

## Influência do glicerol e etilenoglicol e da criopreservação sobre o complexo DNA-Proteína de espermatozóides em gananhões

Alessandra Cunha  
BRANDÃO<sup>1</sup>  
Rubens Paes de ARRUDA<sup>1</sup>  
Ed Hoffmann MADUREIRA<sup>1</sup>  
João Flávio Panattoni  
MARTINS<sup>2</sup>  
Mayra Elena Ortiz D'Ávila  
ASSUMPÇÃO<sup>1</sup>  
José Antônio VISINTIN<sup>1</sup>

1 - Departamento de Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, São Paulo - SP  
2 - Faculdade de Medicina Veterinária da UniFeob, São João da Boa Vista - SP

### Correspondência para:

ALESSANDRA CUNHA BRANDÃO  
Departamento de Reprodução Animal  
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia  
Universidade de São Paulo  
Av. Prof. Dr. Orlando Marques de Paiva, 87  
05508-000 - São Paulo - SP  
abrandao@usp.br

Recebido para publicação: 13/07/2004  
Aprovado para publicação: 10/12/2006

### Resumo

O processo de criopreservação causa estresse físico e químico aos espermatozóides, acarretando alterações bioquímicas, diminuição irreversível da motilidade espermática, aumento da degeneração do DNA e liberação intracelular de enzimas e lipídeos. No presente estudo, foram estudadas a influência das estações não reprodutiva e reprodutiva, dos crioprotetores glicerol e etilenoglicol e do processo de congelação e descongelação sobre o complexo DNA-proteína de espermatozóides em gananhões. Foi comparados o sêmen puro, o sêmen puro e congelado sem crioprotetores, o sêmen diluído e exposto aos crioprotetores sem congelação e o sêmen diluído e congelado com crioprotetores. Foram utilizados seis gananhões, colhendo 12 ejaculados cada. A patologia do complexo DNA-Proteína foi avaliada em espermatozóides fixados com etanol-ácido-acético glacial 3:1 (v/v), tratados com HCL 4N a 25°C e corados com azul de toluidina a 0,025% em tampão McIlvaine, empregando microscopia óptica com aumento de 1000x. Os resultados mostraram que a anomalia do complexo DNA-Proteína dos espermatozóides diferem entre os grupos congelados e não congelados ( $P < 0,05$ ). O sêmen congelado sem crioprotetor não apresentou aumento significativo de patologia do complexo DNA-Proteína em relação ao sêmen congelado com crioprotetores, mas ambos mostraram aumento em relação ao sêmen puro ou diluído e exposto aos crioprotetores. A influência da estação reprodutiva mostrou diferença significativa ( $P < 0,05$ ) somente no sêmen puro e no sêmen puro e congelado sem crioprotetor. Concluiu-se que o processo de congelação exerce influência negativa sobre o complexo DNA-Proteína de espermatozóides em gananhões.

### Palavras-chaves:

Gananhão.  
Cromatina.  
Sêmen.  
Crioprotetores.  
DNA.  
Protamina.

### Introdução

A criobiologia aplicada à conservação de sêmen foi iniciada por Smith e Polge<sup>1</sup> que relataram o efeito crioprotetor do glicerol na sobrevivência espermática, após a congelação dos espermatozóides de várias espécies a -79°C. Em seguida foi demonstrado que o sêmen diluído em gema de ovo-citrato, adicionado de glicerol e conservado a -79°C por 32 semanas<sup>2</sup> ou um ano mantinha as capacidades fecundantes, resultando em taxas de concepção de 69% e 65%, respectivamente. Posteriormente,

mereceu considerável atenção o nitrogênio líquido na congelação, demonstrando que a motilidade progressiva mantinha-se mais elevada no sêmen conservado a -196°C do que a -79°C<sup>3,4</sup>.

Diluidores usados para criopreservação de espermatozóides de gananhões, usualmente contém gema de ovo, açúcares, eletrólitos e glicerol. Lipídeos, lipoproteínas e outros aditivos que previne o "choque frio" e defeitos de refrigeração durante a criopreservação também têm sido adicionados<sup>5</sup>.

As mudanças estruturais causadas pela congelação mencionam-se as lesões de

membrana plasmática e de acrossomo, bem como a liberação de enzimas pelos espermatozoides. Lesões nucleares e mitocondriais determinam o escoamento de fosfolípidios, proteínas intracelulares e mitocôndrias dos espermatozoides<sup>6,7,8,9</sup>.

