

Capacitação espermática *in vitro* com heparina e cálcio ionóforo e sua correlação com a fertilidade em touros

Evaluation of *in vitro* sperm capacitation with heparin and calcium ionophore in bulls

Mayra Elena Ortiz D'Avila ASSUMPCÃO¹; Kátia HAIPECK¹;
Alecsandra Sobreira de LIMA¹; Marco Roberto Bourg de MELLO¹;
Lilian Jesus de OLIVEIRA¹; Viviane Purri de OLIVEIRA¹;
Liliam Mara Trevisan TAVARES¹; José Antônio VISINTIN¹

Endereço para correspondência:
JOSE ANTONIO VISINTIN
Departamento de Reprodução Animal
Faculdade de Medicina Veterinária e
Zootecnia da Universidade de São Paulo
Av. Prof. Orlando Marques de Paiva, 87
Cidade Universitária Armando Salles Oliveira
05508-270 - São Paulo - SP
e-mail: meoaa@usp.br

1- Departamento de Reprodução Animal,
Faculdade de Medicina Veterinária e
Zootecnia Universidade de São Paulo, São
Paulo - SP

RESUMO

O objetivo deste estudo foi avaliar os protocolos de capacitação espermática *in vitro* com 100 mg/ml de heparina e 5 mM de cálcio ionóforo e correlacionar a capacitação com a fertilidade *in vivo*. A capacitação espermática foi avaliada pela coloração com iodeto de propídio e diacetato de carboxifluoresceína e pela coloração tripla com vermelho congo, vermelho neutro e giemsa. Os espermatozoides foram avaliados quanto a viabilidade (vivos ou mortos) e a qualidade do acrossomo (lesados ou íntegros), sendo caracterizados como capacitados (vivos e lesados), não capacitados (vivos e íntegros) e mortos (lesados ou íntegros). A heparina apresentou 64,54% e 39,16% e o cálcio ionóforo 36,41% e 18,11% de espermatozoides capacitados, respectivamente, pela epifluorescência e coloração tripla. Os touros foram divididos em três grupos de fertilidade, sendo o Grupo A <63%, o Grupo B entre 63 e 68% e o Grupo C >68%. Nos três grupos houve diferença significativa ($p < 0,01$) em relação aos espermatozoides capacitados dos tratamentos com heparina e cálcio ionóforo, tanto na epifluorescência quanto na coloração tripla. Não houve diferença estatística significativa ($p > 0,01$) para os espermatozoides capacitados, não capacitados e mortos entre os grupos A, B e C, tanto na epifluorescência quanto na coloração tripla para ambos capacitadores (heparina e cálcio ionóforo). Não houve correlação entre os espermatozoides capacitados *in vitro* e a taxa de fertilidade a campo. A heparina apresentou melhor taxa de espermatozoides capacitados e a epifluorescência mostrou-se mais eficiente na detecção da capacitação espermática ($p < 0,01$).

PALAVRAS-CHAVE: Capacitação espermática. Heparina. Cálcio ionóforo. Colorações

INTRODUÇÃO

Os espermatozoides de mamíferos não possuem habilidade para fecundar os oócitos imediatamente após a ejaculação, mesmo estando móveis e com aparente morfologia normal. No processo *in vivo*, os espermatozoides alcançam esta capacidade fecundante no trato genital feminino. A capacidade de adquirir competência fecundante foi denominada de capacitação espermática^{4,1}.

A capacitação é um processo que envolve múltiplas etapas, ainda não bem compreendidas, e mudanças bioquímicas e estruturais da membrana plasmática dos espermatozoides. Estas mudanças afetam a estrutura e a permeabilidade da membrana espermática. Este processo está relacionado com mudanças na concentração iônica intracelular, na fluidez da membrana plasmática, no metabolismo e na motilidade dos espermatozoides¹⁹.

Para que ocorra a fecundação dos oócitos, os

espermatozoides precisam sofrer reação acrossômica (distúrbio na membrana plasmática), ou seja, precisam estar previamente capacitados para poderem responder ao estímulo da membrana pelúcida que desencadeará o processo de reação acrossômica. Para que ocorra esta alteração da membrana plasmática *in vitro*, adicionam-se agentes capacitadores como a heparina e o cálcio ionóforo²⁰.

Para AX e LENZ², touros com alto índice de fertilidade têm maior taxa de reação acrossômica em resposta às substâncias semelhantes à heparina, pois os seus espermatozoides possuem maior afinidade aos glicosaminoglicanos (GAGs) em comparação aos touros com baixa fertilidade. Os autores concluíram que os GAGs podem ser usados pelos pesquisadores como métodos de observação de alterações estruturais dos espermatozoides e pelas centrais de inseminação artificial como testes para estimar a fertilidade de touros.

YANG *et al.*²⁰ compararam a capacitação espermática induzida pelo Ca A-23187 e pela heparina em

meios de maturação com ou sem hormônios, concluindo que os três tratamentos foram eficientes, mas o cálcio ionóforo apresentou maiores taxas de fecundação e de desenvolvimento embrionário.

PARRISH *et al.*¹⁴ observaram que a heparina induz a capacitação espermática, sendo sua ação notada no início do processo de incubação, mas segundo os autores deve ser no mínimo de 4 horas.

