

**Técnica de coloração com *peanut agglutinin* (PNA) – isoticianato de fluoresceína (FITC) para avaliação de integridade do acrossoma de espermatozoides bovinos**



*Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária  
Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia  
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento*

## **Documentos**328

**Técnica de coloração com *peanut agglutinin* (PNA) –  
isotocianato de fluoresceína (FITC) para avaliação de  
integridade do acrossoma de espermatozoides bovinos**

*José de Oliveira Carvalho Neto  
Margot Alves Nunes Dode*

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

**Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia**

Endereço: Parque Estação Biológica - PqEB - Av. W5 Norte  
Caixa Postal 02372 - Brasília, DF - Brasil - CEP: 70770-917  
Fone: (61) 3448-4700  
Fax: (61) 3340-3624  
*Home page:* <http://www.cenargen.embrapa.br/>  
*E-mail (sac):* [sac@cenargen.embrapa.br](mailto:sac@cenargen.embrapa.br)

**Comitê Local de Publicações (CLP)**

Presidente: *Lúcio Brunale*  
Secretária-Executiva: *Lígia Sardinha Fortes*  
Membros: *José Roberto de Alencar Moreira*  
*Diva Maria de Alencar Dusi*  
*Regina Maria Dechechi G. Carneiro*  
*Samuel Rezende Paiva*  
*Jonny Everson Scherwinski Pereira*  
Suplentes: *João Batista Tavares da Silva*  
*Margot Alves Nunes Dode*

Revisor de texto: *José Cesamildo Cruz Magalhães*  
Normalização bibliográfica: *Lígia Sardinha Fortes*  
Editoração eletrônica e capa: *Rafaela Marcondes Oliveira*

1ª edição (*on line*)

**Todos os direitos reservados.**

A reprodução não autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei n 9.610).

As opiniões nesta publicação são de exclusiva e de inteira responsabilidade dos autores, não exprimindo, necessariamente, o ponto de vista da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa), vinculada ao Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento.

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)**  
**Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia**

---

Carvalho Neto, José de Oliveira.

Técnica de coloração com peanutagglutinin (PNA) – isoticianato de fluoresceína (FITC) para avaliação de integridade do acrossoma de espermatozoides bovinos. / José de Oliveira Carvalho Neto e Margot Alves Nunes Dode. – Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2010.

22.p. – (Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Documentos, 328)

1. Bovino. 2. Espermatozoides – avaliação de integridade. 3. Técnica de coloração. I. Dode, Margot Alves Nunes. II. Título. III. Série.

636.08 – CDD 21

# **Autores**

**José de Oliveira Carvalho Neto**

Universidade de São Paulo

joseocneto@hotmail.com

**Margot Alves Nunes Dode**

Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

margot@cenargen.embrapa.br



# Apresentação

A avaliação espermática tem como objetivo principal prever o potencial de fertilidade de um indivíduo, determinar, entre vários indivíduos, aqueles com maior fertilidade e estabelecer características confiáveis que possam ser utilizadas como indicadores de fertilidade. Nesse sentido, a avaliação da integridade do acrossoma é um parâmetro que deve ser considerado na análise de sêmen, pois fornece informações importantes sobre a qualidade espermática.

Sendo assim, esta publicação tem por objetivo apresentar e descrever a técnica de coloração com peanut agglutinin (PNA) – isotocianato de fluoresceína (FITC) para avaliação da integridade acrossomal em espermatozoides bovinos. Isto pode gerar informações sobre a qualidade de uma amostra de sêmen, auxiliando em técnicas reprodutivas, tais como inseminação artificial e fecundação in vitro.

*Mauro Carneiro*  
Chefe Geral



# Sumário

<b>Introdução.....</b>	<b>10</b>
<b>Estrutura da célula espermática.....</b>	<b>10</b>
Cabeça.....	10
Cauda.....	11
<b>Importância da integridade acrossomal.....</b>	<b>11</b>
<b>Avaliação da integridade acrossomal.....</b>	<b>13</b>
<b>Material necessário.....</b>	<b>14</b>
<b>Preparo do material.....</b>	<b>14</b>
<b>Preparo da solução de trabalho.....</b>	<b>16</b>
<b>Estudo comparativo entre FITC-PNA e Azul de trypan e Giemsa.....</b>	<b>17</b>
<b>Considerações finais.....</b>	<b>19</b>
<b>Referências.....</b>	<b>20</b>

# Técnica de coloração com *peanut agglutinin* (PNA) – isotocianato de fluoresceína (FITC) para avaliação de integridade do acrossoma de espermatozoides bovinos

---

*José de Oliveira Carvalho Neto*  
*Margot Alves Nunes Dode*

## Introdução

A fertilidade do macho depende da integridade funcional e estrutural da célula espermática presente no ejaculado, que, por sua vez, reflete-se na capacidade dessas células de fecundar e, conseqüentemente, nas taxas de concepção do rebanho.

Rotineiramente, a avaliação da fertilidade de uma amostra é realizada pela análise física e morfológica do sêmen, que envolve concentração, motilidade, vigor e morfologia espermática. Entretanto, para ser capaz de fecundar um ovócito, o espermatozoide, além de ter morfologia e motilidade normais, precisa passar por dois importantes processos. O primeiro deles denomina-se capacitação espermática e consiste na remoção dos fatores decapacitantes da superfície da membrana plasmática (MP). Ao final da capacitação, a MP torna-se bastante instável e propensa a sofrer fusão com a membrana acrossomal externa, processo esse denominado de reação acrossômica. Estes eventos são essenciais para que ocorra a ligação e a passagem pela zona pelúcida durante a fecundação (YANAGIMACHI, 1994). Entretanto, a integridade, tanto da MP como do acrossoma, não pode ser avaliada pelos métodos convencionais de análise do sêmen. Sendo assim, o desenvolvimento de ensaios laboratoriais que contemplem outros aspectos da célula espermática tem sido o objetivo de diversos estudos, que visam uma melhor predição da fertilidade. Nesse sentido, a avaliação da integridade do acrossoma é um parâmetro que deve ser considerado na análise de sêmen, pois fornece informações importantes da qualidade espermática.

Portanto, a presente publicação tem por objetivo apresentar e descrever a técnica de coloração com *peanut agglutinin* (PNA) – isotocianato de fluoresceína (FITC) para avaliação da integridade acrossomal em espermatozoides bovinos.

