

MARIA FERNANDA SVIZZERO REGHINI

PRINCIPAIS MARCADORES UTILIZADOS NA AVALIAÇÃO DA QUALIDADE DO SÊMEN DE ANIMAIS DOMÉSTICOS.

Trabalho de Conclusão de Curso de Graduação
apresentado à Faculdade de Medicina Veterinária e
Zootecnia da Universidade “Júlio de Mesquita
Filho”, Campus de Botucatu, SP, para obtenção do
grau de médico veterinário

Área de concentração: Reprodução Animal

Preceptora: Prof^ª. Ass. Dr^ª. Regina Kiomi Takahira
Co-preceptora: Prof^ª. Ass. Dr^ª. Fernanda da Cruz Landim-Alvarenga
Coordenador de Estágios: Prof. Ass. Dr. Francisco José Teixeira Neto

Botucatu
2009

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO DA
INFORMAÇÃO
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: SELMA MARIA DE JESUS

Reghini, Maria Fernanda Svizzero.

Principais marcadores utilizados na avaliação da qualidade do sêmen de animais domésticos / Maria Fernanda Svizzero Reghini. – Botucatu : [s.n.], 2009.

Trabalho de conclusão (bacharelado – Medicina Veterinária) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Botucatu, 2009

Preceptor: Regina Kiomi Takahira

Co-preceptora: Fernanda da Cruz Landim-Alvarenga

1. Animais domésticos - Reprodução - Aspectos genéticos 2. Inseminação artificial

Palavras-chave: Criopreservação; Danos; Espermatozóide; Fluorescentes; Sêmen; Sondas

Resumo

O processo de congelação do sêmen proporciona alterações na integridade e na funcionalidade das células espermáticas, tais como danos à membrana plasmática e acrossomal e alterações na função mitocondrial, devido à desorganização da bicamada lipídica que compõe a membrana espermática. Para que ocorra a efetiva fertilização do oócito pelo espermatozóide, é necessário que a célula espermática apresente membranas funcionais e íntegras. Da mesma forma suas organelas, o acrossomo e o DNA têm de permanecer intactos. Porém, muitos métodos laboratoriais usados para avaliar a qualidade do sêmen não apresentam alta correlação com a capacidade de fertilização e a descoberta de fluorocromos e compostos conjugados com sondas fluorescentes possibilitaram um exame mais acurado da integridade, viabilidade e função do espermatozóide. Dentre as sondas mais utilizadas para a avaliação dos vários compartimentos da célula espermática estão listados corantes impermeáveis à membrana plasmática para demonstrar sua integridade, bem como corantes que passam através da membrana intacta e perdem um grupo acil passando a emitir fluorescência. Para avaliação da integridade acrossomal é comum o uso das lecitinas conjugadas com uma sonda fluorescente. A detecção da reação acrossomal e da capacitação espermática pode ser realizada através da análise de alterações na distribuição dos fosfolipídios da membrana. A função das mitocôndrias é determinada através do uso de sondas que avaliam a funcionalidade destas organelas em condições aeróbicas. A estrutura do DNA espermático tem sido determinada através do uso das propriedades metacromáticas do Acridina Orange, e a fragmentação do DNA é avaliada pela técnica do TUNEL, que identifica fragmentos de DNA pela marcação de terminais 3'-OH livres. Finalmente, a condensação do DNA, importante por torná-lo estável, é analisada através de um ensaio

com gel de eletroforese que determina o seu grau de compactação. Este trabalho visa relacionar as várias técnicas utilizadas para detectar danos aos espermatozoides que sofreram processos de criopreservação, procurando assim aperfeiçoar os valores prognósticos das análises do sêmen com o intuito de se obter sucesso na concepção.

Palavras- chave: criopreservação, sêmen, sondas fluorescentes, danos, espermatozoide

Abstract

Methods of semen cryopreservation allow changes in spermatid cells, such as damage in plasma and acrossomal membrane and modifications in mitochondrial function due to a disorder in the lipidic bilayer. For effective oocyte fertilization, spermatozoa require functional competent membranes, and intact organelles, acrosome and DNA. However, most laboratory methods used to evaluate semen quality are not highly correlated with fertilizing capacity. The discovery of a variety of fluorochromes and compounds conjugated to fluorescent probes has enabled an accurate assessment of the viability, integrity and function of spermatozoa. Among the most used probes that label the various compartments of the sperm cell there are the membrane impermeable fluorescent dyes to test the membrane integrity, as well as acylated dyes that pass the intact membrane. For the acrossomal integrity the most commonly used method is lectins labeled by a fluorescent probe. The acrosome reaction and spermatid capacitation is detected by the evaluation of membrane architecture and disorder of lipids in plasma membrane. Mitochondrial function can be determined using markers for their aerobic activity. The DNA status of spermatozoa has been determined using the metachromatic properties of Acridine Orange, and the DNA fragmentation can also be assessed by TUNEL assay. Finally, DNA condensation is analyzed using a single cell DNA gel electrophoresis assay that indicates DNA compaction. This monograph aims to correlate the various tests used to detect damaged spermatozoa under cryopreservation methods, searching for improve the predictive value of semen analysis with the intention of a successful conception.

