



Avaliação dos marcadores de apoptose e cinética espermática no ejaculado de garanhões *Evaluation of markers of apoptosis and the kinetics sperm in the ejaculate of stallions*

C.P. Freitas-Dell'Aqua¹, G.A. Monteiro, J.A. Dell'Aqua Júnior, F.O. Papa

¹Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Unesp, Botucatu, SP, Brasil.

¹Correspondência: cpaulafreitas@yahoo.com.br

Resumo

O trabalho objetivou avaliar a qualidade seminal por meio da cinética espermática e verificar a presença de marcadores de apoptose no ejaculado de garanhões. Assim, três ejaculados de seis diferentes garanhões foram avaliados, com auxílio do método CASA, em relação ao índice de translocação de fosfolípidos de membrana (ITPS), à ativação de caspase (Icasp) e ao índice de fragmentação de DNA (IDF) com microscopia de epifluorescência às zero, três, seis e 12 horas. Foi realizada ANOVA, contrastes entre médias pelo método Tukey, com nível de significância $P < 0,05$. Os parâmetros avaliados pelo CASA que apresentaram diferenças em todos os momentos avaliados foram: motilidades total e progressiva, número de espermatozoides rápidos e velocidade linear; já para os marcadores de apoptose, apenas o IDF apresentou diferenças entre os momentos zero, seis e 12 horas.

Palavras-chave: apoptose, garanhão, sêmen.

Abstract

The study aimed to evaluate the semen quality through the kinetic sperm and verify the presence of markers of apoptosis in the ejaculate of stallions. Thus, three different ejaculates from six stallions were evaluated by CASA, index of translocation of membrane phospholipids (ITPS), activation of caspase (Icasp) and DNA fragmentation index (DFI) by epifluorescence microscopy at 0, 3, 6 and 12 h. ANOVA was performed and contrasts between means by Tukey method, with significance level $P < 0.05$. The parameters evaluated by CASA that showed differences at all times evaluated were: total and progressive sperm motility, sperm count fast and linear velocity, as for markers of apoptosis only the IDF showed differences between times 0, 6 and 12 h.

Keywords: apoptosis, semen, stallion.

Introdução

A apoptose é caracterizada por distintas mudanças estruturais e bioquímicas nas células, incluindo a agregação da cromatina, condensação citoplasmática e mudanças nas membranas nucleares e citoplasmáticas (Willians e Smith, 1993). No final do processo, o núcleo é fragmentado e todos os debris celulares são denominados corpos apoptóticos. Esses corpos são dispersos nos espaços intercelulares e extrudados dos tecidos. Tal evento tem sido demonstrado por uma variedade de células (Wyllie et al., 1980; Wyllie, 1997).

Durante o início da apoptose, a fosfatidilserina, normalmente presente no interior da membrana das células saudáveis, é translocada e exposta no exterior. Esse distúrbio progressivamente pode levar à lesão de membrana (Martin et al., 1995). Foi demonstrado que a translocação de fosfatidilserina pode ser utilizada como uma marcação de deterioração precoce da membrana de espermatozoides congelados-descongelados de humanos (Duru et al., 2001) e de bovinos (Anzar et al., 2002).

Alguns autores têm demonstrado a existência de caspase-dependente no percurso para a apoptose no ejaculado de homens (Said et al., 2004; Marchetti e Marchetti, 2005). Essas enzimas são consideradas como as maiores transdutoras e efetoras dentro dos diferentes percursos de sinalização de apoptose em células somáticas. Elas pertencem à família de proteases altamente específicas, as quais contêm o aminoácido cisteína em seus sítios ativos (Paash et al., 2004). De um ponto de vista funcional, as caspases envolvidas na ação da apoptose podem ser classificadas como iniciadoras (caspases 8, 9, e 10) ou efetoras (caspases 3, 6 e 7; Brantton et al., 2000).

