

# Sondas fluorescentes: um avanço na avaliação da integridade estrutural e funcional de espermatozoides

*Fluorescent probes: an advance on the evaluation of structural and functional sperm integrity*

Ellen Cordeiro Bento da Silva<sup>1\*</sup>, Maria Madalena Pessoa Guerra<sup>2</sup>

Recebido em 13/05/2011; aprovado em 12/04/2012.

## RESUMO

A qualidade do sêmen é um fator determinante para se obter bons resultados com a utilização de biotécnicas reprodutivas como a inseminação artificial (IA). Desta forma, torna-se essencial a avaliação dos parâmetros espermáticos que determinem a fertilidade destes gametas. Técnicas de avaliação que melhor predigam a fertilidade *in vitro* dos espermatozoides, têm sido buscadas incessantemente, a fim de garantir melhores resultados após IA. Entretanto, até o momento, nenhuma metodologia de avaliação mostrou-se eficiente para este fim, quando utilizada isoladamente, sendo recomendado o emprego conjunto destas técnicas para a melhor predição da capacidade fertilizante dos espermatozoides. Nos últimos anos uma série de novas estratégias foram desenvolvidas para avaliação de sêmen, dentre as quais se destaca o emprego das sondas fluorescentes. Estas técnicas são utilizadas com limitações em função do desconhecimento de seu emprego. Esta revisão tem como objetivo abordar os avanços na avaliação do sêmen e a predição de sua capacidade fertilizante, com ênfase nas que se baseiam no uso de sondas fluorescentes.

**PALAVRAS-CHAVE:** avaliação espermática, sêmen, sondas fluorescentes.

## SUMMARY

The semen quality is a determining factor for obtaining good results with reproductive

biotechnologies, such as artificial insemination (AI). Thus, the evaluation of sperm parameters is essential to determine the fertility of gametes. Assessment techniques that best predict *in vitro* fertility of sperm have been relentlessly pursued with the purpose of ensuring better results after AI. However, until now, no evaluation methodology alone was efficient for this purpose. Then it is recommended to associate the use of these techniques to better predict the fertilizing ability of spermatozoa. In recent years a great number of new strategies were developed for semen evaluation, with the highlighted use of fluorescent probes. These techniques have limited use due to unfamiliarity with their employment. The aim of this paper is to review the advances on semen evaluation and prediction of their fertilising ability, with emphasis on those based on fluorescent probes.

**KEY WORDS:** sperm evaluation, semen, fluorescent probes.

## INTRODUÇÃO

A meta primária das análises de sêmen é a determinação *in vitro* da capacidade fertilizante dos espermatozoides (LUZ et al., 2000; GRAHAM, 2001; VALENÇA e GUERRA, 2007) e, conseqüentemente, da fertilidade de um reprodutor (ZINI e LIBMAN, 2006; BATISTA e GUERRA, 2010). A realização destas análises é de fundamental importância para amostras de sêmen submetidas à criopreservação (FOOTE,

<sup>1</sup> Programa de Pós-graduação em Biotecnologia. Universidade Federal Rural de Pernambuco - UFRPE. Rua Dom Manoel de Medeiros, s/n, Bairro Dois Irmãos, CEP 52171-900, Recife, PE, Brasil. E-mail: silva.ecb@gmail.com. \*Autora para correspondência.

<sup>2</sup> Departamento de Medicina Veterinária, UFRPE.

2002).

Em contrapartida, as análises rotineiras como volume, motilidade espermática, densidade e morfologia, não fornecem um diagnóstico seguro, de modo que indivíduos podem apresentar baixa fertilidade ou serem inférteis, mesmo possuindo parâmetros seminais normais (SIKKA, 1996). Desta forma há um constante empenho para desenvolver testes laboratoriais que permitam a acurada predição da fertilidade dos espermatozoides (ARRUDA et al., 2011). No entanto, esta não é uma tarefa de fácil execução, uma vez que, para a fertilização do oócito, os gametas masculinos devem apresentar uma série de atributos (GRAHAM, 1999; ARRUDA et al., 2007), tais como integridade de membrana plasmática e acrossoma (ESTEVES et al., 2000; SILVA e GADELLA, 2006).

