



Marcelo Emílio Beletti, ⁷, 397

Este exemplar corresponde a Redação Final da Tese
Defendida pelo Candidato Marcelo Emílio Beletti e
aprovada pela Comissão julgadora. Campinas, 27 de
Abril de 1992.

**Anomalias em Complexo DNA-Proteína
de Espermatozóides de Touro:
Contribuição Metodológica**

Tese apresentada ao Instituto de
Biologia da UNICAMP para a
obtenção do Título de Mestre em
Ciências Biológicas na Área de
Biologia Celular.

Orientadora: Profª Dra. Maria Luiza Silveira Mello, ^t

CAMPINAS

1992

9012336

UNIDADE	BC
CHAMADA	84/10
FX	
OMD D.	16686
ROC.	215/92
☐ D ☒	
RECO	0.520.000,00
DATA	23/05/92
CPD	

CM-00024155-3

*A vaidade é o maior dos defeitos,
porque engana a nós mesmos.
Por mais que seja sábio,
há sempre alguém mais sábio que você.*

Dedico

*à minha esposa Valquíria,
à minha filha Renata,
aos meus pais Paulo e Maria Aparecida e
ao meu grande amigo Sylvio Ferri.*

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Maria Luiza Silveira Mello, pelo interesse e confiança demonstrados durante o desenvolvimento deste trabalho e pela orientação e compreensão com que agraciou à minha pessoa.

Ao Prof. Dr. Benedicto de Campos Vidal, à Dra. Shirlei Maria Recco-Pimentel e à Dra. Maria José Lima da Silva pela cuidadosa leitura deste trabalho e pelas valiosas sugestões que levaram ao aprimoramento do mesmo.

Aos professores do Departamento de Biologia Celular - UNICAMP pelos valiosos conhecimentos adquiridos e que direta ou indiretamente contribuíram para que este trabalho se concretizasse.

Aos colegas e funcionários do Departamento de Biologia Celular - UNICAMP, pela amizade, colaboração e agradável convívio com os quais me distinguiram.

À PECPLAN-Bradesco, nas pessoas do Dr. Eduardo Henrique Correa e Dr. Fernando Vilella que não mediram esforços para o fornecimento de sêmen.

Ao Prof. Dr. Aquiles Eugênio Piedrabuena e Benedito de Freitas Bueno, por seus conselhos na estatística deste trabalho.

Às colegas Margarete e Maristela pelo auxílio na elaboração do *Summary*.

A todos que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho.

Parte dos equipamentos utilizados na UNICAMP foram provenientes de convênio CNPq e FAPESP.

ÍNDICE

INTRODUÇÃO	1
MATERIAL	5
MÉTODOS	10
RESULTADOS	13
DISCUSSÃO	24
CONCLUSÕES	27
RESUMO	29
SUMMARY	31
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	33

INTRODUÇÃO

Normalmente, os touros utilizados como reprodutores passam pela determinação de um espermograma de rotina, mas diversos touros que apresentam espermatozóides com morfologia, motilidade e enzimas normais podem vir a se comportar como subférteis. Mesmo touros comprovadamente férteis, podem apresentar intervalos de subfertilidade inexplicáveis.

Inicialmente acreditava-se que este fenômeno fosse devido a alterações no conteúdo de DNA nos espermatozóides dos animais afetados. Submetendo preparados de espermatozóides destes animais à reação Feulgen, M. Peres e colaboradores (1960) e B. Gledhill (1966), através de microespectrofotometria, constatarem um aumento significativo de coloração na cabeça de grande parte dos mesmos, o que poderia indicar um maior conteúdo de DNA. Gledhill (1966) no entanto, usando microespectrofotometria de ultra-violeta, que dispensa coloração do material e algumas outras etapas processuais, não mais constatou diferenças no conteúdo de DNA para estes espermatozóides. Isto supostamente indicaria que a reação de Feulgen estaria se processando de modo diferente nos espermatozóides testados, embora seu conteúdo de DNA não estivesse alterado.

A diferença ocorrida quanto à resposta à reação de Feulgen foi então admitida como sendo devida a uma remoção das proteínas nucleares maior do que a esperada, alterando a cinética hidrolítica do DNA (depurinação mais rápida) e consequentemente alterando o nível de resposta à reação citoquímica (Mello & Vidal, 1978). Isto poderia ser explicado por alterações no complexo DNA-proteína, tornando-o mais frouxo e quimicamente menos estável, e facilitando assim a remoção das proteínas. Esta alteração poderia ser devida à presença de unidades atípicas de aminoácidos na proteína nuclear associada ao DNA nesses espermatozóides (Balhorn, 1982; Mello, 1990).

Alterações no complexo DNA-proteína também explicariam o decréscimo em material Feulgen-positivo nos espermatozóides de sêmen congelados por longo tempo (Salisbury *et alii*, 1961; Handa *et alii*, 1965), devido a um maior fortalecimento da ligação eletrostática entre a proteína nuclear e o DNA e mesmo entre as proteínas.

As diferentes respostas à reação de Feulgen durante a espermiogênese podem ser explicadas pela presença de um tipo de proteína básica no complexo DNA-proteína que tornaria o DNA mais resistente à hidrólise ácida, e portanto com uma resposta à reação de Feulgen gradualmente mais fraca (Gredhill, 1970).

Por outro lado, Britto e colaboradores (1988) detectaram um decréscimo nos valores Feulgen-DNA em espermatozóides de alguns touros da raça "pé-duro", comparados a touros de rebanho de elite. Esta diferença também foi admitida como sendo devida a alterações do complexo DNA-proteína, mas neste caso foi admitido ocorrer não só uma maior depurinação mas também aceleração na velocidade de solubilização do ácido apurínico (segunda etapa da reação de Feulgen)(Mello & Vidal, 1978).

Em 1980, Evenson e colaboradores submeteram preparados de espermatozóides de touro a tratamento térmico e posteriormente à coloração com alaranjado de acridine (Acridine Orange, AO), efetuando observações ao microscópio de fluorescência. Encontraram espermatozóides com fluorescência verde, que é típica de DNA em dupla hélice e fluorescência vermelha, que é típica de DNA desnaturado (e RNA, desprezível em espermatozóides)(Fig. 1). Admitiram que os espermatozóides com fluorescência verde possuíam um complexo DNA-proteína estável o suficiente para suportar um rápido tratamento térmico sem se desnaturar. Já aqueles que apresentavam fluorescência vermelha provavelmente possuiriam alterações no complexo DNA-proteína, tornando-o instável e permitindo a sua desnaturação pelo mesmo tratamento térmico. Utilizando citometria de fluxo (flow cytometry), encontraram um índice de 17% de espermatozóides sensíveis à desnaturação do DNA em touros altamente férteis, enquanto em touros subférteis este índice era muito mais alto (76%). É interessante citar que foi encontrada fluorescência vermelha em praticamente todos os espermatozóides com patologia de cabeça. Considerando-se estes dados, vê-se que este método poderia ser utilizado como um dos instrumentos para identificar animais com problemas de fertilidade (Mello, 1990).

