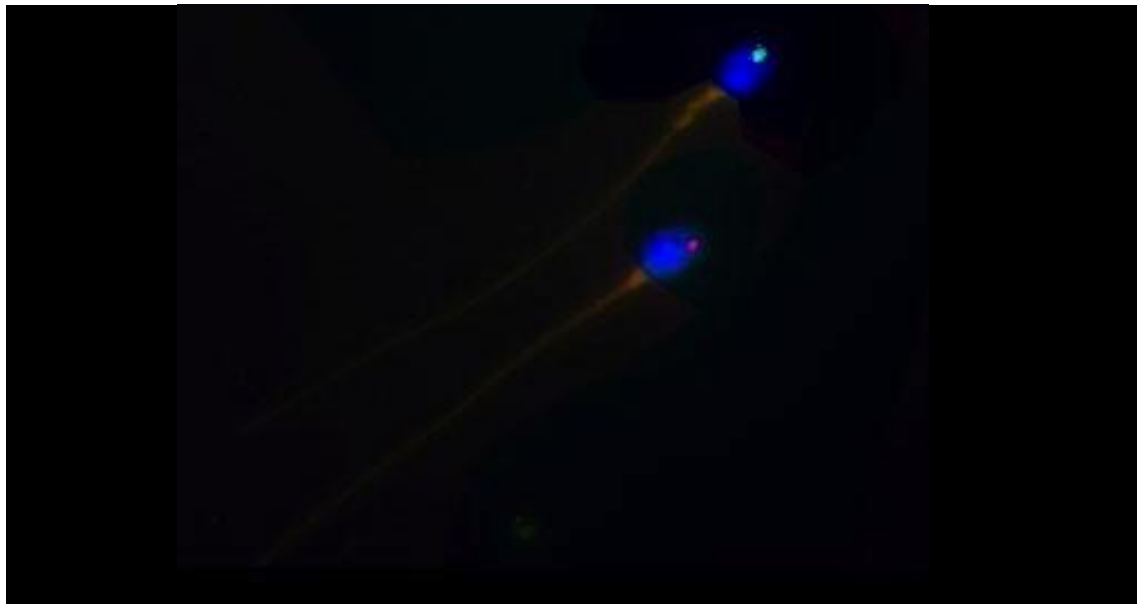




DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS DA VIDA

FACULDADE DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Propriedades de Subpopulações de Espermatozóides Humanos: Sexo e Bioenergética



Patrícia Sofia Alçada Tomás de Morais

2012



DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS DA VIDA

FACULDADE DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Propriedades de Subpopulações de Espermatozóides Humanos: Sexo e Bioenergética

Dissertação apresentada à Universidade de Coimbra para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Biologia Celular e Molecular, realizada sob a orientação científica do Professor Doutor João Ramalho-Santos (Universidade de Coimbra) e sob a co-orientação da Doutora Ana Paula de Sousa (Hospitais da Universidade de Coimbra).

Patrícia Sofia Alçada Tomás de Morais

2012

| Se, a princípio, a ideia não é absurda, então não há
esperança para ela.

ALBERT EINSTEIN

Eu só queria ter tempo... tempo para aprender as coisas que ainda tinhas para me ensinar... tempo para ouvir todas as histórias que tinhas para contar.

À memória da minha avó.

Agradecimentos

Ao meu orientador, Professor João Ramalho. Um muito especial obrigado, por ter feito desde cedo parte do meu crescimento, pessoal e científico. Por estar sempre presente, e por me incentivar a continuar. Por acreditar em mim, mesmo nas alturas em que eu não acredito, por ter sempre um bom conselho e uma palavra amiga. Trabalhar consigo tem sido uma honra e um prazer. A bem dizer da verdade, tem sido Super Interessante. Obrigada!

À Ana Paula, agradeço a presença ao longo do meu percurso de aprendizagem. Agradeço a constante companhia, nos pequenos e grandes momentos, nas curtas e longas conversas. Cada palavra amiga, todo o apoio na hora certa e cada café na hora apropriada. Agradeço que tenha tentado sempre mostrar-me o melhor caminho com todo o rigor e paciência mas, acima de tudo, com toda a honestidade. Obrigada!

Ao Serviço de Reprodução Humana dos Hospitais da Universidade de Coimbra, em particular à Professora Doutora Teresa Almeida Santos, agradeço a oportunidade de fazer parte do dia-a-dia do serviço. O apoio, a disponibilidade e a contribuição para que a realização deste trabalho fosse possível.

Ao Serviço de Histocompatibilidade, em particular ao Doutor Artur Paiva, agradeço por me ter recebido sempre com toda a gentileza e por ter tornado possível o desenvolvimento de parte deste trabalho no serviço, não só sem restrições mas também com todo o apoio e boa disposição.

À Susana Pedreiro, um especial obrigado. Pelas incansáveis horas passadas comigo a trabalhar no *sorter*. Pela paciência, amizade e ajuda demonstradas ao longo destes meses. Pelas conversas e brincadeiras que fizeram com que o tempo passasse mais depressa. Obrigada!

À Bárbara, agradeço o ter partilhado comigo, entre tantas outras coisas, a secretária da Ana Paula. Por ter estado presente e ter feito parte desta minha etapa sempre com boa disposição, amizade, sinceridade e um sorriso na cara. Apesar de falares como se não houvesse amanhã, tive sempre, tenho e terei, todo o gosto em ouvir-te. Obrigada!

Agradeço particularmente aos meu amigos e colegas de trabalho, por terem tornado tão agradável e divertido cada dia que passei junto deles. Pelo interesse que sempre mostraram por mim e pelo meu trabalho. Pelas ideias partilhadas, e pelos momentos sempre bem passados. Um especial obrigado à Xana, Sandra, Paula, Ana Sofia, Beatriz, Renata, Marta, Marília, Carla, Sandro, Solange, Mónica, Maria Inês, Andreia, Sónia, Andreia “musculada” e Laura.

Aos funcionários do Serviço de Reprodução Humana dos Hospitais da Universidade de Coimbra, agradeço toda a alegria, boa disposição e carinho mostrados diariamente. Agradeço terem feito com que me sentisse em casa. Um especial obrigado à Doutora Ana Isabel, Néné, Raquel, D. Fátima e Silvana, funcionárias do laboratório de Citogenética, pela simpatia e por terem contribuído sempre para a realização e aperfeiçoamento deste trabalho.

À minha Joana, agradeço o ter tornado tão difícil a tarefa de lhe escrever um agradecimento. Pelos incontáveis momentos, pelas lágrimas, e pelos imensos sorrisos que nunca deixaram de alegrar a minha vida. Pela capacidade de falar tão rápido como eu, por recordar a data e hora de cada momento que passámos juntas, por tornar tudo tão perfeito e divertido, mas especialmente por continuar a gargalhar, como se não estivesse a ouvir algumas histórias pela vigésima vez. Obrigada pela capacidade de, mesmo estando longe, continuares sempre ao meu lado!

À Mariline, agradeço as longas horas de conversa, sejam onde e à hora que for. Por estar sempre pronta para ir comer uma espetada de fruta com chocolate, mas mais importante que isso por nunca dizer que não quando preciso. Pelas brincadeiras, sorrisos e conversas sérias, de gente grande. Obrigada!

À Isabel, agradeço a amizade, a sinceridade e o carinho. Agradeço que me tenha mostrado que nunca é tarde para perdoar, e que há poucas coisas mais fortes que os laços de uma verdadeira amizade. Por ser deliciosamente teimosa à sua maneira, sem no entanto perder o encanto. Obrigada!

À Di, agradeço a amizade, a preocupação e o carinho com que sempre me presenciou. Pela capacidade, mas sobretudo entusiasmo, que sempre teve em me

mostrar coisas novas, diferentes e fora do vulgar. Por ter um excelente espírito crítico e uma enorme honestidade. Pelas palavras amigas e pelas productivas conversas. Por fazer com que tenha saudades dos momentos que passámos juntas. Obrigada!

À Inês, agradeço o ter conseguido, em tão pouco tempo, mostrar ser tão especial. Por me transmitir calma e tranquilidade. Por ser linda e divertida. Por ter sempre uma palávria sábia e por mostrar que as coisas nem sempre são lineares. Obrigada!

À Leonor e à Carla, agradeço por estarem sempre prontas para uma boa e longa conversa. Por nunca terem deixado de partilhar os bons momentos e continuarem a fazer questão de fazer parte deles.

À Maria Manuela, *the person next to me*, agradeço a companhia, a simpatia e confiança que sempre mostrou. As mensagens amigas sempre na altura certa e os bocadinhos emocionantes antes de cada aula de inglês. Agradeço por teres tornado a minha passagem pelo mestrado mais colorida. Obrigada!

Ao Alcides, agradeço a companhia durante as longas horas de trabalho, as conversas productivas e também as menos productivas. Por estar sempre pronto para perder num Carcassonne épico. Pelas ideias e partilha de conhecimento. Pela sinceridade e amizade. Obrigada!

À Sara Figueiredo, agradeço por me ter mostrado, infelizmente da pior forma possível, que há coisas realmente importantes na vida, e outras que são apenas acessórias e de pouco valor. Por me mostrar o quão ingrata pode ser a vida.

Aos meus amigos de longa longa data, Ana Sofia, Carla, Beatriz, Vitor e Pedro, agradeço o continuarem presentes nos momentos mais importantes. Têm sido um prazer crescer e estar convosco. Obrigada a todos!

Aos meus amigos Fresco, Cláudia, Xano, Marco, Henrique, Vasco, Marta, Rita, André, João Pedro, Guerra, Cátia, Joel, Ritinha, Luísa, Jota, Joana, Lúcio, Andy, agradeço todos os momentos que temos passados juntos, todas as brincadeiras e conversas cheias de interesse que costumamos ter sempre até horas decentes. Pelos

jogos, pelos passeios, pelos filmes que consigo ver até ao fim, pelos outros e por tudo. Amigos como vocês fazem tudo valer a pena. Obrigada!

À minha querida vóvó, agradeço nunca ter deixado de ser das coisas mais importantes na minha vida. Por me ter mostrado a bondade, a beleza e a verdade que ainda hoje iluminam o meu caminho. Por me mostrar que o amor vence tudo. Porque nunca é demais dizer o quanto gosto de ti e o quanto és especial. Adoro-te!

Aos meu avós António e Justina, agradeço toda a amizade, carinho, preocupação e longas horas bem passadas. Por me ensinarem e formarem nalgumas das coisas mais importantes do carácter. Terão sempre um lugar especial no meu coração. Obrigada!

Aos meus pais, agradeço todos estes anos de dedicação, amor e carinho. Todos os ensinamentos e lições cuidadosamente dados no sentido de me tornar a pessoa que sou hoje. Por me ensinarem a importância do trabalho e da verdade, do respeito e da amizade. Muito obrigada!

Aos meus irmãos, Carolina, Pedro e Rui, e ao Joãozinho agradeço a presença constante ao longo da vida. Agradeço as brincadeiras, as cantorias, as filmagens e gravações, as lágrimas, os abraços, as alegrias, as discussões, as escapadelas noturnas e toda a influência que tiveram para que eu me tornasse na pessoa que sou. Obrigada!

À Carla, agradeço os conselhos sempre carinhosos, e os sorrisos sempre verdadeiros. As longas conversas e a partilha de pequenos grandes momentos.

À minha família, em especial aos meus tios Zé e Júlio, Isabel e Zé “dos bigodes”, Félix e Adérito, Jorge, Miguel e Gina, João e Inês, agradeço a contribuição que têm tido ao longo dos tempos. Agradeço tudo o que me ensinaram e mostraram, mas principalmente a amizade que ainda hoje têm por mim. Obrigada por continuarem a fazer parte dos momentos mais importantes e por estarem sempre presentes.

Ao Luís Tomé, agradeço pelo constante espírito de ajuda e preocupação. Por ser um grande amigo, sempre disposto a estender a mão. Por me acompanhar desde que eu me

lembro até aos dias de hoje. Por me ensinar tantas tantas coisas e estar sempre repleto de palavras sábias, verdadeiras e amigas. Obrigada!

Aos pais do Nuno, Fernanda e Gonçalo, agradeço por me tratarem sempre com todo o carinho e preocupação. Por me tratarem sempre como uma filha. Obrigada!

Ao Nuno, e porque não há palavras que descrevam, agradeço acima de tudo o ter sido sempre o meu melhor amigo. Agradeço a incansável presença diária. A bondade, o sorriso, o amor, a paciência para me aturar, o companheirismo e o *Chocapic!* Obrigada por continuares aqui, nos bons e nos maus momentos.

A todos os que tiveram o cuidado e paciência de ler os meus agradecimentos até ao fim! Obrigada!



Lista de Abreviaturas

ABP – Proteína de Ligação ao Androgénio

AC – Adenilato Ciclase

ADN – Ácido Desoxirribonucleico

ADP – Adenosina Difosfato

AMP – Adenosina Monofosfato

ATP – Adenosina Trifosfato

BSA – Albumina Sérica Bovina

cAMP – Adenosina Monofosfato Cíclico

Ca²⁺ – Ião Cálcio

DCV – DyeCycle™ Violeta

FACS – Separação Celular Activada por Fluorescência

FISH – Hibridização Fluorescente *in situ*

FITC – Isotiocianato de Fluoresceína

FIV – Fertilização *in vitro*

FSH – Hormona Estimuladora do Folículo

GnRH – Hormona Libertadora de Gonadotrofinas

HCO₃⁻ – Ião Bicarbonato

HPLC – Cromatografia Líquida de Fase Reversa de Alta Eficiência

HUC – Hospitais da Universidade de Coimbra

H33342 – BisBenzimide Hoechst 33342

IA – Inseminação Artificial

ICSI – Injecção Intracitoplasmática de um Espermatozóide

IP – Iodeto de Propídio

K⁺ – Ião Potássio

LH – Hormona Luteinizante

MT-G – Mitotracker Green

NaOH – Hidróxido de Sódio

NGF – Factor de Crescimento Neuronal

OMS – Organização Mundial de Saúde

PBS – Tampão Salino de Fosfato

Pi – Fosfato

PKA – Proteína Cinase A

PMM – Potencial de Membrana Mitocondrial

PTK – Proteína Tirosina Cinase

PTP – Fosfatase

RE – Retículo Endoplasmático

ROS – Espécies Reactivas de Oxigénio

RT-PCR – Reacção de Polimerização em Cadeia em Tempo Real

SPM – Meio de Preparação de Espermatozóides

SPZ – Espermatozóides

TGF β – Factor de Transformação do Crescimento Beta

TRA – Técnicas de Reprodução Assistida

TRIS – Trishidroximetilaminometano

UV – Ultravioleta

% – Percentagem

Resumo

Os gâmetas masculinos humanos são caracterizados por uma grande heterogeneidade. De facto, apenas alguns dos espermatozóides presentes no ejaculado aparentam ser verdadeiramente funcionais. Durante este estudo procurámos olhar para esta heterogeneidade e encontrar diferentes propriedades nas quais estas subpopulações diferissem. Os critérios considerados para a obtenção destas subpopulações foram o conteúdo em ácido desoxirribonucleico (ADN) das células em estudo (presença de um cromossoma X ou Y), o seu potencial de membrana mitocondrial (PMM) e a sua mobilidade. De forma a identificar e separar estas células recorreremos à técnica de citometria de fluxo acoplada a *cell sorting* (FACS) e à técnica de *swim-up*.

No que respeita à separação de espermatozóides feita com base no ADN, foram utilizadas três sondas distintas (DRAQ5™, DyeCycle™ Violeta e Hoechst33342) com vista na obtenção da maior eficiência de separação possível. Contudo, nenhuma das sondas usadas conduziu a um enriquecimento aceitável em espermatozóides portadores de um cromossoma X (máximo de 67%) ou Y (máximo de 59%). Por esta razão, não prosseguimos para a caracterização destas subpopulações.

Os espermatozóides humanos requerem adenosina trifosfato (ATP) para o seu correcto funcionamento. Portanto, outro objectivo deste estudo foi determinar os níveis de ATP das diferentes subpopulações separadas, quer com base no potencial de membrana mitocondrial (FACS), quer com base na mobilidade das células (*Swim-up*). Esta determinação foi feita com recurso ao ensaio de bioluminescência da Luciferase, cujo resultados mostram não haver diferenças entre as subpopulações separadas desta forma.

Conclusivamente, as sondas de ADN testadas não são apropriadas para a separação de espermatozóides portadores de um cromossoma X ou Y nas condições utilizadas. Em adição, as subpopulações de espermatozóides separadas com base na mobilidade e PMM apresentam quantidades de ATP semelhantes, sugerindo que o conteúdo em ATP destas células não é exclusivamente dependente da actividade mitocondrial.

Palavras-chave: Cromossomas Sexuais/ Espermatozóides Humanos/ Quantidade de ATP/ Subpopulações de Espermatozóides

Abstract

Human male gametes are characterized by a large heterogeneity. In fact, only a few of the sperm cells of a population seem to be truly functional. During this study we have looked into his heterogeneity and tried to find some properties in which different sperm subpopulations differ. Our criteria for separating these subpopulations were DNA content (X and Y bearing chromosomes), mitochondrial membrane potential (MMP) and motility. To identify and separate the cells we have used flow cytometry activated cell sorting (FACS) and swim-up.

In what concerns the separation based on DNA content, we used three different probes (DRAQ5™, Vybrant® DyeCycle™ Violet and Hoechst 33342) in order to obtain the highest efficacy of separation. However, none of them led to an acceptable enrichment in either X- (67%) or Y- (59%) bearing sperm. For this reason we did not continue to characterize these subpopulations.

It is known that human sperm cells require adenosine triphosphate (ATP) for their proper function. Therefore, another aim in this study was to determine the levels of ATP in different subpopulations separated by their mitochondrial membrane potential (FACS) and by their motility (Swim-up). This determination was made using Luciferase bioluminescence assay, and the results show that there are no differences between the subpopulations separated this way.

In conclusion, the DNA probes tested are not appropriate for X/Y sperm selection in the used conditions. Additionally, sperm subpopulations separated by both motility and MMP have undistinguishable amounts of ATP suggesting that sperm ATP content is not exclusively dependent on mitochondrial activity.

Keywords: ATP Content/ Human Sperm/ Sex Chromosomes/ Sperm Subpopulations

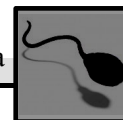
Índice

LISTA DE ABREVIATURAS	VI
RESUMO	VIII
ABSTRACT	IX
ÍNDICE	X
CAPÍTULO I – INTRODUÇÃO	1
ESPERMATOGÉNESE	2
O ESPERMATOZÓIDE	7
CONSTITUIÇÃO E MORFOLOGIA	7
INFERTILIDADE HUMANA	12
CITOMETRIA DE FLUXO E <i>CELL SORTING</i>	14
CELL SORTING	16
SUBPOPULAÇÕES DE ESPERMATOZÓIDES	17
SELECÇÃO SEXUAL	17
BIOENERGÉTICA	24
OBJECTIVOS	29
CAPÍTULO II – MATERIAIS E MÉTODOS	31
MATERIAIS E REAGENTES	32
MATERIAL BIOLÓGICO	32
NÚMERO DE ESPERMATOZÓIDES	32
MARCAÇÃO DE ESPERMATOZÓIDES PARA FACS	33
... COM BASE NO CONTEÚDO EM ADN	33
Confirmação da Separação	36
...COM BASE NO POTENCIAL MEMBRANAR MITOCONDRIAL	41
SEPARAÇÃO DE ESPERMATOZÓIDES COM BASE NA MOBILIDADE	42
VIABILIDADE	42
ATP	43
EXTRAÇÃO DO ATP	43
QUANTIFICAÇÃO DE ATP PELO MÉTODO DA LUCIFERASE	44
ANÁLISE ESTATÍSTICA	45

CAPÍTULO III – RESULTADOS	46
SEPARAÇÃO DE ESPERMATOZÓIDES...	47
...COM BASE NO CONTEÚDO EM ADN	47
DRAQ5	48
VYBRANT DYE CYCLE®	49
HOECHST 33342	51
CONFIRMAÇÃO DA SEPARAÇÃO	52
...COM BASE NO POTENCIAL MEMBRANAR MITOCONDRIAL	56
QUANTIFICAÇÃO DE ATP	56
...COM BASE NA MOBILIDADE	57
QUANTIFICAÇÃO DE ATP	58
CAPÍTULO IV – DISCUSSÃO	59
CAPÍTULO V – CONCLUSÕES	67
CAPÍTULO VI – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	70

Capítulo I

INTRODUÇÃO



Ao processo de fusão dos gâmetas, células reprodutoras masculina e feminina, dá-se o nome de fertilização. Porém, o despoletar do desenvolvimento de um novo ser está dependente da activação do metabolismo do espermatozóide e do ovócito.

Contudo, antes de considerar estes aspectos da fertilização, devemos olhar em mais pormenor para a estrutura das células em si. Foquemo-nos apenas no gâmeta masculino como resultado final de um processo altamente regulado e controlado – a espermatogénese.

Espermatogénese

A espermatogénese é um processo complexo que tem lugar nos túbulos seminíferos dos testículos e envolve, não só sucessivas divisões mitóticas, mas também divisões meióticas, terminando com um processo de diferenciação pós-meiótico conhecido por espermiogénese (De Kretser *et al.*, 1998). Efectivamente, as divisões referidas ocorrem de forma cíclica e sobreposta no tempo, sendo que a sua duração é fixa e dependente da espécie em causa. De acordo com o que foi proposto por França e colaboradores, a duração destes eventos pode ser determinada pelas interacções que se estabelecem entre algumas das células que compõem os túbulos seminíferos (Figura 1), nomeadamente as células germinativas e de Sertoli (França *et al.*, 1998). Tal interacção pode estar ainda na origem da organização celular encontrada nestes tecidos, uma vez que para além da sua função reguladora, as células de Sertoli desempenham funções de suporte físico e de protecção aos espermatozóides em desenvolvimento. Adicionalmente, uma vez que as células germinativas não se encontram em contacto directo com o plasma sanguíneo, as células de Sertoli desempenham um papel fundamental no que respeita à troca de metabolitos e nutrientes com o sangue, constituindo a barreira hematotesticular (Junqueira & Carneiro, 2004).

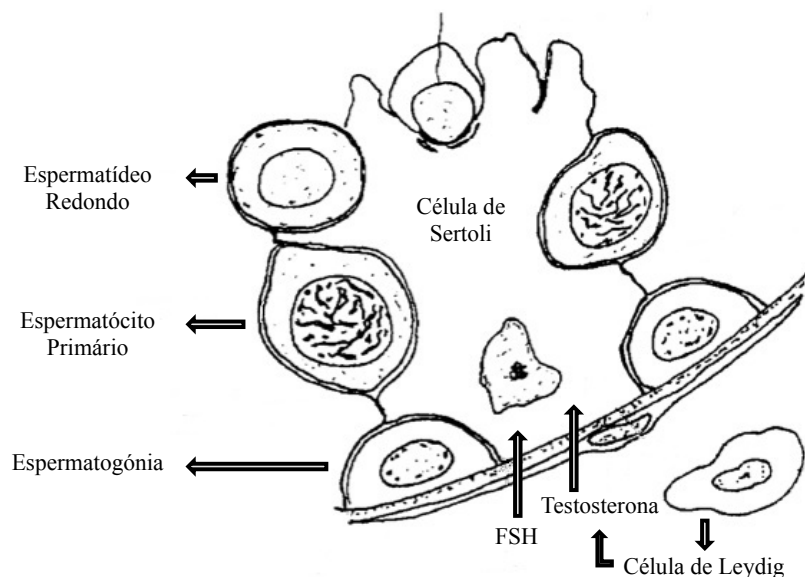
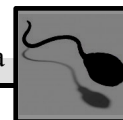
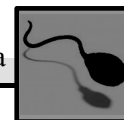


Figura 1 – Esquema representativo das interações estabelecidas entre as células de Sertoli e as células da linha germinativa (adaptado de De Kretser *et al.*, 1998).