A condensação do material nuclear é um importante evento na diferenciação celular durante a espermatogênese. Nos mamíferos, os DNA nucleares, que em células somáticas estaria ligado a proteínas nucleares básicas chamadas histonas, passa a formar complexos íntimos com outros tipos de proteínas nucleares básicas conhecidas como protaminas queratinosas ou “protamine-like”<sup>10,11</sup>.

A protamina é uma sequência de aminoácidos ricos em arginina e alguns resíduos de cisteína, responsáveis pela compactação do DNA dos espermatozoides, formando um complexo condensado de DNA-Proteína. Em algumas espécies (bovinos e suínos), o núcleo dos espermatozoides contém um único tipo de protamina, P1-protamina, com forte homologia entre as espécies. Um segundo tipo de protamina, P2-protamina, está presente em núcleos de espermatozoides de outros mamíferos, incluindo homens, camundongos e garanhões<sup>12,13</sup>.

As moléculas de protamina ligam-se aos grupos fosfatos presentes no sulco menor da fita de DNA, neutralizando as cadeias de fosfodiéster e eliminando a repulsão eletrostática normal entre segmentos vizinhos do DNA. Com isso, o sulco menor da fita de DNA interage com o sulco maior da fita de DNA adjacente, promovendo íntima compactação molecular. O complexo DNA-protamina é mais estável em relação a desnaturação térmica do que o complexo DNA-histona<sup>12,13</sup>.

Existem evidências de que este processo de condensação do DNA possa ser parcial, resultando no complexo DNA-proteína menos estável e aumentando a susceptibilidade à desnaturação<sup>15</sup>. Há ainda sugestão de que esta alteração possa ser causada por defeito na ligação entre os

grupos fosfatos do DNA às proteínas nucleares ou por ocorrência de tipo anormal ou desconhecidos de proteína ligada ao DNA<sup>15,16</sup>.

Alterações no complexo DNA-Proteína dos espermatozoides de mamíferos vêm sendo sugeridas como importantes causas de subfertilidade em várias espécies como bovinos<sup>15,17</sup>, leporinos<sup>17</sup> e humanos<sup>18,19</sup>.

Mello<sup>20</sup> desenvolveu o método denominado de “metacromasia induzida” para identificar alterações no complexo DNA-proteína em espermatozoides de touros. Os espermatozoides normais se coram em verde, pois poucos grupos fosfatos de DNA estariam disponíveis para ligação com o corante catiônico. Contudo, aqueles com anomalia no complexo DNA-Proteína se corariam em violeta (metacromasia), uma vez que muitos grupos fosfatos sequenciais estariam acessíveis no DNA, permitindo maior interação com as moléculas dos corantes<sup>16</sup>.

Os equinos são animais poliétricos estacionais de dias longos, onde os garanhões têm produção espermática reduzida no período de inverno. Um estudo feito para comparar a qualidade espermática pós congelamento/descongelamento durante a estação reprodutiva e não reprodutiva baseada nos parâmetros motilidade, concentração, morfologia, integridade do acossoma e estabilidade cromatínica mostraram que as taxas de sobrevivência pós-descongelamento foram similares entre as duas estações<sup>21</sup>.

O presente trabalho avaliou a influência dos crioprotetores glicerol e etilenoglicol e do processo de congelamento e descongelamento sobre o complexo DNA-proteína de espermatozoides em garanhões. Comparou o sêmen puro, o sêmen puro e congelado sem crioprotetores, o sêmen diluído e exposto aos crioprotetores sem congelamento e o sêmen diluído e congelado com crioprotetores entre as estações reprodutivas e não reprodutiva.

## Material e Método

Foram utilizados 6 garanhões da raça

Mangalarga, entre 4 e 10 anos de idade, realizando 12 colheitas de sêmen cada.

Parte do sêmen foi utilizada pura e parte diluída em diluidor à base de EDTA-gema de ovo-lactose.

Foi avaliado o complexo DNA-proteína no sêmen puro (controle 1 – T1), no sêmen puro e congelado sem crioprotetores (controle 2 – T2), no sêmen diluído e exposto ao crioprotetores glicerol (T3) ou etilenoglicol (T4) sem congelação e no sêmen diluído e congelado nos crioprotetores glicerol (T5) ou etilenoglicol (T6).

