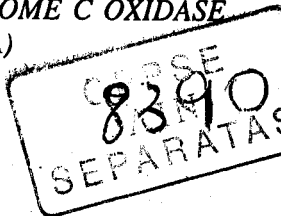


AVALIAÇÃO E DEMONSTRAÇÃO DA ATIVIDADE CITOCROMO C OXIDASE EM ESPERMATOZÓIDES BOVINOS

(EVALUATION AND DEMONSTRATION OF CYTOCHROME C OXIDASE
ACTIVITY IN BOVINE SPERMATOZOA)

R.T. BARBOSA¹, C.R. ESPER²



RESUMO

Um teste objetivo de avaliação quantitativa e qualitativa da atividade mitocondrial em espermatozóides bovinos foi aplicado no sêmen de 50 touros pertencentes a três diferentes genótipos e diluído em três diferentes diluentes. Foi determinado um índice médio de atividade citoquímica de $65,07 \pm 1,48\%$, significativamente correlacionado ($P < 0,05$) com o vigor e consumo de oxigênio, o que evidencia a importância do metabolismo aeróbico dos espermatozóides sob condições específicas.

Unitermos: Touros, Sêmen, Atividade citoquímica.

SUMMARY

An objective test for qualitative and quantitative evaluation of mitochondrial activity in bovine spermatozoa was applied to semen of 50 bulls from three genotypes with three different extenders. The cytochemistry activity index was $65.04 \pm 1.48\%$, significantly correlated ($P < 0.05$) with the vigor and oxygen uptake, showing the importance of the aerobic metabolism in bovine spermatozoa.

Key words: Bulls, Semen, Cytochemistry activity.

INTRODUÇÃO

Como células metabolicamente ativas, os espermatozóides bovinos realizam tanto a glicólise como a respiração mitocondrial, mantendo um adequado balanço energético necessário para o transporte e as demais funções celulares.

Na glicólise anaeróbica os espermatozóides degradam a frutose, glicose ou manose com conseqüente produção de ácido lático, o que proporciona-lhes sobrevivência nas condições anaeróbicas durante a estocagem para uso posterior em inseminação artificial. Em presença de oxigênio os espermatozóides utilizam uma ampla variedade de substratos incluindo o

1. CPPSE- Centro de Pesquisa de Pecuária do Sudeste - EMBRAPA. Caixa Postal, 339, CEP: 13560-970, São Carlos, SP.
2. Departamento de Reprodução Animal, FCAV-UNESP. Rodovia Carlos Tonanni, km 5. CEP: 14870-000, Jaboticabal, SP.

ácido láctico, ácido acético, ácido pirúvico, glicerol, ácidos graxos, certos aminoácidos e sorbitol. Esta via oxidativa é mais eficiente na produção de energia do que a anaeróbica. Utilizando ambos os processos, os espermatozóides convertem os substratos em ATP, a qual é utilizada em sua maior parte na motilidade espermática (MANN & LUTWAK-MANN, 1948; AMELAR *et al.*, 1980; GARNER & HAFEZ, 1993; MANN & LUTWAK-MANN, 1981).

Várias enzimas estão envolvidas em ambos os processos metabólicos, dentre as quais destaca-se a hexoquinase, a lactato desidrogenase e a citocromo c oxidase, sendo esta última da cadeia respiratória relacionada com o processo de oxidação e conseqüente produção de energia ao espermatozóide (MANN & LUTWAK-MANN, 1981; HRUDKA, 1987).

Através de vários métodos citoquímicos tem sido possível demonstrar a atividade desidrogenase das enzimas da bainha mitocondrial dos espermatozóides. Estes testes incluem a redução do azul de metileno (VAN DEMARK *et al.*, 1945; BUCKNER *et al.*, 1954; BRATTON *et al.*, 1956) redução do resazurin (ERB & EHLERS, 1950; GLASS *et al.*, 1991; FUSE *et al.*, 1993), e a redução do azul nitro tetrazólio (HRUDKA, 1978, 1979; BENJAMIN *et al.*, 1987).

A atividade citocromo c oxidase é passível de demonstração e quantificação através de coloração pela 3, 3'-diaminobenzidina (SELIGMAN *et al.*, 1968; CAMER & MOORE, 1973; ROELS, 1974; HRUDKA, 1986, 1987; FERRANDI *et al.*, 1988; IWANO *et al.*, 1994).