A análise da estrutura da cromatina do espermatozoide é o método que mais se correlaciona com a fertilidade. Esse teste avalia a susceptibilidade do DNA do espermatozoide à desnaturação; assim, a habilidade do DNA do espermatozoide para manter a dupla fita é determinada pela exposição ao ambiente ácido, podendo ser utilizado para avaliar a integridade do DNA no sêmen fresco, resfriado ou congelado (Love, 2005). Normalmente, alguns garanhões que exibem elevação do número de DNA comprometido em sêmen fresco também têm uma acelerada queda da qualidade do DNA quando o sêmen é resfriado ou estocado por longo

tempo (Love et al., 2002).

Tais alterações resultam em uma diminuição da longevidade da célula espermática no trato reprodutivo da fêmea. Esse fato é especialmente problemático em espécies como a equina, que apresenta um período de estro longo e que requer um cuidado maior na determinação da ovulação e da melhor hora para a inseminação (Ortega-Ferrusola et al., 2008).

O objetivo deste trabalho foi verificar a presença de marcadores de apoptose no ejaculado de garanhões em diferentes períodos de avaliação, em conjunto com a cinética espermática.

Material e Métodos

Utilizaram-se três ejaculados de seis diferentes garanhões. Os ejaculados foram colhidos por meio de vagina artificial. Após a colheita, o ejaculado foi filtrado para a retirada do gel, acondicionado em tubos de centrifuga, mantido em temperatura ambiente (25°C) e analisado às zero, três, seis e 12 horas após a colheita.

As análises da cinética espermática foram avaliadas por meio do HAMILTON THORNE RESEARCH – IVOS 12 (CASA), para mensuração da motilidade espermática total (MT), motilidade espermática progressiva (MP), velocidade de trajeto (VAP), velocidade linear (VSL), velocidade curvilinear (VCL) e porcentagem de espermatozoides com movimento rápido (RAP).

As análises do índice de translocação de fosfolípidos de membrana (ITPS), do índice de caspases ativadas (ICasp) e do índice de fragmentação de DNA (IDF) foram efetuadas em microscópio de epifluorescência (Leica, Alemanha) com aumento de 1000x. De cada amostra foram examinadas 200 células espermáticas.

Para a avaliação do ITPS, foi utilizado o *kit* anexina V-FITC *kit* II de apoptose (556570; BD Bioscience Pharmingen) de acordo com as recomendações do laboratório. Assim, alíquotas de sêmen foram diluídas em solução tampão de anexina V (10 mM Hepes/NaOH – pH 7,4 – 140 mM NaCl, 2,5 mM CaCl₂) a uma concentração de 1×10^6 espermatozoides/mL. Um volume de 100 µL (concentração final de 1×10^5) desta amostra foi colocado em um microtubo tipo eppendorf e, então, acrescido de 5 µL de anexina V-FITC e 5 µL de IP (50 µg/mL), homogeneizada e incubada por 15 minutos. Os diferentes padrões de células encontrados durante a análise foram classificados em células viáveis (anexina e iodeto de propídeo negativos; An-/PI-); células viáveis com translocação de fosfatidilserina (anexina positiva e iodeto de propídeo negativo; AN+/PI-); células lesadas com translocação de fosfatidilserina (anexina e iodeto de propídeo positivos; An+/PI+) e células mortas (anexina negativa e iodeto de propídeo positivo; An-/PI+). O índice de translocação de fosfatidilserina foi calculado com base na relação entre as células viáveis com translocação (AN+/PI-) e o total de células íntegras (PI-; Ricci et al., 2002).

