

CAROLINA FERNANDA SILVEIRA

**DETERMINAÇÃO DO PADRÃO DE EXPRESSÃO
DE RECEPTORES DE D-MANOSE EM
ESPERMATOZÓIDES DE HOMENS FÉRTEIS**

Dissertação de Mestrado

ORIENTADOR: Prof. Dr. PAULO AUGUSTO NEVES

**UNICAMP
2003**

CAROLINA FERNANDA SILVEIRA

**DETERMINAÇÃO DO PADRÃO DE EXPRESSÃO
DE RECEPTORES DE D-MANOSE EM
ESPERMATOZÓIDES DE HOMENS FÉRTEIS**

Dissertação de Mestrado apresentada à
Pós-Graduação da Faculdade de Ciências
Médicas da Universidade Estadual de
Campinas para obtenção do Título de
Mestre em Tocoginecologia, área de
Ciências Biomédicas

ORIENTADOR: Prof. Dr. PAULO AUGUSTO NEVES

**UNICAMP
2003**

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
UNICAMP**

Si39d	<p>Silveira, Carolina Fernanda Determinação do padrão de expressão de receptores de d-manose em espermatozóides de homens férteis / Carolina Fernanda Silveira. Campinas, SP : [s.n.], 2003.</p>
	<p>Orientador : Paulo Augusto Neves Dissertação (Mestrado) Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas.</p>
	<p>1. Fluorescência. 2. Sêmen. 3. *Fertilidade humana. I. Paulo Augusto Neves. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.</p>

BANCA EXAMINADORA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Aluna: CAROLINA FERNANDA SILVEIRA

Orientador: Prof. Dr. PAULO AUGUSTO NEVES

Membros:

1.

2.

3.

**Curso de Pós-Graduação em Tocoginecologia da Faculdade
de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas**

Data: 07/10/2003

“ Se tiverdes fé do tamanho de um grão de mostarda...”
(Lucas 17.6)

*Dedico este trabalho aos meus pais,
Ademar Silveira e Louzânia Silveira,
por terem me ajudado a trilhar
mais este caminho profissional.*

Agradecimentos

À Universidade Estadual de Campinas, Unicamp, por ter-me conferido a oportunidade de continuar trilhando o caminho do aprendizado, através da Pós-Graduação Multiprofissional da Tocoginecologia da Faculdade de Ciências Médicas, e oferecendo o apoio da FAEP para a compra de parte do material utilizado neste trabalho.

Ao Prof. Dr. Paulo Augusto Neves, que me deu a oportunidade de fazer parte do primeiro grupo de pesquisa do Brasil a trabalhar com o teste D-manose, confiando-me a responsabilidade de estabelecer o teste. Para tanto, abriu as portas profissionais mais difíceis, pois sozinha jamais conseguiria fazê-lo, e me acompanhou em cada etapa deste trabalho, ensinando-me não só a pesquisar, mas a trilhar com nobreza de atitude e princípios cada dificuldade encontrada para a realização desta pesquisa.

Ao Dr. Francisco Antônio Techatti Fazano, que me ensinou tudo que alguém gostaria de aprender sobre laboratório, quebrando seus protocolos e oferecendo as dicas mais importantes para que o teste pudesse ser concluído. Sem seus talentos profissionais como um dos maiores conhecedores sobre técnicas de laboratório de Reprodução Humana, esta pesquisa jamais teria sido concluída. Além disso, a convivência diária agradável e com muito bom senso fez com que pudéssemos partilhar da mesma equipe de trabalho, vivenciando as mais complexas discussões sobre reprodução humana e também a respeito de questões pessoais.

Ao Prof. Dr. Carlos Alberto Petta, Coordenador da Pós-graduação da Unicamp, por ter-me informado inicialmente sobre o curso multiprofissional da Tocoginecologia.

Ao Prof. Dr. Luís Bahamondes, que me aceitou inicialmente como aluna ouvinte em seu curso, ensinando-me todos os passos para a montagem desta dissertação, incentivando-me à pesquisa e recomendando-me a trabalhar com o Dr. Paulo Neves, que tinha este trabalho como uma idéia e tornou-se meu sonho durante estes dois anos e meio.

À mestra Mara A. Lúcio, do Laboratório de Reprodução Humana, CAISM, Unicamp, que foi também minha co-orientadora “extra-oficial”, oferecendo dicas fundamentais de laboratório, corrigindo meus erros, ensinando passo a passo cada técnica, analisando e discutindo conceitos que foram fundamentais para a elaboração deste trabalho. Além da participação como uma grande profissional na área de Reprodução Humana,

é uma pessoa íntegra, que me ensinou muito sobre confiança e responsabilidade, proporcionando no laboratório uma convivência amigável e respeitosa.

À equipe de apoio do Dr. Fazano no Laboratório de Reprodução Humana do CAISM, Unicamp, Nicéia Marrone, Celestina Gomes, Carlos Rigui e Alexandre Martins, com os quais vivenciei a parte prática do laboratório, aprendendo dicas básicas, porém não menos importantes, sobre o funcionamento do laboratório.

À diretora do serviço do Laboratório de Anatomia Patológica do Hospital das Clínicas da Unicamp, Dra. Cecília Amélia Fazzeo Escanhoela, por nos conceder o uso do microscópio com epifluorescência, sem o qual jamais teríamos implantado este teste.

Aos amigos do Laboratório de Microscopia da Anatomia Patológica do HC da Unicamp, Lucinha, Dona Geralda, Dona Fátima e o mais recente, Adilson, pela companhia e apoio durante as leituras no KS.

Ao serviço de microbiologia na Divisão da Patologia Clínica, em nome da Dra. Shirley Alice Gonçalves, por ter-nos cedido para o projeto-piloto o microscópio, onde vimos pela primeira vez nos espermatozóides os sítios receptores de D-manose.

À técnica em eletrônica, responsável pelo Setor de Ótica do CEB – Unicamp, Márcia Almeida Queiroz, que nos ensinou muito sobre microscopia com epifluorescência, dando dicas importantes que melhoraram a qualidade de nossas lâminas, possibilitando as imagens fotográficas presentes neste trabalho.

À bióloga responsável pelo Laboratório Citogenético do Hemocentro – Unicamp, Dra. Maristela Zocca, por ter-nos ensinado a realizar a captura de imagem.

À Dra. Maria José Munucci, pela visita ao LRH, onde seus conhecimentos trazidos da Argentina sobre D-manose fizeram com que esta pesquisa avançasse. Além do carinho e amizade por sempre manter contato, trocando informações valiosas sobre pesquisa.

À secretária da Pós-Graduação do DTG –FCM-Unicamp, Margareth Donadon, responsável pelos meus primeiros contatos com o Prof. Dr. Luís Bahamondes: sua simpatia e competência como secretária executiva da pós-graduação nunca deixaram a desejar.

Às estatísticas da Tocoginecologia da Faculdade de Ciências Médicas da Unicamp, Sirlei Siani Morais e Gislaine Aparecida Fonsechi Carvasan, pelo excelente trabalho estatístico, pelas tardes bem-humoradas que passamos juntas, conseguindo passo a passo, estabelecer o teste mais adequado para este estudo.

Aos pacientes do Ambulatório de Urologia que aceitaram participar desta pesquisa, rompendo tabus e preconceitos. Sem esses voluntários este trabalho não poderia ser realizado.

Aos funcionários da Biblioteca da Faculdade de Ciências Médicas, pelo apoio na busca de artigos que eram encontrados fora desta Universidade, sempre atendendo com muita simpatia.

Aos médicos que conheci através deste trabalho e que, de uma forma ou de outra, contribuíram para o mesmo com suas teses de mestrado: Dr. Marcelo Vieira e Dr. Ricardo Destro Saade.

À amiga da pós-graduação: Dra. Mônica de Oliveira Jorge, pela amizade e pelo cuidados com a minha saúde.

Ao Centro de Reprodução Humana de Campinas que deu suporte em momentos importantes desta pesquisa, além do companheirismo diário no trabalho: Dr. Daniel Faúndes, Dra. Alessandra Matos, Ângela, Ângida, Andreza, Luíza e Mary e Rodrigo.

Ao amigo e habilidoso em informática, José Eduardo Jr., por me ensinar muitas coisas sobre Excel e Word, facilitando este trabalho.

Ao Dr. Paulo Perin e à bióloga Márcia Ramos que me ajudaram a localizar referências bibliográficas importantes quando minhas fontes tornaram-se esgotadas.

Aos amigos da XXX turma de biologia da PUC-Campinas: Amanda Almeida, Luís Bruno Petrilli, Juliana Perosin, Alessandra Schanoski, Alessandra Belluzzo, Vânia Gonçalves e Vanessa, pela amizade que conservamos até os dias de hoje e para todos os integrantes do “bioamigos”.

Aos professores da PUC-Campinas, responsáveis por parte da minha formação acadêmica, Prof. José Eduardo Diotto (histologia e embriologia), Profa. Dra. Miralva (histologia), Profa. Mônica (zoologia dos invertebrados) e Profa. Dra. Luíza I. Ferreira (zoologia dos vertebrados), pelo incentivo desde a época da faculdade até os dias de hoje, para seguir sempre em frente neste árduo caminho da pesquisa.

À amiga Maria Flávia Correia Escudeiro, pelo ombro amigo que nunca me faltou, desde a época das “grandes saídas” até as tardes dos últimos domingos. São mais de sete anos de muita amizade e carinho que recebo de toda a sua família. Obrigada!

Aos meus pais, Ademar Silveira e Louzânia Silveira, por terem me ensinado tudo que sei em relação aos valores e princípios morais e cristãos, além da ética. Sem a ajuda deles, principalmente financeira, jamais teria conseguido realizar este sonho em minha vida. Foram eles que me ajudaram nos momentos mais difíceis e será para eles o meu eterno agradecimento por tudo, inclusive por existir.

À minha irmã mais velha, Gláucia Regina Silveira, historiadora por esta Universidade, e seu marido Hélio Patrício, por terem me dado conselhos importantes sobre o que é fazer uma pós-graduação, além do apoio sentimental em todos os momentos. À minha irmã “do meio”, Lilia Marise Silveira Moda e seu marido Paulo Henrique Moda pelo carinho e apoio, trazendo momentos de grande felicidade para mim com o nascimento do sobrinho Paulinho (2000) e agora com a chegada do Gustavo (setembro/03).

Por último, e mais importante na minha vida, não tenho palavras suficientes para agradecer ao meu companheiro Gustavo Barbetti, que primeiramente incentivou-me a fazer pós-graduação. Além disso, deu-me apoio emocional para realizar esta pesquisa, passando horas e horas no computador, principalmente na fase final deste trabalho, corrigindo minha falhas, montando minha tabela de leitura, agilizando minha contagem, enfim, foi mais que apoio emocional, foi colaborador indispensável para este trabalho acontecer. Ele que acreditou em mim, sempre me incentivando a nunca desistir, principalmente nos momentos árdios. Sua companhia é mais que agradável, é fator de suprema importância para que meus dias, mesmos os “chuvosos”, possam tornar-se com sol. Ao meu amor, muito obrigada!

Sumário

Símbolos, Siglas e Abreviaturas	
Lista de Tabelas e Ilustrações	
Resumo	
Summary	
1. Introdução	19
2. Objetivos	43
2.1. Objetivo geral	43
2.2. Objetivos específicos	43
3. Sujeitos e Métodos.....	44
3.1. Tipo de estudo.....	44
3.2. Tamanho da amostra	44
3.3. Critérios de exclusão.....	45
3.4. Fases do estudo (Anexo 2)	45
3.4.1. Primeira Fase.....	45
3.4.2. Segunda Fase.....	46
3.4.3. Terceira Fase	46
3.5. Local do estudo e disponibilidade de materiais	47
3.6. Descrição do Estudo	47
3.6.1. Primeira Fase.....	47
3.6.2. Segunda Fase.....	53
3.6.3. Terceira Fase	54
3.7. Visualização, análise e leitura	55
3.7.1. Receptores de D-manose	55
3.7.2. Reação Acrossômica	55
3.7.3. Leitura	56
3.8. Aspectos Éticos.....	58
4. Resultados	59
4.1. Análise 1.....	60
4.2. Análise 2.....	61
4.3. Análise 3.....	65
5. Discussão.....	70
6. Conclusões	79
7. Referências Bibliográficas.....	80
8. Bibliografia de Normatizações	88
9. Anexos	89
9.1. Anexo 1- Critérios de normalidade do espermograma de acordo com a Organização Mundial de Saúde , (2001)	89
9.2. Anexo 2 - Algoritmo.....	90
9.3. Anexo 3 - Coloração de Papanicolau Modificada para Espermatozoides (OMS, 2001).....	93
9.4. Anexo 4 - Preparo da solução-Mãe de Man – FITC-BSA (100µg/ml)	94
9.5. Anexo 5 - Preparo da Solução-Mãe de RITC – PSA. (100µg/ml).....	95
9.6. Anexo 6 - Consentimento Informado	96

Símbolos, Siglas e Abreviaturas

°C	graus Celsius
CAISM	Centro de Atenção Integral à Saúde da Mulher
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CO₂	Gás Carbônico
ESCA	Esterilidade Sem Causa Aparente
FCM	Faculdade de Ciências Médicas
FIV	Fertilização <i>in vitro</i>
h	Hora(s)
HC	Hospital das Clínicas
HTF	Fluido Tubário Humano
HZA	Teste da Hemizona
ICSI	Injeção Intracitoplasmática de Espermatozóide
LRH	Laboratório de Reprodução Humana
Man-FITC-BSA	Manose conjugada com soro albumina bovina conjugada com isoticianato
ml	Mililitro(s)
mOsm	Miliosmol
μl	Microlitro(s)

µg	Micrograma (s)
OMS	Organização Mundial de Saúde
PBS	Tampão Fosfato Salino – Dulbecco's
RITC-PSA	Rhodamina conjugada com <i>Pisum sativum</i>
SSS	Substituto de Soro Sintético
TRICT	Tetrametilrhodamina
Unicamp	Universidade Estadual de Campinas

Lista de Tabelas e Ilustrações

	Página
Tabela 1. Análise segundo a reação acrossomal dos espermatozóides com ou sem receptores de D-manose (n = 30).....	59
Tabela 2. Comparações entre as amostras inicial, após processamento (1h) e após incubação (20h), em relação ao estatus acrossomal (p<0,05)...	60
Tabela 3. Análise da leitura da amostra inicial (zero hora).....	62
Tabela 4. Análise da leitura da amostra após 1 hora de incubação.....	62
Tabela 5. Análise da leitura da amostra após 20 horas de incubação.....	63
Tabela 6. Análise da leitura referente aos três momentos.....	64
Tabela 7. Comparações entre as amostras inicial, após processamento (1h) e após incubação (20h), correlacionando a integridade acrossomal e a presença de sítios receptores de D-manose (p<0,05).....	64
Gráfico 1. Análise da integridade acrossomal.....	61
Gráfico 2. Análise da expressão dos sítios receptores de D-manose.....	65
Figura 1. Esquema da espermatogênese.....	24
Figura 2. Estrutura do espermatozóide.....	25
Figura 3. Estrutura molecular da D-manose.....	30
Figura 4. Esquema da ocorrência da marcação dos sítios receptores para D-manose em homens férteis.....	31

Figura 5.	Esquema correlacionando as regiões do espermatozóide com os eventos da capacitação até a reação acrossômica.....	33
Figura 6.	A e B: Interação e penetração do espermatozóide no óvulo.....	34
Figura 7.	Do momento da penetração do espermatozóide até a formação do zigoto.....	35
Figura 8.	Integridade acrossomal dos espermatozoides.....	36
Figura 9.	Captura de imagem referente à integridade acrossomal dos espermatozoides.....	36
Figura 10.	Esquema da marcação da membrana acrossomal para avaliar a sua integridade.....	37
Figura 11.	Padrões propostos por Tesarik e colaboradores.....	38
Figura 12.	Padrões propostos por Benoff e colaboradores.....	39
Figura 13.	Padrões propostos por Youssef e colaboradores.....	40
Figura 14.	Padrões propostos por Gamzu e colaboradores.....	41
Figura 15.	Foto de um espermatozóide morfológicamente normal.....	49
Figura 16.	Câmaras de Neubauer e Makler.....	50
Figura 17.	Foto apresentando radicais peróxidos nos leucócitos.....	51
Figura 18.	Efeito do teste hiposmótico.....	52
Figura 19.	Marcação dos sítios receptores para D-manose e acrossoma íntegro (zero hora).....	66
Figura 20.	Marcação dos sítios receptores para D-manose e acrossoma íntegro (1h).....	67
Figura 21.	Marcação dos sítios receptores para D-manose e acrossoma íntegro (20h).....	68
Figura 22.	Outros padrões de expressão de sítios receptores para D-manose encontrados durante os três momentos (zero hora, após uma hora de processamento espermático e após 20 horas de incubação).....	69
Figura 23.	Foto realizada no KS, ZEISS, referente ao padrão 1.....	73

Resumo

Estudos prévios demonstraram que, em mamíferos, a interação entre os gametas, que antecede a fertilização propriamente dita, é mediada por uma glicoproteína, a D-manose. Os óvulos são ricos em D-manose e os espermatozóides apresentam, em sua superfície, receptores para D-manose, que, durante a interação, reconhecem os óvulos através de um mecanismo tipo chave-fechadura. Os espermatozóides, uma vez capacitados durante sua ascensão pelo trato genital feminino, interagem com os óvulos, sofrem a reação acrossômica e, a seguir, penetram a zona pelúcida. Inúmeros trabalhos procuraram estudar esta interação através de um teste de D-manose, porém não foram conclusivos quanto à metodologia nem quanto aos padrões de expressão dos receptores nos espermatozóides. O presente trabalho teve por objetivo padronizar o teste de D-manose no Laboratório de Reprodução Humana da Universidade Estadual de Campinas e avaliar o padrão de expressão de receptores de D-manose em espermatozóides de homens sabidamente férteis. No período de maio de 2001 a dezembro de 2002, 30 pacientes do programa de vasectomias da Universidade Estadual de Campinas foram selecionados e forneceram uma amostra de sêmen após período de abstinência sexual de três dias, após assinarem consentimento informado. Todas as amostras enquadraram-se dentro dos critérios de normalidade propostos pela Organização Mundial da Saúde. As amostras foram processadas de acordo com a técnica de *swim-up* e incubadas por um período de 20 horas

para induzir a reação acrossômica. Foram colhidas alíquotas da amostra inicial, após processamento seminal por uma hora, e após incubação por 20 horas. As alíquotas seminais foram submetidas ao teste de D-manose, utilizando o corante Man-FITC-BSA, concomitantemente ao teste da reação acrossômica, utilizando o corante RITC - PSA. Para fins de análise, 3.000 espermatozóides foram analisados em cada momento, e os resultados das alíquotas foram comparados entre si. Os principais padrões de expressão dos receptores de D-manose em espermatozóides não reagidos acrossomicamente foram determinados. Os resultados revelaram que houve aumento significativo da proporção de espermatozóides reagidos acrossomicamente ao se comparar as alíquotas inicial e 20 horas e de uma e 20 horas, demonstrando que a incubação por 20 horas foi eficiente em provocar a reação acrossômica. Observou-se expressão de receptores de D-manose em 18% dos espermatozóides na amostra inicial, em 21,5% na amostra incubada por uma hora e em 28% dos espermatozóides incubados por 20 horas. Ao se analisar especificamente os espermatozóides que expressaram receptores para D-manose, porém que se mantiveram com o acrossoma intacto, não houve diferença estatística entre os três momentos (zero hora, 1 hora e 20 horas): medianas de 4,0%, 5,5% e 5,0%, respectivamente. Os principais padrões de expressão dos receptores de D-manose em espermatozóides não reagidos acrossomicamente em homens férteis foram: padrão 1: marcação apenas da peça intermediária (25,1%), padrão 2: marcação do contorno da cabeça (12,2%), padrão 3: todo o corpo marcado (12,2%), padrão 4: somente região equatorial (7,6%) e padrão 5: cabeça toda marcada (6,3%) e outros padrões (36,6%). Uma vez estabelecido o comportamento dos receptores de D-manose em homens férteis, estudos comparativos com homens inférteis poderão ser propostos na tentativa de se estabelecer novos mecanismos fisiopatológicos da infertilidade masculina.

Summary

Several studies showed that, in mammals, gamete interaction is mediated by a glycoprotein, D-mannose. The surface of the eggs is rich in D-mannose, and the spermatozoa show, in their surface, receptors that interact with the female gamete in a key-lock manner. The sperm is capacitated during his ascension in the female tract, interacts with the egg, suffers acrosomal reaction and penetrates the zona pellucida. Previous studies fail to establish the methodology of the D-mannose test, nor could determine usual patterns of expression of the receptors. The objectives of the present work are to standardize the D-mannose test in normal fertile men and to determine the usual patterns of expression of the receptors at the Laboratory of Human Reproduction of the University of Campinas Medical School – Brazil. The period at May-2001 to December-2002, thirty normal patients who presented for vasectomy provided a semen sample after 3 days of sexual abstinence. All samples were considered normal according to the criteria of World Health Organization (2001). All samples were submitted to *swim-up* procedure and further incubation for 20 hours, in order to induce acrosomal reaction. One aliquot of initial sample, after swim-up (1 hour incubation)

and after 20 hours of incubation of all samples were collected and submitted concomitantly to D-manose test, using Man-FITC-BSA dye and to acrosomal reaction test, using RITC - PSA as dye. Three thousand sperms were analysed under epifluorescence microscope in every moment, and it was determined the main patterns of expression of D-manose receptors in spermatozoa without acrosomal reaction. The results showed that there was a significant increase of acrosomal reaction in sperm incubated for 20 hours, denoting that this period of incubation is adequate to induce acrosomal reaction. 18% of sperm expressed D-manose receptors in initial samples, in 21,5% of sperm incubated for 1 hour and in 28% of sperm incubated for 20 hours. There was no significant statistical difference of the median percentage of expression of D-manose receptors in sperm without acrosomal reaction in the three moments (0, 1 and 20 hour incubation): 4.0, 5.5 and 5.0%, respectively. The most common patterns of expression of D-manose receptors in spermatozoa that not suffered acrosomal reaction were: pattern 1 – intermediate piece (25.1%), pattern 2 – around the head (12.2%), pattern 3 – all body of sperm (12.2%), pattern 4 – only equatorial region (7.6%), and pattern 5 – all head (6.3%), other patterns (36.6%). Once established the usual patterns of expression of D-manose receptors of normal fertile donors, comparative studies can be proposed in order to evaluate infertile men and to disclose new physiopathological mechanisms of male infertility.