Até o momento nenhum teste laboratorial isoladamente é capaz de determinar o potencial de fertilidade dos espermatozoides (GRAHAM, 2001; KUISMA et al., 2006). A melhor forma de predição da qualidade de uma amostra seminal e do seu potencial fertilizante é a realização conjunta de técnicas de avaliação para as diferentes características espermáticas (PERIS et al., 2004; ARRUDA et al., 2011). Por conseguinte, foi objetivado nesta revisão abordar os avanços na avaliação do sêmen e a predição de sua capacidade fertilizante, com ênfase nas que se baseiam no uso de sondas fluorescentes.

## DESENVOLVIMENTO

Buscando atender aos princípios básicos das análises laboratoriais como objetividade, repetitividade, rapidez na execução e baixo custo (GRAHAM, 2001), várias metodologias têm sido desenvolvidas, dentre as quais se destacam as análises fluorescentes e as análises computadorizadas (ARRUDA et al., 2007). A utilização de sondas fluorescentes para a avaliação dos espermatozoides reflete o real estado das estruturas celulares apresentando alta repetibilidade (CELEGHINI et al., 2007a) e a possibilidade de utilização isoladamente ou em combinação, para a determinação da

integridade e da viabilidade celular (GRAHAM, 1999; ASSUMPCÃO et al., 2003). Por sua vez, os sistemas de análises computadorizadas de imagens determinam alta repetibilidade das avaliações e são mais precisos, acurados, rápidos e objetivos, com destaque para a citometria de fluxo, que permite a avaliação de milhares de células por segundo e pode ser usada em associação aos fluorocromos (ARRUDA et al., 2007).

### Integridade da membrana plasmática

Para a análise da integridade da membrana plasmática podem ser utilizadas as sondas fluorescentes não penetrantes nas membranas íntegras (AURICH, 2005; SILVA e GADELLA, 2006). Dentre estes agentes destacam-se o Hoechst 33258 (HINSCH et al., 1997; ESTEVES et al., 2000), TOTO (ZULIANI et al., 2003), YoPro-1 (MARTIN et al., 2004) e iodeto de propídeo (IP) (AURICH, 2005; SINGH, 2006), os quais somente penetram nas células com membrana plasmática danificada e, por possuírem afinidade ao DNA, ligam-se a este com emissão das fluorescências azul, verde e vermelho, respectivamente (SILVA et al., 2009).

A análise realizada com o YoPro-1 é barata, rápida e de fácil execução, fornecendo informações a cerca das modificações de membrana em função da apoptose, uma vez que este corante, apesar de não penetrar a célula íntegra, atravessa a membrana da célula apoptótica, em virtude da modificação na sua permeabilidade (MARTIN et al., 2004). Para a identificação de apoptose, o YoPro-1 pode ser associado ao IP (MARTIN et al., 2004), o que permite a diferenciação dos graus de alteração da membrana (ORTEGA FERRUSOLA et al., 2009), visto que as células apoptóticas são permeáveis ao YoPro-1, mas não ao IP (MARTIN et al., 2007).

Um caminho alternativo para a avaliação da membrana plasmática são os corantes penetrantes, tais como o diacetato de carboxifluoresceína (DCF) e o SYBR-14<sup>®</sup>, os quais podem ser empregados isolados ou em associação aos corantes não penetrantes (SILVA e GADELLA, 2006). O DCF é um éster não polar, não fluorescente e

penetrante à membrana plasmática intacta, que sofre hidrólise por esterases inespecíficas no interior da célula e, a partir disto, é convertido em carboxifluoresceína, que fluoresce em verde e é não penetrante à membrana plasmática integra (MEDINA et al., 2000; AURICH, 2005; SILVA e GADELLA, 2006). Em contrapartida, o SYBR-14<sup>®</sup> é uma sonda penetrante específica de DNA, corando as células integras em verde fluorescente (AURICH, 2005; SINGH, 2006).