A patologia do complexo DNA-proteína foi avaliada em esfregaços de sêmen de acordo com Mello<sup>16</sup>. O material foi fixado em etanol-ácido-acético glacial 3:1 (v/v) por 1 minuto e em álcool 70% por 3 minutos.

Para induzir a metacromasia, o esfregaço foi tratado com ácido clorídrico 4N a 25°C por 20 minutos e, em seguida, lavado em água destilada. Este tratamento rompe as ligações protéicas menos estáveis dos espermatozoides que possuem o complexo DNA-proteína anômalo.

A coloração foi feita com azul de toluidina a 0,025% em tampão McILvaine por 15 minutos. O princípio da basofilia no

complexo DNA-proteína corado com azul de toluidina (AT) se baseia na disponibilidade e proximidade de grupos fosfatos do DNA não ligados as protaminas, aptos a se ligarem às moléculas do corante. Se o DNA apresentar poucos grupos fosfatos não ligados às proteínas e distantes entre si, a coloração apresenta tonalidade verde (espermatozoides normais). Se, no entanto, o DNA apresentar muitos grupos fosfatos não ligados às proteínas e próximos entre si, muitas moléculas de azul de toluidina se ligam em sequência no DNA, apresentando coloração violeta, o que representa expressão do fenômeno denominado de metacromasia<sup>22</sup>. O complexo DNA-proteína foi avaliado em 1000 espermatozoides por lâmina, utilizando a microscopia óptica com aumento de 1000x.

## Resultados e Discussão

Os resultados deste trabalho mostraram que a anomalia do complexo DNA-Proteína dos espermatozoides diferem entre os grupos congelados e não congelados ( $P < 0,05$ ).

A anomalia do complexo DNA-Proteína identificado pelo método da metacromasia induzida ocorre em função do número e da proximidade de grupos fosfatos disponíveis no DNA para ligação com

Tabela 1 - Valores médios (%) e desvios padrões da patologia do complexo DNA-Proteína dos espermatozoides eqüinos submetidos a diferentes tratamentos nas estações não reprodutiva e reprodutiva

| TRATAMENTOS | ESTAÇÃO NÃO REPRODUTIVA       | ESTAÇÃO REPRODUTIVA          |
|-------------|-------------------------------|------------------------------|
| P           | 15,35 ± 7,92 <sup>b, A</sup>  | 13,72 ± 3,84 <sup>d, B</sup> |
| EGL         | 16,55 ± 6,97 <sup>b, A</sup>  | 16,52 ± 3,69 <sup>c, A</sup> |
| EET         | 16,86 ± 6,84 <sup>b, A</sup>  | 16,45 ± 3,83 <sup>c, A</sup> |
| CGL         | 29,15 ± 13,58 <sup>a, A</sup> | 30,19 ± 4,21 <sup>a, A</sup> |
| CET         | 31,45 ± 13,25 <sup>a, A</sup> | 30,74 ± 4,19 <sup>a, A</sup> |
| CP          | 31,79 ± 11,32 <sup>a, A</sup> | 27,46 ± 4,42 <sup>b, B</sup> |

Letras minúsculas diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa ( $P < 0,05$ ).  
Letras maiúsculas diferentes na mesma linha indicam diferença significativa ( $P < 0,05$ ).

P = Sêmen puro (T1)  
EGL = Sêmen diluído e exposto em glicerol (T3)  
EET = Sêmen diluído e exposto em etilenoglicol (T4)  
CGL = Sêmen diluído e congelado em glicerol (T5)  
CET = Sêmen diluído e congelado em etilenoglicol (T6)  
CP = Sêmen puro e congelado sem crioprotetor (T2)

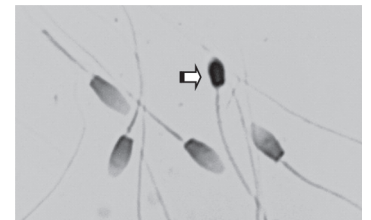
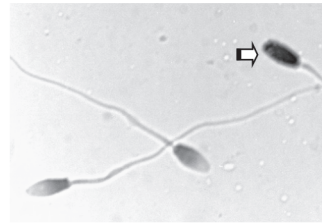


Figura 1 – Espermatozoides corados pela técnica da metacromasia induzida (A, B e C), evidenciando anomalia do complexo DNA-Proteína (seta). Aumento 1000x

moléculas de azul de toluidina<sup>16</sup>. Sendo assim, os espermatozoides com anomalia do complexo DNA-Proteína se coram em violeta (metacromasia). No presente trabalho foram observados núcleos metacromáticos em todos os tratamentos congelados e não congelados com glicerol ou etilenoglicol (Figura 1).