1. Introdução

A fertilização em mamíferos é um processo complexo, que depende do reconhecimento e interação entre moléculas presentes na membrana plasmática do espermatozóide e na zona pelúcida do óvulo (MORI et al., 1989; TESARIK et al., 1991; CHEN e SATHANANTHAN, 1995; YOUSSEF et al., 1996; YAVETZ et al., 2001; FLESCHE e GADELLA, 2000).

Nos últimos trinta anos, a ciência da Reprodução Humana evoluiu sobremaneira, em especial com o desenvolvimento de técnicas complexas de reprodução assistida, como a fertilização *in vitro* (FIV) associada ou não à micromanipulação de gametas (injeção intracitoplasmática de espermatozóides – ICSI) (BURKMAN et al., 1988; PERIN e MALUF, 2002). Ainda, com a popularização das técnicas de reprodução assistida, o número de casais que procura orientação e tratamento da infertilidade aumentou (BAHAMONDES e MAKUCH, 2002).

Através do domínio dessas técnicas, diversas descobertas foram relatadas quanto ao processo de fertilização. Inúmeros casais inférteis, cuja causa de esterilidade não podia ser determinada (e, portanto, eram enquadrados na

categoria “esterilidade sem causa aparente” – ESCA) passaram a contar com possíveis explicações quanto à sua falha de fertilização, como por exemplo, alterações estruturais dos espermatozóides, falha no reconhecimento da zona pelúcida, etc. (DONADIO e DONADIO, 1997; NEVES, 2002).

Ao se analisar a população de casais inférteis, observa-se que, em quase 1/3 deles, o fator masculino é o único responsável pela infertilidade. Se for considerado que em 20% dos casais a causa da infertilidade é mista, o fator masculino pode ter parcial ou total responsabilidade pela dificuldade de gravidez em aproximadamente 50% dos casais (ESTEVES, 1999).

Desta maneira, percebe-se o quão importante é a análise do fator masculino. Além do espermograma, que revela alterações numéricas e qualitativas, o estudo funcional dos espermatozóides auxiliará a detecção de defeitos intrínsecos do mecanismo de fertilização.

Habitualmente o fator masculino é avaliado através de análises do sêmen, que incluem:

- **Análises Macroscópicas**: aspecto, cor, liquefação, pH, viscosidade e volume (OMS, 2001)
- **Análises Microscópicas**: concentração de espermatozóides, motilidade, morfologia, vitalidade, teste da peroxidase, teste hiposmótico, e teste da reação acrossômica (ELIASSON, 1977; JEYENDRAN et al., 1984; ROGERS et al., 1985; NAGAO et al., 1986; NEVES et al., 1990; MENKVELD e KRUEGER, 1991; TESARIK et al., 1991; MARMAR et al., 1992; FAZANO et al., 1993; NEVES, 1995; BENOFF et al., 1996;

YOUSSEH et al., 1996; HERSHLAG et al., 1998; NEVES, et al., 1999; GLAZIER et al., 2000; BAHAMONDES et al., 2001; OMS, 2001).

Inúmeros testes funcionais dos espermatozóides têm sido empregados na prática clínica, como teste hiposmótico, teste da hemizona, estudo da reação acrossômica, dentre outros.

O teste hiposmótico avalia a integridade funcional da membrana plasmática dos espermatozóides e o transporte de água através da mesma (JEYENDRAN et al., 1984; ESTEVES et al., 1996). Os espermatozóides que apresentam membranas íntegras absorvem água quando expostos a uma solução hiposmolar em relação ao meio intracelular e são capazes de manter um gradiente osmótico, enquanto os espermatozóides com membranas lesadas não apresentam capacidade osmorreguladora e, conseqüentemente, não exibem o inchaço da cauda (VAN DEN SAFFELE et al., 1992). Embora o teste hiposmótico tenha sido originalmente descrito como um teste de função espermática, correlacionando-se com o teste da hemizona (utilizando óvulos de *hamster*, JEYENDRAN et al., 1984; FAZANO et al., 1993), outros estudos não confirmaram tal propriedade (VAN KOOIJ et al., 1986; CHAN et al., 1990). Este teste apresenta uma grande correlação com a vitalidade do espermatozóide e também com a capacidade de fecundação (FAZANO et al., 1993; GLAZIER et al., 2000; BAHAMONDES et al., 2001).

Atualmente, o teste hiposmótico tem sido utilizado como um teste de vitalidade espermática associado às técnicas clássicas de vitalidade (eosina e nigrosina, OMS, 2001). É utilizado para identificar espermatozóides que embora se

apresentem imóveis, são viáveis, e, portanto, podem ser utilizados em técnicas de reprodução assistida, como a ICSI (ESTEVES, 1998).

O teste da hemizona (HZA) pode ser usado para aconselhamento de pacientes antes de um procedimento de reprodução assistida (TELÖKEN e BADALOTTI, 2002). Este teste consiste na divisão da zona pelúcida em duas partes iguais, utilizando-se uma micropipeta. Em seguida, uma parte é incubada com espermatozóides do paciente e a outra metade é incubada com espermatozóides de doador fértil como controle. O teste baseia-se na observação da ocorrência de ligação do espermatozóide à superfície externa da zona pelúcida. A capacidade de ligação é expressa como índice da hemizona:

$$\text{Índice HZA} = \frac{\text{número de espermatozóides ligados do paciente}}{\text{número de espermatozóides ligados do doador}} \times 100$$

(BURKMAN et al., 1988)

O índice de 30% foi estabelecido como limite mínimo para o teste da hemizona para que se observe a fertilização em um programa de reprodução *in vitro*. Em um estudo cego prospectivo, o valor preditivo positivo desse teste para fertilização *in vitro* (FIV) foi de 85% e o valor preditivo negativo foi de 70% (FRANKEN et al., 1993).

Em uma metanálise de 10 trabalhos selecionados foi observada excelente correlação entre o teste HZA e a FIV (OEHNINGER, et al.,1998). Pôde-se concluir que a melhor estimativa de correlação dos resultados dos testes de ligação do espermatozóide com a zona pelúcida, expressos pelo índice da hemizona e taxa de ligação (espermatozóide – zona pelúcida), o índice de fertilização foi de 0,64 (KRUGER e COETZEE, 1998).

Para que se possa avaliar alguns testes funcionais para análise espermática, deve-se compreender primeiramente como o espermatozóide é formado.

Durante a espermatogênese – processo de maturação das células gaméticas masculinas, que se inicia durante a puberdade nos meninos –, o espermatozóide é formado após uma seqüência inteira de eventos que dura cerca de 74 dias (divisões mitóticas, divisões meióticas e espermiogênese) (Figura 1).

A espermatogônia, durante o processo de maturação, transforma-se em espermatócito primário, espermatócito secundário, espermátide e espermatozóide. Este, quando maduro, é uma célula móvel que tem capacidade natatória livre e consiste de três partes: cabeça, peça intermediária e flagelo (MOORE e PERSAUD, 2000).

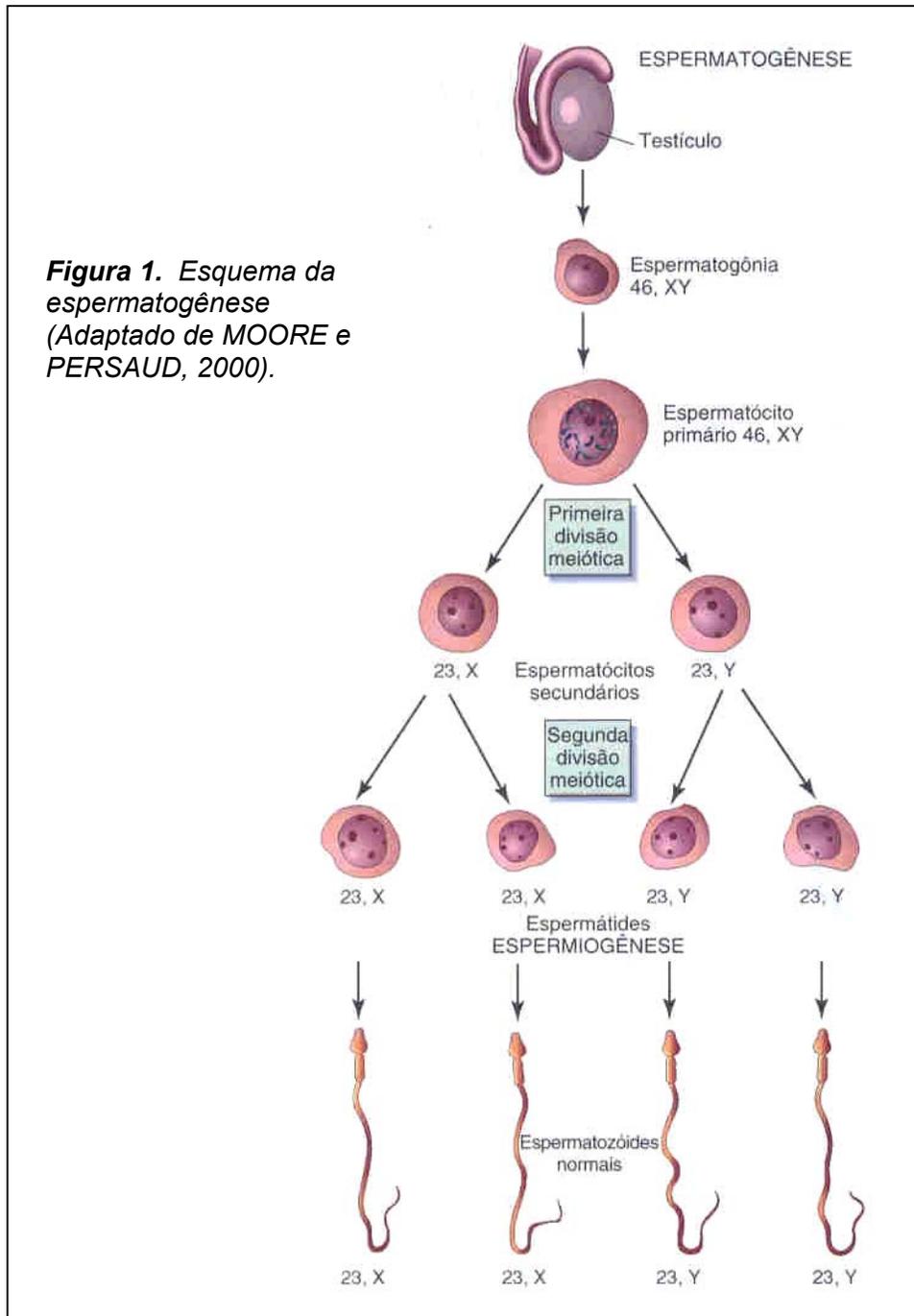
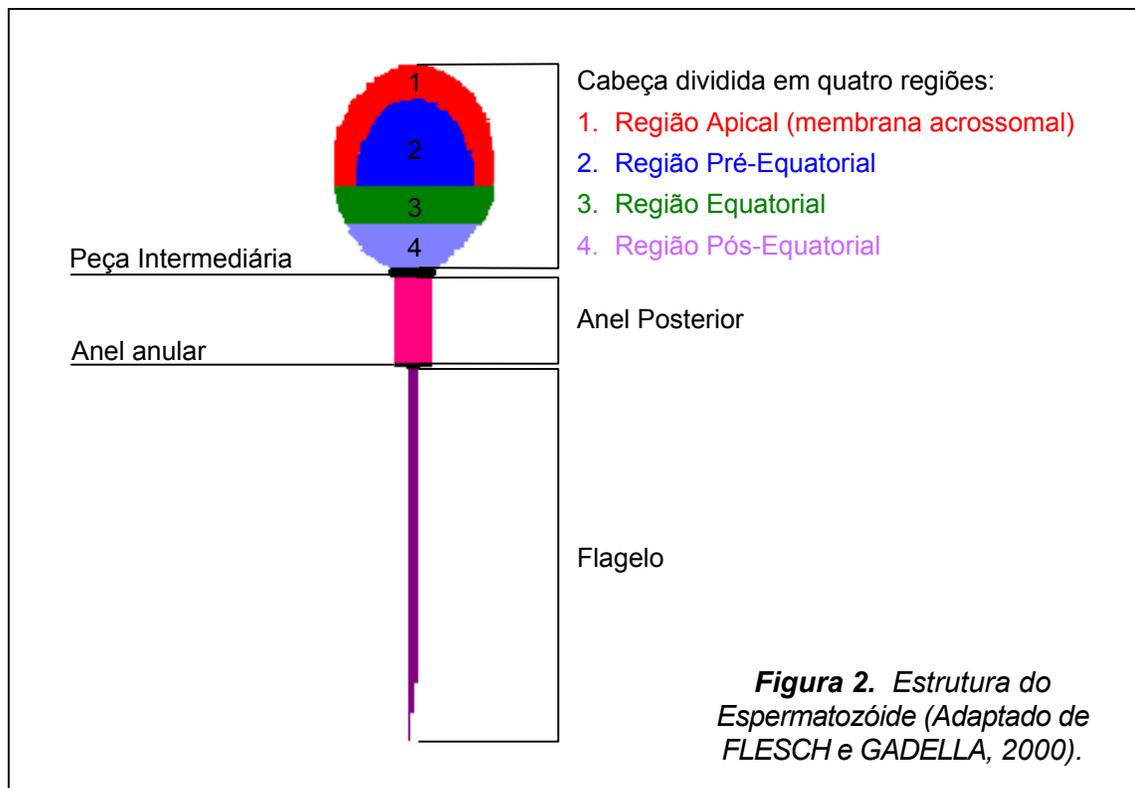


Figura 1. Esquema da espermatogênese (Adaptado de MOORE e PERSAUD, 2000).

Estruturalmente, a cabeça do espermatozóide é dividida em quatro regiões (observadas em 1976 por Flechon através do microscópio eletrônico): apical, pré-equatorial, equatorial e pós-equatorial (FLESCHE e GADELLA, 2000) (Figura 2).

Na região apical encontra-se o acrossoma, que contém enzimas hidrolíticas como a hialuronidase e a acrosina. Logo abaixo do conteúdo acrossomal encontra-se o envelope nuclear que reveste todo o conteúdo nuclear (DNA, altamente condensado). Entre a cabeça e a peça intermediária observa-se o anel posterior. Logo abaixo do anel posterior observa-se a peça intermediária, que abriga as mitocôndrias (apresentam forma helicoidal), produtoras de energia. Antes de chegar no flagelo, logo após a peça intermediária, observa-se o anel anular e por fim o flagelo, que é a primeira estrutura a ser desenvolvida durante o processo de espermatogênese, sendo responsável pelo movimento do espermatozóide (FLESCHE e GADELLA, 2000).



O espermatozóide apresenta duas membranas: uma interna – na região da cabeça, denominada de membrana acrossomal, que reveste todo o acrossoma, responsável pela vesiculação – e outra externa – que reveste todo o corpo – conhecida como membrana plasmática. Esta membrana é responsável por sintetizar estruturas como proteínas, fosfolípidos e colesterol, entre outras. Este evento só terá início quando o espermatozóide começar a percorrer os túbulos seminíferos no epidídimo (FLESCH e GADELLA, 2000).

A membrana plasmática também é responsável por abrigar sítios receptores para D-manose, um carboidrato presente na superfície do ovócito. Estes sítios são fundamentais no processo de fertilização, pois se acredita que são eles que reconhecem a D-manose presente no óvulo e, como em um processo chave-fechadura, eles se ligam, dando início aos processos bioquímicos e fisiológicos que levam à fecundação (MORI et al., 1989; TESARIK et al., 1991).

Para que ocorra a fecundação (interação espermatozóide-óvulo), quatro processos envolvendo os gametas são descritos: capacitação, interação, reação acrossômica e fertilização propriamente dita.

Em 1951, dois biólogos em estudos separados observaram que os espermatozóides tornavam-se “capazes” de fertilizar o óvulo após passarem um período dentro do trato genital feminino (*in vivo*) (AUSTIN, 1952).

Define-se como “capacitação” o conjunto reversível de alterações estruturais, metabólicas e bioquímicas que os espermatozóides sofrem desde que são

ejaculados até que apresentam a reação acrossômica. No ser humano, o período de capacitação dura aproximadamente sete horas (AUSTIN,1972; YANAGIMACHI et al., 1981). Devido a maior resistência de alguns espermatozóides do que outros, a capacitação ocorre em momentos diferentes para cada porção do ejaculado (SANTOS e NEVES, 2002).

Durante a capacitação são reconhecidos três conjuntos principais de alterações (ROGERS e BENTWOOD, 1982):

- 1) Aumento da velocidade e amplitude do batimento dos flagelos após os espermatozóides atingirem a ampola da tuba uterina. Esta mobilidade ocorre antes da reação acrossômica e pode ser observada *in vitro* após lavagem e incubação do sêmen em meio de cultura (processamento seminal). Acredita-se que a função biológica desta hipermotilidade seja a de facilitar a liberação do espermatozóide do istmo e a penetração na matriz viscosa do *cumulus oophorus* (SANTOS e NEVES, 2002);
- 2) Aumento da taxa de respiração, devido ao aumento do consumo de oxigênio pelos espermatozóides e da utilização de substratos energéticos. Estes fenômenos podem ser observados *in vitro*, pois quanto mais enriquecido estiverem os meios de incubação, maiores são as taxas metabólicas e o número de espermatozóides capacitados (MONESI, 1972). A principal fonte de energia provém da glicólise ou respiração oxidativa, tendo como base a glicose, o lactato e piruvato, presentes no líquido seminal e fluido tubário.
- 3) Alterações da membrana citoplasmática: com a passagem do sêmen pelo trato genital feminino. Substâncias que recobrem os espermatozóides, como proteínas, substâncias inibidoras ou estabilizadoras, vão sendo removidas da superfície e os componentes protéicos e lipídicos da membrana plasmática são reorganizados estruturalmente, permitindo

a entrada de íons cálcio, expondo receptores que vão intermediar a reação acrossômica, tornando a membrana plasmática susceptível à fusão com o óvulo.

Todas as etapas da capacitação são importantes para que o espermatozóide, chegando ao encontro do óvulo, possa ligar-se e sofrer a reação acrossômica, permitindo a fertilização e o desenvolvimento embrionário (DE JORGE et al., 1988; MOORE e PERSAUD, 2000).

A reação acrossômica é um processo irreversível em que a membrana acrossomal fragmenta-se, sofre vesiculação e libera enzimas proteolíticas que digerirão as paredes externas do óvulo (DE JORGE et al., 1988; FLESCHE e GADELLA, 2000). Além da hialuronidase e da acrosina, encontram-se também a *corona penetrating enzyme* (CPE - enzima que digere a *corona radiata* ovular), ATPases, esterases, fosfolipases, arilsulfatases e outras. Ainda é desconhecido o início da reação acrossômica *in vivo*, porém conhece-se o papel dos fatores séricos e dos íons cálcio em testes *in vitro* (ROGERS e BENTWOOD, 1982).

Durante a capacitação observa-se uma alteração do conteúdo de colesterol e dos fosfolípidos na membrana plasmática, com uma certa perda de colesterol. O colesterol é encontrado em grande quantidade na membrana espermática e a alteração do seu conteúdo antecede a reação acrossômica. É nesse momento que surgem receptores para D-manose importantes na interação espermatozóide e óvulo (SANTOS e NEVES, 2002).

Com a alteração do colesterol na membrana plasmática, receptores de D-manose tornam-se exteriorizados, favorecendo a ligação dos espermatozóides à

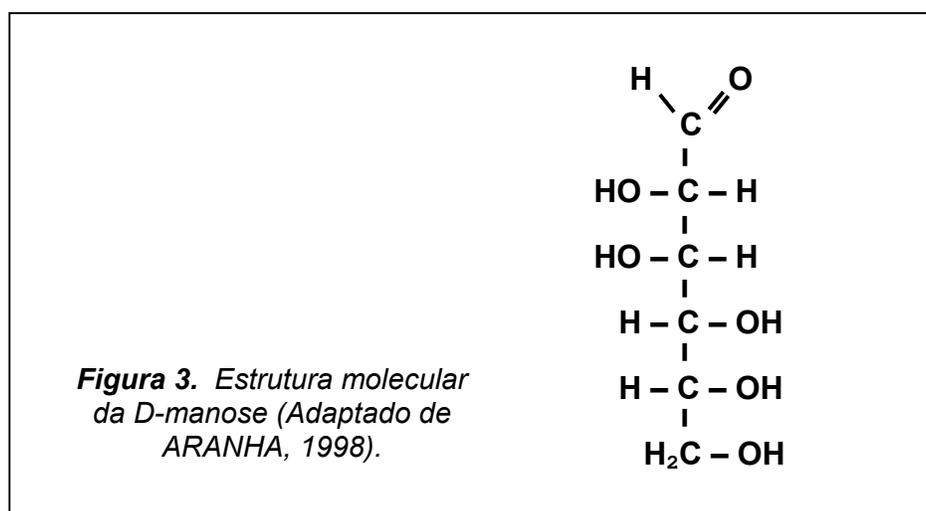
superfície ovular, rica em D-manose. Dessa forma, os receptores de D - manose são mantidos internamente no citoplasma dos espermatozóides ejaculados e são translocados para a superfície, como resultado do efluxo de colesterol associado à capacitação (BENOFF et al., 1993b; BEDFORD, 1997).

Os estudos iniciais envolvendo os receptores de D-manose nos espermatozóides foram propostos por MORI et al., (1989). Estes autores observaram que os espermatozóides previamente tratados com D-manose não se ligavam aos óvulos. Este resultado foi contrário quando óvulos foram pré-tratados com D-manose. Assim, pôde ser comprovado que nos espermatozóides existem receptores para a D-manose, sendo este um dos carboidratos encontrados em grande quantidade na superfície dos óvulos. Segundo BENOFF et al., (1993a) a ligação de D-manose no espermatozóide é preditiva para que ocorra a fertilização, devido à afinidade entre óvulo e espermatozóide através deste açúcar. O resultado obtido com as análises dos sítios receptores de D-manose dos espermatozóides, importantes para que aconteça o processo de fertilização, pode auxiliar o diagnóstico de infertilidade conjugal (HERSHLAG et al., 1998).