Keywords: cryopreservation; semen; fluorescent probes; damage; spermatozoa

Sumário

1	INTRODUÇÃO	6
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	9
2.1	A célula espermática	9
2.2	Membrana plasmática	10
2.3	Capacitação Espermática e Reação Acrossomal	11
2.4	Integridade mitocondrial do espermatozóide.....	16
2.5	Integridade do DNA espermático	18
3	CONCLUSÃO.....	21
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	22

1 INTRODUÇÃO

A criopreservação do sêmen eqüino adquiriu grande importância na eqüinocultura e vem se expandindo nas últimas décadas devido a inúmeras vantagens que este método proporciona como o transporte e armazenamento de material genético de garanhões por períodos variados, o controle de doenças, o melhor aproveitamento do garanhão, o melhoramento genético das raças, a elevação da taxa de concepção e a redução de injúrias durante a cobertura (NASCIMENTO, 2006).

Porém, o uso da monta natural e inseminação artificial com sêmen fresco e refrigerado apresentaram resultados superiores com relação à prenhez se comparado a utilização de sêmen congelado (COTTORELLO; HENRY, 2002). Isso ocorre porque o processo de congelamento do sêmen proporciona alterações na integridade e na funcionalidade das células espermáticas, tais como danos à membrana plasmática e acrossomal e alterações na função mitocondrial, devido à desorganização da bicamada lipídica que compõe a membrana espermática. Além disso, há outros prejuízos às células, como ausência de motilidade, modificação na morfologia do espermatozóide, alterações na cromatina e na permeabilidade das membranas devido à sua desorganização e geração de espécies reativas de oxigênio (CELEGHINI et al., 2008; WATSON, 2000). As causas destes danos aos espermatozoides são referentes aos estresses causados pelo procedimento de criopreservação do sêmen, tais como a mudança de temperatura a qual as células são submetidas, o estresse osmótico e tóxico causado pela adição do crioprotetor e a formação de gelo e posterior liquefação durante os procedimentos de congelamento e descongelamento (WATSON, 2000).

Para a efetiva fertilização do oócito pelo espermatozóide, é necessário que ocorra uma série de modificações da célula espermática, tais como a obtenção do estado de hiperativação, a habilidade de

capacitação e a ligação à zona pelúcida do oócito (GILLAN et al., 2005). Para tanto, a célula deve apresentar membranas funcionais e íntegras, e suas organelas, o acrossomo e o DNA têm de permanecer intactos (SILVA & GADELLA, 2006).

Tradicionalmente, a análise do sêmen congelado envolve a mensuração da motilidade dos espermatozóides (através de análise subjetiva com o uso de um microscópio ou então análise computadorizada) incluindo movimentos progressivos, a velocidade do movimento espermático, a porcentagem de espermatozóides sem alterações morfológicas e o cálculo da concentração espermática contida na palheta (GILLAN et al., 2005; VARNER, 2008). Porém, apenas estes ensaios não apresentam uma correlação satisfatória com a capacidade de fertilização do espermatozóide. GRONDAHL et al, (1994) afirmam que a integridade da membrana espermática é crucial para a fertilização.

A descoberta de grande variedade de fluorocromos e compostos conjugados com sondas fluorescentes possibilitaram uma análise mais acurada da qualidade do sêmen a nível bioquímico e funcional. Muitas análises dos diferentes compartimentos dos espermatozóides têm sido realizadas e para cada um deles são usados determinados tipos de sondas com os fluorocromos específicos. As células podem ser examinadas através de microscópios de fluorescência ou do citômetro de fluxo, que permite uma maior acurácia e rapidez na avaliação dos atributos espermáticos em larga escala por analisar um elevado número de células em poucos minutos. (GILLAN et al., 2005).

Sendo assim, o objetivo deste trabalho de conclusão de curso é mostrar as novas técnicas desenvolvidas para o aperfeiçoamento da avaliação do sêmen de espécies domésticas através da avaliação da integridade da membrana plasmática e acrossomal, da cromatina e do potencial de membrana mitocondrial. Estas técnicas têm se mostrado

essenciais para uma análise completa e satisfatória da qualidade do sêmen.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 *A célula espermática*

Os espermatozoides são células alongadas, recobertas em toda sua extensão pela membrana plasmática. Apresentam uma cabeça achatada contendo o núcleo que possui cromatina altamente condensada, composta de ácido desoxirribonucleico (DNA) unido a uma classe especial de proteínas básicas, as protaminas. O número de cromossomos é haplóide. A extremidade anterior do núcleo espermático é recoberta pelo acrossomo, uma estrutura com parede dupla que envolve o núcleo, situado entre a membrana plasmática e a porção anterior da cabeça. O acrossomo contém acrosina, hialuronidase e outras enzimas hidrolíticas envolvidas no processo de fertilização. A região equatorial, juntamente com a porção anterior da região pós-acrossômica têm importante participação na fertilização, pois se fundem com a membrana do oócito durante a fertilização.