A associação de FITC-VAD-FMK (G7462, Promega) foi utilizada como marcador *in situ* do ICasp. O protocolo empregado foi de acordo com o fabricante; assim, em 1 mL de uma solução de PBS com 1×10^6 espermatozoides foi adicionado 1 µL de FITC-VAD-FMK a 5mM, e, em seguida, ela foi homogeneizada e incubada em temperatura ambiente ao abrigo da luz por 20 minutos. Após a incubação, essa solução foi lavada (200 x g/5min) e ressuspensa em PBS com a concentração inicial e, então, foram adicionados 5 µL de IP (50 µg/mL). Decorridos cinco minutos, foi feita a leitura. Os diferentes padrões de células encontrados durante a análise foram classificados em células viáveis (caspase e iodeto de propídeo negativos; Casp-/PI-); células viáveis caspase ativada (caspase positiva e iodeto de propídeo negativo; Casp+/PI-); células lesadas com caspase ativada (caspase e iodeto de propídeo positivos; Casp+/PI+) e células mortas (caspase negativa e iodeto de propídeo positivo; Casp-/PI+). O índice de ativação de caspase (ICasp) foi calculado com base na relação entre as células viáveis com caspase ativada (Casp+/PI-) e o total de células íntegras (PI-).

Para a avaliação do IDF, foi realizado o teste de acridine orange de acordo com Unanian (2000). A amostra de sêmen foi lavada três vezes a 700 x g por três minutos em 2 mL de TALP. O *pellet* formado foi ressuspensa em TALP para uma concentração de 50×10^6 espermatozoides/mL. Desta solução foi preparado um esfregaço, o qual foi seco em temperatura ambiente por 60 minutos. O esfregaço foi imerso em solução Carnoy (três partes de metanol para uma parte de ácido acético) para fixação durante 12 horas. A lâmina seca em temperatura ambiente era posteriormente coberta com 3 mL da solução de acridine orange (10 mL de solução de acridine orange 1 µg/mL + 40mL de solução de ácido cítrico 0,1M + 2,5 mL de solução de fosfato dissódico 0,3M; pH = 2-3), ficando por cinco minutos em temperatura ambiente ao abrigo da luz. O esfregaço foi lavado com cuidado em água destilada e, antes de secar completamente, coberto com lâmina.

Para a análise estatística, utilizou-se o programa SAS, sendo calculado as médias (X) e desvio-padrão (DP) para todos os parâmetros avaliados. Para análise das variáveis entre os tempos estudados utilizou-se ANOVA e contrastes entre médias pelo método de Tukey, com nível de significância $P < 0,05$.

Resultados

De acordo com os resultados apresentados (Tab. 1), as principais diferenças ocorreram para motilidade total, progressiva, rápidos e VSL. Entretanto, à zero hora, a VAP apresentou valores superiores em relação aos

momentos seis e 12 horas, mas semelhantes às três horas; este também foi semelhante às seis horas e superior às 12 horas; e 12 horas foi diferente de seis horas. Para o parâmetro de VCL, o momento 12 horas foi inferior aos momentos zero, três, e seis horas, enquanto estes foram semelhantes entre si.

Tabela 1. Valores médios e desvio-padrão dos parâmetros de movimento espermático obtidos após análise computadorizada do movimento espermático às zero, três, seis e 12 horas após a colheita de três ejaculados de seis garanhões.

	0h	3h	6h	12h
MT	77,7 ± 7,7 ^a	63,5 ± 14,3 ^b	39,3 ± 16,1 ^c	4,8 ± 5,8 ^d
MP	31,5 ± 5,1 ^a	17,8 ± 6,2 ^b	9,3 ± 5,1 ^c	1,2 ± 1,4 ^d
RAP	62,4 ± 12,5 ^a	46,3 ± 16,9 ^b	25,8 ± 14,2 ^c	1,9 ± 3 ^d
VAP	120,4 ± 16,3 ^a	110,9 ± 23,4 ^{ab}	94,9 ± 24,1 ^b	76,5 ± 18,1 ^c
VSL	91,4 ± 9,9 ^a	77,4 ± 13,9 ^b	66,1 ± 13,2 ^c	54,9 ± 10,5 ^d
VCL	207,2 ± 32,1 ^a	202,2 ± 37,7 ^a	179,2 ± 44 ^a	141,3 ± 40 ^b

MT=motilidade espermática total (%); MP=motilidade espermática progressiva (%); VAP=velocidade de trajeto (µm/s); VSL=velocidade linear (µm/s); VCL=velocidade curvilínea (µm/s); RAP=espermatozoides com movimento rápido (%). Letras diferentes na mesma linha diferem estatisticamente entre si, P < 0,05.