## Estrutura da célula espermática

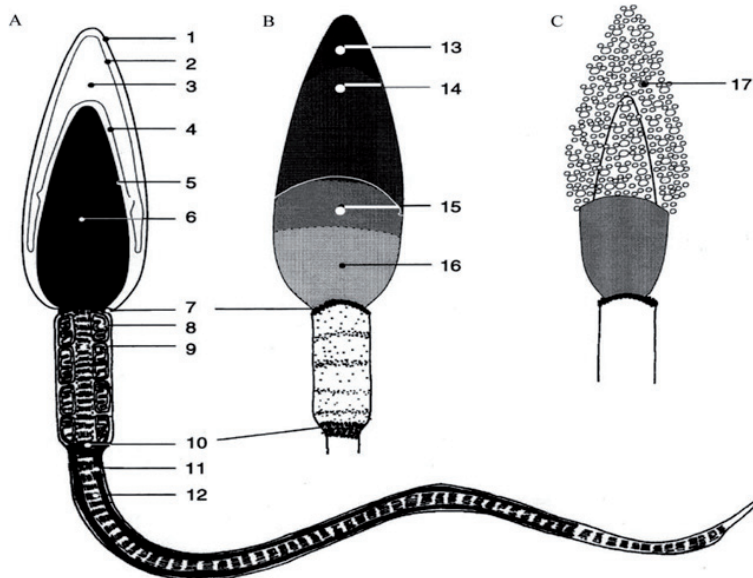
### Cabeça

O formato da cabeça e as dimensões do espermatozoide variam de acordo com a espécie. Nos bovinos e em outras espécies domésticas, a cabeça possui forma arredondada e achatada. A cabeça espermática consiste, em sua maior parte, de um núcleo envolvido pelo envelope nuclear, e formado por uma massa condensada de DNA, a cromatina (JOHNSON, 1994). Esta é sustentada inicialmente por histonas, ricas em lisina, que são substituídas pelas protaminas, ricas em cisteína (SETCHELL, 1993), o que ocorre principalmente na fase do acrossoma e maturação, durante a espermatogênese. Recobrimo até 2/3 da porção anterior da cabeça, entre o lado interno da MP e o núcleo, há o acrossoma, uma estrutura vesicular contendo enzimas hidrolíticas, tais como a hialuronidase e a acrosina (JOHNSON, 1994). Esta estrutura é de grande importância, pois é responsável pelas reações iniciais necessárias ao processo de fecundação (BARTH; OKO, 1989), auxiliando na penetração do espermatozoide no ovócito.

O acrossoma localiza-se sobre o núcleo, na porção anterior da cabeça do espermatozoide, sendo delimitado pela membrana acrossomal interna e membrana acrossomal externa. A membrana acrossomal interna fica em contato com a membrana nuclear, enquanto a membrana acrossomal externa está em contato com o lado interno da MP. Durante a reação acrossômica, a membrana acrossomal externa e a MP se fundem, formando

vesículas com a liberação do conteúdo acrossomal. A membrana acrossomal interna e o segmento equatorial persistem até a fusão do espermatozoide com o ovócito (FLESCHE; GADELLA, 2000), sendo o segmento equatorial a porção que se funde inicialmente com a membrana do ovócito durante a fecundação (GARNER; HAFEZ, 2004).

Na região pós-acrossomal encontra-se a parte posterior do núcleo e microtúbulos onde é formada a fossa de implantação ou o colo em que a cauda é inserida (BARTH; OKO, 1989).



**Figura 1.** Representação esquemática da célula espermática. A: Espermatozoide. B: regiões da cabeça do espermatozoide. C: Reação acrossômica. 1 – Membrana plasmática; 2 – Membrana acrossomal externa; 3 – Conteúdo acrossomal; 4 – Membrana acrossomal interna; 5 – Envelope nuclear; 6 – Núcleo; 7 – Anel nuclear; 8 – Mitocôndrias; 9 – Região proximal da cauda (peça intermediária); 10 – Fim da peça intermediária; 11 – Região distal da cauda (peça principal e terminal); 12 – Bainha fibrosa; 13 – Região apical; 14 – Região pré-equatorial; 15 – Região equatorial; 16 – Região pós-equatorial; 17 – Vesiculações formadas durante a reação acrossômica (GADELLA et al., 2001).

## Cauda

A cauda ou flagelo do espermatozoide de mamíferos é constituída por colo e peça intermediária, principal e terminal. Assim como a cabeça, também pode variar entre as espécies em relação a tamanho e forma, mas a estrutura geral é similar. No centro da cauda encontra-se o axonema central, composto por centríolos arranjados sob forma de nove pares de microtúbulos dispostos radialmente ao redor de dois filamentos centrais (GARNER e HAFEZ, 2004). Entretanto, à medida que vão se tornando mais distais, os túbulos duplos vão se dissociando e desaparecendo, sendo que o último a desaparecer é o túbulo central (BARTH; OKO, 1989). Recobrendo todas estas estruturas, encontra-se uma espiral de mitocôndrias (SETCHELL, 1993).

O colo, próximo à peça intermediária, é a porção da cauda que se liga à cabeça do espermatozoide (SETCHELL, 1993). Já a peça intermediária estende-se do ponto de união com a cabeça espermática (colo) até o final da hélice mitocondrial. Na peça principal, desaparece a hélice mitocondrial, mas há continuidade dos filamentos do axonema e das fibras mais externas presentes na peça conectora, recoberta por uma bainha fibrosa fenestrada (SETCHELL, 1993).

A peça terminal consiste apenas dos nove pares de microtúbulos circundando os microtúbulos centrais, recobertos pela membrana plasmática (GARNER; HAFEZ, 2004).

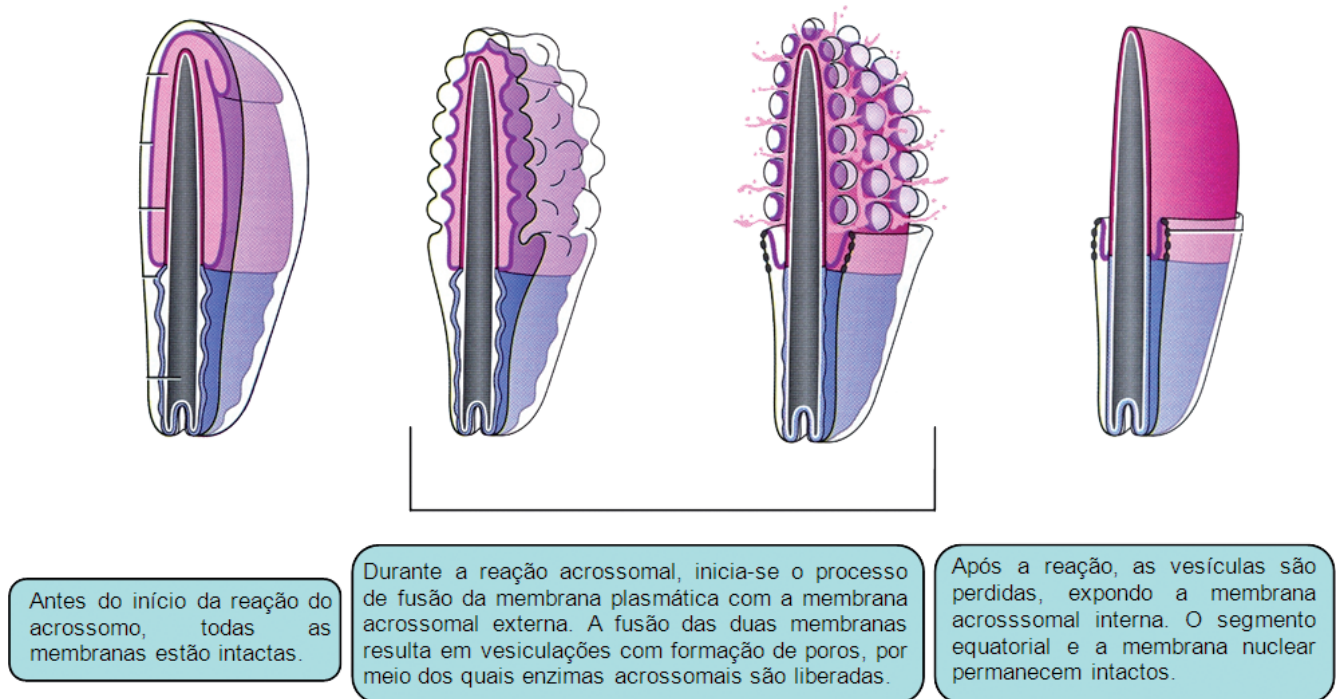
## Importância da integridade do acrossoma

