

# Avaliação da capacitação espermática *in vitro* pela reação acrossômica e viabilidade, em sêmen de touros Guzerá

## Evaluation of *in vitro* sperm capacitation by acrossome reaction and viability, in semen of Guzera bulls

Sá, W.F.,\*,\*\*\* Leite, V.,\*,\*\* Camargo, L.S.A.,\* Ferreira, A.M.,\* Viana, J.H.M.,\* Nogueira, L.A.,\*\* Ramos, A.A.\*

### Resumo

O objetivo deste trabalho foi avaliar a capacitação espermática pela reação acrossômica e viabilidade espermática de sêmen de touros Guzerá. Utilizou-se sêmen de diferentes touros adquiridos de centrais de inseminação artificial. Após o descongelamento, o sêmen foi incubado inicialmente com 0 (T1) e 10 mg/ml (T2) de heparina por quatro horas a 39°C e 95% de umidade, e posteriormente com lisofosfatidilcolina por mais 15 minutos, para indução da reação acrossômica. Antes e após o período de incubação foram feitas lâminas para a análise da viabilidade espermática e reação acrossômica. Verificou-se que o tratamento com heparina aumentou a taxa de espermatozoides com reação acrossômica ( $p < 0,05$ ), e que houve diferenças na fertilidade entre os touros após a capacitação espermática. Conclui-se que o teste de reação acrossômica e viabilidade espermática pode ser utilizado para avaliação da capacitação espermática *in vitro* de touros da raça Guzerá.

*Palavras-chave:* bovino, capacitação espermática, reação acrossômica

### Abstract

The aim of this study was evaluated *in vitro* sperm capacitation through acrosome reaction and viability of Guzera bulls. It was utilized semen from different bulls and frozen in Artificial Insemination Companies. After thawing, the semen was incubated with 0 (T1) and 10 mg/ml (T2) of heparin for four hours, and incubated again with lysophosphatidylcholine for more 15 minutes, to induce the acrosome reaction. Before and after incubation time microscope glass-slides were made with semen samples to analyze sperm viability and acrosome reaction. It was observed that the treatment with heparin increased the acrosome reaction rate ( $p < 0,05$ ), and that there was difference for bulls after sperm capacitation ( $p < 0,05$ ). It was concluded that *in vitro* acrosome reaction and sperm viability could be used to evaluate *in vitro* sperm capacitation for Guzera breed bulls.

*Keywords:* bovine, sperm capacitation, acrosome reaction.

### Introdução

O mecanismo da capacitação espermática e da reação acrossômica (RA) é pouco conhecido. A capacitação espermática compreende alterações fisiológicas que conferem competência ao espermatozoide em penetrar e fecundar o oócito (Dasgupta et al., 1994).

O teste de indução da reação acrossômica *in vitro* é um método utilizado para a avaliação da capacitação espermática, e que possui uma alta correlação com a fertilidade a campo (Blotner et al., 1990). A RA pode ser induzida *in vitro* pela lisofosfatidilcolina (LC) (Parrish et al., 1988), após capacitação espermática provocada pela heparina (Miller et al., 1990). A LC tem sido usada na concentração de 100 mg/ml por 15 minutos, após a incubação do sêmen com heparina por quatro horas (Parrish et al., 1988; Thérien et al., 1995). A heparina é a substância mais eficiente para induzir capacitação espermática e,

conseqüentemente, a RA *in vitro* (Fukui et al., 1990; Cox et al., 1994). Segundo Whitfield e Parkinson (1992), 10 mg/ml de heparina induzem a capacitação e RA em espermatozoides bovinos. A manutenção da viabilidade do espermatozoide capacitado também é importante para o sucesso da fecundação (Way et al., 1994). A percentagem de espermatozoides vivos na fecundação *in vitro* possui correlação positiva com o potencial de fertilidade *in vitro* de um touro (Tanghe et al., 2002).

Devido à necessidade da capacitação espermática para a fecundação, é importante fazer a avaliação antes de procedimentos de fecundação *in vitro* (FIV), para maior eficiência da produção *in vitro* de embriões (PIV). O uso da avaliação de RA e viabilidade espermática auxilia na seleção do sêmen a ser utilizado para a PIV.