Dentre as associações de sondas fluorescentes penetrantes e não penetrantes, utilizadas para a avaliação da integridade da membrana plasmática, pode-se destacar as de DCF com IP (GARNER et al., 1986; ASSUMPCÃO et al., 2003) e de SYBR-14<sup>®</sup> com IP (GRAVANCE et al., 2001; NAGY et al., 2003). Tais metodologias são efetivas para a determinação da viabilidade espermática (GRAVANCE et al., 2001) e permitem a diferenciação entre as células com membrana plasmática lesada e intacta (AURICH, 2005), fato que tem disseminado seu emprego.

### Potencial de membrana mitocondrial

A mensuração do potencial de membrana mitocondrial é realizada, especialmente, com a finalidade de predizer o risco dos espermatozoides sofrerem apoptose, uma vez que a interrupção deste parâmetro é considerada como o primeiro sinal de estresse, induzido pelo aumento da concentração de espécies reativas de oxigênio (ROS) (MARCHESI e FENG, 2007). Desse modo, corantes como o Rhodamine 123 (GRAHAM, 2001; AURICH, 2005), MITO (SILVA et al., 2009) e o 5,5',6,6'-tetracloro-1,1',3,3'-tetraetilbenzimidazolil-carbocianine iodide (JC-1) são utilizados para o monitoramento do potencial de membrana mitocondrial (AURICH, 2005; YAO et al., 2008).

O Rhodamine 123 e o MITO são usados para avaliação da função mitocondrial dos espermatozoides, pelo fato de serem sondas seletivas de membranas funcionais, cujo princípio de atuação está baseado na formação do gradiente de próton na membrana mitocondrial interna (SILVA e GADELLA, 2006). Neste contexto, as sondas fluorescentes são transportadas e

acumuladas no interior das mitocôndrias com respiração ativa (mitocôndrias funcionais), emitindo fluorescência verde (GRAHAM, 2001; SILVA et al. 2009) após sua ligação à membrana mitocondrial interna (HOLT, 2000), não permitindo, porém, distinguir mitocôndrias com diferentes taxas respiratórias (GRAHAM, 2001; GRAVANCE et al., 2001).

O JC-1 é uma sonda fluorescente utilizada para avaliação da funcionalidade mitocondrial (ARRUDA et al., 2007), cujo princípio de atuação se baseia nas mudanças de polarização da membrana mitocondrial interna (SILVA e GADELLA, 2006). Por ser dependente do gradiente eletroquímico, este corante necessita de potencial de membrana mitocondrial altamente negativa para penetrar na organela e emitir fluorescência nos comprimentos de onda de luz vermelha ou verde, de acordo com sua concentração interna final (ARRUDA et al., 2007). Em concentrações elevadas, o corante apresenta-se na forma de J-conjugado e emite coloração vermelha caracterizando mitocôndrias funcionais, enquanto que em concentrações baixas encontra-se na forma de monômero e emite coloração verde, inerente a mitocôndrias afuncionais (ARRUDA et al., 2007).

Pelo fato das mitocôndrias representarem a principal fonte de ATP dos espermatozoides, o monitoramento de sua função é de suma importância, visto que a redução de sua atividade está diretamente relacionada ao comprometimento do metabolismo celular normal (GRAHAM e MOCÉ, 2005). Em decorrência disto, as técnicas de avaliação da atividade mitocondrial têm sido utilizadas em associação a biotécnicas reprodutivas como a criopreservação de sêmen, a qual determina considerável redução da atividade mitocondrial e, conseqüentemente, da capacidade fertilizante dos espermatozoides (MARCO-JIMÉNEZ et al., 2006).

### Integridade do acrossoma

A integridade do acrossoma é comumente avaliada por meio das lectinas conjugadas a sondas fluorescentes, as quais interagem com glicoconjugados exclusivamente localizados no

acrossoma ou com a matriz acrossomal (HOLT, 2000; SILVA e GADELLA, 2006; ARRUDA et al., 2007). Dentre as lectinas conjugadas estão a *Pisum sativum agglutinin* (PSA) e a *Arachis hypogaea agglutinin* (PNA), sendo normalmente utilizados para este tipo de análise o FITC-PNA, TRITC-PNA e RPE-PNA (SILVA e GADELLA, 2006).