A fecundação é um complexo processo que depende da interação de um ovócito maduro e competente com um espermatozoide móvel, capacitado e capaz de sofrer a reação acrossômica (MOLNAROVA et al. 2006). Somente o espermatozoide que passa corretamente pelo processo de capacitação e reação do acrossoma, sofrendo todas as alterações funcionais e estruturais, torna-se apto a fecundar o ovócito (AREEKIJSEREE; VEERAPRADITSIN, 2007; GADELLA et al., 2001).

O processo de capacitação consiste da remoção ou alteração de substâncias que estabilizam a membrana plasmática do espermatozoide. Dentre os processos envolvidos, destacam-se modificações da fluidez da MP e alterações do fluxo de íons e do pH intracelular, que estão associadas à reação acrossomal. Um dos componentes envolvidos neste processo é o colesterol, que é perdido durante a capacitação, iniciando o processo de desestabilização da MP (TRAVIS; KOPF, 2002). Posteriormente a este processo de desestabilização da MP, o espermatozoide torna-se apto a se ligar à zona pelúcida (ZP).

A ZP do ovócito consiste de uma camada extracelular constituída de glicoproteínas sulfatadas com diferentes massas moleculares e funções, denominadas ZP1, ZP2 e ZP3. Estas proteínas são sintetizadas pelo ovócito em crescimento e secretadas para formar estruturas de dímeros de ZP2 e ZP3, que possuem receptores secundários e primários, respectivamente, e são interligadas por ZP1 (PETERSEN et al., 2000).

Os espermatozoides capacitados ligam-se a receptores primários de ZP3, e essa ligação induz à reação do acrossoma (Figura 2). A ligação com a ZP3 provoca uma cascata de eventos, culminando com um aumento intracelular de  $Ca^{++}$ , pela liberação de reservas intracelulares e a entrada de  $Ca^{++}$  extracelular. O  $Ca^{++}$  age em fosfolipídios da membrana, ativando várias substâncias fusogênicas. Outro evento causado pelo aumento de  $Ca^{++}$  é a abertura do canal de sódio. Esta abertura permite a entrada de sódio e hidrogênio, levando ao aumento do pH intracelular (GADELLA et al., 2001). Além da entrada de  $Ca^{++}$ , do aumento de pH e da produção de substâncias fusogênicas, ocorre, ainda, um influxo de água com consequente aumento da pressão hidrostática, auxiliando o início do processo de reação acrossômica (SILVA, 1998).