Diferentes métodos são utilizados para verificar a integridade do acrossomo, conforme estudo realizado por KOVÁCS e FOOTE⁸ no qual aprimoraram a técnica de coloração de Giemsa para visualizar alterações no acrossomo após o processo de reação acrossômica. As modificações apresentadas pelos autores permitiram distinguir 10 classes de espermatozóides (vivos com acrossomo intacto; danificado; solto; sem acrossomo; sem acrossomo e com anel pós-acrossomal ou mortos com as mesmas alterações acrossômicas).

Inúmeras sondas fluorescentes estão sendo utilizados para conseguir informações sobre as funções celulares dos espermatozóides, as quais podem estar relacionadas com a fertilidade. Ainda podem ser usadas combinações de diversas sondas fluorescentes para avaliar diferentes características funcionais, aumentando a probabilidade destas características refletirem a capacidade fecundante dos espermatozóides.

GARNER *et al.*⁶ informam que a combinação do iodeto de propídio com diacetato de carboxifluoresceína resultou em coloração que determina o aspecto funcional dos espermatozóides devido às suas características moleculares. Adaptações às técnicas de coloração foram propostas por HARRISON e VICKERS⁷ com sondas fluorescentes, facilitando a visualização dos espermatozóides em microscópio de epifluorescência. A adição de concentrações baixas de formaldeído (1,7mM) para imobilização dos espermatozóides, durante a avaliação, permitiu a visualização em microscópio de epifluorescência, até então possível somente pela citometria de fluxo, aumentando a aplicabilidade da técnica. WHITFIELD e PARKINSON¹⁷, investigando a correlação entre a fertilidade de touros à campo e testes *in vitro* de indução da reação acrossômica, concluíram que o uso de sondas fluorescentes de iodeto de propídio e diacetato de carboxifluoresceína (CFDA/IP) poderia ser utilizado na avaliação da reação acrossômica. Tal conclusão foi possível comparando os resultados da coloração CFDA/IP com a microscopia de contraste de interferência diferencial (DIC). Esse método de coloração, empregando sondas fluorescentes (iodeto de propídio e diacetato de carboxifluoresceína), tem sido amplamente utilizado na avaliação da integridade do acrossomo após a criopreservação de espermatozóides em diferentes espécies (equino²¹ e ovino¹¹).

De acordo com WHITFIELD e PARKINSON¹⁷, é

importante estabelecer a relação entre a reação acrossômica *in vitro* dos espermatozóides congelados e a fertilidade de touros, pois a maioria dos trabalhos utiliza sêmen fresco. Os graus de fertilidade podem ser estabelecidos de acordo com a taxa de reação acrossômica induzida pelos glicosaminoglicanos. A possibilidade de prever a fertilidade de espermatozóides congelados permite a investigação retrospectiva das causas de baixa fertilidade em touros. Ainda, a indução da capacitação *in vitro* propicia a avaliação de touros jovens destinados ao teste de progênie, descartando os animais que apresentam baixa taxa de capacitação espermática.

Os objetivos deste estudo foram:

1) comparar a eficiência da heparina e do cálcio ionóforo na capacitação espermática *in vitro*.

2) comparar a coloração com iodeto de propídio (IP) e diacetato de carboxifluoresceína (CFDA) e a coloração tripla com vermelho congo, vermelho neutro e giemsa para detectar a integridade do acrossomo e a viabilidade dos espermatozóides.

3) correlacionar as taxas de capacitação espermática e de fertilidade a campo.

MATERIAL E MÉTODO

Todos os reagentes foram adquiridos da Sigma. No entanto, os produtos que possuem mais de uma apresentação têm seus códigos descritos a seguir: "Heparin" - H-3149; "Neutral Red" - N-2880; "Trypan Blue" - T-5526; "Calcium Ionophore" - C-7522; "5-Carboxyfluorescein diacetate" - C-4916; "Sodium Chloride" - S-9625; DMSO - D-5879; "Sodium Citrate" - S-4641; "Potassium Chloride" - P-4504; "Magnesium Chloride" - M-0250; "Sodium Phosphate Monobasic" - S-0751; "Sodium Bicarbonate" - S-8875; "Calcium Chloride" - C-7902; "Phenol Red" - P-4633; "DL-Lactic Acid" - L-7900; "Albumin, Bovine" - A-6003; "Gentamicin Sulfate" - G-1264; "Pyruvic Acid" - P-2256; "HEPES" - H-0891 e "Giemsa Stain, modified" - GS-500.

Após a descongelação (37°C por 30 segundos) e a avaliação da motilidade e do vigor, o sêmen foi submetido à centrifugação (centrífuga Labofuge 300 Heraeus) de 600 g por 30 minutos em gradiente Percoll (45% e 90 %). O sedimento foi lavado uma vez em meio Sperm-Talp¹⁵ e centrifugado a 200 g por 5 minutos para retirada do Percoll.

Deste segundo sedimento, 5ml foram colocados em 250 ml de meio FIV¹⁵ para avaliação da motilidade e 5ml em 250ml de água para determinação da concentração espermática. Para cada tratamento foram colocados, em média, 3X10⁶ espermatozóides móveis em 1 ml do meio FIV, adicionando-se, respectivamente, 100 mg de heparina ou 5 mM de cálcio ionóforo²⁰.

O sêmen com heparina foi mantido em estufa (Revco) a 39°C e 5% de CO₂ durante 6 horas. Em seguida,

foi lavado em meio FIV (1:2 v/v), centrifugado a 200 g por 5 minutos e destinado às colorações. O sêmen com cálcio ionóforo foi mantido à temperatura ambiente (22 - 25°C) durante 1 minuto. Em seguida, foi lavado em meio FIV (1:2 v/v), centrifugado a 200 g por 5 minutos e destinado às colorações.

