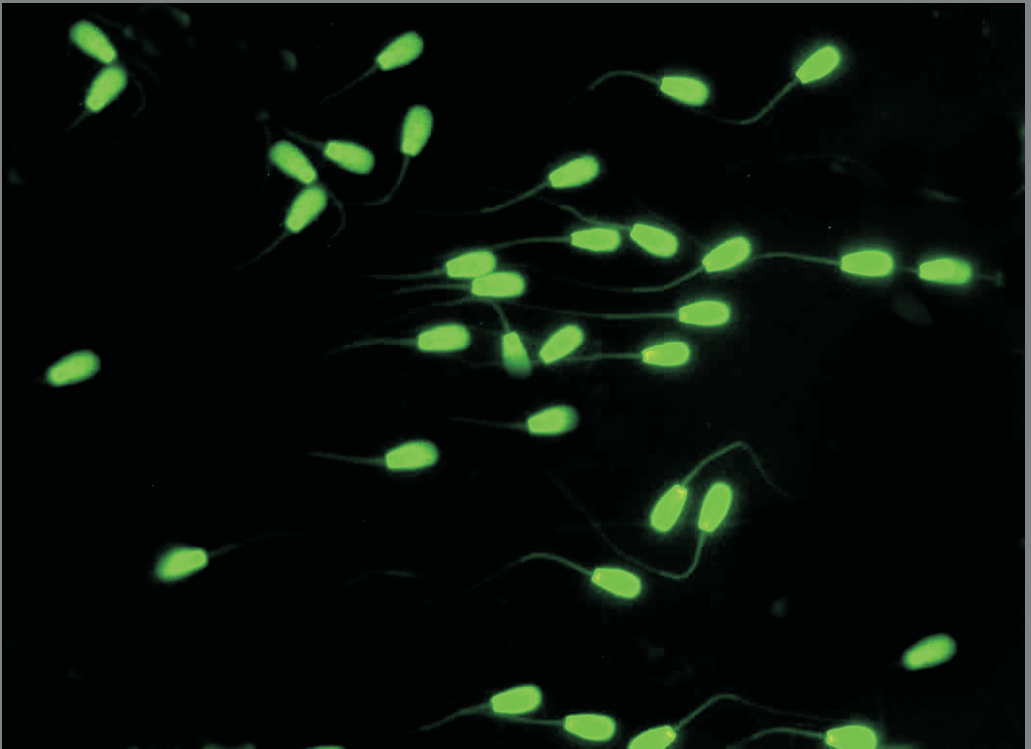


Método de TUNEL: uma ferramenta alternativa para avaliar a integridade do DNA de espermatozóides bovinos



*Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Embrapa Cerrados
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento*

Documentos 192

Método de TUNEL: uma ferramenta alternativa para avaliar a integridade do DNA de espermatozóides bovinos

*Carlos Frederico Martins
Margot Nunes Dode
Sônia Nair Bão
Rodolfo Rumpf*

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

Embrapa Cerrados

BR 020, Km 18, Rod. Brasília/Fortaleza

Caixa Postal 08223

CEP 73310-970 Planaltina, DF

Fone: (61) 3388-9898

Fax: (61) 3388-9879

<http://www.cpac.embrapa.br>

sac@cpac.embrapa.br

Comitê de Publicações da Unidade

Presidente: *José de Ribamar N. dos Anjos*

Secretário-Executivo: *Maria Edilva Nogueira*

Supervisão editorial: *Fernanda Vidigal Cabral de Miranda*

Revisão de texto: *Francisca Elijani do Nascimento*

Normalização bibliográfica: *Rosângela Lacerda de Castro*

Editoração eletrônica: *Jussara Flores de Oliveira*

Capa: *Jussara Flores de Oliveira*

Foto da capa: *Carlos Frederico Martins*

Impressão e acabamento: *Jaime Arbués Carneiro /
Divino Batista de Sousa*

Impresso no Serviço Gráfico da Embrapa Cerrados

1ª edição

1ª impressão (2007): tiragem 100 exemplares

Todos os direitos reservados

A reprodução não-autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei no 9.610).