A presença destes receptores na superfície dos espermatozóides, mais especificamente na membrana plasmática, é aparentemente responsável pelo primeiro passo da fertilização. Através destes receptores os espermatozóides ligam-se à zona pelúcida dos óvulos, rica em D-manose (TESARIK et al., 1991, BENOFF et al., 1993a).

Bioquimicamente, a D-manose é um aldeído glicérico com seis carbonos, epímera da glicose no carbono 2. Funde-se a 132°C, apresentando poder rotatório

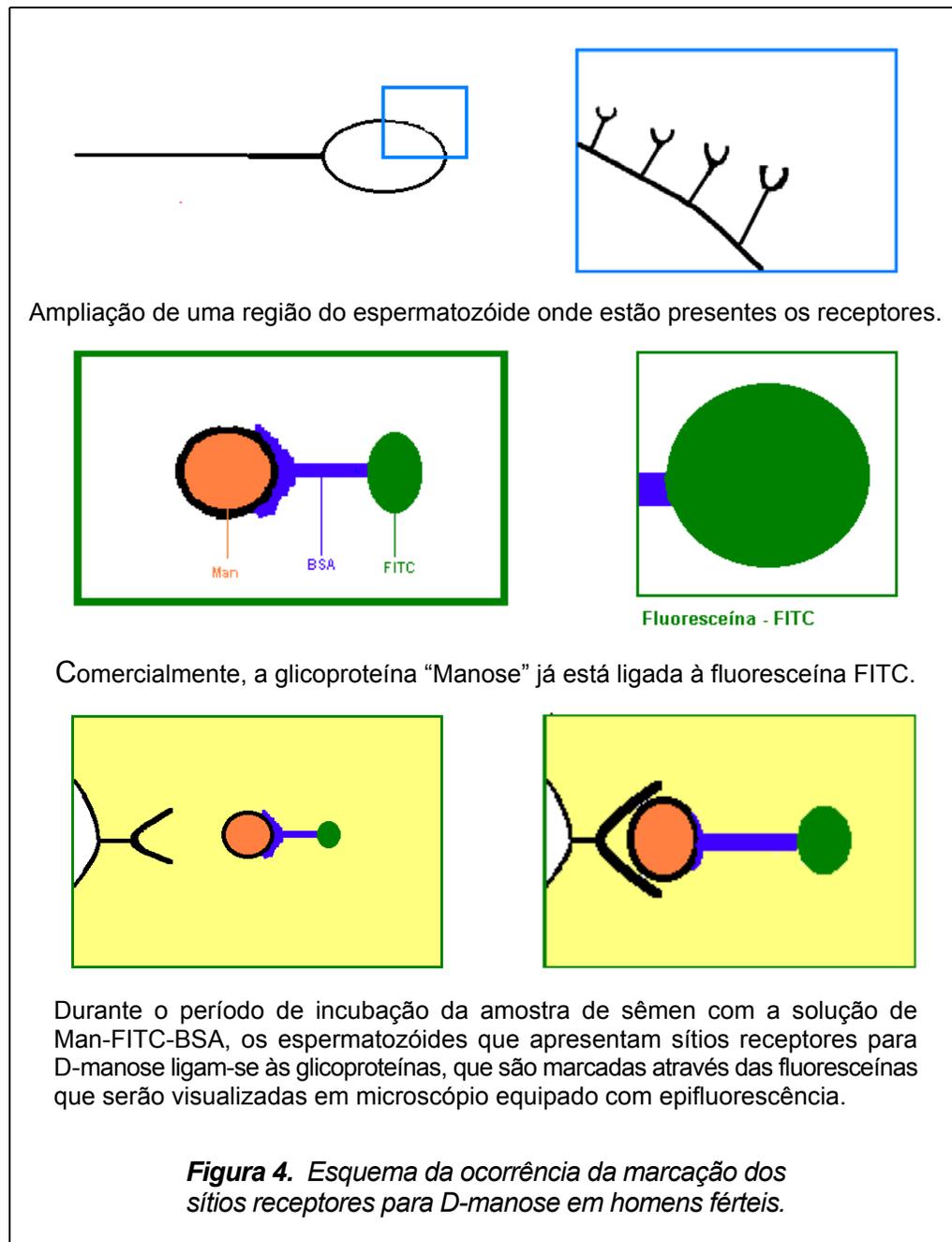
específico +14,5°/dm.g/ml. A letra D indica que o OH presente no penúltimo carbono está do lado direito, como apresenta a proposta realizada por Fisher (ARANHA, 1998) (Figura 3):



TESARIK et al., (1991) afirmaram que existe uma relação entre a expressão dos sítios de receptores de D-manose presentes na superfície da membrana plasmática dos espermatozóides e sua capacidade de fertilização. Assim, propuseram o teste da D-manose para verificarem em que regiões da superfície na membrana plasmática dos espermatozóides há receptores preenchidos com D-manose (TESARIK et al., 1991; BENOFF et al., 1993a). Este teste também permite verificar se, após um período previamente determinado de incubação em meio de cultura em estufa com 5% de CO₂, ocorre aumento ou não do número de receptores ligados a D-manose (BENOFF et al., 1993a).

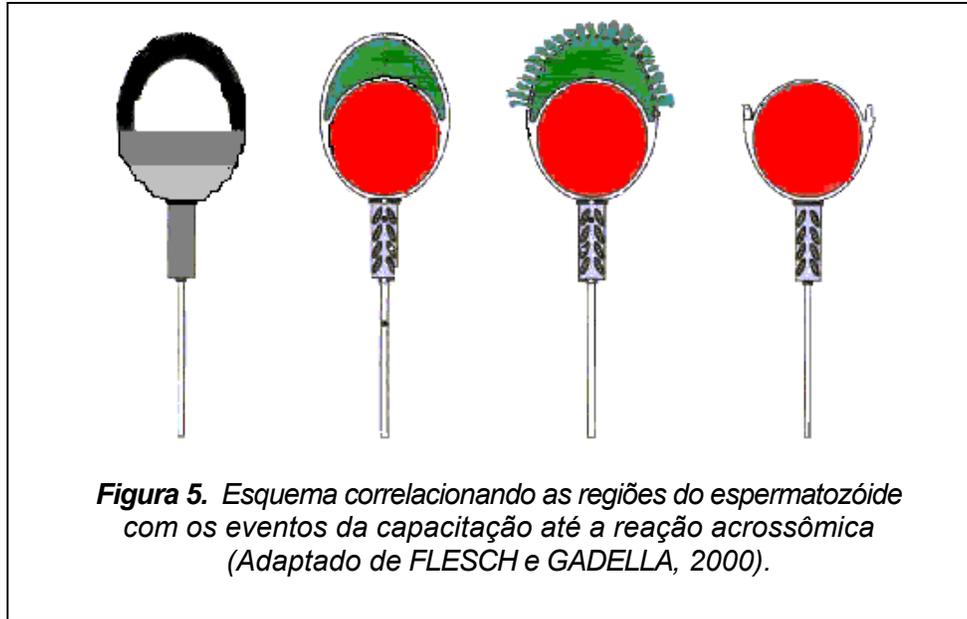
A visualização destes receptores é feita através de uma glicoproteína (manosilado de soro albumina bovina) ligada a uma fluoresceína (*fluorescein*

isothiocyanete) (Man-FITC-BSA) em microscópio equipado com epifluorescência (TESARIK et al., 1991; BENOFF et al., 1993a; BENOFF et al., 1996; YOUSSEF et al., 1996; HERSHLAG et al., 1998; YAVETZ et al., 2001) (Figura 4).



Após a interação entre o espermatozóide e o óvulo (através dos receptores de D-manose), inicia-se a reação acrossômica. Observa-se a liberação de enzimas pelo acrossoma, como a hialuronidase, que atua sobre o ácido hialurônico, mucopolissacáride presente na matriz que envolve as células do *cumulus oophorus*. Na presença da enzima, as células do *cumulus* se dispersam, favorecendo a aproximação do espermatozóide. Outras enzimas são liberadas para permitir a passagem do espermatozóide pela zona pelúcida, como esterases, neuraminidase e, a mais importante, a acrosina, que está presente sob a forma de pró-acrosina, que é convertida em acrosina durante a capacitação. A acrosina é a enzima proteolítica acrossomal responsável pela lise e dissolução dos componentes da zona pelúcida do óvulo (CARLSON, 1994; SANTOS E NEVES, 2002). Após penetrar o espaço perivitelíneo e a membrana plasmática do óvulo, o espermatozóide funde-se com o citoplasma do óvulo, ocorrendo, portanto, a fertilização. Esta liberação enzimática implica a perda da membrana plasmática do gameta masculino (FLESCHE e GADELLA, 2000; MOORE e PERSAUD, 2000), sendo um processo irreversível (SANTOS e NEVES, 2002).

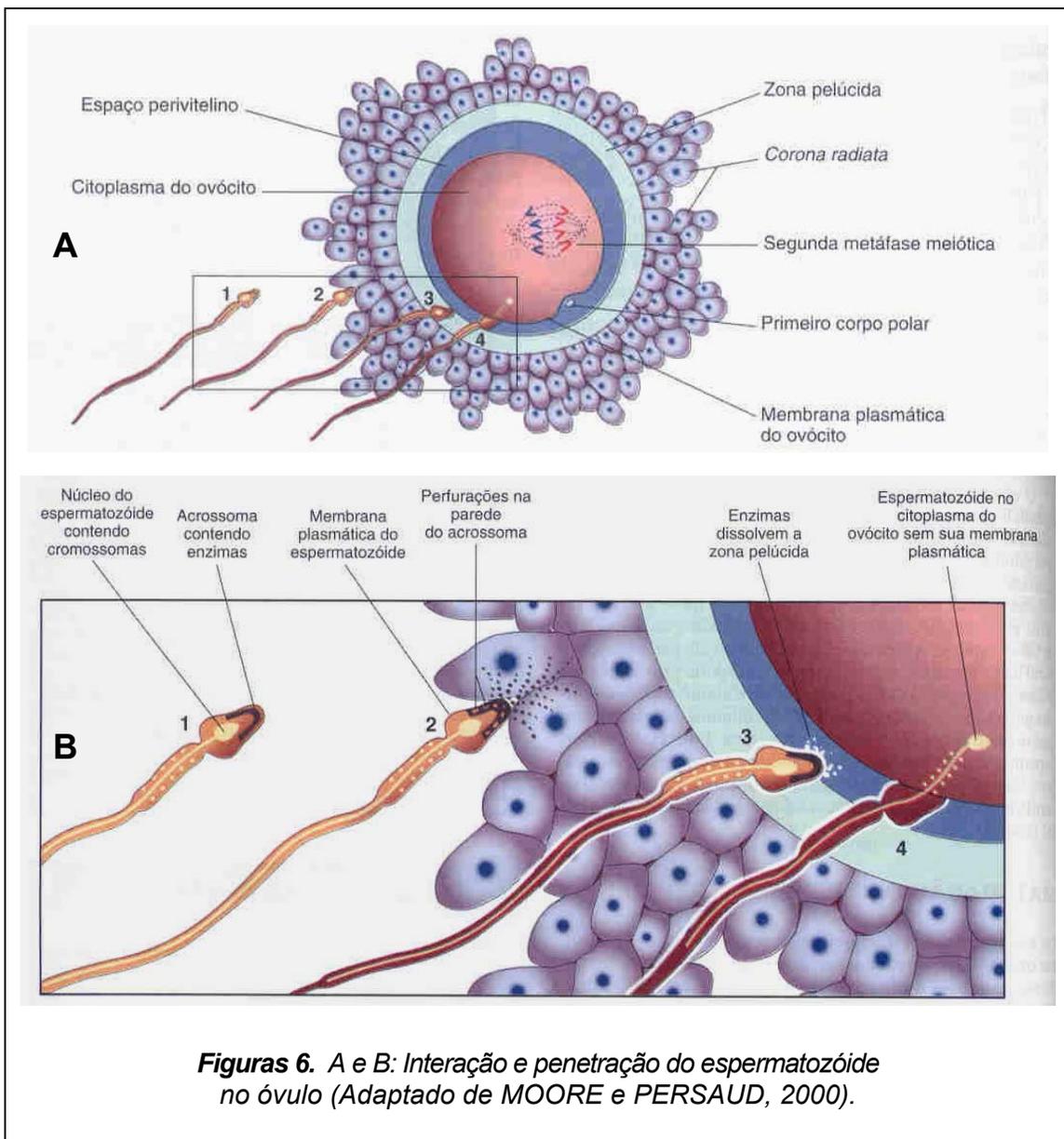
A reação acrossômica exige uma alta concentração intracelular de cálcio. Durante o processo de capacitação ocorre um influxo de íons cálcio através da ação da calmodulina, proteína que se liga ao cálcio. Esta proteína determina toda a síntese e degradação de cAMP em diversos tipos celulares, dependendo da quantidade e disponibilidade presente de cálcio. Quando há o aumento do influxo de cálcio ocorre a ativação das moléculas de calmodulina, que por sua vez, ativam a adenilciclase (enzima), aumentando a síntese de cAMP. O cálcio também interage com as lípidos da membrana, alterando seu arranjo estrutural, tornando-a mais susceptível à fusão e vesiculação observada durante o processo de reação acrossômica (SANTOS e NEVES, 2002) (Figura 5).



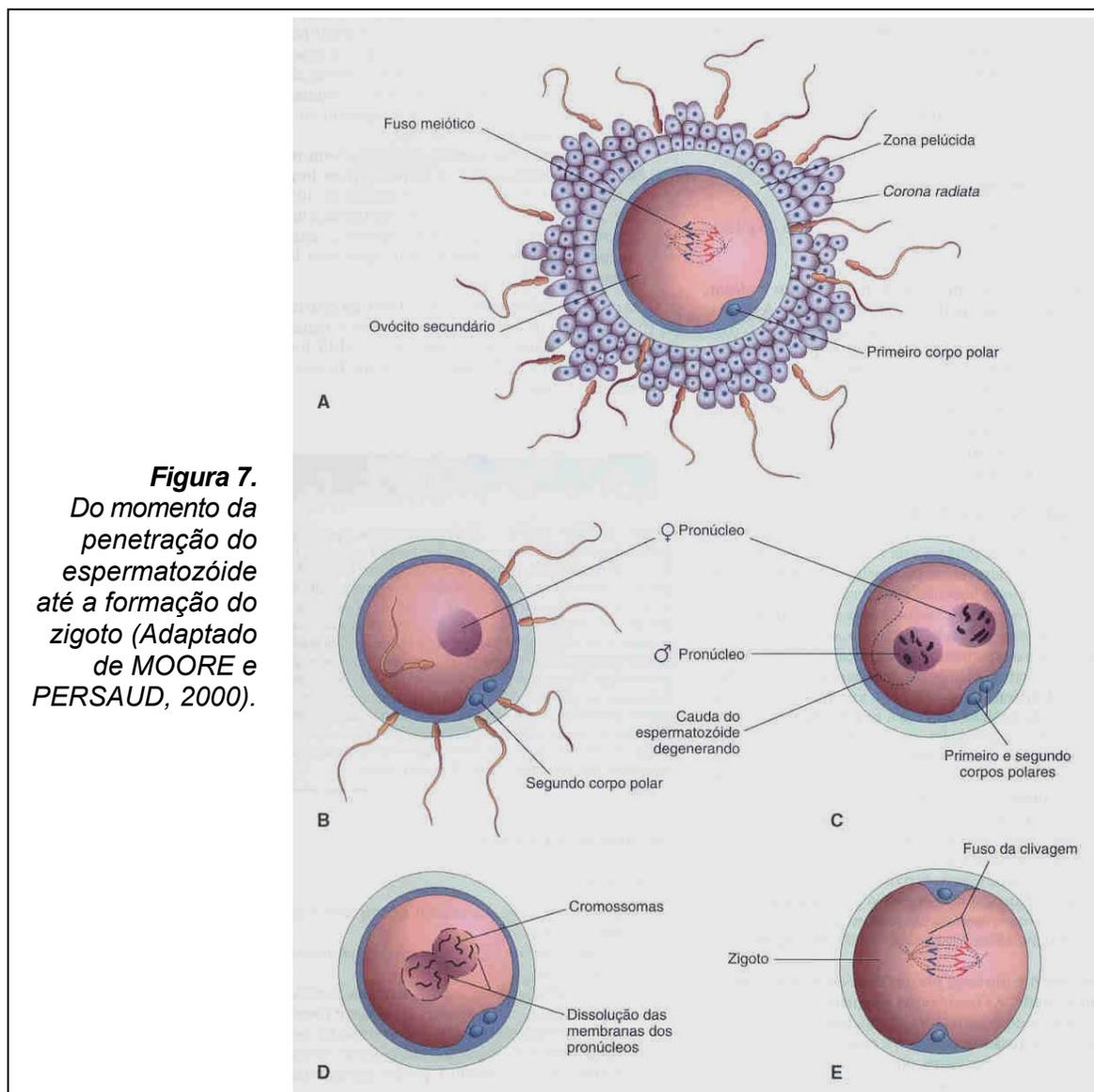
Após a reação acrossômica ocorre um mecanismo de bloqueio, conhecido como **reação da zona**, uma mudança das propriedades da zona pelúcida, tornando-a impermeável à entrada de outros espermatozóides. Observa-se uma alteração da capa glicoprotéica extracelular do óvulo (MOSS et al., 1995). Acredita-se que a reação da zona resulte da ação de enzimas lisossômicas liberadas pelos grânulos da cortical ovarar perto da membrana plasmática do ovócito. O conteúdo destes grânulos, liberados no espaço perivitelínico, também causa mudanças na membrana plasmática do ovócito, tornando-a impermeável aos espermatozóides (WASSARMAN, 1987; BERCEGEAY et al., 1995; CHEN e SATHANANTHAN, 1996).

A cabeça e a cauda do espermatozóide penetram no citoplasma do óvulo, mas a sua membrana plasmática fica “retida” no espaço perivitelino (MOORE e PERSAUD, 2000). Acredita-se que a membrana plasmática tenha o

papel fundamental de conduzir e preparar o espermatozóide para que o mesmo chegue ao encontro do óvulo e realize a interação (FLESCHE e GADELLA, 2000), principalmente através da manifestação dos receptores de D-manose (TESARIK et al., 1991; BENOFF et al., 1993a; MOORE e PERSAUD, 2000). Após sua interação e penetração ela é dispensada, pois já cumpriu sua função dentro do processo de fertilização (Figuras 6: A e B).

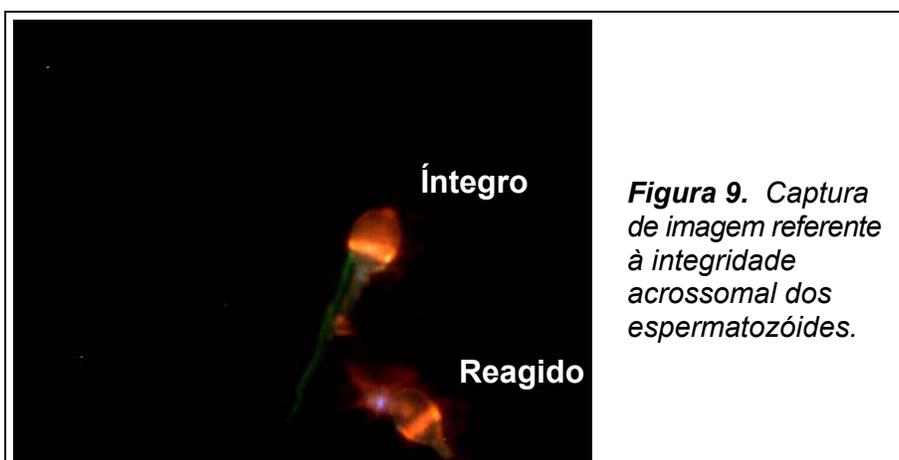
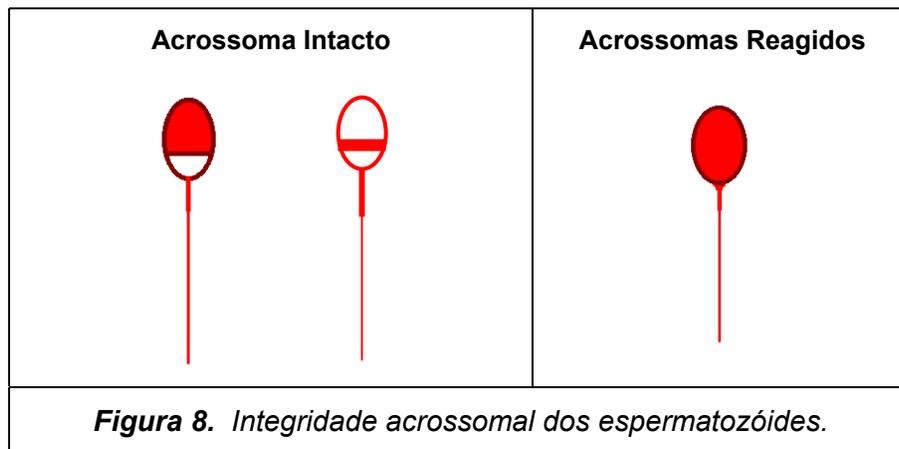


Após a entrada do espermatozóide, o ovócito que estava parado na metáfase da segunda divisão meiótica termina esta divisão e forma um ovócito maduro e um segundo corpo polar. Após a descondensação dos cromossomos maternos, o núcleo do ovócito maduro torna-se o pronúcleo feminino que se unirá com o pronúcleo do espermatozóide, que é formado após sua entrada no citoplasma do óvulo. As membranas dos pronúcleos (espermatozóide – óvulo) se dissolvem, os cromossomos se condensam e se dispõem para uma divisão mitótica da célula, que passará de zigoto para embrião (MOORE e PERSAUD, 2000) (Figura 7).

