITC) (Peña et al., 2016). Em espermatozoides essa alteração pode ocorrer também tanto em crio injúrias como durante a capacitação, sem estar diretamente correlacionado a um evento apoptótico. Assim espermatozoide viáveis e sem alteração de membrana, a FS permanece restrita ao folheto interno; já aqueles que apresentam alteração de membrana, a exposição da FS permite a ligação da anexina V, gerando fluorescência mensurável. A marcação simultânea com iodeto de propídio (PI) possibilita distinguir células integras que não tem alteração de membrana plasmática, daquelas integras, mas que já apresentam alteração de membrana (Anexina V/PI-) membrana plasmática íntegra, mas já com alteração de membrana (Anexina V+/PI-), essas células já podem ser consideradas células com “lesão” precoce (Marqui et al., 2018).

Além disso, o corante Yo-Pro-1 foi o utilizado para identificar espermatozoides em apoptose precoce, uma vez que penetra em células com alterações intermediárias de permeabilidade, mas não em células viáveis, mas essa alteração de permeabilidade também pode ocorrer em alterações relacionadas a crio injúrias, avaliando também uma lesão de membrana mais precoce do que a ruptura total marcada pelo iodeto de propídio. Apesar de alguns estudos com sêmen equino indicam que a combinação Yo-Pro-1/EthD-1 não proporciona vantagens claras sobre a tradicional dupla SYBR-14/PI na detecção de alterações iniciais de membrana (Gallardo Bolaños et al., 2012; García et al., 2012), sabe-se que na avaliação de laudos andrológicos de animais com histórico de subfertilidade essa avaliação confere dados importantes de como devemos trabalhar com esse indivíduo desde a congelamento até a descongelamento do sêmen (dados não publicados).

Apoptose

Outra ferramenta relevante é a detecção de enzimas apoptóticas intracelulares, especialmente caspase-3 e caspase-7, cuja ativação é um marcador fundamental do processo apoptótico. Sondas fluorescentes específicas que se ligam a substratos clivados por caspases permitem detectar espermatozoides que ativaram essas vias, mesmo quando ainda apresentam integridade de membrana, fornecendo uma visão mais precoce e sensível do comprometimento celular (Balão da Silva et al., 2023).

Atividade mitocondrial

A funcionalidade mitocondrial é um fator crítico na avaliação da qualidade espermática, especialmente em garanhões, cuja produção de ATP depende majoritariamente da fosforilação oxidativa nas mitocôndrias localizadas na peça intermediária do flagelo. Essa produção energética é essencial para sustentar a motilidade progressiva, um dos principais indicadores de fertilidade (Plaza Dávila et al., 2015).

A disfunção mitocondrial pode comprometer significativamente o desempenho espermático, refletindo-se em motilidade reduzida e, conseqüentemente, em menor competência fecundante. Para avaliação do potencial de membrana mitocondrial, diversas sondas fluorescentes têm sido utilizadas com eficácia. Entre as mais empregadas estão as probes JC-1, rhodamina 123 e MitoTracker Green (Gravance et al., 2000; Amaral & Ramalho-Santos, 2009).

A probe JC-1 é particularmente valorizada por sua capacidade de distinguir mitocôndrias funcionais, que acumulam o corante e emitem fluorescência laranja/vermelha, daquelas despolarizadas, que permanecem verdes (Gravance et al., 2000). A rhodamina 123, por sua vez, também é utilizada para identificar mitocôndrias ativas, acumulando-se seletivamente em organelas com alto potencial de membrana. Já a MitoTracker Green, embora útil, não depende do potencial mitocondrial para sua marcação, sendo mais indicada para quantificação da massa mitocondrial total do que da funcionalidade (Amaral & Ramalho-Santos, 2009).

Recentemente, o MitoTracker Deep Red tem ganhado destaque por sua capacidade de manter a fluorescência após a fixação celular, tornando-se ideal para análises diferidas, como aquelas que exigem transporte ou múltiplas marcações em painéis multiparamétricos. Sua emissão no espectro vermelho profundo evita interferência com fluoróforos comumente usados, facilitando combinações com sondas de viabilidade ou integridade acrossomal (Peña et al., 2018).

Estresse oxidativo

Os espermatozoides equinos exibem uma das mais elevadas atividades mitocondriais entre os animais domésticos, o que, embora seja fundamental para sua motilidade altamente dependente de ATP, os torna particularmente suscetíveis à geração excessiva de espécies reativas de oxigênio (EROs). Quando produzidas em excesso, as EROs podem causar danos oxidativos significativos às membranas lipídicas, proteínas estruturais e ao DNA espermático, comprometendo a viabilidade, motilidade e a competência fecundante. Como consequência, o estresse oxidativo é frequentemente implicado em casos de subfertilidade idiopática (Swegen et al., 2014).

A citometria de fluxo tem se consolidado como uma ferramenta eficiente para a detecção direta e multiparamétrica de EROs em espermatozoides, permitindo correlações funcionais com outros indicadores celulares. Sondas fluorescentes específicas são utilizadas conforme o tipo de ERO a ser detectada: dihidroetídio (DHE) para ânion superóxido, CellROX Deep Red para EROs totais e diclorofluoresceína diacetato (DCFH-DA) para peróxido de hidrogênio. Adicionalmente, o uso de sondas como MitoSOX Red permite a detecção específica de superóxidos gerados nas mitocôndrias (Peña et al., 2018). A análise da peroxidação lipídica, é uma avaliação indireta já que indica danos às membranas celulares causadas pelos EROs, pode ser realizada com o marcador C11-BODIPY 581/591, que sofre uma mudança de fluorescência de vermelho para verde conforme o grau de oxidação lipídica.

A combinação de marcadores de viabilidade, integridade acrossomal, funcionalidade mitocondrial e níveis de EROs em um único painel multiparamétrico de citometria de fluxo oferece um perfil funcional abrangente do espermatozoide. Essa abordagem integrada tem se mostrado particularmente valiosa na investigação de falhas reprodutivas de origem funcional, aprofundando a compreensão de casos de infertilidade em garanhões e contribuindo para uma predição mais refinada do desempenho reprodutivo (Hernández-Avilés et al., 2019).

Integridade do DNA espermático

Danos ao DNA do espermatozoide podem levar a falhas de fertilização ou perdas embrionárias precoces, mesmo quando outros parâmetros estão normais. Alguns garanhões subfêrteis exibem índices elevados de fragmentação de DNA espermático sem alterações evidentes na motilidade ou morfologia, o que torna crucial a incorporação dessa avaliação (Love & Kenney, 2008).