Como a raça Guzerá e seus cruzamentos vem surgindo como uma boa opção para produção de leite nos trópicos, aumen-

\*Embrapa Gado de Leite – Juiz de Fora, MG

\*\*Universidade Federal Fluminense – Niterói, RJ

\*\*\*wandefsa@cnppl.embrapa.br

tando sua importância no rebanho nacional, torna-se necessário o conhecimento do comportamento do sêmen de touros dessa raça em procedimentos de capacitação espermática *in vitro*, pelas diferenças fisiológicas existentes entre as subespécies bovinas quanto à secreção hormonal (Randel, 1984), sensibilidade a hormônios externos (Munro, 1986) e comportamento social e sexual (Galina et al., 1995), contribuindo assim para a adaptação da técnica de PIV para essa raça. O objetivo do trabalho foi avaliar a capacitação espermática *in vitro* de sêmen de touros Guzerá pela RA e viabilidade espermática.

## Material e métodos

Utilizou-se sêmen congelado de três touros Guzerá, adquiridos em centrais de inseminação artificial e estocados em nitrogênio líquido. O sêmen foi descongelado em banho-maria a 37°C por 30 segundos, após o que avaliou-se sua motilidade e vigor, pelo exame em lâmina aquecida e laminula. Para cada observação foram utilizadas três palhetas de sêmen, com dez repetições por touro.

O sêmen descongelado era depositado num tubo de centrifuga e diluído em meio Talp Hepes na proporção 1:10 e centrifugado a 300g por dez minutos. Desprezou-se o sobrenadante e ressuspendeu-se o sedimento com Talp Hepes na proporção 1:10 para uma nova lavagem nas mesmas condições descritas anteriormente. Após desprezar o sobrenadante dessa segunda lavagem, o sedimento foi novamente ressuspendido com Talp Hepes, na proporção 1:1. Preparando-se esfregaços corados com eosina-negrosina (Dott e Foster, 1972) para avaliação da viabilidade espermática e naftol amarelo e eritrosina B para avaliação da RA (tempo de incubação 0h). A concentração espermática foi determinada pela contagem de células na câmara de Neubauer, e a concentração ajustada para  $20 \times 10^6$  células/ml de solução, para cada tratamento. O sêmen foi distribuído em dois tratamentos: T1 (0 mg/ml de heparina) e T2 (10 mg/ml de heparina), e mantido em estufa a 39°C por quatro horas e avaliou-se novamente a RA. A seguir, adicionaram-se 100 mg/ml de lisofosfatidilcolina<sup>1</sup> a cada tratamento, após o qual os tubos voltaram para a estufa por mais 15 minutos, sob as mesmas condições descritas anteriormente. Prepararam-se, então, os esfregaços e avaliaram-se as taxas de viabilidade espermática e de RA (tempo de incubação 4h15).

Nas lâminas coradas com eosina-negrosina, contavam-se 100 células, para se avaliar o percentual de espermatozoides vivos (viabilidade espermática) ou mortos. Definiu-se como células viáveis aquelas que não coraram, apresentando apenas coloração de fundo na lâmina (acinzentado), e como não-viáveis aquelas que se coram total ou parcialmente. Nas lâminas coradas com naftol amarelo-eritrosina B, contavam-se 200 células para determinar o percentual de espermatozoides com acrossoma intacto ou espermatozoides com reação do acrossoma. Ao ler acrossoma "intacto", deve-se entender como presença do acrossoma.

Definiu-se como células com acrossoma íntegro e que não sofreram RA, aquelas de coloração avermelhada, com ápice proeminente e bem definido. As células que sofreram RA apresentavam coloração clara e sem o contorno acrossomal.

Os dados foram submetidos à análise de variância, usando-se o procedimento GLM (General Linear Models) do SAS (1987), com delineamento fatorial 3x2 (três touros e duas concentrações de heparina), e as médias comparadas pelo teste de Turkey. As variáveis – viabilidade espermática e espermatozoides com reação acrossômica sofreram transformação angular.

## Resultados e discussão

A Tabela 1 mostra o efeito da capacitação espermática com heparina sobre a taxa de espermatozoide com reação acrossômica, em touros da raça Guzerá.