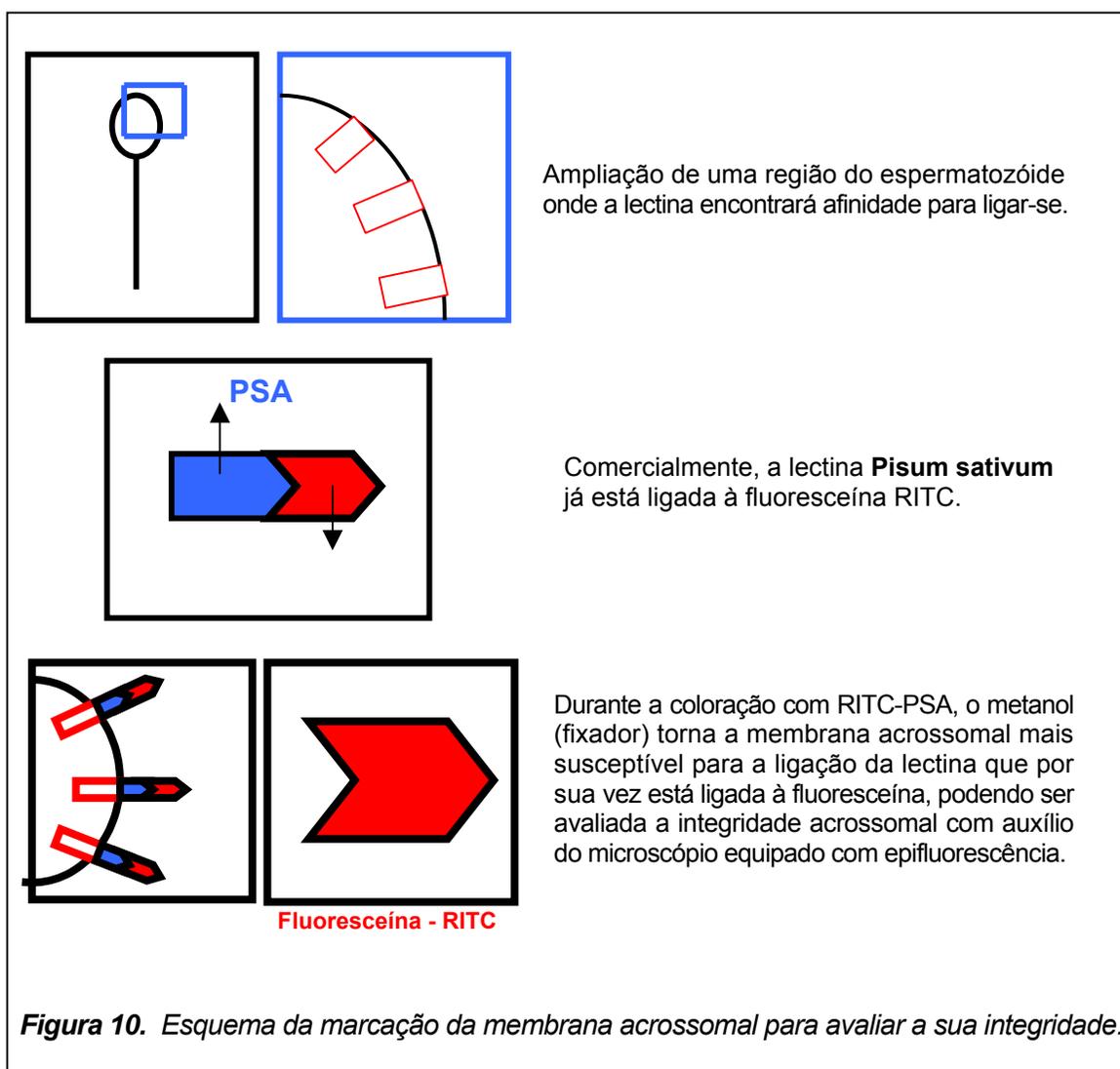


Os estudos iniciais dos receptores de D-manose propuseram sua avaliação concomitantemente ao estudo da reação acrossômica, tendo em vista a íntima relação entre sua manifestação durante a interação dos gametas e a consequente reação acrossômica, permitindo a fertilização propriamente dita.

Para realizar as análises de reação acrossômica em conjunto com o teste de D-manose, BENOFF et al. (1993a) propuseram um protocolo onde verificaram se a membrana acrossomal (situada no espermatozóide logo abaixo da membrana plasmática) apresentava-se intacta ou não. Quando a membrana acrossomal está intacta, as enzimas como a hialuronidase e a acrosina ainda não foram liberadas. Se esta membrana romper sem que o espermatozóide esteja ligado à zona pelúcida, essas enzimas serão liberadas e o espermatozóide não terá como reverter esta perda, não podendo mais participar do processo de fertilização (Figuras 8 e 9).

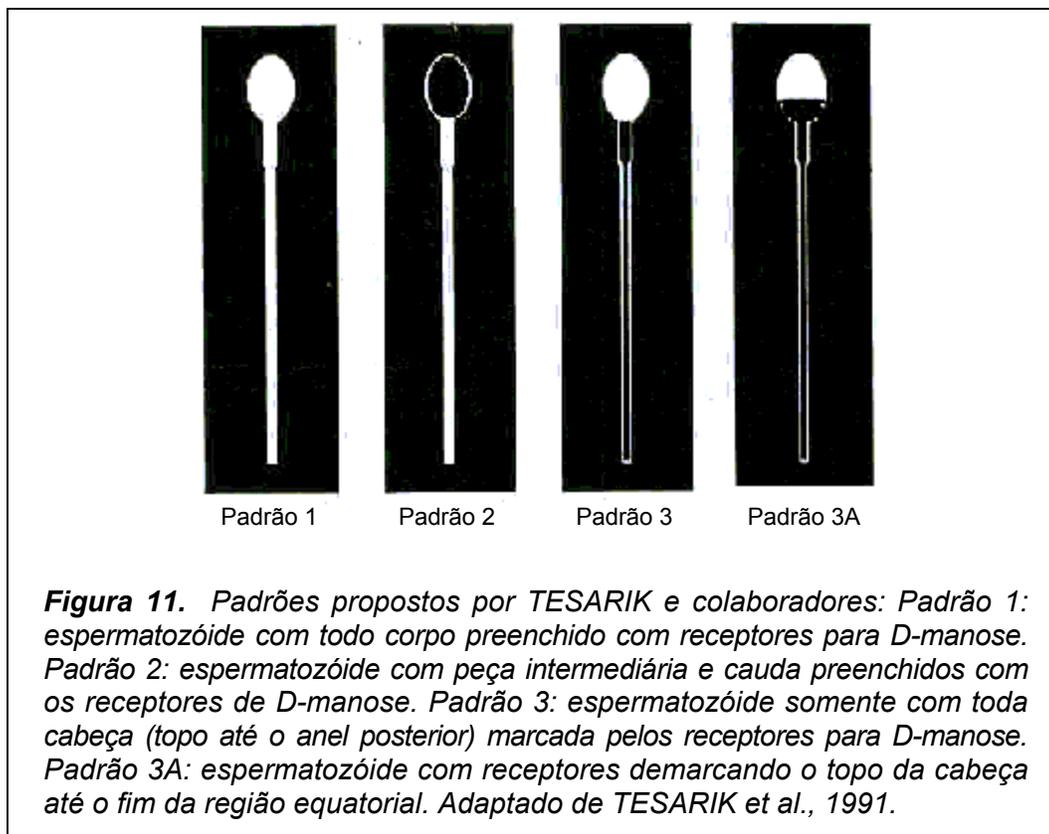


Para a realização dos dois testes no mesmo preparado, torna-se importante o uso de fluoresceínas (marcadores) de cores diferentes. A manose é comercializada ligada ao FITC (isothiocyanate) que, em microscópio equipado com filtros para epifluorescência, apresenta-se na cor verde-maçã. A integridade da membrana acrossomal é observada através de uma lectina *Pisum sativum* conjugada com uma fluoresceína RITC (Rhodamine), que é visualizada na cor vermelha (Figura 10).



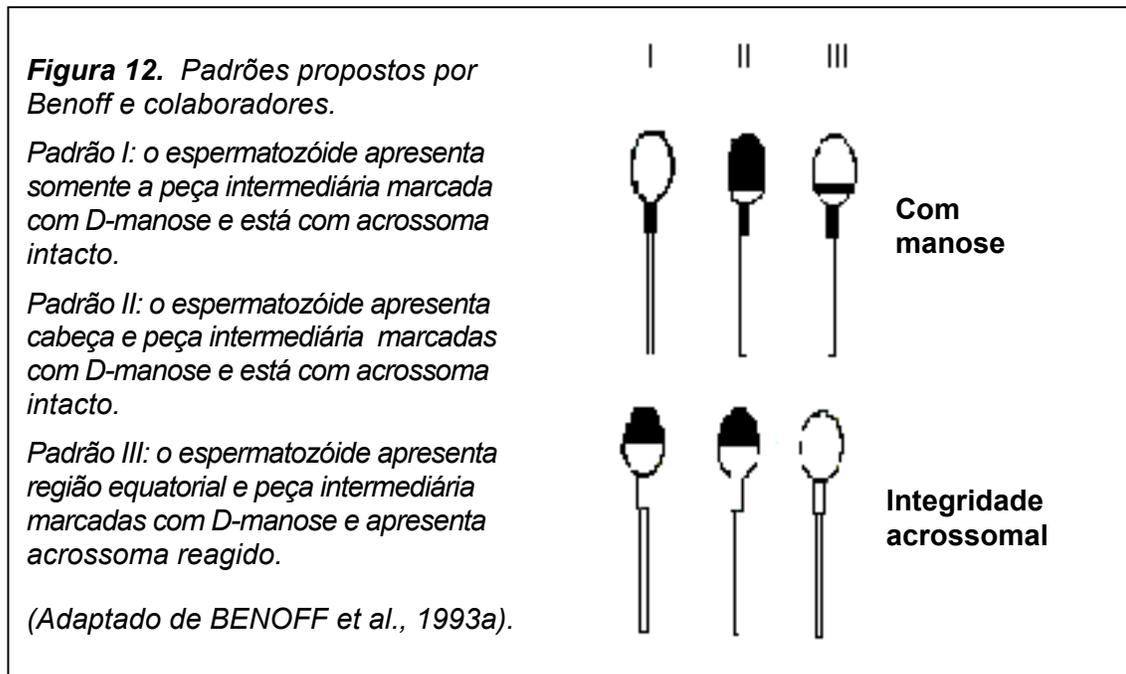
As lectinas são proteínas que foram obtidas primeiramente de vegetais (JUNQUEIRA e CARNEIRO,1995) e hoje sabe-se que elas podem ser encontradas na maioria dos seres vivos. São moléculas com ao menos dois sítios ativos que se ligam a hidratos de carbono específicos e podem causar aglutinação de células. Essas proteínas são muito utilizadas para analisar a composição química dos hidratos de carbono das glicoproteínas e glicolípídeos presentes na face externa da membrana plasmática (GUPTA SANDHU, 1997; JUNQUEIRA e CARNEIRO, 1997).

Após MORI et al., (1989) observarem a presença dos receptores para D-manose presentes nos espermatozóides, TESARIK et al.,1991 propuseram um protocolo e analisaram a expressão dos sítios receptores para D-manose comparando homens férteis com pacientes inférteis. Nesse trabalho, apresentaram quatro padrões de expressão de sítios receptores para D-manose (Figura 11).



Para observar a reação acrossômica, a amostra foi incubada durante quatro horas e utilizado o marcador TRICT – conjugado com imunoglobulina de coelho (SIGMA).

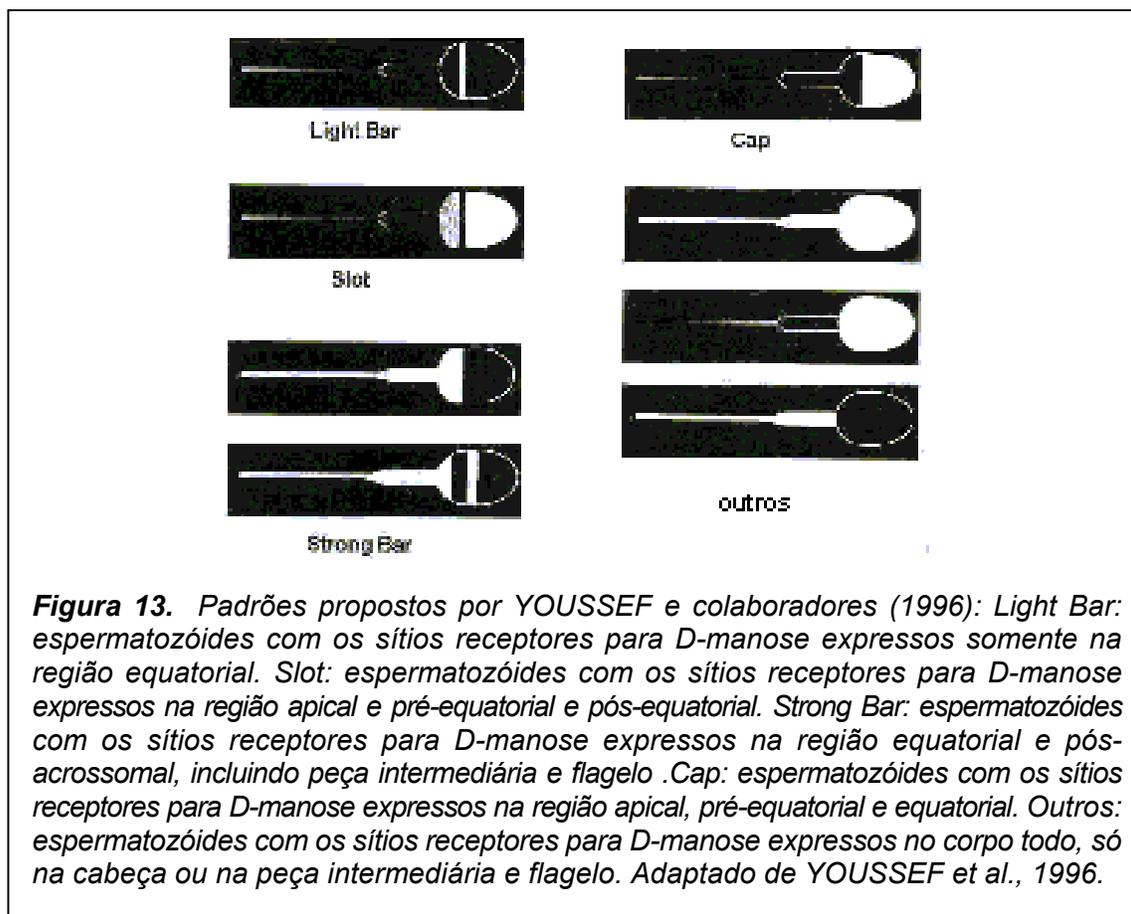
BENOFF et al., (1993a) propuseram um protocolo diferente de TESARIK et al., (1991), aumentando o tempo de incubação para 20 horas e utilizando um marcador diferente para a reação acrossômica, (RITC-PSA) e encontraram três padrões principais distintos de visualização. Este trabalho comparou homens férteis com pacientes que foram encaminhados para FIV (Figura 12).



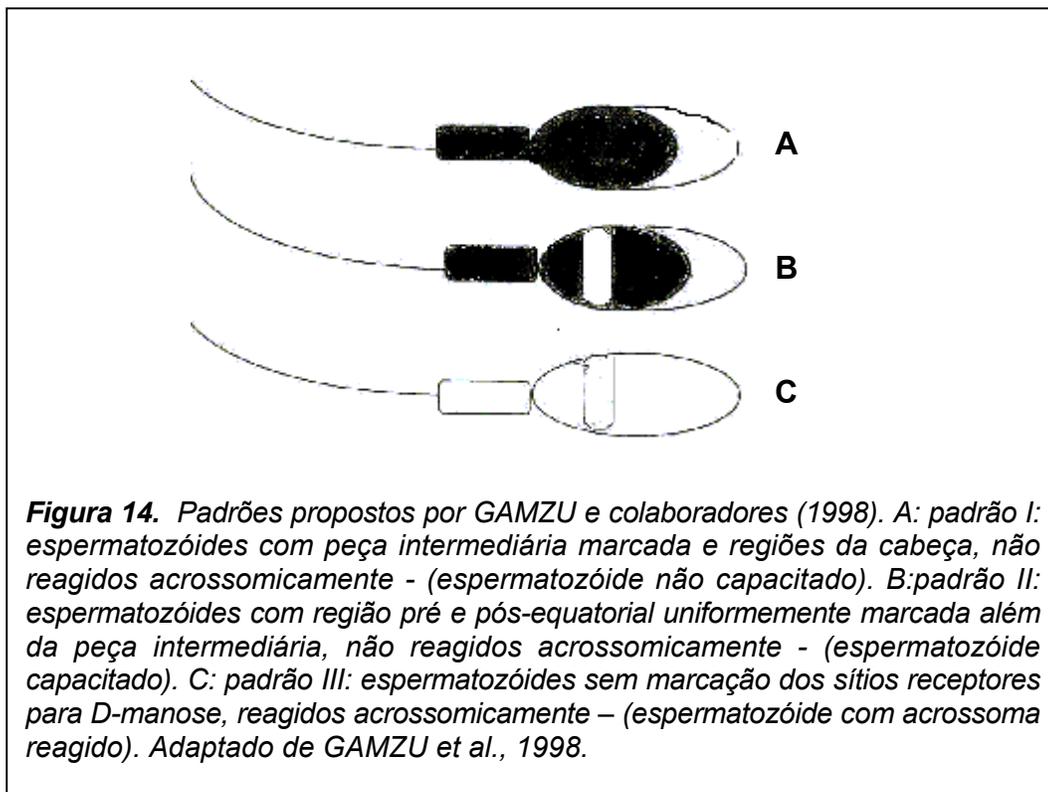
Embora TESARIK et al. (1991) tenham proposto outro reagente para o teste de reação acrossômica (TRICT), seu estudo e o de BENOFF et al., (1993a), foram capazes de determinar padrões principais de expressão de receptores para D-manose, em tempos diferentes: sêmen após liquefação e remoção do plasma seminal, após 1 hora de incubação em meio de cultura e após 20 horas de incubação em meio de cultura, em estufa de CO₂ (BENOFF et al., 1993a).

Correlacionou-se a incubação por 1 hora com o fenômeno da capacitação (processamento seminal) e por 20 horas com a reação acrossômica, pois quanto maior o tempo de incubação, maior a porcentagem de espermatozóides que sofrem a reação acrossômica (BENOFF et al., 1993a).

Em 1996, YOUSSEF et al., correlacionaram a expressão de ligação de D-manose com a morfologia do espermatozóide, utilizando os critérios estritos de KRUGER et al., 1986. Nesse trabalho foram comparados doadores férteis com pacientes com queixas de infertilidade. YOUSSEF et al. (1996), encontraram cinco padrões diferentes dos padrões publicados por TESARIK et al., (1991) e BENOFF et al. (1993a). Concluíram nesse estudo que a expressão alterada dos sítios de expressão para D-manose está relacionada com morfologia espermática anormal, prejudicando a fertilização (Figura 13).



Em 1998, GAMZU et al., realizaram um estudo com homens férteis e pacientes com queixas de infertilidade sobre a expressão de ligação da D-manose nos espermatozóides em associação com o potencial de ligação à zona pelúcida através do teste HZA. Nesse trabalho apresentaram três padrões diferentes (Figura14).



Nesse trabalho os autores afirmaram que consideraram a expressão dos receptores de D-manose meramente um marcador do estágio de maturação do espermatozóide. Cada momento de expressão dos receptores e dos locais, assim como as alterações que ocorreram na membrana plasmática, poderiam estar relacionados a cada etapa da maturação espermática.

Utilizando estes padrões, GAMZU et al., (2002) realizaram, seis anos após a publicação de YOUSSEF et al., (1996), o mesmo trabalho correlacionando a expressão de ligação de D-manose com a morfologia do espermatozóide, e não puderam estabelecer uma correlação entre os padrões propostos por YOUSSEF et al., (1996) e a morfologia.

Diante desta análise, observa-se que todos os trabalhos concordam quanto à importância dos receptores de D-manose nos espermatozóides, e são discordantes quanto aos padrões de expressão dos sítios receptores para D-manose e sua eventual expressão nos fenômenos que envolvem a fertilização, além de terem apresentado padrões de homens férteis ao mesmo tempo que comparavam com um grupo de pacientes inférteis.

O presente trabalho propõe-se a estabelecer padrões de expressão dos receptores de D-manose de espermatozóides somente de indivíduos considerados férteis. O estabelecimento de padrões determinados de normalidade permitirá a inclusão do teste de D-manose no laboratório de reprodução para comparação com pacientes portadores de infertilidade conjugal. Uma futura análise de espermatozóides de pacientes apresentando causas de infertilidade (por exemplo, varicocele, infecção de vias seminais, etc.) poderá revelar alteração dos padrões de expressão dos receptores de D-manose.

2. Objetivos

2.1. Objetivo geral

Avaliar a expressão dos sítios receptores de D-manose presentes na superfície de espermatozóides de homens férteis em diversos momentos de incubação.

2.2. Objetivos específicos

- Observar se o período de 20 horas de incubação é suficiente para induzir a reação acrossômica.
- Avaliar a porcentagem de espermatozóides com receptores para D-manose expressos com acrossoma intacto nos diferentes tempos de incubação.
- Determinar os principais padrões de expressão dos receptores de D-manose nos diferentes períodos de incubação (correlacionando-os com o fenômeno de capacitação e com a reação acrossômica).
- Estabelecer padrões normais de expressão dos receptores de D-manose em espermatozóides de homens férteis, em tempos de incubação diferentes, no Laboratório de Reprodução Humana (LRH) do Centro de Atenção Integral à Saúde da Mulher (CAISM) da Universidade Estadual de Campinas (Unicamp).

3. Sujeitos e Métodos

3.1. Tipo de estudo

Estudo descritivo de corte transversal.

3.2. Tamanho da amostra

Para o presente estudo foram convocados, voluntariamente, 48 homens candidatos à vasectomia no Ambulatório de Urologia do Hospital das Clínicas (HC) da Unicamp. O programa de vasectomia do Ambulatório de Urologia da Unicamp aceita apenas casais que se enquadram nos seguintes critérios: união matrimonial há pelo menos sete anos, presença de no mínimo dois filhos, o menor com mais de um ano de idade, idade do casal igual ou superior a 30 anos, ausência de distúrbios na esfera sexual, entrevista com assistente social e reunião de esclarecimento dos casais com o médico responsável. Todos os homens convocados foram submetidos a exame físico específico e apenas aqueles considerados normais foram aceitos para o estudo (ausência de varicocele, alterações epididimárias ou testiculares).

Desta forma, considerou-se, para o presente estudo, que os homens selecionados eram normais do ponto de vista de fertilidade. Ainda, dentre os homens convocados, apenas aqueles cujo espermograma apresentou resultados normais, de acordo com os critérios da Organização Mundial da Saúde (OMS, 2001) (Anexo 1) foram aceitos no presente estudo.