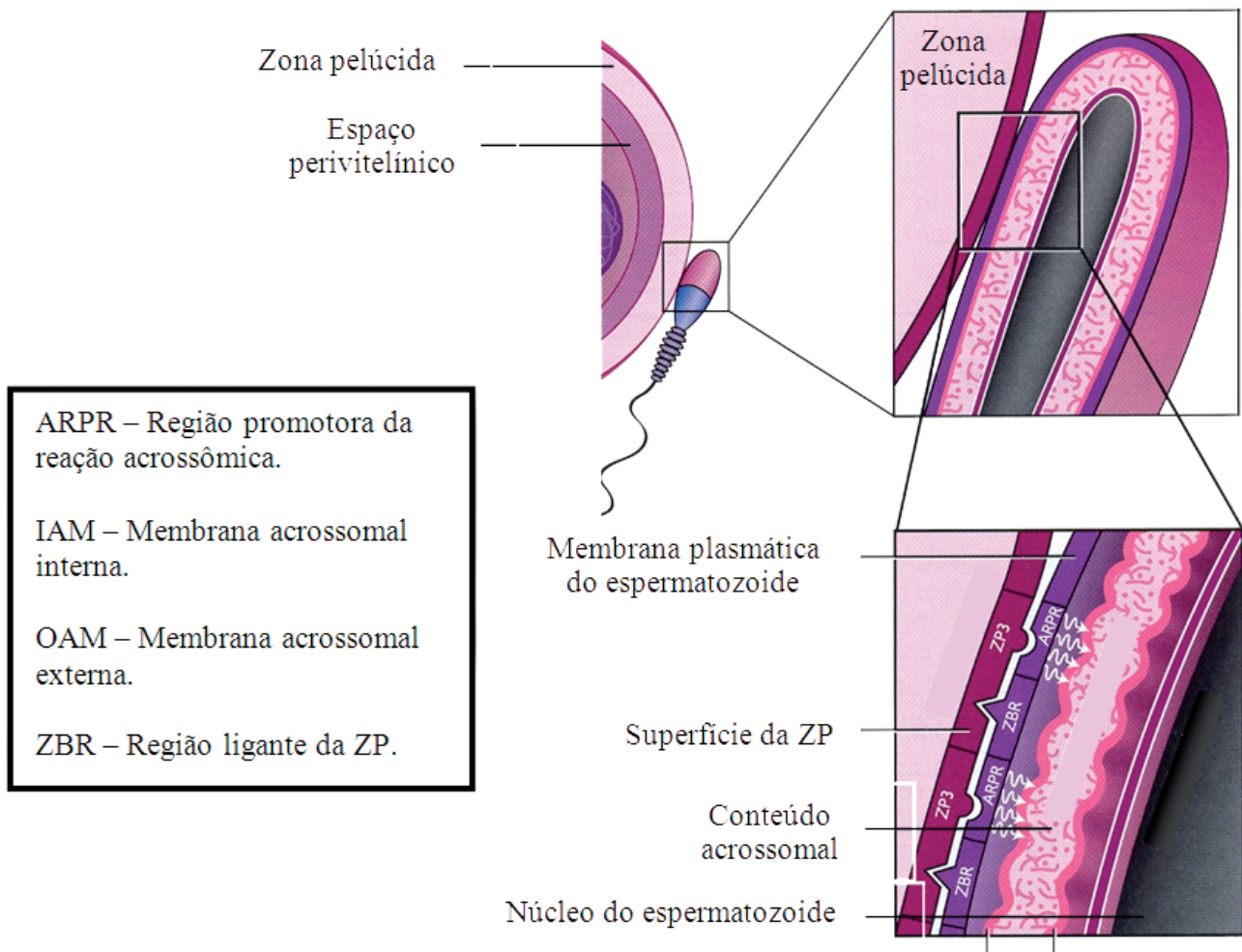


**Figura 1.** Modelo ilustrativo da reação acrossômica (Adaptado de SENGGER, 2003)

Todas essas modificações levam à fusão da membrana plasmática do espermatozoide com a membrana acrossomal externa, ocorrendo a abertura de poros e a saída de enzimas hidrolíticas presentes no acrossoma (Figura 3), sendo estas enzimas necessárias para auxiliar a passagem do espermatozoide pela ZP (AREEKIJSEREE; VEERAPRADITSIN, 2007).

Após a reação acrossomal, outro receptor no espermatozoide é exposto, e este liga-se a outra glicoproteína da membrana (ZP2). Com o auxílio das enzimas que foram liberadas do acrossoma, juntamente com o movimento de hiperativação, o espermatozoide ultrapassa a ZP (SILVA, 1998).

Após ultrapassar a ZP, a região equatorial do espermatozoide – ou ponto de fusão (PF) – ainda permanece intacta. O espermatozoide, então já no espaço perivitelínico do ovócito, por meio do PF liga-se à membrana plasmática do ovócito, sendo incorporado ao citoplasma deste (AREEKIJSEREE e VEERAPRADITSIN, 2007).



**Figura 3.** Modelo esquemático da ligação do espermatozoide à ZP e início da reação acrossômica (Adaptado de SENGER, 2003).

No entanto, se a reação do acrossoma inicia-se antes da ligação do espermatozoide à ZP, as enzimas são perdidas e o espermatozoide não é capaz de fecundar o ovócito (GADELLA et al., 2001). Portanto, pode-se considerar que quanto maior a porcentagem de células com acrossoma intacto em uma amostra de sêmen, melhor a qualidade desta amostra, pois contém maior número de espermatozoides aptos a fecundar.

### Avaliação da integridade acrossomal

Diversas técnicas têm sido desenvolvidas com o objetivo de avaliar a porcentagem de espermatozoides com acrossoma íntegro em uma amostra de sêmen. Dentre as mais utilizadas, pode-se citar a dupla coloração com azul de tripan e Giemsa (DIDION et al., 1989), diferentes técnicas de fluorescência, tais como *LysoTracker Gren DND-26* (LYSO-G) (THOMAS et al., 1997), anticorpos antiacrosina (THOMAS et al., 1997) e anticorpos anti-hialuronidase (BACCETTI et al., 1999).

Outra forma de mensurar a integridade acrossomal é por meio do uso de lecitinas conjugadas. As lecitinas conjugadas ligam-se a glucose, manose, galactose e N-acetilglucosamina, ou a outros carboidratos específicos de glicoproteínas que estão exclusivamente localizados no acrossoma. Dependendo da espécie de mamífero, as lecitinas mais comumente utilizadas são *Psium sativum* (Green pea) (PSA) ou *Arachis hypogaea* (peanut; PNA) (SILVA; GADELLA, 2006), podendo citar ainda *Triticum vulgare* (WGA) (BAKER et al., 2004; SILVA; GADELLA, 2006) ou *Concanavalia ensiformis* (ConA) (SILVA; GADELLA, 2006). Para a visualização em microscopia de epifluorescência, estas aglutininas devem ser conjugadas a fluoresceínas, tal como o isotocianato de fluoresceína (FITC) (Baker et al., 2004) ou R-ficoeritrina (RPE) (GADELLA; HARRISON, 2000). Estas lecitinas são impermeáveis ao acrossoma intacto; portanto, a reação acrossomal ou

acrossoma danificado permite a entrada destas macromoléculas. O PNA liga-se a glicoproteínas da membrana acrossomal externa e o PSA liga-se a componentes enzimáticos da matriz na luz do acrossoma, ligando-se especificamente ao açúcar  $\alpha$ -manosidade, encontrado no conteúdo acrossomal (CROSS; MEIZEL, 1989; SILVA; GADELLA, 2006).

Coloração *peanut agglutinin* (PNA), isotocianato de fluoresceína (FITC), para avaliação da integridade acrossomal.

Essa técnica permite distinguir os espermatozoides vivos e mortos com acrossoma intacto ou reagido, e pode ser utilizada para sêmen fresco ou congelado. Baseia-se na utilização de um fluorocromo (isotocianato de fluoresceína - FITC), conjugado a uma lecitina (*peanut agglutinin* - PNA) e associado a um fluorocromo que tem afinidade pelo DNA (iodeto de propídeo - IP). O PNA possui a capacidade de se ligar à membrana acrossomal externa do espermatozoide com acrossoma reagido ou danificado. O IP penetra no espermatozoide com membrana lesada, ligando-se ao DNA e indicando os espermatozoides vivos e mortos.

## Material necessário

- Sêmen fresco ou congelado
- Microscópio com fluorescência
- Filtro de comprimento de onda 494/517 excitação/emissão
- Lâmina
- Lamínula
- Papel alumínio
- Óleo de imersão
- Papel toalha
- Tubo tipo micrtubo para centrífuga
- Pipetas de 20  $\mu$ L e 200  $\mu$ L
- Ponteiras
- Contador de células

## Reagentes

- Peanut agglutinin – Lecitin, FITC labeled from *Arachis Hypogaea* (Peanut); Sigma®.
- Iodeto de propídeo – Propidium iodide; Molecular probe®
- Formalina 40%; p.a.
- Cloreto de Sódio – NaCl; PM 58,44; p.a.
- Citrato de sódio – C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>Na<sub>3</sub>O<sub>7</sub>; PM 294,10; p.a.
- Solução salina fosfatada tamponada – PBS

## Preparo do material

Após o descongelamento do sêmen, retirar uma alíquota de 10  $\mu$ L desse material e adicionar 30  $\mu$ L da solução de trabalho de trabalho (descrita no item 7) em microtubo protegido da luz (envolto em papel alumínio), deixando incubar por 10 minutos. Em seguida, colocar uma gotícula sobre uma lâmina e cobrir com lamínula. Pressionar suavemente a lamínula com papel toalha, retirando o excesso da solução.