Comparando-se a taxa de reação acrossômica em meios com e sem heparina, verifica-se um número maior de espermatozoides com reação acrossômica na presença dessa substância ( $p < 0,05$ ). De acordo com a literatura (Miller et al., 1990; Gliedt et al., 1996; McCauley et al., 1996), a presença de heparina mostrou-se eficaz na capacitação de espermatozoides, predispondo-os a sofrerem reação acrossômica. A menor taxa de espermatozoides com reação acrossômica no T1 pode ser em virtude da LC possuir pouca ação sobre os espermatozoides não-capacitados, com mais espermatozoides prontos para reagir no T2. Entretanto, o aumento no percentual de células com reação acrossômica às 4h15, com relação à taxa inicial (0h), no tratamento sem heparina, sugere que o próprio tempo de incubação ou outra substância presente no meio de incubação podem também capacitar espermatozoides bovinos e provocar reação acrossômica, embora em taxa menor do que com a heparina. Pereira et al. (2000) observaram um pequeno aumento na RA de espermatozoides bovinos incubados por 30 minutos com heparina, na ausência de um agente indutor. Os autores consideram este aumento como resultado de uma RA induzida pela heparina. Alguns trabalhos indicam que, ao se deixar sêmen não-diluído de carneiros em temperatura ambiente (escuro) por quatro horas, é possível induzir capacitação em aproximadamente 50% dos espermatozoides (Pérez et al., 1997) ou que a simples lavagem dos espermatozoides provocará a remoção das proteínas do plasma seminal da superfície de sua membrana, permitindo o início da capacitação (Miller e Hunter, 1986). Segundo Rajamahendran et al. (1994) pode ocorrer reação acrossômica espontaneamente após longos períodos de incubação.

Verifica-se, portanto, a necessidade do uso da heparina para a capacitação espermática do sêmen da raça Guzerá para otimização da reação acrossômica, o que se mostrou semelhante a outras raças (Whitfield e Parkinson, 1992; Sá et al., 2002). Para Blotter et al. (1990); Bellin et al. (1994) e McCauley et al. (1996), espermatozoides de touros com alta fertilidade sofrem reação acrossômica com mais frequência, por apresentarem maior afinidade na ligação com a heparina. Esta acelera a conversão da proacrosina zimógena em acrosina, iniciando a digestão da membrana plasmática, e por si só é capaz de desencadear a perda acrossômica em algumas células (Leclerc et al., 1989; Mark e Ax, 1985).

A Figura 1 mostra as taxas de viabilidade espermática e reação acrossômica para cada touro analisado. Observa-se que o touro C apresentou melhor taxa de viabilidade espermática e de reação acrossômica após a capacitação espermática *in vitro* ( $P < 0,05$ ). Com base nesses resultados, o touro C esta-

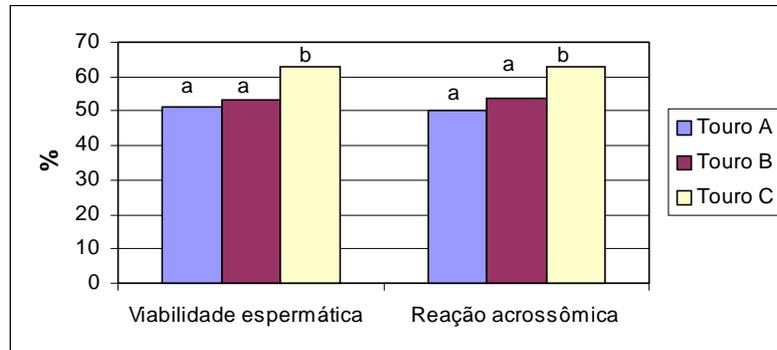
<sup>1</sup> L-lysophosphatidilcholine - L4129 - St. Louis, MO, USA

**Tabela 1** – Taxa de espermatozoides viáveis e com reação acrossômica de acordo com os tratamentos de heparina.

Tratamento	Nº de observações	Viabilidade espermática (%)		Espermatozoides com RA <sup>1</sup> (%)		
		0 h	4:15 h	0 h	4:00 h	4:15 h
T1 (0 µg/ml de heparina)	30	82,0	73,0 <sup>a</sup>	20,0	43,92	48,0 <sup>a</sup>
T2 (10 µg/ml de heparina)	30	82,0	72,0 <sup>a</sup>	20,0	43,50	54,0 <sup>b</sup>

Médias com letras diferentes na mesma coluna diferem entre si ( $P < 0,05$ ).

<sup>1</sup>RA: reação acrossômica



**Figura 1** – Percentagem de espermatozoides viáveis e com reação acrossômica para os touros A, B e C, da raça Guzerá, após a capacitação *in vitro*. Médias com letras diferentes entre colunas diferem entre si ( $P < 0,05$ ).

ria mais apto para a FIV, levando-se em consideração que haverá uma correlação positiva entre a taxa de não-retorno aos 90 dias e as taxas de RA e viabilidade (Whitfield e Parkinson, 1992). Tanghe et al. (2002) observaram que sêmen com maior viabilidade ao final da incubação *in vitro* promove maior taxa de oócitos fecundados.