Para cada tratamento (heparina e cálcio ionóforo) foram utilizadas a coloração com iodeto de propídio (IP) e diacetato de carboxifluoresceína (CFDA) descrita por HARRISON e VICKERS⁷ e modificada por ZÚCCARI²¹ e a coloração tripla com vermelho congo, vermelho neutro e giemsa descrita por KOVÁCS e FOOTE⁸.

As colorações com IP e CFDA foram realizadas com 10 ml do sêmen capacitado com heparina ou cálcio ionóforo e 40 ml da solução corante, aguardando-se 8 minutos. As lâminas foram confeccionadas com 5 ml da solução corante/sêmen e cobertas com lamínula, e o excedente retirado com lenço de papel, sendo imediatamente avaliados os espermatozóides em Microscópio de Epifluorescência (ZEISS) com filtro 510-560 excitações. Foram analisadas 200 células por amostra/tratamento/touro, avaliando-se a viabilidade dos espermatozóides (vivos ou mortos) e a qualidade do acrossomo (lesado ou íntegro).

A coloração tripla foi realizada em lâmina com 5 ml de sêmen capacitado com heparina ou cálcio ionóforo e 5 ml de vermelho congo, sendo misturadas as soluções e confeccionado, imediatamente, o esfregaço. As lâminas foram secas ao ar e devidamente identificadas quanto ao tratamento (heparina ou cálcio ionóforo), data e nome do touro. Posteriormente, foram fixadas em solução de formaldeído 40%, ácido clorídrico (1 N) e vermelho neutro por 5 minutos e, finalmente, incubadas em giemsa a 7,5% por 4 horas a 40°C. As lâminas foram secas ao ar e observadas em Microscópio de Contraste de Fase (Olympus CH 30/BH₂-PC) sob imersão. Foram analisadas 200 células por amostra/tratamento/touro, avaliando-se a viabilidade dos espermatozóides (vivos ou mortos) e a qualidade do acrossomo (lesado ou íntegro).

Análise Estatística

Para analisar os resultados da capacitação espermática com heparina e cálcio ionóforo e os métodos de coloração com iodeto de propídio/diacetato de carboxifluoresceína (IP/CFDA) e de coloração tripla com vermelho congo, vermelho neutro e giemsa foi utilizado o teste do Qui-quadrado (χ^2) com nível de significância de 0,01.

Para avaliar a relação entre a capacitação espermática *in vitro* e a fertilidade a campo, foram utilizadas as análises de correlação e de regressão. Realizou-se diagramas de dispersão nos quais estão representados a taxa de fertilidade de cada touro, no eixo das abcissas e a proporção média de espermatozóides capacitados com

heparina e cálcio ionóforo, no eixo das ordenadas. Procedeu-se ao ajuste da reta pelo método dos quadrados mínimos para as incertezas diferentes e o cálculo do coeficiente de correlação (R^2).

Para cada amostra analisada há uma proporção e uma incerteza. Calculou-se a média das 10 amostras analisadas e propagou-se as incertezas para o valor médio. Para cada agente capacitador e método de coloração há uma equação de reta ($y = ax + b$) onde o **a** é o coeficiente angular; o **b** é o intercepto; o **y** é a proporção média de espermatozóides capacitados e o **x** é a taxa fertilidade.

RESULTADOS

Comparando-se os métodos de coloração, a técnica de epifluorescência com iodeto de propídio e diacetato de carboxifluoresceína (IP/CFDA) mostrou-se mais eficiente ($p < 0,01$) na detecção dos espermatozóides capacitados, quando comparada à técnica de coloração tripla com vermelho congo, vermelho neutro e giemsa, tanto no tratamento com heparina (64,54 e 39,16%) quanto no tratamento com cálcio ionóforo (36,41 e 18,11%). A coloração tripla apresentou taxa ($p < 0,01$) de espermatozóides não capacitados significativa no tratamento com heparina (48,27 e 29,00%) e não significativa no tratamento com cálcio ionóforo (76,39 e 58,38%) em comparação a coloração IP/CFDA. Não houve diferença significativa na detecção de espermatozóides mortos entre as colorações IP/CFDA e tripla (Tab. 1), tanto na heparina (6,46 e 12,57%, $p = 0,75$) quanto no cálcio ionóforo (5,21 e 5,50%, $p = 0,15$).

Houve diferença significativa ($p < 0,01$) entre a heparina e o cálcio ionóforo em relação aos espermatozóides capacitados, tanto na coloração IP/CFDA (64,54 e 36,41%) quanto na coloração tripla (39,16 e 18,11%). O cálcio ionóforo mostrou significativa taxa ($p < 0,01$) de espermatozóides não capacitados em relação a heparina, tanto na coloração IP/CFDA (58,38 e 29,00%) quanto na coloração tripla (76,39 e 48,27%). Não houve diferença significativa ($p > 0,01$) entre a heparina e o cálcio ionóforo em relação aos espermatozóides mortos (Tab. 1), tanto na coloração IP/CFDA (6,46 e 5,21%, $p = 0,75$) quanto na coloração tripla (12,57 e 5,50%, $p = 0,08$).

