

## O uso de sondas fluorescentes na avaliação morfofuncional de espermatozóides bovinos

Alexandre Rossetto Garcia<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Pesquisador III – Embrapa Amazônia Oriental - Travessa Dr. Enéas Pinheiro. s/n – Belém-PA

argarcia@cpatu.embrapa.br

### Introdução

A necessidade de nutrir 6,5 bilhões de pessoas que constituem a população mundial e a disputa pelos mercados internacionais de alimentos têm exigido que as cadeias produtivas de carne e leite se organizem e trabalhem com elevado grau de profissionalismo. A produção de material genético de alta qualidade é um dos itens de maior impacto na rentabilidade dos sistemas produtivos de bovinos, pois a produtividade animal depende, dentre outros fatores, da disseminação de germoplasmas superiores.

Um touro adulto saudável pode ejacular de 5 a 15 bilhões de células por monta (GARNER; HAFEZ, 2004), quantidade suficiente para emprenhar uma vaca em monta natural ou para ser empregado em pelo menos duas centenas de fêmeas, se devidamente criopreservado. Enquanto as pesquisas caminham no sentido de possibilitar a transgênese através da incorporação de DNA exógeno a espermatozóides (ANZAR; BUHR, 2006) e de transformar animais comuns em biofábricas para a produção *ex situ* de espermatozóides proveniente de doadores de espermatozônias (BRINSTER, 2002), o advento de biotécnicas como a produção *in vitro* de embriões, a injeção intracitoplasmática de espermatozóides e a sexagem espermática tem gerado demanda cada vez maior por material genético de animais de elite.

Como a fertilização é um processo complexo, qualquer estimativa isolada da fertilidade seminal permanece aquém do ideal. Durante a avaliação dos ejaculados, é necessário considerar indicadores mais específicos da condição espermática. Técnicas que indiquem alterações de morfofuncionalidade nos compartimentos celulares e/ou organelas podem ser incorporadas à rotina de avaliação espermática. Essas observações devem auxiliar sobremaneira a identificação e seleção de grupos de gametas mais aptos a executar os eventos imprescindíveis à fecundação, baratear o acesso a material genético de touros vivos e potencializar o uso de sêmen de animais já mortos.

### Avaliação de Acrossomo, Membrana Plasmática e Mitocôndrias

Classicamente, os médicos veterinários andrologistas têm buscado identificar animais capazes de produzir ejaculados com um maior número de espermatozóides morfológicamente normais, dotados de motilidade progressiva e aptos a executar a fertilização. As avaliações morfológicas de defeitos de acrossomo, cabeça, cauda e a presença de gotas citoplasmáticas têm sido usadas para estimar a qualidade de uma amostra de sêmen.

Apesar da morfologia espermática normal ser importante para a fertilidade de touros, tem-se observado freqüentemente que a avaliação concentrada na porcentagem de espermatozóides anormais no ejaculado pode ser um indicador frágil da aptidão reprodutiva, especialmente para animais de raça pura (HORN; MORAES e MACIE, 2002). Nas espécies que possuem espermatozóides com acrossomo muito pequeno - por exemplo, rato, homem, touro e cavalo - não é possível visualizar danos acrossomais usando microscopia óptica. Assim, técnicas para marcação do acrossomo têm sido usadas para permitir a detecção de defeitos sob microscopia de epifluorescência (CASEY et al., 1993) e por citometria de fluxo (THOMAS et al., 1998).

Para avaliação da integridade do acrossomo, há duas classes de sondas fluorescentes: as que detectam elementos intracelulares associados ao acrossomo e as que podem ser usadas em células não permeabilizadas. Na primeira categoria enquadram-se as lecitinas e os anticorpos contra antígenos internos ao acrossomo, enquanto na segunda categoria estão a clortetraciclina e os anticorpos contra antígenos acrossomais externos. Dentre esses compostos, as lecitinas têm sido usadas com maior sucesso, pois são reagentes mais acessíveis e capazes de se ligar a glicocôjugados da matriz acrossomal ou à membrana acrossomal externa (CROSS et al., 1986). As lecitinas produzem coloração fluorescente de grande intensidade, imprimem maior contraste que as colorações simples e geram padrões menos ambíguos de interpretação (CROSS; MEIZEL, 1989).