A citometria de fluxo adaptou testes de integridade cromatínica para a rotina. Um dos mais difundidos é o Ensaio de Estrutura da Cromatina Espermática (Sperm Chromatin Structure Assay, SCSA), que utiliza a propriedade metacromática do corante laranja de acridina (AO): sob condições controladas

(pH ácido), o AO emite fluorescência verde quando intercalado em DNA de fita dupla, mas emite laranja-avermelhado quando ligado a regiões de fita simples (decorrentes de quebras na molécula de DNA). Assim, ao analisar milhares de eventos, obtém-se o índice de fragmentação de DNA (DNA Fragmentation Index, DFI), correspondente à proporção de espermatozoides com DNA danificado. Valores de DFI elevados têm sido associados à redução da fertilidade em várias espécies, incluindo equinos (Evenson & Wixon, 2006; Ball et al., 2018).

Outro teste é o Ensaio de Dispersão da Cromatina Espermática (Sperm Chromatin Dispersion, SCD), no qual espermatozoides com DNA íntegro formam um halo de cromatina dispersa após desnaturação e remoção das proteínas nucleares, enquanto espermatozoides com DNA fragmentado formam halos pequenos ou ausentes. Embora o SCD originalmente envolva avaliação microscópica, já existem tentativas de automatizá-lo e adaptá-lo para citometria ou análise computadorizada, eliminando a subjetividade da leitura manual (Cortés-Gutiérrez et al., 2008).

Outros ensaios de integridade do DNA espermático, como o teste Cometa (COMET) e o ensaio TUNEL (Terminal deoxinucleotidil transferase dUTP nick-end labeling), também podem ser empregados para detectar quebras na molécula de DNA, embora sejam mais utilizados em pesquisas do que na rotina clínica. Adicionalmente, a quantificação da 8-hidroxi-2'-desoxiguanosina (8-OHdG) por meio de ensaios imunológicos serve como indicador de danos oxidativos ao DNA espermático (Hernández-Avilés et al., 2019).

No geral, a inclusão dos testes de integridade de DNA à avaliação seminal permite detectar subfertilidades de origem espermática antes não diagnosticáveis; por exemplo, um garanhão pode apresentar motilidade e morfologia normais, mas exibir alto grau de danos ao DNA espermático que comprometerá o desenvolvimento do futuro embrião e, consequentemente, a fertilidade.

Painéis multiparamétricos de citometria de fluxo

A aplicação da citometria de fluxo multiparamétrica na avaliação funcional de espermatozoides equinos tem sido aprimorada por meio de protocolos avançados que combinam múltiplas sondas fluorescentes, formando painéis. Esses painéis permitem a análise simultânea de diferentes aspectos celulares em uma única amostra, oferecendo uma visão integrada da qualidade espermática (Peña, 2015).

Um dos protocolos desenvolvidos avalia simultaneamente a viabilidade celular, a atividade de caspases e a peroxidação lipídica. Para isso, emprega-se o etídio homodímero-1 (EthD-1) como marcador de integridade de membrana, sondas específicas para caspases 3 e 7 como indicadores de apoptose e 4-hidroxinonenal (4-HNE) para detectar peroxidação lipídica. A combinação com o corante nuclear Hoechst 33342 permite excluir detritos e focar a análise em células intactas (Peña et al., 2023).

Outro painel validado integra a avaliação da viabilidade espermática, integridade acrossomal e potencial mitocondrial. A viabilidade é determinada pela dupla marcação SYBR-14/iodeto de propídeo (PI), enquanto a integridade do acrossomo é avaliada com a lectina fluorescente PNA-FITC, que se liga a resíduos de carboidrato expostos após a reação acrossomal. Para a análise mitocondrial, utiliza-se o MitoTracker Deep Red, que permite detectar mitocôndrias funcionalmente ativas mesmo após fixação celular, com a vantagem adicional de não interferir com fluorocromos usados nos canais verde e laranja da citometria (Peña et al., 2022).

Outros painéis multiparamétricos também foram descritos para equinos, como o painel integrando a avaliação do potencial de membrana mitocondrial, da produção de superóxido intracelular e da permeabilidade da membrana plasmática, como indicativo precoce de apoptose, foi desenvolvido por meio da combinação das sondas MitoStatus Red, MitoSOX™ Red e YoPRO-1, respectivamente, além da utilização de Hoechst 33342 para a exclusão de debris e células não espermáticas (Freitas-Dell'Aqua et al., 2018).

Esses painéis multiparamétricos têm permitido não apenas uma caracterização mais completa dos espermatozoides equinos, mas também a identificação de subpopulações com diferentes perfis funcionais, auxiliando a identificar perfis celulares em casos de subfertilidade (Peña, 2015).

Biomarcadores proteicos

Certos marcadores proteicos espermáticos, quantificáveis por meio de abordagens citométricas ou imunológicas, têm emergido como ferramentas promissoras na predição da fertilidade e da capacidade de congelamento seminal na prática clínica.

Um exemplo é a proAKAP4, uma proteína estrutural do flagelo, cuja concentração nos espermatozoides demonstrou correlação significativa com a qualidade pós-descongelamento do sêmen em

bovinos e equinos (Griffin et al., 2019). Altos níveis de proAKAP4 indicam maior motilidade e viabilidade espermática após o congelamento. A partir desses estudos, kits comerciais de ELISA para a dosagem de proAKAP4 foram desenvolvidos, ilustrando a extrapolação de pesquisas em análises avançadas de sêmen para a rotina de centros de reprodução, permitindo a identificação precoce de garanhões com bom potencial para inseminação artificial a fresco ou congelado (Dordas-Perpinyà et al., 2022a, b).

Outro exemplo relevante é a avaliação da fosforilação de resíduos de tirosina em proteínas espermáticas, um evento chave no processo de capacitação. A fosforilação de tirosina está associada à aquisição da competência fecundante e à hiperativação da motilidade espermática, sendo reconhecida como um marcador molecular do estado funcional do espermatozoide. Essa modificação pós-traducional pode ser detectada por anticorpos monoclonais anti-fosfotirosina conjugados a fluorocromos, aplicados em técnicas como imunofluorescência para imunolocalização. Estudos demonstram que a intensidade e o padrão de fosforilação de tirosina variam entre indivíduos e estão correlacionados à fertilidade, o que torna essa análise uma ferramenta adicional valiosa para avaliar a capacitação e o potencial reprodutivo dos espermatozoides em garanhões (Pommer et al., 2003; Andrade et al., 2008).