3.3. Critérios de exclusão

Foram excluídos os pacientes que apresentaram alguma alteração ao exame físico, como varicocele ou hipotrofia testicular. As amostras de sêmen que não se enquadraram dentro dos critérios de normalidade propostos pela Organização Mundial da Saúde (OMS, 2001), também foram excluídas. Dentre os 48 homens convocados, dois foram submetidos à cirurgia de vasectomia antes da coleta do sêmen, um paciente foi excluído por apresentar varicocele grau III à esquerda e 15 pacientes apresentaram espermograma inicial fora dos critérios de normalidade da OMS (2001). Uma vez aplicados todos estes critérios de seleção, 30 pacientes foram submetidos ao teste de D-manose, concordando com o estudo e assinando o Termo de Consentimento Livre e Informado.

3.4. Fases do estudo (Anexo 2)

3.4.1. Primeira Fase

Todas as amostras obtidas dos doadores foram incubadas por 60 minutos para liquefação em estufa de cultura a 37°C. Decorrido este tempo, foram

realizadas as análises macroscópicas e microscópicas seguindo os critérios da OMS, onde as amostras que não se apresentaram dentro dos critérios foram excluídas do estudo.

3.4.2. Segunda Fase

Todas as amostras que se apresentaram dentro dos critérios de normalidade da OMS (2001) foram centrifugadas duas vezes com PBS (*Dulbecco's phosphate-buffered saline*, Gibco BRL®, # 14190-136). Após a segunda centrifugação o botão formado foi ressuspenso em 1,0ml de PBS, sendo retirada a alíquota inicial de 192µl. O restante da amostra foi centrifugado mais uma vez e o botão formado foi ressuspenso em meio de cultura e incubado em estufa 5% de CO₂ para processamento seminal. Decorrido este tempo, foi retirada do sobrenadante a alíquota uma hora de 192µl. O restante do sobrenadante foi novamente incubado em estufa de 5% de CO₂ por um período de 20 horas. Após este período, a alíquota 20 horas de 192µl foi colhida.

3.4.3. Terceira Fase

As três alíquotas retiradas (zero hora, 1 hora e 20 horas) foram submetidas ao teste D-manose e a seguir ao teste de reação acrossômica (descritos a seguir). A leitura de ambos os testes (D-manose e reação acrossômica) foi realizada concomitantemente em microscópio equipado com epifluorescência. Como as técnicas da D-manose e da reação acrossômica foram realizadas na mesma

lâmina, foram utilizadas fluoresceínas diferentes para cada etapa: Man -FITC-BSA que apresentou uma coloração verde maçã e rhodamina (RITC – PSA) por apresentar a cor vermelha, evitando, assim, possíveis erros durante a leitura. Cada coloração necessita de um filtro de leitura específico para que ocorra a excitação das fluoresceínas para que as mesmas possam ser observadas. Em ambiente escuro foi necessário o uso do microscópio KS, marca Zeiss, equipado com epifluorescência para realizar a leitura.

3.5. Local do estudo e disponibilidade de materiais

Todas as coletas e análises do presente estudo foram realizadas no LRH - CAISM e no Laboratório de Anatomia Patológica do HC da Unicamp no período de maio de 2001 a dezembro de 2002. Os equipamentos citados a seguir, como também os materiais a serem utilizados neste estudo, pertencem aos referidos laboratórios conforme cada etapa realizada.

3.6. Descrição do Estudo

3.6.1. Primeira Fase

- Coleta das amostras de sêmen: A coleta das amostras de sêmen foi realizada após o paciente ter permanecido três dias sem ejacular, através de masturbação, em sala anexa ao LRH, utilizando recipiente plástico estéril para coleta do material. Após a coleta, os recipientes contendo as amostras foram imediatamente colocados em estufa de cultura a 37°C por 60 minutos, para que ocorresse a liquefação do sêmen.

- Análises das amostras de sêmen: Os exames macroscópicos e microscópicos foram realizados dentro dos critérios propostos pela OMS (2001).

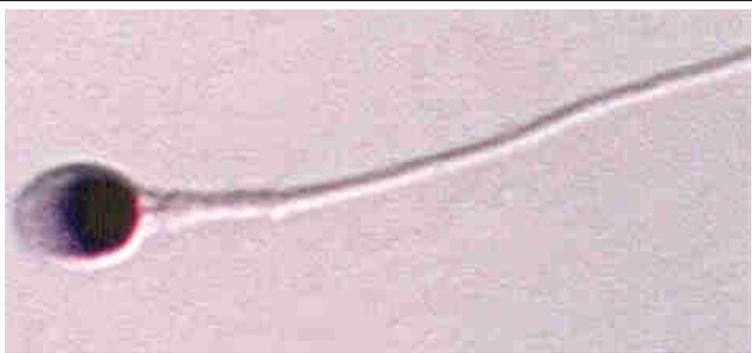
– **Exame Macroscópico**

- Aspecto: A análise foi realizada através da observação do sêmen contido no recipiente utilizado na coleta, sendo classificado em normal ou alterado quanto a cor, homogeneidade, viscosidade e liquefação.
- ❖ Viscosidade: A amostra foi aspirada em uma pipeta Pasteur estéril. Caso a saída do sêmen ocorresse em gotas individuais, o mesmo seria classificado em normal, e se foi observada a presença de filamento espermático maior que 2cm de extensão, considerou-se como viscosidade aumentada.
- ❖ Liquefação: A liquefação do sêmen foi classificada em completa (homogênea) quando não foi encontrada a presença de grumos após 60 minutos de incubação a 37°C.
- ❖ Cor: As amostras de sêmen normal apresentaram-se branco opalescentes e homogêneas. As amostras diferentes deste padrão (brancas ou amarelas e translúcidas) foram consideradas alteradas.
- Volume: O ejaculado foi aspirado e colocado em tubo estéril graduado, sendo considerado um volume normal entre 2ml e 5ml.
- pH: uma alíquota da amostra foi aplicada a uma fita sensível de pH onde a leitura foi realizada após 30 segundos, anotando-se o resultado através do padrão estabelecido pela fita de calibração colorimétrica de pH. O valor normal variou de 7,2 a 7,8.

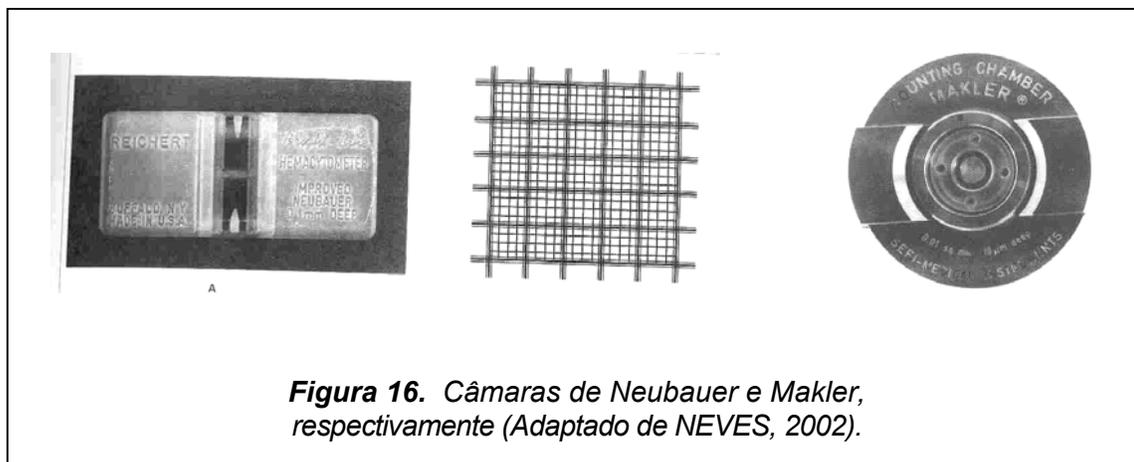
– Exame Microscópico

- **Motilidade:** foi realizada através da análise de uma alíquota de 50 μ l de sêmen colocada sobre uma lâmina de vidro para microscopia, aquecida a 37°C e coberta por uma lamínula de vidro. Em seguida, a lâmina foi observada ao microscópio óptico sob aumento de 400 vezes, onde foram classificados os tipos de deslocamentos realizados pelos espermatozóides em termos percentuais e em graus (A, B, C e D): grau A – movimento progressivo linear rápido; grau B – movimento linear lento; grau C – movimento não progressivo; grau D – ausência de movimento. Foram consideradas normais as porcentagens de graus de motilidade A+B iguais ou maiores que 50% dos espermatozóides.
- **Morfologia:** foram realizados esfregaços com uma gota de sêmen fresco em lâminas para microscopia. Após a secagem em temperatura ambiente foram coradas com a coloração de Papanicolau modificada (Anexo 3) para espermatozóide, e examinadas sob imersão. A avaliação foi feita através dos critérios estritos de KRUEGER et al., (1986), cujo valor de referência normal foi a presença de 14% ou mais de espermatozóides estritamente normais (Figura 15). Os critérios estritos de normalidade incluem: cabeça oval medindo entre 3mm e 5mm de extensão e entre 2mm e 3mm de largura, pescoço intacto, peça intermediária delgada, cauda única e não enrolada, e ausência de gotas citoplasmáticas.

Figura 15. Foto de um espermatozóide morfologicamente normal (Adaptado de VEECK, 1998).



- **Concentração Espermática:** realizada através da contagem em câmara de Neubauer preenchida com a amostra diluída em solução de formalina 1%, de acordo com a concentração preestabelecida (1:20 = 1,9ml de formalina somado a 100 μ l de sêmen, segundo MORTIMER et al., 1986) e observada ao microscópio óptico com aumento de 400X, e também através da câmara de MAKLER, com uma gota de sêmen fresco sob aumento 20X (Figura 16). Consideraram-se normais as amostras que inicialmente apresentavam valor igual ou maior que 20 milhões de espermatozóides por mililitro.



- **Teste da Peroxidase:** Segundo NAHOUM e CARDOZO, (1980), este teste é fundamentado na presença dos radicais peróxido no citoplasma dos leucócitos, que reagem com a água oxigenada resultando em uma coloração marrom dos mesmos. Para tanto, em um tubo de ensaio foram colocados 100 μ l de sêmen e adicionados mais 100 μ l de solução peroxidase. Esta mistura foi homogeneizada lentamente e interagiu por 12 minutos. Decorrido este tempo, uma alíquota de 50 μ l foi retirada e colocada sobre

lâmina de vidro e coberta por lamínula de vidro. A leitura foi realizada em microscópio óptico, sob aumento de 400 vezes. Considerou-se como normal a presença de menos de $1,0 \times 10^6$ leucócitos por mililitro ejaculado (Figura 17).

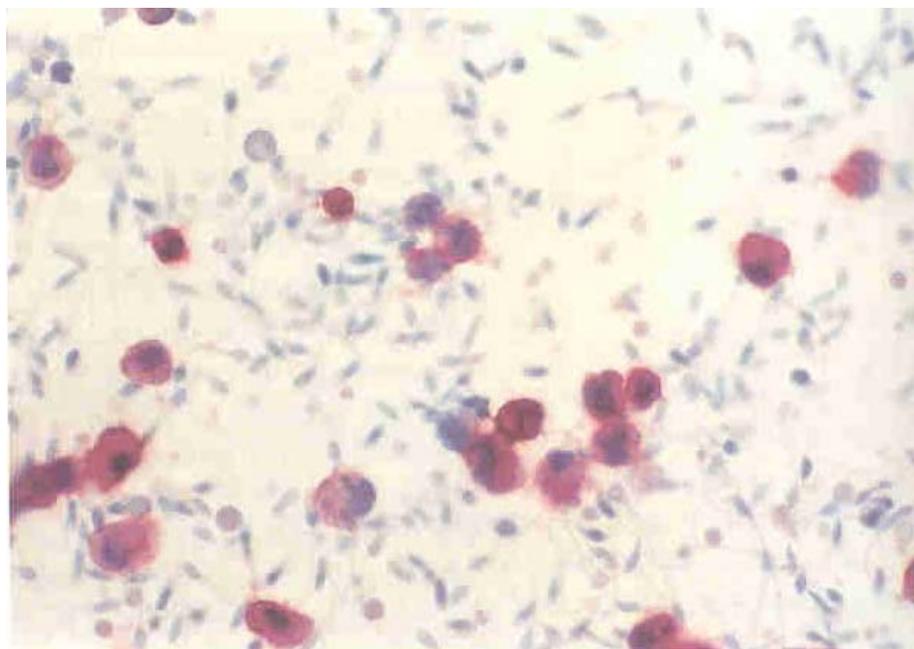
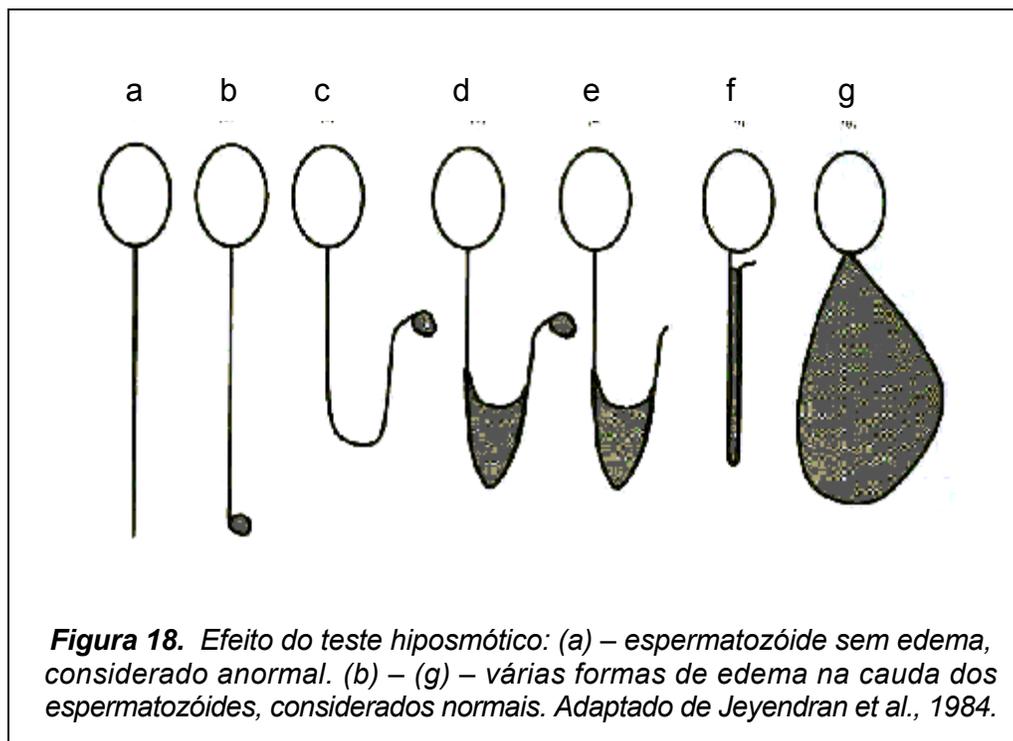


Figura 17. Foto apresentando radicais peróxidos nos leucócitos (em marrom), indicação de contaminação seminal. Adaptado da OMS, 1992.

- Vitalidade: Para avaliar a vitalidade dos espermatozóides colocou-se uma alíquota de 300 μ l de sêmen em um tubo de ensaio e em seguida adicionou-se eosina, um corante que tem a capacidade de penetrar células mortas que possuem suas membranas lesadas (ELIASSON, 1977). Esta mistura foi homogeneizada lentamente e aguardou-se três minutos para a seguir adicionar-se nigrosina, um corante que propicia fundo preto. Em seguida, realizou-se um esfregaço desta mistura em lâmina de vidro para microscopia. Após

apresentar-se seca em temperatura ambiente, a mesma foi avaliada sob microscópio óptico com aumento de 400 vezes. Considerou-se como normal a presença de pelo menos 75% de espermatozóides vivos (não corados).

- Teste hiposmótico: Uma alíquota de 100 μ l foi colocada em 1ml de solução hiposmótica (150mOsm de citrato de sódio e frutose), previamente alíquotado, durante 60 minutos a 37°C. Após esta incubação em estufa de cultura a 37° C, uma alíquota de 50 μ l foi colocada em uma lâmina de vidro e coberta por lamínula de vidro. A leitura foi realizada sob microscópio óptico, com contraste de fase e aumento de 400 vezes. Os espermatozóides que apresentaram inchaço devido ao influxo dessa solução para restabelecer o equilíbrio osmótico indicaram a funcionalidade da membrana. Considerou-se normal a presença de 60% ou mais de formas inchadas (Figura 18).



3.6.2. Segunda Fase

- Processamento espermático: Técnica de *Swim-up*: Após a amostra estar liquefeita, a mesma foi colocada em um tubo de ensaio estéril e misturada com meio de cultura Dulbecco's tampão fosfato salino (PBS), cujo pH é 7,4 e osmolaridade 280mOsm, na proporção de 3:1. Com uma pipeta Pasteur, essa mistura foi homogeneizada e centrifugada a 300 – 400g por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e o botão formado pelos espermatozóides no fundo do tubo de ensaio foi ressuscitado em 2,0ml a 5,0ml de PBS para nova lavagem e centrifugação. A seguir, o sobrenadante foi descartado, novamente ressuscitado em 1,0ml de PBS, homogeneizado, de onde se retirou a alíquota inicial para o teste D-manose. A amostra contendo 1,0ml de sêmen com PBS foi centrifugada por mais cinco minutos. Descartado o sobrenadante, foi adicionado cuidadosamente sobre o botão formado 1,0ml de meio de cultura contendo *Human Tubal Fluid* (HTF – Irvine Scientific ® # 90125), suplementado com 10% de *Synthetic Serum Substitute* (SSS – Irvine Scientific ® , # 99193). O tubo foi colocado em estufa de CO₂ a 5,0%, a 37°C e inclinado a 45° para que ocorresse a migração dos espermatozóides móveis do botão para o meio durante o período de 60 minutos (NEVES et al.,1990; NEVES, 1995).

- Incubação após 20 horas: retirada a alíquota após processamento espermático (1 hora), a amostra foi colocada novamente em estufa a 37°C com 5% de CO₂ durante 20 horas. Decorrido este tempo, uma alíquota de 192µl de sêmen era retirada para realizar o teste D-manose.

3.6.3. Terceira Fase

- **Teste da D-manose**

- Amostras: Inicial (zero hora), após processamento espermático (1 hora) e após período de incubação (20 horas).

Em ambiente escuro, cada amostra de 192µl de sêmen com PBS foi adicionada a um tubo Eppendörff previamente preparado contendo 8µl de solução-mãe (Anexo 4) de Man – FITC – BSA (Sigma - A7790), resultando em uma concentração final de corante de 100µg/ml. Este tubo foi incubado por 30 minutos a 37°C em estufa com 5% de CO₂, para que ocorresse a marcação dos sítios receptores de D-manose. Em seguida foi adicionado 1,0 ml de PBS e centrifugado entre 300g – 400g por 10 minutos. Este procedimento foi realizado duas vezes, desprezando-se o sobrenadante. Em seguida, o sedimento restante foi ressuspenso em 50µl de PBS, homogeneizado e foram efetuados dois esfregaços (lâmina para leitura + duplicata) que secaram em temperatura ambiente.

- **Teste da Reação Acrossômica**

Em ambiente escuro, depois que as lâminas anteriormente preparadas com o teste D-manose estavam secas, estas foram tratadas com metanol por

30 segundos para permeabilizar a membrana plasmática dos espermatozoides, permitindo a penetração do corante RITC-PSA para a visualização do *status* acrossomal. Em seguida, foram secas em temperatura ambiente. Decorrido este processo, foram coradas em câmara úmida por 30 minutos com 208µl de PBS que foi colocado em um tubo Eppendorff previamente preparado, contendo 8µl de solução-mãe (Anexo 5) de RITC-PSA (Vector Laboratories Inc ®, Burlingame, CA. RL-1052) resultando em uma concentração final do corante de 100µg/ml. Decorrido este período, as lâminas foram lavadas duas vezes com PBS, secas em temperatura ambiente e armazenadas em caixa de laminário a 5°C.

3.7. Visualização, análise e leitura

3.7.1. Receptores de D-manose

A visualização foi realizada em um microscópio KS, marca Nikon, equipado com epifluorescência sob filtro BP 490 faixa de excitação, lâmpada 500 (dichroic) e filtro de barreira LP 515. Foram contados 20 campos diferentes, sendo cinco espermatozoides por campo, totalizando a leitura de 100 espermatozoides em cada lâmina para cada momento (zero hora, 1 hora e 20 horas).

3.7.2. Reação Acrossômica

A reação acrossômica foi observada sob filtro BP 545 faixa de excitação, lâmpada 580 (dichroic) e filtro de barreira de LP 590 em microscópio equipado com epifluorescência, KS, marca Zeiss. Foram avaliados os mesmos 20 campos

do teste da D-manose, e os mesmos 5 espermatozóides por campo, totalizando 100 espermatozóides por lâmina para cada momento, observando-se a integridade do acrossoma.

3.7.3. Leitura

Inicialmente, para aumentar o índice de refração emitido pela fonte de luz do microscópio equipado com epifluorescência, utilizou-se em cada lâmina duas gotas de solução de glicerol entre lâmina e lamínula. Em seguida a lâmina foi selanizada com esmalte incolor. No microscópio, inicialmente focava-se um campo com cinco espermatozóides e avaliava-se a integridade do acrossoma, que poderia apresentar-se intacto ou reagido. Esta avaliação era feita utilizando um filtro BP 545 faixa de excitação, lâmpada 580 (dichroic) e filtro de barreira LP 590. Em seguida, mantinha-se focado o mesmo campo da leitura da reação acrossômica, mas mudava-se o rotor de filtro para BP490 faixa de excitação, lâmpada 500 (dichroic) e filtro de barreira LP 515, e avaliava-se nos mesmos cinco espermatozóides a ocorrência ou não da expressão dos sítios receptores de D-manose. Quando se observavam sítios receptores de D-manose avaliava-se em qual região ocorria essa expressão e os padrões eram anotados em uma tabela. Esse procedimento foi realizado para cada um dos 20 campos diferentes avaliados.

- Amostra inicial: foram avaliados 100 espermatozóides em cada lâmina para cada paciente (n =30). Portanto, a leitura total neste momento foi igual a 3.000 espermatozóides.