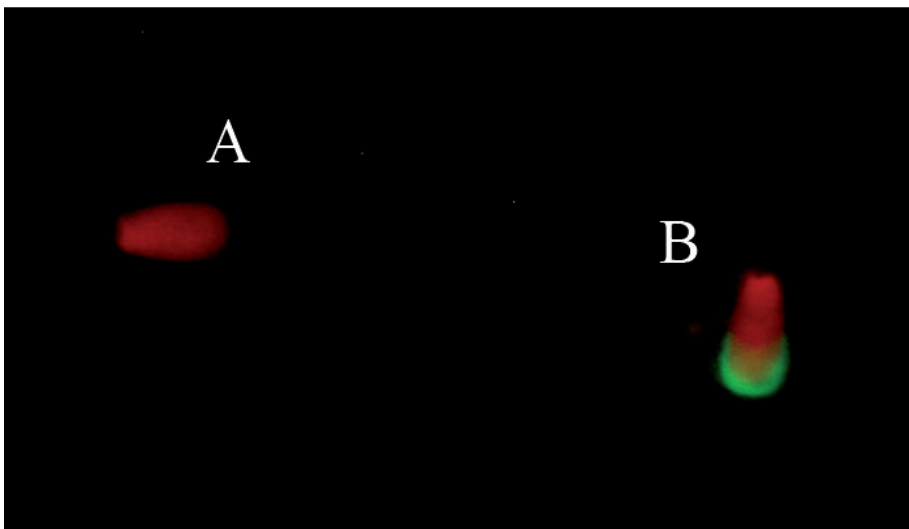
Imediatamente após o preparo, as lâminas devem ser avaliadas em microscópio de fluorescência, em filtro de comprimento de onda 494/517 excitação/emissão, com aumento de 40 a 100x sob óleo de imerção. Para esta avaliação, um campo deve ser selecionado, no qual os espermatozoides são visualizados; inicialmente em campo claro e, posteriormente, em fluorescência.

No campo claro, devem ser contados todos os espermatozoides presentes. Ao passar para a fluorescência, devem ser contados quantos espermatoide estão visíveis. Os espermatozoides visualizados em campo

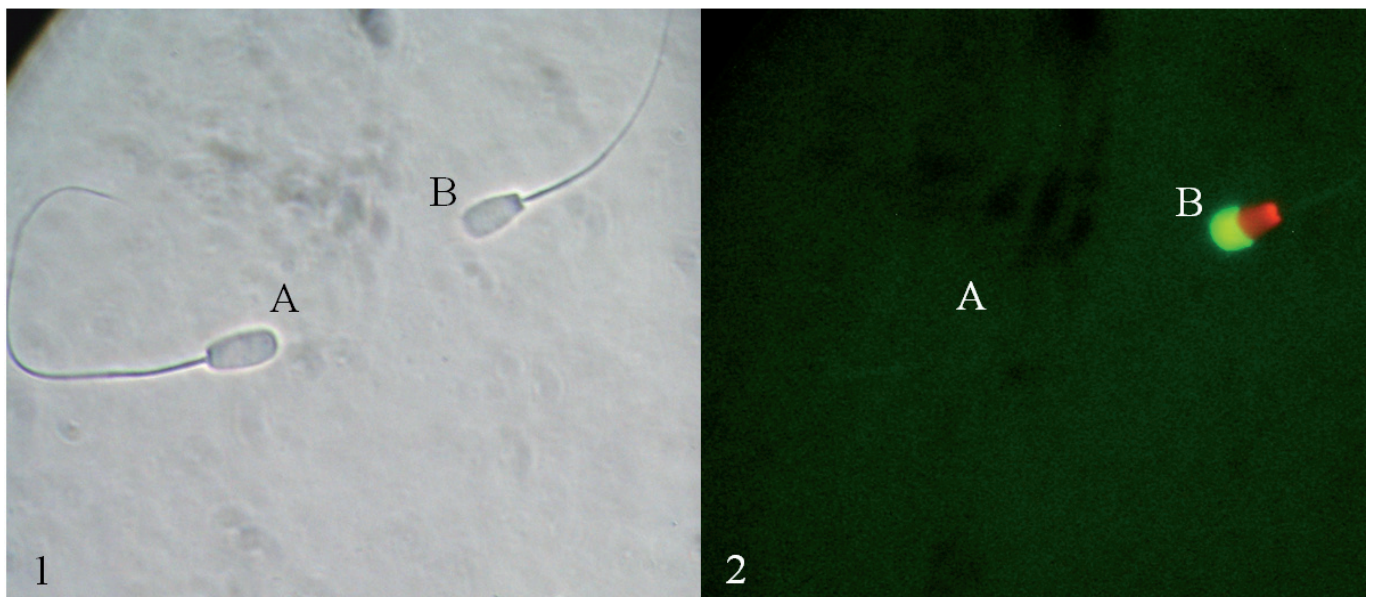
claro e que não foram visíveis na fluorescência são considerados vivos com acrossoma íntegro, pois não foram corados com o IP e/ou FITC-PNA. Os espermatozoides que foram visíveis em fluorescência podem ser considerados vivos com acrossoma reagido (corados com FITC-PNA), mortos com acrossoma íntegro (corados com IP) ou mortos com acrossoma reagido (corados com IP e FITC-PNA). Para cada lâmina, deve ser feita a contagem de um total de 200 espermatozoides, sendo estes classificados em quatro categorias:

1. Espermatozoides mortos com acrossoma intacto (espermatozoide corado de vermelho) (Figura 4);
2. Espermatozoides mortos com acrossoma reagido ou danificado (espermatozoide corado de vermelho com região acrossômica corada de verde) (Figuras 4 e 5);
3. Espermatozoide vivo com acrossoma intacto (espermatozoides não são observados em fluorescência, apenas em campo claro) (Figura 5);
4. Espermatozoide vivo com acrossoma reagido ou danificado (espermatozoides apresentando contorno verde na região do acrossoma) (Figura 6).

Todo o preparo da lâmina, bem como a leitura no microscópio, deve ser feito em ambiente escuro.



**Figura 4.** (A) Espermatozoide morto com acrossoma íntegro, visualizado em microscópio de epifluorescência. Apresenta-se corado com iodeto de propídeo (IP), mas com ausência da coloração da conjugação de isoticianato de fluotresceína – FITC (sonda fluorescente) com lecitina de amendoim (*peanut agglutinin* – PNA). (B) Espermatozoide morto com acrossoma reagido, visualizado em microscópio de epifluorescência. Apresenta-se corado com IP e FITC-PNA. Aumento de 80x.