Após um longo período de “pré-espermatogênese”, durante o desenvolvimento fetal e a infância, o advento da puberdade marca o início da espermatogênese propriamente dita (Holstein *et al.*, 2003). Este processo pode ser dividido em três fases distintas que se encontram associadas a tipos celulares específicos da linha germinativa: espermátogônias, espermátocitos e espermátides, respectivamente (Figura 2):

Espermatogoniogênese

A espermatogoniogênese é uma fase de proliferação celular, durante a qual as espermátogônias se multiplicam em sucessivas divisões mitóticas de forma a renovar o epitélio germinal onde se encontram (de Kretser & Kerr, 1994). Algumas destas células originam células precursoras, acabando por se diferenciar em espermatozóides. Na verdade, as divisões mitóticas não ocorrem na totalidade, ficando as células-filhas interligadas por pontes citoplasmáticas. A formação destes sincícios celulares pode explicar parte da sincronia encontrada durante a evolução das células germinativas.



Por sua vez, a ligação entre células quebrar-se-á numa fase avançada do desenvolvimento dos espermátides (Holstein *et al.*, 2003).

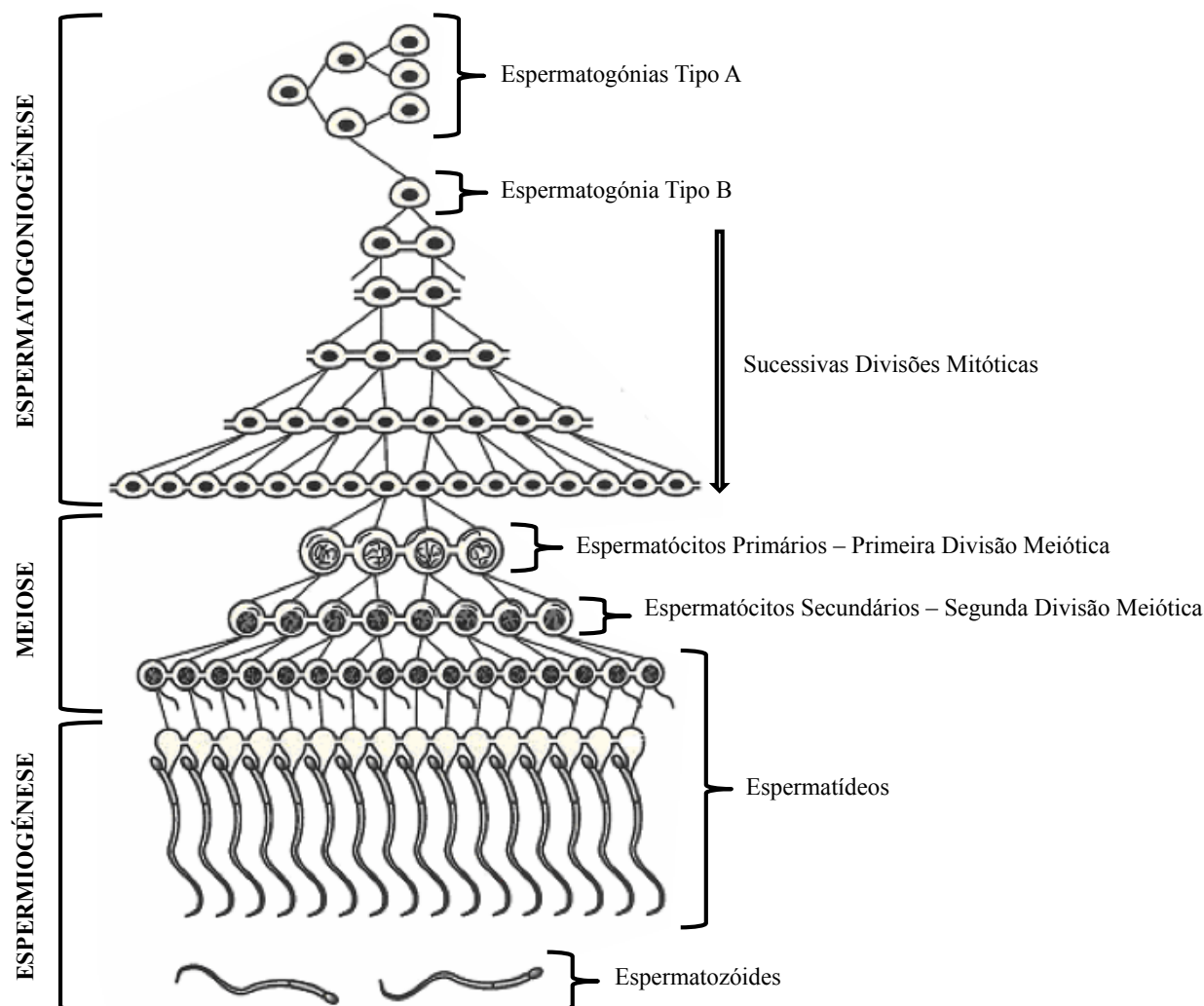
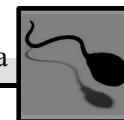


Figura 2 – Esquema alusivo à espermatogênese, com representação das três fases principais e tipos celulares (adaptado de Junqueira & Carneiro, 2004).

Considerando algumas das suas características morfológicas, bem como a sua posição ao longo da zona basal do epitélio germinativo, podemos distinguir essencialmente dois tipos de espermatogônias: um tipo A, pertencente à *pool* de células estaminais e um tipo B, que representa o início do desenvolvimento das células germinativas (De Kretser *et al.*, 1998; Holstein *et al.*, 2003).



Meiose

A entrada das espermatogônias na profase I da meiose é representada pela conversão dessas células em espermatócitos primários, que ao sofrer uma primeira divisão meiótica, originam os espermatócitos secundários. Em humanos, após um curto período de tempo, estas células que possuem apenas uma cópia de cada cromossoma (haploidia) vão novamente entrar em meiose originando os espermátides (De Kretser *et al.*, 1998).

Espermiogénese

Constituindo a última fase da espermatogénese, a espermiogénese visa a diferenciação dos espermátides em espermatozoides, através da transformação e formação de diversas estruturas (Figura 3). Dentro destas alterações podem destacar-se: a condensação e alongamento nucleares, a formação do acrossoma e o aparecimento da cauda, acompanhado pela fagocitose da maior parte do citoplasma pelas células de

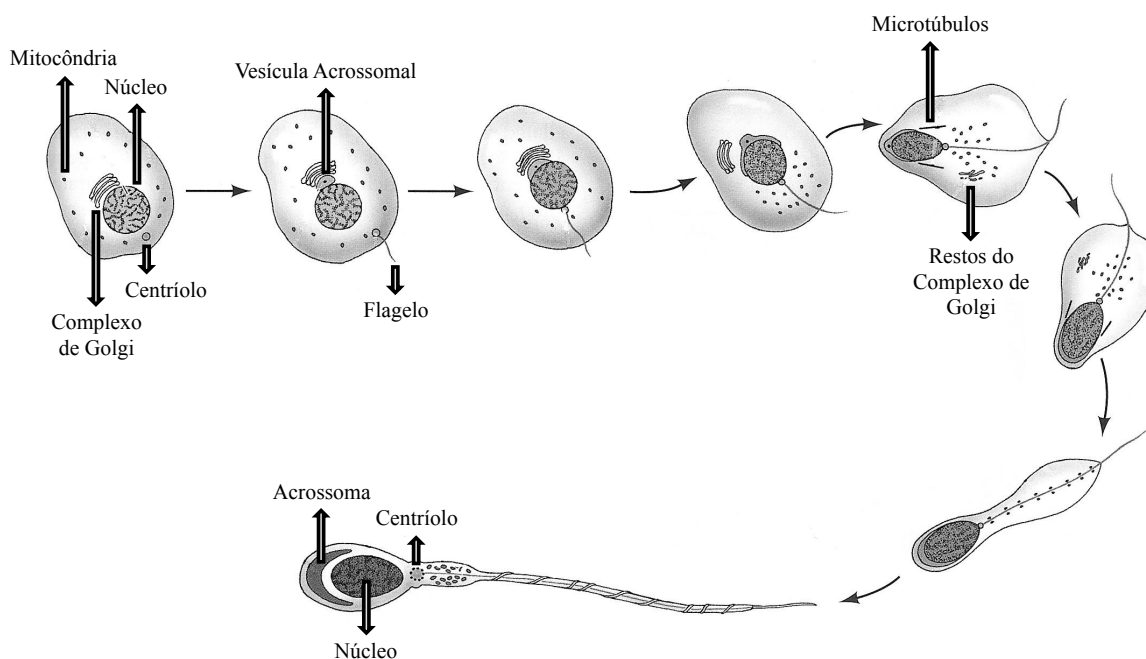
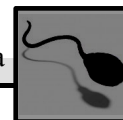


Figura 3 – Esquema representativo das modificações sofridas por uma célula germinativa até à formação de um espermatozoide (adaptado de Gilbert, 2006).



Sertoli (Holstein *et al.*, 2003; Toshimori, 2003). Posto isto, os espermatozóides agora maduros estão aptos a deixar o epitélio germinativo, sendo libertados para o lúmen dos túbulos seminíferos, processo denominado espermição (Holstein *et al.*, 2003).

O processo da espermatogénese ao longo do epitélio seminífero é regulado essencialmente a dois níveis (Figura 4): um intrínseco, regulado pelas células de Leydig e de Sertoli; e um extrínseco, controlado pelo eixo hipotalâmico-hipofisário (De Kretser *et al.*, 1998; Holstein *et al.*, 2003).

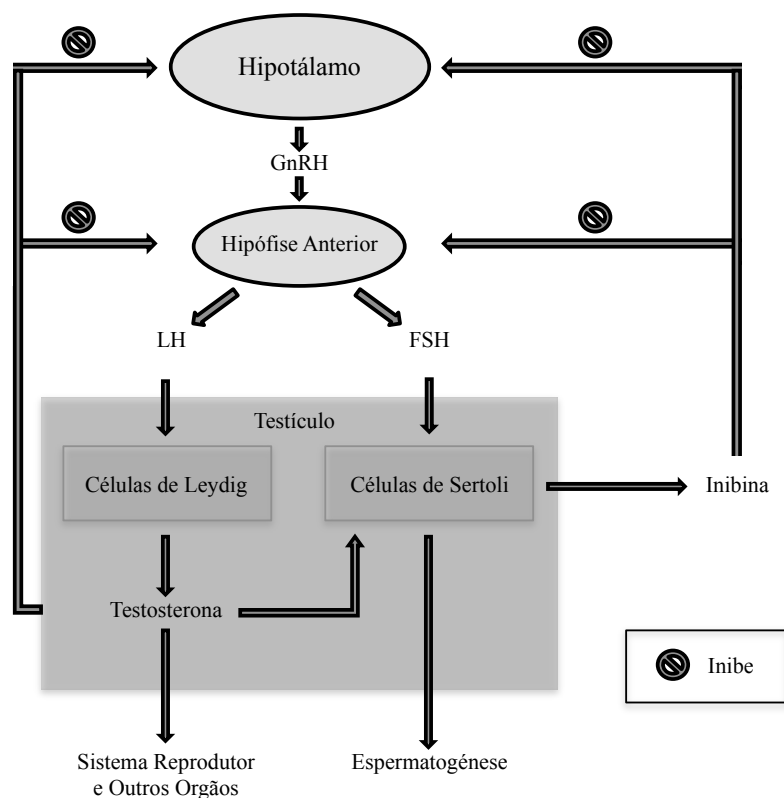
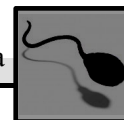


Figura 4 – Representação esquemática do controlo hormonal do sistema reprodutor masculino (adaptado de Purves *et al.*, 2006).

As células de Leydig, localizadas no espaço intertubular, vão segregar testosterona ao ser estimuladas pela hormona luteinizante (LH). Adicionalmente podem ser libertados factores de crescimento que em conjunto com outras substâncias vão ser



lançados para a vizinhança destas células, bem como para a corrente sanguínea, lâmina própria dos túbulos seminíferos e células de Sertoli. O elevado número de compostos produzidos conduz a uma estreita regulação das funções celulares, sendo que alguns deles acabam por influenciar a contractilidade e movimentos peristálticos dos túbulos, interferindo com o transporte dos espermatozóides (Holstein *et al.*, 2003).

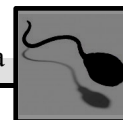
Enquanto isto as células de Sertoli libertam a par com alguns tipos de células germinativas outros factores de crescimento, como o factor de crescimento tumoral beta (TGF β) e o factor de crescimento neuronal (NGF), regulando o processo de desenvolvimento dessas mesmas células germinativas. As células de Sertoli produzem também a proteína de ligação à testosterona (ABP) e segregam inibina, sendo que esta última controla mecanismos de retrocontrolo negativo à síntese de testosterona ao inibir a secreção e libertação da hormona folículo-estimulante (FSH) na hipófise. Finalmente, as células de Sertoli estão envolvidas na conversão de testosterona em estradiol, auxiliando no transporte dos gâmetas após a sua libertação para o lúmen (de Kretser & Kerr, 1994).

O Espermatozóide

Constituição e Morfologia

O espermatozóide é uma célula altamente diferenciada e especializada, responsável pela transmissão da informação genética de origem paterna. Por norma, um espermatozóide funcional é composto por três regiões distintas: cabeça, peça intermédia e cauda ou flagelo (Figura 5).

A cabeça situa-se na zona anterior do espermatozoide e a sua formação e organização ocorre através de diversos processos celulares e moleculares durante a



espermiogénese (Toshimori & Ito, 2003). Estes eventos celulares incluem não só alterações sequenciais no núcleo bem como algumas modificações no acrossoma, os dois constituintes principais da cabeça. Estas estruturas encontram-se ainda rodeadas respectivamente pelo envelope nuclear e membranas acrossómicas, interna e externa (Holstein *et al.*, 2003).

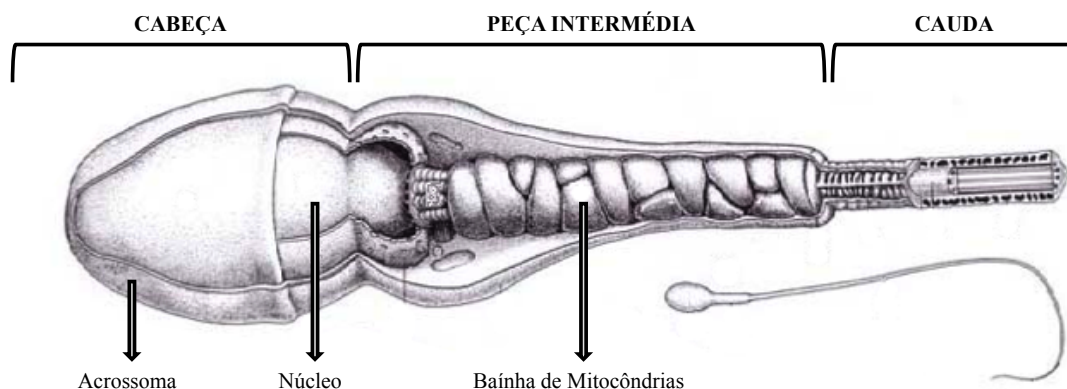
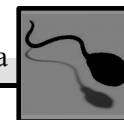


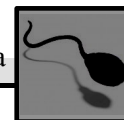
Figura 5 – Representação de um espermatozoide humano (adaptado de Holstein, 2003).

No núcleo a cromatina é altamente estável e condensada, estando presente uma cópia de cada cromossoma. Em 1982, o recurso à microscopia electrónica permitiu a Balhorn demonstrar que em algumas espécies o núcleo dos espermátides sofre várias alterações visíveis, tanto ao nível da forma como do grau de condensação da cromatina (Brewer *et al.*, 2002). Verificou-se ainda que estas alterações ocorrem ao longo do processo normal de diferenciação. Concomitantemente, ocorre uma substituição das histonas ligadas ao ácido desoxirribonucleico (ADN) por proteínas de transição, que numa fase mais avançada são removidas para dar lugar a protaminas. A presença de protaminas permite a forte condensação da cromatina e, juntamente com a perda da maioria dos organelos celulares e citoplasma, desempenha um importante papel na redução do volume da célula, conduzindo a um aumento das propriedades aerodinâmicas do espermatozoide (Ramalho-Santos *et al.*, 2007). Esta modificação



ocorre durante os estágios finais de maturação dos espermátides e reorganização da cromatina (Balhorn, 1982). É ainda necessário garantir que a membrana celular do espermatozoide se mantém íntegra, de modo a assegurar a viabilidade celular. De igual modo, a integridade do ADN nuclear é fundamental, visto ser um ponto crucial para que haja uma correcta transmissão da informação genética de origem paterna (Sousa *et al.*, 2009).

À excepção da mitocôndria, nenhum dos organelos citoplasmáticos principais, como por exemplo o complexo de Golgi ou o retículo endoplasmático (RE), pode ser visto num espermatozoide maturo de mamífero. Em vez disso, o que é observado são os derivados desses organelos, como no caso do acrossoma formado a partir do sistema RE-complexo de Golgi (Oko & Sutovsky, 2009). O acrossoma encontra-se a rodear parcialmente o núcleo e desenvolve-se na região anterior da cabeça do espermatozoide, constituindo no fundo uma vesícula secretora. Esta vesícula contém enzimas hidrolíticas que ajudam a promover a penetração da célula reprodutora masculina através das camadas de células que envolvem o ovócito, nomeadamente através da *Zona Pellucida*. A libertação do conteúdo acrossómico, um processo exocitótico conhecido por reacção acrossómica, deve ter lugar na vizinhança do ovócito, sendo que a ausência de acrossoma em qualquer outra circunstância pode ser sinal de que o espermatozoide não está totalmente funcional (Ramalho-Santos *et al.*, 2007). Nos mamíferos, os espermatozoides são libertados num estado funcional restrito, sendo necessário que ocorram uma série de etapas envolvidas na activação de várias vias de sinalização intracelulares e fosforilação de proteínas (principalmente em resíduos de tirosina) antes de poderem entrar em reacção acrossómica e consequentemente penetrar na célula reprodutora feminina. O referido processo toma o nome de capacitação e tem lugar no



tracto reprodutor feminino, durante a migração dos espermatozóides para o local de fertilização. Porém, em determinadas condições, a capacitação pode ser induzida *in vitro* (Bailey, 2010). A exocitose do conteúdo acrossomal pode ocorrer prematuramente, deixando o espermatozóide incapaz de entrar no ovócito. Tal facto leva a que o despoletar da reacção acrossómica deva ser altamente controlado no espaço e no tempo (Florman *et al.*, 2008). A capacitação encontra-se ainda relacionada com o aparecimento de novos padrões de motilidade espermática incluindo hiperactivação e orientação do movimento através do sistema reprodutor feminino (Florman *et al.*, 2008; Murad *et al.*, 1992).

Numa fase inicial da capacitação, ocorre remoção de colesterol da membrana dos espermatozóides provocada por proteínas presentes no tracto reprodutor feminino (Figura 6). Este efluxo de colesterol causa uma alteração na fluidez membranar e na distribuição de certos lípidos, que passam a concentrar-se preferencialmente na região anterior da cabeça dos espermatozóides (Baldi *et al.*, 1996; Gilbert, 2006).

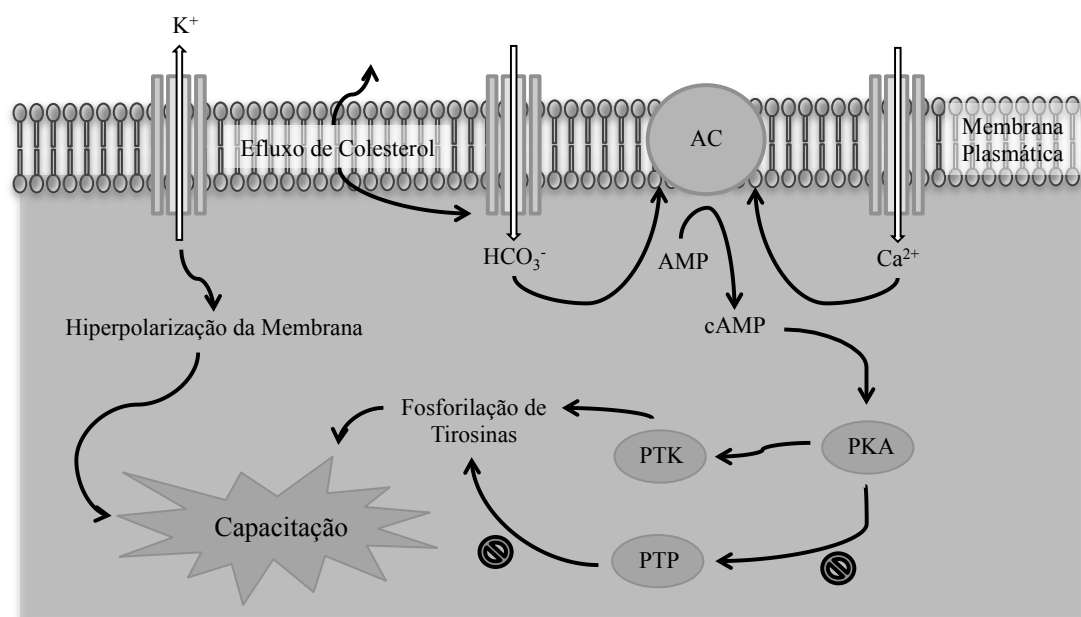
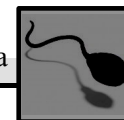
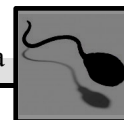


Figura 6 – Representação de um modelo hipotético para a capacitação de um espermatozóide de mamífero (adaptado de Gilbert, 2006).



Adicionalmente, há perda de certas proteínas e hidratos de carbono que se julga estarem envolvidos no bloqueio de locais de reconhecimento de proteínas responsáveis pela ligação à *Zona Pellucida* (Gilbert, 2006). A saída de iões potássio (K^+) da célula provoca hiperpolarização e leva à alteração do potencial membranar conduzindo à abertura de canais de cálcio (Ca^{2+}), permitindo a entrada deste ião. A par com o bicarbonato (HCO_3^-), o Ca^{2+} é crítico na produção de adenosina monofosfato cíclico (cAMP), facilitando os processos de fusão membranar que ocorrem durante a reacção acrossómica (Visconti *et al.*, 1995; Arnoult *et al.*, 1999). Foi também visto que, durante a capacitação, há fosforilação de certas proteínas em resíduos de tirosina. Asquith e colaboradores sugerem que essa fosforilação está relacionada com a migração de duas *chaperones* específicas para a superfície da cabeça do espermatozóide, propondo um envolvimento das mesmas na formação dos receptores que ligam à *Zona Pellucida* (Asquith *et al.*, 2004; Nixon *et al.*, 2005). De forma a preparar-se para a fusão, a membrana acrossómica externa sofre algumas alterações, entrando em contacto com a membrana citoplasmática do espermatozóide (Tulsiani & Abou-Haila, 2004). Na verdade, não é possível dizer com certeza se estes eventos são ou não independentes, nem qual a sua contribuição para a capacitação (Gilbert, 2006).