Para avaliar se o número de espermatozóides capacitados, não capacitados e mortos nos tratamentos com heparina e cálcio ionóforo estaria relacionado com a taxa de fertilidade, os touros foram divididos em 3 grupos. No grupo A foram colocados os touros com fertilidade inferior a 63%, no grupo B entre 63% e 68% e no grupo C, superior a 68%.

Para cada grupo realizou-se análise estatística (χ^2), comparando os agentes capacitadores e os métodos de coloração. Para verificar se houve diferença entre os grupos

ASSUMPTÃO, M.E.O.D.; HAIPECK, K.; LIMA, A.S.; MELLO, M.R.B.; OLIVEIRA, L.J.; OLIVEIRA, V.P.; TAVARES, L.M.T.; VISINTIN, J.A. Capacitação espermática *in vitro* com heparina e cálcio ionóforo e sua correlação com a fertilidade em touros. **Braz. J. vet. Res. anim. Sci.**, São Paulo, v.39, n.2, p. 149-156, 2002.

Tabela 1

Média de espermatozóides capacitados, não capacitados e mortos nos tratamentos com heparina e cálcio ionóforo, após avaliação pela epifluorescência IP/CFDA e coloração tripla, São Paulo - 1999

Espermatozóides	Capacitores	IP/CFDA (%)		Coloração Tripla (%)	
		Heparina	Cálcio	Heparina	Cálcio
Capacitados	Heparina	64,54 ^{aA}	39,16 ^{aB}		
	Cálcio	36,41 ^{bC}	18,11 ^{bD}		
Não capacitados	Heparina	29,00 ^{cE}	48,27 ^{cF}		
	Cálcio	58,38 ^{dG}	76,39 ^{dG}		
Mortos	Heparina	6,46 ^{eH}	12,57 ^{eH}		
	Cálcio	5,21 ^{eI}	5,50 ^{eI}		

^{a,b,c,d,e} Letras diferentes sobrescritas dentro de cada categoria de espermatozóides na mesma coluna diferem significativamente (p<0,01)

^{A,B,C,D,E,F,G,H,I} Letras diferentes sobrescritas entre colunas da mesma linha diferem significativamente (p<0,01)

Tabela 2

Média de espermatozóides capacitados, não capacitados e mortos nos tratamentos com heparina e cálcio ionóforo, após avaliação pela epifluorescência IP/CFDA, São Paulo - 1999

Grupos de Touros	Espermatozóides	Capacitores	
		Heparina (%)	Cálcio ionóforo (%)
A	Capacitados	61,48 ^{aA}	34,61 ^{aB}
	Não capacitados	31,50 ^{bC}	59,91 ^{bD}
	Mortos	7,02 ^{cE}	5,48 ^{cE}
B	Capacitados	64,19 ^{aF}	36,37 ^{aG}
	Não capacitados	29,54 ^{bH}	58,57 ^{bI}
	Mortos	6,27 ^{cJ}	5,06 ^{cJ}
C	Capacitados	68,68 ^{aK}	38,34 ^{aL}
	Não capacitados	24,87 ^{bM}	56,25 ^{bN}
	Mortos	6,45 ^{cO}	5,41 ^{cO}

^{a,b,c} Letras diferentes sobrescritas dentro de cada categoria de espermatozóides na mesma coluna diferem significativamente (p<0,01)

^{A,B,C,D,E,F,G,H,I,J,K,L,M,N,O} Letras sobrescritas diferentes entre colunas da mesma linha diferem significativamente (p<0,01)

Tabela 3

Média de espermatozóides capacitados, não capacitados e mortos nos tratamentos com heparina e cálcio ionóforo, após avaliação pela coloração tripla, São Paulo - 1999

Grupos de Touros	Espermatozóides	Capacitores	
		Heparina (%)	Cálcio ionóforo (%)
A	Capacitados	33,54 ^{aA}	16,74 ^{aB}
	Não capacitados	52,56 ^{bC}	77,71 ^{bD}
	Mortos	13,90 ^{cE}	5,55 ^{cE}
B	Capacitados	38,83 ^{aF}	17,93 ^{aG}
	Não capacitados	48,56 ^{bH}	76,60 ^{bI}
	Mortos	12,61 ^{cJ}	5,47 ^{cJ}
C	Capacitados	45,78 ^{aK}	20,02 ^{aL}
	Não capacitados	43,12 ^{bM}	74,47 ^{bN}
	Mortos	11,10 ^{cO}	5,51 ^{cO}

^{a,b,c} Letras diferentes sobrescritas dentro de cada categoria de espermatozóides na mesma coluna diferem significativamente (p<0,01)

^{A,B,C,D,E,F,G,H,I,J,K,L,M,N,O} Letras diferentes sobrescritas entre colunas da mesma linha diferem significativamente (p<0,01)

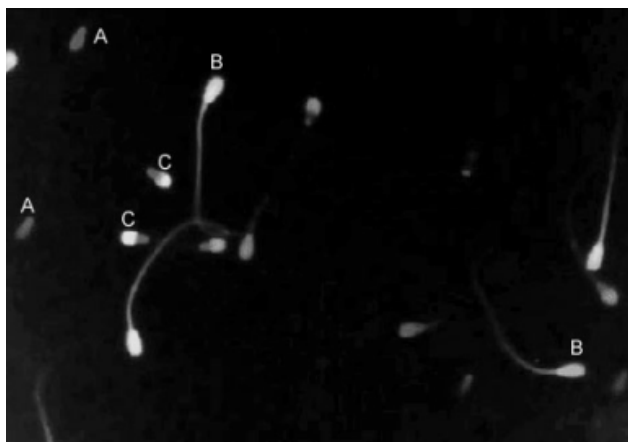


Figura 1

Coloração IP/CFDA. Espermatozoides: (A) capacitado; (B) não capacitado; (C) morto. Microscópio DE Epifluorescência, aumento DE 400X.