Em 1977, Mello havia também desenvolvido um novo método ("metacromasia induzida") para identificar alterações no complexo DNA-proteína em espermatozóides de touro (Mello, 1977). Este método consta de um tratamento ácido (HCl 4N a 25 °C, 15 a 20 min.) seguido de coloração com Azul de Toluidina (AT). Os espermatozóides normais se corariam em verde, mas aqueles com anomalias no complexo DNA-proteína se corariam em violeta. Isto ocorria devido ao caráter mais frouxo desse complexo nos espermatozóides anômalos, o que permitiria durante a hidrólise ácida a liberação de grande parte dos grupos fosfatos do DNA (sítios de ligação para o AT), antes bloqueados pela proteína nuclear, além da própria condição intrínseca ao complexo anômalo de já possuir alguns grupos fosfatos não bloqueados pela proteína. Esta alta disponibilidade e proximidade de grupos fosfatos livres para a ligação com o corante, permite o empilhamento das moléculas de AT, ocorrendo assim o fenômeno conhecido como metacromasia, ou seja, um abaixamento dos valores de absorbância na região dos comprimentos de onda mais longos

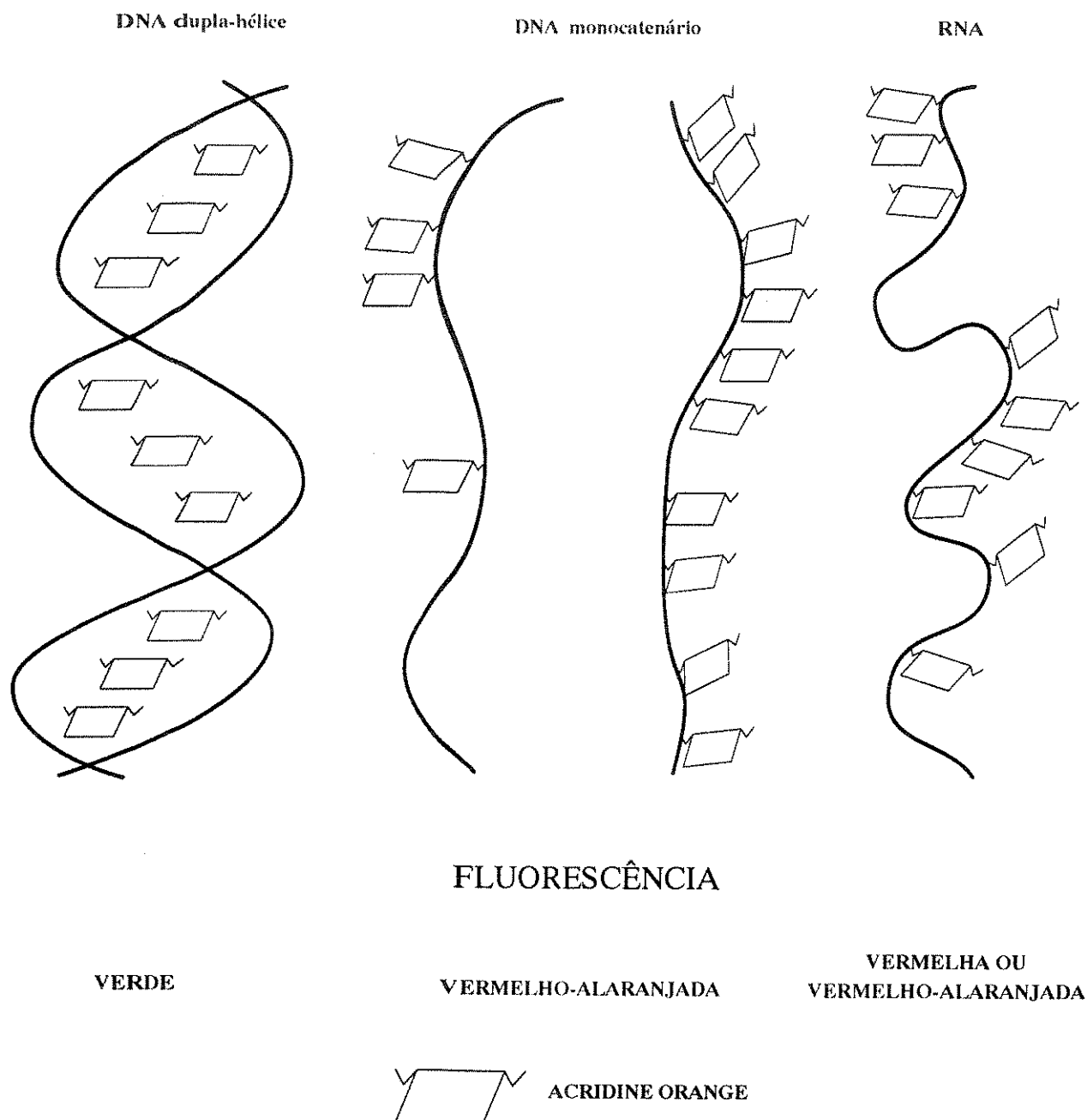


Fig. 1 - O acridine orange (AO) se intercala entre as bases nitrogenadas do DNA, no interior da dupla hélice, provocando uma fluorescência verde. O RNA, sendo em sua maior extensão monocatenário, liga moléculas de AO apenas em seus grupos fosfatos, sendo assim originada uma fluorescência vermelho-alaranjada. No DNA denaturado (por exemplo, pelo calor), como as suas duas fitas se separam, o corante somente se ligará aos seus grupos fosfatos, à semelhança do que acontece no RNA; a sua fluorescência será igualmente vermelho-alaranjada. As proteínas não estão representadas (esquema segundo **Mello, 1990** - submetido à publicação).

(hipocromismo) acompanhado de um deslocamento de pico para comprimentos de onda mais curtos (hipsocromismo), sendo a cor violeta a expressão visual deste fenômeno (Lison, 1960; Vidal, 1987) (Fig. 2).

Em 1982, Mello observou que o fenômeno de metacromasia induzida em touros subfêrteis era de 12 a 20 vezes maior que a de touros altamente férteis. Diferindo dos achados de fluorescência dos experimentos de Evenson, nem todos os espermatozóides com patologia de cabeça foram encontrados exibindo metacromasia induzida, embora geralmente os ejaculados contendo altos percentuais de espermatozóides com esta alteração também apresentassem percentuais acima dos toleráveis para patologia de cabeça. Apesar dos níveis de anomalia encontrados em ambos os métodos citados serem diferentes, visto que os próprios princípios dos métodos citoquímicos diferem (Mello, 1977; Evenson *et alii*, 1980; Mello, 1982; Ballachey *et alii*, 1987; Vidal, 1987; Britto & Mello, 1988), podem ser os mesmos usados no diagnóstico de subfertilidade em touros (Mello, 1990), desde que conhecidos os níveis de anormalidades detectáveis para cada um dos casos (Evenson *et alii*, 1980; Mello, 1982; Ballachey *et alii*, 1987; Britto & Mello, 1988).

Embora dos dois métodos, o de metacromasia induzida envolva maior simplicidade e menores custos (Mello, 1990), variantes metodológicas poderiam ser testados, buscando-se o estabelecimento de até melhor adequação em termos de custos operacionais baixos, rapidez e aplicabilidade aos propósitos de diagnose de complexos DNA-proteína anômalos.

Este trabalho busca, portanto, desenvolver variantes metodológicas dos procedimentos acima citados para identificação de anomalias no complexo DNA-proteína de espermatozóides de touro. Para tal, pretende-se utilizar diferentes condições de execução da etapa destinada a colaborar para o afrouxamento da ligação entre DNA e proteína e maior exposição de grupos fosfatos do DNA aos corantes, em espermatozóides portadores de diversas patologias conhecidas ("pouch formation", estreito na base, "knobbed") e supostamente portadores de anomalias químicas ao nível de seus complexos DNA-proteína, comparando-os com resultados obtidos através dos métodos reportados acima.