A diferença observada entre os touros pode estar relacionada com diferentes níveis de produção e secreção de complexos protéicos com afinidade à heparina (denominados HBP) no fluido seminal, e (ou) à capacidade do espermatozoide em

se ligar ou incorporar esses complexos à sua membrana plasmática (Blottner et al., 1990; McCauley et al., 1996). Os HPBs aumentam a habilidade do espermatozoide em sofrer reação acrossômica na presença de heparina ou proteínas da zona pelúcida (Bellin et al., 1996; McCauley et al., 1996).

Além disso, existem diferentes tipos de HPB que se incorporam aos espermatozoides, podendo variar de acordo com o seu peso molecular e afinidade pela heparina (Bellin et al., 1996). Portanto, espermatozoides de touros de alta fertilidade tendem a sofrer reação acrossômica com mais frequência (Blottner et al., 1990; Rajamahendran et al., 1994), provavelmente por terem HPBs com maior afinidade à heparina.

A utilização de procedimentos para avaliar a capacidade espermática *in vitro* antes de se utilizar o sêmen para a FIV, torna a produção de embriões *in vitro* mais eficiente. Isso pode ser feito por meio de exames de RA a viabilidade espermática. Como observado neste experimento, diferenças na capacitação espermática em touros da raça Guzerá podem ser identificadas pela avaliação da RA e viabilidade.

## Conclusões

A concentração de 10 mg/ml de heparina é suficiente para aumentar a capacitação espermática e, conseqüentemente, a taxa de reação acrossômica do sêmen de touros Guzerá, sem afetar sua viabilidade.

Exames de RA e viabilidade espermática podem auxiliar na avaliação de sêmen de touros Guzerá, antes de utilizá-los em procedimentos de FIV, identificando diferenças existentes durante a capacitação espermática *in vitro*.

## Referências

- BELLIN, M. E.; HAWKINS, H. E.; AX, R. L. Fertility of range beef bulls grouped according to presence or absence of heparin-binding proteins in sperm membranes and seminal fluid. *Journal of Animal Science*, v. 1, n. 7, p. 2441-2448, 1994.
- BELLIN, M. E.; HAWKINS, H. E.; OYARZO, J. N.; RUSSEL, J. V.; AX, R. L. Monoclonal antibody detection of heparin-binding proteins on sperm corresponds to increased fertility of bulls. *Journal of Animal Science*, v. 74, p. 173-182, 1996.
- BLOTTNER, S.; NEHRING, H.; TORNER, H. Individual differences in capacitation of bull spermatozoa by heparin *in vitro*: relationship to fertility. *Theriogenology*, v. 34, n. 3, p. 619-628, 1990.
- COX, J. F.; SARAVIA, F.; BRIONES, M.; SANTA MARIA, A. Dose-dependent effect of heparin on fertilizing ability of goat spermatozoa. *Theriogenology*, v. 44, p. 451-460, 1994.
- DASGUPTA, S.; MILLS, C. L.; FRASER, L. R. A possible role of Ca<sup>2+</sup> Tpsase in human sperm capacitation. *Journal of Reproduction Fertility*, v. 102, p. 107-116, 1994.
- DOTT, H. M.; FOSTER, G. C. A technique for studying the morphology of mammalian spermatozoa which are eosinophilic in a differential life-dead stain. *Journal of Reproduction Fertility*, v. 29, p. 443-445, 1972.

FUKUI, Y.; SONOYAMA, T.; MOCHIZUKI, H.; ONO, H. Effects of heparin dosage and sperm capacitation time on *in vitro* fertilization and cleavage of bovine oocytes matured *in vitro*. *Theriogenology*, v. 34, p. 579-591, 1990.

GALINA, C. S.; ORIHUELA, A.; RUBIO, I. Reproductive physiology in zebu cattle, characteristics related to estrous expression and performance of bulls utilized in natural mating. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL, 2. Belo Horizonte, MG, 1995. *Anais...* Belo Horizonte, MG: Colégio Brasileiro de Reprodução animal, 1995. p. 46-61.

GLIEDT, D. W.; ROSENKRANS, C. F.; RORIE, R. W.; RAKES, J. M. Effects of oocyte maturation length, sperm capacitation time, and heparin on bovine embryo development. *Journal of Dairy Science*, v. 79, p. 532-535, 1996.