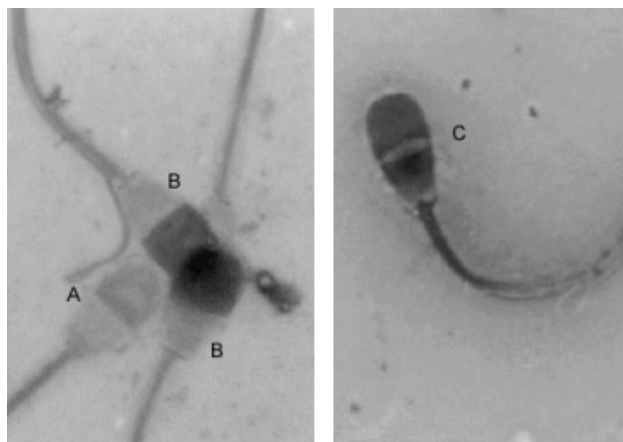


Figura 2

Coloração tripla. Espermatozoides: (A) apacitado; (B) íntegro; (c) morto. Microscópio de contraste de fase, aumento de 1000X

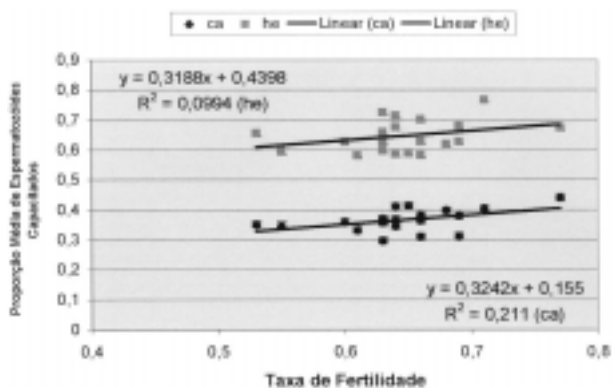


Figura 1

Correlação entre a taxa de fertilidade e a proporção média de espermatozoides capacitados nos tratamentos com heparina (he) e cálcio ionóforo (ca), após avaliação pela coloração IP/CFDA, São Paulo – 1999

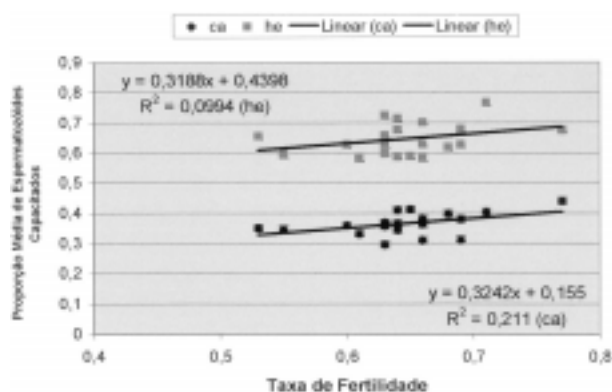


Figura 2

Correlação entre a taxa de fertilidade e a proporção média de espermatozoides capacitados nos tratamentos com heparina (he) e cálcio ionóforo (ca), após avaliação pela coloração tripla, São Paulo- 1999

de touros A, B e C, comparou-se os números de espermatozoides capacitados, não capacitados e mortos nos tratamentos com heparina e cálcio ionóforo e avaliados pela epifluorescência e pela coloração tripla (Tab. 2 e 3).

Na coloração de epifluorescência com (IP/CFDA não houve diferença significativa entre os grupos de touros A e B; A e C; B e C, em relação aos espermatozoides capacitados, não capacitados e mortos (Fig.1), tanto na heparina quanto no cálcio ionóforo (Tab. 2).

Na coloração tripla não houve diferença significativa entre os grupos de touros A e B; A e C; B e C, em relação aos espermatozoides capacitados, não capacitados e mortos (Fig. 2), tanto na heparina quanto no cálcio ionóforo (Tab. 3).

Após as análises *in vitro*, correlacionaram-se os

números de espermatozoides capacitados com as taxas de fertilidade dos touros a campo (Fig. 1 e 2).

A variação das taxas de fertilidade dos touros explica 9,94% e 21,10% (Fig. 1) da variação da proporção média de espermatozoides capacitados, respectivamente, pela heparina e o cálcio ionóforo e corados pelo IP/CFDA e 18,64% e 9,00% (Fig. 2) quando capacitados, respectivamente, pela heparina e o cálcio ionóforo e corados pela coloração tripla.