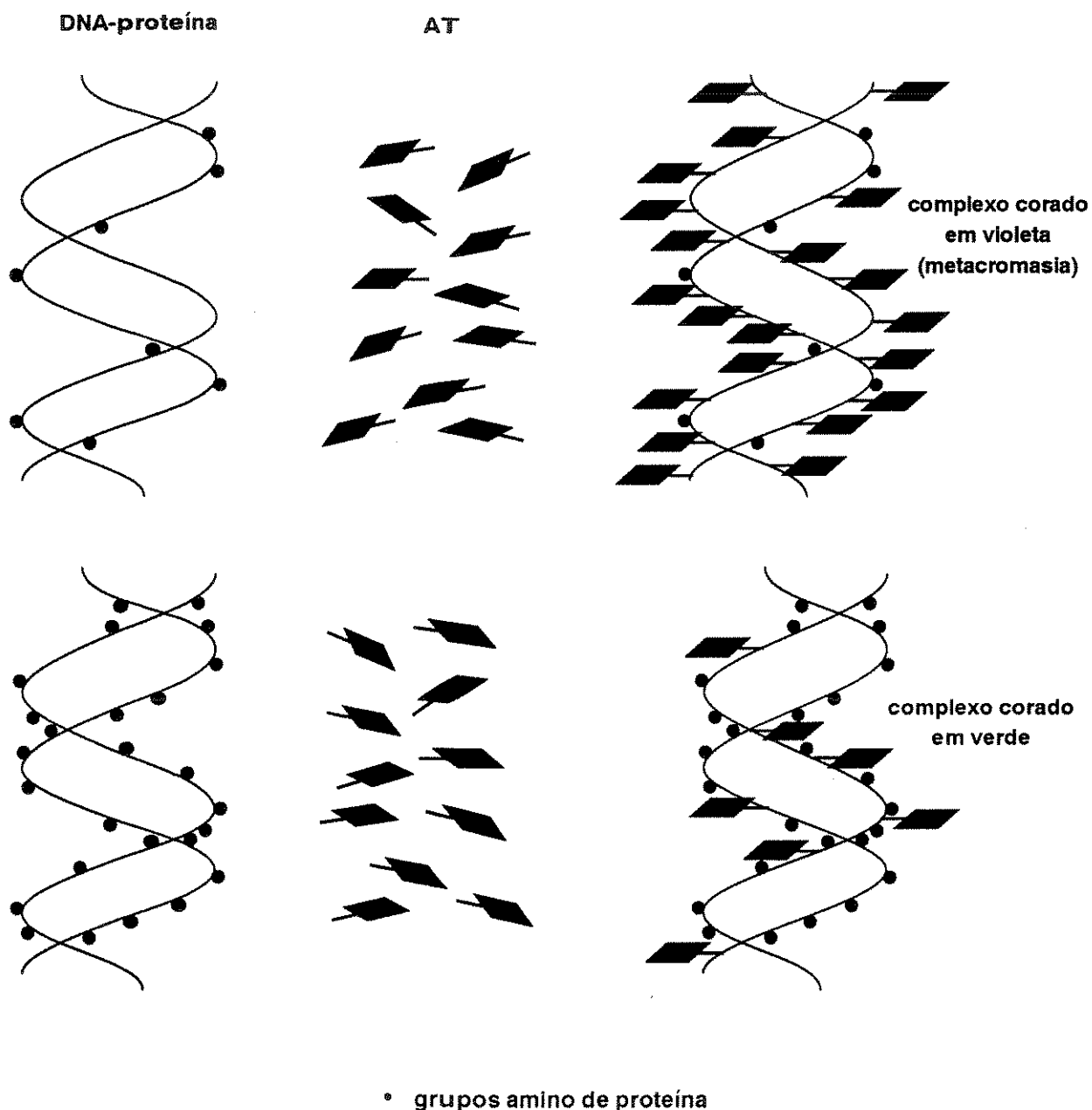


Fig. 2 - O princípio da basofilia em complexos DNA-proteína corados com azul de toluidina (AT) se baseia na disponibilidade e proximidade de fosfatos do DNA não ligados à proteína, aptos a ligarem moléculas do corante. Se no complexo considerado o DNA apresentar poucos grupos fosfatos livres e distantes entre si, o produto final da coloração apresentará uma tonalidade verde. Se, no entanto, ocorrerem no DNA muitos grupos fosfatos não ligados à proteína e estes estiverem próximos entre si, muitas moléculas de AT se ligarão em sequência ao DNA e a cor exibida, violeta, será uma expressão do fenômeno denominado de metacromasia (esquema segundo **Mello, 1990** - submetido à publicação).

MATERIAL

Foram utilizadas dezenove partidas de sêmen congelado de touros de diversas raças (nelore, gir, simental, holandês), sendo dezoito oriundas da Central de Tecnologia de Sêmen Pecplan-Bradesco de Uberaba - MG e uma da Central de Tecnologia de Sêmen Sembra de Barretos - SP. Quatorze destas partidas não chegaram a ser comercializadas por ter sido identificada a presença de alta porcentagem de espermatozóides portadores de anomalias "pouch formation" (Fig. 3), estreito na base (Fig. 4) e condensação de acrossomo ("knobbed")(Fig.5). Uma das partidas foi comercializada, mas apresentou uma baixa taxa de concepção por fatores desconhecidos. Finalmente, quatro partidas foram comercializadas e apresentaram alta taxa de concepção (touros altamente férteis).

A Tabela I atribui códigos às partidas e mostra suas respectivas descrições.

TABELA I

Código	Raça	Proveniência	Anomalias	Taxa de Concepção
1	Holandês	PECPLAN	não tem	alta
2	Simental	PECPLAN	não tem	alta
3	Holandês	SEMBRA	não tem	alta
4	Gir	PECPLAN	não tem	alta
5	Nelore	PECPLAN	pouch formation	não testado
6	Nelore	PECPLAN	pouch formation	não testado
7	Nelore	PECPLAN	pouch formation	não testado
8	Limosan	PECPLAN	pouch formation	não testado
9	Nelore	PECPLAN	pouch formation	não testado
10	Gir	PECPLAN	pouch formation	não testado
11	Nelore	PECPLAN	pouch formation	não testado
12	Guzerá	PECPLAN	pouch formation	não testado
13	Nelore	PECPLAN	pouch formation	não testado
14	Nelore	PECPLAN	pouch formation	não testado
15	Gir	PECPLAN	pouch formation	não testado
16	Simental	PECPLAN	estreito na base	não testado
17	Nelore	PECPLAN	estreito na base	não testado
18	Nelore	PECPLAN	"pouch formation + knobbed"	não testado
19	Holandês	PECPLAN	desconhecido*	baixa

* Após reanálise da partida, atribuiu-se a baixa concepção da mesma à alta porcentagem de espermatozóides levemente estreitos na base.

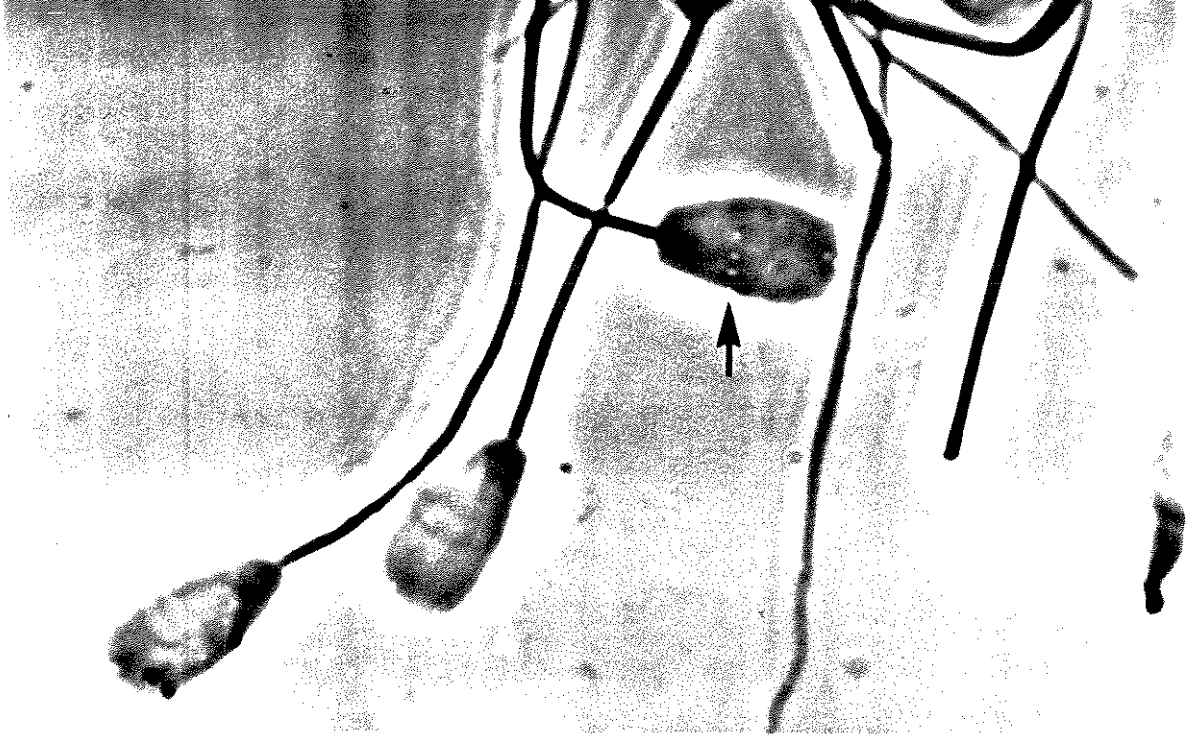


Fig. 3 - Estreção de sêmen do touro 18, visto ao microscópico de contraste de fase. A seta indica a presença de "pouch formation". Aumento 3.000X.