A ligar a cabeça e a cauda do espermatozóide encontra-se a peça intermédia, constituída por um número variável de mitocôndrias localizadas helicoidalmente à volta da porção anterior do flagelo. Pensa-se que estas mitocôndrias podem estar relacionadas com o fornecimento de adenosina trifosfato (ATP) envolvido na mobilidade dos espermatozóides. Contudo é possível que o ATP necessário seja produzido maioritariamente por glicólise ao longo do flagelo, havendo apenas contribuição da fosforilação oxidativa em certas circunstâncias (Ramalho-Santos *et al.*, 2009).



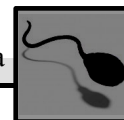
Por fim, na zona posterior do espermatozóide localiza-se a cauda, responsável por gerar a força motriz que impulsiona a célula permitindo que esta atinja o ovócito e penetre a *Zona Pellucida*. À estrutura contráctil do flagelo propriamente dita damos o nome de axonema, sendo que este apresenta um arranjo microtubular típico 9+2, consistindo em nove pares de microtúbulos periféricos, ordenados em círculo à volta de um par central. Podemos ainda observar, ao redor do axonema, várias estruturas proteicas que conferem força e resistência à cauda (Kierszenbaum, 2002).

A motilidade dos espermatozóides está assim dependente não só do normal desenvolvimento das estruturas do axonema (como por exemplo os microtúbulos e braços de dineína) mas também da presença duma bainha de mitocôndrias e da implantação do flagelo no núcleo pelos dois centríolos. Qualquer anomalia ao nível do aparecimento das estruturas flagelares pode causar imobilidade celular, resultando não só numa diminuição da fertilidade mas também, em casos extremos, em infertilidade (Holstein *et al.*, 2003).

Infertilidade Humana

Nos últimos tempos tem-se verificado um aumento nos casos diagnosticados de infertilidade, sendo que actualmente esta afecta cerca de 15% dos casais que tentam procriar. Segundo o que está descrito, esta condição reflecte a incapacidade de concepção após um ano de relações sexuais desprotegidas, não havendo uma contribuição prevalente por parte de um dos sexos (Singh & Jaiswal, 2011).

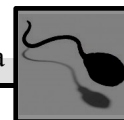
Naturalmente, esta diminuição da fertilidade alertou a comunidade científica no sentido de criar meios que, não solucionando, minimizassem o problema. Como resultado surgem então as técnicas de reprodução assistida (TRA).



Sem dúvida esta é uma área em expansão. Porém as técnicas mais recorrentes permanecem a Inseminação Artificial (IA), onde os espermatozóides são depositados na cavidade uterina; a Fertilização *in vitro* (FIV), onde os espermatozóides são colocados em contacto com o ovócito não fertilizado *in vitro*; e a Injecção Intracitoplasmática de um espermatozóide (ICSI), onde ocorre micromanipulação de modo a injectar o espermatozóide seleccionado directamente dentro do ovócito (Lopata *et al.*, 1978; Palermo *et al.*, 1992).

Rotineiramente, o diagnóstico da infertilidade masculina é feito com recurso a uma análise seminal estandardizada – o espermograma. Ao seguir uma abordagem clássica, nesta análise devemos considerar três parâmetros fundamentais: concentração, mobilidade e morfologia. Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS) vários valores de referência estabelecem aquilo que pode ser considerado como uma amostra normal. Assim, relativamente aos parâmetros mencionados, consideramos que um indivíduo é normozoospermico (valores normais) quando este possui pelo menos 15 milhões de espermatozóides por mililitro, pelo menos 32% de células móveis progressivas e pelo menos 4% de espermatozóides com formas normais. Caso algum destes valores não respeite o valor estipulado a amostra é classificada como oligo-, asteno- ou teratozoospermica, respectivamente (WHO, 2010). Em certas situações, os indivíduos podem apresentar combinações das classificações referidas, sendo que num caso extremo (alteração dos três parâmetros) apresentarão oligoastenoteratozoospermia.

Apesar da sua utilização rotineira em andrologia, os critérios apresentados pela OMS têm um valor preditivo limitado, indicando apenas algum grau de qualidade espermática e funcionalidade do tracto reprodutor masculino, deixando por esclarecer a capacidade



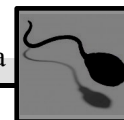
dos espermatozóides em fertilizar um ovócito (Sousa *et al.*, 2009). De facto, indivíduos normozoospermicos podem ser inférteis enquanto que indivíduos com parâmetros anormais podem ser pais biológicos.

Citometria de Fluxo e *Cell Sorting*

Por definição, citometria é o processo através do qual as características físicas e/ou químicas de uma única célula (ou partícula) são medidas (Shapiro, 2003). Qualquer forma de citometria responde a leis básicas da física, desde a mecânica de fluidos à óptica e à electrónica (Macey, 2007).

Na citometria de fluxo as medições são feitas durante a passagem sequencial das partículas pelo aparelho de medição, sendo que neste caso é necessária a existência de uma corrente fluida contínua (Shapiro, 2003). No fundo, esta é uma técnica multiparamétrica que nos permite contar, examinar e classificar diversas partículas microscópicas em suspensão. Qualquer partícula cujo tamanho esteja compreendido entre os 0,2 e os 50 micrómetros é passível de análise. Mas de que modo é que a determinação destes parâmetros pode ser feita?

Alguns dos princípios nos quais a citometria de fluxo assenta baseiam-se em eventos de difusão luminosa e emissão de fluorescência, provocados pela incidência de um feixe de luz ou laser nas partículas aquando da sua passagem pela zona de medição. Na prática o que acontece é que, ao ser atravessada pelo feixe luminoso, a partícula vai dispersar luz em todas as direcções (Figura 7). A luz difundida para a frente, em pequenos ângulos de 0.5° - 5° a partir do eixo, é proporcional ao quadrado do raio de uma esfera e, conseqüentemente, ao tamanho da célula ou partícula. Parte da luz pode ainda entrar na célula, sendo reflectida e refractada pelo núcleo e outros componentes



celulares. Esta difusão luminosa em grandes ângulos de 15° - 150° considera-se então proporcional à complexidade da célula (Macey, 2007). O recurso a marcadores de fluorescência permite obter informação adicional relacionada com diversos factores, nomeadamente actividade enzimática, potencial de membrana e conteúdo em ADN.

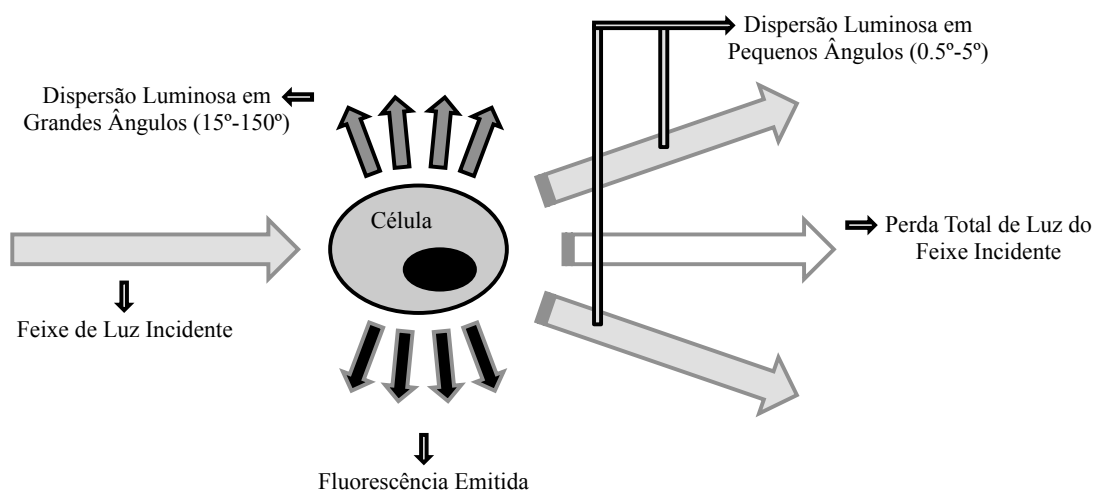
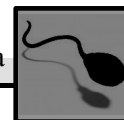


Figura 7 – Esquema ilustrativo da interacção da luz com uma célula em termos de difusão, absorção e fluorescência (adaptado de Shapiro, 2003).

Na sua maioria, os citómetros de fluxo são constituídos por três sistemas fundamentais: um sistema de fluidos, um sistema óptico e um sistema electrónico. Ao sistema de fluidos compete genericamente o transporte das partículas em suspensão até ao feixe luminoso. Por norma, este movimento ocorre por intermédio de uma corrente fluida salina, de modo a que as partículas cheguem à zona de medição. Muitos dos instrumentos utilizados recorrem a uma técnica de fluxo laminar que garante a permanência das células no centro do fluxo, evitando o bloqueio provocado por fenómenos de aglutinação (Macey, 2007). Tipicamente, as amostras correm a concentrações compreendidas entre os 0,2 e os 10 milhões de células por mililitro. O sistema óptico é composto por componentes de excitação e captação, dos quais fazem parte lasers, lentes e filtros, responsáveis por guiar os lasers até à partícula que

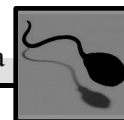


queremos analisar. Como foi referido, a intercepção das partículas com o laser provoca difusão luminosa, e no caso de partículas marcadas, emissão de fluorescência. Aos componentes colectores cabe então a captação dessa informação e consequente endereçamento para os detectores, que constituem já parte do sistema electrónico. Os detectores são assim responsáveis pela conversão dos fotões recebidos num pulso eléctrico, para que posteriormente haja processamento dos dados analógicos. Este processamento é feito com recurso a um conversor que torna os dados analógicos em digitais. No fundo, ocorre alteração de um pulso eléctrico para um sinal numérico, que é armazenado no computador (Macey, 2007).

Cell Sorting

A separação de células activadas por fluorescência (FACS) constitui um tipo especializado de citometria de fluxo. Esta técnica representa actualmente um recurso vital nas ciências biológicas, sendo de extrema utilidade na separação de células provenientes de populações heterogéneas (Macey, 2007). Porém, para que estas células possam ser recuperadas é necessário que a sua discriminação seja possível recorrendo a um citómetro tradicional. Após a separação, estas células podem ser usadas em análises bioquímicas, microscópicas ou funcionais (Sousa *et al.*, 2011).

Genericamente, a maioria dos aparelhos de separação celular baseiam-se no princípio de deflexão electrostática de gotículas carregadas, havendo contudo outros métodos de divisão. Na verdade, independentemente do princípio utilizado, é essencial garantir que as células que atravessam o feixe satisfazem os critérios estipulados. Após a confirmação desses critérios, é necessário gerar um sinal que active o mecanismo de separação (Shapiro, 2003). Consoante a carga associada às gotículas, estas vão ser encaminhadas para a esquerda ou para a direita por placas deflectoras.



As partículas neutras, às quais não foi atribuída carga, não são afectadas pelas forças eléctricas e passam pelo fluxo sem ser recolhidas.

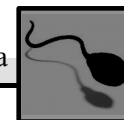
Subpopulações de Espermatozóides

Seleccção Sexual

Há muito que se procura um método que permita determinar qual o sexo da sua descendência mesmo antes da concepção. Decerto, esta não só não é uma busca recente, como as suas origens são remotas no tempo.

Inicialmente, esta temática encontrava-se ligada aos Egípcios, Chineses e Indianos, contudo o seu efeito fazia sentir-se em várias partes do mundo. Esta necessidade cultural e social criou meios que conduziram a esforços muito primitivos de selecção sexual, mesmo antes de qualquer conhecimento de conceitos genéticos (Sills et al., 1998). Talvez por essa razão muitos desses meios sejam hoje considerados obsoletos.

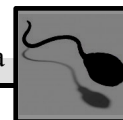
O que é facto é que desde cedo os Egípcios atribuem um importante papel às funções do sistema reprodutor masculino, baseados na observação de que a castração conduzia à diminuição da libido e à esterilidade. Mais tarde, Anaxágoras (500-482 A.C) avançou com a ideia de que seria o homem o responsável por determinar o sexo da descendência, e foi um dos primeiros a propor uma função específica para cada testículo. Deste modo, o sémen proveniente do testículo esquerdo originaria descendência feminina enquanto que o sémen proveniente do testículo direito originaria descendência masculina. Esta presunção permaneceu até ao século XVIII e foi responsável por que muitos nobres europeus removessem o seu testículo esquerdo, de forma a assegurar o nascimento de um herdeiro do sexo masculino (Sills et al., 1998). É sabido que muitas foram as



técnicas utilizadas, contudo nenhuma mostrou ser eficaz, chegando algumas delas a ser muito dolorosas.

Já no século XIX, Gregor Johann Mendel dá origem a todo um novo conceito de genética, graças à descoberta das leis da herança biológica, conhecidas hoje em todo o mundo por Leis de Mendel. Porém, apesar destes estudos pioneiros, os factores que conduzem ao início do desenvolvimento sexual feminino e masculino continuavam por desvendar. Anos mais tarde, em 1891, Hermann Henking apercebeu-se que alguns insectos – *Pyrrhocoris apterus* – apresentavam diferenças sexuais na meiose e no cariótipo, sendo que as fêmeas possuíam 24 cromossomas, que se comportavam como doze pares de homólogos, enquanto que os machos possuíam apenas 23, onze pares mais um (McClung, 1901). Da necessidade de definir este cromossoma solitário surge então o termo cromossoma acessório, o que acaba por fazer com que em 1901 McClung conclua, baseado nas suas próprias descobertas, que esse cromossoma acessório seria o responsável pela determinação do sexo. Ainda que as suas premissas apresentassem alguns detalhes pouco correctos, esta demonstração constituiu uma forte ligação entre cromossomas e um aspecto fundamental do fenótipo – o sexo de um organismo (McClung, 1901). Estava assim criado o primeiro passo para a confirmação da Teoria Cromossómica da Hereditariedade proposta por Walter Sutton em 1902 (Sutton, 1902).

No seu trabalho, Sutton propõe que o padrão de segregação dos cromossomas durante a meiose corresponde aos padrões de segregação propostos por Mendel. Acrescenta ainda que durante o processo meiótico, no qual são produzidos ovócitos e espermatozóides, cada gâmeta recebe apenas um cromossoma de cada tipo. É curioso



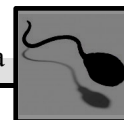
pensar que, enquanto que as divisões meióticas são um processo muito conservado nos eucariotas, a sua regulação é drasticamente divergente entre machos e fêmeas (Gilbert, 2006).

Métodos de Separação

Com o passar dos anos, a procura por um método que permitisse seleccionar o sexo da descendência levou ao aparecimento de inúmeras estratégias direccionadas para a separação dos espermatozoides, uma vez que estes são os gâmetas responsáveis pela determinação sexual. Esta procura tentava basear-se assim numa característica particular e identificável que conduzisse à sua distinção.

Um dos primeiros esforços surge em 1929, após Mudd e colaboradores demonstrarem que, dependendo da espécie em causa, havia padrões de migração distintos entre espermatozoides submetidos a uma corrente eléctrica. Tal demonstração aponta para existência de diferenças na carga eléctrica à superfície das células, diferenças essas que poderiam ser utilizadas como meio de diferenciação (Sills *et al.*, 1998). O interesse por este método electroforético acabou por decair em consequência da incapacidade para reproduzir novamente os resultados obtidos (Sills *et al.*, 1998).

Numa outra tentativa, Rothschild apresenta em 1960 um ensaio apoiado pelas diferenças ácido/base hipotéticas entre os espermatozoides portadores de um cromossoma X ou Y, porém o trabalho de outros laboratórios desafiava as observações efectuadas (Sills *et al.*, 1998). Um ano mais tarde, a descoberta de uma possível distinção baseada na forma dos espermatozoides despertou as atenções no seio da comunidade científica, o que rapidamente foi revertido devido à ausência de dados que

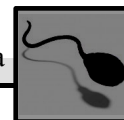


apoiassem esta teoria de dimorfismo sexual. Ao longo dos anos outras perspectivas foram surgindo, contudo olhando para a progressão dos métodos científicos publicados, o denominador comum entre eles é o facto de para todos haver estudos que os refutem (Sills *et al.*, 1998).

Até à data, o recurso à técnica de FACS mostrou ser o único método verdadeiramente eficaz na separação de espermatozóides X e Y. Proposto pela primeira vez por Johnson em 1987, este método baseia-se na medição do conteúdo diferencial de ADN existente em gâmetas individuais (Cran & Johnson, 1996). Contudo, a primeira separação bem sucedida (apresentada pelo mesmo autor) remonta a 1993, tendo sido conseguida através da aplicação de técnicas de citometria cuidadosamente modificadas (Johnson *et al.*, 1993).

Em 1976, Sumner & Robinson constataram a existência de diferenças no conteúdo de ADN em espermatozóides humanos. Segundo o que está descrito por estes e outros autores, estas diferenças rondam os 2,8-3% em humanos e variam entre os 2,3-12,5% noutras espécies de mamíferos (Cran & Johnson, 1996; Sills *et al.*, 1998; Fugger, 1999; Garner, 2006). A assunção de que os diferentes cromossomas sexuais poderiam ter diferentes tamanhos acabou por ser o elemento propulsor da descoberta. Estudos ao nível do cariótipo vieram confirmar a suposição (Sills *et al.*, 1998).

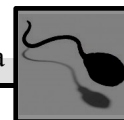
Na prática, o que vai permitir a separação de espermatozóides é a ligação prévia de marcadores de fluorescência que, ao ligar aos ácidos nucleicos, levam à quantificação precisa do ADN nuclear (Seidel & Garner, 2002). Vários corantes foram assim testados, porém o único que mostrou ser eficaz foi o bisBenzimide Hoechst 33342 (H33342) utilizado por Johnson e colaboradores em 1993. O H33342 é um marcador de células vivas que permeia a membrana e liga selectivamente aos pares de base de adenina e



timina (A-T). Com vista a otimizar a separação, é comum recorrer-se à marcação combinada de H33342 e iodeto de propídeo (IP). O IP é também um marcador nuclear, porém a sua acção manifesta-se apenas em células com a membrana comprometida, pelo que permite a diferenciação de células viáveis (normais) de células não viáveis (necróticas e apoptóticas). A ligação ao ADN é feita através da sua intercalação entre os pares de bases. Na verdade, devido ao potencial mutagénico do IP alguns autores sugerem a utilização de corantes alimentares (Johnson & Welch, 1999; Schenk *et al.*, 1999).

Um importante atributo que difere entre os espermatozóides das diferentes espécies de mamíferos é a forma da cabeça. Na maioria dos casos, os espermatozóides destes animais apresentam uma cabeça oval e achatada, à excepção dos roedores e monotrématos (Garner, 2006). O recurso às diferenças existentes entre os espermatozóides portadores de um cromossoma X ou Y não depende apenas das diferenças encontradas ao nível do ADN, mas depende também da capacidade de conseguir orientar esses espermatozóides durante a sua passagem pela zona de medição do citómetro de fluxo (Garner, 2006; Sharpe & Evans, 2009). De um modo geral, os espermatozóides com cabeças ovais e mais achatadas tendem a posicionar-se correctamente mais depressa do que os espermatozóides com cabeças arredondadas ou angulares, devido às suas propriedades hidrodinâmicas. Com base nesta característica, estudos comparativos realizados em diferentes espécies sugerem que os espermatozóides humanos são cerca de quatro vezes mais difíceis de separar do que os espermatozóides de touro ou javali, por exemplo (Garner, 2006).

Uma boa resolução do conteúdo de ADN pode ser conseguida através da optimização da marcação da cromatina para cada espécie. Contudo, este processo é

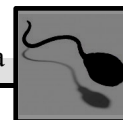


bastante mais complexo, na medida em que é igualmente necessário considerar a susceptibilidade dos diferentes gâmetas ao laser, bem como a pressão a que estes estão sujeitos ou mesmo a própria resistência às condições do meio. Assim, estas razões fazem da separação de espermatozóides um processo variável não só entre espécies mas também entre indivíduos de uma mesma espécie (Garner, 2006). A análise de lesões ao nível do ADN de espermatozóides de bovino, ao longo dos vários passos do processo de separação, revelou que há uma diminuição na integridade da cromatina, não só devida à exposição ao H33342 mas também devida à exposição ao laser (Garner, 2006).

Seguindo outra abordagem, alguns estudos foram realizados no sentido de avaliar a eficácia da separação de espermatozóides após a sua criopreservação e o seu descongelamento. Num trabalho publicado por O'Brien e associados mostrou-se ser possível a obtenção de subpopulações enriquecidas em espermatozóides portadores de um cromossoma X, tanto em amostras frescas como em amostras que sofreram o processo de criopreservação e descongelamento (O'Brien *et al.*, 2005).

Outro tópico de elevada importância, no que concerne à separação de espermatozóides, relaciona-se com a validação dos resultados obtidos. De que modo podemos demonstrar que o que estamos a obter são de facto subpopulações enriquecidas em espermatozóides X ou Y?

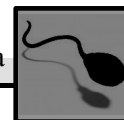
Um dos métodos mais utilizados na validação de subpopulações é a hibridização fluorescente *in situ* (FISH), estando contudo descrito o recurso a outros métodos de análise, como a electroforese capilar ou a reacção de polimerização em cadeia em tempo real (RT-PCR) (Flaherty & Matthews, 1996; Fugger *et al.*, 1998; Fugger, 1999; Checa & Cañón, 2002; Puglisi *et al.*, 2006). A preferência apresentada deve-se não só ao facto da técnica de FISH permitir a identificação individual dos cromossomas



sexuais usando marcados específicos do X e do Y, mas também devido à rápida obtenção de um *screening* de um elevado número de espermatozóides (Flaherty & Matthews, 1996). Com base nesta confirmação de resultados, calcula-se ser hoje possível predeterminar o sexo da descendência de várias espécies com uma precisão de 85-95% (Cran & Johnson, 1996; Seidel & Garner, 2002). Em Humanos, Johnson e colaboradores demonstraram que essa separação podia ser conseguida com uma pureza de 80-85% para espermatozóides portadores de um cromossoma X e cerca de 75% para espermatozóides portadores de um cromossoma Y (Johnson *et al.*, 1993).

Actualmente, estão descritas várias aplicações para as quais o recurso à técnica de FACS pode ser uma solução. De um modo geral, esta técnica é muito utilizada no que respeita à gestão e conservação de espécies animais (O'Brien *et al.*, 2005). A reprodução de populações de animais selvagens que vivem em cativeiro dependem muitas vezes da aplicação deste método. Como exemplo disso temos o caso do Gorila de planície ocidental (*Gorilla gorilla gorilla*). Estes animais vivem normalmente em grupos constituídos por várias fêmeas e apenas um macho, o que leva a que, quando em cativeiro, seja necessário separar os machos que atingem a maturidade sexual. Esta situação faz com que haja um número insuficiente de fêmeas disponíveis para formar novos haréns para os machos excedentes (O'Brien *et al.*, 2005).