LECLERC, P.; LANGLAIS, J.; LAMBERT, R. D.; SIRARD, M. A.; CHAFOULEAST, J. G. Effect of heparin on the expression of calmodulin-binding proteins in bull spermatozoa. *Journal of Reproduction Fertility*, v. 85, p. 615-622, 1989.

MARK, J. L.; AX, R. L. Relationship of nonreturn rates of dairy bulls to binding affinity of heparin to sperm. *Journal of Dairy Science*, v. 68, p. 2078, 1985.

- McCAULEY, T. C.; BELLIN, M. E.; AX, R. L. Localization of a heparin-binding protein to distinct regions of bovine sperm. *Journal Animal Science*, v. 74, p. 429-438, 1996.
- MILLER, D. J.; HUNTER, A. G. Effect of osmolality and glycosaminoglycans on motility, capacitation, acrosome reaction, and *in vitro* fertilizability of bovine ejaculated spermatozoa. *Journal Dairy Science*, v. 69, p. 2915-2924, 1986.
- MILLER, D. J.; WINER, M. A.; AX, R. L. Heparin-binding proteins from seminal plasma bind to bovine spermatozoa and modulate capacitation by heparin. *Biology of Reproduction*, v. 12, p. 899, 1990.
- MUNRO, R. K. The superovulatory response of *Bos taurus* and *Bos indicus* cattle following treatment with follicle stimulating hormone and progesterone. *Animal Reproduction Science*, v. 11, p. 91-97, 1986.
- PARRISH, J. J.; SUSKO-PARRISH, J.; WINER, M. A.; FIRST, N. L. Capacitation of bovine spermatozoa by heparin. *Biology of Reproduction*, v. 38, p. 1171-1188, 1988.
- PEREIRA, R. J. T. A.; TULI, R. K.; WALLENHORST, S.; HOLTZ, W. The Effect of Heparin, Caffeine and Calcium Ionophore A 23187 on *in vitro* Induction of the Acrosome Reaction in Frozen-Thawed Bovine and Caprine Spermatozoa. *Theriogenology*, v. 54, n. 2, p. 185-192, 2000.
- PÉREZ, L. J.; VALCÁRCEL, A.; DE LAS HERAS, M. A.; MOSES, D.; BALDASSARE, H. The storage of pure ram semen at room temperature results in capacitation of a subpopulation of spermatozoa. *Theriogenology*, v. 47, n. 2, p. 549-558, 1997.
- RAJAMAHENDRAN, R.; AMBROSE, J. D.; LEE, C. Y. G. Anti-human sperm monoclonal antibody HS-11: a potential marker to detect bovine sperm capacitation and acrosome reaction *in vitro*. *Journal Reproduction Fertility*, v. 101, p. 539-545, 1994.
- RANDEL, R. D. Seasonal effects on female reproductive functions in the bovine (Indian breed). *Theriogenology*, v. 21, p. 170-185, 1984.
- SÁ, W. F.; LOPES, C. F.; CAMARGO, L. S.; FERREIRA, A. M.; RAMOS, A. A.; VIANA, J. H. M.; NOGUEIRA, L. A. Avaliação da capacitação espermática *in vitro* pela viabilidade e reação acrossômica. *Revista Brasileira de Ciência Veterinária*, v. 9, n. 2, p. 68-71, 2002.
- TANGHE, S.; VAN SOOM, A.; STERCKX, V.; DE KRUIF, A. Assessment of Different Sperm Quality Parameters to Predict *in vitro* Fertility of Bulls. *Reproduction Domestic Animal*, v. 37, n. 3, p. 127-32, 2002.
- THÉRIEN, I.; BLEAU, G.; MANJUNATH, P. Phosphatidylcholine-binding proteins of bovine seminal plasma modulate capacitation of spermatozoa by heparin. *Biology of Reproduction*, v. 52, p. 1372-1379, 1995.
- WAY, A. L.; HENAULT, M. A.; KILLIAN, G. J. Comparison of four staining methods for evaluating acrosome status and viability of ejaculated and cauda epididymal bull spermatozoa. *Theriogenology*, v. 43, p. 1301-1316, 1994.
- WHITFIELD, C. H.; PARKINSON, T. J. Relationship between fertility of bovine semen and *in vitro* induction of acrosome reactions by heparin. *Theriogenology*, v. 38, p. 11-20, 1992.