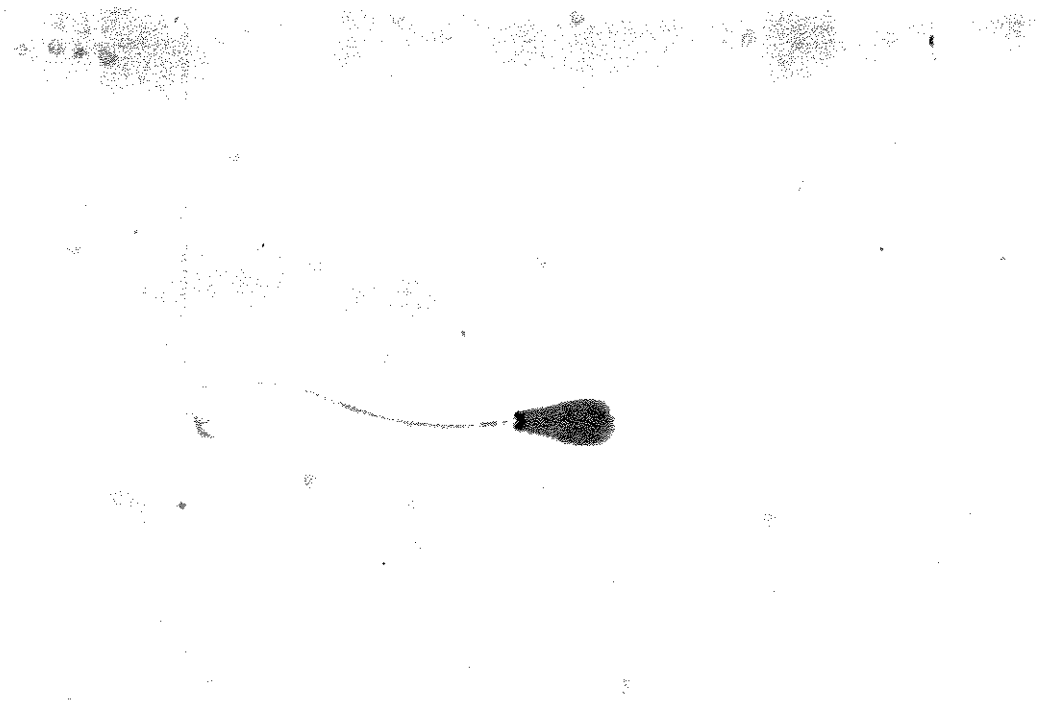


Fig. 4 - Estreção de sêmen do touro 16, tratado com solução 2SSC "overnight" e corado com AT a pH 4 por 15 minutos, mostrando um espermatozóide estreito na base. Aumento 1.500X.



Fig. 5 - Esfregaço de sêmen do touro 18, visto ao microscópio de contraste de fase. A seta indica uma condensação do acrossomo ("knobbed"). Aumento 3.000X.

MÉTODOS

Após descongelamento em água a 40°C durante um minuto, parte das amostras foi utilizada diretamente na obtenção de esfregaços. O restante das amostras foi diluído em NaCl 0,15M e EDTA 0,001M (Evenson *et alii*, 1980) numa proporção de 0,5 ml de sêmen para 9,5 ml de solução e centrifugado à temperatura ambiente a 3.000 rpm por 6 minutos. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi resuspendido em 10 ml da mesma solução e novamente centrifugado a 3.000 rpm por 6 minutos. Após ser submetido três vezes aos procedimentos de diluição e centrifugação, o que visou remover o meio de diluição usado no congelamento, o sêmen foi ressuspendido em 0,5 ml de solução para posteriormente ser efetuado o esfregaço.

Todos os esfregaços foram fixados por um minuto em etanol-ácido acético (3:1) e lavados em etanol a 70% por 3 minutos.

Após a fixação os preparados foram corados com solução de azul de toluidina (AT) a 0,025% em tampão McIlvaine a pH 4 e 5, conforme o método de Vidal (Mello & Vidal, 1980) precedidos dos seguintes tratamentos:

- a1 Sem tratamento prévio (controle);
- b1 HCl 4 N por 15 minutos à temperatura ambiente e lavagem em água destilada (Mello, 1982);
- c1 Ácido cítrico a 0,67% durante 35 minutos e lavagem em água destilada (modificado de Roy *et alii*, 1982);
- d1 Solução 2 SSC à temperatura de 60°C "overnight" e lavagem com água destilada (Mello, comunicação pessoal);
- e1 Solução SSC à temperatura de 60°C "overnight" e lavagem com água destilada;
- f1 Solução de 2-mercaptoetanol 0,2M, uréia 4M e cloreto de sódio 0,8M por 20 minutos e lavagem com água destilada (Mello, 1982);
- g1 Solução de 2-mercaptoetanol 0,2M, uréia 0,1M e cloreto de sódio 0,8M por 10 minutos e lavagem com água destilada (modificado de Mello, 1982).

Parte dos preparados foi também corada com solução de "acridine orange" (AO) subsequente aos seguintes procedimentos:

- a2 Sem prévio tratamento (controle);
- b2 HCl 4N por 15 minutos à temperatura ambiente e lavagem em água destilada (Mello, 1982);
- c2 Ácido cítrico 0,67% durante 35 minutos e lavagem em água destilada (modificado de Roy *et alii*, 1982);
- d2 Ácido cítrico a 2% durante 30 minutos e lavagem em água destilada;
- e2 HCl 0,5N variando-se o tratamento de 1 a 6 minutos à temperatura ambiente e lavagem em água destilada.

Após os tratamentos acima mencionados foi colocada uma gota de solução contendo NaCl 0,5M, MgCl 5mM, Tris-HCl 20mM (pH 7,4), AO $2,67 \times 10^{-5}$ M (Evenson *et alii*, 1980) entre lâmina e lamínula, observando-se a fluorescência depois de um minuto em microscópio de fluorescência Nikon ou Zeiss.

Nos preparados em que a coloração foi realizada com solução de azul de toluidina, foi estabelecida para cada condição analisada a percentagem de espermatozóides com metacromasia nuclear em 1.000 células (aumento 400X) contadas ao acaso por lâmina, por animal.

Nas lâminas tratadas com ácido cítrico a 2% (b2) e HCl 4N (d2), coradas com "acridine orange", foi estabelecida para cada condição analisada, a percentagem de espermatozóides com maior intensidade de fluorescência nuclear em 1.000 células (aumento 400X), contadas ao acaso, por lâmina, por animal.

A documentação fotográfica foi realizada em fotomicroscópio Zeiss com objetivas de 25X, 40X e 100X e optovar 1,25; 1,6 e 2,0. Para as observações de fluorescência nuclear foi utilizado filtro de excitação I com máximo de transmissão em torno de $\lambda = 400$ nm e filtros de barragem 53 e 50, que correspondem a transmissão de luz com λ acima de 530 nm e 500 nm, respectivamente (Vidal, 1987). Foi utilizado filme Kodak Gold asa 100.

RESULTADOS

Esfregaços sem a Retirada do Meio Diluente do Sêmen

Os esfregaços corados com "acridine orange" apresentaram fluorescência de intensidade variável, sendo vermelho-alaranjada quando pré-tratada com HCl 4N e verde para os demais tratamentos. Não foi realizada uma análise quantitativa, pois a observação de diferenças de fluorescência, tanto na intensidade como na cor, era difícil e inconstante em lâminas preparadas com o sêmen de um mesmo touro.