**Figura 5.** Fotografia em microscopia de contraste de fase (1) e epifluorescência (2) do mesmo campo de leitura. Espermatozoide vivo com acrossoma íntegro (A), visualizado no contraste de fase (1). Não se apresenta corado com a conjugação de isoticianato de fluotresceína – FITC (sonda fluorescente) com lecitina de amendoim (*peanut agglutinin* – PNA) e iodeto de propídeo (IP) quando avaliado em epifluorescência (2). Espermatozoide morto com acrossoma reagido (B), visualizado no contraste de fase (1). Apresenta-se corado com IP-PNA em epifluorescência (2), em aumento de 40x.



**Figura 6.** Espermatozoide vivo com acrossoma reagido, visualizado em microscópio de epifluorescência. Apresenta-se corado apenas com isotocianato de fluoresceína – FITC (sonda fluorescente) com lecitina de amendoim (*peanut agglutinin* – PNA), em aumento de 100x.

## Preparo da solução de trabalho

A solução de trabalho para coloração de PNA–FITC deve ser preparada no dia e armazenada a 4°C até o momento de uso. Para o seu preparo, são utilizadas 4 soluções estoques, que podem ser preparadas previamente e mantidas a -20°C (solução I e II) ou a 4°C (solução III e IV), sendo:

### I – Solução estoque de FITC-PNA

- 9,2 mg FDA
- 20 mL PBS

### II – Solução estoque de iodeto de propídeo (IP)

- 10 mg IP
- 20 mL solução salina 0,9%

### III – Solução estoque de formoldeído

- 4 mL de formalina 40%
- 96 mL de solução salina 0,9%

### IV – Solução estoque de citrato de sódio 3%

- 3 g citrato de sódio
- 100 mL solução salina 0,9%

### Solução de trabalho

- Solução I – 20  $\mu$ L
- Solução II – 10  $\mu$ L
- Solução III – 10  $\mu$ L
- Solução IV – 960  $\mu$ L

## Estudo comparativo entre FITC-PNA, Azul de trypan e Giemsa

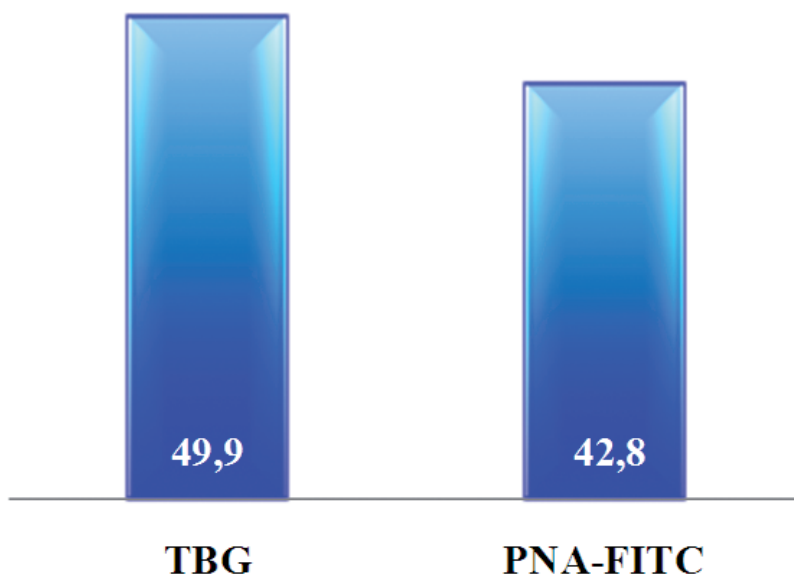
Diversos estudos têm sido realizados na tentativa de identificar métodos *in vitro* que melhor avaliem a fertilidade de touros, dentre os quais a avaliação da integridade de acrossoma. Esta avaliação pode ser feita com o emprego de microscopia de luz ou de fluorescência. O corante vital azul de trypan, em associação com Giemsa, tem sido utilizado por muitos anos para avaliar a integridade do acrossoma. Mais recentemente, corantes fluorescentes, como a associação de IP e FITC-PNA, têm sido amplamente utilizados.

Com o objetivo de comparar duas diferentes técnicas para avaliação de integridade acrossomal, foi realizado no Laboratório de Reprodução Animal da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia um estudo em que se utilizou uma técnica avaliada em microscopia de campo claro (dupla coloração com azul de tripan e Giemsa – TBG, preparado de acordo com Silva, 1998) e outra em microscópio de epifluorescência (isoticianato de fluoresceína – FITC e *peanut agglutinin* PNA).

Para isso, foi utilizado sêmen criopreservado de 4 touros, sendo realizadas três réplicas por touro. Em cada réplica foram descongeladas três palhetas, sendo feito um *pool* em microtubo para centrifuga. A partir deste *pool*, foram removidas amostras para avaliação da integridade acrossomal com o emprego de coloração para campo claro (TBG) e para avaliação em microscópio de epifluorescência (FITC-PNA). Para cada amostra foram contadas 200 células, e os dados foram comparados com a utilização do teste t.

A porcentagem de espermatozoides com acrossoma intacto foi maior (Figura 7;  $P < 0,05$ ) quando avaliada em microscópio de campo claro (TBG), em relação à avaliação feita em microscópio de epifluorescência (FITC-PNA).

### ■ Porcentagem de espermatozoides vivos com acrossoma íntegro

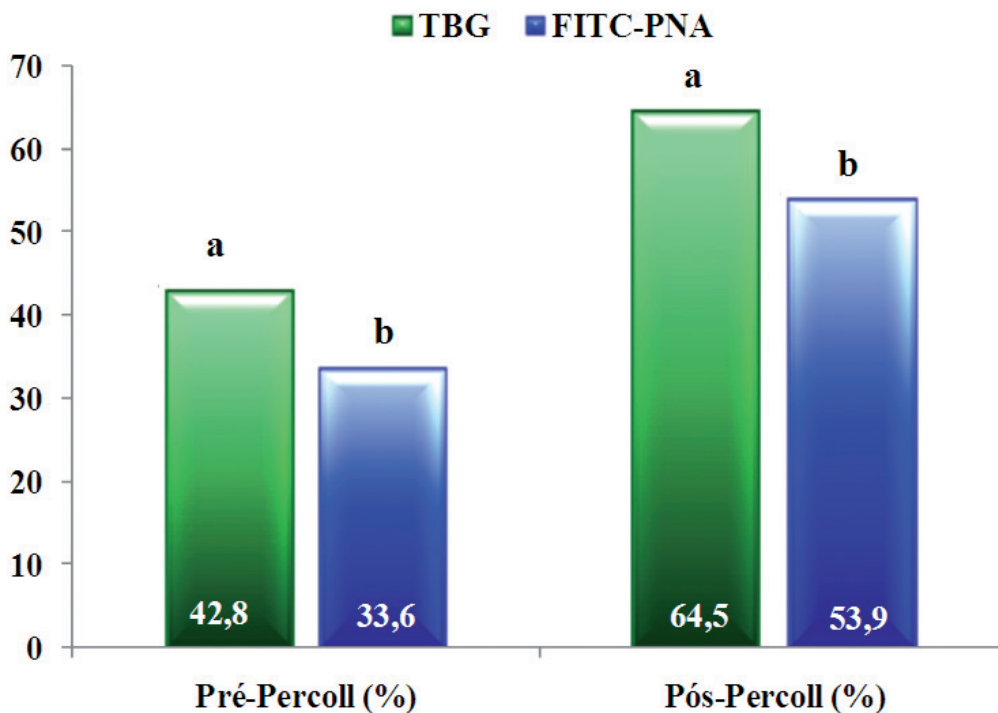


**Figura 7.** Comparação entre azul de trypan e Giemsa (TBG) e isoticianato de fluoresceína (FITC) – *peanut agglutinin* (PNA) a partir de espermatozoides criopreservado de 4 touros (três réplicas por touro).