Além disso, a utilização de anticorpos monoclonais conjugados a fluorocromos tem possibilitado a detecção de proteínas envolvidas em diferentes vias celulares, como as vias apoptóticas, tanto na superfície celular quanto em compartimentos intracelulares, ampliando as possibilidades diagnósticas. Entre os marcadores de superfície destacam-se Fas (CD95) e os receptores de TRAIL (TRAIL-R1 e TRAIL-R2), enquanto marcadores intracelulares como as caspases 3 e 7, enzimas executoras da apoptose, e a ubiquitina, associada à degradação proteica, vêm sendo investigados como indicadores funcionais relevantes da qualidade espermática (Peña et al., 2016).

Segundo Hernández-Avilés et al. (2019), a aplicação combinada desses biomarcadores com sistemas CASA acoplados à fluorescência permite a correlação entre padrões de motilidade e expressão molecular em nível de célula individual. Essa abordagem integrada fortalece a capacidade de diagnóstico funcional do ejaculado, sendo particularmente útil na detecção de casos de subfertilidade idiopática, em que os parâmetros tradicionais, como motilidade e morfologia, não revelam anormalidades evidentes.

Análises ômicas aplicadas ao sêmen equino

Transcriptômica

Embora espermatozoides não realizem transcrição nem tradução, carregam RNAs remanescentes da espermatogênese e maturação epididimária. Antes considerados resíduos, esses RNAs hoje são reconhecidos por seu papel na fertilização e no desenvolvimento embrionário inicial (Das et al., 2013).

Durante a fecundação, o espermatozoide transfere ao oócito não apenas seu DNA, mas também RNAs (mRNAs, miRNAs, lncRNAs) capazes de modular a expressão gênica nas primeiras divisões embrionárias. Assim, o perfil de RNA espermático tem sido investigado como biomarcador de fertilidade, sob a hipótese de que garanhões férteis apresentem assinaturas transcriptômicas distintas das de subfêrteis, refletindo diferenças na espermatogênese ou maturação pós-testicular (Ortiz-Rodríguez et al., 2019).

Estudos com RNA-seq mostraram que o espermatozoide equino carrega milhares de transcritos. Em um deles, foram encontrados mais de 11 mil tipos diferentes de RNA em amostras de sêmen, sendo que o mais abundante tinha quase 1.500 bases. Muitos desses RNAs são semelhantes aos encontrados em outras espécies, o que sugere que eles desempenham funções comuns relacionadas à reprodução. Além disso, o perfil de RNAs variaram entre grupos de espermatozoides mais ou menos maduros. Ao comparar células mais densas (mais maduras) com as menos densas (mais imaturas), foram identificados 166 RNAs com diferenças significativas na quantidade. A maioria desses RNAs (159) estava mais presente nas células de melhor qualidade (Ing et al., 2020).

Esses achados foram confirmados por qPCR, ao detectarem que o RNA do gene SLC26A8, envolvido no transporte de substâncias nos testículos, era três vezes mais abundante nos espermatozoides imaturos. Já os RNAs dos genes SCP2D1 e SPATA31D1, ligados às últimas etapas da formação dos espermatozoides, eram de 3 a 6 vezes mais presentes nas células maduras (Ing et al., 2014; Alves et al., 2022). Isso indica que o tipo de RNA presente pode refletir o estágio de desenvolvimento e a qualidade funcional do espermatozoide.

Além dos mRNAs, um outro tipo de RNA pequeno, chamado microRNA (miRNA), tem ganhado atenção. Esses miRNAs atuam como reguladores, ajudando a desligar certos genes depois da fertilização. Em cavalos, um estudo recente identificou 287 tipos de miRNAs maduros nos espermatozoides, especialmente nas células mais densas (e mais maduras). Nessa população, os miRNAs estavam mais prontos para uso, o que indica maior competência celular (Ing et al., 2024). Nove desses miRNAs estavam

significativamente mais presentes nos espermatozoides de melhor qualidade. Três deles atuavam diretamente em genes que controlam a degradação de proteínas e RNAs, processos que deveriam estar desligados em células já maduras. Isso sugere que os miRNAs ajudam a manter a estabilidade e o bom funcionamento da célula, enquanto sua ausência ou imaturidade pode indicar problemas na qualidade dos espermatozoides (Ing et al., 2024).

Esses estudos mostram que o perfil de RNAs, tanto os mensageiros (mRNAs) quanto os reguladores (miRNAs), pode ajudar a distinguir espermatozoides férteis dos que têm menor potencial. No futuro, um painel de fertilidade baseado nesses RNAs poderá ser usado para selecionar garanhões com melhor desempenho reprodutivo. Apesar dos desafios técnicos, como a pequena quantidade de RNA e a estrutura muito compacta do DNA nos espermatozoides, essa área de pesquisa denominada transcriptômica espermática vem se consolidando como uma ferramenta promissora na avaliação da fertilidade masculina.

Proteômica e fosfoproteômica

A análise proteômica aplicada ao sêmen de garanhões tem avançado na compreensão da função espermática e na identificação de biomarcadores de fertilidade. Diferentemente do DNA e RNA, o proteoma espermático reflete diretamente a maquinaria funcional e as modificações pós-traducionais associadas à maturação (Peña et al., 2024).

Com o avanço da espectrometria de massa, estudos revelaram mais de mil proteínas nos espermatozoides equinos, associando perfis proteicos à fertilidade. Destacam-se estudos sobre: (a) a importância dessas proteínas no metabolismo energético e no estado redox para a longevidade espermática; (b) os efeitos de manejos como refrigeração e criopreservação sobre o proteoma; e (c) a identificação de proteínas correlacionadas à fertilidade (Martín-Cano et al., 2020; Peña et al., 2024).

Estudos comparativos entre ejaculados frescos de “bons” e “maus congeladores” mostraram diferenças na abundância de proteínas ligadas ao estresse oxidativo e metabolismo energético, sugerindo que a resiliência espermática ao congelamento depende do estado redox e perfil metabólico (Martín-Cano et al., 2020).