A cauda é responsável pela motilidade celular. Ela é composta pelo colo e peças intermediária, principal e terminal. O colo se insere em uma depressão na superfície posterior ao núcleo. A região entre o colo e o *annulus* é a peça intermediária, cuja parte central junto com o comprimento total da cauda, forma o axonema. Este é composto de nove pares de microtúbulos dispostos radialmente ao redor de dois filamentos centrais, sendo que na peça intermediária esses arranjos de microtúbulos estão circundados por densas fibras que podem estar associadas com os nove pares do axonema. Numerosas mitocôndrias em forma de hélice envolvem essas fibras, gerando a energia necessária para a motilidade espermática.

A peça principal continua posteriormente ao *annulus* e se estende até a parte terminal da cauda. É composta pelo axonema e sua associação de fibras. Uma camada fibrosa fornece estabilidade para os elementos contráteis da cauda.

A peça terminal contém o axonema central recoberto pela membrana plasmática, sendo este o responsável pela motilidade espermática (GARNER & HAFEZ, 2004).

2.2 Membrana plasmática

A membrana plasmática envolve todo o espermatozóide. É constituída por lipídios, proteínas e carboidratos. Esta estrutura é essencial para a regulação das funções espermáticas, tais como a manutenção do gradiente de íons, permissão ou não da entrada de moléculas para o citosol e organização de vários eventos celulares (VARNER, 2008). Se a membrana plasmática não se encontra intacta, e, portanto, não há funcionalidade desta estrutura, o espermatozóide é considerado morto, e não é capaz de fertilizar o oócito. Desta forma é essencial a avaliação da integridade da membrana (SILVA & GADELLA, 2006). Uma vasta quantidade de corantes impermeáveis à membrana está disponível comercialmente e podem ser usados para testar a sua integridade. Como exemplos, podem ser citados os corantes de DNA iodeto de propídio, bis-benzimide (Hoechst 33258), YO-PRO®-1, TOTO®-1, Brometo de Etídio e ToPro®3 (VARNER, 2008; SILVA & GADELLA, 2006). Estes corantes só são capazes de penetrar as membranas lesadas, marcando, portanto, células consideradas mortas.

Outro método que pode ser usado para analisar a integridade da membrana é o uso de corantes que perdem um grupo acil ao penetrar a célula. Essas sondas são anfipáticas e então passam através da

membrana intacta corando as células viáveis. As sondas que entraram nas células são imediatamente deaciladas por esterases intracelulares deixando-as impermeáveis e tornando-as fluorescentes. Então, as células vivas permanecerão com as sondas em seu interior, enquanto que as células deterioradas com membranas lesadas não apresentarão a sonda. São exemplos o diacetato de fluoresceína, carboxi(metil)fluoresceína e a calceína, a qual forma complexos fluorescentes com o cálcio e outros metais. Recentemente, uma nova sonda foi adicionada à análise das membranas, a SYBR-14. Ao entrar na célula, a perda do grupo acil da SYBR-14 resulta em sua ligação com o DNA, tornando-se fluorescente. É possível corar células vivas com SYBR-14 (fluorescência verde) e células deterioradas com Brometo de Etídio ou Iodeto de Propídio (fluorescência vermelha) simultaneamente. Esta combinação de corantes forma o kit de viabilidade espermática “LIVE/DEAD”, que é útil ao se trabalhar com sêmen descongelado (SILVA & GADELLA, 2006). O uso deste kit proporciona três tipos de população de espermatozóides: (1) com membrana intacta, corados com SYBR-14 (verde); (2) com membrana lesada, corados com Iodeto de Propídio (vermelho) e (3) células agonizantes (coradas em verde e vermelho). Em um estudo, a porcentagem de espermatozóides de eqüinos móveis (através de análise computadorizada) foi altamente correlacionada com a porcentagem de células com membrana plasmática intacta, baseado em coloração com SYBR-14 e Iodeto de Propídio (VARNER, 2008).

2.3 Capacitação Espermática e Reação Acrossomal

O conjunto de mudanças fisiológicas que possibilitam a fertilização entre o espermatozóide e o oócito é chamado de “capacitação”. Esta envolve uma série de eventos, tais como a remoção do colesterol da sua

membrana proporcionando o aumento da sua fluidez, o transporte de íons através da célula, sinalizações intracelulares através de segundos mensageiros, migração das proteínas de membrana, produção de espécies reativas de oxigênio, exteriorização de receptores e fosforilação do aminoácido tirosina (VISCONTI & KOPF, 1998). As alterações na proporção colesterol/ fosfolípidios na membrana espermática fazem com que esta fique instável, possibilitando que haja fusão entre a membrana acrossomal externa e a membrana plasmática, culminando na reação acrossomal (LANDIM-ALVARENGA et al., 2001); este processo é cálcio-dependente e resulta na ativação das enzimas hidrolisantes (CHENG et al., 1996), e exposição dos receptores de membrana, os quais são requeridos para a penetração do espermatozóide através da zona pelúcida e para a fusão com o oolema (ESTEVES et al. 2007).