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Embrapa Cerrados**

M593 Método de TUNEL: uma ferramenta alternativa para avaliar a integridade do DNA de espermatozóides bovinos / Carlos Frederico Martins ... [et al.]. Planaltina, DF : Embrapa Cerrados, 2007. 26 p.— (Documentos / Embrapa Cerrados, ISSN 1517-5111; 192)

1. Reprodução animal. 2. DNA espermático. 3. Bovino.
I. Martins, Carlos Frederico. II. Série.

636.2 - CDD 21

Autores

Carlos Frederico Martins

Méd. Vet., D.Sc., Pesquisador

Embrapa Cerrados

carlos.frederico@cpac.embrapa.br

Margot Nunes Dode

Méd. Vet., Ph.D., Pesquisador

Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

PqB W5 Norte Final, 70770-900-Brasília, DF

margot@cenargen.embrapa.br

Sônia Nair Bão

Biól., Ph.D., Pesquisadora

Universidade de Brasília-UnB

Instituto de Ciências Biológicas

Departamento de Biologia Celular

Lab. Microscopia Eletrônica/CEL/IB/UnB

Asa Norte, 70919-970 - Brasília, DF

snbao@unb.br

Rodolfo Rumpf

Méd. Vet., Ph.D., Pesquisador

Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

rodolfo@cenargen.embrapa.br

Apresentação

Esta publicação tem por objetivo destacar a utilidade da técnica de *terminal deoxynucleotidyl transferase mediated dUTP nick end labeling assay* (TUNEL) na avaliação da integridade do DNA dos espermatozóides bovinos, para se evitar perdas na eficiência das principais biotécnicas de reprodução animal, tais como inseminação artificial, transferência de embriões e fecundação in vitro.

Considerando que, durante a avaliação espermática de rotina, não é possível identificar danos no DNA espermático, é de fundamental importância utilizar técnicas confiáveis na detecção deste parâmetro, a fim de se evitar o comprometimento do desenvolvimento embrionário. Dentro desse contexto, encontra-se o método de TUNEL, que é uma técnica que consegue detectar com confiabilidade fragmentações de DNA na amostra de sêmen, antes que ele seja aplicado na reprodução animal.

Dessa forma, espera-se que as informações contidas nesta publicação consigam estimular os técnicos a realizarem rotineiramente uma avaliação de DNA nos espermatozóides frescos ou criopreservados de bovinos, considerando que a técnica de TUNEL pode ser uma ferramenta útil nesse processo, determinando exames espermáticos mais seguros e um retorno econômico do sêmen utilizado.

Roberto Teixeira Alves
Chefe-Geral da Embrapa Cerrados

Sumário

Introdução	9
Organização da estrutura da cromatina espermática	10
Relação da estrutura da cromatina com a fecundação e sobrevivência embrionária	11
Fatores que influenciam a estabilidade da estrutura espermática	12
A técnica de <i>terminal deoxynucleotidyl transferase mediated dUTP nick end labeling assay</i> (TUNEL) para detecção de fragmentação do DNA espermático	13
Material necessário	15
Preparo de soluções	15
Procedimento	18
Estudo comparativo entre o método de TUNEL e o teste AO (<i>Acridine Orange</i>)	19
Considerações finais	21
Referências	21
Abstract	26

Método de TUNEL: uma ferramenta alternativa para avaliar a integridade do DNA de espermatozóides bovinos

*Carlos Frederico Martins; Margot Nunes Dode
Sônia Nair Bão; Rodolfo Rumpf*

Introdução

A fecundação nos mamíferos envolve uma interação direta entre o espermatozóide e o ovócito, a fusão das membranas celulares e a subsequente união do genoma masculino e feminino ([PRIMAKOFF; MYLES, 2002](#)). Estudos em diferentes animais demonstraram que a finalização desse processo e o posterior desenvolvimento do embrião dependem em parte da integridade do DNA espermático ([AHMADI; NG, 1999](#)). Alterações no genoma paterno podem comprometer não só a fecundação e a qualidade do embrião, mas também a viabilidade embrionária e a progressão da prenhez ([BORINI et al., 2006](#)).

A adequada qualidade espermática pode garantir o sucesso de diferentes técnicas de reprodução animal, tais como a inseminação artificial, a transferência de embriões e a fecundação in vitro, pois, em todas essas técnicas, o espermatozóide exerce um papel fundamental.

No entanto, a qualidade do sêmen normalmente é mensurada pela avaliação de concentração, motilidade e morfologia espermática. Esses parâmetros, entretanto, não são capazes de avaliar alterações na organização da cromatina nuclear do espermatozóide, tais como condensação irregular ou danos no DNA ([SAKKAS et al., 1998](#)).