Durante o processo de condensação

do DNA espermático, há evidências de que este processo pode ser parcial, tornando o complexo DNA-Proteína menos estável e mais susceptível a desnaturação<sup>15</sup>. Neste caso, durante o processo de congelamento com glicerol ou etilenoglicol e de descongelamento, as ligações protéicas do DNA estavam menos estáveis, tornando os espermatozoides inviáveis para fecundação. No presente estudo,

verificou-se que durante o processo de congelamento e de descongelamento, havia aumento no número de espermatozoides com alterações do complexo DNA-Proteína em relação aos espermatozoides não congelados, independentes do crioprotetor.

Existem várias técnicas para analisar o complexo DNA-Proteína dos espermatozoides, mas precisam ser aprimoradas para uso rotineiro em exames de avaliação da capacidade reprodutiva dos animais.

Para a criopreservação do sêmen, deve-se fazer a avaliação da fertilidade do reprodutor como concentração espermática, vigor, motilidade, morfologia, compactação do DNA, pois o processo de congelamento e descongelamento influenciam diretamente a capacidade fecundante dos espermatozoides.

A sazonalidade fértil dos garanhões coincide com períodos de dias longos, com

baixa qualidade espermática em dias curtos<sup>21</sup>. Neste trabalho, ao estudar a influência da estação reprodutiva, pode-se observar diferença significativa ( $P < 0,05$ ) do complexo DNA-proteína somente no sêmen puro e no sêmen puro congelado sem crioprotetor, não havendo diferença no sêmen exposto ou congelado com crioprotetores.

O sêmen congelado sem crioprotetores não apresentou aumento significativo de patologia do complexo DNA-Proteína em relação ao sêmen congelado com crioprotetores, mas ambos mostraram aumento em relação ao sêmen puro ou diluído e exposto aos crioprotetores.

Em conclusão, a associação criopreservação e crioprotetores exerce influência negativa sobre o complexo DNA-Proteína, independente do crioprotetor.

## **Glycerol, ethyleneglycol and cryopreservation influences on semen and sperm DNA-Protein complex in stallion**

### **Abstract**

The cryopreservation process cause stress physical and chemical to the spermatozoa, causing biochemistry alteration, irreversible reduction of the spermatid motility, increase of the DNA degeneration and intracellular enzyme and lipids release. The aim of this study was to evaluate the influence of non-breeding and breeding seasons, glycerol and ethylene glycol, cryopreservation and thawing processes on stallion spermatozoa DNA-protein complex. It was compared fresh semen, diluted semen frozen without cryoprotectants, diluted semen exposed to cryoprotectants but not frozen and d) diluted semen frozen with cryoprotectants. Six stallions had 12 semen collections each. DNA-protein complex pathology was assessed by optical microscopy (1000x) using spermatozoa treated with ethanol-acetic acid 3:1 (v/v), HCl 4N at room temperature and toluidin blue 0,025% in McIlvaine buffer. Results showed that DNA-protein complex were different between frozen and not frozen spermatozoa groups ( $P < 0,05$ ). Frozen semen without cryoprotectants had no increasing of DNA-protein complex pathology compared to semen cryopreserved with cryoprotectant, but both showed increasing in relation to fresh and diluted semen exposed to cryoprotectants. The influence of non breeding and breeding season showed significant difference ( $P < 0,05$ ) in the fresh semen and fresh semen frozen without cryoprotectants. Cryopreservation process had negative influence on spermatozoa DNA-protein complex.

### **Key-words:**

Stallion.  
Chromatin.  
Semen.  
Cryoprotectants.  
DNA.  
Protamine.