DISCUSSÃO

Uma das metas da indústria da inseminação artificial tem sido o encontro de um método simples e eficaz para prever a fertilidade dos espermatozoides bovinos. Diferentes

grupos de pesquisadores^(2,7) têm desenvolvido métodos de coloração para encontrar respostas quanto à viabilidade e à qualidade dos espermatozoides. As técnicas são escolhidas de acordo com a facilidade e a simplicidade de preparo, eficiência, sensibilidade e custo do método. Neste trabalho, escolheu-se a técnica de epifluorescência por apresentar boa visualização dos espermatozoides, capacitados ou não (Fig. 2), e ser rápida e de fácil preparo, utilizando as categorias classificadas por HARRISON e VICKERS⁷ para os diferentes tipos de espermatozoides porém relacionando-as à capacitação espermática. A primeira categoria (espermatozoides verdes em toda sua extensão) foi atribuída aos espermatozoides não capacitados (FIG. 1B). A segunda categoria (espermatozoides com cabeça vermelha e com peça intermediária e cauda verdes) foi atribuída aos espermatozoides capacitados (FIG. 1A). A terceira categoria (espermatozoides com acrossomo, cauda e peça intermediária verdes e região posterior da cabeça vermelha) foi atribuída aos espermatozoides mortos (FIG. 1C). A quarta categoria (espermatozoides inteiramente vermelhos) não foi encontrada neste trabalho.

Para ter informação mais precisa sobre o processo de capacitação, duas lâminas por amostra/touro foram avaliadas, sendo observados 200 espermatozoides em cada lâmina. As lâminas do tratamento com heparina, apresentaram, muitas vezes, número reduzido de espermatozoides, dificultando a contagem, apesar do alto número de espermatozoides por teste (3×10^6). Possivelmente, devido ao tempo de incubação, estes espermatozoides podem ter se fixado à parede do tubo "ependorf", pois a alteração da membrana faz com que os espermatozoides tenham maior facilidade de aderência nas superfícies lisas, conforme relatado por PARRISH *et al.*¹⁵.

Utilizou-se a coloração tripla descrita por KOVÁCS e FOOTE⁸, os quais desenvolveram esta técnica para diferenciar a reação acrossômica verdadeira da falsa⁽¹⁹⁾, obtendo melhor interpretação da qualidade e da viabilidade dos espermatozoides (vivos ou mortos). Neste trabalho notou-se que, apesar de simples, esta coloração necessita de adequado preparo do material, como lavagem rigorosa das lâminas, uma vez que qualquer resíduo que permaneça será corado, dificultando a visualização dos espermatozoides. Ainda observou grande imprecisão do método quando se analisou a integridade do acrossomo, embora a técnica seja útil para avaliar a viabilidade dos espermatozoides (vivos ou mortos).

Neste estudo, o cálcio ionóforo mostrou-se inferior em relação a heparina como agente capacitor (Tab. 1 a 3), o que contradiz, de certa forma, os resultados de YANG *et al.*²⁰, que mostraram que o cálcio ionóforo e a heparina são bons agentes capacitores, embora o cálcio tenha conferido taxas de fecundação e de desenvolvimento embrionário mais altas. Provavelmente esta diferença está relacionada ao tempo de incubação dos espermatozoides com a heparina empregado por YANG *et al.*²⁰ que foi de 15 minutos e neste trabalho de 6 horas. Os autores utilizaram 0,1 mM de cálcio ionóforo e tempo de incubação de 1 minuto, enquanto WHITFIELD e

PARKINSON¹⁷ utilizaram 1 mM de cálcio ionóforo e tempo de incubação de 1 hora para a capacitação de espermatozoides. Neste trabalho, o tempo de incubação do cálcio ionóforo foi de 1 minuto e a concentração de 5 mM, pois em ensaios prévios a taxa de capacitação espermática apresentava-se baixa com a concentração de 0,1 mM.

A dose de heparina neste experimento foi de 100 mg/ml, pois YANG *et al.*²⁰ relatam maiores taxas de fecundação e de desenvolvimento embrionário nesta concentração em comparação a 10 mg/ml. FUKUI *et al.*⁵ avaliaram a heparina em diferentes doses e tempos de incubação, verificando que houve aumento da taxa de fecundação nas concentrações de 25, 50 e 100 mg/ml e diminuição a 200 mg/ml.

De acordo com PARRISH *et al.*¹⁵, a heparina provou ser o glicosaminoglicano mais potente para capacitar espermatozoides bovinos. Mencionam que a taxa de fecundação e a reação acrossômica são dependentes do tempo de exposição dos espermatozoides à heparina. Comentam que, após 2 horas de incubação, ocorre saturação das ligações da heparina com os espermatozoides, não devendo haver aumento da taxa de fecundação em maior tempo de incubação. Contudo não é isso que acontece, pois tratamentos com 4 e 6 horas mostraram aumento da taxa de fecundação, provavelmente devido à ação direta da heparina sobre os espermatozoides⁽¹³⁾. MILLER e HUNTER¹² relatam que não houve diferença da frequência de reação acrossômica entre 4,5 horas e 8 horas de incubação dos espermatozoides com a heparina.

No presente estudo, realizaram-se testes experimentais para comparar os tempos de incubação de 4, 6 e 9 horas, constatando que o período de 6 horas apresentou os melhores resultados, sendo adotado neste experimento.

Notou-se neste trabalho variação entre os touros e entre as amostras de sêmen quanto ao número de espermatozoides capacitados, não capacitados e mortos. No entanto, entre os grupos de touros A, B e C não houve diferença quanto a taxa de espermatozoides capacitados, não capacitados e mortos, observação esta também verificada por SHAMSUDDIN e LARSSON¹⁶.