Por não existir um exame único para a predição da fertilidade dos espermatozóides frescos ou criopreservados, quanto maior for o número de parâmetros avaliados, mais confiável será o resultado final do exame do sêmen bovino. Dentro desse contexto, a análise do DNA espermático deve ser considerada durante o exame seminal, pois pode trazer informações importantes da qualidade espermática, as quais não estariam sendo observadas pelos exames convencionais.

Portanto, o objetivo desta publicação é apresentar a técnica de *terminal deoxynucleotidyl transferase mediated dUTP nick end labeling assay* (TUNEL) como metodologia eficaz e sensível para identificar danos ao DNA espermático e demonstrar a importância de se avaliar o DNA dos espermatozóides durante as avaliações de rotina.

Organização da estrutura da cromatina espermática

A cromatina dos espermátócitos, que sofreram a última divisão meiótica para formar as espermátides, consiste de proteínas histonas intimamente ligadas ao DNA em partículas do nucleossomo ([EVENSON, 1999](#)). O nucleossomo compreende o DNA envolvido por um octâmero de histonas nucleares ([KORNBERG, 1974](#)), aparentando grânulos em uma corda ([WOLFFE, 2001](#)). A organização nucleossomal das espermátides prematuras se modifica para formar o espermatozóide, sendo substituída inicialmente por fibrilas lisas ([DADOUNE, 2003](#)). As agregações dessas fibrilas formam fibras maiores e posteriormente uma massa homogênea, que é resultado da interação do DNA espermático com as proteínas protaminas ([LOIR et al., 1985](#)). Essas alterações na cromatina do espermatozóide determinam uma organização diferente à encontrada nas células somáticas ([EVENSON et al., 2002](#)). Junto com a visível mudança na organização da cromatina espermática, as histonas são removidas do DNA dos espermátócitos e espermátides prematuras e são substituídas por proteínas de transição. Em seguida, as proteínas de transição são substituídas pelas proteínas protaminas, que são responsáveis pela condensação nuclear final e estabilização da cromatina espermática ([ZHAO](#)

[et al., 2001](#)). Então, no complemento da espermiogênese, as protaminas interagem com o DNA espermático de uma forma única e original, envolvendo-o em subunidades toroidais, que contêm 50 kb de DNA.

Em virtude dessa organização final, o núcleo espermático dos mamíferos é muito estável e altamente condensado ([YANAGIMACHI, 1994](#)), sendo seis vezes mais compactado e tendo 40 vezes menos volume de DNA que as células somáticas ([WARD, 1994](#); [WARD; ZALENSKY, 1996](#)). Esse tipo de empacotamento do DNA é essencial para proteger as células e minimizar os danos causados pelos agentes exógenos antes da fecundação. Ainda tem sido sugerido que o espermatozóide bovino possui uma condensação nuclear mais estável que várias outras espécies ([PERREAULT et al., 1988](#)).

Relação da estrutura da cromatina com a fecundação e sobrevivência embrionária

Existem muitas evidências indicando que a integridade da cromatina espermática não é só importante para a fecundação, mas também para o desenvolvimento embrionário normal ([MORRIS et al., 2002](#); [WARD et al., 2000](#)). Espermatozóides com a integridade do DNA comprometida, independente do grau da lesão, parecem apresentar a capacidade de fecundar ovócitos com as mesmas taxas encontradas para os espermatozóides normais. Entretanto, os danos do DNA espermático estão relacionados com o comprometimento do desenvolvimento embrionário. Apesar de o ovócito ter a capacidade de reparar alguns danos pré-existentes do DNA espermático, essa capacidade é limitada e, às vezes, inadequada, resultando em falhas no desenvolvimento embrionário ([AHMADI; NG, 1999](#)). Ademais, mudanças na arquitetura da cromatina espermática podem influenciar a regulação da expressão de genes paternos no embrião ([HAAF; WARD, 1995](#)). Nos bovinos, danos na cromatina espermática foram associados com um padrão anormal de descondensação da cromatina e aumento do tempo para formação dos pró-núcleos após a fecundação ([EVENSON et al., 1999](#)).