Segundo CHENG et al.(1996), como a capacitação e a reação acrossomal são essenciais para a fertilização e ocorrem antes da penetração na zona pelúcida, a incidência destas reações proporciona uma avaliação funcional do espermatozóide, bem como sua capacitação. A reação acrossomal precoce resulta em espermatozoides inférteis, o que torna importante a avaliação da integridade acrossomal antes das técnicas de reprodução assistida (SILVA & GADELLA, 2006).

Vários métodos podem ser usados para se analisar a integridade acrossomal, mas o mais comum é o uso da lecitina encontrada nas plantas marcada com uma sonda fluorescente. Este conjugado se liga às glicoproteínas que estão localizadas exclusivamente no acrossomo. Dentre as mais utilizadas está a lecitina proveniente da ervilha, *Pisum sativum* agglutinin (PSA) que se liga à porção α -mannose e α -galactose da matriz acrossomal (GILLAN et al., 2005). Como o PSA não penetra na membrana acrossomal intacta, apenas o acrossoma reagido ou o espermatozóide lesado vão se corar (CROSS et al., 1986). Outra lecitina muito usada é a do amendoim, *Arachis hypogaea* agglutinin (PNA) que

se liga à porção β -galactose associada com a membrana acrossomal externa do espermatozóide. (MORTIMER et al., 1987). GRAHAM (2001) acredita que o PNA tem menor propensão a se ligar a outras áreas do espermatozóide que não seja a membrana acrossomal externa, sendo, portanto, mais específica.

As lecitinas específicas que se ligam ao acrossomo podem ser conjugadas com uma série de fluorescências, dentre as quais PNA-FITC, PNA-TRITC e o PNA-RPE estão descritas na literatura. A detecção é feita em células vivas; a ausência de fluorescência indica acrossoma intacto e a fluorescência é indicativa de ruptura do acrossomo ou reação acrossomal (SILVA & GADELLA, 2006). Quando a coloração é feita com FITC-PNA, três principais padrões são detectados no espermatozóide ligado à zona pelúcida: 1) intenso, com fluorescência uniforme por toda a capa acrossomal; 2) variando em graus de mosqueado ou padrão irregular por toda a região acrossomal ou fluorescência apenas na região equatorial; 3) sem fluorescência. Se o complexo espermatozóide-hemizona for permeabilizado antes da fixação, esses padrões são caracterizados como acrossomo intacto, acrossomo em reação e acrossomo reagido, respectivamente. Este mesmo complexo usado sem prévia permeabilização é designado acrossomo em reação, acrossoma reagido e acrossomo intacto, respectivamente. Com esta técnica é possível mostrar o grau da reação acrossomal do espermatozóide que se ligou à zona pelúcida em dado momento (FAZELI et al., 1997).

A natureza ácida do acrossomo intacto sugere que sondas acidofílicas como a Lysotracker GreenTM podem ser usadas para acessar a integridade acrossomal, já que esta é usada para organelas ácidas como o acrossomo. (THOMAS, 1997).

O estado de capacitação tem sido analisado via alterações mediadas por cálcio através do uso do antibiótico fluorescente

Clortetraciclina (CTC), aumentando consideravelmente a sua fluorescência ao se ligar a um cátion bivalente em um meio apolar (SALING & STOREY, 1979). A CTC atravessa a membrana celular do espermatozóide e entra nos compartimentos intracelulares contendo cálcio livre. Após a entrada, a CTC apresenta-se com carga negativa e se liga ao cálcio, tornando-se mais fluorescente. O complexo CTC- Cálcio se liga preferencialmente a uma região hidrofóbica, como a membrana celular, resultando em padrões de coloração para espermatozóide não capacitado (F-), capacitado (B-) e acrossomo reagido (padrão AR) (GILLAN et al., 2005). As observações dos padrões de coloração do CTC podem ser feitas através do uso da microscopia de luz (SALING & STOREY, 1979) ou adaptado ao citômetro de fluxo (MAXWELL & JOHNSON, 1997). Um espermatozóide intacto não-capcitado resulta em membrana plasmática padrão F-, uma coloração por toda a cabeça espermática. Este padrão muda para B- no caso de espermatozóides capacitados, com uma coloração mais proeminente na região apical da cabeça do espermatozóide e com menor intensidade em sua região posterior. Finalmente, o padrão AR ocorre indicando que foi induzida a reação acrossomal. Estas células apresentam perda da coloração característica do CTC na área apical da cabeça, provavelmente pela remoção das vesículas da membrana plasmática do acrossomo geradas durante a reação acrossomal (SALING & STOREY, 1979). Atualmente, o CTC é rotineiramente usado para se analisar simultaneamente a incidência da capacitação espermática e reação acrossomal (LEE et al., 1987).

Acredita-se que o aumento intracelular de cálcio livre é associado com a capacitação, e este pode ser detectado através do uso de moléculas que penetrem os compartimentos aquosos e mudam seu espectro quando ligados ao cálcio, por exemplo, o fluo-3-AM (LANDIM-ALVARENGA et. al, 2004). O uso do fluo-3 detectado pelo citômetro de

fluxo mostrou que o espermatozóide bovino refrigerado lentamente e reaquecido posteriormente exibiu aumento no cálcio intracelular que foi similar aos espermatozóides capacitados. (GREEN & WATSON, 2001).