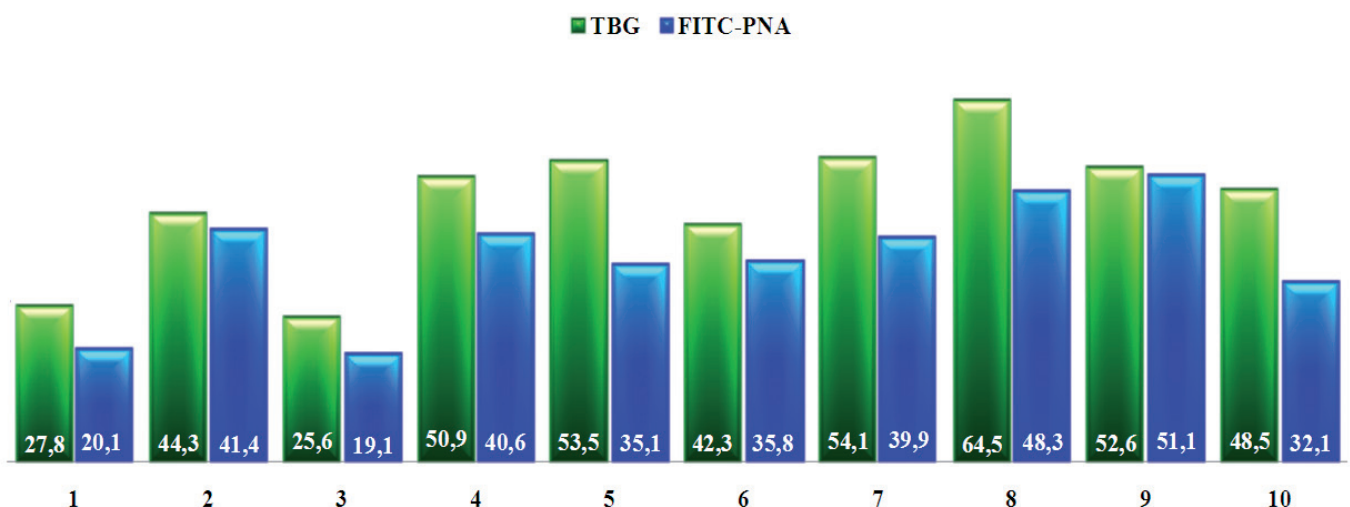
<sup>a,b</sup> Diferem entre os grupos ( $P < 0,05$ ).

Um segundo estudo foi realizado com o objetivo de comparar as duas técnicas, antes e após a passagem da amostra de sêmen pelo gradiente de Percoll. Para isso, foi utilizado sêmen congelado de 10 touros Nelore. Inicialmente, uma palheta de sêmen foi descongelada, sendo retirada uma amostra para avaliação da integridade acrossomal pela técnica de FITC-PNA e outra para avaliação pela técnica de TBG. O restante da amostra foi depositado sobre 4 mL de gradiente de Percoll 45:90% e centrifugado a 700 g por 20 min. Após a centrifugação, o *pellet* resultante foi lavado e homogeneizado e amostras foram retiradas para avaliação da integridade acrossomal.

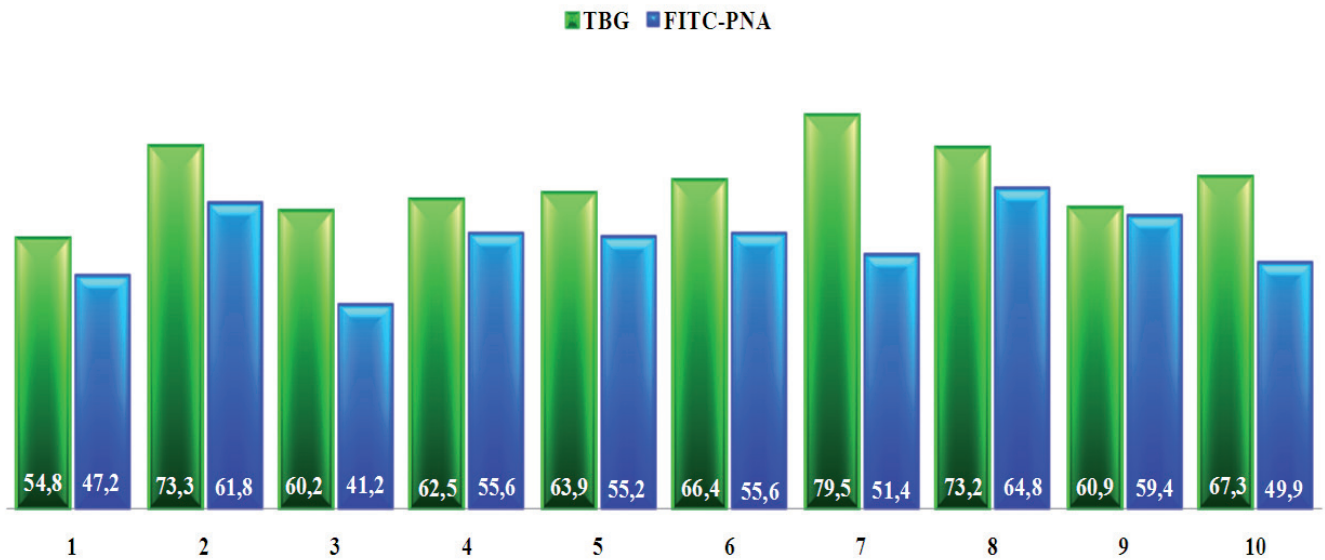
Em ambos os momentos, a avaliação com a técnica de FITC-PNA detectou menor percentagem de espermatozoides com acrossoma íntegro do que TBG (Figura 8), sendo, portanto, a mais rigorosa. Além disso, foi possível identificar uma grande variação individual entre touros na percentagem de espermatozoides vivos com acrossoma íntegro. Quando comparados individualmente todos os 10 touros, a técnica de FITC-PNA apresentou valores numéricos da percentagem de espermatozoides vivos com acrossoma íntegro inferiores à técnica de TBG, antes (Figura 9) ou após (Figura 10) a passagem pelo gradiente de Percoll. Isso comprova a maior sensibilidade da técnica de FITC-PNA na detecção de alterações acrossomais de espermatozoide bovino criopreservado, independentemente do touro ou da passagem do espermatozoide por um processo de seleção espermática.