- Amostra após processamento espermático (1 hora de incubação): foram avaliados 100 espermatozóides em cada lâmina para cada paciente (n=30). Portanto, a leitura total neste momento foi igual a 3.000 espermatozóides.
- Amostra após incubação durante 20 horas: foram avaliados 100 espermatozóides em cada lâmina para cada paciente (n = 30). Portanto, a leitura total neste momento foi igual a 3.000 espermatozóides.

Em todos os três tempos foram avaliados espermatozóides que se apresentaram:

- Reagidos acrossomicamente e com expressão dos sítios receptores para D-manose;
- Não reagidos acrossomicamente e com expressão dos sítios receptores para D-manose;
- Reagidos acrossomicamente e sem expressão dos sítios receptores de D-manose;
- Não reagidos acrossomicamente e sem expressão dos sítios receptores de D-manose.

Os resultados foram analisados pelo teste não paramétrico de Wilcoxon para dados assimétricos (CONOVER, 1999). As amostras iniciais, após 1 hora de incubação e após 20 horas de incubação, foram comparadas entre si através da mediana com confiabilidade de 95% para avaliar o comportamento do

espermatozóide quanto à sua integridade acrossomal e quanto à expressão dos sítios receptores de D-manose.

3.8. Aspectos Éticos

Todos os pacientes voluntariamente convocados assinaram o Termo de Consentimento Informado que solicitava a coleta de uma única amostra de sêmen após um período de abstinência sexual de três dias. O trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Faculdade de Ciências Médicas (FCM) da Unicamp, afirmando que o projeto apresentado atendia todos os dispositivos das Resoluções 196/96 e 251/97, bem como ter aprovado o Termo do Consentimento Livre e Esclarecido (Anexo 6).

4. Resultados

TABELA 1

Análise segundo a reação acrossomal dos espermatozóides com ou sem receptores de D-manose (n = 30)

Variável		Momentos	Média	Desvio Padrão	Mínimo	Maximo
Espermatozóides acrossomicamente independentes da ligação de D-manose (%)	Reagidos	0h	49	15,34	18	77
		1h	48,9	18,02	16	91
		20h	64,27	16,33	32	97
	Não reagidos	0h	51	15,34	23	82
		1h	51,1	18,02	9	84
		20h	35,73	16,33	3	68
Espermatozóides - receptores de ligação de D-manose e acrossoma reagido	Com	0h	13,6	7,1	2	31
		1h	14,67	10,17	2	43
		20h	21,5	12,26	2	51
	Sem	0h	35,4	12,97	11	59
		1h	34,23	13,66	11	66
		20h	42,77	13,11	17	63
Espermatozóides – expressão de ligação de D-manose e acrossoma não reagido	Com	0h	4,43	2,97	0	12
		1h	6,53	6,17	0	31
		20h	6,57	5,34	0	21
	Sem	0h	46,57	15,95	13	79
		1h	44,57	19,85	6	82
		20h	29,17	16,21	0	63

4.1. Análise 1

Avaliação do comportamento espermático em relação a integridade acrossomal em homens férteis.

Amostra inicial: do total de 3.000 espermatozóides avaliados, 51% (n=1.530) dos espermatozóides apresentaram seus acrossomas íntegros.

Amostra após processamento espermático (1 hora de incubação): do total de 3.000 espermatozóides avaliados, 51,1% (n = 1.533) dos espermatozóides apresentaram seus acrossomas íntegros.

Amostra após 20 horas de incubação: do total de 3.000 espermatozóides avaliados, 35,7% (n = 1.072) dos espermatozóides apresentaram seus acrossomas íntegros.

Observou-se um aumento significativo ($p = 0,0018$) entre a porcentagem de espermatozóides reagidos após incubação por 20 horas (Tabela 2 e Gráfico 1).

TABELA 2

Comparações entre as amostras inicial, após processamento (1 hora) e após incubação (20 horas), em relação ao *status* acrossomal ($p < 0,05$)

Status Acrossomal	Amostra inicial (zero h)	Valor p*	Amostra após processamento (1 h)	Valor p*	Amostra após incubação (20 h)
Íntegro	49,5	0,8887	49,0	0,0018	38,0
Reagido	50,5	0,8887	51,0	0,0018	62,0

* Teste de Wilcoxon.

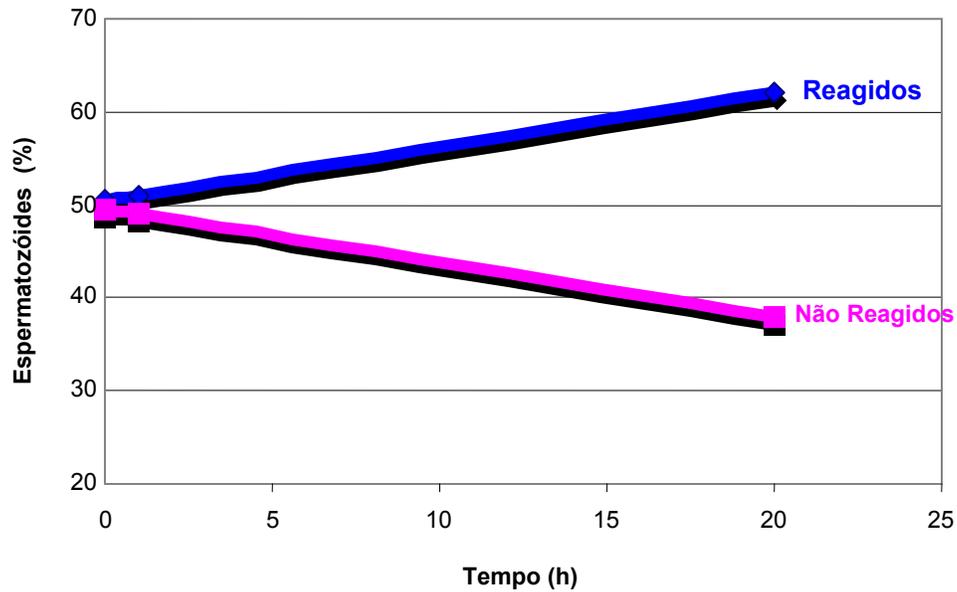


Gráfico 1. Análise da Integridade Acrossomal.

4.2. Análise 2

Avaliação do padrão de expressão dos sítios receptores de D-manose

Amostra Inicial: foram avaliados 3.000 espermatozoides, sendo que 541 (18%) expressaram receptores para D-manose. Dentre os espermatozoides analisados, 133 (4%) apresentaram receptores para D-manose e não apresentaram reação acrossomal (Tabela 3).

TABELA 3**Análise da leitura da amostra inicial (zero hora)**

Comportamento Espermático (D-manose e RA)	Zero Hora	
	n	%
Com manose e não reagido	133	4
Com manose e reagido	408	14
Sem manose e não reagido	1.397	47
Sem manose e reagido	1.062	35
Total	3.000	100

Amostra após processamento espermático (1 hora de incubação): foram avaliados 3.000 espermatozóides, sendo que 636 (21,5%) expressaram receptores para D-manose. Dentre os espermatozóides analisados, 196 (6,5%) apresentaram receptores para D-manose e não apresentaram reação acrossômica (Tabela 4).

TABELA 4**Análise da leitura da amostra após 1 hora de incubação**

Comportamento Espermático (D-manose e RA)	1 hora de incubação	
	n	%
Com manose e não reagido	196	6,5
Com manose e reagido	440	15,0
Sem manose e não reagido	1.337	44,5
Sem manose e reagido	1.027	34,0
Total	3.000	100

Amostra após 20 horas de incubação: foram avaliados 3.000 espermatozóides, sendo que 852 (28%) apresentaram receptores para D-manose. Dentre os espermatozóides analisados, 197 (6,5%) apresentaram receptores para D-manose e não apresentaram reação acrossômica (Tabela 5).

TABELA 5

Análise da leitura da amostra após 20 horas de incubação

Comportamento Espermático (D-manose e RA)	20 horas de incubação	
	n	%
Com manose e não reagido	197	6,5
Com manose e reagido	645	21,5
Sem manose e não reagido	875	29,0
Sem manose e reagido	1.283	43,0
Total	3.000	100

Ao se analisar estatisticamente o total de espermatozóides que expressaram ou não receptores para D-manose, observaram-se os seguintes resultados:

- Espermatozóides com receptores e não reagidos acrossomicamente: não houve diferença estatisticamente significativa em nenhum dos diferentes momentos analisados. As medianas a zero hora, incubação por 1 hora e incubação por 20 horas foram respectivamente de 4,0%, 5,5% e 5,0%.
- Espermatozóides com receptores e reagidos acrossomicamente: não houve diferença estatística entre as medianas a zero e 1 hora; porém observou-se incremento estatístico significativo entre as medianas a 1 hora (15%) e 20 horas (21,5%) de incubação ($p=0,0253$).

- Espermatozoides sem receptores não reagidos: observou-se diminuição significativa entre os momentos 1 hora (mediana 43,5%) e 20 horas (mediana 26%) ($p=0,003$).
- Espermatozoides sem receptores e reagidos acrossomicamente: observou-se incremento significativo entre os momentos 1 hora (mediana 33,0%) e 20 horas (mediana 42,5%) ($p= 0,0205$).

TABELA 6

Análise da leitura referente aos três momentos

Comportamento espermático (D-manose e R.A.)	0 hora		1 hora		20 horas		Total	
	n	%*	n	%*	n	%*	n	%*
Com manose não reagido	133	4	196	5,5	197	5	526	4,8
Com manose reagido	408	14	440	15	645	21,5	1.493	16,8
Sem manose não reagido	1.397	45,5	1.337	43,5	875	26	3.609	38,3
Sem manose reagido	1.062	33,5	1.027	33	1.283	42,5	3.372	36,3
Total	3.000	100	3.000	100	3.000	100	9.000	100

* Valores da Mediana dos percentuais de espermatozoides através do teste de Wilcoxon.

TABELA 7

Comparações entre as amostras inicial, após processamento (1h) e após incubação (20h), correlacionando a integridade acrossomal e a presença de sítios receptores de D-manose ($p<0,05$)

Padrões Encontrados	Amostra inicial (0 h)	Valor - p*	Amostra p/ processamento (1 h)	Valor - p*	Amostra p/ incubação (20 h)
Com manose e acrossoma reagido	14	0,9471	15	0,0253	21,5
Sem manose e acrossoma reagido	33,5	0,6803	33	0,0205	42,5
Com manose e acrossoma íntegro	4	0,2484	5,5	0,8593	5
Sem manose e acrossoma íntegro	45,5	0,7074	43,5	0,003	26,0

*Teste de Wilcoxon.

O Gráfico 2 apresenta a análise da expressão dos receptores de D-manose ao longo do tempo. Observa-se aumento progressivo da porcentagem de espermatozóides que apresentam a reação acrossômica, diminuição progressiva dos espermatozóides sem receptores de D-manose e que não apresentam a reação acrossômica, e manutenção da porcentagem de espermatozóides que apresentaram receptores de D-manose, mas que não sofreram a reação acrossômica durante o período de incubação.

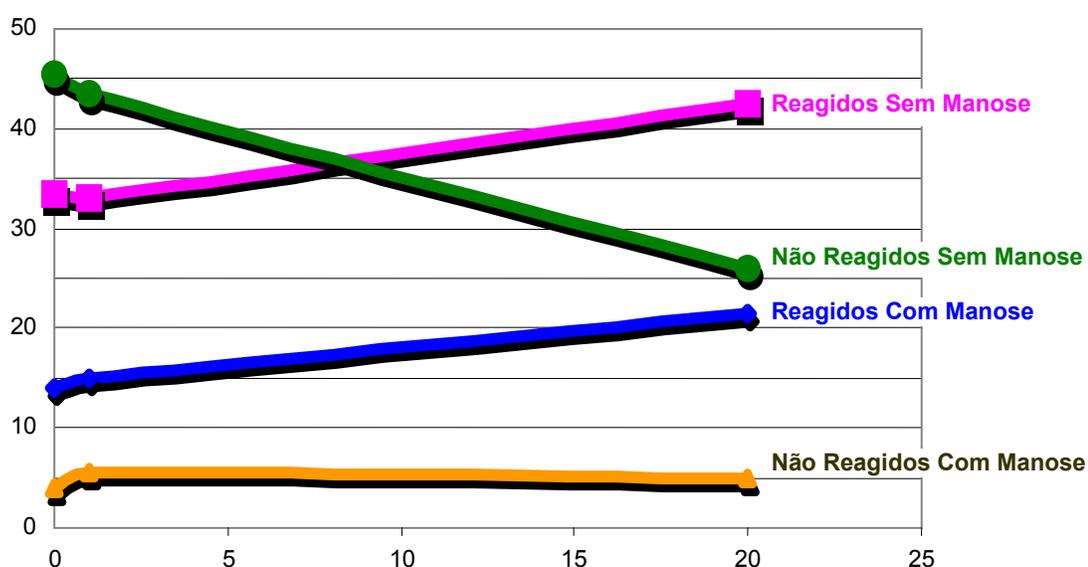


Gráfico 2. Análise da expressão dos sítios receptores de D-manose.

4.3. Análise 3

Avaliação dos padrões obtidos de expressão dos sítios receptores de D-manose em espermatozóides não reagidos.

Foram encontrados três principais tipos de marcação diferentes para cada momento (zero hora, após 1 hora e após 20 horas de incubação).

Amostra inicial: do total de 133 espermatozóides, 56 (42%) apresentaram somente expressão dos receptores de D-manose na região da peça intermediária, 26 (20%) contorno da cabeça, 19 (14%) na região equatorial e 32 (24%) apresentaram outros padrões (Figura 19).

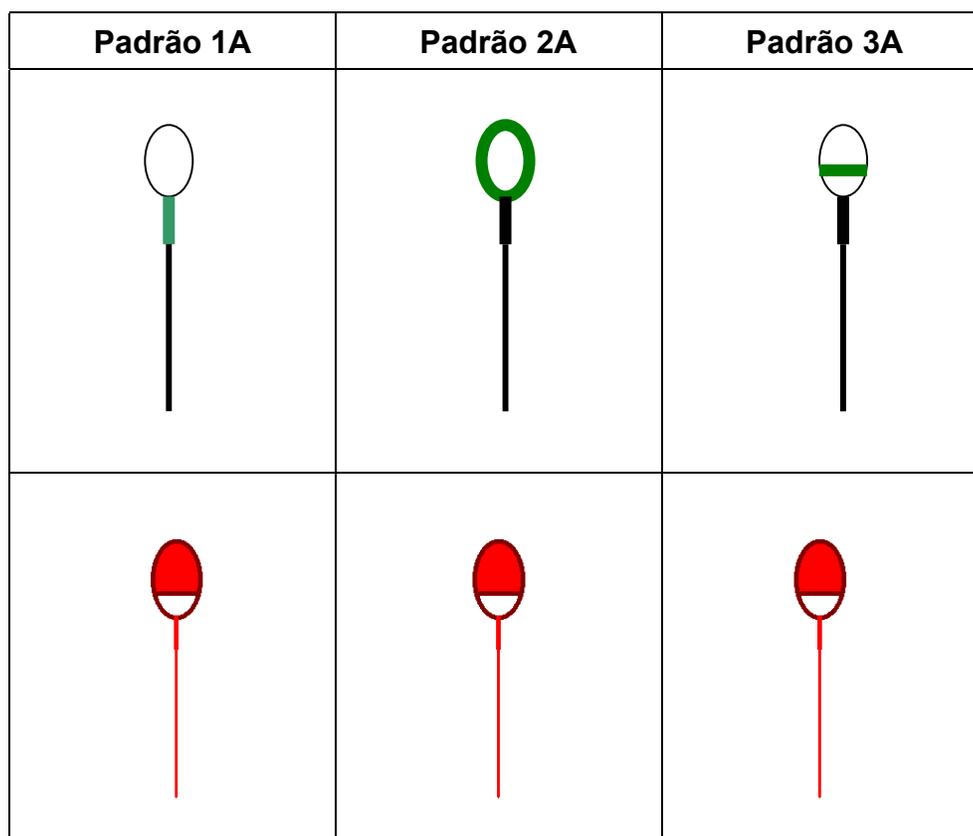


Figura 19. Marcação dos sítios receptores para D-manose e acrossoma íntegro (zero hora).

Amostra após processamento espermático (incubação por 1 hora): do total de 196 espermatozóides, 38 (19%) apresentaram expressão dos receptores de D-manose do contorno da cabeça, 33 (17%) cabeça toda preenchida, 28 (14%) somente a peça intermediária e 97 (50%) apresentaram outros padrões (Figura 20).

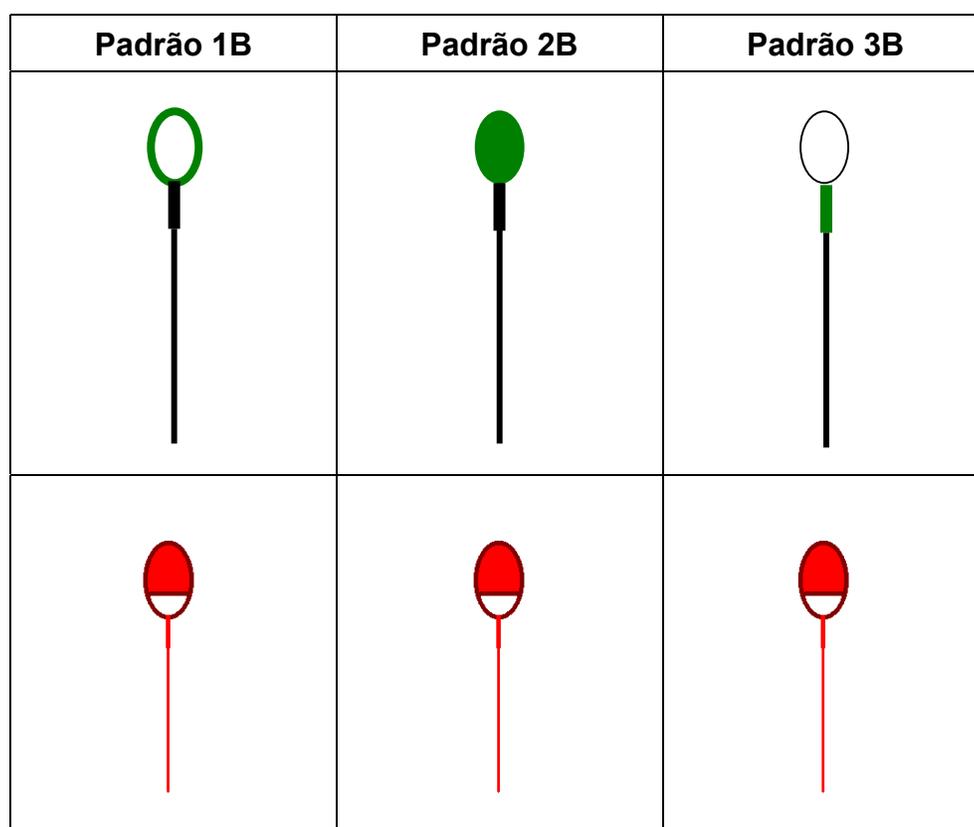


Figura 20. Marcação dos sítios receptores para D-manose e acrossoma íntegro (1 hora).

Amostra após 20 horas de incubação: do total de 197 espermatozóides, 64 (32,5%) apresentaram somente expressão dos receptores de D-manose no corpo todo, 48 (24%) na peça intermediária, 21(11%) na região equatorial e 64 (32,5%) apresentaram outros padrões.

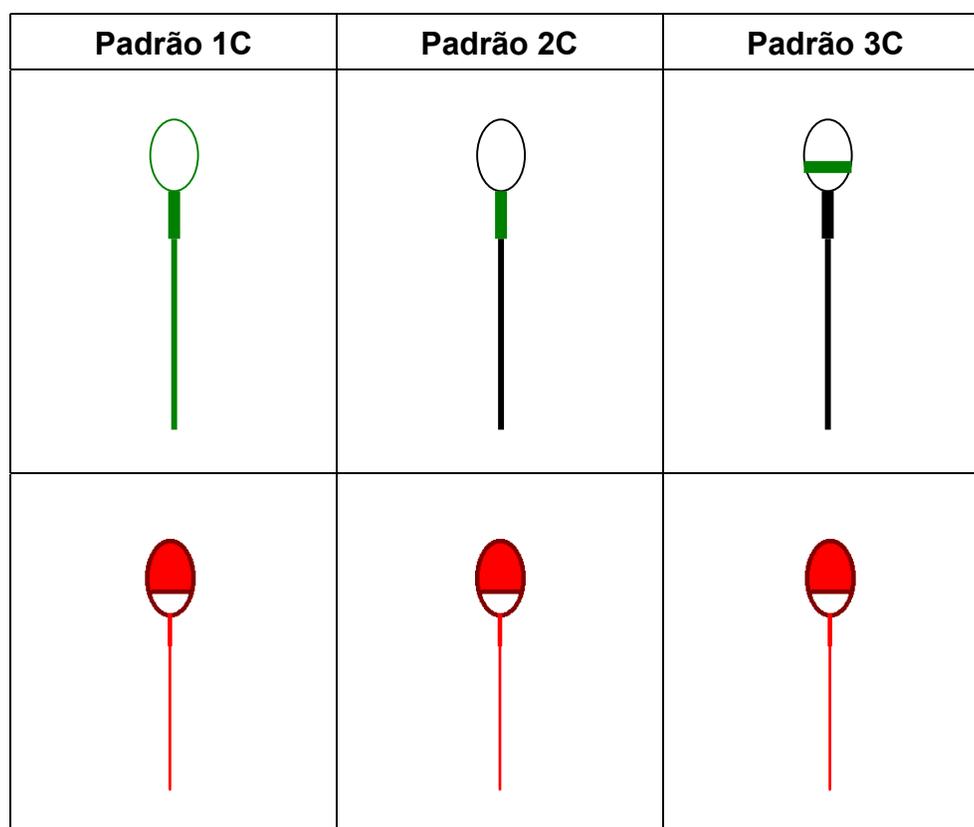


Figura 21. Marcação dos sítios receptores para D-manose e acrossoma íntegro (20 horas).