Um método alternativo para a avaliação da capacitação espermática é através do uso da sonda hidrofóbica Merocyanina 540 (M540), responsável por corar as membranas celulares mais intensamente se seus componentes lipídicos estão em grande desordem. Acredita-se que esta sonda detecta um decréscimo na taxa de fosfolipídios da porção externa da dupla camada lipídica da membrana plasmática (WILLIAMSON et al., 1983), fato que parece ocorrer no espermatozóide capacitado. Estudos indicam que a alteração na fluidez da membrana detectada pela M540 precede o influxo de cálcio detectado pelo CTC, o que a torna um melhor método para se avaliar os eventos precoces da capacitação (RATHI et al., 2001).

A Anexina V é uma proteína ligante da fosfatidilserina cálcio-dependente. Quando conjugada a um fluorocromo como o FITC, a Anexina V permite reconhecimento das células com exposição da fosfatidilserina (GADELLA et al., 1999). Igualmente, o marcador Ro-09-0198 pode ser usado para detectar a exposição da fosfatidiletanolamina na superfície da célula. A exposição destes fosfolipídios na superfície é considerada uma representação da capacitação espermática, porque eles geralmente se encontram na porção citoplasmática da bicamada lipídica em espermatozóides não- capacitados. Foram usados o FITC-Anexina V e o marcador Ro-09-0198 para demonstrar que o bicarbonato induz a exposição da fosfatidilserina e fosfatidiletanolamina na superfície do espermatozóide suíno e humano (SILVA & GADELLA, 2006).

A peroxidação lipídica pode ser quantificada e localizada depois de se marcar o espermatozóide com uma sonda própria, a C₁₁BODIPY^{581/591} que é um análogo fluorescente dos ácidos graxos insaturados, o principal

alvo das espécies reativas de oxigênio. Essencialmente, este corante muda suas propriedades fluorescentes depois da peroxidação. A sonda intacta apresenta fluorescência vermelha e se torna verde quando peroxidada pelas espécies reativas de oxigênio e laranja quando peroxidada por peroxinitrito (DRUMMEN et al., 2004). Esta alteração na emissão de coloração verde ou laranja indica a presença de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio na porção hidrofóbica da bicamada lipídica das membranas dos espermatozoides. A proporção de fluorescência verde e laranja versus a fluorescência total (indicativo do grau de peroxidação da sonda) se correlaciona bem com o grau da peroxidação de fosfolipídios endógenos como mensurado com espectrometria de massa (BROUWERS; GADELLA, 2003). Esta taxa de peroxidação pode ser realizada em subpopulações espermáticas usando o citômetro de fluxo ou localizada em cada célula usando microscópio “life cell imaging”. Foi observado que o $C_{11}BODIPY^{581/591}$ é preferencialmente peroxidado na peça intermediária e nas gotas citoplasmáticas (BROUWERS et al., 2005). Isto se deve principalmente a disfunções na respiração mitocondrial.

2.4 Integridade mitocondrial do espermatozoide

As mitocôndrias dos espermatozoides estão localizadas na peça intermediária e produzem ATP por fosforilação oxidativa. Estas organelas fornecem ao espermatozoide o ATP necessário para manter suas funções. Dentre estas, a manutenção do gradiente de sódio/potássio na membrana plasmática é uma das mais importantes. A sódio/potássio ATPase está envolvida indiretamente na condução de outros transportadores e também regula o gradiente químico e elétrico da membrana plasmática. A integridade funcional da mitocôndria também é

importante para a sobrevivência do espermatozóide no trato genital feminino (SILVA; GADELLA, 2006).

A mitocôndria pode ser corada com corantes específicos. O Rhodamine 123 (R123) é usado para corar seletivamente as mitocôndrias funcionais. O princípio desta sonda é que ela só fluoresce em vermelho quando o gradiente de prótons da membrana mitocondrial interna está ativo. Este gradiente de prótons é resultado de uma cadeia de carreadores de elétrons ativos e é ligado à fosforilação oxidativa: os prótons fluindo através da ATP sintetase para a matriz mitocondrial estão conduzindo à produção de ATP. Na mitocôndria não corada, o gradiente de prótons estará diminuído e conseqüentemente a produção aeróbia de ATP, interrompida. Então, espermatozóides não corados não contêm mitocôndrias ativas, enquanto que as células coradas são aerobicamente funcionais (GARNER et al., 1997).

Também são usadas as sondas Mitotracker Deep Red™, Mitotracker Red™, Mitotracker Orange™ e Mitotracker Green™, que são marcadores seletivos de mitocôndrias em processo de produção de oxigênio. A Mitotracker Orange CM-H₂TMROS e a Mitotracker X-Rosamine CM-H₂XROS se tornam fluorescentes após a oxidação em um processo que só ocorre após a respiração oxidativa. Como este processo é relevante apenas em mitocôndrias funcionais, essas sondas são apropriadas para diferenciar espermatozóide com mitocôndrias deterioradas de espermatozóides aptos aerobicamente (GILLAN et al., 2005).