Quando o FITC-PSA é usado para a avaliação do acrossoma, os espermatozoides que possuem integridade acrossomal não são corados, uma vez que, neste caso, o contato da sonda fluorescente com o conteúdo acrossomal, ao qual se liga, não é efetivado pelo fato desta não entrar na membrana acrossomal íntegra (GRAHAM, 2001). Por outro lado, em células que apresentam acrossomas danificados, o FITC-PSA entra em contato com o conteúdo acrossomal e se liga a  $\alpha$ -manose e a  $\alpha$ -galactose da matriz acrossomal, corando esta região (GRAHAM, 2001) em verde amarelado fluorescente (ARRUDA et al., 2007; CELEGHINI et al., 2007a).

Em contrapartida, quando é usado o FITC-PNA para a avaliação da integridade do acrossoma, este agente se liga a  $\beta$ -galactose associada à pequena porção da membrana acrossomal externa (GRAHAM, 2001) de espermatozoides portadores de acrossoma intacto, corando-os com uma fluorescência verde brilhante (ROTH et al., 1998). Por outro lado, em acrossomas reagidos e onde existem áreas lesionadas na membrana acrossomal, o corante não consegue se ligar a  $\beta$ -galactose nas áreas comprometidas, apresentando-se os espermatozoides corados em verde fluorescentes apenas na região equatorial da cabeça ou não corados em toda a extensão da cabeça (ROTH et al., 1998).

No caso do TRITC-PNA (Tetramethylrhodamine isothiocyanate-labeled peanut agglutinin), os espermatozoides portadores de acrossomas íntegros são permeados por esta sonda com manifestação de fluorescência vermelha na cabeça espermática, enquanto que nos portadores de acrossomas reagidos apenas a região equatorial fluoresce (LIM et al., 2008). Por outro lado, o RPE-PNA (*R-phycoerythrin peanut*

*agglutinin*) possibilita uma avaliação precisa da integridade acrossomal, caracterizada pela emissão de fluorescência vermelha alaranjada pelas células com acrossomas reagidos e pela não fluorescência nas células com acrossomas íntegros (NAGY et al., 2004; GARCÍA et al., 2007).

### **Peroxidação lipídica**

Os métodos comumente utilizados para a mensuração das ROS são baseados no uso dos complexos Nitroblue Tetrazolium (NBT) ou citocromo C-Fe<sup>3+</sup> e do corante fluorescente luminol (SIKKA, 1996; SIKKA, 2004; MANEESH e JAYALEKSHMI, 2006), que consistem em testes de mensuração direta (GUERRA et al., 2004). Por outro lado, para a mensuração indireta, são utilizados testes para determinação das concentrações de antioxidantes e da lipoperoxidação (GUERRA et al., 2004), que pode ser obtida através da dosagem dos produtos da peroxidação, tal como o malonaldeído (MDA) (FERREIRA e MATSUBARA, 1997; CHI et al., 2008) e por corantes fluorescentes como o C11 BODIPY581/591 (AITKEN et al., 2007; ARRUDA et al., 2007).

O nitroblue tetrazolium (NBT) é usado para determinar a quantidade de ROS produzida pela célula, particularmente na superfície das membranas celulares (SIKKA, 1996; SIKKA, 2004; MANEESH e JAYALEKSHMI, 2006). Esta técnica se baseia na redução da estrutura do NBT na presença de ROS com a ocorrência de depósito de formazanas, compostos insolúveis em água de cor preta azulada (SALEH e AGARWAL, 2002).