De forma similar, comparações entre garanhões férteis e subfêrteis revelaram 140 proteínas diferencialmente expressas, sendo 83 reduzidas e 57 aumentadas nos subfêrteis. Muitas estavam ligadas ao metabolismo geral e lipídico. Destaca-se a enzima arilsulfatase F (ARSF), cuja ausência na região acrossomal correlacionou-se com menor ligação à zona pelúcida, sugerindo papel na competência fecundante (Hernández-Avilés et al., 2024).

Outro estudo investigou flutuações sazonais de fertilidade. Em amostras de mesma origem, espermatozoides obtidos durante período de alta fertilidade apresentaram maior adesão de caseínas (κ , α S1 e α S2), enquanto nas amostras obtidas em período de menor fertilidade predominaram proteínas epididimárias e do plasma seminal, como ELSPBP1, HSP-1 e clusterina. Ensaio *in vitro* indicaram que a adição de caseína protege a membrana espermática e reduz a ligação de proteínas deletérias, estabilizando o gameta e preservando a fertilidade (Morris, 2023).

Além disso, a fosfoproteômica revelou que a criopreservação reduz a fosforilação de proteínas como SPATA18, CABYR e AKAP3/AKAP4, o que pode explicar a perda de funcionalidade espermática após o congelamento. Esses achados abrem caminho para testes práticos, como painéis proteômicos ou kits ELISA multiparâmetro, voltados à predição de fertilidade em garanhões (Gaitskell-Phillips et al., 2023).

Testes de insuficiência acrossomal e avaliação da reação acrossômica

A reação acrossomal é essencial para a penetração do espermatozoide no oócito. Falhas nesse processo – como ausência, antecipação ou reação defeituosa – podem causar infertilidade mesmo com sêmen aparentemente normal (Hernández-Avilés et al., 2022). Em garanhões, foi descrita uma forma específica de subfertilidade chamada insuficiência acrossomal espermática (IAE), caracterizada por espermatozoides morfolologicamente normais e viáveis que não conseguem desencadear adequadamente a reação acrossomal, resultando em taxas de fertilização extremamente baixas e diagnóstico difícil por exames convencionais. Para detectar IAE, utiliza-se o Teste de Exocitose Acrossomal (Teste AE), no qual o sêmen é incubado com ionóforo de cálcio (A23187) e a taxa de reação acrossomal é avaliada com lectina fluorescente (como PNA-FITC). Garanhões férteis apresentam ≥ 70 –80% de reação, enquanto os com IAE apresentam $\leq 50\%$ (Cheng et al., 1996).

Em um estudo clínico, 8 de 21 garanhões com subfertilidade idiopática apresentaram reação acrossomal reduzida (>30 pontos percentuais abaixo dos controles). Curiosamente, seus espermatozoides

mantiveram maior viabilidade após 2 h de incubação, sugerindo que a falta de reação, não a vitalidade, era o fator limitante (Varner et al., 2022).

Adicionalmente, estudos identificaram uma associação genética com mutações no gene FKBP6 (Raudsepp et al., 2012; Varner et al., 2022). Garanhões Puro-Sangue Inglês (PSI) homozigotos para duas mutações pontuais (genótipo A/A-A/A em dois SNPs no éxon 5 de FKBP6) apresentaram predisposição à IAE, herdando um defeito que prejudica a cascata molecular da exocitose acrossômica (Hernández-Avilés et al., 2022; Varner et al., 2022). Em 8 garanhões identificados com insuficiência acrossomal, amostras de crina/sangue revelaram que 7 deles portavam o genótipo mutante de FKBP6 e eram da raça PSI, sugerindo uma predisposição genética específica desta raça (Hernández-Avilés et al., 2022). Assim, a combinação do teste funcional (citometria de fluxo para reação acrossomal) com a análise molecular do gene FKBP6 constitui uma estratégia diagnóstica poderosa, permitindo confirmar a etiologia genética da subfertilidade em questão (Varner et al., 2022).

Atualmente, testes de DNA para detecção da mutação FKBP6 estão disponíveis e ajudam a orientar o manejo reprodutivo, como a indicação precoce para uso de ICSI em vez de inseminação convencional (Schrimpf et al., 2015).

Além do ionóforo, outros estímulos fisiológicos como progesterona ou extratos de oviduto também têm sido usados em testes laboratoriais, com eficácia reduzida em garanhões com IAE. O teste de ligação à zona pelúcida, apesar de mais trabalhoso, fornece avaliação funcional complementar: espermatozoides incapazes de sofrer a reação acrossomal raramente aderem adequadamente à zona (Cheng et al., 1996).

Uma vez diagnosticada a IAE, é possível contornar a limitação com o uso de ICSI, técnica que independe da reação acrossomal e permite a obtenção de embriões mesmo de garanhões subfêrteis (Varner et al., 2022). Portanto, testes de reação acrossomal são cruciais no diagnóstico de subfertilidade funcional, permitindo o direcionamento para biotécnicas reprodutivas adequadas e evitando falhas repetidas com inseminações convencionais.

Tetes de ligação *in vitro*

O teste de fertilidade *in vivo* é considerado o método mais preciso para avaliar a capacidade reprodutiva de um macho, baseando-se no acasalamento com fêmeas férteis e na análise das taxas de prenhez (Pimentel, 1989). No entanto, sua aplicação rotineira é limitada por ser demorada, onerosa e influenciada por diversos fatores externos, como a fertilidade das fêmeas, o manejo do sêmen, a habilidade do inseminador e o momento da inseminação. Diante dessas limitações, os ensaios de ligação *in vitro* surgem como ferramentas complementares valiosas, permitindo avaliar, de forma prática e controlada, a capacidade dos espermatozoides de interagir com estruturas do trato reprodutor feminino ou com componentes do oócito, como a zona pelúcida e a membrana perivitelínica. Esses testes fornecem informações importantes sobre a capacitação espermática, a integridade do acrossoma e o potencial de fertilização (Fontes et al., 2025).

O teste de ligação à zona pelúcida envolve a incubação de espermatozoides com zonas pelúcidas intactas isoladas de oócitos, também homólogos ou heterólogos. Esse ensaio permite avaliar a habilidade geral dos espermatozoides de se ligarem à matriz glicoproteica que envolve o oócito, funcionando como um indicador indireto da capacitação e da integridade do acrossoma. Diferenças no padrão de ligação podem sugerir falhas na maturação espermática ou na expressão de proteínas envolvidas no reconhecimento da zona pelúcida (Coutinho da Silva et al., 2012).