Com relação aos preparados corados com azul de toluidina, as lâminas submetidas a tratamento com solução 2 SSC (d₁) e SSC (e₁) apresentaram uma retirada do material, não sendo possível uma análise das mesmas.

Já as lâminas tratadas com 2-mercaptoetanol (f₁ e g₁) apresentaram a formação de uma película sobre o material, impedindo uma análise confiável das mesmas.

Os demais tratamentos mostraram parte dos espermatozoides com as cabeças completamente ou parcialmente (somente na base) metacromáticas, semelhante às observações de Mello (1982)(Fig. 6 e 7).

A ocorrência de resposta metacromática nuclear bem evidente na região da base da cabeça dos espermatozoides foi muito mais frequente na partida 16, sendo notada em todos os métodos. Nas demais partidas esta ocorrência foi eventual, sendo mais frequente nas lâminas pré-tratadas com 2-mercaptoetanol (g₁).

Os resultados quantitativos obtidos frente a estes métodos para metacromasia nuclear após coloração com azul de toluidina estão demonstrados na Tabela II.

Através da tabela II verifica-se que a resposta metacromática nuclear em espermatozoides de touro pode ser também encontrada em alguns animais quando a coloração não é precedida por qualquer tratamento (a₁), sendo mais frequente para coloração com azul de toluidina pH 5,0, e em animais com problemas de sub-fertilidade.

De modo geral, no entanto, a metacromasia induzida é mais frequente após pré-tratamento com HCl (b₁), especialmente quando utilizado AT a pH 5,0 e entre os animais com problemas de fertilidade, apesar destas diferenças de frequência ser pequena.

Nestas condições o pré-tratamento com ácido cítrico (c₁) não se mostrou eficaz para indução da resposta metacromática, já que o número de espermatozoides metacromáticos após este procedimento foi muito semelhante ao obtido após coloração não precedida de qualquer tratamento.

TABELA II

Porcentagem de espermatozóides metacromáticos em esfregaço de s men congelado de touro sem a retirada do meio diluente.

Touros	TRATAMENTOS					
	a1 pH4	a1 pH5	b1 pH4	b1 pH5	c1 pH4	c1 pH5
1	0.05	0.00	0.10	0.15	0.05	0.10
2	0.00	0.15	0.10	0.05	0.00	0.10
3	0.00	0.00	0.05	0.10	0.10	0.05
4	0.00	0.05	0.15	0.15	0.05	0.10
5	0.15	0.10	0.10	0.15	0.15	0.10
6	0.00	0.05	0.25	0.30	0.00	0.15
7	0.05	0.25	0.10	0.25	0.10	0.15
8	0.05	0.25	0.25	0.30	0.20	0.15
9	0.00	0.15	0.25	0.20	0.05	0.20
10	0.10	0.10	0.05	0.20	0.15	0.15
11	0.00	0.20	0.10	0.30	0.00	0.30
12	0.00	0.15	0.05	0.20	0.00	0.05
13	0.10	0.25	0.15	0.25	0.05	0.15
14	0.10	0.20	0.10	0.25	0.10	0.15
15	0.10	0.35	0.25	0.20	0.25	0.20
16	0.10	0.30	0.30	0.35	0.10	0.40
17	0.15	0.15	0.10	0.30	0.10	0.10
18	0.20	0.15	0.15	0.25	0.20	0.15
19	0.10	0.10	0.20	0.20	0.05	0.20



Percentuais acima do máximo encontrado nas partidas com alta taxa de concepção (1,2,3,4)

Esfregaços com a Retirada do Meio Diluente do Sêmen

As lâminas coradas com "acridine orange" sem prévio tratamento (a2) e precedidas dos tratamentos com ácido cítrico a 0,67% (c2) e a 2% (d2) apresentaram espermatozóides com fluorescência verde, existindo entre estes alguns com maior intensidade de fluorescência. Esta variação de intensidade de fluorescência foi melhor notada nos esfregaços tratados com ácido cítrico a 2%, sendo também possível observar espermatozóides apresentando maior intensidade de fluorescência somente na base (Fig. 8).

Já nos esfregaços corados com "acridine orange" e pré-tratados com HCl 4N (b2) observaram-se espermatozóides com fluorescência vermelho-alaranjada, sendo possível notar espermatozóides com maior intensidade de fluorescência em toda a cabeça (Fig. 9) ou somente na base (Fig. 10). A Tabela III mostra os percentuais de espermatozóides com maior intensidade de fluorescência nessas lâminas e naquelas tratadas com ácido cítrico a 2% (d2).

Com a variação de tempo do tratamento com HCl 0,5N e coloração com "acridine orange", obtiveram-se lâminas apresentando espermatozóides com fluorescência verde e vermelho-alaranjada (Fig. 11). Não foi possível uma avaliação confiável do percentual dos espermatozóides com fluorescência verde e vermelho-alaranjada, pois o tempo necessário para que as duas cores aparecessem variou intensamente (de 2 a 6 minutos) para material de um mesmo touro e a fluorescência vermelha desaparecia rapidamente.

Tanto o tratamento com solução 2 SSC (d1) como aquele com 2-mercaptoetanol e uréia 4M (f1)(Fig. 12) mostraram todos os espermatozóides metacromáticos.

Nos demais métodos usando coloração com azul de toluidina obtiveram-se resultados semelhantes aos observados nas lâminas com meio diluente do sêmen (Fig. 13 e 14), variando apenas quantitativamente, como está demonstrado na Tabela III. Alguns espermatozóides apareceram metacromáticos, mas não intensamente corados.

Através da Tabela III verifica-se que todos os pré-tratamentos mostraram-se eficazes na indução de resposta metacromática, porém o 2-mercaptoetanol (g1) e a solução SSC (e1) mostraram uma maior eficiência. Verifica-se também que uma resposta metacromática nuclear é também encontrada nas lâminas sem tratamento precedendo a coloração, semelhante ao observado nos esfregaços com sêmen contendo o meio de diluição.

É possível notar que as partidas 9 e 10 e mesmo as 5 e 6 apresentaram percentuais de espermatozóides metacromáticos semelhantes aos das partidas com alta taxa de concepção

(1, 2, 3 e 4), apesar de apresentarem grande quantidade de espermatozóides com "pouch formation". As demais partidas apresentaram percentuais acima dos apresentados pelos touros altamente férteis, destacando-se principalmente a partida 16.

TABELA III

Porcentagem de espermatozoides metacromáticos (a₁-g₁) ou com maior intensidade de fluorescência (b₂,d₂) em esfregaços de sêmen congelado de touro, após a retirada do meio diluente.