Em humanos, o desejo de determinar o sexo da descendência prende-se essencialmente com valores sociais ou com a tentativa de prevenir o aparecimento de doenças associadas a cromossomas sexuais. Por outro lado, quando se trata de outras espécies prevalecem os interesses económicos, nomeadamente através do melhoramento genético e da optimização da gestão de explorações animais (Cran & Johnson, 1996).

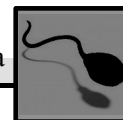


Os produtores de leite, por exemplo, preferem ter uma preponderância de crias do sexo feminino, enquanto que aos produtores de carne é mais vantajoso o inverso.

Bioenergética

Qualquer reacção bioquímica envolve o fluxo de energia, daí ser válida a aplicação do termo bioenergética a todas as ciências da vida.

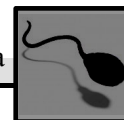
A bioenergética emergiu como disciplina durante os anos cinquenta, na sequência da procura por uma solução para o mecanismo através do qual a energia disponível, obtida quer por oxidação de substratos quer por absorção de luz, é acoplada a reacções celulares, como a síntese de ATP ou como a acumulação de iões através da membrana. No seguimento destes estudos é estabelecida a teoria quimiosmótica, perfeitamente aceite nos dias de hoje. A essência desta teoria é a existência de uma bomba protónica capaz de gerar um gradiente de protões tal, que conduz à reversão do funcionamento de uma segunda bomba protónica, levando assim à síntese de ATP a partir de adenosina difosfato (ADP) e fosfato (Pi). Contudo, no período compreendido entre 1965 e 1980 esta área encontrava-se quiescente e pouco desenvolvida, e só após alguns progressos conseguidos no que respeita à elucidação dos mecanismos moleculares de certos complexos proteicos, muitos dos quais são agora compreendidos a nível atómico, é que este campo mostrou ser promissor (Nicholls & Ferguson, 2002). Por outro lado, a explosão paralela de estudos relativos à fisiologia mitocondrial veio permitir também um melhor conhecimento do funcionamento celular. No entanto, o papel da mitocôndria na reprodução masculina permanece um enigma por desvendar (Rajender *et al.*, 2010).



A Mitocôndria e a (In)Fertilidade Masculina

O factor masculino continua a ser apontado como uma das principais causas da infertilidade humana e, em muitos casos, este problema é conduzido de forma empírica e sem recurso a evidências científicas (Isidori *et al.*, 2005; Makker *et al.*, 2009; Tournaye *et al.*, 2012). É certo que várias podem ser as causas que conduzem à infertilidade masculina, porém num grande número de casos essa causa permanece idiopática, o que reflete o fraco conhecimento do processo de espermatogénese e mecanismos associados (Rajender *et al.*, 2010). Para além das razões convencionais que levam a esta incapacidade, como sejam o varicocelo (síndrome anatómico de varizes escrotais), a criptorquidia (ausência de um ou ambos os testículos da bolsa escrotal, permanecendo no interior da cavidade abdominal), algumas lesões obstructivas, infecções e traumas ou certos tumores, tem havido uma intensa procura por outras causas que possam estar também a condicionar o sucesso reprodutivo (Makker *et al.*, 2009). Neste sentido, vários estudos têm sublinhado o importante papel desempenhado pela mitocôndria na fertilidade masculina, nomeadamente ao longo do processo de espermatogénese (Ho & Wey, 2007; Makker *et al.*, 2009; Ramalho-Santos *et al.*, 2009; Rajender *et al.*, 2010).

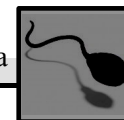
Durante a diferenciação dos espermátides, algumas mitocôndrias, assim como grande parte do citoplasma, são perdidos após fagocitose dos corpos residuais (Ramalho-Santos *et al.*, 2009). Contudo, deve haver uma forte razão biológica para a retenção do elevado número de mitocôndrias na região anterior da cauda. Apesar do papel destes organelos no espermatozóide não estar totalmente estabelecido, parece ser consensual que a energia fornecida pelas mitocôndrias pode ser usada com vários propósitos, sendo a fosforilação oxidativa a função imediatamente associada à



mitocôndria (Ramalho-Santos *et al.*, 2009; Ruiz-Pesini *et al.*, 2000). Estes organelos localizam-se no citoplasma de qualquer célula animal ou vegetal, apresentando na sua estrutura uma dupla membrana que compõe o espaço intermembranar, delimitado então por uma membrana externa e outra membrana interna. Este espaço caracteriza-se pela existência de um elevado número de proteínas, sendo ainda palco para a fosforilação oxidativa (Rajender *et al.*, 2010; Ramalho-Santos *et al.*, 2009). Para além disto, as mitocôndrias destacam-se dos restantes organelos celulares na medida em que apresentam o seu próprio genoma, de origem exclusivamente materna (Giles *et al.*, 1980).

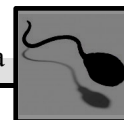
Actualmente, foram já descritas várias mutações ao nível do genoma mitocondrial de homens inférteis, mutações essas que indicam que um mau funcionamento da respiração mitocondrial pode contribuir para a infertilidade masculina (Shivaji *et al.*, 2009). De facto, certas deleções do ADN mitocondrial conduzem a oligo e astenozoospermia em ratinhos, bem como alterações ao nível da fosforilação oxidativa, ou da síntese de ATP em geral em espermatozóides de mamíferos, comprometem a mobilidade destas células (Nakada *et al.*, 2006; Ruiz-Pesini *et al.*, 2000). A mobilidade reduzida dos espermatozóides, juntamente com a sua baixa concentração, é apresentada como grande causa para a infertilidade. Ainda no que respeita a danos no ADN mitocondrial, foi proposto por St. John e colaboradores que não só nos espermatozóides estes danos podem ser determinantes, avançado com a ideia de que alterações no ADN mitocondrial em células de Sertoli e outras células de suporte podem levar a perdas na produção de energia, resultando numa espermatogénese deficiente (St. John *et al.*, 2000).

Apesar da fosforilação oxidativa ser considerada essencial para a função e normal fisiologia dos espermatozóides por alguns autores (Spiropoulos *et al.*, 2002), outros



defendem que estas células necessitam igualmente do ATP gerado no processo glicolítico, não só na sua mobilidade mas também para eventos como hiperactivação e fosforilação de proteínas em resíduos de tirosina (St. John *et al.*, 2000; Hung *et al.*, 2008). No entanto, Ford mostra num trabalho realizado em 2006 que, mesmo inibindo a glicólise, os espermatozóides mantêm a sua capacidade de progressão (Ford, 2006). A existência desta discórdia, a par com a falta de suporte científico, leva a que não haja um consenso no que respeita à verdadeira importância de cada uma destas vias na produção de energia. O que é realmente importante é não direccionar os esforços apenas na compreensão dos mecanismos de produção de ATP, e sim considerar todas os outros eventos que ocorrem no espermatozóide, como a hiperactivação, reacção acrossómica e capacitação, por exemplo. Dos métodos descritos até hoje para quantificação desta molécula energética, é comum recorrer-se com mais frequência à cromatografia líquida de fase reversa de alta eficiência (HPLC) ou à determinação por bioluminescência através do método da Luciferase.

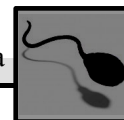
Certas evidências apontam ainda para o envolvimento de proteínas mitocondriais no processo de capacitação, sendo que a via de sinalização que envolve fosforilação dependente de cAMP de proteínas em resíduos de tirosina está apenas descrita para espermatozóides (Shivaji *et al.*, 2009). Em adição, estudos têm indicado que a actividade da proteína cinase A (PKA) é essencial para esta fosforilação, assim como para a hiperactivação e reacção acrossómica nestas células (Lefievre *et al.*, 2002). É notório aqui uma vez mais o importante papel da mitocôndria no que respeita a vias metabólicas, na medida em que está descrito que estes organelos regulam os níveis de vários segundos mensageiros, como é o caso do cálcio e das espécies reactivas de oxigénio (Kroemer *et al.*, 1997; Ruiz-Pesini *et al.*, 2007).



Qualquer célula que viva num ambiente aeróbio lida constantemente com o paradoxo do oxigénio: o oxigénio é necessário para que haja vida, mas os seus metabolitos podem modificar algumas funções celulares, pôr em risco a sobrevivência da célula ou ambos (Agarwal *et al.*, 2003). Este stress oxidativo é consequência do desequilíbrio que pode ser gerado entre a produção de ROS e os mecanismos de defesas antioxidantes do organismo, estando por vezes este desequilíbrio associado à infertilidade (Agarwal *et al.*, 2003; Armstrong *et al.*, 1999; Makker *et al.*, 2009).

Actualmente, está estabelecido que não só os leucócitos presentes no sémen, mas também os próprios espermatozóides, têm a capacidade de gerar ROS (Aitken *et al.*, 1996; Ford, 2004). Os espermatozóides são na verdade especialmente susceptíveis a danos causados por stress oxidativo, na medida em que possuem na sua membrana um elevado número de ácidos gordos polisaturados, bem como uma reduzida concentração de enzimas capazes de impedir a acção das espécies reactivas. Parte deste stress oxidativo interfere não só com a membrana das células, mas também com a integridade do ADN presente no núcleo (Aitken *et al.*, 1999). Todas estas contribuições do stress oxidativo na actividade celular podem levar à apoptose precoce dos espermatozóides, o que se traduz numa diminuição da quantidade e qualidade dos mesmos no ejaculado (Agarwal *et al.*, 2003).

O papel das espécies reactivas de oxigénio, como elemento na transdução de sinal em fenómenos fisiológicos, é um conceito recente e que vem alterar a ideia de que estas moléculas têm um efeito única e exclusivamente deletério para as células (O'Flaherty *et al.*, 2006). A activação de diversas cascatas de sinalização associadas a certos processos fisiológicos, como a capacitação, está intimamente modulada por ROS,



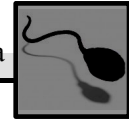
que tanto pode ter origem na própria célula como pode ser proveniente do meio envolvente (de Lamirande & Lamothe, 2009).

Objectivos

O ejaculado humano é extremamente heterogéneo e pensa-se que inclua um baixo número de gâmetas verdadeiramente funcionais (Sousa *et al.*, 2011). Tendo isto por base, vários estudos têm tentado demonstrar que existem de facto diferentes subpopulações de espermatozóides com diferentes características bioquímicas e fisiológicas, cuja identificação levará idealmente à selecção e separação de uma subpopulação de espermatozóides mais funcionais e com maior capacidade de fertilizar o ovócito.

Actualmente, está já descrito que espermatozóides com mitocôndrias activas determinam uma subpopulação de células mais funcionais, subpopulação essa que contém um maior número de células capacitadas e com acrossoma intacto, menor número de células com danos na cromatina e, não menos importante, células com maior capacidade de descondensação após fecundação e consequente participação nas fases iniciais do desenvolvimento embrionário (Sousa *et al.*, 2011).

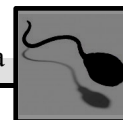
Deste modo, um dos objectivos deste estudo consiste em determinar quais os níveis de ATP presentes em espermatozóides com diferentes potenciais mitocondriais membranares, numa tentativa de perceber de que modo é que estes níveis se relacionam com a qualidade espermática. Como foi referido, o ATP presente nestas células pode ainda estar a influenciar a mobilidade dos espermatozóides, pelo que a quantificação desta molécula energética foi também realizada em subpopulações separadas pelo método de *swim-up*.



Neste estudo procurou ainda fazer-se a separação e caracterização de subpopulações de espermatozóides com base no cromossoma sexual de que são portadores, sem que para isso fosse necessário o recurso à excitação de fluoróforos por UV, não só por causa dos danos que esta excitação pode causar no ADN, mas também devido a questões técnicas, na medida em que o citómetro utilizado não possui laser UV.

Capítulo II

MATERIAIS E MÉTODOS



Materiais e Reagentes

Todos os reagentes e compostos químicos usados neste estudo foram adquiridos através da Sigma (St. Louis, EUA), salvo algumas exceções citadas ao longo do texto.

Material Biológico

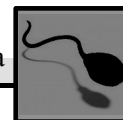
As amostras de sémen analisadas ao longo do trabalho foram provenientes de indivíduos que recorreram ao Serviço de Reprodução Humana dos Hospitais da Universidade de Coimbra (HUC) com vista no tratamento de diversas situações clínicas. As colheitas foram obtidas por masturbação, após um período de 3 a 5 dias de abstinência sexual, estando estas essencialmente destinadas à realização de TRA (como sejam a FIV ou ICSI), ou simplesmente a uma análise de rotina (espermograma).

Todos os indivíduos foram esclarecidos e, de livre vontade, deram o seu consentimento para a utilização com fins científicos do material biológico excedente, de acordo com as directrizes do quadro interno de revisão fornecido pelos HUC.

A separação dos espermatozóides do líquido seminal e restantes células foi feita através do tratamento prévio das amostras, preparadas por centrifugação em gradiente de densidade, utilizando os meios de separação de espermatozóides de acordo com o descrito pelo fabricante (Isolate; Irvine Scientific, Santa Ana, CA, USA). De seguida, os espermatozóides foram lavados e ressuspensos em meio de preparação de espermatozóides (SPM; Origio, Jyllinge, Dinamarca).

Número de Espermatozóides

A contagem dos espermatozóides foi feita utilizando uma câmara de Makler, de modo a determinar a concentração de cada uma das amostras analisada. Para facilitar a determinação do número de espermatozóides procedeu-se à imobilização dos mesmos



através do choque osmótico provocado pela água, na qual foram feitas as diluições das amostras antes de cada contagem.

Todos os valores apresentados representam o número de espermatozóides (em milhões) por mililitro.

Marcação de Espermatozóides para FACS

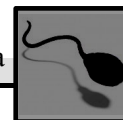
... com Base no Conteúdo em ADN

A separação de subpopulações de espermatozóides, considerando o seu conteúdo em ADN, foi feita com recurso a três sondas nucleares distintas. Contudo, apesar das diferenças existentes, estas sondas têm em comum o facto de ligarem quantitativamente ao ADN, onde residem então as variações que pretendemos explorar.

DRAQ5™

Derivado da antraquinona, o DRAQ5™ (BioStatus Limited, UK) foi recentemente introduzido como novo método de marcação e visualização do ADN e da cromatina. Altamente permeante, a utilização deste composto parece ser das mais indicadas no que respeita à marcação de células vivas quando comparado por exemplo ao H33342, na medida em que ao emitir na gama do *far-red* evita a exposição a UV. O facto de não interferir com a fluorescência da maioria dos marcadores utilizados é também apresentado por alguns autores como uma vantagem prática (Mari *et al.*, 2010).

Numa fase inicial, procedeu-se à determinação da concentração de DRAQ5™ (BioStatus Limited) menos tóxica para os espermatozóides, através da exposição dos mesmos a várias concentrações de sonda durante diferentes períodos de tempo. Deste modo, foram testadas neste ensaio seis concentrações (5, 10, 15, 20 e 50µM), tendo sido verificada a viabilidade das células ao fim de cinco minutos



(tempo de incubação com a sonda) e uma hora, visto tratar-se da duração provável para cada separação.

Posto isto, e uma vez estabelecido o valor a partir do qual a viabilidade celular parece ficar comprometida, foram testadas também diferentes concentrações para FACS, com vista na obtenção de uma separação mais eficaz.

A marcação dos espermatozóides com DRAQ5™ foi feita através da incubação directa das células com a sonda, de acordo com o seguinte protocolo:

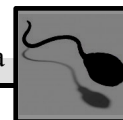
Marcação de Espermatozóides com DRAQ5™ para FACS

- Preparação de uma suspensão celular contendo 20×10^6 espermatozóides (spz)/ml em meio SPM;
- Adição directa do DRAQ5™ à suspensão celular a partir de um stock com concentração de 5mM. As concentrações utilizadas neste trabalho para marcação das amostras foram de 5 e 10 μ M num volume final de 1500 μ l;
- Agitação ligeira da suspensão celular e conseqüente incubação durante 5 min. à temperatura ambiente e no escuro.

Nota: Uma vez que não é necessário recorrer a nenhuma lavagem, o DRAQ5™ é normalmente o último passo de coloração, mesmo nos casos em que seja necessário aplicar algum tratamento adicional às células.

Vybrant® DyeCycle™ Violeta

O DyeCycle™ Violeta (DCV; Molecular Probes) é um fluorocromo convenientemente utilizado na análise do conteúdo de ADN na medida em que, ao contrário do H33342, não requer excitação por UV, podendo ser excitado com lasers violeta. A par com o DRAQ5®, este marcador representa uma importante ferramenta em estudos de ciclo celular, visto tratar-se de uma sonda selectiva para o ADN que permeia a membrana celular e emite um sinal fluorescente proporcional à massa de ADN, após a sua ligação ao mesmo.



Neste caso, a marcação das células foi feita de acordo com o seguinte protocolo:

Marcação de Espermatozóides com Vybrant® DyeCycle™ Violeta para FACS

- Preparação de uma suspensão celular contendo 20×10^6 spz/ml em meio SPM;
- Adição directa do DyeCycle™ Violeta à suspensão celular a partir de um stock com concentração de 5mM. A concentração utilizada neste trabalho para marcação das amostras foi de $5 \mu\text{M}$ num volume final de $1500 \mu\text{l}$;
- Agitação ligeira da suspensão celular e consequente incubação durante 30 min. a 37° no escuro.

Hoechst 33342

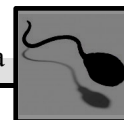
Por fim, a última sonda testada para a separação de subpopulações com base no conteúdo de ADN foi o H33342 (Molecular Probes) que, como já foi referido, é talvez o biomarcador de ADN mais utilizado para este fim.

O protocolo usado nesta marcação apresenta apenas ligeiras diferenças relativamente às sondas anteriores, sendo que neste caso experimentou-se também a marcação combinada de H33342 e IP (Molecular Probes).

Marcação de Espermatozóides com Hoechst 33342 para FACS

- Preparação de uma suspensão celular contendo 20×10^6 spz/ml em meio SPM;
- Preparação de um stock secundário a partir de um stock primário com 16,2mM;
- Adição do H33342 à suspensão celular a partir do stock secundário com concentração de $900 \mu\text{M}$. A concentração utilizada neste trabalho para marcação das amostras foi de $9 \mu\text{M}$ num volume final de $1500 \mu\text{l}$;
- Agitação ligeira da suspensão celular e consequente incubação durante 45 min. a 37° no escuro.

Nota: No ensaio em que foi utilizado o IP, as células foram expostas a uma concentração final de 240nM do composto. A incubação ocorreu durante 20 min. a 37° no escuro.



FACS

Feitas as marcações mencionadas, as diferentes amostras foram separadas utilizando um citómetro de fluxo acoplado a um sistema de *cell sorting* (BD FACSAria III; BD Biosciences, NJ, USA). Para cada separação, foram obtidas cerca de um milhão de células por população, sendo que foi utilizada a menor pressão disponível, de forma a preservar a viabilidade celular. Ao aumentar o tamanho do feixe vamos diminuir a velocidade e a pressão a que as células ficam sujeitas.

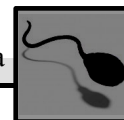
Na escolha dos lasers tivemos em consideração os comprimentos de onda de excitação de cada uma das sondas utilizadas, sendo que no caso do H33342 houve alteração do protocolo original, na medida em que não foi possível aceder a um sistema com laser UV. Assim, foi utilizado o laser violeta para excitação desta sonda.

Confirmação da Separação

Após marcação e consequente separação dos espermatozóides, procurou encontrar-se um meio que permitisse uma identificação eficaz do tipo de células obtidas em cada separação, ou seja, confirmar se as subpopulações separadas eram de facto compostas maioritariamente por espermatozóides portadores de um cromossoma X ou por espermatozóides portadores de um cromossoma Y. Posto isto, para confirmar a separação foi utilizado o método de FISH, consensualmente aceite para este propósito, bem como o método de coloração com Mostarda de Quinacrina, descrito por alguns autores como possível meio de distinção entre os cromossomas sexuais (Barlow & Vosa, 1970; Ericsson, R. J. *et al.*, 1973; Roberts, A. M. & Goodall, H., 1976).

Mostarda de Quinacrina

Nos anos 70, a coloração dos cromossomas com Mostarda de Quinacrina era frequentemente usada, estando descrito na literatura que a região distal do braço longo

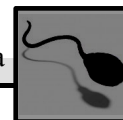


do cromossoma Y de células humanas em metáfase apresenta uma zona cuja fluorescência é mais intensa quando comparada aos outros cromossomas. Barlow e Vosa avançam ainda que esta propriedade está também presente nos espermatozóides humanos maduros (Barlow & Vosa, 1970). À região referida dá-se o nome de *F-body*.

Numa tentativa de reproduzir semelhante observação, procurámos testar este tipo de método uma vez que, comparativamente à técnica de FISH, o protocolo de coloração com a Mostarda de Quinacrina apresentaria vantagens técnicas e económicas. Deste modo, testámos o protocolo descrito por Barlow e Vosa em 1970. Este método consiste na marcação das lâminas (após preparação prévia de esfregaços contendo espermatozóides) com uma solução de Mostarda de Quinacrina (0.005%) dissolvida em água. As lâminas permaneceram nesta solução durante 20 minutos dentro de uma jarra de Coplin, para posteriormente serem observadas ao microscópio de fluorescência. O outro protocolo testado está descrito por Check e colaboradores, e consiste na marcação dos espermatozóides com uma solução 0.1% de Mostarda de Quinacrina dissolvida em água. Neste caso, a amostra e a solução foram misturadas numa lâmina com vista na obtenção de um esfregaço celular. Após montagem desta preparação, as lâminas foram igualmente observadas ao microscópio de fluorescência (Check *et al.*, 2000). No entanto, e tanto quanto pudemos observar com as condições utilizadas, não é possível identificar nenhuma estrutura que permita fazer a referida distinção entre os diferentes tipos de cromossomas (Figura 8).

FISH

O estudo citogenético de gâmetas humanos é um desafio, principalmente devido à alta condensação da cromatina presente na cabeça dos espermatozóides. Deste modo,



estão descritos vários protocolos que visam a descondensação prévia destas células, com intuito de melhorar a hibridização das sondas que vão ser utilizadas.

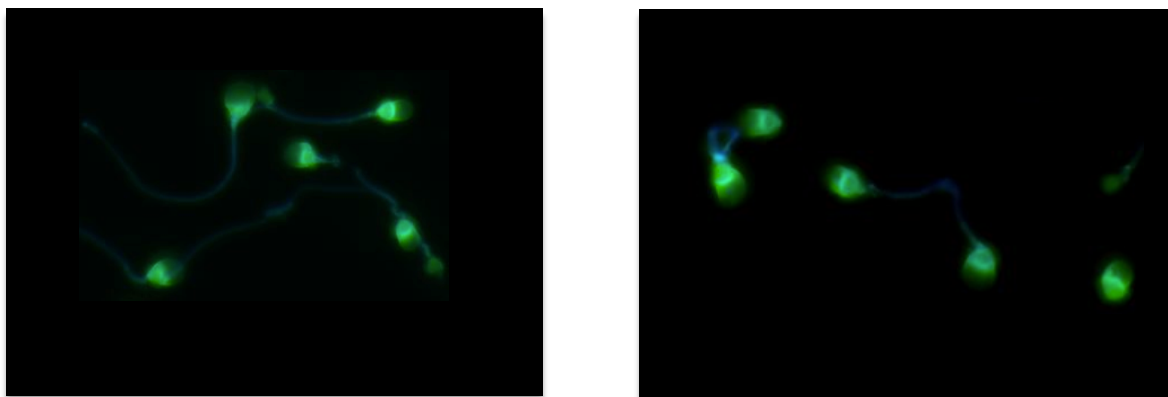
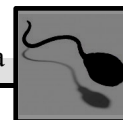


Figura 8 – Observação de espermatozóides marcados com Mostarda de Quinacrina ao microscópio de fluorescência.