O luminol (5-amino-2,3-dihidro-1,4-phthalazinedione) é um corante quimioluminescente fluorescente (SANOCCA e KURPISZ, 2004) que reage com uma variedade de ROS (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, O<sub>2</sub><sup>-</sup>, OH<sup>·</sup>, <sup>1</sup>O<sub>2</sub>) (AITKEN e CLARKSON, 1987) em pH neutro, produzindo, a partir desta reação, um sinal luminoso que é observado no luminômetro (SALEH e AGARWAL, 2002). Tal sinal se traduz na quantificação das ROS produzidas (SIKKA, 1996), tanto no interior quanto no

exterior da célula (SIKKA, 1996; SIKKA, 2004; MANEESH e JAYALEKSHMI, 2006). Por outro lado, embora esta metodologia seja utilizada para quantificação das taxas de geração de ROS, ela pode não refletir precisamente o status de danos espermáticos provocados pelos oxidantes (SIKKA, 2004; MANEESH e JAYALEKSHMI, 2006).

A lipoperoxidação de membranas é habitualmente monitorada pelo método de dosagem do MDA (FERREIRA e MATSUBARA, 1997), cuja concentração pode ser determinada a partir da utilização de testes comerciais como o MDA-586 (CHI et al., 2008). Neste caso, após processamento, as amostras são submetidas à espectrofotometria para a determinação da concentração de MDA produzido (CHI et al., 2008).

Em contrapartida, a peroxidação lipídica pode ser observada, quantificada e localizada de forma mais precisa após marcação pelo corante C11 BODIPY581/591, que consiste em um análogo fluorescente dos ácidos graxos insaturados, principais alvos das ROS (SILVA e GADELLA, 2006; ARRUDA et al., 2007). Deste modo, após sofrer peroxidação, o C11 BODIPY muda suas propriedades fluorescentes, passando da cor vermelha, original da sonda intacta, para a cor verde quando peroxidada pelas ROS e para laranja quando peroxidada por RNS (espécies reativas de nitrogênio) (SILVA e GADELLA, 2006). Esta técnica é muito eficaz para o monitoramento da peroxidação lipídica em populações de espermatozoides de mamíferos, visto que detecta níveis de lipoperoxidação com grau elevado de correlação da produção de ROS nos espermatozoides (AITKEN et al., 2007).

### Capacitação

O estado de capacitação espermática pode ser avaliado por meio do antibiótico fluorescente clortetraciclina (CTC), que se liga à membrana plasmática na dependência dos íons  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{Mg}^{2+}$ , embora possa ser utilizado, alternativamente, o corante hidrofóbico Merocyanine 540 (M540), que age independentemente do  $\text{Ca}^{2+}$  (SILVA e GADELLA, 2006). A Merocyanine

540 é uma sonda com tropismo elevado para lipídeos de membranas com alta desorganização (RAMALHO-SANTOS et al., 2007), processo que é observado durante a capacitação (GADELLA e HARRISON, 2000). A realização desse tipo de teste é de suma importância, especialmente, para a avaliação de amostras de sêmen criopreservadas, em virtude do processo de criocapacitação espermática (HOLT, 2000), a qual é caracterizada, particularmente, pelo influxo de  $\text{Ca}^{2+}$  na célula (BAILEY e BUH, 1994).

### Associação de sondas

Um aspecto relevante a ser considerado é que, apesar da importância das técnicas de avaliação espermática em isolado, a incapacidade de fertilização dos espermatozoides pode ser proveniente de diversos fatores (GRAHAM, 2001). Assim, é justificável a mensuração de múltiplos parâmetros espermáticos simultaneamente, visto que permite a predição mais eficaz da capacidade fecundante dos espermatozoides (GRAHAM, 2001; ASSUMPCÃO et al., 2003). Neste contexto, as associações de sondas fluorescentes permitem avaliar, concomitantemente, vários compartimentos da mesma célula espermática, aumentando a precisão das análises de sêmen (ARRUDA et al., 2007; CELEGHINI et al., 2010), fato que se torna possível em virtude da capacidade das sondas de se ligarem a compartimentos específicos das células (CELEGHINI et al., 2007b; ARRUDA et al., 2011).