TOUROS	TRATAMENTOS											
	a1 pH4	a1 pH5	b1 pH4	b1 pH5	c1 pH4	c1 pH5	e1 pH4	e1 pH5	g1 pH4	g1 pH5	b2 AO	d2 AO
1	0.00	0.00	0.25	0.25	0.10	0.15	0.15	0.30	0.20	0.25	0.45	0.50
2	0.10	0.15	0.20	0.30	0.15	0.15	0.35	0.30	0.40	0.40	0.70	0.75
3	0.00	0.05	0.15	0.30	0.15	0.15	0.40	0.45	0.25	0.30	0.45	0.45
4	0.00	0.15	0.25	0.40	0.15	0.30	0.35	0.35	0.35	0.35	0.65	0.35
5	0.15	0.20	0.20	0.45	0.15	0.20	0.35	0.55	0.50	0.70	0.70	0.60
6	0.10	0.20	0.25	0.55	0.20	0.20	0.40	0.40	0.40	0.50	0.65	0.60
7	0.25	0.20	0.60	0.60	0.35	0.35	0.50	0.55	0.60	0.60	0.75	0.70
8	0.05	0.20	0.35	1.15	0.15	0.25	0.55	0.65	0.60	1.10	1.15	1.25
9	0.05	0.10	0.25	0.40	0.10	0.20	0.25	0.45	0.40	0.50	0.70	0.75
10	0.05	0.10	0.25	0.45	0.15	0.20	0.35	0.40	0.40	0.55	1.05	1.10
11	0.05	0.10	0.25	0.55	0.25	0.25	0.55	1.00	0.75	0.80	0.70	0.45
12	0.05	0.10	0.35	0.80	0.25	0.25	1.05	1.00	0.95	1.00	0.70	0.50
13	0.20	0.20	0.45	0.60	0.25	0.35	1.35	1.35	0.55	0.60	0.80	0.65
14	0.15	0.20	0.40	1.00	0.35	0.50	1.65	2.85	0.65	0.75	1.35	1.40
15	0.20	0.25	0.40	0.60	0.30	0.35	0.80	0.65	0.45	0.75	1.00	1.05
16	0.20	0.35	1.35	7.45	0.35	0.75	5.65	16.70	33.20	38.75	29.85	40.05
17	0.05	0.10	0.25	0.55	0.30	0.30	0.60	0.55	0.45	0.75	0.75	1.00
18	0.20	0.25	0.65	1.75	0.35	0.90	1.55	1.50	2.95	3.55	1.75	1.65
19	0.15	0.20	0.25	0.60	0.40	0.40	0.65	1.05	0.75	0.50	0.70	0.65



Percentuais acima do máximo encontrado nas partidas com alta taxa de concepção (1,2,3,4).



Fig. 6 - Esfregaço de sêmen do touro 5, sem a retirada do meio diluente, tratado com HCl 4N por 15 minutos e corado com azul de toluidina a pH 4,0. A seta indica um espermatozóide metacromático. Aumento 600X.

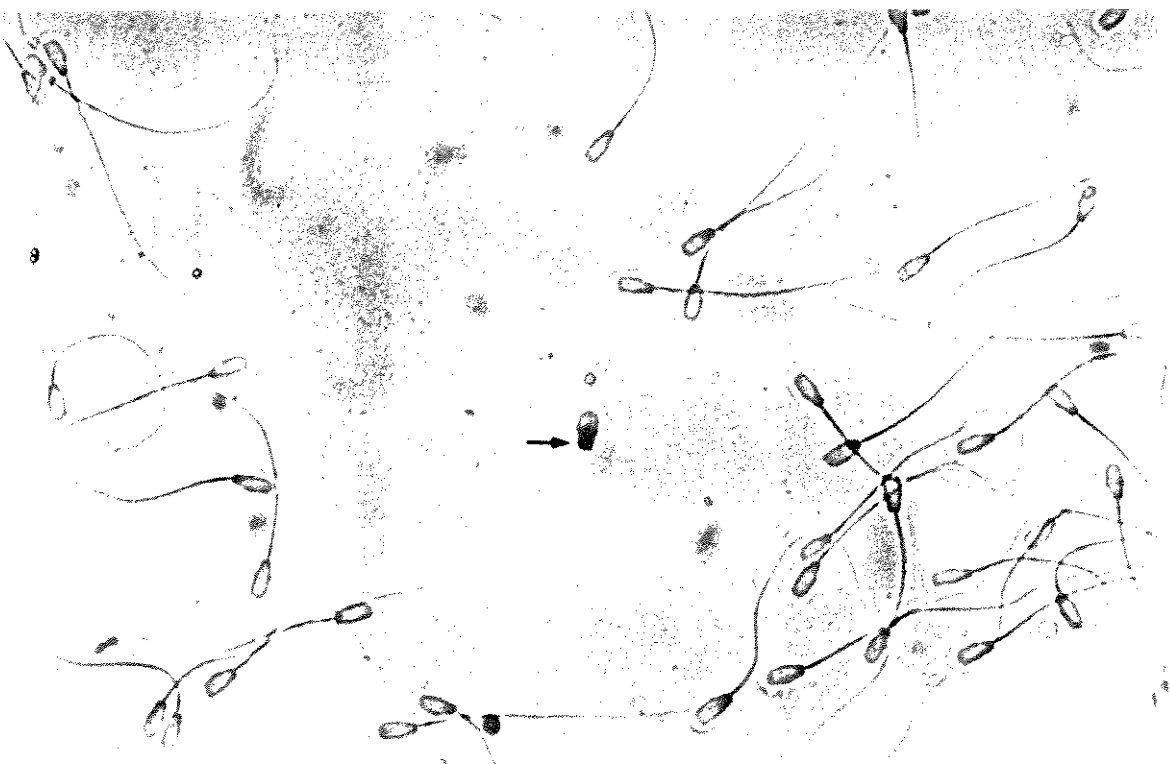


Fig. 7 - Esfregaço de sêmen do touro 19, sem a retirada do meio diluente, tratado com HCl 4N por 15 minutos e corado com azul de toluidina a pH 4,0. A seta indica um espermatozóide parcialmente metacromático. Aumento 600X.

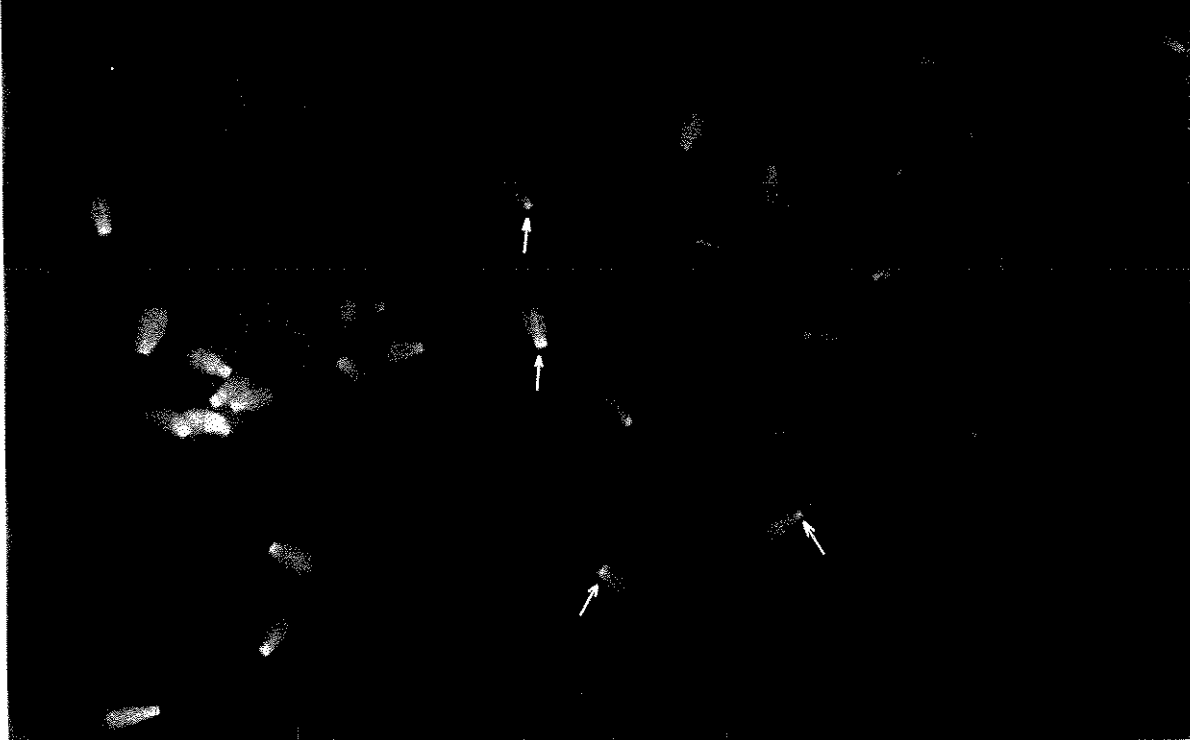


Fig. 8 - Esfregaço de sêmen do touro 16, após retirada do meio diluente, tratado com ácido cítrico 2% e corado com "acridine orange". As setas indicam espermatozóides com maior intensidade de fluorescência na base. Aumento 770X.