O objetivo deste trabalho foi demonstrar e quantificar a atividade citocromo c oxidase em espermatozóides bovinos após a descongelação, e estabelecer os coeficientes de correlação desta atividade com características físicas e metabólicas do sêmen bovino.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados 50 reprodutores bovinos mestiços leiteiros de três grupos genéticos que estavam sendo avaliados em teste de progênie (FREITAS, 1989), cujo sêmen havia sido congelado no laboratório de processamento de sêmen do Centro de Pesquisa de Pecuária do Sudeste, da EMBRAPA, em São Carlos, SP.

Amostras de sêmen, provenientes de uma mesma partida de cada touro, foram submetidas após a descongelação e avaliadas quanto à motilidade e vigor espermáticos, bem como quantificadas quanto ao consumo de oxigênio e atividade citocromo c oxidase. Motilidade (%) e vigor (0-5) foram avaliados subjetivamente sob microscopia ótica de contraste de fase, e o consumo de oxigênio em dois ensaios, utilizando um oxígrafo GILSON com eletrodo tipo Clark.

Para cada ensaio de respiração, duas doses de sêmen eram descongeladas, o sêmen centrifugado por duas vezes em meio de RINGER a 150 g x 10 minutos e o sedimento, ressuspensão em 0,2 ml de RINGER, era transferido para a câmara de respiração do oxígrafo onde o consumo de oxigênio pelos espermatozóides era registrado. Após o cálculo da concentração espermática, a velocidade de consumo de oxigênio era calculada e expressa em $\mu\text{l O}_2/\text{hora}/10^8$ espermatozóides.

Para a demonstração qualitativa e quantitativa da atividade da enzima citocromo c oxidase, foi utilizado o procedimento citoquímico desenvolvido e validado por HRUDKA (1987). Esta técnica é baseada na oxidação da 3,3'-diaminobenzidina (DAB) pela enzima numa reação em cadeia, onde o reagente é polimerizado e depositado na bainha mitocondrial ao longo da peça intermediária dos espermatozóides.

A atividade foi então determinada pela incubação de uma alíquota de 250 ml de sêmen em 750 μl de meio DAB, por uma hora a 37°C e na ausência de luz. O meio DAB era obtido pela

dissolução de 3,3'-diaminobenzidina na concentração de 1mg/ml em tampão fosfato de sódio 0,15M, pH 7,2.

Após a incubação, dois esfregaços eram preparados, secos ao ar, fixados em formaldeído 10% por 10 minutos, lavados, novamente secos ao ar, e avaliados sob microscopia ótica de contraste de fase, sob imersão. A cada ensaio realizado, um controle negativo era obtido pela incubação de uma amostra de sêmen aquecida a 70°C por 5 minutos e adicionada ao meio DAB nas mesmas proporções do teste. Cem espermatozóides foram avaliados por touro, em cada lâmina. Para a classificação da atividade das células individuais, uma escala de quatro classes foi utilizada ou seja: na classe 1, quase todas mitocôndrias eram ativas e proporcionavam uma bainha mitocondrial com aparência de um cilindro compacto e proeminente; na classe 2 a bainha mitocondrial aparecia fragmentada, consistindo de segmentos ativos e inativos, prevalecendo os ativos. A classe 3 compreendia espermatozóides com menos da metade da bainha ativa, isto é, com menos da metade das mitocôndrias ativas e a classe 4, espermatozóides completamente inativos. O índice de atividade citoquímica foi calculado, multiplicando-se o número de células em cada classe por um fator de correção, como segue: 1 x 1,0, 2 x 0,50, 3 x 0,25 e 4 x 0,00. Ao final estes produtos eram somados e o resultado expresso em porcentagem.

As observações foram analisadas através dos procedimentos disponíveis no Statistical Analysis System (SAS, 1988). Os dados foram avaliados por meio de análise de variância, onde grupo genético (G) e diluente (D) atuaram como efeitos fixos e touro como efeito aleatório. As relações entre as variáveis foram avaliadas através de correlação e as médias comparadas pelo teste de Tukey. O seguinte modelo matemático foi utilizado:

$$Y_{ijk} = \mu + G_i + D_j + (G \times D)_{ij} + \sum_{ijk}, \text{ onde}$$

Y_{ijk} = valor observado no k-ésimo touro; no j-ésimo diluente e i-ésimo grupo genético;

μ = média geral;

G_i, D_j = efeitos fixos de grupo genético e de diluente utilizado, respectivamente;

$(G \times D)_{ij}$ = efeito da interação de G_i e D_j ;

\sum_{ijk} = erro aleatório.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As freqüências relativas do número de espermatozóides distribuídas nas diferentes classes e o índice de atividade citoquímica, de acordo com o proposto por HRUDKA (1987), encontram-se na Tabela 01.