Existe actualmente uma grande variedade de sondas, adquiridas comercialmente consoante o tipo de estudo em causa. As sondas podem ter maior ou menor especificidade em detectar determinadas regiões estruturais dos cromossomas (como é o caso das regiões α -satélite próximas dos centrómeros), detectar e definir translações, assim como deleções ou duplicações em genes específicos, podendo ter também uma relevância extrema na identificação de cromossomas (Barch *et al.*, 1997).

Uma vez que procurámos fazer não só a identificação do cromossoma sexual presente nos diferentes espermatozóides, mas também determinar qual a sua localização na cabeça dos mesmos, foi utilizado o protocolo descrito por Teresa Almeida Santos e colaboradores (Almeida-Santos *et al.*, 2002). Este protocolo prima pela possibilidade de haver hibridização sem comprometer a morfologia das células, facilitando assim a observação da região onde os cromossomas se encontram. Contudo, esta conservação da morfologia dos espermatozóides conduz a um elevado número de espermatozóides sem marcação, o que podia influenciar os resultados obtidos nas contagens. Daqui surgiu a necessidade de otimizar um protocolo de descondensação complementar.



Na figura 9 são apresentadas as imagens relativas aos diferentes tipos de descondensação testados.

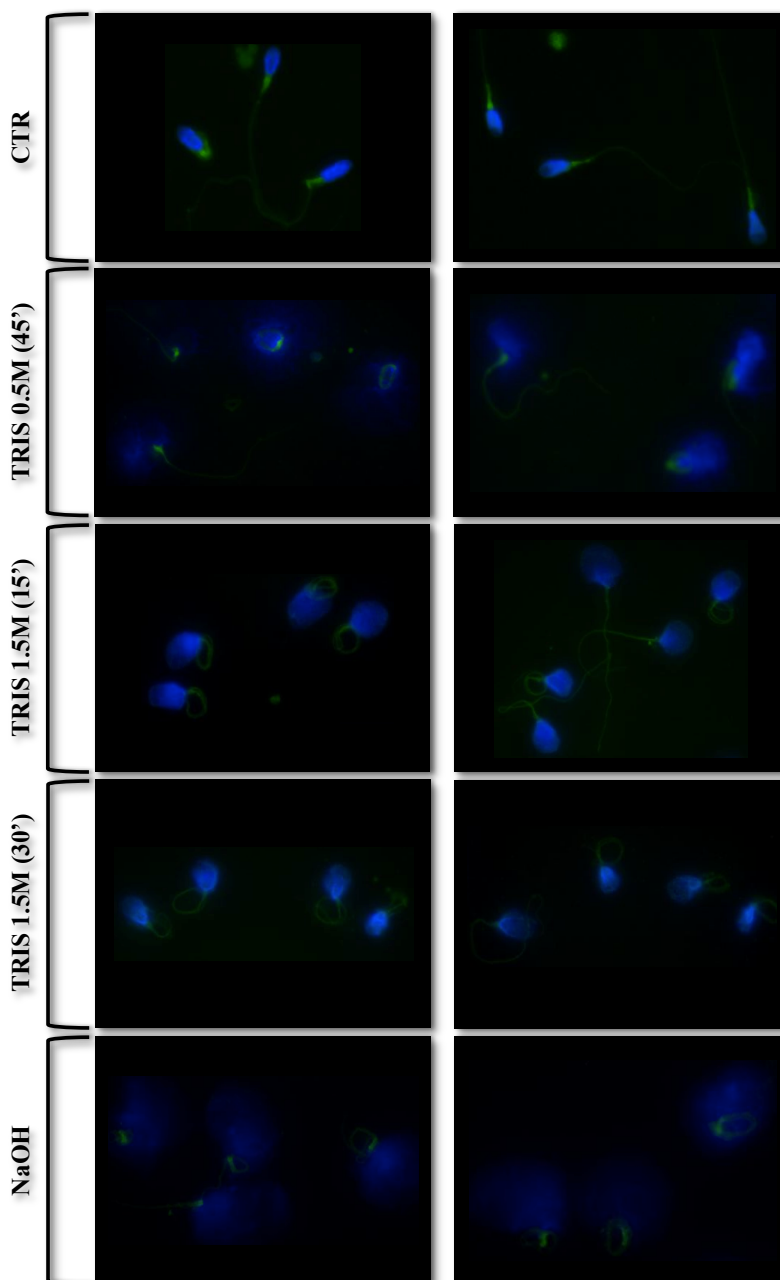
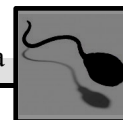


Figura 9 – Observação de espermatozóides ao microscópio de fluorescência sujeitos a diferentes protocolos de descondensação nuclear.

Dos vários protocolos descritos para descondensar o núcleo das células, foram testados quatro métodos distintos, que diferem ora na solução usada, ora no tempo de exposição à mesma (Chantot-Bastarud *et al.*, 2007; Blanco *et al.*, 1996;



Machev *et al.*, 2005; Martini *et al.*, 1995; Zeyneloglu *et al.*, 2000). Foi então observado que, para as soluções de TRIS testadas, a concentração de 1.5M leva a uma descondensação das células, no entanto essa descondensação não é ideal (aos 15 minutos), na medida em que há apenas uma ligeira expansão do núcleo. O aumento do tempo de exposição à solução (30 minutos) também não veio solucionar o problema, uma vez que pareceu haver uma desidratação das células, que não só não expandem o núcleo como parecem danificadas após esse tempo. A terceira solução usada (TRIS 0.5M durante 45 minutos) mostra por seu turno uma descondensação excessiva da cabeça dos espermatozóides, o que nos levou a optar pela solução de NaOH. A exposição das lâminas a esta solução revelou ser eficaz na obtenção de núcleos perfeitamente descondensados em apenas 5 minutos. Assim a selecção do método a usar foi feita com base no protocolo mais simples e que mostrou mais tarde, já na presença das sondas de FISH, não comprometer o resultado final da marcação.

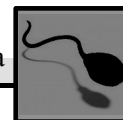
O protocolo de FISH utilizado para confirmar a eficácia da separação de subpopulações de espermatozóides, consoante o conteúdo em ADN, foi:

Hibridização Fluorescente *in situ*

- Preparação de um esfregaço com as células obtidas na separação;
- Coloração das lâminas através do método tipo Diff-Quik® (Dade Behring Inc., Newark, USA) descrito em Sousa *et al.*, 2009;

Nota: A coloração tipo Diff-Quik® foi utilizada para comprovar a existência de espermatozóides no esfregaço, sendo que neste passo é possível armazenar as lâminas a -20°C até realização do FISH.

- Descondensação dos espermatozóides durante 5' numa solução de NaOH;
- Descoloração das lâminas com metanol (100%) durante 10'';



- Desidratação da amostra com etanol em concentrações crescentes (70, 80 e 100%) durante 2'';
- Adição da mistura de hibridização composta por água, tampão de hibridização e sondas CEP X e CEP Y (Vysis, Inc.);
- Revestimento da lâmina com a lamela e adição da cola;
- Codesnaturação do ADN a 90°C durante 10' usando um sistema *Hybrite* (Abbot Molecular, USA);
- Hibridização *overnight* a 42°C numa estufa;
- Remoção da cola e da lamela;
- Lavagem da lâmina numa solução salina 0,4x Citrato de Sódio (SSC) / 0,3% NP40 durante 90'' a 72°C no escuro;
- Lavagem da lâmina numa solução salina 0,2% SSC / 0,1% NP40 durante 10'' à temperatura ambiente no escuro;
- Adição de Antifade com DAPI (Vectashield; Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA).

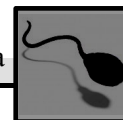
...com Base no Potencial de Membrana Mitocondrial

A determinação do potencial de membrana mitocondrial pode ser facilmente conseguida através do recurso a sondas catiónicas específicas, tais como carbocianina, rodamina e derivados da rosamina (Amaral & Ramalho-Santos, 2010).

Neste trabalho, a separação de subpopulações de espermatozóides considerando o PMM foi feita através da marcação das amostras com a sonda Mitotracker Green (MT-G; Molecular Probes, Eugene, Oregon, USA).

Mitotracker Green

O funcionamento do MT-G passa pela sua acumulação selectiva ao nível da matriz mitocondrial de acordo com o seu potencial, onde covalentemente liga a proteínas através da reacção com grupos tiol livres presentes em resíduos de cisteína. Desta marcação resultam então espermatozóides com diferentes PMM (marcados a verde) e espermatozóides sem potencial (não marcados).



Marcação de Espermatozóides com Mitotracker Green para FACS

- Preparação de uma suspensão celular contendo 20×10^6 spz/ml em meio SPM;
- Preparação de um stock secundário de MT-G a partir de um stock primário com 1mM;
- Adição do MT-G à suspensão celular a partir do stock secundário com concentração de $1 \mu\text{M}$. A concentração utilizadas neste trabalho para marcação das amostras foi de 20nM num volume final de $1500 \mu\text{l}$;
- Agitação ligeira da suspensão celular e incubação durante 15 min. a 37° no escuro.
- A separação em si foi feita de acordo com o descrito na página 36, secção FACS.

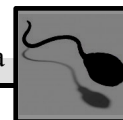
Separação de Espermatozóides com Base na Mobilidade

Com vista na obtenção de subpopulações de espermatozóides com mobilidade progressiva distinta, recorreu-se ao teste clássico de migração *swim-up*. Este teste baseia-se simplesmente no movimento activo dos espermatozóides através do meio utilizado no tratamento, permitindo deste modo a obtenção de uma elevada percentagem (>90%) de espermatozóides móveis e com morfologia normal na camada superior do meio (Jameel, 2008). Da aplicação deste método obtemos então duas subpopulações de espermatozóides, uma constituída por espermatozóides dotados de mobilidade progressiva (migrados) e outra constituída pelos espermatozóides menos móveis, sem capacidade de progressão (não migrados).

Viabilidade

Eosina-Nigrosina

A viabilidade celular foi testada através de um teste de coloração de espermatozóides, o teste de exclusão de Eosina (Bloom, 1950). Este teste consiste na coloração sequencial da amostra, primeiro numa solução de Eosina seguida pela exposição a uma solução de Nigrosina. A Eosina vai penetrar apenas nas células cuja membrana se encontre comprometida, enquanto que a Nigrosina funcionará somente



como contrastante, ou seja vai permitir a observação das células vivas que não foram coradas pela Eosina (WHO, 2010).

Coloração de Espermatozóides com Eosina-Nigrosina

- Adição de 10 μ l de Eosina 1% a 10 μ l de amostra numa lâmina;
- Adição de 10 μ l de Nigrosina 10% à mistura sensivelmente 30 segundos após a adição da Eosina;
- Preparação de um esfregaço cerca de 30 segundos após a adição da Nigrosina;
- Montagem das lâminas para conseqüente observação ao microscópio.

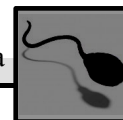
A análise das lâminas ao microscópio foi feita através da determinação do número de células coradas de vermelho (células mortas) e do número de células brancas (células vivas). No total foram contadas 200 células em cada lâmina e calculadas as respectivas percentagens de viabilidade.

ATP

O ATP presente nos espermatozóides foi quantificado pelo método da Luciferase (Long & Guthrie, 2006; Torres-Flores *et al.*, 2011). Contudo, a utilização deste protocolo está descrita para células somáticas, pelo que foi necessário fazer a sua optimização para as células germinativas em estudo. Um dos passos essenciais nesta optimização foi a adição de um método eficaz para extração de ATP.

Extração do ATP

Apesar do kit utilizado na quantificação de ATP possuir um reagente de lise celular, este é dirigido apenas para células somáticas e, do que nos foi possível observar, não estava a ser eficaz nas células germinativas utilizadas. Deste modo, foi necessário recorrer a um protocolo de extração adicional, de modo a aceder ao ATP existente no interior das células.



Extração do ATP de Espermatozóides com Ácido Perclórico

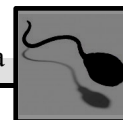
- Lavagem da suspensão de espermatozóides em 200µl de um meio composto por uma solução tampão salina de fosfato (PBS), glucose e 3g/L de albumina sérica bovina (BSA);
- Centrifugação durante 5' a 2000 rpm;
- Adição de 200µl de PBS-Glu-BSA;
- Agitação durante 10'' num vórtex;
- Adição de 200µl de Ácido Perclórico 0.6M + EDTA-Na 25mM em gelo;
- Nota: A partir daqui usar sempre gelo!
- Agitação durante 10'' num vórtex;
- Centrifugação durante 2' a 4° e 14000 rpm;
- Neutralização do sobrenadante com KOH 3M + Tris 1.5M até pH=7.8;
- Centrifugação durante 2' a 4° e 14000 rpm;
- Armazenamento do sobrenadante a -80° (anotar o volume final).

Quantificação de ATP pelo Método da Luciferase

A luciferase tem como substrato um ácido carboxílico complexo, denominado luciferina. Como enzima bifuncional que é, a luciferase vai numa primeira fase actuar como adenil-transferase, ao adenilar a luciferina a partir de ATP e com libertação de pirofosfato. Numa segunda reacção actuará como oxigenase, havendo produção de oxiluciferina, AMP e dióxido de carbono. Esta última reacção é ainda acompanhada pela emissão de luz. Assim, se considerarmos o ATP no meio limitante, podemos dizer que a emissão de luz vai ser proporcional à quantidade de ATP existente em solução.

Quantificação do ATP em Espermatozóides

- Adição num *ependorf* de 100µl do 1x Somatic Cell ATP Releasing Reagent (reagente de lise), 50µl de água ultrapura e, já em gelo, 50µl da amostra a analisar;
- Paralelamente deve correr-se um padrão interno:
- Adição num *ependorf* de 100µl do reagente de lise, 50µl do ATP Standard (diluído convenientemente) e, também em gelo, 50µl da amostra em análise;



Nota: Para um melhor resultado, a quantidade de ATP adicionada com o Standard deve conter aproximadamente a mesma quantidade de ATP medida na amostra.

- Adição de 100µl da WS A (ATP Assay Mix Working Solution) a cada um dos poços onde vai ser feita a leitura. Agitação ligeira, deixando 3' à temperatura ambiente.
- Adição de 100µl do eppendorf que contém a amostra a analisar ao respectivo poço da placa;
- Noutro poço da placa, adição do padrão interno seguida da leitura imediata da luz emitida usando um luminómetro.

A quantificação do ATP foi efectuada nas subpopulações de espermatozóides MitoTracker positivos/negativos e nos migrados/não migrados, sendo que a quantidade de ATP presente na amostra é apresentada em picamole (pmol) por milhão (10^6) de espermatozóides e foi calculada através da seguinte equação:

$$ATP_{(Sam)} = ATP_{(IS)} \times L_{(Sam)} / L_{(Sam+IS)} - L_{(Sam)}$$

$ATP_{(Sam)}$ - Quantidade de ATP na amostra (em moles);

$ATP_{(IS)}$ - Quantidade de ATP adicionado como padrão interno (em moles);

$L_{(Sam)}$ - Luz emitida pela amostra;

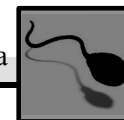
$L_{(Sam+IS)}$ - Luz emitida pela amostra mais o padrão interno.

Análise Estatística

A análise estatística dos dados foi efectuada com recurso ao software IBM SPSS® 20 (Chicago, Il.). A normalidade dos dados foi avaliada através do teste *Kolmogorov-Smirnov*. Nos casos em que comparámos os níveis de ATP entre espermatozóides com diferentes PMM recorreu-se ao teste t para amostras independentes, de forma a testar a igualdade entre médias. A ANOVA de uma via foi usada para comparar os níveis de ATP entre subpopulações separadas com base na mobilidade. Todos os dados obtidos apresentam homogeneidade de variâncias. Os resultados estão expressos como médias \pm desvio padrão, sendo que a relevância estatística foi considerada quando $p < 0.05$.

Capítulo III

RESULTADOS



Separação de Espermatozóides...

A separação de diferentes subpopulações celulares permitiu-nos a análise de diversas características presentes nos espermatozóides humanos. Como já vimos, existe uma grande heterogeneidade celular entre espermatozóides de um mesmo indivíduo, heterogeneidade essa que foi explorada ao longo deste trabalho de investigação.

...com Base no Conteúdo em ADN

Antes de qualquer tipo de separação, numa população de espermatozóides provenientes de uma espermatogénese típica, é de esperar que a percentagem de células portadores de um cromossoma X seja semelhante à percentagem de células portadores de um cromossoma Y. Para comprovar tal facto, foi efectuada a confirmação desta proporção utilizando a técnica de FISH.

As contagens efectuadas foram feitas com recurso a microscopia de fluorescência e revelaram a presença de 48% de espermatozóides portadores de um cromossoma X contra 52% de espermatozóides portadores de um cromossoma Y (Figura 10).

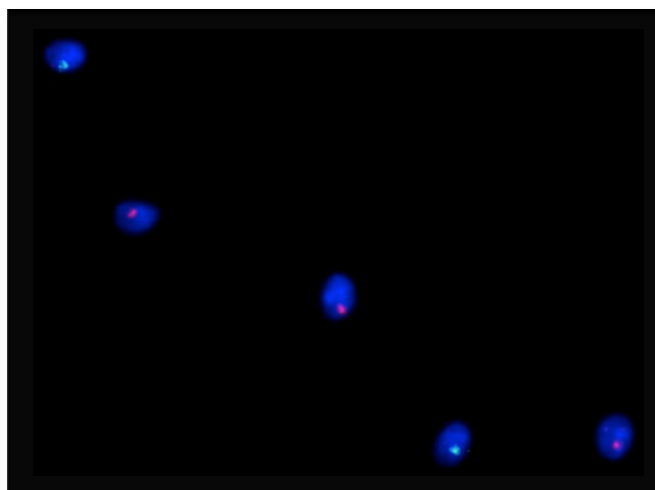
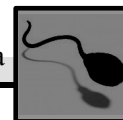


Figura 10 – Hibridização fluorescente *in situ* realizada em espermatozóides humanos ($n=1$) com marcação para os cromossomas sexuais X (a vermelho) e Y (a verde). As contagens foram efectuadas com recurso a um microscópio de fluorescência, tendo sido contadas 200 células.



Posto isto, procedemos à marcação do ADN com as diferentes sondas nucleares (DRAQ5™, DyeCycle™ Violeta e Hoechst33342), de modo a testar a eficácia da separação de subpopulações enriquecidas ou em espermatozóides portadores de um cromossoma X, ou em espermatozóides portadores de um cromossoma Y.

DRAQ5

No que respeita ao DRAQ5, antes da separação propriamente dita, foram testadas várias concentrações do composto, de forma a determinar a concentração de sonda a partir da qual a viabilidade celular fica comprometida. Este passo foi necessário na medida em que não está descrito até à data o recurso a este derivado da antraquinona para marcação de espermatozóides, e consequentemente o seu efeito nesta células é ainda desconhecido.

Ensaio de Toxicidade

Apesar do tempo de incubação deste composto ser de apenas 5 minutos, a exposição dos espermatozóides ao DRAQ5 foi superior, na medida em que o processo de separação é relativamente moroso. Deste modo, optámos também por testar o efeito da sonda 1 hora após a incubação. Como vemos no gráfico da figura 11, a viabilidade celular parece não estar a ser afectada ao fim de 5 minutos, independentemente da concentração usada. No entanto, após 1 hora de exposição a toxicidade do composto já é notória, nomeadamente para concentrações superiores a 15 μM .

Após a análise dos resultados obtidos (Figura 11), foram escolhidas duas concentrações de DRAQ5 (5 e 10 μM) para marcação das células. Feita esta selecção as células foram marcadas e separadas por FACS.

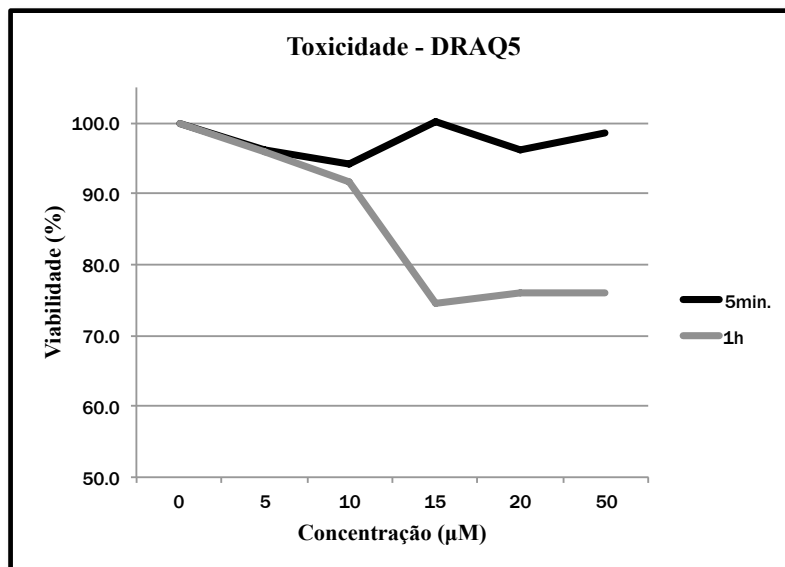
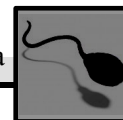


Figura 11 – Avaliação do efeito de diferentes concentrações de DRAQ5 na viabilidade dos espermatozóides após 5 minutos (n=2) e 1 hora (n=3) de exposição ao composto. A determinação do número de células vivas, bem como do número de células mortas, foi conseguida com recurso ao teste de exclusão da Eosina, tendo sido contadas 200 células por lâmina.

A separação das duas subpopulações de interesse foi conseguida começando por selecionar a nossa população total de espermatozóides, consoante a complexidade e o tamanho das células já definidos em estudos anteriores (Varum *et al.*, 2007). Esta selecção está representada nos *dot plots* da figura 12 (à esquerda). De seguida, num segundo *dot plot*, onde temos apenas a nossa população de espermatozóides, seleccionámos apenas a população positiva para o marcador utilizado (*dot plots* centrais da figura). Finalmente, criámos um terceiro *dot plot*, onde temos apresentada a intensidade de fluorescência das células (figura 12, à direita). Neste *dot plot* definimos duas áreas a partir das quais foi feita a separação. Por um lado, à direita teremos os espermatozóides com maior intensidade de fluorescência (logo, teoricamente, com maior conteúdo em ADN - B) e por outro lado, à esquerda teremos os espermatozóides com menor conteúdo em ADN (que se reflete numa intensidade de fluorescência inferior - A).