O corante mitocondrial “5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazolyl-carbocyanine iodide” (JC-1) permite uma distinção entre espermatozóides que apresentam mitocôndrias deficientes ou altamente funcionais. O JC-1 é um corante de carbocianina catiônico fluorescente lipofílico que é internalizado por todas as mitocôndrias

funcionais, que fluoresce em verde. Em uma mitocôndria altamente funcional, a concentração de JC-1 no seu interior aumenta e o corante forma agregados que fluorescem em laranja (GARNER et al., 1997).

2.5 Integridade do DNA espermático

A integridade do DNA paterno é de crucial importância para o desenvolvimento do embrião. O grau de dano ao DNA é claramente correlacionado com o prejuízo do desenvolvimento do embrião e um dano severo ao DNA causa a infertilidade do macho (SELI, 2004). Entretanto, alguns experimentos mostraram que espermatozóides com severos prejuízos no DNA apresentaram funcionalidade nas membranas e organelas, bem como nos parâmetros de motilidade. De fato, as células espermáticas com DNA lesado mostraram ligação normal à zona pelúcida e os índices de fertilização e clivagem foram satisfatórios. Entretanto, nos estágios de quatro a oito células é iniciada a apoptose (FATEHI et al., 2006) no momento da ativação do genoma embrionário.

A condição do DNA do espermatozóide pode ser determinada através do uso das propriedades metacromáticas do Acridina Orange (AO) no ensaio da estrutura da cromatina espermática – “Sperm Chromatin Structure Assay” (SCSA®). A estrutura da cromatina do DNA é muito resistente à denaturação em espermatozóides com desenvolvimento normal. Entretanto, o DNA da célula espermática com estrutura anormal da cromatina é suscetível à denaturação e o grau dessa anormalidade pode ser detectado através do uso do SCSA®. O Acridina Orange se intercala nos filamentos duplos de DNA fluorescendo em verde, enquanto que os filamentos simples de DNA (denaturado) fluorescem em vermelho. A proporção do vermelho sobre a fluorescência total pode ser determinada pela citometria de fluxo para prover um índice

de normalidade/anormalidade. O SCSA® mostrou boa correlação com a fertilidade em várias espécies (bovino, humano e roedor) (EVENSON, 1980).

Outro método para a detecção de dano ao DNA é possibilitar a incorporação enzimática de análogos de nucleotídeos fluorescentes através da sua ligação em áreas terminais de filamentos simples de DNA. Este ensaio é o TUNEL, no qual células espermáticas fluorescentes contém filamentos simples de DNA marcado por dUTP (“terminal deoxynucleotidyl transferase- mediated deoxyuridine triphosphae in situ DNA Nick-end labeling”). (SELI, 2004). A proporção de células marcadas com TUNEL aparenta ter alta correlação com os baixos índices de prenhez ao se utilizar as técnicas de reprodução assistida (BENCHAIIB, 2003).

A condensação do DNA é importante porque o torna estável e também menos vulnerável a danos oxidativos. Através do uso de um ensaio com gel de eletroforese para se analisar o DNA, o COMET, pode-se fazer uma distinção entre o DNA de um núcleo de espermatozóide condensado normalmente marcado por fluorescência (mínima migração) e DNA menos condensado (resíduo de DNA) depois da migração pelo gel de agarose devido a um estímulo elétrico (CHO et al., 2003). No espermatozóide com DNA menos condensado ocorre migração desigual dos fragmentos de DNA, formando no gel uma estrutura semelhante a um cometa.

As protaminas são as proteínas mais importantes envolvidas na condensação final do DNA espermático (BREWER, 2003). A Chromomicina A3 pode ser usada para acompanhar as últimas etapas da compactação do DNA com as protaminas. Esta sonda fluorescente se liga ao DNA desassociado das protaminas nas regiões específicas de Guanina-Citosina, mas falha ao fazê-lo após a combinação do DNA com a

molécula de protamina (BIANCHI, 1993). Esta sonda é usada para detectar defeitos de protaminação do espermatozóide, o que ocorre durante a espermiogênese (SAKKAS et al., 1995).

3 CONCLUSÃO

Nas técnicas de reprodução assistida, como a inseminação artificial, o sêmen não é introduzido diretamente no trato reprodutivo da fêmea no momento da ejaculação, mas passa por uma série de etapas, as quais podem causar danos ao DNA espermático, bem como em suas membranas e organelas. Para se obter melhores resultados de fertilização, é necessário analisar a qualidade do sêmen antes de usá-lo nas técnicas de reprodução assistida (SILVA & GADELLA, 2006).

Porém, as análises do sêmen realizadas rotineiramente têm valor prognóstico limitado no que diz respeito ao potencial de fertilização do espermatozóide. Os parâmetros funcionais dos oócitos e dos espermatozóides são importantes na fertilização. Os oócitos devem estar no estágio ideal de maturidade. Os fatores relacionados à célula espermática incluem motilidade, integridade de membrana, habilidade para se ligar à zona pelúcida, atividade da acrosina, habilidade de fusão da membrana, além da reação acrossomal, que é de essencial importância (ESTEVEZ et al., 2007).