A primeira lecitina conjugada ao isotiocianato de fluoresceína (FITC) utilizada para a detecção do *status* acrossomal foi a lecitina de *Ricinus communis*. Dada sua toxicidade e os cuidados requeridos em seu manuseio, essa lecitina foi substituída convenientemente pelas lecitinas de *Peanut* aglutinina (PNA) e de *Pisum sativum* aglutinina (PSA). A lecitina fluorescente *Pisum sativum* aglutinina (FITC-PSA) tem

funcionado adequadamente em espermatozoides de humanos (CROSS et al., 1986), macacos (CROSS et al., 1989), eqüinos (ARRUDA, 2000) e bovinos (ARRUDA; CELEGHINI, 2003; GARCIA, 2004).

A lecitina FITC-PSA pode ser usada eficientemente para avaliar a integridade do acrossomo e a viabilidade tanto de células espermáticas a fresco quanto de células submetidas à criopreservação. Quando misturas de diferentes proporções de espermatozoides com acrossomo intacto (sêmen fresco) e espermatozoides com acrossomo lesado (sêmen congelado-descongelado) foram avaliadas, houve correlação positiva ( $r = 0,98$ ;  $P < 0,05$ ) entre a percentagem de espermatozoides ligados à FITC-PSA e a proporção de espermatozoides com acrossomo danificado nas amostras (FARLIN et al., 1992).

Como a integridade da membrana plasmática exerce papel fundamental para a sobrevivência do espermatozoide no trato genital da fêmea e para a manutenção de sua capacidade fertilizante (PARKS; GRAHAN, 1992), houve o interesse de se estudar os marcadores fluorescentes de acrossomo combinados a marcadores de membrana, como o iodeto de propídio (PI). O PI é um fluorescente de alta intensidade e impermeável à membrana plasmática, o qual se acopla ao DNA somente de espermatozoides de membrana danificada (GARNER; THOMAS e GRAVANCE, 1999).

Para detectar concomitantemente a integridade do acrossomo e a viabilidade de espermatozoides bovinos durante a capacitação *in vitro*, quatro diferentes técnicas de coloração foram testadas: Fast Green + Eosina B, Eosina B + Anilina Azul, Azul de Tripán + Giemsa e Iodeto de Propídio + *Pisum sativum* aglutinina (PI/PSA). Os espermatozoides foram corados pelos diferentes métodos e classificados como: intactos vivos, intactos mortos, vivos com acrossomo reagido e mortos com acrossomo reagido. Quando coradas com PI/PSA, células vivas e intactas não emitiram fluorescência, enquanto células mortas e intactas fluoresceram em vermelho. Espermatozoides vivos e com acrossomo reagido exibiram fluorescência verde na região acrossomal e não coraram na região pós-acrossomal. Espermatozoides mortos e com acrossomo reagido fluoresceram em verde na região acrossomal e vermelho na região pós-acrossomal. Desta forma, o método PI/PSA foi considerado bastante adequado para avaliar a viabilidade espermática e a integridade do acrossomo (WAY; HENAULT e KILLIAN, 1995). Em virtude de FITC-PSA e PI serem excitados a um mesmo comprimento de onda (488 nm), há a facilidade e precisão na diferenciação entre as categorias de células analisadas sob microscopia de epifluorescência (SUKARDI; CURRY e WATSON, 1997).

Também o acetato de carboxidimetilfluoresceína (CDMFDA) pode ser usado em combinação com o PI. O CDMFDA é um substrato enzimático não fluorescente e permeável à membrana plasmática que, quando hidrolisado por esterases espermáticas, resulta em um composto relativamente impermeável à membrana e altamente fluorescente. A associação tripla entre o CDMFDA, o PI e a Rodamina 123, este último um corante mitocondrial, permite a análise quantitativa simultânea da integridade de membrana plasmática e da função mitocondrial de espermatozoides bovinos a fresco e após a descongelação. Análise de regressão indicou que a melhor equação preditiva para taxa de não retorno ao cio ( $R^2 = 0,96$ ;  $P = 0,001$ ) usando esta técnica foi dada pela combinação do número de espermatozoides com membrana plasmática intacta e mitocôndrias funcionais após 4 horas de incubação a 37°C pós-descongelação e a porcentagem de espermatozoides com morfologia e acrossomos normais no momento da descongelação (ERICSSON et al., 1993).