Fatores que influenciam a estabilidade da estrutura espermática

A estrutura da cromatina espermática pode ser alterada pela temperatura, substâncias químicas, doenças e distúrbios moleculares ([KARABINUS et al., 1997](#); [LOVE et al., 2002](#)). Estudos avaliando a alteração da temperatura no espermatozóide humano, bovino e suíno têm mostrado que a cromatina espermática pode sofrer importantes mudanças após os procedimentos de congelamento e descongelamento ([MADRID-BURY et al., 2005](#); [CÓRDOVA-IZQUIERDO et al., 2006](#)). Além disso, Martins et al. (2007a), trabalhando com o processo de liofilização como método alternativo para conservação de espermatozóides bovinos, também verificaram que, durante esse processo e principalmente durante o período de estocagem, o DNA do espermatozóide liofilizado pode ser danificado, caso não haja adequada proteção.

[Karabinus et al. \(1997\)](#) demonstraram que os touros apresentam uma redução da estabilidade da cromatina 12 dias após a exposição ao estresse térmico testicular. Espermatozóides do epidídimo coletados com mais de 9 dias após o estresse calórico foram menos afetados pelo estresse térmico, sugerindo que a estabilização da cromatina espermática pela formação das pontes de dissulfeto e a condensação da cromatina, que normalmente ocorrem durante o trânsito epididimário, conferem o aumento da resistência à desnaturação.

Nos homens, existe uma grande relação entre o tabagismo e o comprometimento das funções reprodutivas, possivelmente em virtude de os fumantes inalarem mais toxinas, como a nicotina, monóxido de carbono e outros compostos mutagênicos, que os não fumantes ([ZAVOS et al., 1998](#)). Nos fumantes, têm sido demonstrado um aumento dos danos ao DNA espermático ([POTTS et al., 1999](#)), que pode ser resultado do estresse oxidativo no sêmen ([SALEH et al., 2002](#)). Nos animais, a criopreservação está associada ao aumento do estresse oxidativo, causando maiores lesões aos espermatozóides. Muitos pesquisadores acreditam que o estresse oxidativo não só danifica a membrana plasmática, mas também pode induzir altas frequências de quebras na dupla fita de DNA ([AITKEN, 1999](#)).

Em relação aos distúrbios moleculares, estudos realizados em seres humanos identificaram indivíduos com níveis de protamina 2 no ejaculado, o que tem sido atribuído à persistência das histonas ou incompleto processamento dos precursores da protamina 2 ([DE YEBRA et al., 1998](#)). A protamina 2 tem importante função na formação das pontes de dissulfeto inter e intramoleculares, que são necessárias para a estabilização da cromatina ([EVENSON et al., 1980](#)).

A técnica de *terminal deoxynucleotidyl transferase mediated dUTP nick end labeling* assay (TUNEL) para detecção de fragmentação do DNA espermático

Várias técnicas são disponíveis para avaliar a estrutura da cromatina e DNA espermático. Entre as principais técnicas, estão os métodos microscópicos que incluem o ensaio Cometa (*Single Cell Gel Electrophoresis*) ([IRVINE et al., 2000](#)), a avaliação de TUNEL ([HOST et al., 2000](#)), teste *Acridine Orange* (AO) ([DURAN et al., 1998](#)) e *Sperm chromatin structure assay* (SCSA) ([EVENSON et al., 2002](#)).

A técnica de TUNEL detecta danos endógenos no DNA e tem sido considerada um método adequado para quantificar as quebras no DNA dos espermatozoides ([YOUNG et al., 2003](#)). Na análise do espermatozoide humano, o método de TUNEL tem mostrado resultados similares ao SCSA ([LARSON-COOK et al., 2003](#)) e ao ensaio Cometa ([COLLINS et al., 1997](#)).

A avaliação de TUNEL se baseia na incorporação de nucleotídeos (d-UTP = 2'-desoxiuridina 5' trifosfato) marcados com um corante fluorescente (Isotiocianato de fluoresceína-FITC) na região livre 3'OH das quebras do DNA fita simples ou fita dupla. Essa reação é catalisada por uma enzima denominada de *terminal deoxynucleotidyl transferase* que irá polimerizar os nucleotídeos modificados nas regiões de fragmentação do DNA. A incorporação de d-UTP fluoresceína é então amplificada por várias reações enzimáticas secundárias e mensurada por microscopia de fluorescência ou por citometria de fluxo. Os espermatozoides examinados microscopicamente são identificados como TUNEL positivo (DNA fragmentado), por causa da

presença de coloração verde na cabeça espermática determinada pela ação do corante isotiocianato de fluoresceína-FITC (Fig. 1), ou negativo (DNA íntegro), de acordo com a presença de coloração azul na cabeça espermática, por causa da contra-coloração com o corante *Hoechst* 33342 (Fig. 2).