Já ensaio de hemizona é uma variação padronizada do teste de ligação à zona pelúcida, desenvolvido para reduzir a variabilidade biológica entre oócitos. Nesse método, zonas pelúcidas de oócitos (homólogos ou heterólogos) são divididas longitudinalmente em duas metades idênticas (hemizonas). Uma metade é incubada com espermatozoides do indivíduo avaliado e a outra com espermatozoides controle. A comparação direta do número de espermatozoides ligados a cada hemizona permite uma avaliação precisa da capacidade de ligação, refletindo a competência funcional dos espermatozoides (Fazeli et al., 1995).

O teste de ligação a fragmentos do oviduto (explant) tem como objetivo simular a interação dos espermatozoides com o epitélio ovidutário, local onde ocorre a capacitação e o armazenamento temporário dos gametas masculinos antes da fertilização. Nesse teste, espermatozoides são incubados com segmentos de oviduto da mesma espécie ou de espécies doadoras, como suínos ou bovinos, e avalia-se sua capacidade de adesão ao epitélio. Um número reduzido de espermatozoides ligados pode indicar alterações em proteínas de superfície importantes para a fixação, afetando negativamente a fertilidade (Carneiro et al., 2017).

Por fim, o teste de ligação à membrana perivitelínica da gema do ovo de galinha (conhecido como MPOG) utiliza essa membrana como um modelo heterólogo alternativo para avaliar a capacidade de ligação

espermática. Trata-se de um teste amplamente utilizado em diferentes espécies devido à sua acessibilidade e simplicidade técnica. Os espermatozoides são incubados com a membrana, e o número de células ligadas é contabilizado. O MPOG fornece informações sobre a funcionalidade da membrana plasmática e da região acrossomal dos espermatozoides, refletindo seu potencial de reconhecimento e interação com o oócito (Fontes et al., 2025).

Outras análises avançadas em desenvolvimento

Epigenética espermática

Além do DNA e RNA, os espermatozoides carregam marcas epigenéticas – como metilação de DNA e modificações de histonas – que influenciam a expressão gênica no embrião e podem impactar a fertilidade (Aitken & Baker, 2020). Estudos em equinos ainda são limitados, mas pesquisas em bovinos e humanos mostram que alterações na metilação genômica espermática estão associadas à subfertilidade, perdas embrionárias e falhas de desenvolvimento. A aplicação de técnicas como bisulfito-sequenciamento e ChIP-seq para mapeamento epigenético poderá representar um próximo passo na avaliação seminal avançada.

Painéis e plataformas integradas

Um caminho promissor é a criação de painéis diagnósticos que combinem múltiplos biomarcadores – como proAKAP4, DFI (índice de fragmentação de DNA), miRNAs específicos e parâmetros funcionais (como integridade de membranas, potencial mitocondrial, estresse oxidativo e funcionalidade acrossomal) – em um índice único de fertilidade. Plataformas comerciais baseadas em ELISA multiplex, microarranjos proteicos ou chips de RNA estão sendo desenvolvidas para esse fim (Peña et al., 2024; Parrish, 2023). Isso permitiria uma avaliação mais abrangente e objetiva do potencial reprodutivo do garanhão.

Inteligência artificial e aprendizado de máquina

Com o avanço das análises ômicas (como transcriptômica e proteômica), da citometria de fluxo e dos sistemas CASA, o volume de dados gerado na avaliação espermática tem aumentado significativamente. Nesse contexto, abordagens baseadas em inteligência artificial (IA) e aprendizado de máquina vêm sendo exploradas como ferramentas para integrar múltiplos parâmetros e prever a fertilidade com maior precisão em humanos (Hicks et al., 2019; Girela & García, 2023) e bovinos (Meyer & Wirthgen, 2022).

Embora ainda não existam estudos consolidados aplicando modelos de IA especificamente à predição de fertilidade em garanhões, os trabalhos mencionados em outras espécies demonstraram sucesso com algoritmos baseados em redes neurais, árvores de decisão e máquinas de vetor de suporte (SVM). Esses modelos conseguem correlacionar padrões moleculares e funcionais complexos, como níveis de fragmentação de DNA, avaliações funcionais por citometria, cinemática, morfometria e perfis de expressão gênica, com desfechos reprodutivos, auxiliando no diagnóstico de subfertilidade e na escolha personalizada de técnicas reprodutivas.

A expectativa é que, com o avanço e padronização das análises de sêmen equino, esses algoritmos possam ser adaptados e validados também para essa espécie, permitindo diagnósticos mais acurados e decisões clínicas mais estratégicas, especialmente em casos de subfertilidade idiopática.

Implicações clínicas

O crescente arsenal de ferramentas para análise do sêmen de garanhões tem impacto direto na prática clínica, sobretudo no manejo da subfertilidade idiopática. Esses recursos permitem diagnósticos mais precisos, substituindo o empirismo por avaliações menos subjetivas. Por exemplo, um garanhão idiopaticamente subfêrtil pode ser reclassificado ao se identificar um alto índice de fragmentação de DNA ou uma deficiência acrossomal específica, possibilitando intervenção direcionada (como uso de antioxidantes, escolha por ICSI, etc.). Da mesma forma, painéis multiparamétricos e biomarcadores moleculares podem auxiliar na triagem de reprodutores jovens, identificando precocemente indivíduos com menor potencial reprodutivo, uso de ferramentas biotecnológicas e tomada de decisão.

A implementação dessas inovações, entretanto, requer capacitação técnica e investimento laboratorial. Além disso, a interpretação integrada de múltiplos resultados demanda cautela e conhecimento aprofundado para evitar diagnósticos exagerados ou condutas indevidas. Protocolos padronizados e estudos de validação são essenciais para consolidar a utilização clínica dessas novas metodologias de forma integrada.

Assim, a incorporação de análises espermáticas avançadas na rotina da medicina reprodutiva equina oferece um panorama mais completo da fertilidade do garanhão, permitindo um manejo reprodutivo mais preciso e embasado em evidências, com potencial para melhorar as taxas de sucesso reprodutivo e minimizar perdas associadas à subfertilidade não diagnosticada.