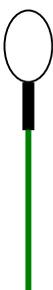
Contorno do corpo todo	Cabeça toda preenchida + peça intermediária	Região pré-equatorial
		
Região equatorial + peça intermediária	Região equatorial + peça intermediária + cauda	Região pós-equatorial
		
Região pós-equatorial + peça intermediária	Região pós-equatorial + peça intermediária + cauda	Peça intermediária + cauda
		
	Somente cauda	
		

Figura 22. Outros padrões de expressão de sítios receptores para D-manose encontrados durante os três momentos (zero hora, após uma hora de processamento espermático e após 20 horas de incubação).

5. Discussão

Os espermatozóides sofrem alterações que os tornam capazes de ligar-se ao óvulo e penetrá-lo. O primeiro evento é a capacitação, processo que tornará a membrana plasmática do espermatozóide permeável para a interação com o óvulo (MOORE e PERSAUD, 2000; SANTOS e NEVES, 2002). Essa interação ocorre através do influxo de colesterol que torna ativos os sítios receptores de glicoproteínas, encontradas na superfície do óvulo. Uma destas glicoproteínas é a D-manose (BENOFF et al., 1993b).

MORI et al., (1989) fizeram uma análise sobre a interação espermatozóide-óvulo, utilizando oligossacarídeos. Esse trabalho mostrou que espermatozóides pré-tratados com 50mmol/L D-manose não penetraram a zona pelúcida, o que não foi observado quando pré-trataram os espermatozóides com outros açúcares. Assim, estabeleceu-se a importância entre o receptor de D-manose e a zona pelúcida rica em D-manose.

Em 1991, TESARIK et al., apresentaram quatro padrões de expressão dos sítios receptores para D-manose, comparando homens férteis e inférteis.

As amostras foram avaliadas após duas centrifugações, após uma hora de processamento espermático e após quatro horas de incubação, que os autores consideraram suficientes para a capacitação e início da reação acrossômica. O presente trabalho difere do de TESARIK et al, 1991 por estudar somente homens férteis. Os padrões de expressão de receptores de D-manose propostos por TESARIK et al., 1991 são:

- Padrão 1: espermatozóide com todo o corpo preenchido com receptores para manose;
- Padrão 2: espermatozóide com peça intermediária e cauda preenchidos com os receptores de manose;
- Padrão 3: espermatozóide somente com toda a cabeça (topo até o anel posterior) marcada pelos receptores para manose;
- Padrão 3A: espermatozóide com receptores demarcando do topo da cabeça até o fim da região equatorial.

No presente trabalho observou-se a expressão de receptores de D-manose em 18% dos espermatozóides na amostra inicial, em 21,5% na amostra incubada por 1 hora e em 28% dos espermatozóides incubados por 20 horas. Ao se analisar especificamente os espermatozóides que expressaram receptores de D-manose, porém que se mantiveram com o acrossoma intacto, não houve diferença estatística nos três momentos (zero hora, 1 hora e 20 horas): medianas de 4,0, 5,5 e 5,0%, respectivamente. Ainda, observou-se um incremento significativo de espermatozóides que sofreram reação acrossômica entre os períodos de incubação de 1 hora e 20 horas. Desta forma, a reação acrossômica também é

acompanhada da maior expressão de receptores para D-manose, sendo que nenhum dos estudos propostos explicou o motivo da relação entre o aumento de ligação para D-manose e o fenômeno da reação acrossômica. Porém, se considerarmos que os espermatozóides que expressam D-manose e que não sofrem a reação acrossômica, fenômeno irreversível, são aqueles que realmente participarão da interação espermatozóide-óvulo, concluiu-se que o estudo independe do tempo de incubação e do conseqüente aumento da porcentagem de espermatozóides reagidos. Em relação ao padrão de expressão dos receptores de D-manose dos espermatozóides não reagidos acrossomicamente, observou-se os seguintes principais padrões, nos diferentes tempos de incubação:

- Amostra inicial
 - Padrão I: somente peça intermediária (42%)
 - Padrão II: marcação apenas do contorno da cabeça do espermatozóide (20%)
 - Padrão III: somente a região equatorial demarcada (14%)
- Amostra após incubação por 1 hora
 - Padrão I: somente contorno da cabeça (19%)
 - Padrão II: cabeça toda preenchida (17%)
 - Padrão III: somente peça intermediária (14%)
- Amostra após 20 horas de incubação
 - Padrão I: corpo todo preenchido (32,5%)
 - Padrão II: somente a peça intermediária (24%)
 - Padrão III: apenas a região equatorial (11,5%).

Ao se agrupar todos os espermatozoides que apresentaram receptores para D-manose, e que não apresentaram a reação acrossômica, e tendo em mente que não houve influência do tempo de incubação (reação acrossômica) sobre a porcentagem mediana deste tipo de espermatozoide nos diferentes tempos, pode-se inferir os seguintes principais padrões de expressão de receptores de D-manose para homens férteis:

- Padrão 1: marcação apenas da peça intermediária: n=132 – 25,1%
- Padrão 2: marcação do contorno da cabeça: n = 64 – 12,2%
- Padrão 3: todo o corpo marcado: n=64 – 12,2%
- Padrão 4: somente região equatorial: n=40 – 7,6%
- Padrão 5: cabeça toda marcada: n = 33 – 6,3%
- Outros: n = 193 – 36,6%



Nossos padrões não se assemelharam aos propostos por TESARIK et al. (1991).

BENOFF et al., (1993a) correlacionaram o teste da D-manose com o teste de reação acrossômica, em amostras de sêmen de homens férteis e candidatos ao programa de FIV, propondo três padrões. Esses padrões foram analisados em diferentes períodos de incubação (após uma hora de processamento espermático e após 20 horas de incubação). Esses eventos são importantes para que ocorra o processo de fecundação e esta habilidade foi observada naquele trabalho através da fertilização de óvulo *in vitro*.

Os padrões propostos por BENOFF et al., 1993a, foram:

- Padrão I: espermatozóides com os receptores de manose presentes somente na região da peça intermediária e não reagidos acrossomicamente;
- Padrão II: espermatozóides com receptores de manose na cabeça e na peça intermediária e não reagidos acrossomicamente;
- Padrão III: espermatozóides com os receptores de manose presentes na região equatorial e peça intermediária e reagidos acrossomicamente.

Nesse trabalho concluiu-se que os homens férteis apresentaram com maior frequência os padrões I e II.

O presente trabalho utilizou o protocolo proposto por BENOFF et al., (1993a), com algumas modificações: centrifugação durante 10 minutos do sêmen com PBS para retirar o plasma seminal; o processamento espermático foi

realizado somente pela técnica de *swim-up*, onde o botão era incubado com HTF suplementado com 10% de SSS. No teste da D-manose aumentou-se o tempo de incubação para 30 minutos, já que no projeto-piloto o tempo de incubação de 15 minutos proposto por BENOFF et al. (1993a) foi insuficiente para marcação dos sítios receptores de D-manose.

No mesmo ano, BENOFF et al., (1993b) estudaram a importância do efluxo de colesterol através da membrana plasmática no mecanismo de expressão dos receptores de D-manose. Para isto, compararam amostras de homens candidatos ao programa de FIV cujas parceiras não obtiveram a gravidez (FIV negativo) com amostras de homens candidatos ao programa de FIV cujas parceiras obtiveram a gravidez (FIV positivo). Concluíram que os homens do grupo FIV positivo apresentaram poucos espermatozóides reagidos acrossomicamente e com pouca perda do conteúdo de colesterol, além de encontrarem com maior frequência o padrão II para o teste de D-manose.

Em 1996, YOUSSEF et al., compararam amostras de sêmen de doadores férteis com amostras de pacientes com queixas de infertilidade, correlacionando a expressão de ligação de D-manose com a morfologia do espermatozóide utilizando os critérios estritos de Kruger. No presente trabalho, embora tenhamos utilizado o critério estrito de Kruger para avaliar a morfologia, não fizemos nenhum tipo de correlação entre este e o teste da D-manose, pois analisamos apenas amostras de homens férteis, ou seja, com critério estrito

de Kruger maior ou igual a 14%. O interessante do trabalho de YOUSSEF et al., 1996 é que apresentaram cinco padrões diferentes dos propostos anteriormente:

- *Light Bar*: espermatozóides com os sítios receptores para D-manose expressos somente na região equatorial;
- *Slot*: espermatozóides com os sítios receptores para D-manose expressos na região apical e pré-equatorial e pós-equatorial;
- *Strong Bar*: espermatozóides com os sítios receptores para D-manose expressos na região equatorial e pós acrossomal, incluindo peça intermediária e flagelo.
- *Cap*: espermatozóides com os sítios receptores para D-manose expressos na região apical, pré-equatorial e equatorial;
- Outros: espermatozóides com os sítios receptores para D-manose expressos no corpo todo, só na cabeça ou na peça intermediária e flagelo.

Concluíram no trabalho que a alteração da expressão dos sítios de receptores de D-manose coincide com a morfologia anormal do espermatozóide.

Em 1998, GAMZU et al., avaliaram a expressão dos sítios receptores de D-manose e a capacidade de interação (óvulo e espermatozóide) através do teste HZA, após períodos de incubação com lectinas lipossômicas. Compararam homens férteis com um grupo infértil. Nesse trabalho propuseram três padrões de expressão de receptores de D-manose:

- Padrão I: espermatozóides com peça intermediária marcada e regiões da cabeça, não reagidos acrossomicamente - (espermatozóide não capacitado);

- Padrão II: espermatozóides com região pré e pós-equatorial uniformemente marcada além da peça intermediária, não reagidos acrossomicamente (espermatozóide capacitado);
- Padrão III: espermatozóides sem marcação dos sítios receptores para D-manose, reagidos acrossomicamente (espermatozóide com acrossoma reagido).

Concluíram que as amostras de homens férteis apresentaram com maior frequência o padrão II.

Nenhum dos padrões propostos por GAMZU et al., em 1998 foi encontrado com maior frequência no presente estudo, em nenhum dos períodos analisados.

Em 2002, GAMZU et al., realizaram o mesmo trabalho de YOUSSEF et al., (1996) correlacionando a expressão de ligação de D-manose com a morfologia do espermatozóide. No referido estudo discordaram dos cinco padrões propostos por YOUSSEF, já que encontraram os mesmos três padrões principais do estudo de 1998, por sua vez diferentes dos de TESARIK et al., (1991) e BENOFF et al., (1993a).

O presente trabalho retomou o estudo dos receptores de D-manose, atendo-se ao estudo apenas de homens sabidamente férteis e com espermograma normal. Desta maneira, pôde-se observar que a expressão de receptores de D-manose em espermatozóides que não sofrem a reação acrossômica independe do tempo de incubação, sendo estabelecidos cinco principais padrões de expressão, distribuídos nos três períodos analisados. De acordo com os resultados

observados, a incubação por 20 horas é suficiente para induzir a reação acrossômica, mas parece não alterar a porcentagem de espermatozoides intactos e que expressam receptores para D-manose. Sendo estes os espermatozoides responsáveis pelo fenômeno de interação óvulo-espermatozoide, o estudo comparativo da expressão destes receptores em homens normais e inférteis poderá estabelecer como causa de infertilidade a ausência ou o prejuízo da capacidade de expressão dos receptores de D-manose.

Uma vez implantado o método no LRH e conhecidos os resultados em homens normais e férteis, é possível o estudo comparativo destes receptores em homens com infertilidade (por exemplo com varicocele, infecção, atrofia testicular, etc) sendo que o encontro de alterações da expressão e dos padrões de expressão destes receptores poderá explicar o mecanismo pelo qual alguma patologia associada pode levar à infertilidade masculina. Casais com falha em ciclos de FIV convencional poderão revelar alteração dos padrões de expressão dos receptores de D-manose, justificando a indicação de ICSI. A inclusão do teste de D-manose, padronizado e com resultados estabelecidos para homens férteis e normais, na rotina laboratorial do Laboratório de Reprodução Humana do CAISM-Unicamp, poderá se tornar uma atitude valiosa para o estudo da infertilidade masculina.

6. Conclusões

No presente estudo, concluiu-se que:

- O tempo de 20 horas de incubação foi suficiente para induzir um aumento estatisticamente significativo da reação acrossômica;
- Não se observou diferença significativa na expressão de receptores de D-manose em espermatozoides não reagidos acrossomicamente, em relação aos diferentes períodos de incubação;
- Os principais padrões de expressão dos receptores de D-manose em espermatozoides não reagidos acrossomicamente em homens férteis foram:
 - Padrão 1: marcação apenas da peça intermediária: n=132 (25,1%)
 - Padrão 2: marcação do contorno da cabeça: n = 64 (12,2%)
 - Padrão 3: todo o corpo marcado: n=64 (12,2%)
 - Padrão 4: somente região equatorial: n=40 (7,6%)
 - Padrão 5: cabeça toda marcada: n = 33 (6,3%)
 - Outros: n = 193 (36,6%)
- Uma vez estabelecido o comportamento dos receptores de D-manose em homens férteis, estudos comparativos com homens inférteis poderão ser propostos, na tentativa de se estabelecer novos mecanismos fisiopatológicos da infertilidade masculina.

7. Referências Bibliográficas

ARANHA, F.L. Bioquímica dos carboidratos (Glucides). In: ARANHA, F.L.

Bioquímica didática. Campinas: Copola Livros Ltda; 1998. p.81.

AUSTIN, C.R. The "capacitation" of the mammalian sperm. *Nature*, 170:326-31, 1952.

AUSTIN C.R. Fertilization. In: AUSTIN, C.R., SHORT, R.V. (eds.). **Reproduction in mammals. Book1. - Germ cells and fertilization**. London: Cambridge University Press; 1972. p.103-13.

BAHAMONDES, L., FAZANO, F.A.T.; LUCIO, M.A., NEVES, P.A., LUIZ, F.B., LORENZETTI, G.B. Evaluation of human sperm membrane integrity using the water test and the hiposmotic test. *Andrologia*, 33:75-7, 2001.

BAHAMONDES, L., MAKUCH, M.Y. Aspectos epidemiológicos da infertilidade conjugal. In: NEVES, P. e RODRIGUES NETTO JR., N. (eds.) **Infertilidade masculina**. São Paulo: Atheneu; 2002. p.29-32.

BEDFORD, J.M. Capacitation and the acrosome reaction in human spermatozoa. In: LIPSHULTZ, L.I., HOWARDS, S.S. (eds.). **Infertility in the male**. St. Louis: Mosby Year Book; 1997. p.123-37.

BENOFF, S.; COOPER, G.W.; HURLEY, I.; NAPOLITANO, B.; ROSENFELD, D.L.; SCHOLL, G.M. et al. Human sperm fertilizing potential in vitro is correlated with differential expression of a head-specific mannose – ligand receptor. **Fertil Steril.**, 59:854-62, 1993a.

BENOFF, S.; HURLEY, I.; COOPER, G.W.; MANDEL, F.S.; HERSHLAG, A.; SCHOLL, G.M. et al. Fertilization potential in vitro is correlated with head-specific mannose-ligand receptor expression, acrosome status and membrane cholesterol content. **Hum Reprod**, 8:2155-66, 1993b.

BENOFF, S.; BARCIA, M.; HURLEY, I.R.; COOPER, G.W.; MANDEL, F.S.; HEYNER, S. et al. Classification of male factor infertility relevant to in-vitro fertilization insemination strategies using mannose ligands, acrosome status and anti-cytoskeletal antibodies. **Hum Reprod**, 11:1905-18, 1996.

BERCEGEAY, S.; JEAN, M.; LUCAS, H. Composition of human zona pellucida as revealed by SDS-PAGE after silver staining. **Mol Reprod Dev**, 41:355-9, 1995.

BURKMAN, L.J.; CODDINGTON, C.C.; FRANKEN, D.R. The hemizona assay (HZA). Development of a diagnostic test for the binding of human spermatozoa to the human hemizona pellucida to predict fertilization potential. **Fertil Steril**, 49:688-97, 1988.

CARLSON, B.M. **Human embryology and developmental biology**. St. Louis: Mosby, 1994.

CHAN, S. Y.W.; WANG, C.; CHAN, S.T.H. Differential evaluation of human sperm hypo-osmotic swelling test and its relationship with the outcome of *in-vitro* fertilization of human oocytes. **Hum Reprod**, 5:84-8, 1990.

CHEN, C.M.; SATHANANTHAN, A.H. Early penetration of human sperm through the vestments of human egg in vitro. **Arch Androl**, 16:183-97, 1996.

CONOVER, W.J. Practical nonparametric statistics. New York: Wiley, 1999.

DE JORGE, C.J.; RAWLINS, R.G.; ZANEVELD, C. Induction of the human sperm acrosome reaction by human oocytes. *Fertil Steril*, 949-52, 1988.

DONADIO, N.; DONADIO, N.F. Reprodução humana laboratorialmente assistida. In: DONADIO, N.; LOPES, J.R.C.; MELO, N.R. **Reprodução humana II (infertilidade, anticoncepção e reprodução assistida)**. São Paulo: Organon, 1997. p.137-75.

ELIASSON, R. Supravital staining of human spermatozoa. *Fertil Steril*, 28:1257, 1977.

ESTEVES, S.C.; SHARMA, R.K.; THOMAS, A.J.; AGARWAL, A. Suitability of the hypo-osmotic swelling test for assessing the viability of cryopreserved sperm. *Fertil Steril*, 66:798-802, 1996.

ESTEVES, S.C. **Criopreservação de espermatozóides humanos selecionados pela técnica de swim-up: efeitos sobre a vitalidade, motilidade e integridade acrossômica após o descongelamento**. Campinas, 1998. [Dissertação – Mestrado - Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas].

ESTEVES, S.C. Infertilidade masculina: propedêutica e diagnóstico In: RODRIGUES NETTO JR, N. **Urologia prática**. São Paulo: Atheneu; 1999. p.305-17.

JR., N. **Infertilidade Masculina**. São Paulo: Atheneu; 2002. p.59-70.

FAZANO, F.A.T.; LUCIO, M.A.; LUIZ, F.B.; NEVES, P.A.; BAHAMONDES, L.G. Correlation between hypo-osmotic swelling teste and water – test to asses human sperm membrane integrity”. *Andrologia*, 25:351-3, 1993.

FLESCHE, F.M.; GADELLA, M.B. Dynamics of the mammalian sperm plasma membrane in the process of fertilization. *Bioch Biophys Acta*, 1469:197-235, 2002.

FRANKEN, D.R., KRUGER, T.F., OEHNINGER, S.C. The ability of the hemizona assay to predict human fertilization in different and consecutive in vitro fertilization cycles. **Human Reprod**, 8:1240-4, 1993.

GAMZU, R.; YOGEV, L.; KLEIMAN, S.; BOTCHAN, A.; HAUSER, R., LESSING, J.B. et al. Expression of mannose-ligand receptors on human spermatozoa: effect of lecithin and association with sperm binding to the zona pellucida. **Fertil Steril**, 70:766-70, 1998.

GAMZU, R.; YOGEV, L.; AMNON, B.; KLEIMAN, S.; HAUSER, R. The expression of mannose-ligand receptor is correlated with sperm morphology. **Arch Androl**, 48:475-80, 2002.

GLAZIER, D.B.; MARMAR, J.L.; DIAMOND, S.M.; GIBBS, M.; CORSON, S.L. A modified acrosome induction test. **Arch Androl**, 44:59-64, 2000.

GUPTA, A.; SANDHU, R.S. In vivo binding of mannose specific lectin from garlic to intestinal epithelium. **Nutrition Res**, 17:703-11, 1997.

HERSHLAG, A.; SCHOLL, G.M.; JACOB, A., MANDEL, F.S., GUHRING, P., PAINE, T. et al. Mannose ligand receptor assay as a test to predict fertilization in vitro: a prospective study. **Fertil Steril**, 70:482-91, 1998.

JEYENDRAN, R.S.; VAN DER VEN, H.H.; PEREZ-PELAEZ, M.; CRABO, B.G.; ZANEVELD, L.J. Development of an assay to assess the functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to other semen characteristics". **J Rep Fertil**, 70:219-28, 1984.

JEYENDRAN, R.S.; ZANEVELD, L.J.D. Human sperm hyposmotic swelling test. Letters – to-editor. **Fertil Steril**, 46:151, 1986.

JUNQUEIRA,L.C.; CARNEIRO, J. A histologia e seus métodos de estudo. In: JUNQUEIRA, L.N.; CARNEIRO, J. **Histologia Básica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1995. p.1-18.

JUNQUEIRA,L.C.; CARNEIRO, J. Membrana plasmática. Digestão Intracelular. In: JUNQUEIRA,L.C.; CARNEIRO,J. **Biologia celular e molecular**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1997, p.77-103.

KRUGER, T.F.; MENKEVELD, R.; STANDER,F.S.H., VAN DER MERVE,J.P., VANZYL, J.A.. Sperm morphologic features as a prognostic factor in *in vitro* fertilization. **Fertil Steril.**, 46:1118-23, 1986.

KRUGER, T.F., COETZEE, K. Predicting treatment success for male infertility. In: KEMPERS, R.D., COHEN J., et al. (eds.). **Fertility and reproductive medicine**. Amsterdam: Elsevier: 1998, p.465-74.

MARMAR, J.L.; CORSON, S.L.; BATZER, F.R. Insemination data on men with varicoceles. **Fertil Steril**, 57:1084-90, 1992.

MENKVELD, R.; KRUEGER, T. **Atlas of human morphology** Baltimore: Williams and Wilkins; 1991.

MONESI, V. Spermatogenesis and the spermatozoa. In: AUSTIN,C.R. Short RV (ed.) **Reproduction in mammals. Book1. Germ cells and fertilization**. London: Cambridge University Press; 1972. p.46-62.

MOORE, K.L.; PERSAUD, T.V.N. **Embriologia clínica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2000. p.15-43.

MORI, K.; DAITOH, T.; IRAHARA, M.; KAMADA,M.; AONO, T. Significance of D-manose as a sperm receptor site on the zona pellucida in human fertilization. **Am J Obstet Gynecol**,161:207-11, 1989.

MOSS, J.; FAUNDES, D.; KOPF, G.S.; SCHULTZ, R. M. Composition of the human zona pellucida and modifications following fertilization. **Human Reprod**, 10:2467-71, 1995.

NAGAO, R.R.; PLYMATE, S.R.; BERGER, R.E. Comparison of gonadal function between fertile and infertile men with varicoceles. **Fertil Steril**, 46:930-3, 1986.

NAHOUM, C.R.D.; CARDOZO, D. Staining for volumetric count of leucocytes in semen and prostate-vesicular fluid. **Fertil Steril**, 34:68-9, 1980.