Em geral a associação de sondas fluorescentes é realizada com precisão para a análise das estruturas de membrana plasmática, acrossomal e do potencial da membrana mitocondrial (ANDRADE et al., 2007; ARRUDA et al., 2007; CELEGHINI et al., 2007a). Contudo, é indispensável realizar testes para identificar a melhor associação de sondas, visto que algumas destas podem manifestar resultados contraditórios e alteração de suas características e fluorescência padrão, quando associadas a outras (CELEGHINI et al., 2010). Tais interferências podem ser resultantes da competição entre as fluorescências emitidas pelos fluoróforos, possivelmente em

virtude da similaridade entre os comprimentos de onda dos mesmos (CELEGHINI et al., 2007b), o que compromete a precisão dos resultados obtidos ao final destas análises.

## CONCLUSÕES

A partir do exposto, pode-se constatar avanços significativos nas pesquisas relacionadas ao aperfeiçoamento das biotécnicas laboratoriais de avaliação espermática, a partir de sondas fluorescentes. Fica evidente a extrema importância de uma acurada predição da integridade estrutural e funcional dos espermatozoides, o que é determinante para a observação de adequada fertilidade após a fertilização. Embora muitos avanços ainda sejam necessários para que os objetivos sejam alcançados, já está disponível uma gama de avaliações que podem melhor prever a fertilidade dos espermatozoides, das quais são particularmente importantes as sondas fluorescentes.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AITKEN, R.J. et al. Analysis of lipid peroxidation in human spermatozoa using BODIPY C11. **Molecular Human Reproduction**, Oxford, v.13, p.203-211, 2007.

AITKEN, R.J.; CLARKSON, J.S. Cellular basis of defective sperm function and its association with the genesis of reactive oxygen species by human spermatozoa. **Journal of Reproduction and Fertility**, Cambridge, v.81, p.459-469, 1987.

ANDRADE, A.F.C. et al. Fluorescent stain method for the simultaneous determination of mitochondrial potential and integrity of plasma and acrosomal membranes in boar sperm. **Reproduction in Domestic Animal**, Berlin, v.42, p.190-194, 2007.

ARRUDA, R.P. et al. Métodos de avaliação da morfologia e função espermática: momento atual e desafios futuros. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v.35, p.45-151, 2011.

ARRUDA, R.P. et al. Biotécnicas aplicadas à avaliação do potencial de fertilidade do sêmen

equino. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v.31, p.8-16, 2007.

ASSUMPTÃO, M.E.O.D'A. et al. Capacitação espermática in vitro com heparina e cálcio ionóforo e sua correlação com a fertilidade em touros. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, São Paulo, v.39, p.149-156, 2002.

AURICH, C. Factors affecting the plasma membrane function of cooled-stores stallion spermatozoa. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v.89, p.65-75, 2005.

BAILEY, J.L.; BUHR, M.M. The impact of cryopreservation on Ca<sup>2+</sup> regulation by bovine spermatozoa. **Canadian Journal of Animal Science**, Ottawa, v. 4, p.45-52, 1994.

BATISTA, A.M.; GUERRA, M.M.P.G. Novas técnicas para avaliação da qualidade do sêmen caprino. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v.34, p.125-132, 2010.

CELEGHINI, E.C.C. et al. Simultaneous assessment of plasmatic, acrosomal, and mitochondrial membranes in ram sperm by fluorescent probes. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v.62, p.536-543, 2010.

CELEGHINI, E.C.C. et al. Utilization of fluorescent probe association for simultaneous assessment of plasmatic, acrosomal, and mitochondrial membranes of rooster spermatozoa. **Brazilian Journal of Poultry Science**, Campinas, v.9, p.143-149, 2007a.

CELEGHINI, E.C.C. et al. Practical techniques for bovine sperm simultaneous fluorimetric assessment of plasma, acrosomal and mitochondrial membranes. **Reproduction in Domestic Animals**, Berlin, v.42, p.479-488, 2007b.

CHI, H.J. et al. Protective effect of antioxidant supplementation in sperm-preparation medium against oxidative stress in human spermatozoa. **Human Reproduction**, Oxford, v.23, p.1023-1028, 2008.