Referências

- Aitken, R. J., & Baker, M. A. (2020). Redox regulation of human sperm function: from the physiological control of sperm capacitation to the etiology of infertility and DNA damage in the germ line. *Antioxidants & Redox Signaling*, 32(7), 527–535.
- Alghamdi, A. S., Lovaas, B. J., Bird, S. L., Lamb, G. C., Rendahl, A. K., Taube, P. C., & Foster, D. N. (2009). Species-specific interaction of seminal plasma on sperm–neutrophil binding. *Animal Reproduction Science*, 114(4), 331–344.
- Alves, M. B. R., Indriastuti, R., Pardede, B. P., Gunawan, A., Ulu, M. F., Arifiantini, R. I., & Purwantara, B. (2022). Sperm transcriptome analysis accurately reveals male fertility potential in livestock. *Frontiers in Genetics*, 13, 965799.
- Amaral, A., & Ramalho-Santos, J. (2009). Assessment of sperm mitochondrial function: JC-1 and Rhodamine 123. In *Methods in Molecular Biology* (Vol. 477, pp. 131–145). Humana Press.
- Andrade, A. F. C. D., Zaffalon, F. G., Merighe, G. K. F., Nascimento, J., Tarragó, O. F. B., Meirelles, F. V., & Arruda, R. P. D. (2008). Relation between tyrosine phosphorylation of the equine sperm surface proteins and acrosome reaction. *Animal Reproduction Science*, 107(3–4), 304–305.
- Aurich, C. (2016). Reproductive performance of stallions: the role of selection and management in subfertility detection. *Journal of Equine Veterinary Science*, 43(1), 1–5.
- Balão da Silva, C. M., Martín-Cano, F. E., Gaitskill-Phillips, G., & Peña, F. J. (2023). Multiparametric flow cytometry for determination of viability, caspase 3 and 7 activity, and lipid peroxidation adduct (4-hydroxynonenal) in equine spermatozoa. *Current Protocols*, 3(9), e885.
- Ball, B. A., Contri, A., Love, C. C., & Varner, D. D. (2018). Association between sperm DNA fragmentation and fertility in domestic animals: a meta-analysis. *Theriogenology*, 122, 15–20.
- Battut, I. B., Kempfer, A., Becker, J., Lebailly, L., Camugli, S., & Chevrier, L. (2016). Development of a new fertility prediction model for stallion semen, including flow cytometry. *Theriogenology*, 86(4), 1111–1131.
- Blondin, P., Beaulieu, M., Fournier, V., Morin, N., Crawford, L., Madan, P., & King, W. A. (2009). Analysis of bovine sexed sperm for IVF from sorting to the embryo. *Theriogenology*, 71, 30–38.
- Breitbart, H. (2005). Signaling pathways in sperm capacitation and acrosome reaction. *Cellular and Molecular Biology*, 51(5), 519–526.
- Carneiro, J. A. M., Monteiro, G. A., Martin, I., Maziero, R. R. D., Sancler-Silva, Y. F. R., de Paula Freitas-Dell'Aqua, C., & Dell'Aqua Jr, J. A. (2017). Heterologous oviductal cells binding capacity of cryopreserved equine ejaculated and epididymal spermatozoa. *Journal of Equine Veterinary Science*, 59, 40–48.
- Celeghini, E. C. C., Alves, M. B. R., De Arruda, R. P., de Rezende, G. M., Florez-Rodriguez, S. A., & de Sá Filho, M. F. (2021). Efficiency of CellROX Deep Red® and CellROX Orange® fluorescent probes in identifying reactive oxygen species in sperm samples from high and low fertility bulls. *Animal Biotechnology*, 32(1), 77–83.
- Cheng, F. P., Fazeli, A., Voorhout, W. F., Marks, A., Bevers, M. M., & Colenbrander, B. (1996). Use of peanut agglutinin to assess the acrosomal status and the zona pellucida-induced acrosome reaction in stallion spermatozoa. *Journal of Andrology*, 17(6), 674–682.
- Correia, J., Michelangeli, F., & Publicover, S. (2015). Regulation and roles of Ca²⁺ stores in human sperm. *Reproduction*, 150(2), R65–R76.
- Cortés-Gutiérrez, E. I., Crespo, F., Gosálvez, A., Davila-Rodriguez, M. I., López-Fernández, C., & Gosálvez, J. (2008). DNA fragmentation in frozen sperm of *Equus asinus*: Zamorano-Leones, a breed at risk of extinction. *Theriogenology*, 69(8), 1022–1032.