O Mito Tracker Green FM (MITO) é um corante que tem especificidade pela membrana mitocondrial ativa e, portanto, indica a potencialidade elétrica das mitocôndrias, requisito fundamental para a movimentação espermática. Seu uso combinado com a avaliação simultânea da integridade das membranas plasmática e acrossomal é recente. Os dados obtidos com uso de PI, PSA e MITO em sêmen bovino foram submetidos à análise de regressão e apresentaram para integridade de membrana plasmática a equação  $Y = 0,40 + 0,79X$  e  $R^2 = 0,95$ ; para integridade de acrossomo  $Y = 8,51 + 0,81X$  e  $R^2 = 0,95$  e para potencial de membrana mitocondrial  $Y = 35,0 + 0,55X$  e  $R^2 = 0,84$ . Com base nas equações e no alto coeficiente de determinação, é possível indicar o uso dessa técnica para a avaliação simultânea das membranas plasmática, acrossômica e mitocondrial em espermatozoides bovinos (ARRUDA; CELEGHINI, 2003).

A técnica de PI, PSA e MITO é sensível e permite diagnosticar que, nos bovinos, a disfunção espermática é maior que a presumida pela análise isolada da morfologia espermática. Quando dezesseis touros europeus foram mantidos a pasto em condição de conforto, a análise morfológica indicou média de 85,25% de gametas normais nos ejaculados coletados semanalmente, enquanto a avaliação por epifluorescência detectou que apenas 65,16% dos espermatozoides eram dotados concomitantemente de membrana plasmática íntegra, acrossomo intacto e mitocôndrias com potencial elétrico (GARCIA, 2004). Após os touros serem submetidos a estresse térmico testicular, enquanto a análise morfológica indicou 21,25% de espermatozoides normais no ejaculado, a análise morfofuncional com PI, PSA e Mito Tracker Green FM apontava que apenas 6,50% de espermatozoides eram considerados capazes de fecundar (GARCIA et al., 2005a).

### Avaliação da Estrutura da Cromatina Espermática

Nos mamíferos, a integridade do DNA espermático é de vital importância para a normalidade da prole. Quando um espermatozóide com DNA danificado fertiliza o ovócito, pode ocorrer impacto negativo no desenvolvimento fetal (EVENSON; JOST, 2000), o que possibilita a mortalidade embrionária precoce e prejudica a eficiência reprodutiva.

Vários autores hipotetizaram que espermatozóides dotados de núcleos irregulares apresentam cromatina com estrutura alterada e que essas alterações poderiam ser detectadas por padrões anormais de desnaturação do DNA em testes específicos (GLEDHILL; DARZYNKIEWICZ e RINGERTZ, 1971; EVENSON; DARZYNKIEWICZ e MELAMED, 1980). A fragmentação da cromatina pode ser detectável pelo uso da acridina laranja, um corante metacromático que interage com o DNA e com o RNA por intercalação ou atrações eletrostáticas. Quando ligada à dupla fita íntegra do DNA, a acridina laranja fluoresce em verde e, quando ligada à fita simples do DNA, sua fluorescência passa a ser em vermelho. Entretanto, quando a cromatina se encontra extremamente condensada, o DNA é tão compactado que não permite uma intercalação eficiente da acridina laranja (HAUGLAND, 1996).

A estrutura da cromatina é sensível à desnaturação por elevação da temperatura. Ao submeter o sêmen coletado diretamente do testículo, do epidídimo, da *rete testis* ou do ejaculado a temperaturas crescentes que variam de 22 a 100°C, a desnaturação térmica é capaz de induzir a fragmentação da cromatina de espermatozóides de morfologia normal ou anormal, principalmente naquelas células mais imaturas. Esta fragmentação é detectável com uso da acridina laranja (GLEDHILL, 1972).

Não somente o DNA de células de morfologia irregular tem uma menor resistência ao calor, mas muitos espermatozóides normais de doadores subfêrteis também são anormalmente susceptíveis à desnaturação térmica de seu DNA, sendo que a sensibilidade da cromatina ao estresse térmico pode ser um determinante adicional da fertilidade (EVENSON, 1980).