ESTEVES, S.C. et al. Improvement in motion characteristics and acrosome status in cryopreserved human spermatozoa by swim-up processing before freezing. **Human**

- Reproduction**, Oxford, v.15, p.2173-2179, 2000.
- FERREIRA, A.L.A.; MATSUBARA, J.S. Radicais livres: Conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Revista da Associação Médica Brasileira**, São Paulo, v.43, p.61-68, 1997.
- FOOTE, R.H. The history of artificial insemination: Selected notes and notables. **Journal of Animal Science**, Champaign, v.80, p.1-10, 2002.
- GADELLA, B. M.; HARRISON, R.A.P. The capacitating agent bicarbonate induces protein kinase A-dependent changes in phospholipid transbilayer behavior in the sperm plasma membrane. **Development**, Washington, v.127, p.2407-2420, 2000.
- GARCÍA, E.M. et al. Improving the fertilizing ability of sex sorted boar spermatozoa. **Theriogenology**, Stoneham, v.68, p.771-778, 2007.
- GARNER, D.L. et al. Assessment of spermatozoal function using dual fluorescent staining and flow cytometric analyses. **Biology of Reproduction**, Champaign, v.34, p.127-138, 1986.
- GRAHAM, J.K.; MOCÉ, E. Fertility evaluation of frozen/thawed semen. **Theriogenology**, Stoneham, v.64, p.492-504, 2005.
- GRAHAM, J.K. Assessment of sperm quality: a flow cytometric approach. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 68, p. 239-247, 2001.
- GRAHAM, J.K.; KUNZE, E.; HAMMERSTEDT, R.H. Analysis of sperm cell viability, acrosomal integrity, and mitochondrial function using flow cytometry. **Biology of Reproduction**, Champaign, v.43, p.55-64, 1999.
- GRAVANCE, C.G. et al. Fluorescent probes and flow cytometry to assess rat sperm integrity and mitochondrial function. **Reproductive Toxicology**, Hoboken, v.15, p.5-10, 2001.
- GUERRA, M.M.P.; EVANS, G.; MAXWELL, W.M.C. Papel de oxidantes e anti-oxidantes na andrologia. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v.28, p. 187-195, 2004.
- HINSCH, E. et al. A new combined in vitro test model for the identification of substances affecting essential sperm functions. **Human Reproduction**, Oxford, v.12, p.1673-1681, 1997.
- HOLT, W.V. Basic aspects of frozen storage of semen. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v.62, p.3-22, 2000.
- KUISMA, P. et al. Fertility of frozen-thawed stallion semen cannot be predicted by the currently used laboratory methods. **Acta Veterinaria Scandinavica**, Copenhagen, v.48, p.1-8, 2006.
- LIM, J.J. et al. Effect of cholesterol supplementation in freezing medium on the survival and integrity of human sperm after cryopreservation. **Korean Journal of Reproductive Medicine**, Coréia, v.35, p.203-212, 2008.
- LUZ, S.L.N.; NEVES, J.P.; GONÇALVES, P.B.D. Parâmetros utilizados na avaliação do sêmen congelado ovino para inseminação laparoscópica. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, São Paulo, v.37, p.10-18, 2000.
- MANEESH, M.; JAYALEKSHMI, H. Role of reactive oxygen species and antioxidants on pathophysiology of male reproduction. **Indian Journal of Clinical Biochemistry**, New Delhi, v.21, p.80-89, 2006.
- MARCHESI, D.E.; FENG, H.L. Sperm DNA integrity from sperm to egg. **Journal of Andrology**, Lawrence, v.28, p.481-489, 2007.
- MARCO-JIMÉNEZ, F. et al. Morphometric changes in goat sperm heads induced by cryopreservation. **Cryobiology**, San Diego, v.52, p.295-304, 2006.
- MARTIN, G. et al. Kinetics of occurrence of some features of apoptosis during the cryopreservation process of bovine spermatozoa. **Human Reproduction**, Oxford, v.22, p.380-388, 2007.
- MARTIN, G. et al. Cryopreservation Induces an Apoptosis-Like Mechanism in Bull Sperm. **Biology of Reproduction**, Champaign, v.71, p.28-37, 2004.
- MEDINA, V.H. et al. Uso de sondas fluorescentes para avaliação da integridade da membrana plasmática de espermatozoides ovinos antes e após congelamento. **ARS Veterinária**, Jaboticabal, v.16, p.204-209, 2000.
- NAGY, S. et al. Changes in plasma membrane and acrosome integrity of frozen-thawed bovine spermatozoa during a 4 h incubation as measured by multicolor flow cytometry. **Animal**