- Coutinho da Silva, M. A., Seidel Jr, G. E., Squires, E. L., Graham, J. K., & Carnevale, E. M. (2012). Effects of components of semen extenders on the binding of stallion spermatozoa to bovine or equine zonae pellucidae. *Reproduction*, 143(5), 577–585.
- Das, P. J., Paria, N., Sangtong, K., Gautier, T. L., McCarthy, F., Platt, R., & McGee, M. (2013). Characterization of the stallion sperm transcriptome and its role in fertilization and early embryonic development. *Reproduction*, 146(6), 537–547.
- Dobrinski, I., Smith, T. T., & Suarez, S. S. (1996). Membrane vesicles from oviductal epithelial cells prolong sperm viability in vitro. *Biology of Reproduction*, 54(6), 1063–1068.
- Dordas-Perpinyà, M., Sergeant, N., Ruelle, I., Bruyas, J. F., Charreaux, C., Michaud, S., Carracedo, S., Catalán, J., Miró, J., Delehedde, M., & Briand-Amirat, L. (2022a). ProAKAP4 as indicator of long-lasting motility in post-thaw stallion semen. *Animals*, 12(11), 1421.
- Dordas-Perpinyà, M., Yáñez-Ortiz, I., Sergeant, N., Mevel, V., Bruyas, J. F., Catalán, J., Delehedde, M., Briand-Amirat, L., & Miró, J. (2022b). ProAKAP4 concentration is related to sperm motility and motile sperm subpopulations in frozen–thawed horse semen. *Animals*, 12(23), 3417.
- Egyptien, S., Deleuze, S., Ledeck, J., & Ponthier, J. (2023). Sperm quality assessment in stallions: how to choose relevant assays to answer clinical questions. *Animals*, 13(19), 3123.
- Elsayed, M., El-Sherry, T. M., & Abdelgawad, M. (2015). Development of computer-assisted sperm analysis plugin for analyzing sperm motion in microfluidic environments using ImageJ. *Theriogenology*, 84, 1367–1377.
- Evenson, D., & Wixon, R. (2006). Meta-analysis of sperm DNA fragmentation using the sperm chromatin structure assay. *Reproductive Biomedicine Online*, 12(4), 466–472.
- Fazeli, A. R., Steenweg, W., Bevers, M. M., Van den Broek, J., Bracher, V., Parlevliet, J., & Colenbrander, B. (1995). Relation between stallion sperm binding to homologous hemizona and fertility. *Theriogenology*, 44(5), 751–760.
- Fontes, C. S., Garcia, H. D. M., Freitas, M. S., Teixeira, S. C., Silva-Junior, E. R., Oliveira, L. L., Paula, T. A. R., & Sancler-Silva, Y. M. F. (2025). Is the sperm-binding test to the hen's egg perivitelline membrane reliable for the functional assessment of equine and donkey semen? *Journal of Equine Veterinary Science*, 145, 105285.
- Freitas-Dell'Aqua, C. P., Guasti, P. N., Papa, F. O., Canisso, I. F., & Junior, J. D. A. (2018). Superoxide anion is reduced in gradient selected cryopreserved stallion semen despite high mitochondrial potential. *Journal of Equine Veterinary Science*, 66, 57.
- Gacem, S., Catalán, J., Yáñez-Ortiz, I., Soler, C., & Miró, J. (2021). New sperm morphology analysis in equids: Trumorph® vs. eosin-nigrosin stain. *Veterinary Sciences*, 8(5), 79.
- Gaitskell-Phillips, G. L., Martin-Cano, F. E., da Silva-Álvarez, E., Tapia, J. A., Silva, A., Gil, M. C., Ortega-Ferrusola, C., & Peña, F. J. (2023). Phosphoproteomics for the identification of new mechanisms of cryodamage: the role of SPATA18 in the control of stallion sperm function. *Biology of Reproduction*, 108(2), 324–337.
- Gallardo Bolaños, J. M., Miró Morán, Á., Balao da Silva, C. M., Morillo Rodríguez, A., Plaza Dávila, M., Aparicio, I. M., et al. (2012). Autophagy and apoptosis have a role in the survival or death of stallion spermatozoa during conservation in refrigeration. *PLoS ONE*, 7(1), e30688.
- García, B. M., Morán, Á. M., Fernández, L. G., Ferrusola, C. O., Rodríguez, A. M., Bolaños, J. M. G., Balao da Silva, C. M., Tapia, J. A., & Peña, F. J. (2012). The mitochondria of stallion spermatozoa are more sensitive than the plasmalemma to osmotic-induced stress: role of c-Jun N-terminal kinase (JNK) pathway. *Journal of Andrology*, 33(1), 105–113.
- Garner, D. L., Johnson, L. A., Yue, S. T., Roth, B. L., & Haugland, R. P. (1994). Viability assessment of mammalian sperm using SYBR-14 and propidium iodide. *Biology of Reproduction*, 53(2), 276–284.
- Gervasi, M. G., & Visconti, P. E. (2017). Molecular changes and signaling events occurring in spermatozoa during epididymal maturation. *Andrology*, 5(2), 204–218.
- Girela, J. L., & García, J. (2023). Predicting male infertility using artificial neural networks: a review. *Computational and Mathematical Methods in Medicine*, 2023, 1–10.
- Gravance, C. G., Garner, D. L., & Baumber, J. (2000). Assessment of equine sperm mitochondrial function using JC-1. *Theriogenology*, 53(9), 1691–1703.
- Griffin, J., Love, C. C., & Varner, D. D. (2019). What makes a fertile sperm? Unique molecular attributes of stallion fertility. *Reproduction*, 158(4), R125–R141.
- Hernández-Avilés, C., Zambrano-Varón, J. L., Jiménez-Escobar, C., et al. (2019). Current trends on stallion semen evaluation: What other methods can be used to improve our capacity for semen quality assessment? *Journal of Veterinary Andrology*, 4(1), 1–19.