## Referências

- 1 SMITH, A. U.; POLGE, C. Storage of bull spermatozoa at low temperatures. **Veterinary Record**, v. 46, p. 115-116, 1950.
- 2 POLGE, C.; ROWSON, L. E. A. Results with bull semen stored at -79°C. **Veterinary Record**, v. 4, n. 3, p. 851, 1952.
- 3 BEAN, B. H.; PICKETT, B. W.; MARTIG, R. C. Influence of freezing methods, extenders, and storage temperatures on motility and pH of frozen bovine semen. **Journal. Dairy Science.**, v. 46, p. 145-149, 1963.
- 4 SULLIVAN, J. J.; MIXNER, J. P. Effects of method of egg yolk addition and of glycerol equilibration time upon post thawing motility and metabolic activity of frozen bull semen. **Journal Dairy Science**, v. 46, p. 463-467, 1963.
- 5 HEITLAND, A. V.; JASKO, D. J., SQUIRES, E. L.; GRAHAM, J. K.; PICKET, B. W.: HAMILTON, C. Factors affecting motion characteristics of frozen-thawed stallion spermatozoa. **Equine Veterinary Journal**, v. 28, n. 1, p. 47-53, 1996.
- 6 MANN, T.; LUTWAK-MANN, C. **Male reproductive function and semen**. Berlin: Springer-Verlag, 1981. 495 p.
- 7 LARSON, K.; ERSMAR, M. Laboratory studies on frozen: thawed boar semen in relation to contemporary fertility with liquid semen in AI boars. **Zuchthygiene**, v. 15, p. 111-117, 1980.
- 8 BEORLEGUI, N. B.; CORDOBA, M.; BECONI, M. T. Mitochondrial calcium uptake in bovine frozen sperm. **Biochemistry and Molecular Biology International**. v. 35, n. 4, p. 713-718, 1995.
- 9 BRAUN, J.; HOCHI, S.; OGURI, N.; SATO, K.; TORRES BOGGINO, F. Effect of different protein supplements on motility and plasma membrane integrity of frozen/thawed stallion spermatozoa. **Cryobiology**, v. 32, n. 5, p. 482-492, 1995.
- 10 BLOCH, D. P. A catalog of sperm histones. **Genetics**, v. 61, p. 93-111, 1969. Supplement.
- 11 OLIVA, R.; DIXON, G. H. Vertebrate protamine genes and the histone-to-protamine replacement reaction. **Program Nuclear Acid Research Molecular Biology**, v. 40, p. 25-94, 1991.
- 12 PIRHONEN, A.; LINNALA-KANKKUNEN, A.; MAENPAA, P. H. Identification of phosphoseril residues in protamines from mature mammalian spermatozoa. **Biology of Reproduction**, v. 50, p. 981-986, 1994.
- 13 ALBERTS, B.; BRAY, D.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WATSON, J. D. **Molecular biology of the cell**. 3rd ed. New York: Garland, 1994. p. 342.
- 14 BALHORN, R. A model for the structure of chromatin in mammalian sperm. **Journal Cell Biology**, v. 93, p. 298-305, 1982.
- 15 GLEDHILL, B. L.; GLEDHILL, M. P.; RIGLER Jr, R.; RINGERTZ, N. R. Atypical changes of desoxyribonucleoprotein during spermiogenesis associated with a case of infertility in bull. **Journal Reproduction Fertility**, v. 12, p. 575-578, 1966.
- 16 MELLO, M. L. S. Induced metachromasia in bull spermatozoa. **Histochemistry**, v. 74, p. 387-392, 1982.
- 17 BELETTI, M. E.; MELLO, M. L. S. Influência da temperatura testicular sobre o complexo DNA-proteína em espermatozóides de coelho. **Revista Brasileira de Genética**. v. 18, p. 131, 1995. Suplemento.
- 18 COSTA, E. N.; BELETTI, M. E. Uso da metacromasia induzida na detecção de anomalias ao nível de complexo DNA-proteína em espermatozóides humanos. **Revista Brasileira Genética**, v. 18, p. 567, 1995.
- 19 COSTA, E. N.; BELETTI, M. E.; SOUSA, M. C. N.; RESENDE, E. V. The anomalous DNA protein complex in human spermatozoa of varicocele cases. **Brazilian Journal Genetics**. v. 19, n. 3, p. 147, 1996. Supplement.
- 20 MELLO, M. L. S. DNP variants in morphologically normal spermatozoa. CONGRESSO LATINO-AMERICANO DE GENÉTICA, 3., 1977, Montevideu. **Resumos...**, p.250.
- 21 BLOTTNER, S.; WARNKE, C.; TUCHSCHERER, A.; HEINEN, V.; TORNER, H. Morphological and functional changes of stallion spermatozoa after cryopreservation during breeding and non-breeding season. **Animal Reproduction Science**, v. 31, n. 65(1-2), p. 75-88, 2001.
- 22 BELETTI, M. E.; MELLO, M. L. S. Methodological variants contributing to detection of abnormal DNA-protein complexes in bull spermatozoa. **Brazilian Journal of Genetics**, v. 19, n. 1, p. 97-103, 1996.