Para os índices de apoptose avaliados (ITPS, ICasp e IDF), os resultados foram apresentados na Tab. 2. Em relação ao ITPS e ICasp, não houve diferença entre os tempos estudados. No entanto, para o IDF, o momento zero hora foi inferior aos momentos seis e 12 horas, enquanto três horas foi semelhante a todos.

Tabela 2. Valores médios e desvio-padrão dos parâmetros avaliados por microscopia de epifluorescência para índice de translocação de fosfolípidos de membrana (ITPS), índice de ativação de caspase (ICasp) e índice de fragmentação de DNA (IDF) obtidos às zero, três, seis e 12 horas após a colheita de três ejaculados de seis garanhões.

	0h	3h	6h	12h
ITPS	42,5 ± 12,4	47,9 ± 14,8	52,1 ± 17,4	38,8 ± 39
ICasp	37 ± 13,9	44 ± 14,3	49,5 ± 17,8	37,3 ± 42,1
IDF	6,5 ± 3,1 ^b	10,6 ± 5,2 ^{ab}	11,8 ± 4,5 ^a	14 ± 5,5 ^a

Letras diferentes na mesma linha diferem estatisticamente, P < 0,05.

Discussão

De acordo com os resultados, houve diminuição da qualidade espermática no decorrer do tempo de acordo com os parâmetros de MT, MP e rápidos. Os parâmetros espermáticos inerentes à característica do trajeto e as oscilações durante a movimentação da célula espermática não diferiram, portanto não se mostraram variáveis interessantes para serem investigadas durante a análise.

A presença de marcadores apoptóticos em células espermáticas maduras é explicada por uma variedade de teorias, entre elas a teoria da apoptose abortiva. Isto, em parte, explica a coexistência de marcadores tanto da fragmentação de DNA quanto da apoptose em espermatozoide do ejaculado, mostrando, desse modo, uma falha na eliminação de espermatozoides defeituosos durante a espermatogênese (Sakkas et al., 1999). Esses marcadores têm sido estudados predominantemente em homens com problemas de fertilidade. Assim, para células espermáticas maduras, foi proposto o modelo de morte induzida, em que alterações endócrinas levam à secreção do ligante do receptor de morte Fas (FasL) pelas células de Sertoli (Bustamante Filho et al., 2005). O receptor Fas é uma proteína de superfície celular que pertence à família dos receptores TNF (*tumor necrosis factor*) e NGF (*nerve growth factor*). O sinal apoptótico induzido por Fas é iniciado quando um ligante de Fas se une ao receptor, o que dispara uma via iniciada por caspase-8, que culminará com a ativação de caspases -3, -6, e -7, envolvidas com a fragmentação de DNA, inibição do reparo cromossômico, translocação de fosfolípidos de membrana e fragmentação celular (Thornberry e Lazebnik, 1998; Paasch et al., 2004).

O teste utilizado para determinar o ICasp não apresenta especificidade para estabelecer as diferentes caspases; sendo assim, determinou tanto as caspases indutoras quanto as efetoras, que se apresentam em momentos diferentes da cascata apoptótica. Isso pode ser a explicação para não terem ocorrido diferenças entre os tempos avaliados. Weng et al. (2001) observaram ativação de caspase-3 na peça intermediária do espermatozoide, juntamente com fragmentação de DNA em sêmen de baixa motilidade em homens inférteis e constataram que alterações na polarização da membrana mitocondrial estão envolvidas na formação do apoptossomo, responsável pela ativação da caspase-3. Uma explicação poderia ser a de que a fase de execução da apoptose envolveu a ativação de outras caspases (que não a caspase-3) que são detectadas pelo *kit* FITC-

VAD-FMK, assim pode-se especular que as caspases iniciadoras (como caspases-8 e -10), as quais são ativadas por receptores ligados à morte, é que estão envolvidas na apoptose do espermatozoide maduro (Sakkas et al., 1999).