O grande objetivo das pesquisas que envolvem a capacitação espermática está em prever *in vitro* o que acontece *in vivo*, após a inseminação artificial. Para tanto, há necessidade de conhecer os índices de fertilidade dos touros a campo e compará-los com os resultados dos testes *in vitro*. As centrais de inseminação submetem o sêmen dos touros a inúmeras avaliações *in vitro* e, posteriormente, empregam como teste *in vivo* a inseminação artificial ou a cobertura natural. Geralmente, os touros permanecem por 60 dias com as vacas (estação de monta) e, após 50 a 90 dias da retirada dos touros, as vacas são avaliadas para diagnóstico de gestação. A partir deste resultado tem-se a taxa de não retorno do cio, ou seja, o número de vacas que, no período de 60 dias, foi fecundada. Este resultado só é válido quando se tem elevado número de inseminações ou de coberturas, obtendo-se, com isso, índice real da fertilidade dos touros.

MARKS e AX⁹, utilizando touros holandeses que

tinham índices de não retorno do cio entre 59 e 90 dias e, no mínimo, 2.000 serviços por animal, concluíram que a ligação da heparina marcada aos espermatozoides está relacionada com os índices de não retorno do cio, podendo ser um teste para prever a fertilidade de touros. Portanto o acompanhamento *in vitro* do processo de capacitação espermática com glicosaminoglicanos pode esclarecer as alterações espermáticas que, normalmente, ocorrem durante a capacitação *in vivo*.

BLOTTNER *et al*³ correlacionaram a motilidade e os demais parâmetros morfológicos dos espermatozoides com a fertilidade (índice de não retorno do cio), verificando baixa correlação. A indução da reação acrossômica, após o processo de capacitação espermática pela heparina (10 mg/ml), mostrou correlação alta com os índices de não retorno do cio. Ainda, relatam que a competência funcional dos espermatozoides é fundamental no processo de fecundação. Por esta razão, os ensaios biológicos devem abranger os processos de capacitação, reação acrossômica e fusão *in vitro* dos espermatozoides com os oócitos. Os autores consideram que o coeficiente de correlação não foi satisfatório, mas, provavelmente, com o aumento do número de ejaculados, de inseminações e de oócitos fecundados *in vitro* poderá haver correlação. MARQUANT-LE GUIENNE *et al*.¹⁰ afirmaram que, para conseguir os índices de não retorno do cio, foi necessário computar os resultados de 2 anos consecutivos de inseminação artificial, variando de 802 até 88.008 por animal, para encontrar efeito do touro. WHITFIELD e PARKINSON¹⁸ observaram que existe correlação entre a indução *in vitro* da reação acrossômica pela heparina (10 mg/ml) com a taxa de não retorno do cio após 90 dias da inseminação artificial. Segundo os autores, as amostras de sêmen estão sujeitas a variações e, por isso, deve-se fazer

repetidas avaliações antes de prever a fertilidade dos touros pelos testes *in vitro*.

No presente estudo, houve baixa correlação entre as taxas de espermatozoides capacitados e a fertilidade dos touros a campo, o que contradiz inúmeros trabalhos^(9, 3, 10, 18). Esta taxa de fertilidade foi fornecida pela central de inseminação artificial, sendo oriunda de inseminações realizadas em fazendas, sem o controle da central que só conhece a qualidade do sêmen, nada podendo informar quanto a eficiência do inseminador, a qualidade das vacas, o manejo das propriedades e, principalmente, o baixo número de inseminações por touro. Baseado nestas informações, pode-se afirmar que a não existência de correlação entre as taxas de espermatozoides capacitados *in vitro* e os índices de fertilidade a campo deve-se ao fato destes índices não espelharem a realidade. Para contornar esta influência, as reais taxas de fertilidade devem ser calculadas com grande número de inseminações, o que demanda muito tempo ou, então, realizar experimentos com touros que tenham índices de fertilidade confiáveis, o que as centrais não conseguem controlar no Brasil.

CONCLUSÕES

Nas condições em que este trabalho foi realizado pode-se concluir que:

- 1) A heparina mostrou ser melhor do que o cálcio ionóforo como agente capacitor *in vitro*.
- 2) A coloração com iodeto de propídio e diacetato de carboxifluoresceína mostrou-se melhor do que a coloração tripla, pois apresentou maior eficiência na detecção de espermatozoides capacitados.
- 3) Não houve correlação positiva entre as taxas de espermatozoides capacitados *in vitro* e de fertilidade a campo.

SUMMARY

The aim of this particular study was to test *in vitro* sperm capacitation protocols, using heparin (100mg/ml) and calcium ionophore (5mM). Propidium iodide and carboxifluorescein diacetate (IP/CFDA) in a fluorescence microscope as well as triple stain (congo red, neutral red and Giemsa) in Phase contrast microscope were used as staining. The spermatozoa were classified according to its viability (alive or dead) and acrosome integrity (damaged or intact). They were considered as follows: capacitated (alive and damaged); non capacitated (alive and not damaged) and dead (damaged or intact). The heparin group showed a ratio of 64.54% and 39.16% of capacitated spermatozoa in IP/CFDA and triple stain, respectively. In the calcium group, 36.41% and 18.11% of spermatozoa were capacitated in IP/CFDA and triple stain, respectively. Bulls were divided into 3 groups according to their fertility rates as follows: Group A < 63%, Group B from 63 to 68% and Group C > 68%. For all three groups there was significant differences (p<0.01), regarding capacitated spermatozoa with heparin and calcium ionophore in both stains IP/CFDA and triple stain. On the other hand, there was no significant differences (p>0.01), when observed capacitated, non capacitated and dead spermatozoa among groups A and B; A and C; B and C, using heparin and calcium ionophore in both stains. No correlation was seen between capacitation and fertility rates. Therefore heparin treatment showed better sperm capacitation rates than calcium ionophore. The IP/CFDA technique showed itself as being a better method to evaluate sperm capacitation than the triple stain (p<0.01).