NEVES, P.A.; LUIZ, F.A.B.; FAZANO, F.A.T.; LUCIO, M.A., BURMEISTEIR, M.L.M.B. Relação entre os parâmetros do espermograma e a recuperação de espermatozóides pela técnica de “swim-up”. **J Bras Urol**, 16:33-6, 1990.

NEVES, P.A. **Impacto das técnicas de reprodução assistida no tratamento da infertilidade masculina**. Campinas, 1995. [Tese Doutorado – Faculdade de Ciências Médicas – Universidade Estadual de Campinas].

NEVES, P.A.; SAMPAIO, F.J.B.; VANNUCHI, E.H. Espermograma (análise seminal). In: GLINA, S.; DAMIÃO, S. (Coord.). **I Consenso Brasileiro de Infertilidade Masculina**. Campos de Jordão. São Paulo: BG Editora e Produções Culturais; 1999.

NEVES, P.A. Micromanipulação de gametas. In: NEVES, P.; RODRIGUES NETTO JR., N. (eds). **Infertilidade masculina**. São Paulo: Atheneu; 2002. p.211-7.

OEHNINGER, S.; SAYED, E.; KOLM, P. Role of sperm morphology tests in subfertility treatment strategies. In: OMBELET, W.; BOSMANS, E. VANDEPUT, H. et al. (eds.). **Modern ART in the 2000s**. New York: Parthenon Publishing; 1998. p.25-36.

ORGANIZACION MUNDIAL DE LA SALUD. Manual de Laboratorio de La OMS para el examen del semen humano y de la interacción entre el semen y el moco cervical 4ª ed. Madrid: Editorial Médica Panamericana; 2001.

PATRAT, C.; SERRES, C.; JOUANNET, P. The acrosome reaction in human spermatozoa. **Biol Cell**, 92:255-66, 2000.

PERIN, P.M.; MALUF, M. Fertilização in vitro e transferência de embriões e transferência intratubária de gametas/embriões. In: NEVES,P.; RODRIGUES NETTO JR., N.(eds). **Infertilidade masculina**. São Paulo: Atheneu; 2002. p.187-209.

ROGERS, B.J.; BENTWOOD,B.J. Capacitation acrosome reaction and fertilization. In: ZANEVELD, L.D.J., CHATTERTON, R.T., (eds.).**Biochemistry of mamalian reproduction**. New York: John Wiley & Sons; 1982. p.230-17.

ROGERS, B.J.; MYGATT, G.G.; SODERDAHL, D.W.; HALE,R.W. Monitoring of suspected infertile men with varicocele by the sperm penetration assay. **Fertil Steril**, 44:800-5, 1985.

SANTOS, J.R.F.; NEVES, P. A. Capacitação e reação acrossômica In: NEVES,P.; RODRIGUES NETTO JR., N. (eds). **Infertilidade masculina**. São Paulo: Atheneu; 2002. p.45-8.

TELÖKEN, C.; BADALOTTI, M. Testes de penetração espermática. In: NEVES,P.; RODRIGUES NETTO JR., N.(eds). **Infertilidade masculina**. São Paulo: Atheneu; 2002. p.95-8.

TESARIK, J.; MENDOZA, C.; CARRERAS, A. Expression of D – mannose binding sites on human spermatozoa: comparison of fertile donors and infertile patients. **Fertil Steril**, 56:113-8, 1991.

VAN DEN SAFFELE, J.; VERMEULEN, L.; SCHOONJANS, F.; COMBAIRE, F.H. Evaluation of the hypo-osmotic swelling test in relation with advanced methods of semen analysis. **Andrologia**, 24:213-7, 1992.

VAN KOOIJ, R.J., BALERNA, M., ROATTI, A. Oocyte penetration and acrosome reactions of human sperms, II: correlation with other seminal parameters.

Andrologia, 18:503-8, 1986.

VEECK, L.L. **An atlas of human gametes and conceptuses: an illustrated reference for assisted reproductive technology.** New York: The Parthenon Publishing Group: 1998.

WASSARMAN, P.M. The biology and chemistry of fertilization. ***Science***, **235**:553-60, 1987.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Laboratory manual for the examination of human semen and sperm-cervical mucus interaction. Cambridge: Cambridge University Press; 1992. p.10.

YANAGIMACHI R. Capacitation. MASTROIANNI L., BIGGERS, J. D. **Fertilization and embryonic development in vitro.** New York: Plenum Press, 1981. p.81-112.

YAVETZ, H., ROSENBLAT, Y., YOGEV, L., BOTCHAN, A., LESSING, J.B., PAZ, G. et al. Effect of freezing-thawing on the expression of mannose-ligand receptors on human spermatozoa: the impact on sperm capacitation and acrosome reaction. ***Andrologia***, 33:272-6, 2001.

YOUSSEF, H.M., DONCEL, G.F., BASSIOUNI, B.A., ACOSTA, A.A. Manose-binding sites on human spermatozoa and sperm morphology. ***Fertil Steril.***, 66: 640-5, 1996.

8. Bibliografia de Normatizações

FRANÇA, J.L.; BORGES, S.M.; VASCONCELLOS, A.C.; MAGALHÃES, M.H.A.
– **Manual para normatização de publicações técnico-científicas**. 4^aed.,
Editora UFMG, Belo Horizonte, 1998. 213p.

Normas e procedimentos para publicação de dissertações e teses. Faculdade
de Ciências Médicas, UNICAMP. Ed. SAD – Deliberação CCPG-001/98
(alterada 2002).

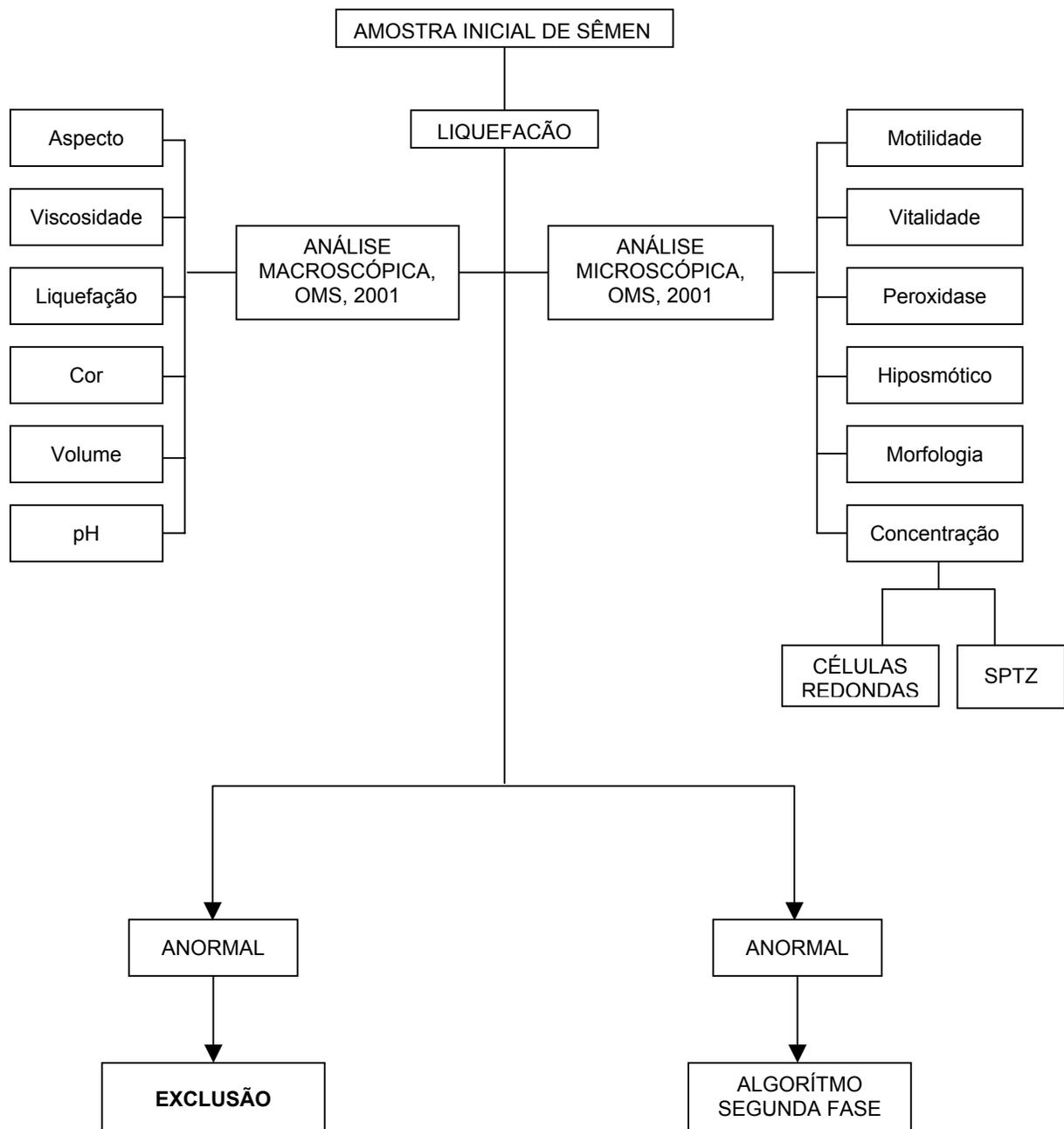
9. Anexos

9.1. Anexo 1- Critérios de normalidade do espermograma de acordo com a Organização Mundial de Saúde , (2001)

Critérios	Padrão de Normalidade
Cor	Branco opalescente
Volume	Entre 2,0 e 5,0 mililitros
Viscosidade	Normal
Liquefação	Incompleta
pH	Entre 7,2 – 7,8
Concentração Espermática	Igual ou maior que $20,0 \times 10^6$ por mililitro de sêmen
Motilidade	Igual ou maior que 50% de graus A+B
Leucócitos	Igual ou menor que a $1,0 \times 10^6$ por mililitro de sêmen
Vitalidade	Igual ou maior que 50% de formas vivas
Morfologia Estrita de Kruger	Igual ou maior que 14% de formas normais
Teste hiposmótico	Igual ou maior que 60% de formas inchadas

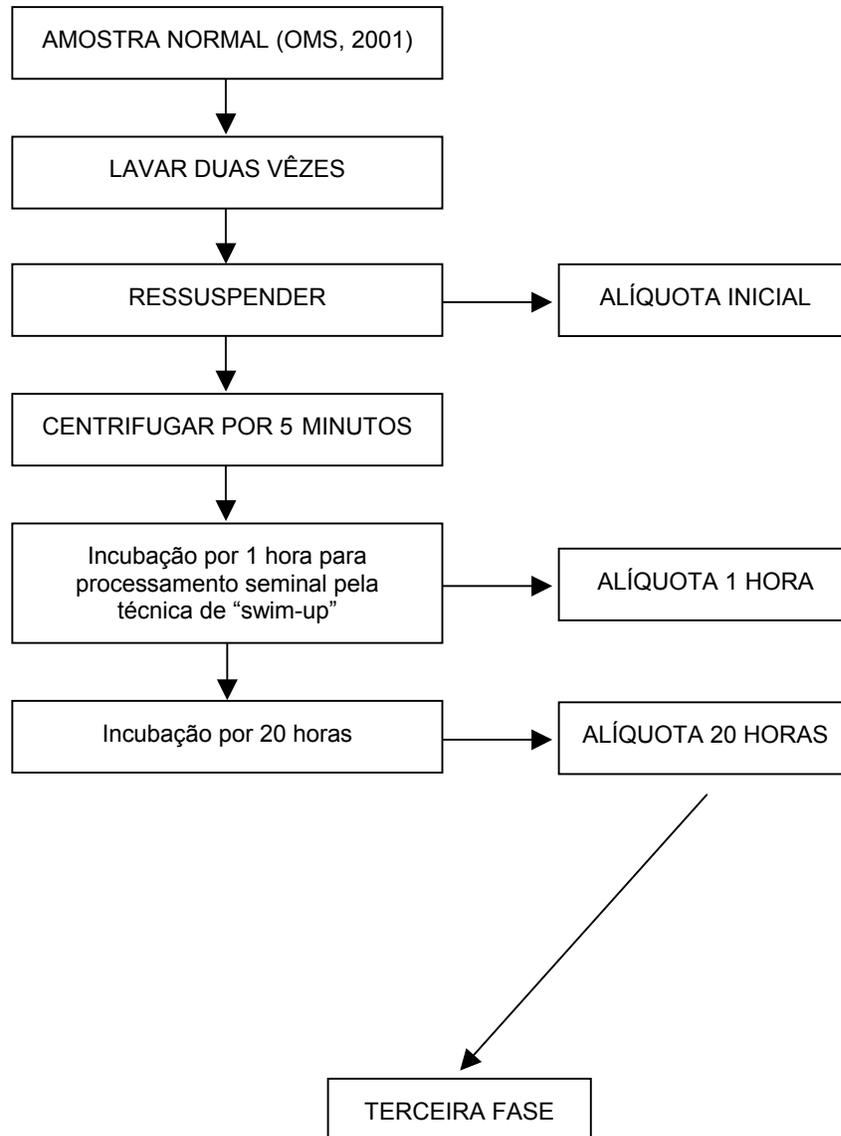
9.2. ANEXO 2 - Algoritmo

PRIMEIRA FASE



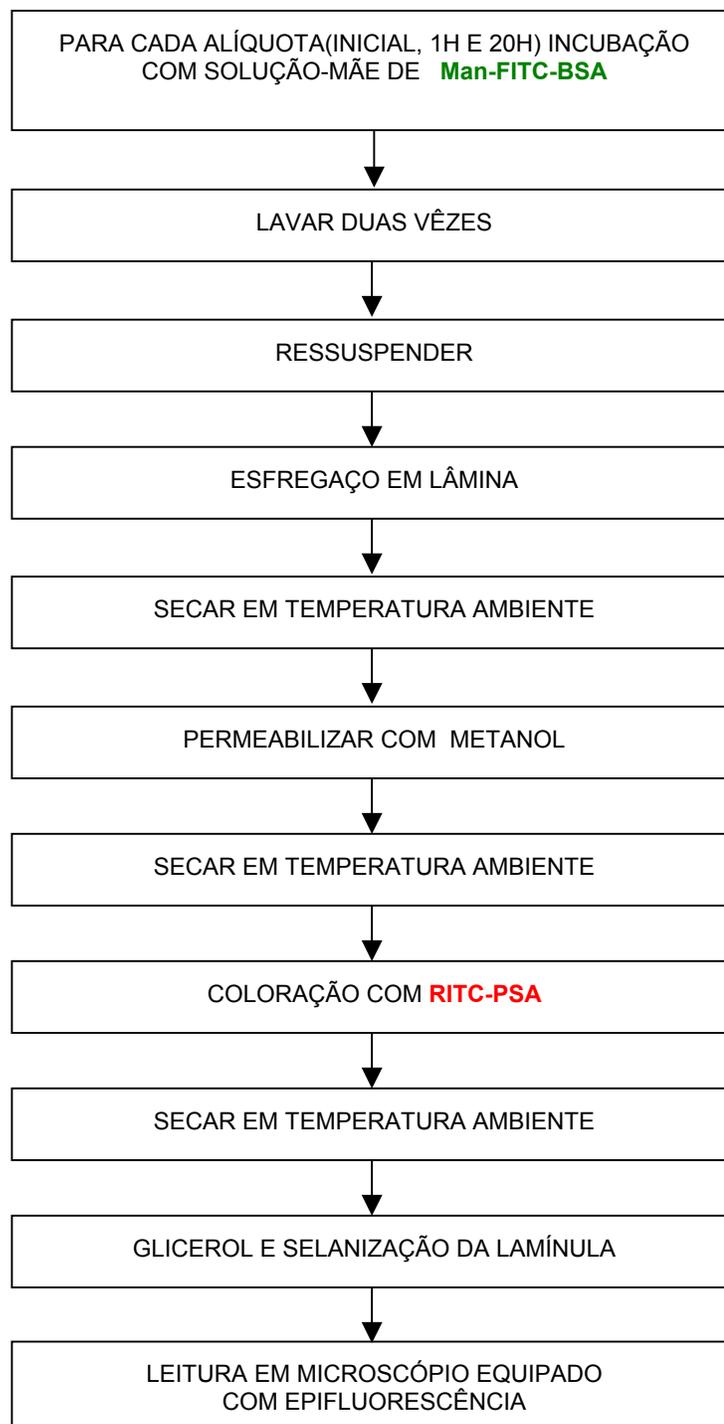
ALGORÍTMO

SEGUNDA FASE



ALGORITMO

TERCEIRA FASE



9.3. ANEXO 3 – Coloração de Papanicolau Modificada para Espermatozóides (OMS, 2001)

Deixar as lâminas secarem em temperatura ambiente e, em seguida, colocar sob imersão no etanol-éter (50%etanol + 50% éter) por 30 minutos.

1. Hidratar em etanol 80% (10 imersões)
2. Hidratar em etanol 70% (10 imersões)
3. Hidratar em etanol 50% (10 imersões)
4. Lavar em água corrente (10 imersões)
5. Corar em hematoxilina de Harris por 3 minutos
6. Deixar em água corrente por 5 minutos
7. Lavar em etanol-ácido (2 imersões)
8. Lavar em água corrente por 5 minutos
9. Deixar em solução Scott por 4 minutos
10. Lavar em água destilada (1 imersão)
11. Desidratar em etanol 50% (10 imersões)
12. Desidratar em etanol 70% (10 imersões)
13. Desidratar em etanol 90% (10 imersões)
14. Desidratar em etanol 95% (10 imersões)
15. Corar com Orange G6 por 2 minutos
16. Lavar em etanol 95% (10 imersões)
17. Lavar em etanol absoluto (10 imersões)
18. Corar com EA – 36 por 5 minutos
19. Lavar em etanol 95% (10 imersões)
20. Lavar em etanol absoluto (5 imersões)
21. Lavar em etanol absoluto (5 imersões)
22. Deixar em xilol por 15 minutos.

9.4. ANEXO 4 - Preparo da solução-mãe de Man – FITC-BSA (100µg/ml)

- **Material Utilizado**

- 1 frasco contendo 2mg de solução de Man-FITC-BSA (Sigma A7790)
- 2ml de Dulbecco's solução fosfato-salino
- 01 tubo Eppendörff por exame
- papel alumínio

- **Procedimento**

- Adicionar 1ml de Dulbecco's solução fosfato-salino (PBS) em um frasco de 2mg de solução de Man-FITC-BSA (Sigma A7790).
- Homogeneizar
- Aliquotar 8µl desta solução e acondicionar cada alíquota em tubo Eppendörff.
- Envolver o tubo com papel alumínio e armazená-lo a -20°C .
- No momento da coloração cada Eppendörff de 8µl de solução será homogeneizado com 192µl de sêmem e levado à incubação.

9.5. ANEXO 5 - Preparo da Solução-Mãe de RITC – PSA. (100µg/ml)

- **Material Utilizado**

- 01 frasco contendo 5mg de RITC-PSA (Vector Laboratories, Inc, Burlingame, CA. RL1052)
- 1,0ml de Dulbecco's solução fosfato-salina (PBS)
- 01 tubo Eppendörff por exame
- papel alumínio

- **Procedimento**

- Adicionar 1,0ml de Dulbecco's solução fosfato-salina (PBS) em um frasco contendo 5mg de RITC-PSA (Vector Laboratories, RL1052).
- Homogeneizar
- Aliquotar 8µl desta solução e acondicionar cada alíquota em tubo Eppendörff.
- Envolver cada tubo com papel alumínio e armazenar a –20 °C.
- No momento da coloração cada Eppendörff de 8µl será dissolvido em 208µl de Dulbecco's solução fosfato-salina (PBS) e esta solução resultante será utilizada para a coloração da lâmina.

9.6. ANEXO 6 - Consentimento Informado

Eu, _____, paciente do Ambulatório de Urologia/Andrologia do Hospital das Clínicas – UNICAMP fui informado sobre a realização da pesquisa “Determinação do padrão de expressão de receptores de D-manose em espermatozóides de homens férteis” cujo objetivo é melhorar o conhecimento científico sobre a infertilidade masculina.

Concordo em participar voluntariamente desta pesquisa sabendo que não receberei nenhum benefício pessoal, comparecendo primeiramente ao Ambulatório de Urologia do HC - UNICAMP onde será realizado um exame clínico pelo Dr. Paulo A. Neves antes da minha cirurgia de vasectomia. Realizado este exame, comprometo-me a comparecer em data previamente agendada no Laboratório de Reprodução Humana – CAISM – UNICAMP tendo mantido abstinência sexual (sem ocorrência de ejaculação) por três dias, para coletar, por masturbação, amostra de sêmen. Esta amostra terá a finalidade única e exclusiva de atingir o objetivo desta pesquisa, sendo a mesma descartada após a realização das análises de rotina (espermograma) e dos testes propostos no estudo (D-manose e reação acrossômica). Caso seja encontrado qualquer tipo de alteração durante exame clínico ou no espermograma serei notificado.

Fui informado e estou ciente dos possíveis desconfortos, riscos e benefícios que o exame clínico e a coleta da amostra de sêmen podem acarretar.

Os ambulatórios do HC- UNICAMP não deixarão de atender-me caso eu desista de participar deste estudo, respeitando os meus direitos como voluntário de acordo com a declaração de Helsink-II e da resolução 196/96 do CONEP.

Estou ciente de que serei compensado dos custos de transporte como também receberei um comprovante de comparecimento do LRH para que eu possa apresentar em meu trabalho, após a coleta da amostra de sêmen.

Todos os pesquisadores envolvidos neste estudo comprometem-se a esclarecer qualquer dúvida que eu tiver sobre o mesmo, como também garantem o total sigilo, assegurando a privacidade dos meus dados confidenciais nesta pesquisa.

Campinas, de _____ de 2001.

Assinatura do Voluntário

Assinatura do Investigador

Exame clínico realizado em: ____/_____/____

Data da coleta: ____/_____/____ no LRHF: (19)3788-9358

Pesquisadores Responsáveis: **Carolina Fernanda Silveira** (Bióloga e mestranda da Tocogineco-LRH-CAISM) F: (19)3788-9358; **Dr. Paulo Augusto Neves** (Urologista do Amb. Andro/Uro do HC – UNICAMP) F: (19)3788-7481

Dr. Francisco A.T. Fazano (Responsável pelo LRH – CAISM-UNICAMP) F: (19)3788-9358
FCM – Comitê de Ética em Pesquisa – UNICAMP – F: (19)3788-8936