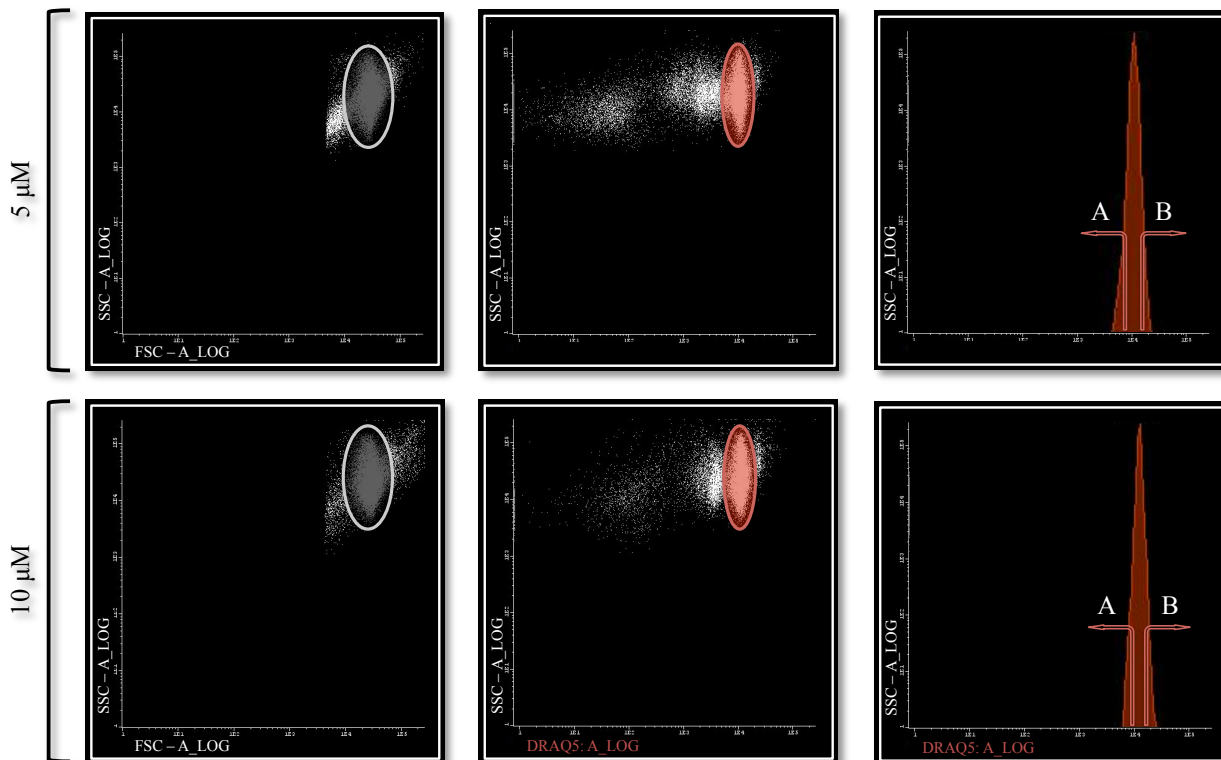
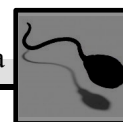


Figura 12 – Representação do processo de separação de espermatozóides marcados com a sonda DRAQ5, excitada com um comprimento de onda de 488nm. Foram testadas as concentrações de 5 (em cima) e 10 μ M (em baixo).

Vybrant DyeCycle®

As subpopulações de espermatozóides marcados com a sonda DCV foram separadas seguindo os mesmos passos referidos para o DRAQ5 (Figura 13). Contudo, neste caso a excitação foi feita com recurso ao laser violeta.

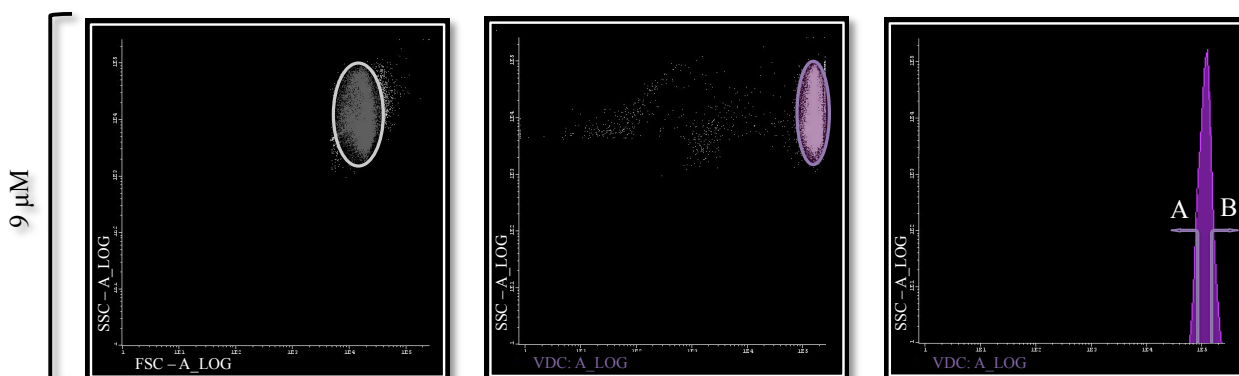
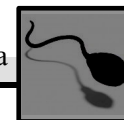


Figura 13 – Representação do processo de separação de espermatozóides marcados com a sonda DCV, excitada com um comprimento de onda de 407nm. A concentração de sonda utilizada foi de 9 μ M.

*Hoechst 33342*

A última sonda testada, aquela que está descrita como sendo a mais utilizada no processo de seleção dos cromossomas sexuais, foi o H33342. No entanto, no nosso caso a excitação do marcador foi feita com recurso ao laser violeta, e não UV como é habitual. A esta alteração está claramente associada a vantagem de evitar o potencial mutagénico dos UV a que as células ficam sujeitas durante o processo de separação.

Todos os passos do processo de separação foram já descritos para as sondas anteriores.

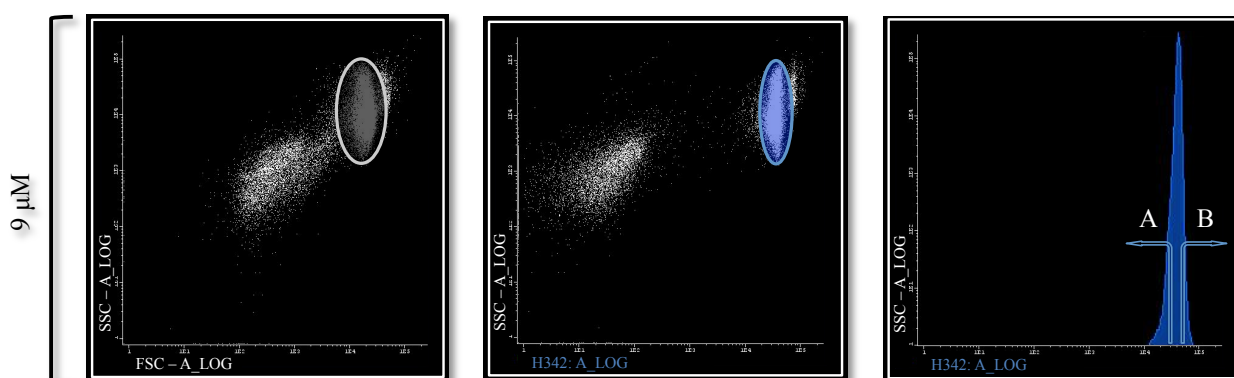
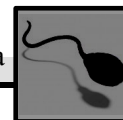


Figura 14 – Representação do processo de separação de espermatozóides marcados com a sonda H33342, excitada com um comprimento de onda de 407nm. A concentração de sonda utilizada foi de 9 μ M.

Eliminação de Células Mortas (IP)

Considerando que, o critério de separação até este ponto tem sido o conteúdo em ADN presente nas células, conteúdo esse que é deduzido com base na intensidade de fluorescência emitida, é de esperar que qualquer alteração ao nível do sinal transmitido pela célula durante a interrogação possa estar a interferir com a eficácia da separação. Deste modo, com vista na minimização do problema, procurámos excluir da equação as células mortas presentes na nossa população inicial (através da marcação combinada de H33342 e IP).



O processo de selecção destas populações foi em tudo semelhante ao descrito anteriormente, variando apenas no passo de exclusão das células positivas para IP (Figura 15). O IP, tal como muitos marcadores de viabilidade, penetra apenas nas células cuja membrana se encontra comprometida, razão pela qual seleccionámos as células negativas para IP antes da separação (*dot plot* superior direito da figura). Note-se que em nenhum dos casos obtivemos duas subpopulações distintas separadas com base no conteúdo em ADN.

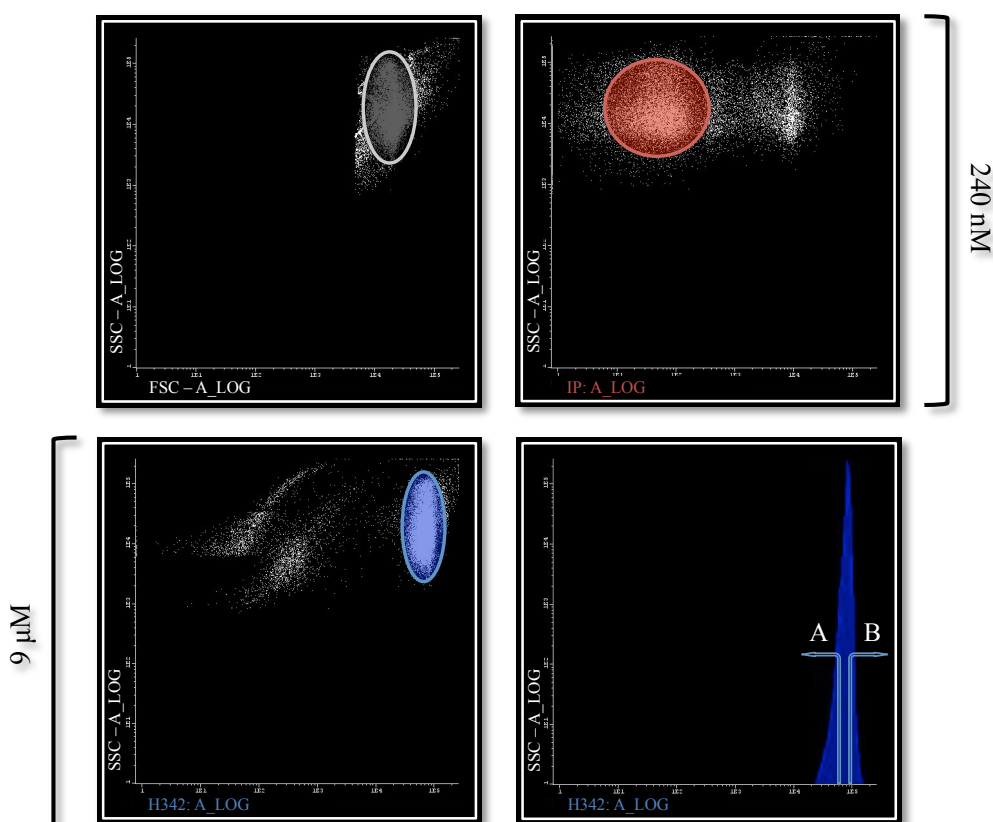


Figura 15 – Representação do processo de separação de espermatozóides após marcação combinada das sonda H33342 (9 μ M) e IP (240nM).

Confirmação da Separação

FISH

Todas as subpopulações obtidas após *cell sorting* foram utilizadas para FISH, de forma a confirmar a eficácia da separação (Figura 16).

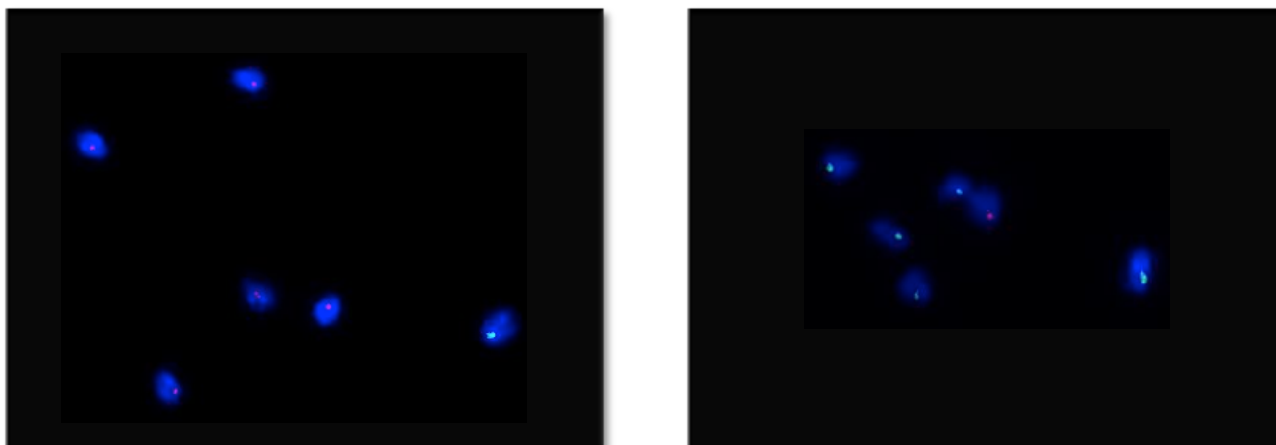
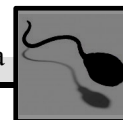
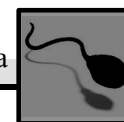


Figura 16 – Hibridização fluorescente *in situ* realizada em espermatozóides humanos com marcação para os cromossomas sexuais X (a vermelho) e Y (a verde). À esquerda está representada uma subpopulação enriquecida com espermatozóides portadores de um cromossoma X e, à direita, uma subpopulação enriquecida em espermatozóides portadores de um cromossoma Y. As contagens foram efectuadas com recurso a um microscópio de fluorescência, tendo sido contadas 200 células por lâmina.

Na Tabela I são apresentadas as percentagens de espermatozóides que compõem cada uma das subpopulações pretendidas, ou seja, na coluna relativa à subpopulação enriquecida com espermatozóides portadores de um cromossoma X obtivemos 67% de espermatozóides realmente portadores de um cromossoma X, contra 33% de espermatozóides portadores de um cromossoma Y, no que respeita a marcação com o DyeCycle™ Violeta por exemplo. A mesma leitura deve ser feita para a coluna relativa à subpopulação enriquecida com espermatozóides portadores de um cromossoma Y.

Feita a análise, podemos ver que o DRAQ5 não está a permitir a separação destas subpopulações para nenhuma das concentrações testadas, ainda que aparente ser mais eficaz no que respeita às subpopulações enriquecidas com espermatozóides portadores de um cromossoma Y.

Por outro lado, tanto o DCV como o H33342 parecem estar a permitir um maior enriquecimento de subpopulações com espermatozóides portadores de um cromossoma X, o que já não se verifica para o outro cromossoma sexual. A adição de IP à separação



induz um ligeiro aumento da eficácia de separação, contudo não atinge níveis satisfatórios.

Tabela I – Eficácia de separação de subpopulações enriquecidas com espermatozóides portadores dos diferentes cromossomas sexuais. As contagens foram efectuadas com recurso a um microscópio de fluorescência, tendo sido contadas 200 células por lâmina.

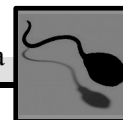
Marcador	[μ M]	Subpopulação enriquecida em espermatozóides portadores de um cromossoma X (%)	Subpopulação enriquecida em espermatozóides portadores de um cromossoma Y (%)
DRAQ5	5	50	59
	10	53	59
DCV	9	67	55
H33342	9	63	57
	9*	67	56

*Marcação combinada de H33342 e IP.

Do que pudemos observar, ainda que tenha havido um enriquecimento de algumas populações, no que respeita à percentagem de espermatozóides portadores de um cromossoma X ou portadores de um cromossoma Y, este enriquecimento não foi satisfatório no geral. Consequentemente, decidimos não prosseguir para a caracterização de espermatozóides portadores de diferentes cromossomas sexuais, na medida em que a presença de espermatozóides com um cromossoma Y na subpopulação X ainda era considerável, tal como o inverso.

Localização da marcação

Paralelamente, e durante a determinação do cromossoma sexual de que os espermatozóides eram portadores, procurámos também definir a região onde se encontrava essa marcação. Considerámos por isso três regiões distintas na cabeça dos espermatozóides, consoante a marcação ocorresse na zona anterior, equatorial ou



posterior da célula. A cauda dos espermatozóides foi utilizada como ponto de referência para identificar as regiões posterior e anterior da célula (Figura 17).

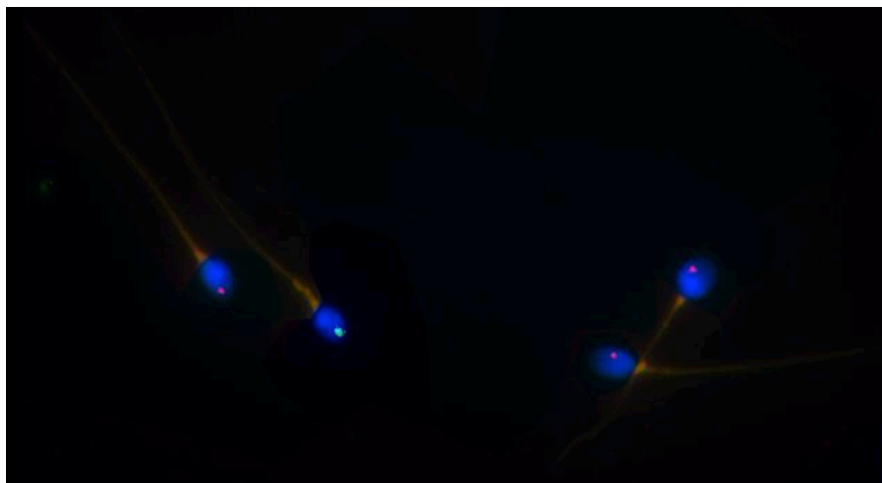
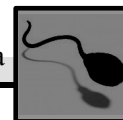


Figura 17 – Hibridização fluorescente *in situ* realizada em espermatozóides humanos com marcação para os cromossomas sexuais X (a vermelho) e Y (a verde). A imagem foi obtida de uma subpopulação enriquecida em espermatozóides portadores de um cromossoma X.

Na tabela II encontram-se as percentagens relativas à posição ocupada pelos cromossomas sexuais na cabeça dos espermatozóides. A análise da localização da marcação dos cromossomas X e Y permitiu-nos determinar que, na sua maioria, os cromossomas sexuais ocupam a região mais anterior da célula, parecendo não haver diferenças entre as restantes regiões.

Tabela II – Posição da marcação dos cromossomas sexuais (X,Y) efectuada em espermatozóides humanos. As contagens foram efectuadas com recurso a um microscópio de fluorescência, tendo sido contadas 200 células por lâmina.

Localização da Marcação	Cromossoma X (%)	Cromossoma Y (%)
Anterior	60	52
Equatorial	20	28
Posterior	20	20



...com Base no Potencial de Membrana Mitocondrial

A separação de espermatozóides considerando o seu PMM foi feita seguindo os mesmos moldes descritos anteriormente para a separação com base no conteúdo em ADN. Os espermatozóides foram selecionados no *dot plot* tamanho vs complexidade e a partir daqui foi utilizado o histograma que mede a intensidade de fluorescência das células (Figura 18), para separar as subpopulações como descrito anteriormente pelo nosso grupo (Sousa *et al.*, 2011).

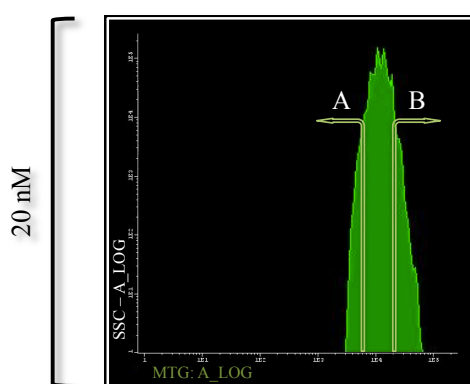
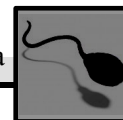


Figura 18 – Representação do processo de separação de espermatozóides marcados com a sonda MT-G. A concentração de sonda utilizada foi de 20 nM.

Quantificação de ATP

A quantificação de ATP presente nas diferentes subpopulações separadas foi feita através do ensaio da Luciferase, e revelou não existirem diferenças estatisticamente significativas entre as subpopulações MitoTracker positiva e MitoTracker negativa, tanto para as amostras provenientes de indivíduos normozoospermicos (Figura 19) como para as amostras provenientes de indivíduos astenozoospermicos (Figura 20).

Procurámos ainda comparar as subpopulações MitoTracker positivas de indivíduos normozoospermicos e astenozoospermicos, bem como comparar as suas subpopulações MitoTracker negativas. No entanto não foram igualmente encontradas diferenças estatísticas entre os resultados obtidos.



...com Base na Mobilidade

A separação de espermatozóides com base na mobilidade foi feita através do teste de migração *swim-up*. As diferentes fracções obtidas foram separadas em migrados e não migrados, sendo que no final voltaram a reunir-se estas duas fracções de forma a obter o total de células.

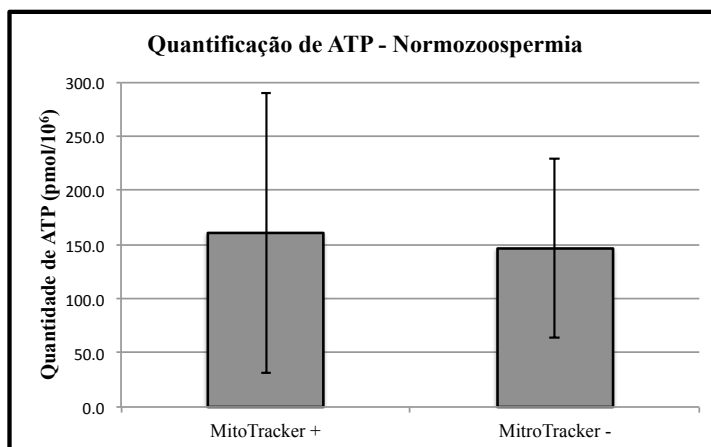


Figura 19 – Quantidade média de ATP (pmol/10⁶) presente em espermatozóides de indivíduos normozoospermicos separados com base no seu potencial de membrana mitocondrial. Cada subpopulação separada continha cerca de 1x10⁶ de espermatozóides. Os resultados representam a média ± desvio padrão dos níveis de ATP por milhão de células para cada amostra (n=11). Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas.