PALAVRAS-CHAVE: Sperm capacitation. Heparin. Calcium ionophore. Staining methods.

ASSUMPCÃO, M.E.O.D.; HAIPECK, K.; LIMA, A.S.; MELLO, M.R.B.; OLIVEIRA, L.J.; OLIVEIRA, V.P.; TAVARES, L.M.T.; VISINTIN, J.A. Capacitação espermática *in vitro* com heparina e cálcio ionóforo e sua correlação com a fertilidade em touros. **Braz. J. vet. Res. anim. Sci.**, São Paulo, v.39, n.2, p. 149-156, 2002.

REFERÊNCIAS

1. AUSTIN, C.R. Observations on the penetration of the sperm into the mammalian egg. **Australian Journal of Science Research**, v.4, n.1, p.581-596, 1951.
2. AX, R.L.; LENZ, R.W. Glycosaminoglycans as probes to monitor differences in fertility of bulls. **Journal of Dairy Science**, v.70, n.7, p.1477-1486, 1986.
3. 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.
4. CHANG, M.C. Fertilizing capacity of spermatozoa deposited in to the fallopian tube. **Nature**, v.168, n.1, p.697-698, 1951.
5. 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, n.3, p.579-591, 1990.
6. GARNER, D.L.; PINKEL, D.; JOHNSON, L.A.; PACE, M.M. Assessment of spermatozoal functions using dual fluorescent staining and flow cytometric analyses. **Biology of Reproduction**, v.34, n.1, p.127-138, 1986.
7. HARRISON, R.A.P.; VICKERS, S.E. Use of fluorescent probes to assess membrane integrity in mammalian spermatozoa. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.88, n.1, p.343-352, 1990.
8. KOVÁCS, A.; FOOTE, R.H. Viability and acrosome staining of bull, boar and rabbit spermatozoa. **Biotechnic & Histochemistry**, v.67, n.3, p.119-124, 1992.
9. MARKS, J.L.; AX, R.L. Relationship of nonreturn rates of dairy bulls to bindings affinity of heparin to sperm. **Journal of Dairy Science**, v.68, n.8, p.2078-2082, 1985.
10. MARQUANT-LE GUIENNE, B.; HUMBLLOT, P.; THIBIER, M.; THIBAUT, C. Evaluation of bull semen fertility by homologous *in vitro* fertilization tests. **Reproduction Nutrition and Development**, v.30, n.4, p.259-266, 1990.
11. MEDINA, V.H. **Uso de sondas fluorescente na avaliação da integridade da membrana plasmática de espermatozoides ovinos recém colhidos e submetidos a congelamento**. Jaboticabal, 1995. 89p. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Campus de Jaboticabal, Universidade Estadual Paulista.
12. MILLER, D.J.; HUNTER, A.G. Effect of osmolality and glycosaminoglycans on motility, capacitation, acrosome reaction, and *in vitro* fertilizability of bovine ejaculated sperm. **Journal of Dairy Science**, v.69, n.11, p.2915-2924, 1986.
13. PARRISH, J.J.; SUSKO-PARRISH, J.L.; FIRST, N.L. Effect of heparin and chondroitin sulfate on the acrosome reaction and fertility of bovine sperm *in vitro*. **Theriogenology**, v.24, n.5, p.537-549, 1985.
14. PARRISH, J.J.; SUSKO-PARRISH, J.L.; LEIBFRIED-RUTLEDGE, M.L.; CRISTER, E.S.; EYESTONE, W.H.; FIRST, N.L. Bovine *in vitro* fertilization with frozen thawed semen. **Theriogenology**, v.25, n.4, p.591-600, 1986.
15. PARRISH, J.J.; SUSKO-PARRISH, J.L.; WINER, M.A.; FIRST, N.L. Capacitation of bovine sperm by heparin. **Biology of Reproduction**, v.38, n.1, p.1171-1180, 1988.
16. SHAMSUDDIN, M.; LARSSON, B. *In vitro* development of bovine embryos after fertilization using semen from different donors. **Reproduction of Domestic Animals**, v.28, n.2, p.77-84, 1993.
17. WHITFIELD, C.H.; PARKINSON, T.J. Assessment of the fertilizing potencial of frozen bovine spermatozoa by *in vitro* induction of acrosome reactions with calcium ionophore (A23187). **Theriogenology**, v.44, n.3, p.413-422, 1995.
18. WHITFIELD, C.H.; PARKINSON, T.J. Relationship between fertility of bovine semen and *in vitro* induction of acrosome reactions by heparin. **Theriogenology**, v.38, n.1, p.11-20, 1992.
19. YANAGIMACHI, R. Mammalian fertilization. *In*: Knobil, E.; Neill, J. (Eds), **The physiology of reproduction**. New York: Raven Press, 1994. p.189-317.
20. YANG, X.; JIANG, S.; FOOTE, R.H. Bovine oocyte development following different oocyte maturation and sperm capacitation procedures. **Molecular Reproduction and Development**, v.34, n.1, p.94-100, 1993.
21. ZÚCCARI, C.E.S.N. **Efeito da criopreservação sobre a integridade estrutural da célula espermática equina**. Botucatu, 1998. 118p. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

Recebido para publicação: 25/10/1999
Aprovado para publicação: 19/03/2002