Assim, análises mais amplas das populações de espermatozóides das espécies domésticas têm aperfeiçoado o valor prognóstico dos processos de avaliações. De fato, testes adicionais que parecem ser de valor diagnóstico estão atualmente sendo incorporados aos procedimentos de exames do sêmen em alguns laboratórios de referência (VARNER, 2008).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BENCHAIIB, M.; BRAUN, V.; LORNAGE, J.; HADJ, S.; SALLE, B.; LEJEUNE, H., et al. Sperm DNA fragmentation decreases the pregnancy rate in an assisted reproductive technique. **Human Reproduction**, v.18, p.1023-1028, 2003.

BIANCHI, P.G.; MANICARDI, G.C.; BIZZARO, D.; BIANCHI, U.; SAKKAS, D. Effect of deoxyribonucleic acid protamination on fluorochrome staining and in situ nick-translation of murine and human mature spermatozoa. **Biology of Reproduction**, v.49, p. 1083-1088, 1993.

BREWER, L.; CORZETT, M.; LAU, E.Y.; BALHORN, R. Dynamics of protamine 1 binding to single DNA molecules. **Journal of Biological Chemistry**, v.278, p. 42403-42408, 2003.

BROUWERS, J.F.; GADELLA, B.M. In situ detection and localization of lipid peroxidation in individual bovine sperm cells. **Free Radical Biology & Medicine**, v.35, p.1382-1391, 2003.

BROUWERS, J.F.; SILVA, P.F.; GADELLA, B.M. New assays for detection and localization of endogenous lipid peroxidation products in living boar sperm after BTS dilution or after freeze-thawing. **Theriogenology**, v.63, p.458-469, 2005.

CELEGHINI, E.C.C.; ARRUDA, R.P.; ANDRADE, A.F.C.; NASCIMENTO, J.; RAPHAEL, C.F.; RODRIGUES, P.H.M.. Effects that bovine sperm cryopreservation using two different extenders has on sperm membranes and chromatin. **Animal Reproduction Science**, v.104, p. 119-131, 2008.

CHENG, F-P.; FAZELI, A.; VOORHOUT, W.F.; MARKS, A.; BEVERS, M.; COLENBRANDER B. Use of peanut agglutinin to assess the acrosomal status and the zona pellucid- induced acrosome reaction in stallion spermatozoa. **Journal of Andrology**, v. 17, n.6, 1996.

CHO, C.; JUNG-HA, H.; WILLIS, W.D.; GOULDING, E.H.; STEIN, P.; XU, Z., et al. Protamine 2 deficiency leads to sperm DNA damage and embryo death in mice. **Biology of Reproduction**, v.69, p.211-217, 2003.

COTTORELLO, A.C.P.; HENRY, M. Princípios da criopreservação, congelamento e avaliação do sêmen equino (Revisão de Literatura). **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v.26, n.1, p. 14-25, 2002.

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.

DRUMMEN, G.P.; GADELLA, B.M.; POST, J.A.; BROUWERS, J.F. Mass spectrometric characterization of the oxidation of the fluorescent lipid

peroxidation reporter molecule C11-BODIPY(581/591). **Free Radical Biology & Medicine**, v.36, p.1635-44, 2004.

ESTEVEES, S.C.; SHARMA, R.K.; THOMAS JR, A.J.; AGARWAL A. Evaluation of acrosomal status and sperm viability in fresh and cryopreserved specimens by the use of fluorescent peanut agglutinin lectin in conjunction with hypo-osmotic swelling test. **International Braz J Urol**, v. 33, n.3, p. 364-376, 2007.

EVENSON, D.P.; DARZYNKIEWICZ, Z.; MELAMED, M.R. Relation of mammalian sperm chromatin heterogeneity to fertility. **Science**, v.210, p. 1131-1133, 1980.

FATEHI,A.N.; BEVERS, M.M.; SCHOEVEERS, E.; ROELEN, B.A.J.; COLENBRANDER, B.; GADELLA, B.M. DNA damage in bovine sperm cells does not block fertilization but induces apoptosis after the first cleavages. **Journal of Andrology**, 2006.

FAZELI, A.; HAGE, W.J.; CHENG, F.P.; VOORHOUT, W.F.; MARKS, A.; BEVERS, M.M. et al. Acrosome-intact boar spermatozoa initiate binding to the homologous zona pellucida in vitro. **Biology of Reproduction**, v.56, p.430-438, 1997.

GADELLA, B.M.; MILLER, N.G.A.; COLENBRANDER, B.; VAN GOLDE, L.M.G.; HARRISON, R.A.P. Flow cytometric detection of transbilayer movement of fluorescent phospholipid analogues across the boar sperm plasma membrane: elimination of labelling artefacts. **Molecular Reproduction and Development**, v.53, p. 108-125, 1999.

GARNER, D.L.; HAFEZ, E.S.E. Espermatozóides e Plasma Seminal. In: -----, **Reprodução Animal**. 7 ed. Barueri: Manole, 2004. p. 97 – 110.