Fig. 9 - Esfregaço de sêmen do touro 19, após a retirada do meio diluente, tratado com HCl 4N e corado com "acridine orange". A seta indica uma cabeça de espermatozóide com fluorescência vermelha mais intensa. Aumento 770X.



Fig. 10 - Esfregaço de sêmen do touro 16, após retirada do meio diluente, tratado com HCl 4N e corado com "acridine orange". As setas indicam espermatozóides com maior intensidade de fluorescência na base. Aumento 770X.



Fig. 11 - Esfregaço de sêmen do touro, após a retirada do meio diluente, tratado com HCl 0,5N por 5 minutos e corado com "acridine orange". A seta indica espermatozóide com fluorescência amarela entre os demais com fluorescência verde. Aumento 500X.



Fig. 12 - Esfregaço de sêmen do touro 4, após a retirada do meio diluente, tratado com solução de 2-mercaptoetanol 0,2M, uréia 4M e cloreto de sódio 0,8M por 20 minutos e posterior coloração com azul de toluidina a pH 4,0, mostrando todos os espermatozóides metacromáticos. Aumento 770X.

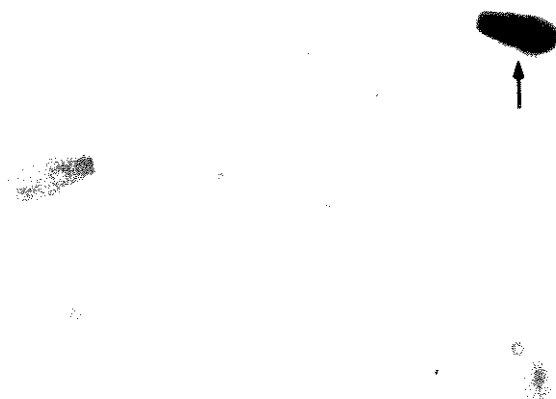


Fig. 13 - Esfregaço de sêmen do touro 16, após a retirada do meio diluente, tratado com solução de 2-mercaptoetanol 0,2M, uréia 0,1M e cloreto de sódio 0,8M por 20 minutos e posterior coloração com azul de toluidina a pH 5,0. A seta indica a cabeça de espermatozóide metacromática. Aumento 1.500X.

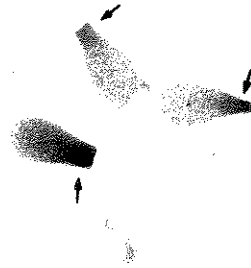


Fig. 14 - Esfregaço de sêmen do touro 16, após a retirada do meio diluente, tratado com solução de 2-mercaptoetanol 0,2M, uréia 0,1M e cloreto de sódio 0,8M por 20 minutos e posterior coloração com azul de toluidina a pH 5,0. As setas indicam respostas metacromáticas de diferentes intensidades na base dos espermatozóides. Aumento 1.500X.

DISCUSSÃO

Os dados obtidos neste trabalho indicam que de maneira geral a metacromasia nuclear em espermatozóides de touro aparece com maior frequência em animais com subfertilidade do que nos altamente férteis, variando de pouco maior a centenas de vezes maior. As frequências aqui encontradas para animais altamente férteis foram semelhantes àquelas obtidas por Britto e Mello (1988) em reprodutores de elite.

Alguns animais, no entanto, considerados subférteis por apresentarem sêmen com alta porcentagem de espermatozóides com "pouch formation", não mostraram uma maior frequência de metacromasia nuclear, sugerindo que esta anomalia nem sempre é acompanhada de anomalias no complexo DNA-proteína, não permitindo assim a utilização apenas destes métodos para se identificar animais com problemas de fertilidade (Mello, 1990).

Dos pré-tratamentos seguidos de coloração pelo azul de toluidina, a solução SSC e 2-mercaptoetanol foram os que propiciaram os melhores resultados. A hidrólise ácida com HCl 4N por 15 minutos (Mello, 1982) mostrou-se comparativamente menos eficiente, porém é ainda o mais prático e o de menor custo. Já a utilização de ácido cítrico a 0,67% mostrou-se pouco vantajosa.

A hidrólise com HCl mostrou-se menos eficiente possivelmente devida à ocorrência de alguma perda de DNA (ácido apurínico?), além da liberação de grupos fosfatos (Savage & Plaut, 1958; Sandritter *et alii*, 1965; Mello & Vidal, 1978; Balhorn, 1982), embora o tempo utilizado corresponda à fase ascendente da cinética de hidrólise de Feulgen para este material (Silva & Mello, 1986). Já o 2-mercaptoetanol atua reduzindo pontes dissulfeto, muito importantes na estabilização do complexo DNA-proteína encontrado em espermatozóides de touro, sem afetar intensamente a molécula de DNA (Balhorn, 1982).

O maior percentual de espermatozóides metacromáticos encontrados quando utilizado o azul de toluidina a pH 5,0, possivelmente ocorre dada uma maior facilidade de observação visual, aliada ao fato de que, por dissociação parcial de regiões protéicas de um complexo DNA-proteína mais frouxo, possivelmente sejam expostos grupos de aminoácidos reativos ao azul de toluidina (ácido glutâmico?)(Coelingh *et alii*, 1972).

Os resultados referentes às lâminas coradas com azul de toluidina sem pré-tratamentos mostraram existir espermatozóides que não necessitam da etapa de hidrólise para se revelarem metacromáticos, possivelmente devido à não substituição ou à substituição deficiente das proteínas nucleares durante a fase de espermiogênese (Gredhill, 1970). A frequência desses espermatozóides é, no entanto, inferior àquelas detectáveis nos métodos que utilizam pré-tratamentos.

Comparando-se os resultados obtidos nos preparados corados com "acridine orange" com aqueles utilizando coloração com azul de toluidina, pode-se sugerir que a maior intensidade de fluorescência dos espermatozóides estaria relacionada com a exibição de metacromasia com azul de toluidina. Os espermatozóides com maior intensidade de fluorescência vermelha possuiriam mais radicais fosfatos livres para se ligarem às moléculas de "acridine orange". Já aqueles com fluorescência verde permitiriam um maior número de moléculas do "acridine orange" intercalando-se entre as bases nitrogenadas do DNA, no interior da dupla hélice e comparativamente poucos fosfatos livres disponíveis à ligação eletrostática com o corante.

O pré-tratamento com HCl 0,5N seguido de coloração com "acridine orange" não permitiu uma contagem dos espermatozóides com fluorescência verde e vermelha pelo rápido desaparecimento da fluorescência vermelha, o que possivelmente ocorre devido ao rearranjo da fita de DNA.

Analisando-se os resultados obtidos após tratamento com HCl 4N e posterior coloração com "acridine orange" ou com azul de toluidina, pode-se especular que a abertura da fita de DNA através da hidrólise ácida tenha sido mais rápida do que a liberação dos radicais fosfatos para a ligação com a molécula do azul de toluidina, já que observaram-se todos os espermatozóides com fluorescência na cor vermelho-alaranjada na coloração com "acridine orange" (fluorescência característica de DNA desnaturado) e apenas alguns espermatozóides metacromáticos na coloração com azul de toluidina (a metacromasia depende do número de radicais fosfatos livres). Outra possibilidade seria a de que para o aparecimento do fenômeno de fluorescência vermelha com o "acridine orange" fosse suficiente a presença de um determinado número de fosfatos disponíveis no DNA, como sítios de ligação, menor do que aquele requerido para o aparecimento da metacromasia com o azul de toluidina.

É importante citar a influência do meio diluente do sêmen nos resultados obtidos nos esfregaços. Sem a sua retirada é impossibilitada uma observação clara das respostas citoquímicas e também é prejudicada a análise quantitativa de resultados buscados com a metodologia descrita neste trabalho.

CONCLUSÕES

1 - Na obtenção de metacromasia nuclear induzida em espermatozóides de touro, utilizando-se diversos tratamentos anteriores à coloração, o pré-tratamento com HCl 4N é o mais simples e o que envolve menor custo, embora os pré-tratamentos que utilizam 2-mercaptoetanol e solução SSC sejam os mais eficazes.