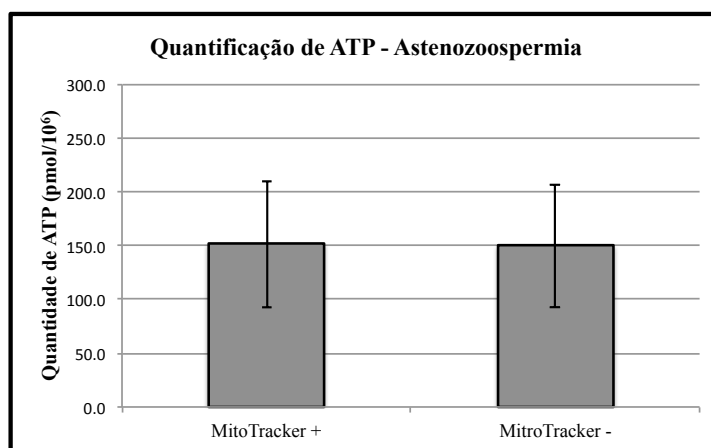
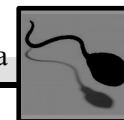


Figura 20 – Quantidade média de ATP (pmol/10⁶) presente em espermatozóides de indivíduos astenoospermicos separados com base no seu potencial de membrana mitocondrial. Cada subpopulação separada continha cerca de 1x10⁶ de espermatozóides. Os resultados representam a média ± desvio padrão dos níveis de ATP por milhão de células para cada amostra (n=7). Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas.



Quantificação de ATP

Também neste caso, a quantificação de ATP presente nas diferentes subpopulações separadas foi feita através do ensaio da Luciferase, e revelou não haver diferenças estatisticamente significativas entre os diferentes grupos analisados (Figura 21).

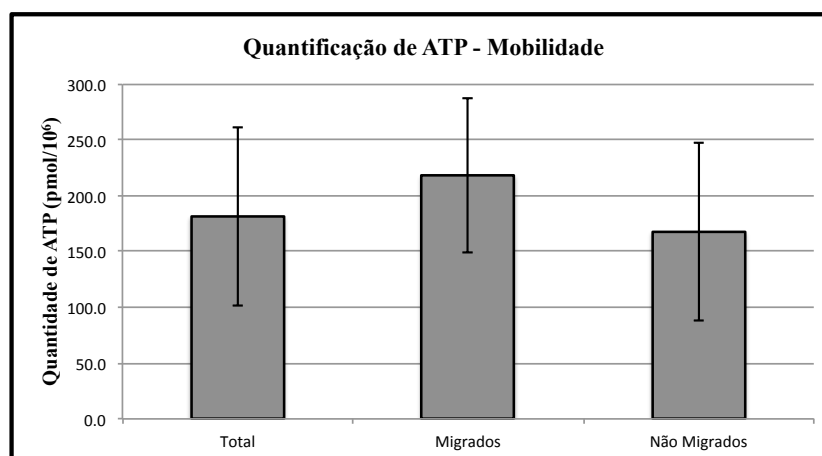
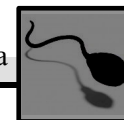


Figura 21 – Quantidade média de ATP (pmol/10⁶) presente em espermatozóides de indivíduos normozoospermicos separados com base na sua mobilidade. Os resultados representam a média \pm desvio padrão dos níveis de ATP por milhão de células para cada amostra (Total n=6; Migrados/Não Migrados n=8). Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas.

Capítulo IV

DISCUSSÃO



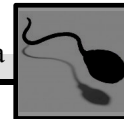
Separação de Espermatozóides...

Os resultados obtidos durante a elaboração deste projecto, mostram que de facto é possível obter diferentes subpopulações de espermatozóides com diferentes características. Parte daqui o nosso grande objectivo neste estudo, ao tentar identificar algumas das características que permitam a distinção dessas subpopulações, sempre com vista na selecção de uma subpopulação de espermatozóides mais funcionais.

... com base no Conteúdo em ADN

Como vimos, estão descritos vários estudos que recorrem à técnica de FACS com vista na obtenção de subpopulações enriquecidas em espermatozóides portadores de um cromossoma X ou Y (Bermejo-Álvarez *et al.*, 2008; O'Brien *et al.*, 2005; Penfold *et al.*, 1998; Vidal *et al.*, 1998). Esta prática é especialmente comum na conservação de espécies animais (Behr *et al.*, 2009; Parrilla *et al.*, 2003; Puglisi *et al.*, 2006), dado que a capacidade de controlar o sexo da descendência de espécies exóticas, em vias de extinção ou comercialmente relevantes tem um potencial que pode ser facilmente reconhecido. Dando um exemplo mais específico, nos últimos anos tem havido um certo desenvolvimento das técnicas de reprodução assistida para gato doméstico, na medida em que este mamífero é um óptimo modelo para o estudo de outros felinos exóticos de maior porte que se encontram actualmente em perigo (Garner & Seidel, 2003). A aplicação do método está também descrita para alguns mamíferos marinhos e certas espécies domésticas, nomeadamente bovinos, porcos, ovelhas e cavalos por exemplo (Catt *et al.*, 1996; Johnson, 1991; Johnson *et al.*, 1989; Lindsey *et al.*, 2002; Seidel *et al.*, 1999).

A eficiência da separação utilizando este método, está claramente dependente dos diferentes conteúdos em ADN das diversas espécies, sendo que essa eficiência será



tanto maior quanto maior for a diferença entre os cromossomas sexuais destes animais. Das espécies descritas até hoje, o homem encontra-se entre aquelas que apresentam menores diferenças (cerca de 2.8 a 3%) entre os cromossomas X e Y (Garner, 2009; Johnson *et al.*, 1993). Em parte, esta diferença diminuta entre conteúdos em ADN explica a baixa eficiência por nós obtida durante o processo de separação. Uma vez que o critério de distinção entre os espermatozóides reside na intensidade de fluorescência emitida por cada célula, qualquer factor que interfira com essa emissão interfere também com a separação.

Um dos primeiros problemas com que nos deparamos durante o processo de separação de espermatozóides ocorre aquando da passagem destas células através do laser. Efectivamente, a eficiência de detecção do ADN depende totalmente da orientação da cabeça do espermatozóide no momento da leitura, uma vez que estamos a falar de células relativamente ovais e cuja cromatina se encontra altamente condensada (Garner, 2001; Van Dilla *et al.*, 1977).

Vários esforços têm sido feitos com o intuito de minimizar o artefacto causado pela emissão diferencial de fluorescência a partir do limite lateral do espermatozóide quando comparado com a parte anterior do mesmo. Neste sentido, algumas soluções utilizadas passam pela substituição do *nozzle* e da agulha de injeção, que juntos tornam possível a correcta e quase uniforme orientação dos espermatozóides ao longo do fluxo (Garner, 2001; Garner, 2006; Rens *et al.*, 1998; Sharpe & Evans, 2009). Outras tentativas envolvem já o reposicionamento de certos detectores, bem como a substituição do laser usado para excitar o marcador escolhido. No entanto, e na impossibilidade de contornarmos estes factores, procurámos seguir outras abordagens, nomeadamente proceder à eliminação de células mortas através da marcação combinada dos espermatozóides com H33342 e IP. Considerando os dados da

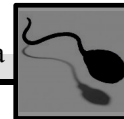
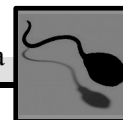


tabela I, vemos que há uma melhoria na eficiência de separação após a adição do composto, contudo não podemos dizer com certeza que esta tendência é significativa. Segundo a bibliografia consultada, a identificação das células mortas na análise leva a que só as células intactas sejam verdadeiramente separadas, aumentando assim a eficiência da nossa separação (Garner, 2006).

Durante o processo de separação, devemos ainda considerar a susceptibilidade relativa dos gâmetas à marcação com a sonda, à exposição ao laser, à elevada pressão a que se encontram sujeitos e, por fim mas não menos importante, considerar a sua resistência individual a certas alterações na composição do meio. O controlo da pressão a que o circuito se encontra sujeito permite também uma melhor ou pior eficiência, ou seja, uma maior pressão está associada a uma maior quantidade de danos no ADN, o que nos leva a crer que talvez o ideal seja fazer a separação utilizando a menor pressão possível. O único inconveniente deste procedimento é o facto da velocidade de separação não ser tão elevada, não contribuindo tanto para a correcta orientação dos espermatozóides (Austin & Bishop, 1957; Garner, 2006).

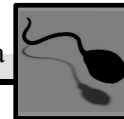
Fazendo uma avaliação global das sondas utilizadas podemos dizer que o DRAQ5 parece não ser uma boa solução em substituição do H33342. A ausência de efeito observada ao nível do enriquecimento das subpopulações separadas com este composto pode dever-se à concentração de composto usada, no entanto os ensaios de toxicidade efectuados demonstram que aumentando essa concentração há um elevado decréscimo da viabilidade celular. No caso do DCV parece haver já um enriquecimento notório no que respeita à subpopulação de espermatozóides portadores de um cromossoma X. Por fim, o H33342, a sonda actualmente mais utilizada na separação de espermatozóides consoante o cromossoma sexual de que são portadores, mostrou ter algumas semelhanças comparativamente ao DCV, principalmente quando combinado



com o IP. Estas duas sondas apresentam uma estrutura em tudo semelhante, sendo que variam um pouco no seu espectro de excitação.

A utilização do laser violeta, o que à partida podia ser menos tóxico para as células, mostrou ser menos eficiente na separação, uma vez que não se obteve a mesma eficiência descrita na literatura. Posto isto, seria de extrema importância efectuar um controlo positivo neste trabalho ao tentar aplicar o protocolo de separação com o H33342 tal como ele está descrito, pelo menos no que respeita ao uso do laser UV. Desta forma poderíamos verificar se de facto conseguíamos obter as percentagens descritas por outros autores. Nesse caso, e se as percentagens continuassem a não coincidir, poderíamos atribuir a baixa eficiência de separação a problemas físicos e mecânicos do sistema de separação.

Paralelamente à determinação do tipo de cromossoma sexual presente nos espermatozóides das diferentes subpopulações, foi avaliada a sua localização na cabeça dos mesmos. Do que pudemos constatar existe uma predominância de espermatozóides com marcação na região anterior da cabeça. Fica contudo por desvendar a existência de uma razão biológica para este facto. O estudo da questão do posicionamento dos cromossomas na cabeça dos espermatozóides já foi descrito tanto em marsupiais como em hamsters, e segundo os autores a posição dos cromossomas não ocorre ao acaso (Zalenskaya *et al.*, 2000; Zalenskaya & Zalensky, 2002). Em humanos, estava apenas descrito, até cerca de uma década atrás, que quer os telómeros quer os centrómeros dos cromossomas ocupavam uma posição na cabeça dos espermatozóides que não era aleatória. Um estudo publicado em 1999, por Luetjens e colaboradores, veio então mostrar que também o cromossoma X ocupa uma posição preferencial na região anterior da cabeça do espermatozóide (Luetjens *et al.*, 1999). Neste estudo procurou associar-se o posicionamento não aleatório de cromossomas a algumas anomalias ao

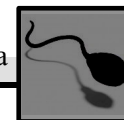


nível do cromossoma X após tratamento por ICSI. Do que foi descrito, parece que este posicionamento do cromossoma X pode estar na origem de algumas anomalias existentes na descendência proveniente desta técnica de reprodução assistida, na medida em que, ao estar na zona anterior, sofre uma descondensação mais lenta, podendo interferir com a primeira mitose do zigoto. Esta descondensação lenta deve-se por sua vez ao facto do núcleo do espermatozóide adjacente à teca perinuclear permanecer condensada até que todos os restos do acrossoma sejam removidos. É então este atraso na descondensação que pode levar a que haja assimetrias na segregação dos cromossomas aquando da primeira mitose (Luetjens *et al.*, 1999). Da nossa análise verificamos ainda que este posicionamento preferencial está também patente no cromossoma Y.

... com base no Potencial de Membrana Mitocondrial e Mobilidade

Existe actualmente uma forte polémica sobre o papel da molécula de ATP nos espermatozóides. Na verdade, sabe-se que a sua presença é essencial, pelo que vários estudos têm sido feitos de modo a tentar esclarecer qual a sua proveniência.

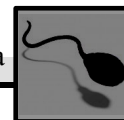
Uma das propriedades mais estudadas nos gâmetas masculinos relaciona-se precisamente com esta molécula energética, e de que modo é que os seu níveis na célula podem influenciar a fertilidade masculina. A propriedade de que estamos a falar é a mobilidade que, como sabemos, dita entre outros factores a possibilidade do espermatozóide atingir naturalmente o ovócito. O movimento efectuado pelos espermatozóides é no fundo resultado da propagação de ondas transversais ao longo do flagelo segundo o eixo próximo-distal. Durante este processo é produzido um impulso hidrodinâmico que conduz o espermatozóide através do tracto reprodutor feminino até à penetração no ovócito. O ATP funciona como molécula motora para o movimento



flagelar, gerando força (Paoli *et al.*, 2011). No entanto, fica por esclarecer qual a origem deste ATP utilizado. Será que é proveniente da respiração mitocondrial (através da fosforilação oxidativa) ou será resultado do processo glicolítico?

A escolha do método utilizado neste trabalho, para quantificação de ATP, foi feita com base no número de células por nós obtidas após FACS. Ainda que o HPLC permita uma medição mais precisa e completa no que respeita ao estado energético das células (uma vez que permite a quantificação não só de ATP, mas também ADP e AMP), o número de espermatozóides conseguidos em cada separação é extremamente baixo (cerca de um milhão por subpopulação), o que leva à ineficaz quantificação do ATP presente nas células. Deste modo, foi utilizado o método da Luciferase, que mostrou ser capaz de detectar quantidades de ATP em subpopuações com apenas alguns milhares de células. O ATP por nós quantificado nas subpopulações separadas com base no seu potencial de membrana mitocondrial suporta a teoria de que o espermatozóide não pode apenas depender da produção de ATP proveniente da respiração mitocondrial, visto que subpopulações com diferentes PMM têm níveis semelhantes de ATP, tendo de existir uma outra fonte de energia. Estudos realizados por outros grupos reforçam esta ideia, revelando a existência de actividade de enzimas glicolíticas, bem como de substratos glicosiláveis no plasma seminal de vários mamíferos, incluindo humanos (Nichol *et al.*, 1992; Pova *et al.*, 1986).

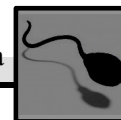
Por outro lado, alguns estudos sugerem uma correlação positiva entre a mobilidade dos espermatozóides e a actividade da cadeia respiratória, o que levaria a crer na existência de diferenças entre subpopulações de espermatozóides separadas consoante a sua mobilidade (Boryshpolets *et al.*, 2009; Ferramosca *et al.*, 2012; O'Bryan *et al.*, 1998; Ruiz-Pesini *et al.*, 2007). Contudo, apesar do ligeiro aumento dos níveis de ATP na subpopulação de espermatozóides migrados, as diferenças não são



significativas. Uma eventual causa para esta ausência de diferenças pode deve-se ao facto de na subpopulação de espermatozóides não migrados estarem outras células que não espermatozóides a contribuir para a produção de ATP, como leucócitos por exemplo. Um estudo interessante que poderia ser feito no seguimento deste trabalho era avaliar, dentro da subpopulação de migrados, o potencial de membrana mitocondrial e, depois disso fazer a quantificação de ATP. Paralelamente, a quantificação seria feita na subpopulação de espermatozóides não migrados (onde excluiríamos o problema da presença de outras células na análise). Na literatura, também no caso dos níveis de ATP quantificados em espermatozóides provenientes do ejaculado total e em espermatozóides migrados há discrepância, sendo que alguns estudos apoiam que de facto há diferenças entre eles (Ferramosca *et al.*, 2012; Vigue *et al.*, 1992). Uma das razões encontradas para explicar a discrepância de resultados obtidos pela comunidade científica pode ser o facto de haver diversas condições experimentais, bem como diferenças específicas para cada espécie (Ramalho-Santos *et al.*, 2009).

Capítulo V

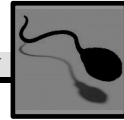
CONCLUSÕES



Através da elaboração deste trabalho podemos concluir que é relativamente fácil obter diferentes subpopulações de espermatozóides, na medida em que existe uma grande heterogeneidade de células num ejaculado. No entanto, no que respeita aos parâmetros avaliados não obtivemos diferenças estatisticamente significativas, não tendo sido por isso possível identificar nenhuma característica que permita a distinção de subpopulações para estudos posteriores de funcionalidade espermática.

As sondas de ADN testadas (DRAQ5™, DyeCycle™ Violeta e Hoechst33342) mostraram não ser apropriadas para a separação de subpopulações de espermatozóides consoante o cromossoma sexual de que são portadores, nas condições utilizadas. Neste ponto, seria de extrema importância poder recorrer ao laser UV para excitar o H33342, e confirmar as percentagens de separação descritas na literatura. A não obtenção desses valores permitiria apontar para eventuais problemas mecânicos e físicos durante a separação, como a orientação das células ao longo do feixe por exemplo.

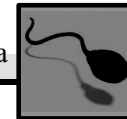
A crescente procura por técnicas de reprodução assistida tornou fundamental a existência de estudos mais aprofundados no que respeita a subpopulações de espermatozóides humanos, principalmente quando se recorre à ICSI. É certo que a injeção directa do espermatozóide no ovócito ultrapassa todas as barreiras naturais, diminuindo a possível exclusão natural de espermatozóides anómalos ou com danos no ADN. Desta forma, é necessário desenvolver novas técnicas que permitam a distinção mais detalhada dos espermatozóides, ou analisar mais aprofundadamente aquelas que estão actualmente implementadas. Um desses casos é o teste de migração, a partir do qual obtemos duas subpopulações de espermatozóides, uma constituída por espermatozóides dotados de mobilidade progressiva e outra fracção constituída por espermatozóides menos móveis. Do que pudemos determinar,



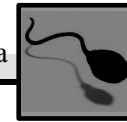
as quantidades de ATP entre estas duas subpopulações não apresentam diferenças significativas. Em adição, também as subpopulações de espermatozóides separadas com base no PMM apresentam quantidades de ATP semelhantes. Estes dados indicam que o conteúdo em ATP destas células não é exclusivamente dependente da actividade mitocondrial, havendo outras vias a contribuir para o fornecimento de energia para a célula.

Capítulo VI

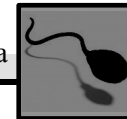
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS



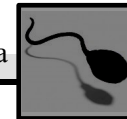
- Agarwal, A., Saleh, R. A. and Bedaiwy, M. A.** (2003) *Role of Reactive Oxygen Species in the Pathophysiology of Human Reproduction*. *Fertility and Sterility*, 79, 829-843.
- Aitken, R. J.** (1999) *The Amoroso Lecture - The Human Spermatozoon - A Cell in Crisis?* *Journal of Reproduction and Fertility*, 115, 1-7.
- Aitken, R. J., Buckingham, D. W., West, K. and Brindle, J.** (1996) *On the Use of Paramagnetic Beads and Ferrofluids to Assess and Eliminate the Leukocytic Contribution to Oxygen Radical Generation by Human Sperm Suspensions*. *American Journal of Reproductive Immunology*, 35, 541-551.
- Almeida Santos, T., Dias, C., Brito, R., Henriques, P. and Almeida Santos, A.** (2002) *Analysis of Human Spermatozoa by Fluorescence in situ Hybridization with Preservation of the Head Morphology is Possible by Avoiding a Decondensation Treatment*. *Journal of assisted reproduction and genetics*, 19, 291-294.
- Amaral, A. and Ramalho-Santos, J.** (2010) *Assessment of Mitochondrial Potential: Implications for the Correct Monitoring of Human Sperm Function*. *International Journal of Andrology*, 33, E180-E186.
- Armstrong, J. S., Rajasekaran, M., Chamulitrat, W., Gatti, P., Hellstrom, W. J. and Sikka, S. C.** (1999) *Characterization of Reactive Oxygen Species Induced Effects on Human Spermatozoa Movement and Energy Metabolism*. *Free Radical Biology and Medicine*, 26, 869-880.
- Arnoult, C., Kazam, I. G., Visconti, P. E., Kopf, G. S., Villaz, M. and Florman, H. M.** (1999) *Control of the Low Voltage-Activated Calcium Channel of Mouse Sperm by Egg ZP3 and by Membrane Hyperpolarization during Capacitation*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96, 6757-6762.
- Asquith, K. L., Baleato, R. M., McLaughlin, E. A., Nixon, B. and Aitken, R. J.** (2004) *Tyrosine Phosphorylation Activates Surface Chaperones Facilitating Sperm-Zona Recognition*. *Journal of Cell Science*, 117, 3645-3657.



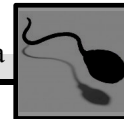
- Austin, C. R. and Bishop, M. W. H.** (1957) *Fertilization in Mammals*. Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society, 32, 296-346.
- Bailey, J. L.** (2010). *Factors Regulating Sperm Capacitation*. Systems Biology in Reproductive Medicine 56 (5): 334-348.
- Baldi, E., Luconi, M., Bonaccorsi, L., Krausz, C. and Forti, G.** (1996) *Human Sperm Activation during Capacitation and Acrosome Reaction: Role of Calcium, Protein Phosphorylation and Lipid Remodelling Pathways*. Frontiers in bioscience: a journal and virtual library, 1, d189-205.
- Balhorn, R.** (1982) *A Model for the Structure of Chromatin in Mammalian Sperm*. Journal of Cell Biology, 93, 298-305.
- Barch M. J., Knutsen, T. & Spurbeck, J.** (1997) *The AGT Cytogenetics Laboratory Manual*. Third Edition. The Association of Genetic Technologists. Lippicott – Raven Publishers. Philadelphia.
- Barlow, P. and Vosa, C. G.** (1970) *Y Chromosome in Human Spermatozoa*. Nature, 226, 961-&.
- Behr, B., Rath, D., Mueller, P., Hildebrandt, T. B., Goeritz, F., Braun, B. C., Leahy, T., de Graaf, S. P., Maxwell, W. M. C. and Hermes, R.** (2009) *Feasibility of Sex-Sorting Sperm from the White and the Black Rhinoceros (*Ceratotherium simum*, *Diceros bicornis*)*. Theriogenology, 72, 353-364.
- Bermejo-Alvarez, P., Rizos, D., Rath, D., Lonergan, P. and Gutierrez-Adan, A.** (2008) *Can Bovine in vitro-Matured Oocytes Selectively Process X- or Y-Sorted Sperm Differentially?* Biology of Reproduction, 79, 594-597.
- Blanco, J., Egozcue, J. and Vidal, F.** (1996) *Incidence of Chromosome 21 Disomy in Human Spermatozoa as Determined by Fluorescent in situ Hybridization*. Human Reproduction, 11, 722-726.
- Blom, E.** (1950) *A One-Minute Live-Dead Sperm Stain by Means of Eosin-Nigrosin*. Fertility and Sterility, 1, 176-177.