Ao usar a coloração de acridina laranja em amostras de ejaculados, o nível de desnaturação do DNA *in situ* pode ser determinado pelo índice denominado  $\alpha_t$ , o qual é dado pela relação entre a fluorescência das células em vermelho e a fluorescência das células em vermelho+verde. O  $\alpha_t$  pode variar experimentalmente entre 0,1 (DNA pouco desnaturado) e 0,9 (DNA altamente desnaturado), sendo indicativo de padrões seminais de touros férteis e subfêrteis, respectivamente. Esta relação pode ser detectada através de citometria de fluxo e o ensaio de avaliação da estrutura da cromatina espermática é conhecido como SCSA, do termo em inglês *Sperm Chromatin Structure Assay* (EVENSON, 1980). Porém, a variação de fluorescência da acridina laranja em espermatozóides pode ser também observada com o uso da microscopia de epifluorescência (TEJADA et al., 1984).

O grau de desnaturação da cromatina de células espermáticas que foram expostas ao ácido ou ao calor representa uma forma de mensuração da subfertilidade de um macho. Em touros, a porcentagem de células espermáticas com estrutura anormal de cromatina é relacionada à fertilidade dos animais (BALLACHEY; EVENSON e SAACKER, 1988). Bochenek; Smorag e Pilch, (2001) também encontraram uma correlação significativa entre os resultados da SCSA e a fertilidade em touros aprovados para doação de sêmen em centrais de inseminação artificial. Segundo esses autores, touros com fertilidade acima da média apresentaram 1,2% de células com DNA desnaturado, enquanto touros com fertilidade abaixo da média apresentaram até 23,8% de espermatozóides com defeitos de cromatina.

Em bovinos, a susceptibilidade da cromatina à desnaturação é maior nos espermatozóides colhidos após período de insulação testicular realizada por 48 horas e os efeitos negativos do estresse térmico testicular sobre a integridade da cromatina se manifestam mais rapidamente que os efeitos sobre as características seminais convencionalmente analisadas (KARABINUS et al., 1997). De fato, em animais insulados durante 96 horas, os níveis de fragmentação da cromatina detectados à microscopia de epifluorescência com acridina laranja se elevam do estado basal de  $0,10 \pm 0,10\%$  para  $0,60 \pm 0,22\%$  nos primeiros sete dias pós-insulação, atingindo o pico de fragmentação de  $9,95 \pm 4,04\%$  em 23 dias após a insulação (GARCIA et al., 2005b).

Assim, o uso da acridina laranja pode auxiliar na identificação de indivíduos portadores de distúrbios muito sensíveis ocorridos durante o processo da espermatogênese (FOSSA et al., 1997). O teste pode ser aplicado para controlar a qualidade do sêmen, para melhor compreender certos tipos de infertilidade masculina, para checar a condição do sêmen usado na fertilização *in vitro* e para diagnosticar indivíduos que apresentem espermogramas normais e fertilidade reduzida (TEJADA et al., 1984).

Waberski et al. (2004) utilizaram a acridina laranja para avaliação de integridade da cromatina, associada ao teste hiposmótico e a testes rotineiros de avaliação seminal a fim de tentar estabelecer correlação com capacidade de adesão a células do oviduto e fertilidade *in vitro*. Sêmen de 30 touros foram avaliados, de modo que houve diferença individual significativa na habilidade dos espermatozóides dos distintos touros em se ligarem a células de oviduto. Houve correlação negativa entre instabilidade da cromatina e capacidade de ligação a células ovidutais ( $P < 0,05$ ). Os touros cujos espermatozóides demonstraram alta

capacidade de ligação a células do oviduto tiveram taxas de formação de blastocistos significativamente maiores que os touros de baixa capacidade de ligação ( $P < 0,05$ ). Isso indica que touros com cromatina fragmentada têm menor capacidade de ligação às células do oviduto *in vitro* e, conseqüentemente, menor capacidade de formação de blastocistos. Baseados nas correlações realizadas entre os resultados da avaliação de integridade da cromatina, do teste hiposmótico e do teste de adesão a células do oviduto, sugere-se que o aumento na porcentagem de espermatozoides com instabilidade de cromatina pode também estar associado a distúrbios funcionais da membrana plasmática.

### Considerações Finais

O uso de sondas fluorescentes para o monitoramento da integridade de membranas e organelas é bem conhecido em vários sistemas celulares. Esta metodologia tem sido aplicada para espermatozoides, mas seu potencial de uso ainda permanece desconhecido para a maioria dos médicos veterinários andrologistas. Apesar de alguns autores preconizarem o uso da fluorescência restrito à citometria de fluxo, em virtude da sua característica de examinar 10.000 espermatozoides em menos de um minuto, métodos para diagnóstico em microscopia de epifluorescência têm sido desenvolvidos com sucesso, a fim de disponibilizar tecnologia a pesquisadores com menor acesso à instrumentação altamente sofisticada.