No presente estudo, não foram constatadas diferenças para ITPS nos diferentes momentos estudados, o que sugere que talvez este não seja o método ideal para a análise da apoptose espermática no ejaculado, pois alterações da membrana plasmática, como a translocação da fosfatidilserina, podem ocorrer sem que seja um evento da cascata apoptótica. Apenas trabalhos sobre criopreservação de bovinos mostraram aumento da taxa de translocação de PS (Anzar et al., 2002). Isso pode ser explicado pela sensibilidade ao estresse térmico. O significado funcional do ITPS permanece ainda obscuro, entretanto não é provável que essas células com tais características sejam completamente competentes (Duru et al., 2001), revelando, assim, a presença de células danificadas em amostras de sêmen, as quais poderiam ter sido avaliadas como células normais em uma análise convencional (Anzar et al., 2002).

Nos estudos em humanos e equinos, observa-se correlação negativa entre fertilidade e integridade de DNA (Morrell et al., 2008). Assim, a concepção depende, entre outros fatores, da habilidade da cromatina espermática previamente condensada em se descondensar e formar o pronúcleo masculino durante a interação com o ovócito (Madrid-Bury et al., 2005). A fragmentação do DNA genômico é considerada um dos marcadores da apoptose, conhecida como a forma mais comum de morte das células eucarióticas (Donnelly et al., 2000). Isso pode alterar a capacidade fecundante dessas células ou, em etapas mais tardias, alterar o desenvolvimento embrionário, provocando casos de abortamento ou fetos com defeitos congênitos (Henkel et al., 2004). Em outro estudo, o IFD analisado em sêmen fresco aumentou ao longo do tempo, com variação entre espécies e entre indivíduos da mesma espécie (Gosálvez et al., 2008). O mesmo resultado foi observado no presente estudo, mostrando que os índices de fragmentação de DNA no ejaculado aumentaram no decorrer do tempo.

Entre os parâmetros da cinética espermática avaliados pelo CASA, as motilidades total e progressiva e o número de espermatozoides rápidos em uma amostra são os índices que mais marcaram a qualidade espermática de acordo com o tempo. Quanto aos marcadores de apoptose, o IDF foi o que apresentou diferenças nos diferentes momentos avaliados, sendo o que melhor avaliou a taxa de apoptose no ejaculado de garanhões.

Agradecimentos

Os autores agradecem à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (Fapesp, São Paulo, Brasil), pelo auxílio financeiro, processo Fapesp 2008/54286-4.

Referências

- Anzar M, He L, Buhr MM, Kroetsch TK, Pauls KP.** Sperm apoptosis in fresh and cryopreserved bull semen detected by flow cytometry and its relationship with fertility. *Biol Reprod*, v.66, p.354-360, 2002.
- Bratton SB, MacFarlane M, Cain K, Cohen GM.** Protein complexes activate distinct caspase cascades in death receptor and stress-induced apoptosis. *Exp Cell Res*, v.256, p.27-33, 2000.
- Bustamante Filho IC, Silva JFS, Jobim MIM.** Apoptose em espermatozoides: uma nova abordagem na avaliação da viabilidade espermática. *Semina Ciênc Agrar*, v.26, p.395-404, 2005.
- Donnelly ET, O'Connell M, McClure N, Lewis SE.** Differences in nuclear DNA fragmentation and mitochondrial integrity of semen and prepared human spermatozoa. *Hum Reprod*, v.15, p.1552-1561, 2000.
- Duru NK, Morshedi M, Schuffner A, Oehninger S.** Cryopreservation-thawing of fractionated human spermatozoa and plasma membrane translocation of phosphatidylserine. *Fertil Steril*, v.75, p.263-268, 2001.
- Gosálvez P, Cortes-Gutierrez EI, Nunez R, Fernandes JL, Caballero P, Lopez-Fernandez C, Holt W.** A dynamic assessment of sperm DNA fragmentation versus sperm viability in proven fertile human donors. *Fertil Steril*, v.92, p.1915-1919, 2008.
- Henkel R, Hajimohammad M, Stalf T, Hoogendijk C, Mehnert C, Menkveld R, Gips H, Schill WB, Kruger TF.** Influence of deoxyribonucleic acid damage on fertilization and pregnancy. *Fertil Steril*, v.81, p.965-972, 2004.
- Love CC.** The sperm chromatin structure assay: a review of clinical applications. *Anim Reprod Sci*, v.89, p.39-45, 2005.
- Love CC, Thompson JA, Lowry VK, Varner DD.** Effect of storage time and temperature on stallion sperm DNA and fertility. *Theriogenology*, v.57, p.1135-1142, 2002.
- Madrid-Bury N, Pérez-Gutiérrez JP, Pérez-Garnelo S, Moreira P, Pintado Sanjuanbenito B, Gutiérrez-Adán A, de la Fuente Martínez J.** Relationship between non-return rate and chromatin condensation of deep frozen bull spermatozoa. *Theriogenology*, v.64, p.232-241, 2005.
- Marchetti C, Marchetti P.** Detection of apoptotic markers in human ejaculated spermatozoa as new methods in human reproductive biology. *Gynecol Obstet Fertil*, v.33, p. 669-677, 2005.
- Martin SJ, Reutelingsperger CP, McGahon AJ, Rader JA, van Schie RC, LaFace DM, Green DR.** Early redistribution of plasma membrane phosphatidylserine is a general feature of apoptosis regardless of the