Tabela 01. Frequências relativas do número de espermatozóides e atividade citoquímica, por classes e fator de correção de acordo com HRUDKA (1987) avaliados no sêmen dos touros mestiços.

Classes	Fator Correção	Nº de sptz, %	Atividade Citoquímica
1	1	49,38	49,38
2	0,5	24,80	12,40
3	0,25	13,10	3,26
4	0,00	12,72	0,00
Total		100,0	65,04±1,48

Como pode ser observado, cerca da metade dos espermatozóides (49,38%) encontram-se classificados na classe 1, 24,80 na classe 2, 13,10% na classe 3, e 12,72% na classe 4. A frequência na classe 1 é muito semelhante aos valores verificados por SODERQUIST (1991), quando observou 45,10% dos espermatozóides nesta classe. Já as frequências nas demais classes diferiram daquelas verificadas por esse autor que encontrou valores de 50,5, 3,5 e 1,6% para as classes 2, 3 e 4, respectivamente. Estas diferenças podem ter ocorrido pelo fato da motilidade espermática (52,7% em média) ter sido avaliada naquela pesquisa por um período de 30 minutos após a descongelação, superior portanto a deste trabalho.

O fato de existirem espermatozóides nas diferentes classes, em diferentes frequências, demonstra a coexistência de espermatozóides com atividade normal, reduzida ou ausente, confirmando a visão geral que um mesmo ejaculado apresenta uma multidão de clones de espermatozóides compreendendo células intactas, senescentes e mortas (SALISBURY & VANDENMARK, 1961).

A atividade citoquímica para as classes 1, 2 e 3 foi de 49,38, 12,40 e 3,26% o que resultou em um índice médio de 65,04±1,48% para todos os touros avaliados, sendo entretanto inferior ao verificado por SODERQUIST, 1991. Este índice significa que mais da metade das mitocôndrias estão ativas nos espermatozóides após a descongelação, o que é compatível para suportar o percentual de motilidade espermática (42,20%) quando avaliada após a descongelação. Isto está de acordo com SOOSALU *et al.* (1975) quando verificou ser possível, a existência de espermatozóides vivos, mas imóveis.

A análise de variância revelou que não houve diferenças significativas entre grupos genéticos ou diluentes, ocorrendo entretanto, efeito significativo da interação grupo genético x diluente ($P < 0,05$), em que os touros $\frac{3}{4} E \times Z$, cujo sêmen fora diluído em citrato, apresentaram significativamente ($P > 0,05$) maiores índices de atividade citoquímica do que os diluídos em lactose.