Fig. 1. Espermatozoides TUNEL positivo (com fragmentação do DNA), caracterizados pela coloração verde da cabeça.

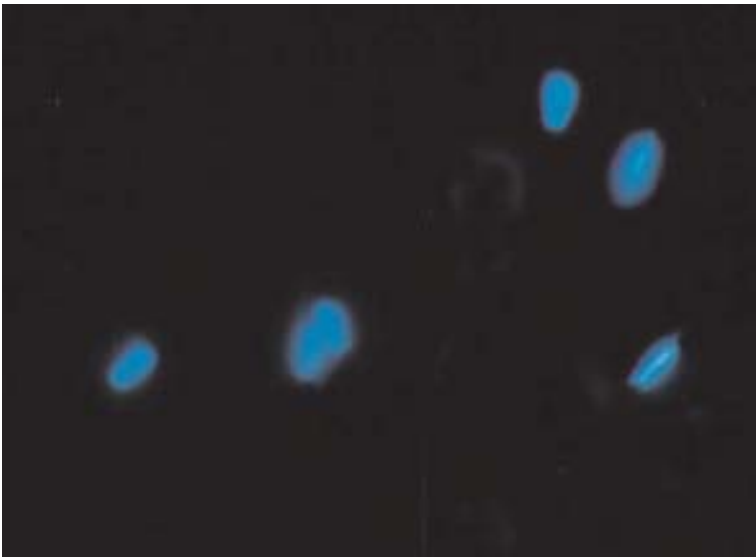


Fig. 2. Espermatozoides TUNEL negativo (DNA íntegro), caracterizados pela coloração azul da cabeça.

Material necessário

- Sêmen fresco ou congelado.
- Microscópio de fluorescência com filtro de comprimento de onda de excitação de 365 nm e de emissão de 420 nm para detecção do corante Hoechst; e filtro de comprimento de onda de excitação de 450 nm e de emissão de 515 nm para o corante isotiocianato de fluoresceína (FITC).
- Solução de Reação de TUNEL: *In Situ Cell Death Detection Kit, with fluorescein* (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany).
- Solução de lavagem.
- Solução de DNase.
- Solução permeabilizadora.
- Corante fluorescente genômico *Hoechst 33342*.
- Tampão fosfato.
- Paraformaldeído 10 %.
- Paraformaldeído 4 %.
- Triton -X 0,5 %.

Preparo de soluções

1. Tampão Fosfato pH 7,1 (Phosphate Buffer Saline, PBS).

Fração A = fosfato monobásico ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$).

2,76 g em 100 mL de água destilada

Fração B = fosfato dibásico ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$).

7,17 g em 100 mL de água destilada

Solução final: misturar A e B para obter o pH desejado⁽¹⁾.

Solução A (mL)	Solução B (mL)	pH
90	10	5,9
85	15	6,1
77	23	6,3
68	32	6,5
57	43	6,7
45	55	6,9
33	67	→ 7,1
23	77	7,3
19	81	7,4
16	84	7,5
10	90	7,7

⁽¹⁾ Temperatura ambiente.

2. Solução de lavagem.

Componente	Para 100 mL de solução
PBS	100 mL
Polivinilpirrolidona (PVP) ou Bovine Serum Albumin (BSA) <i>fatty</i>	0,1 g

Detalhe: Armazenar a solução na geladeira (4 °C) por uma semana.

3. Solução DNase (para controle positivo).

Componente	Concentração	Para 50 mL de solução
PBS + BSA	400 mM (0,0025 g – 1 mL)	5 µL
MgCl ₂	50 mM (0,001 g – 1 mL)	6 µL
DNase	50U/mL (0,0001 g – 100 µL)	0,5 µL
Água deionizada	— — —	38,5 µL

Detalhe: A solução deve ser fresca. Não armazenar!