### Referências Bibliográficas

- ANZAR, M.; BUHR, M. M. Spontaneous uptake of exogenous DNA by bull spermatozoa. **Theriogenology**, v. 65, p. 683-690, 2006.
- ARRUDA, R. P. **Avaliação dos efeitos de diluidores e crioprotetores para o espermatozoide eqüino pelo uso de microscopia de epifluorescência, citometria de fluxo, análises computadorizadas da motilidade (CASA) e da morfometria (ASMA)**. 2000, 121 f. Tese (Livre Docência) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2000.
- ARRUDA, R. P.; CELEGHINI, E. C. C. Validação de uma técnica para avaliação simultânea das membranas plasmática, acrossomal e mitocondrial de espermatozoides bovinos. **Acta Scientiae Veterinariae**, Porto Alegre, v. 31, p. 230-231, 2003. Suplemento.
- BALLACHEY, B. E.; EVENSON, D. P.; SAACKE, R. G. The sperm chromatin structure assay: relationship with alternate tests of semen quality and heterospermic performance of bulls. **Journal of Andrology**, v. 9, n. 2, p. 109-115, 1988.
- BOCHENEK, M.; SMORAG, Z.; PILCH, J. Sperm chromatin structure assay of bulls qualified for artificial insemination. **Theriogenology**, v. 56, n. 4, p. 557-567, 2001.
- BRINSTER, R. L. Germline stem cell transplantation and transgenesis. **Science**, v. 296, p. 2174-2176, 2002.
- CASEY, P. J.; HILLMAN, R. B.; ROBERTSON, K. R.; YUDIN, A. I.; LIU, I. K. M.; DROBNIS, E. Z. Validation of an acrosomal stain for equine sperm that differentiates between living and dead sperm. **Journal of Andrology**, v. 14, n. 4, p. 289-297, 1993.
- CROSS, N. L.; MEIZEL, S. Methods for evaluating the acrosomal status of mammalian sperm. **Biology of Reproduction**, v. 41, n. 4, p. 635-641, 1989.
- CROSS, N. L.; MORALES, P.; FUKUDA, M.; BEHBOODI, E. Determining acrosomal status of the cynomolgous monkey (*Macaca fascicularis*) sperm by fluorescence microscopy. **American Journal of Primatology**, v. 17, p. 157-163, 1989.
- CROSS, N. L.; MORALES, P.; OVERSTREET, J. W.; HANSON, F. W. Two simple methods for detecting acrosome-reacted human sperm. **Gamete Research**, v. 15, p. 213-226, 1986.
- ERICSSON, S.A.; GARNER, D.L.; THOMAS, C.A.; DOWNING, T.W.; MARSHALL, C.E. Interrelationships among fluorometric analyses of spermatozoal function, classical semen quality parameters and the fertility of frozen-thawed bovine spermatozoa. **Theriogenology**, v. 39, p. 1009-1024, 1993.
- EVENSON, D. P. Flow cytometry evaluation of male germ cells. In: YEN, A. (Ed.). **Flow Cytometry: advanced research and clinical applications**. Boca Raton, Flórida: CRC Press, 1980. p. 217-246.



WABERSKI, D.; KHALIL, A. Y. Y.; ARDON, F.; MAGNUS, F.; HELMS, D.; WRENZYCKI, A. M.; PETRUNKINA, E.; TÖPFER-PETERSEN, E. Sperm-oviduct binding in bull and boar and its relation to chromatin stability, sperm volume regulation and fertility. In: INTERNATIONAL CONGRESS ON ANIMAL REPRODUCTION, 15., Porto Seguro **Workshops Communications**. Belo Horizonte: CBRA, 2004. p. 470.

WAY, A. L.; HENAULT, M. A.; KILLIAN, G. J. Comparison of four staining methods for evaluating acrosome status and viability of ejaculate and cauda epididymal bull spermatozoa. **Theriogenology**, v. 43, n. 8, p. 1301-1316, 1995.

**Palavras-chave:** bovino, sêmen, sondas fluorescentes, SCSA, fertilidade.

**Keywords:** bovine, semen, fluorescent probes, SCSA, fertility.