- Reproduction Science**, Amsterdam, v.80, p.25-235, 2004.
- NAGY, S. et al. A triple-stain flow cytometric method to assess plasma- and acrosome-membrane integrity of cryopreserved bovine sperm immediately after thawing in presence of egg-yolk particles. **Biology of Reproduction**, Champaign, v.68, p.1828-1835, 2003.
- ORTEGA FERRUSOLA, C. et al. Lipid peroxidation, assessed with BODIPY-C11, increases after cryopreservation of stallion spermatozoa, is stallion-dependent and is related to apoptotic-like changes. **Reproduction**, Cambridge, v.138, p.55-63, 2009.
- PERIS, S.I. et al. Cryopreservation of ram semen facilitates sperm DNA damage: relationship between sperm andrological parameters and the sperm chromatin structure assay. **Journal of Andrology**, Lawrence, v.25, p.224-233, 2004.
- RAMALHO-SANTOS, J. et al. Probing the structure and function of mammalian sperm using optical and fluorescence microscopy. In: **Modern Research and Educational Topics in Microscopy**, Coimbra, v.1, p.394-402, 2007.
- ROTH, T.L. et al. Heterologous in vitro fertilization and sperm capacitation in an endangered African antelope, the Scimitar-Horned Oryx (*Oryx dammah*). **Biology of Reproduction**, Champaign, v.58, p.475-482, 1998.
- SALEH, R.A.; AGARWAL, A. Oxidative stress and male infertility: From research bench to clinical practice. **Journal of Andrology**, Lawrence, v.23, p.737-752, 2002.
- SANOCKA, D.; KURPISZ, M. Reactive oxygen species and sperm cells. **Reproductive Biology and Endocrinology**, Londres, v.2, p.12-18, 2004.
- SIKKA, S.C. Role of oxidative stress and antioxidants in andrology and assisted reproductive technology. **Journal of Andrology**, Lawrence, v.25, p.5-18, 2004.
- SIKKA, S.C. Oxidative stress and role of antioxidants in normal and abnormal sperm function. **Frontiers in Bioscience**, Nova Iorque, v.1, p.78-86, 1996.
- SINGH, B.K. **Compêndio de andrologia e inseminação artificial em animais de fazenda**. São Paulo: Andrei Editora, 2006. 331p.
- SILVA, P.F.N.; GADELLA, B.M. Detection of damage in mammalian sperm cells. **Theriogenology**, Stoneham, v.65, p.958-978, 2006.
- SILVA, S.V. et al. Diferentes Métodos e técnicas na avaliação espermática: uma breve revisão. **Ciência Veterinária nos Trópicos**, Recife, v.12, p.1-15, 2009.
- VALENÇA, R.M.B.; GUERRA, M.M. Espécies reativas ao oxigênio (ROS) e a utilização de antioxidantes na criopreservação do sêmen suíno. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v.31, p.47-53, 2007.
- YAO, J. et al. Involvement of mitochondrial pathway in triptolide-induced cytotoxicity in human normal liver L-02 cells. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, Tokyo, v.31, p.592-597, 2008.
- ZINI, A.; LIBMAN, J. Sperm DNA damage: Clinical significance in the era of assisted reproduction. **Canadian Medical Association Journal**, Ottawa, v.175, p.494-500, 2006.
- ZULIANI, T. et al. Sensitive and Reliable JC-1 and TOTO-3 Double Staining to Assess Mitochondrial Transmembrane Potential and Plasma Membrane Integrity: Interest for Cell Death Investigations. **Cytometry Part A**, Hoboken, v.54A, p.100-108, 2003.