4. Solução Permeabilizadora.

Componente	Para 15 mL de solução
Triton X-100 (0,5 %)	75 μ L
Citrato de sódio	0,015 g
PBS/PVP ou BSA <i>fatty</i>	14,925 mL

Detalhe: Armazenar a solução na geladeira (4 °C).

5. Corante Fluorescente Hoechst 33342 (controle negativo).

Componente	Para 1 mL de solução
Hoschst 33342	1 mg
Água deionizada	1 mL

Detalhe: alíquotar com 9 μ l e diluir para uso com 1,5 mL de PBS.

6. Paraformaldeído a 10 %.

Componente	Para 25 mL de solução
Paraformaldeído	2,5 g
Água deionizada	25 mL

Detalhe: primeiramente, adicionar 2,5 gramas de formaldeído em 12 mL de água deionizada aquecida a 60 °C e homogeneizar. Em seguida, pingar 1 a 2 gotas de NaOH na concentração de 8 M e verificar a mudança de cor (deve ficar translúcido). Finalmente, completar com água deionizada até 25 mL.

7. Paraformaldeído a 4 % (Diluição final).

Componente	Para 10 mL de solução
Paraformaldeído a 10 %	4 mL
PBS	2 mL
Água destilada	4 mL

8. Solução da Reação TUNEL (Roche® Germany).

Componente	Para 500 L de solução
solução enzimática	50 μL
solução <i>label</i>	450 μL

Detalhe: misturar bem e manter no gelo e no escuro até o uso.

Procedimento

1. Usar 0,5 mL de sêmen fresco ou congelado.
2. Centrifugar o sêmen em 1 mL de Solução de lavagem a 37°C.

Detalhe: centrifugar a 700 g por 5 minutos, a temperatura ambiente. Repetir o procedimento duas vezes.

3. Descartar o sobrenadante e diluir o sedimentado com 1 mL de paraformaldeído 4 %.

Detalhe: incubar por 1 hora em temperatura ambiente.

4. Adicionar mais 1 mL de Solução de lavagem, homogeneizar e centrifugar a 700 g por 5 minutos, a temperatura ambiente.
5. Descartar o líquido sobrenadante e diluir o sedimentado com 1 mL de Triton-X 0,5 %.

Detalhe: incubar a 4 °C por 1 hora.

6. Adicionar mais 1 mL de Solução de lavagem e lavar por centrifugação.
7. Diluir o sedimentado com Solução de lavagem (a quantidade pode variar com o tamanho do sedimentado).

Sugestão: usar 100 a 150 μL .

8. Fazer as soluções controles.

Controle negativo – 30 μL da solução *label* do Kit do TUNEL e 10 μL da amostra.

Controle positivo – 50 μL de DNAse e 10 μL da amostra.

9. Incubar o controle positivo por 20 minutos (o restante permanece aguardando).

Detalhe: Incubar à temperatura ambiente.

10. Diluir as amostras com 50 μL da solução de reação do TUNEL (contém isotiocianato de fluoresceína).

Detalhe: incubar 1 hora a 37 °C no escuro em câmara úmida; a câmara úmida pode ser preparada em uma caixa de ponteiras, contendo água a 37 °C e fechada com papel alumínio.

11. Centrifugar as amostras com solução de lavagem.

12. Contra-corar as amostras com o corante fluorescente genômico Hoechst 33342.

Detalhe: incubar o sedimentado das amostras com 50 μL da solução de Hoechst 33342 por 10 minutos.

13. Centrifugar e diluir o sedimentado das amostras com 50 μL de Solução de lavagem.

14. Preparar a lâmina para observação.

Detalhe: Depositar em cima de uma lâmina limpa 15 μL da amostra, colocar lamínula em cima e vedar as bordas com esmalte.

15. Observar em microscópio de fluorescência.

Detalhe: usar filtro de excitação de 450 nm e de emissão de 515 nm para o corante isotiocianato de fluoresceína (verde, indicando fragmentação de DNA); e filtro de excitação de 365 nm e de emissão de 420 nm para o corante Hoechst (azul, indicando integridade do DNA).

Atenção: as soluções de DNase e da reação do TUNEL devem ser sempre manipuladas em gelo até o momento da utilização.