**Figura 8.** Percentagem de espermatozoides vivos com acrossoma íntegro, avaliados pela coloração de azul de trypan e Giemsa (TBG) e isoticianato de fluoresceína (FITC) – *peanut agglutinin* (PNA) antes ou após a passagem pelo gradiente de Percoll de espermatozoides criopreservados de 10 touros. <sup>a,b</sup> Diferem entre os grupos ( $P < 0,05$ ).



**Figura 9.** Apresentação gráfica descritiva da percentagem de espermatozoides vivos com acrossoma íntegro avaliados pela coloração de azul de trypan e Giemsa (TBG) e isoticianato de fluoresceína (FITC) – *peanut agglutinin* (PNA) antes da passagem pelo gradiente de Percoll de espermatozoides criopreservados de 10 touros. <sup>a,b</sup> Diferem entre os grupos ( $P < 0,05$ ).



**Figura 10.** Apresentação gráfica descritiva da porcentagem de espermatozoides vivos com acrossoma íntegro avaliados pela coloração de azul de trypan e Giemsa (TBG) e isoticianato de fluoresceína (FITC) – *peanut agglutinin* (PNA) após a passagem pelo gradiente de Percoll de espermatozoides criopreservados de 10 touros. <sup>a,b</sup> Diferem entre os grupos ( $P < 0,05$ )( $P < 0,05$ ).

## Considerações finais

Os estudos realizados pelo grupo do Laboratório de Reprodução Animal da empresa Recursos Genéticos e Biotecnologia demonstraram que a técnica de FITC-PNA, utilizando-se uma sonda fluorescente para avaliação acrossomal, detecta uma maior porcentagem de espermatozoides com acrossoma reagido. Isso comprova que a utilização de uma sonda fluorescente apresenta maior sensibilidade na detecção de alterações acrossomais em espermatozoides bovinos criopreservados do que a técnica de avaliação acrossomal em microscópio de campo claro, como o TBG. No entanto, é importante salientar que a integridade acrossomal não é o único parâmetro espermático necessário para que o espermatozoide tenha capacidade fecundante. Outras características, tais como motilidade, morfologia normal, integridade de membrana e cromatina também são importantes para que ocorra a fecundação. Portanto, além da integridade acrossomal, outras características espermáticas também devem ser avaliadas, visto que somente o conjunto de várias características espermáticas pode fornecer informações mais precisas sobre a fertilidade de uma amostra de sêmen.

## Referências

- AREEKIJSEREE, M.; VEERAPRADITSIN, T. Characterization of porcine oviductal epithelial cells, cumulus cells and granulosa cells-conditioned media and their ability to induce acrosome reaction on frozen-thawed bovine spermatozoa. **Micron**, v. 39, p. 160-167, 2007.
- BACCETTI, B.; GAMBERA, L.; MORETTI, E.; PIOMBONI, P. A quick molecular method for the simultaneous detection in spermatozoa of nuclear, acrosomal and axonemal structure by fluorescent microscopy. **Journal of Submicroscopic Cytology and Pathology**, v. 31, p. 563-569, 1999.
- BAKER, S. S.; THOMAS, M.; THALER, C. D. Sperm membrane dynamics assessed by changes in lectin fluorescence before and after capacitation. **Journal of Andrology**, v. 25, p. 744-751, 2004.
- BARTH, A. D.; OKO, R. J. **Abnormal morphology of bovine spermatozoa**. Ames, Iowa: Iowa State University, 1989. 285 p.
- CROSS, N. L.; MEIZEL, S. Methods for evaluating the acrosomal status of mammalian sperm. **Biology of Reproduction**, v. 41, p. 635-641, 1989.
- DIDION, B. A.; DOBRINSKY, J. R.; GILES, J. R.; GRAVES, C. N. Staining procedure to detect viability and the true acrosome reaction in spermatozoa of various species. **Gamete Research**, v. 22, p. 51-57, 1989.
- FLESCHE, F. M.; GADELLA, B. M. Dynamics of the mammalian sperm plasma membrane in the process of fertilization. **Biochimica et Biophysica**, v. 1469, p. 197-235. 2000.
- GADELLA, B. M.; HARRISON, R. A. The capacitating agent bicarbonate induces protein kinase A-dependent changes in phospholipids transbilayer behavior in the plasma membrane. **Development**, v. 127, p. 2407-2420, 2000.
- GADELLA, B. M.; RATHI, R.; BROUWERS, J. F.; STOUT, T. A.; COLENBRANDER, B. Capacitation and the acrosome reaction in equine sperm. **Animal Reproduction Science**, v. 68, p. 249-265, 2001.
- GARNER, D. L.; HAFEZ, E. S. E. Espermatozoides e plasma seminal. In: HAFEZ, E. S. E.; HAFEZ, B. **Reprodução Animal**. 7. ed. Manole: São Paulo, 2004. p. 97-110.
- JOHNSON, L. A. Isolation of X- and Y-bearing sperm for sex preselection. **Biology of Reproduction**, v. 16, p. 303-26, 1994.
- MOLNAROVA, Z.; MACHATKOVA, M.; MACHAL, A.; HORAKOVA, J.; HANZALOVA, K. A potential relationship between the acrosome response characteristics of bovine spermatozoa and their in vitro fertilizing ability. **Zygote**, v. 14, p. 63-69, 2006.

PETERSEN, E. T.; PETROUNKINA, A. M.; HUNDRIESER, M. E. Oocyte-sperm interactions. **Animal Reproduction Science**, v. 61, p. 653-662, 2000.

SENGER, P. L. **Pathways to pregnancy and parturition**. 2. ed. Pullman (WA): Current Conceptions, 2003. 271p.

SETCHELL, B. P. Spermatogenesis and spermatozoa. In: AUSTIN, C. R.; SHORT, R. V. (Ed.). **Reproduction in Mammals: Germ Cells and Fertilization**. New York: Cambridge, 1993. p. 63-101.

SILVA, A. E. D. F. **Reação acrossômica induzida**: método indicador de fertilidade de touros. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 1998. 38p.

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

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

TRAVIS, A. J.; KOPF, G. S. The of cholesterol efflux in regulation the fertilization potencial of mammalian spermatozoa. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 110, p. 731-736, 2002.

YANAGIMACHI, R. Mammalian fertilization. In: KNOBIL, E.; NEILL, J. D. **The Physiology of Reproduction**. 2. ed. New York: Raven, 1994. p. 189-317.



---

*Recursos Genéticos  
e Biotecnologia*