initiating stimulus: inhibition by overexpression of Bcl-2 and Abl. *J Exp Med*, v.182, p.1545-1556, 1995.

Morrel JM, Johannisson A, Dalin AM, Hammar L, Sandebert T, Rodriguez-Martinez H. Sperm morphology and chromatin integrity in Swedish warmblood stallions and their relationship to pregnancy rates. *Acta Vet Scand*, v.50, p.2, 2008.

Ortega-Ferrusola C, Sotillo-Galan Y, Varela-Fernandez E, Gallardo-Bolanos JM, Muriel A, Gonzalez-Fernandez L, Tapia JA, Pena FJ. Detection of "Apoptosis-Like" changes during cryopreservation process in equine sperm. *J Androl*, v.29, p.213-221, 2008.

Paasch U, Grunewald S, Agarwal a, Glandera H. Activation pattern of caspase in human spermatozoa. *Fertil Steril*, v.81, p.802-809, 2004

Ricci G, Perticarari S, Fragonas E, Giolo E, Canova S, Pozzobon C. Apoptosis in human sperm: its correlation with semen quality and the presence of leukocytes. *Hum Reprod*, v.17, p.2665-2672, 2002.

Said TM, Paasch U, Glander HJ, Agarwal A. Role of caspases in male infertility. *Hum Reprod Update*, v.10, p.39-51, 2004.

Sakkas D, Mariethoz E, St John JC. Abnormal sperm parameters in humans are indicative of an abortive apoptotic mechanism linked to the Fas-mediated pathway. *Exp Cell Res*, v.251, p.350-355, 1999.

Thorberry NA, Lazebnik Y. Caspases: enemies within. *Science*, v.281, p.1312-1316, 1998.

Unanian, MM. Integridade da cromatina: método complementar para avaliação da qualidade do sêmen bovino. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2000. 21p. (Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Documentos, 56).

Weng SL, Schuffner A, Morshedi M, Beebe S, Taylor S, Oehninger SC. Caspase-3 activity is present at low levels in ejaculated human spermatozoa. *Fertil Steril*, v.76, p.193, 2001.

Willians GT, Smith CA. Molecular regulation of apoptosis: genetic controls on cell death. *Cell*, v.74, p.777-779, 1993.

Wyllie AH. Apoptosis and carcinogenesis. *Eur J Cell Biol*, v.73, p.189-97, 1997.

Wyllie AH, Kerr JF, Currie AR. Cell death: the significance of apoptosis. *Int Rev Cytol*, v.68, p.251-306, 1980.