- Hernández-Avilés, C., Castaneda, C., Raudsepp, T., Varner, D. D., & Love, C. C.** (2022). The role of impaired acrosomal exocytosis (IAE) in stallion subfertility: A retrospective analysis of the clinical condition, and an update on its diagnosis by high throughput technologies. *Theriogenology*, 186, 40–49.
- Hernández-Avilés, C., Ramírez-Agámez, L., Weintraub, S. T., Scoggin, C. F., Davis, B. W., Raudsepp, T., Varner, D. D., & Love, C. C.** (2024). Proteomic analysis of sperm from fertile stallions and subfertile stallions due to impaired acrosomal exocytosis. *Scientific Reports*, 14(1), 12446.
- Hicks, S. A., Andersen, J. M., Wiczak, O., Thambawita, V., Halvorsen, P., Hammer, H. L., Haugen, T. B., & Riegler, M. A.** (2019). Machine learning-based analysis of sperm videos and participant data for male fertility prediction. *Scientific Reports*, 9, 16770.
- Ing, N. H., Forrest, D. W., Love, C. C., & Varner, D. D.** (2014). Dense spermatozoa in stallion ejaculates contain lower concentrations of mRNAs encoding the sperm-specific calcium channel 1, ornithine decarboxylase antizyme 3, aromatase, and estrogen receptor alpha than less dense spermatozoa. *Theriogenology*, 82(2), 347–353.
- Ing, N. H., Konganti, K., Ghaffari, N., Johnson, C. D., Forrest, D. W., Love, C. C., & Varner, D. D.** (2020). Identification and quantification of coding and long non-coding RNAs in stallion spermatozoa separated by density. *Andrology*, 8(5), 1409–1418.
- Ing, N. H., Konganti, K., Ghaffari, N., Johnson, C. D., Forrest, D. W., Love, C. C., & Varner, D. D.** (2024). Specific microRNAs in stallion spermatozoa are potential biomarkers of high functionality. *Reproduction in Domestic Animals*, 59(7), e14674.
- Ing, N. H., Love, C. C., Varner, D. D., Blanchard, T. L., & Teague, S. R.** (2020). Sperm RNA and the stallion: identification of transcripts present in equine sperm and their association with fertility. *Journal of Equine Veterinary Science*, 89, 103002.
- Ing, N., Love, C. C., Varner, D. D., & Teague, S. R.** (2024). microRNA profiles in stallion sperm reflect subpopulation density and functionality. *Theriogenology*, 213, 152–162.
- Kenney, R. M., Hurtgen, J., Pierson, R., Witherspoon, D., & Simons, J.** (1983). Theriogenology and the equine, part II: the stallion. *Theriogenology*, 9, 88–90.
- López-Fernández, C., Johnston, S. D., Gosálvez, J., & Holt, W. V.** (2011). Paternal factors affecting fertility in domestic species. *Animal Reproduction Science*, 124(1–2), 9–18.
- Losinno, L., O'Callaghan, E., Galli, M., & Varner, D. D.** (2023). Idiopathic subfertility in stallions: clinical approaches to a complex problem. *Clinical Theriogenology*, 15(2), 123–130.
- Love, C. C., & Kenney, R. M.** (2008). Flow-cytometric analysis of membrane integrity of stallion sperm in response to capacitating conditions. *Journal of Andrology*, 29(6), 569–576.
- Marqui, F. N., Martins, A., Cruz, T. E. D., Uherara Berton, T. L., Freitas-Dell'Aqua, C. D. P., Dell'Aqua, J. A., & Oba, E.** (2018). Addition of iodixanol in bull freezing extender improves the sperm membranes integrity. 194 (2018) e1–e27.
- Meyer, H. H. D., & Wirthgen, E.** (2022). The use of machine learning methods to predict sperm quality in Holstein bulls. *Theriogenology*, 192, 1–9.
- Morrell, J. M., & Rodríguez-Martínez, H.** (2011). Practical applications of sperm selection techniques as a tool for improving reproductive efficiency. *Veterinary Medicine International*, 2011, 1–9.
- Morris, L. H. A.** (2023). Equine seminal plasma proteins and fertility. *Equine Veterinary Journal*, 55(1), 45–54.
- Ortiz-Rodríguez, J. M., Ortega-Ferrusola, C., Gil, M. C., Martín-Cano, F. E., Gaitskill-Phillips, G., Rodríguez-Martínez, H., Hinrichs, K., Morrell, J. M., & Peña, F. J.** (2019). Transcriptome analysis reveals that fertilization with cryopreserved sperm downregulates genes relevant for early embryo development in the horse. *PLoS ONE*, 14(6), e0213420.
- Parrish, J. J.** (2023). Molecular mechanisms of mammalian sperm capacitation, and its potential for improving fertility. *Reproduction*, 166(4), R97–R110.
- Peña, F. J.** (2015). Multiparametric flow cytometry: a relevant tool for sperm function evaluation. *Animal Reproduction*, 12(3), 351–355.
- Peña, F. J., Ball, B. A., & Squires, E. L.** (2018). A new method for evaluating stallion sperm viability and mitochondrial membrane potential in fixed semen samples. *Cytometry Part B: Clinical Cytometry*, 94(2), 302–311.
- Peña, F. J., Ortega-Ferrusola, C., & Martín-Muñoz, P.** (2016). New flow cytometry approaches in equine andrology. *Theriogenology*, 86(1), 366–372.
- Peña, F. J., Ortega-Ferrusola, C., & Martín-Muñoz, P.** (2022). Advances in flow cytometry in basic and applied equine andrology. *Animal Reproduction*, 14(1), 136–142.

- Peña, F. J., Ortega-Ferrusola, C., & Martín-Muñoz, P.** (2023). Multiparametric flow cytometry for determination of viability, caspase 3 and 7 activity, and lipid peroxidation adduct 4-hydroxynonenal in equine spermatozoa. *Current Protocols*, 3(9), e752.
- Peña, F. J., Ortega-Ferrusola, C., & Morrell, J. M.** (2024). Proteomics is advancing the understanding of stallion sperm biology. *Proteomics*, 24(4), e2300522.
- Pimentel, C. A.** (1989). Aspectos da patologia espermática e a fertilidade no garanhão. In *Congresso Brasileiro de Reprodução Animal* (pp. 127-132).
- Plaza Dávila, M., Martín Muñoz, P., Tapia, J. A., Ortega Ferrusola, C., Balao da Silva, C. C., & Peña, F. J.** (2015). Inhibition of mitochondrial complex I leads to decreased motility and membrane integrity related to increased hydrogen peroxide and reduced ATP production, while the inhibition of glycolysis has less impact on sperm motility. *PLoS ONE*, 10(9), e0138777.
- Pommer, A. C., Rutllant, J., & Meyers, S. A.** (2003). Phosphorylation of protein tyrosine residues in fresh and cryopreserved stallion spermatozoa under capacitating conditions. *Biology of Reproduction*, 68(4), 1208–1214.
- Publicover, S., Harper, C. V., & Barratt, C.** (2007). $[Ca^{2+}]_i$ signalling in sperm—making the most of what you’ve got. *Nature Cell Biology*, 9(3), 235–242.
- Quintero-Moreno, A., Miró, J., Rigau, A. T., & Rodríguez-Gil, J. E.** (2003). Identification of sperm subpopulations with specific motility characteristics in stallion ejaculates. *Theriogenology*, 59(9), 1973–1990.
- Schrimpf, R., Metzger, J., Martinsson, G., Sieme, H., & Distl, O.** (2015). Implication of FKBP6 for male fertility in horses. *Reproduction in Domestic Animals*, 50(2), 195–199.
- Scott, M. A.** (2000). A glimpse at sperm function in vivo: sperm transport and epithelial interaction in the female reproductive tract. *Animal Reproduction Science*, 60–61, 337–348.
- Swegen, A., Lambourne, S. R., Aitken, R. J., & Gibb, Z.** (2014). The paradoxical relationship between stallion fertility and oxidative stress. *Biology of Reproduction*, 91(3), 77.
- Troedsson, M. H. T.** (1999). Interaction between equine semen and the endometrium: the inflammatory response to semen. *Journal of Reproduction and Fertility Supplement*, 56, 341–354.
- Varner, D. D., Gibb, Z., & Aitken, R. J.** (2015). Stallion fertility: a focus on the spermatozoon. *Equine Veterinary Journal*, 47(1), 16–24.
- Varner, D. D., Love, C. C., & Blanchard, T. L.** (2022). The role of impaired acrosomal exocytosis (IAE) in stallion subfertility. *Journal of Equine Veterinary Science*, 112, 103892.
- Visconti PE, Galantino-Homer H, Ning X, Moore GD, Valenzuela JP, Jorgez CJ, Alvarez JG, Kopf GS.** Cholesterol efflux-mediated signal transduction in mammalian sperm. beta-cyclodextrins initiate transmembrane signaling leading to an increase in protein tyrosine phosphorylation and capacitation. *J Biol Chem.* 1999;274:3235–3242. doi: 10.1074/jbc.274.5.3235