O índice de atividade citoquímica embora se apresentasse não correlacionado com a motilidade espermática, tanto antes, como após a descongelação, mostrou-se correlacionado significativamente ($P < 0,05$) com o vigor pós descongelação ($r = 0,34$) e com o consumo de oxigênio ($r = 0,37$), evidenciando assim a importância do metabolismo aeróbico dos espermatozóides bovinos sob circunstâncias específicas. Por outro lado, de acordo com CARDULLO & BALTZ (1991), a maneira pela qual ocorre a regulação entre o metabolismo espermático e a motilidade, é uma questão que ainda permanece não esclarecida.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AMELAR, R.D., DUBIN, L., SCHOENFELD, C. Sperm motility. *Fertility and Sterility*, Birmingham, v.34, n.3, p.197-215, 1980.
- BENJAMIN, B.R. *et al.* Evaluation of spermatozoan mitochondrial activity with reference to motility and livability among Holstein-Friesian bulls and Murrah buffaloes. *Indian Journal Animal Sciences*, New Delhi, v.57, n.11, p.1175-1180, 1987.
- BRATTON, R.W. *et al.* The relative usefulness of combinations of laboratory tests for predicting the fertility of bovine semen. *Journal of Dairy Sciences*, Champaign, v.39, n.9, p.1542-1549, 1956.
- BUCKNER, P.J., WILLETT, E.L., BAILEY, N. Laboratory tests, singly and in combination, for evaluating fertility of semen and of bulls. *Journal of Dairy Sciences*, Champaign, v.37, n.7, p.1050-1060, 1954.
- CAMMER, W., MOORE, C.L. Oxidation of 3,3'-diaminobenzidine by rat liver mitochondria. *Biochemistry*, Washington, v.12, n.13, p.2502-2509, 1973.
- CARDULLO, R.A., BALTZ, J.M. Metabolic regulation in mammalian sperm: mitochondrial volume determines sperm length and flagellar beat frequency. *Cell Motility and the Cytoskeleton*, New York, v.19, p.180-188, 1991.
- ERB, R.E., EHLERS, M.H. Resazurin reducing time as an indicator of bovine semen fertilizing capacity. *Journal of Dairy Sciences*, Champaign, v.33, p.853-864, 1950.
- FERRANDI, B. *et al.* Effects of deep freezing on the energy metabolism of bovine spermatozoa during in vitro capacitation: a cytochemical approach. *Theriogenology*, Stoneham, v.30, n.3, p.563-573, 1988.
- FREITAS, A.F. Desenvolvimento do gado Mestiço Leiteiro Brasileiro (MLB). Coronel Pacheco: EMBRAPA/CNPGL, 1989. 4p. (Comunicado Técnico nº 7).
- FUSE, H. *et al.* Comparison of resazurin test results with various sperm parameters. *Andrologia*, Berlin, v.25, p.153-157, 1993.
- GARNER, D.L., HAFEZ, E.S.E. Spermatozoa. In: HAFEZ, E.S.E. *Reproduction in farm animals*. 6ª ed. Philadelphia, Lea & Febiger, 1993. p.165-187.
- GLASS, R.H. *et al.* The resazurin reduction test provides an assessment of sperm activity. *Fertility and Sterility*, Birmingham, v.56, n.4, p.743-746, 1991.
- HRUDKA, F. A morphological and cytochemical study on isolated sperm mitochondria. *Journal of Ultrastructure Research*, San Diego, v.63, n.1, p.1-19, 1978.
- HRUDKA, F. Cytochemistry of oxidoreductases in spermatozoa: the technique revisited. *Andrologia*, Berlin, v.11, n.5, p.337-353, 1979.
- HRUDKA, F. Cytochemical demonstration of cytochrome oxidase - an objective vitality test of spermatozoa. *Development, Growth and Differentiation*. Tokyo, Suppl. 28, p.89, 1986.
- HRUDKA, F. Cytochemical and ultracytochemical demonstration of cytochrome c oxidase in spermatozoa and dynamics of its changes accompanying ageing or induced by stress. *International Journal of Andrology*, Oxford, v.10, n.6, p.809-828, 1987.

- MANN, T., LUTWAK-MANN, C. Studies on the metabolism of semen. 4. Aerobic and anaerobic utilization of fructose by spermatozoa and seminal vesicles. *The Biochemical Journal*, London, v.43, p.266-270, 1948.
- MANN, T., LUTWAK-MANN, C. *Male reproductive function and semen*. 1^a ed., New York: Springer Verlag, 1981. 495pp.
- ROELS, I. Cytochrome C and cytochrome oxidase in diaminobenzidine staining of mitochondria. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, New York, v.22, n.6, p.442-446, 1974.
- SALISBURY, G.W., VANDEMARK, N.L. *Physiology of reproduction and artificial insemination of cattle*. San Francisco, W.H. Freeman, 1961. 361p.
- SAS. *Statistical Analysis System*. 6. 3.ed. Cary, NC, USA: SAS Institute Inc., 1988, 1028p.
- SELIGMAN, A.M. Nondroplet ultrastructural demonstration of cytochrome oxidase activity with a polymerizing osmiophilic reagent diaminobenzidine (DAB). *Journal of Cell Biology*, New York, v.38, p.1-14, 1968.
- SODERQUIST, L. *Sperm characteristics and fertility in dairy A.I. bulls with special reference to sperm motility, ATP content, sperm morphology, and spermatogenesis*. Uppsala, 1991, 73p. Tese (Doutorado). Swedish University of Agricultural Sciences, Sweden.
- SOOSALU, O., EINARSSON, S., GUSTAFSSON, B. Studies on whole semen and epididymal contents in a bull with low post-thawing sperm motility. *Nordisk Veterinaermedicin*, Copenhagen, v.27, p.518-522, 1975.
- VANDEMARK, N.L., MERCIER, E., SALISBURY, G.W. The methylene blue reduction tests and its relation to other measures of quality in bull semen. *Journal of Dairy Science*, Champaign, v.28, n.3, p.121-128, 1945.