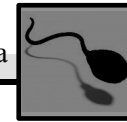
- Boryshpolets, S., Dzyuba, B., Stejskal, V. and Linhart, O.** (2009) *Dynamics of ATP and Movement in Eurasian Perch (*Perca fluviatilis* L.) Sperm in Conditions of Decreasing Osmolality*. *Theriogenology*, 72, 851-859.
- Brewer, L., Corzett, M. and Balhorn, R.** (2002) *Condensation of DNA by Spermatid Basic Nuclear Proteins*. *Journal of Biological Chemistry*, 277, 38895-38900.
- Catt, S. L., Catt, J. W., Gomez, M. C., Maxwell, W. M. C. and Evans, G.** (1996) *Birth of a Male Lamb Derived from an in vitro Matured Oocyte Fertilised by Intracytoplasmic Injection of a Single Presumptive Male Sperm*. *Veterinary Record*, 139, 494-495.
- Chantot-Bastaraud, S., Ravel, C., Berthaut, I., McElreavey, K., Bouchard, P., Mandelbaum, J. and Siffroi, J. P.** (2007) *Sperm-FISH Analysis in a Pericentric Chromosome 1 Inversion, 46,XY,inv(1)(p22q42), Associated with Infertility*. *Molecular Human Reproduction*, 13, 55-59.
- Checa, M. L., Dunner, S. and Canon, J.** (2002) *Prediction of X and Y Chromosome Content in Bovine Sperm by using DNA Pools through Capillary Electrophoresis*. *Theriogenology*, 58, 1579-1586.
- Check, M. L., Bollendorf, A., Check, J. H., Hourani, W., Long, R. and McMonagle, K.** (2000) *Separation of Sperm Through a 12-Layer Percoll Column Decreases the Percentage of Sperm Staining with Quinacrine*. *Archives of Andrology*, 44, 47-50.
- Cran, D. G. and Johnson, L. A.** (1996) *The Predetermination of Embryonic Sex using Flow Cytometrically Separated X and Y Spermatozoa*. *Human Reproduction Update*, 2, 355-363.
- de Lamirande, E. and Lamothe, G.** (2009) *Reactive Oxygen-Induced Reactive Oxygen Formation during Human Sperm Capacitation*. *Free Radical Biology and Medicine*, 46, 502-510.
- de Kretser D. M., Kerr J. B.** (1994) *The Cytology of the Testis*. In:Knobil E, Neill JD (eds). *The physiology of reproduction*. New York. Raven press ltd.



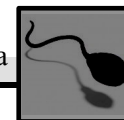
- de Kretser, D. M., Loveland, K. L., Meinhardt, A., Simorangkir, D. and Wreford, N.** (1998) *Spermatogenesis*. Human Reproduction, 13, 1-8.
- Ericsson, R. J., Langevin, C. N. and Nishino, M.** (1973) *Isolation of Fractions Rich in Human Y Sperm*. Nature, 246, 421-424.
- Ferramosca, A., Provenzano, S. P., Coppola, L. and Zara, V.** (2012) *Mitochondrial Respiratory Efficiency is Positively Correlated With Human Sperm Motility*. Urology, 79, 809-814.
- Flaherty, S. P. and Matthews, C. D.** (1996) *Application of Modern Molecular Techniques to Evaluate Sperm Sex Selection Methods*. Mol Hum Reprod, 2, 937-942.
- Florman, H. M., Jungnickel, M. K. and Sutton, K. A.** (2008) *Regulating the Acrosome Reaction*. International Journal of Developmental Biology, 52, 503-510.
- Ford, W. C. L.** (2004) *Regulation of Sperm Function by Reactive Oxygen Species*. Human Reproduction Update, 10, 387-399.
- Ford, W. C. L.** (2006) *Glycolysis and Sperm Motility: Does a Spoonful of Sugar Help the Flagellum Go Round?* Human Reproduction Update, 12, 269-274.
- Franca, L. R., Ogawa, T., Avarbock, M. R., Brinster, R. L. and Russell, L. D.** (1998) *Germ Cell Genotype Controls Cell Cycle during Spermatogenesis in the Rat*. Biology of Reproduction, 59, 1371-1377.
- Fugger, E. F.** (1999) *Clinical Experience with Flow Cytometric Separation of Human X- and Y- Chromosome Bearing Sperm*. Theriogenology, 52, 1435-1440.
- Fugger, E. F., Black, S. H., Keyvanfar, K. and Schulman, J. D.** (1998) *Births of Normal Daughters after MicroSort Sperm Separation and Intrauterine Insemination, in vitro Fertilization, or Intracytoplasmic Sperm Injection*. Human Reproduction, 13, 2367-2370.
- Garner, D. L.** (2001) *Sex-Sorting Mammalian Sperm: Concept to Application in Animals*. Journal of Andrology, 22, 519-526.



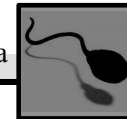
- Garner, D. L.** (2006) *Flow Cytometric Sexing of Mammalian Sperm*. *Theriogenology*, 65, 943-957.
- Garner, D. L.** (2009) *Hoechst 33342: The Dye that Enabled Differentiation of Living X-and Y-Chromosome Bearing Mammalian Sperm*. *Theriogenology*, 71, 11-21.
- Garner, D. L. and Seidel, G. E.** (2003) *Past, present and future perspectives on sexing sperm*. *Canadian Journal of Animal Science*, 83, 375-384.
- Gilbert, S. F.** (2006) *Developmental Biology*. Eighth edn.
- Giles, R. E., Blanc, H., Cann, H. M. and Wallace, D. C.** (1980) *Maternal Inheritance of Human Mitochondrial-DNA*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America-Biological Sciences*, 77, 6715-6719.
- Ho, H.-C. and Wey, S.** (2007) *Three Dimensional Rendering of the Mitochondrial Sheath Morphogenesis during Mouse Spermiogenesis*. *Microscopy Research and Technique*, 70, 719-723.
- Holstein, A.-F., Schulze, W. and Davidoff, M.** (2003) *Understanding Spermatogenesis is a Prerequisite for Treatment*. *Reprod Biol Endocrinol*, 1, 107.
- Isidori, A., Latini, M. and Romanelli, F.** (2005) *Treatment of Male Infertility*. *Contraception*, 72, 314-318.
- Jameel, T.** (2008) *Sperm Swim-up: a Simple and Effective Technique of Semen Processing for Intrauterine Insemination*. *JPMA The Journal of the Pakistan Medical Association*, 58, 71-74.
- Johnson, L. A.** (1991) *Sex Preselection in Swine- Altered Sex-Ratios in Offspring Following Surgical Insemination of Flow Sorted X-Bearing and Y-Bearing Sperm*. *Reproduction in Domestic Animals*, 26, 309-314.
- Johnson, L. A. and Welch, G. R.** (1999) *Sex Preselection: High-Speed Flow Cytometric Sorting of X and Y Sperm for Maximum Efficiency*. *Theriogenology*, 52, 1323-1341.



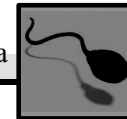
- Johnson, L. A., Flook, J. P. and Hawk, H. W.** (1989) *Sex Preselection in Rabbits – Live Births from X-Sperm and Y-Sperm Separated by DNA and Cell Sorting*. *Biology of Reproduction*, 41, 199-203.
- Johnson, L. A., Welch, G. R., Keyvanfar, K., Dorfmann, A., Fugger, E. F. and Schulman, J. D.** (1993) *Gender Preselection in Humans – Flow Cytometric Separation of X- Spermatozoa and Y- Spermatozoa for the Prevention of X-Linked Diseases*. *Human Reproduction*, 8, 1733-1739.
- Junqueira, L. and Carneiro, J.** (2004) *Histologia Básica*. Tenth edn, Guanabara Koogana.
- Kierszenbaum, A. L.** (2002) *Sperm Axoneme: A Tale of Tubulin Post-translation Diversity*. *Molecular Reproduction and Development*, 62, 1-3.
- Kroemer, G., Zamzami, N. and Susin, S. A.** (1997) *Mitochondrial Control of Apoptosis*. *Immunology Today*, 18, 44-51.
- Lefievre, L., Jha, K. N., De Lamirande, E., Visconti, P. E. and Gagnon, C.** (2002) *Activation of Protein Kinase A during Human Sperm Capacitation and Acrosome Reaction*. *Journal of Andrology*, 23, 709-716.
- Lindsey, A. C., Morris, L. H. A., Allen, W. R., Schenk, J. L., Squires, E. L. and Bruemmer, J. E.** (2002) *Hysteroscopic Insemination of Mares with Low Numbers of Nonsorted or Flow Sorted Spermatozoa*. *Equine Veterinary Journal*, 34, 128-132.
- Long, J. A. and Guthrie, H. D.** (2006) *Validation of a Rapid, Large-Scale Assay to Quantify ATP Concentration in Spermatozoa*. *Theriogenology*, 65, 1620-1630.
- Lopata, A., McMaster, R., McBain, J. C. and Johnston, W. I. H.** (1978) *In vitro Fertilization of Preovulatory Human Eggs*. *Journal of Reproduction and Fertility*, 52, 339-&.
- Luetjens, C. M., Payne, C. and Schatten, G.** (1999) *Non-Random Chromosome Positioning in Human Sperm and Sex Chromosome Anomalies Following Intracytoplasmic Sperm Injection*. *Lancet*, 353, 1240-1240.



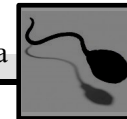
- Macey, M. G.** (2007) *Flow Cytometry - Principles and Applications*, Humana Press, Totowa, New Jersey.
- Machev, N., Gosset, P., Warter, S., Treger, M., Schillinger, M. and Viville, S.** (2005) *Fluorescence in situ Hybridization Sperm Analysis of Six Translocation Carriers Provides Evidence of an Interchromosomal Effect*. *Fertility and Sterility*, 84, 365-373.
- Makker, K., Agarwal, A. and Sharma, R.** (2009) *Oxidative Stress & Male Infertility*. *Indian Journal of Medical Research*, 129, 357-367.
- Mari, P.-O., Verbiest, V., Sabbioneda, S., Gourdin, A. M., Wijgers, N., Dinant, C., Lehmann, A. R., Vermeulen, W. and Giglia-Mari, G.** (2010) *Influence of the Live Cell DNA Marker DRAQ5 on Chromatin-Associated processes*. *DNA Repair*, 9, 848-855.
- Martini, E., Speel, E. J. M., Geraedts, J. P. M., Ramaekers, F. C. S. and Hopman, A. H. N.** (1995) *Application of Different in situ Hybridization Detection Methods for Human Sperm Analysis*. *Human Reproduction*, 10, 855-861.
- McClung, C. E.** (1901) *Notes on the Accessory Chromosome*, *Anatomischer Anzeiger*.
- Murad, C., Delamirande, E. and Gagnon, C.** (1992) *Hyperactivated Motility is Coupled with Interdependent Modifications at Axonemal and Cytosolic Levels in Human Spermatozoa*. *Journal of Andrology*, 13, 323-331.
- Nakada, K., Sato, A., Yoshida, K., Morita, T., Tanaka, H., Inoue, S.-I., Yonekawa, H. and Hayashi, J.-I.** (2006) *Mitochondria-Related Male Infertility*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103, 15148-15153
- Nichol, R., Hunter, R. H. F., Gardner, D. K., Leese, H. J. and Cooke, G. M.** (1992) *Concentrations of Energy Substrates in Oviductal Fluid and Blood-Plasma of Pigs During the Perioovulatory Period*. *Journal of Reproduction and Fertility*, 96, 699-707.



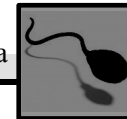
- Nicholls, D. G. and Ferguson, S. J.** (2002) *Bioenergetics*3, Elsevier Science, Academic Press.
- Nixon, B., Asquith, K. L. and Aitken, R. J.** (2005) *The Role of Molecular Chaperones in Mouse Sperm-Egg Interactions*. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 240, 1-10.
- O'Brien, J. K., Stoianov, T., Heffeman, S. J., Hollinshead, F. K., Vogelnest, L., Maxwell, W. M. C. and Evans, G.** (2005) *Flow Cytometric Sorting of Non-Human Primate Sperm Nuclei*. *Theriogenology*, 63, 246-259.
- O'Bryan, M. K., Zini, A., Cheng, C. Y. and Schlegel, P. N.** (1998) *Human Sperm Endothelial Nitric Oxide Synthase Expression: Correlation with Sperm Motility*. *Fertility and Sterility*, 70, 1143-1147.
- O'Flaherty, C., de Lamirande, E. and Gagnon, C.** (2006) *Positive Role of Reactive Oxygen Species in Mammalian Sperm Capacitation: Triggering and Modulation of Phosphorylation Events*. *Free Radical Biology and Medicine*, 41, 528-540.
- Oko, R. and Sutovsky, P.** (2009) *Biogenesis of Sperm Perinuclear Theca and its Role in Sperm Functional Competence and Fertilization*. *Journal of Reproductive Immunology*, 83, 2-7.
- Palermo, G., Joris, H., Devroey, P. and Vansteirteghem, A. C.** (1992) *Pregnancies after Intracytoplasmic Injection of Single Spermatozoon into an Oocyte*. *Lancet*, 340, 17-18.
- Paoli, D., Gallo, M., Rizzo, F., Baldi, E., Francavilla, S., Lenzi, A., Lombardo, F. and Gandini, L.** (2011) *Mitochondrial membrane potential profile and its correlation with increasing sperm motility*. *Fertility and Sterility*, 95, 2315-2319.
- Parrilla, I., Vazquez, J. M., Oliver-Bonet, M., Navarro, J., Yelamos, J., Roca, J. and Martinez, E. A.** (2003) *Fluorescence in situ Hybridization in Diluted and Flow Cytometrically Sorted Boar Spermatozoa using Specific DNA Direct Probes Labelled by Nick Translation*. *Reproduction*, 126, 317-325.



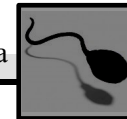
- Penfold, L. M., Holt, C., Holt, W. V., Welch, G. R., Cran, D. G. and Johnson, L. A.** (1998) *Comparative Motility of X and Y Chromosome-Bearing Bovine Sperm Separated on the Basis of DNA Content by Flow Sorting*. *Molecular Reproduction and Development*, 50, 323-327.
- Povoa, H., Bastos, J. J., Silva, M. E. D., Ariza, A., Moraes, M. I. C., Rodrigues, R. B. and Silva, M. S.** (1986) *Glucose in Human-Semen*. *Biomedica Biochimica Acta*, 45, 685-686.
- Puglisi, R., Vanni, R., Galli, A., Balduzzi, D., Parati, K., Bongioni, G., Crotti, G., Duchi, R., Galli, C., Lazzari, G. et al.** (2006) *In vitro Fertilisation with Frozen-Thawed Bovine Sperm Sexed by Flow Cytometry and Validated for Accuracy by Real-Time PCR*. *Reproduction*, 132, 519-526.
- Purves, W. K., Sadava, D., Orians, G. H. and Heller, H. C.** (2006) *Vida - A Ciência da Biologia*. 6ª ed., artmed.
- Rajender, S., Rahul, P. and Mahdi, A. A.** (2010) *Mitochondria, Spermatogenesis and Male Infertility*. *Mitochondrion*, 10, 419-428.
- Ramalho-Santos, J., Amaral, A., Sousa, A. P., Rodrigues, A. S., Martins, L., Baptista, M., Mota, P. C., Tavares, R., Amaral, S. and Gamboa, S.** (2007) *Probing the Structure and Function of Mammalian Sperm using Optical and Fluorescence Microscopy*. *Modern Research and Educational Topics in Microscopy*, 394-402.
- Ramalho-Santos, J., Varum, S., Amaral, S., Mota, P. C., Sousa, A. P. and Amaral, A.** (2009) *Mitochondrial Functionality in Reproduction: from Gonads and Gametes to Embryos and Embryonic Stem Cells*. *Human Reproduction Update*, 15, 553-572.
- Rens, W., Welch, G. R. and Johnson, L. A.** (1998) *A Novel Nozzle for More Efficient Sperm Orientation to Improve Sorting Efficiency of X and Y Chromosome-Bearing Sperm*. *Cytometry*, 33, 476-481.
- Roberts, A. M. and Goodall, H.** (1976) *Y- Chromosome Visibility in Quinacrine-Stained Human Spermatozoa*. *Nature*, 262, 493-494.



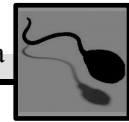
- Ruiz-Pesini, E., Diez, C., Lapena, A. C., Perez-Martos, A., Montoya, J., Alvarez, E., Arenas, J. and Lopez-Perez, M. J.** (1998) *Correlation of Sperm Motility with Mitochondrial Enzymatic Activities*. *Clinical Chemistry*, 44, 1616-1620.
- Ruiz-Pesini, E., Lapena, A. C., Diez, C., Alvarez, E., Enriquez, J. A. and Lopez-Perez, M. J.** (2000) *Seminal Quality Correlates with Mitochondrial Functionality*. *Clinica Chimica Acta*, 300, 97-105.
- Ruiz-Pesini, E., Diez-Sanchez, C., Lopez-Perez, M. J. and Enriquez, J. A.** (2007) *The Role of the Mitochondrion in Sperm Function: Is there a pPace for Oxidative Phosphorylation or is this a Purely Glycolytic Process?* *Mitochondrion in the Germline and Early Development*, 77, 3-19.
- Schenk, J. L., Suh, T. K., Cran, D. G. and Seidel, G. E.** (1999) *Cryopreservation of Flow-Sorted Bovine Spermatozoa*. *Theriogenology*, 52, 1375-1391.
- Seidel, G. E. and Garner, D. L.** (2002) *Current Status of Sexing Mammalian Spermatozoa*. *Reproduction*, 124, 733-743.
- Seidel, G. E., Schenk, J. L., Herickhoff, L. A., Doyle, S. P., Brink, Z., Green, R. D. and Cran, D. G.** (1999) *Insemination of Heifers with Sexed Sperm*. *Theriogenology*, 52, 1407-1420.
- Shapiro, H.** (2003) *Practical Flow Cytometry*. Fourth edn, John Wiley & Sons, Inc., New Jersey.
- Sharpe, J. C. and Evans, K. M.** (2009) *Advances in Flow Cytometry for Sperm Sexing*. *Theriogenology*, 71, 4-10.
- Shivaji, S., Kota, V. and Siva, A. B.** (2009) *The Role of Mitochondrial Proteins in Sperm Capacitation*. *Journal of Reproductive Immunology*, 83, 14-18.
- Sills, E. S., Kirman, I., Thatcher, S. S. and Palermo, G. D.** (1998) *Sex-Selection of Human Spermatozoa: Evolution of Current Techniques and Applications*. *Archives of Gynecology and Obstetrics*, 261, 109-115.
- Singh, K. and Jaiswal, D.** (2011) *Human Male Infertility: A Complex Multifactorial Phenotype*. 18, 418-425.



- Sousa, A. P. M., Tavares, R. S., de la Calle, J. F. V., Figueiredo, H., Almeida, V., Almeida-Santos, T. and Ramalho-Santos, J.** (2009) *Dual use of Diff-Quik-Like Stains for the Simultaneous Evaluation of Human Sperm Morphology and Chromatin Status*. Human Reproduction, 24, 28-36.
- Sousa, A. P., Amaral, A., Baptista, M., Tavares, R., Campo, P. C., Peregrin, P. C., Freitas, A., Paiva, A., Almeida-Santos, T. and Ramalho-Santos, J.** (2011) *Not All Sperm Are Equal: Functional Mitochondria Characterize a Subpopulation of Human Sperm with Better Fertilization Potential*. Plos One, 6(3) e18112.
- Spiropoulos, J., Turnbull, D. M. and Chinnery, P. F.** (2002) *Can Mitochondrial DNA Mutations Cause Sperm Dysfunction?* Molecular Human Reproduction, 8, 719-721.
- St John, J. C., Sakkas, D. and Barratt, C. L. R.** (2000) *A Role for Mitochondrial DNA and Sperm Survival*. Journal of Andrology, 21, 189-199.
- Sutton, W. S.** (1902). *On the Morfology of the Chromosome Group in Brachystola Magna*. Biological Bulletin 4: 24-39.
- Torres-Flores, V., Picazo-Juarez, G., Hernandez-Rueda, Y., Darszon, A. and Gonzalez-Martinez, M. T.** (2011) *Sodium Influx Induced by External Calcium Chelation Decreases Human Sperm Motility*. Human Reproduction, 26, 2626-2635.
- Toshimori, K.** (2003) *Biology of Spermatozoa Maturation: An Overview with an Introduction to this Issue*. Microscopy Research and Technique, 61, 1-6.
- Tournaye, H.** (2012) *Male Factor Infertility and ART*. Asian Journal of Andrology, 14, 103-108.
- Toshimori, K. and Ito, C.** (2003) *Formation and Organization of the Mammalian Sperm Head*. Archives of Histology and Cytology, 66, 383-396.
- Tulsiani, D. and Abou-Haila, A.** (2004). *Is Sperm Capacitation Analogous to Early Phases of Ca²⁺-Triggered Membrane Fusion in Somatic Cells and Viruses?* BioEssays 26(3): 281-290.



- Vandilla, M. A., Gledhill, B. L., Lake, S., Dean, P. N., Gray, J. W., Kachel, V., Barlogie, B. and Gohde, W.** (1977) *Measurement of Mammalian Sperm Deoxyribonucleic-acid by Flow Cytometry – Problems and Approaches*. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 25, 763-773.
- Varum, S., Bento, C., Sousa, A. P. M., Gomes-Santos, C. S. S., Henriques, P., Almeida-Santos, T., Teodosio, C., Paiva, A. and Ramalho-Santos, J.** (2007) *Characterization of Human Sperm Populations using Conventional Parameters, Surface Ubiquitination, and Apoptotic Markers*. *Fertility and Sterility*, 87, 572-583.
- Vidal, F., Fugger, E. F., Blanco, J., Keyvanfar, K., Catala, V., Norton, M., Hazelrigg, W. B., Black, S. H., Levinson, G., Egozcue, J. et al.** (1998) *Efficiency of MicroSort Flow Cytometry for Producing Sperm Populations Enriched in X- or Y-Chromosome Haplotypes: a Blind Trial Assessed by Double and Triple Colour Fluorescent in situ Hybridization*. *Human Reproduction*, 13, 308-312.
- Vigue, C., Vigue, L. and Huszar, G.** (1992) *Adenosine-Triphosphate (ATP) Concentrations and ATP/Adenosine Diphosphate Ratios in Human Sperm of Normospermic, Oligospermic, and Asthenospermic Specimens and in their Swim-Up Fractions – Lack of Correlation Between ATP Parameters and Sperm Creatine-Kinase Concentrations*. *Journal of Andrology*, 13, 305-311.
- Visconti, P. E., Bailey, J. L., Moore, G. D., Pan, D. Y., Oldsclarke, P. and Kopf, G. S.** (1995) *Capacitation of Mousse Spermatozoa 1. Correlation Between the Capacitation State and Protein-Tyrosine Phosphorylation*. *Development*, 121, 1129-1137.
- Visconti, P. E., Moore, G. D., Bailey, J. L., Leclerc, P., Connors, S. A., Pan, D. Y., Oldsclarke, P. and Kopf, G. S.** (1995) *Capacitation of Mousse Spermatozoa 2. Protein-Tyrosine Phosphorylation and Capacitation are Regulated by a cAMP-Dependent Pathway*. *Development*, 121, 1139-1150.
- WHO** (2010) *In: WHO Laboratory Manual for the Examination and Processing of Human Semen*. 5th ed. 2010 Geneva, WHO Press.



Zalenskaya, I. A., Bradbury, E. M. and Zalensky, A. O. (2000) *Chromatin Structure of Telomere Domain in Human Sperm*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 279, 213-218.

Zalenskaya, I. A. and Zalensky, A. O. (2002) *Telomeres in Mammalian Male Germline Cells*. International Review of Cytology - a Survey of Cell Biology, Vol 218, 218, 37-67.

Zeyneloglu, H. B., Baltaci, V., Ege, S., Haberal, A. and Batioglu, S. (2000) *Detection of Chromosomal Abnormalities by Fluorescent in situ Hybridization in Immotile Viable Spermatozoa Determined by Hypo-Osmotic Sperm Swelling Test*. Human Reproduction, 15, 853-856.