2 - A utilização de azul de toluidina a pH 5,0 torna a observação visual mais fácil e parece ser mais indicada do que aquela com azul de toluidina a pH 4,0.

3 - Os métodos de metacromasia induzida não podem ser utilizados como únicos métodos de diagnóstico de problemas de fertilidade nesse material, pois nem sempre são identificadas anomalias de complexo DNA-proteína em sêmens que possuem outras anomalias graves (ex. "pouch formation").

4 - Para a aplicação dos métodos de metacromasia induzida em sêmens congelados é necessária a retirada do meio diluente para que se obtenham dados confiáveis.

5 - Os resultados obtidos no tratamento com HCl 4N e posterior coloração com "acridine orange" demonstraram ser necessário um estudo mais aprofundado do mecanismo de coloração que seja compatível aos resultados de Evenson e colaboradores (1980) e aos dados de metacromasia induzida deste trabalho e aqueles de Mello (1982). No entanto, considerando-se apenas a característica "intensidade de fluorescência", observou-se ser ela, da mesma forma que o aparecimento de metacromasia induzida, mais frequente em animais com problemas de fertilidade.

RESUMO

Esfregaços de sêmen de touros com fertilidade conhecida foram submetidos a variantes metodológicas que visam a identificação de anomalias no complexo DNA-proteína, baseando-se na metacromasia induzida após coloração com azul de toluidina e na diferença de cores de fluorescência após coloração com "acridine orange". Buscou-se estabelecer métodos simples, eficazes e de baixo custo para a evidenciação de espermatozóides de touro com complexos DNA-proteína anômalos, associados a algumas formas de subfertilidade.

Dos métodos testados, os tratamentos com 2-mercaptoetanol, solução SSC e HCl 4N antes da coloração mostraram-se eficientes na evidenciação de metacromasia induzida, sendo os dois primeiros mais eficazes que o último. Além disso o HCl 4N mostrou-se mais simples e envolvendo menor custo do que os primeiros.

Os métodos com "acridine orange" mostraram espermatozóides com maior intensidade de fluorescência em números semelhantes aos espermatozóides metacromáticos observados nos métodos com azul de toluidina.

De maneira geral os animais com problemas de fertilidade apresentaram uma maior frequência de espermatozóides metacromáticos e com maior intensidade de fluorescência, porém nem todos esses animais apresentaram esta frequência aumentada.

SUMMARY

Smears of semen of known fertility have been subjected to varied methods with the objective of identifying chemical anomalies in the DNA-protein complex, based on the induced toluidine blue metachromasy method and on the difference of fluorescence colors after acridine orange staining.

The main objective of this study was to find more efficient, simpler and cheaper methods to detect the occurrence of abnormal DNA-protein complexes in bull spermatozoa associated with some types of subfertility.

Among the methods tested, those using 2-mercaptoethanol, SSC solution and 4N HCl treatments prior to staining were the most efficient to demonstrate induced metachromasy. The first two methods were more efficient than the latter, but 4N HCl proved to be simpler and cheaper than the others.

As regards the methods employing acridine orange as dye, the frequency of sperm heads exhibiting higher fluorescence intensity resembled that of the metachromatic spermatozoa highlighted with the toluidine blue methods.

In general, the animals with fertility defects have a higher frequency of metachromatic spermatozoa and a greater acridine orange fluorescence intensity, but this cannot be taken as a rule.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

(Segundo padrões da Revista Brasileira de Genética)

- Balhorn, R. (1982). A model for the structure of chromatin in mammalian sperm. *J. Cell Biol.* 93: 298-305.
- Ballachey, B.E., Hohenboken, W.D. & Evenson, D.P. (1987). Heterogeneity of sperm nuclear chromatin structure and its relationship to bull fertility. *Biol. Reprod.* 36: 915-916.
- Britto, C.M.C., & Mello, M.L.S. (1988). Induced nuclear metachromasy evaluated in spermatozoa of "Pé-duro" bulls. *Rev. Brasil.Genét.* 11:349-354.
- Britto, C.M.S., Mello, M.L.S. & Cordeiro, J.A. (1988). Conteúdo Feulgen-DNA e área nuclear em espermatozóide de gado "Pé-duro". *Rev.Brasil.Genét.* 11: 73-88.
- Coelingh, J.P., Monfoort, C.H., Rozijn, T.H., Leuven, J.A.G., Shiphof, R. Stey-Parvé, E.P., Braunitzer, G., Schranck, B. & Ruhfus, A. (1972). The complete amino acid sequence of basic nuclear protein of bull spermatozoa. *Biochim.Biophys.Acta* 285: 1-14.
- Evenson, D.P., Darzynkiewics, Z. & Melamed, M.R. (1980). Relation of mammalian sperm chromatin heterogeneity to fertility. *Science* 210: 1131-1133.
- Gredhill, B.L. (1966). Studies on the DNA content, dry mass and optical area of morphologically normal and abnormal bull spermatozoal heads. *Acta Vet. Scand.* 7: 1-20.

- Gledhill, B.L. (1970). Changes in nuclear stainability associated with spermateliosis, spermatozoal maturation, and male infertility. In: *Introduction to Quantitative Citochemistry - II* (Wied, G.L. & Bahr, G.F., eds.). Academic Press, New York & London, pp. 125-151.
- Handa, A., Hiroe, K. & Tomizuka, T. (1965). Effects of in vitro aging on the DNA content of bull spermatozoa. *Japan J. Animal Reprod.* 11: 91-94.
- Lison, L. (1960). *Histochimie et Cytochimie Animales*. Gauthier-Villars, Paris.
- Mello, M.L.S. (1977). DNP variants in morphologically normal spermatozoa. III Congr. Latinoamericano de Genética, Montevideu. Resumos, p. 250.
- Mello, M.L.S. (1982). Induced metachromasy in bull spermatozoa. *Histochemistry* 74: 387-392.
- Mello, M.L.S. (1990). Anomalias químicas no complexo DNA-proteína de espermatozoides e subfertilidade em touros. Submetido à publicação.
- Mello, M.L.S. & Vidal, B.C. (1978). A reação de Feulgen. *Ciênc. Cult.* 30: 665-676.
- Mello, M.L.S. & Vidal, B.C. (1980). Métodos. In: Mello, M.L.S. & Vidal, B.C. *Práticas de Biologia Celular*. Editora Edgard Bluecher, São Paulo, pp. 57-69.
- Peres, M., Petel, J.P. & Vendrely, C. (1960). Sur la teneur en acid desoxyribonucléique des spermatozoides de taureaux présentant différents degrés de fécondité. *Compt. Rend.* 251: 2581-2583.
- Roy, J.K. Lakhota, S.C. & Mello, M.L.S. (1982). Further observations on Hoeschst 33258 plus hypotonic treatment induced supercondensation of interphase heterochromatin in Drosophila nasuta cells. *Ind. J. Exp. Biol.* 20: 791-796.
- Salisbury, G.W., Birge, W.J., De la Torre, L. & Lodge, J.R. (1961). Decrease in nuclear Feulgen-positive material (DNA) upon aging *in vitro* storage of bovine spermatozoa. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* 10: 353-359.
- Sandritter, W., Jobst, K., Rakow, L. & Bosselmann, K. (1965). Zur Kinetik der Feulgenreaktion bei verlangerter Hydrolysezeit Cytophotometrische Messungen im sichtbaren und ultravioletten Licht. *Histochemie* 4: 420-437.

- Savage, R.E. & Plaut, W. (1958). The effect of HCl hydrolysis on the retention of thymidine in DNA. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* 4: 701-706.
- Silva, M.J.L. & Mello, M.L.S. (1986). Lability to acid hydrolysis in some different DNA-protein complexes of spermatozoa. *Acta histochem.* 78: 197-215.
- Vidal, B.C. (1987). Métodos em Biologia Celular. In: Vidal, B.C. & Mello, M.L.S. *Biologia Celular*. Edições Atheneu, Rio de Janeiro, Cap. 2, pp. 5-34.