GARNER, D.L.; THOMAS, C.A.; JOERG, H.W.; DEJARNETTE, J.M.; MARSHALL, C.E. Fluorometric assessments of mitochondria function and viability in cryopreserved bovine spermatozoa. **Biology of Reproduction**, v. 57, p.1401-1406, 1997.

GILLAN, L.; EVANS, G.; MAXWELL, W.M.C. Flow cytometric evaluation of sperm parameters in relation to fertility potential. **Theriogenology**, v. 63, p. 445-457, 2005.

GRAHAM, J.K. Assessment of sperm quality: a flow cytometric approach. **Animal Reproduction Science**, v.68, p.239-247, 2001.

GREEN, C.E.; WATSON, P.F. Comparison of the capacitation-like state of cooled boar spermatozoa with true capacitation. **Reproduction**, v. 122, p.889-898, 2001.

GRONDAHL, C.; GRONDAHL, M.L.; HYTTEL, P.; GREVE, T. Acrosomal status in fresh and frozen/thawed stallion spermatozoa evaluated by scanning electron microscopy. **Anatomy and Embryology**, Berlin, v.190, n.2, p. 195-200, 1994.

LANDIM-ALVARENGA, F.C.; ALVARENGA, M.A.; SEIDEL JR., G.E.; SQUIRES, E.L.; GRAHAM, J.K. Penetration of zona-free hamster, bovine and equine oocytes by stallion and bull spermatozoa pretreated with equine follicular fluid, dilauroylphosphatidylcholine or calcium ionophore A23187. **Theriogenology**, v.56, p.937-953, 2001.

LANDIM-ALVARENGA, F.C.; GRAHAM, J.K.; ALVARENGA, M.A.; SQUIRES, E.L. Calcium influx into equine and bovine spermatozoa during *in vitro* capacitation. **Animal Reproduction**, v.1, n.1, p.96-105, 2004.

LEE, M.A.; KOPF, G.S.; STOREY, B.T. Effects of phorbol esters and a diacylglycerol on the mouse sperm acrosome reaction induced by the zona pellucida. **Biology of Reproduction**, v.36, p.617-627, 1987.

MAXWELL, W.M.C.; JOHNSON, L.A. Chlortetracycline analysis of boar spermatozoa after incubation, flow cytometric sorting, cooling, or cryopreservation. **Molecular Reproduction and Development**, v.46, p.408-418, 1997.

MORTIMER, D.; CURTIS, E.F.; DRAVLAND, J.E. Specific labelling by peanut agglutinin of the outer acrosomal membrane of the human spermatozoon. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.81, p. 127-135, 1987.

NASCIMENTO, J. **Efeitos da concentração espermática e volume sobre as características do movimento espermático e sobre membranas plasmática, acrosomal e mitocondrial de espermatozoides eqüinos criopreservados**. 2006. 107 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos – Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2006.

RATHI, R.; COLENBRANDER, B.; BEVERS, M.M.; GADELLA, B.M. Evaluation of *in vitro* capacitation of stallion spermatozoa. **Biology of Reproduction**, v.65, p.462-470, 2001.

SAKKAS, D.; MANICARDI, G.; BIANCHI, P.G.; BIZZARO, D.; BIANCHI, U. Relationship between the presence of endogenous nicks and sperm chromatin packaging in maturing and fertilizing mouse spermatozoa. **Biology of Reproduction**, v.52, 1149-1155, 1995.

SALING, P.M.; STOREY, B.T. Mouse gamete interactions during fertilization in vitro Chlortetracycline as a fluorescent probe for the mouse sperm acrosome reaction. **Journal of Cell Biology**, v.83, p.544-555, 1979.

SELI, E.; GARDNER, D.K.; SCHOOLCRAFT, W.B.; MOFFATT, O.; SAKKAS, D. Extent of nuclear DNA damage in ejaculated spermatozoa impacts on blastocyst

development after in vitro fertilization. **Fertility and Sterility**, v.82, p.378-383, 2004.

SILVA, P.F.N.; B.M. GADELLA. Detection of damage in mammalian sperm cells. **Theriogenology**, v. 65, p. 958-978, 2006.

THOMAS, C.A.; GARNER, D.L.; DEJARNETTE, J.M.; MARSHALL, C.E. Fluorometric assessments of acrosomal integrity and viability in cryopreserved bovine spermatozoa. **Biology of Reproduction**, v.56, p.991-998, 1997.

VARNER, D.D. Developments in stallion semen evaluation. **Theriogenology**, v.70, p. 448-462, 2008.

VISCONTI, P.E.; KOPF, G.S. Regulation of protein phosphorylation during sperm capacitation. **Biology of Reproduction**, v.59, p.1-6, 1998.

WATSON, P.F. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. **Animal Reproduction Science**, v.60-61, p. 481-492, 2000.

WILLIAMSON, P.; MATTOCKS, K.; SCHLEGAL, R.A. Merocyanine 540, a fluorescent probe sensitive to lipid packaging. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 732, p.387-393, 1983.