Estudo comparativo entre o método de TUNEL e o teste AO (*Acridine Orange*)

Em estudo realizado recentemente na Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, [Martins et al. \(2007b\)](#) compararam a eficiência do método de TUNEL e do teste AO em detectar lesões no DNA de espermatozoides

liofilizados e criopreservados de bovinos. Os resultados demonstraram que a técnica de TUNEL é extremamente mais sensível e confiável que o teste AO para essa finalidade (Tabela 1). Esses resultados confirmam as afirmações de [Young et al. \(2003\)](#), que indicam a técnica de TUNEL como um método confiável para avaliar danos ao DNA espermático.

Tabela 1. Comparação entre o teste AO (*acridine orange*) e o método de TUNEL (*deoxynucleotidyl transferase mediated dUTP nick end labeling assay*) em avaliar danos no DNA de espermatozóides bovinos submetidos à liofilização em diferentes meios ([MARTINS et al., 2007b](#)).

Método	Porcentagem de células com danos no DNA			
	T1	T2	T3	Controle
TUNEL	14 % ^a	5 % ^a	2 % ^a	1 % ^a
AOT	4 % ^b	2 % ^a	1 % ^a	0.5 % ^a

^{a,b} Porcentagens com diferentes letras dentro das colunas diferem significativamente quando $p < 0,05$.

T1: TCM 199 com sais de Hanks com 10 % de soro fetal bovino.

T2: TCM 199 com sais de Hanks com 10 % de soro fetal bovino e 0,2M de trehalose.

T3: Solução de EGTA.

Controle: Sêmen congelado.

Ainda, nesse mesmo trabalho, Martins et al. (2007b) compararam os resultados de fragmentação de DNA detectado pelo método de TUNEL com o potencial de fecundação *in vitro* desse material utilizando a técnica de injeção intracitoplasmática de espermatozóide (ICSI). Por meio de uma análise de regressão linear foi demonstrado que a fragmentação do DNA é inversamente relacionada com o potencial de fecundação, uma vez que o aumento da fragmentação de DNA espermático determinou uma diminuição na formação de pró-núcleos nos ovócitos. Esse fato confirma que o método de TUNEL consegue detectar importantes danos no DNA, podendo dessa forma auxiliar na predição da fertilidade de espermatozóides.

Contrariamente, o teste AO, apesar de apresentar uma avaliação de fácil realização, apresenta resultados duvidosos. De acordo com [Duran et al. \(1998\)](#) e [Evenson et al. \(1999\)](#), a principal dificuldade do teste AO está

relacionada com a leitura microscópica e sua interpretação, pois ocorrem muitos problemas em virtude da rápida perda da fluorescência e pela coloração heterogênea da lâmina.

Considerações finais

O ovócito é capaz de reparar integralmente quebras no DNA fita simples, entretanto, se um alto nível de quebras no DNA fita dupla estiver presente, o ovócito pode gerar erros na reparação, produzindo mutações genéticas que podem mais tarde bloquear ou alterar o desenvolvimento embrionário ([BRAUDE et al., 1988](#)).

Por essa razão, fragmentações no DNA espermático devem ser sempre consideradas durante a avaliação da qualidade do sêmen. Porém, essa avaliação não deve ser vista como um método isolado, mas sim em associação com outros parâmetros, tais como integridade de membrana plasmática e acrossoma para uma melhor predição da fertilidade espermática.

O método de TUNEL é uma avaliação com adequada sensibilidade e precisão para detectar danos no DNA espermático, sendo indicado sua inclusão na avaliação espermática de rotina, pois pode aumentar a confiabilidade do resultado final do exame do sêmen a fresco e principalmente do sêmen criopreservado dos animais.

Referências

- AHMADI, A.; NG, S. C. Fertilizing ability of DNA-damaged spermatozoa. **The Journal of Experimental Zoology**, Hoboken, v. 284, p. 696-704, Nov. 1999.
- AITKEN, R. J. The Amoroso lecture: the human spermatozoon-a cell in crisis? **Journal of Reproduction and Fertility**, North Yorkshire, v. 115, p. 1-7, Jan. 1999.
- BORINI, A.; TAROZZIL, N.; BIZZARO, D.; BONUL, M. A.; FAVAL, L. F.; FLAMIGNI, C.; COTICCHIOL, G. Sperm DNA fragmentation: paternal effect on early post-implantation embryo development in ART. **Human Reproduction**, Oxford, v. 21, n. 11, p. 2876-2881, Nov. 2006.

BRAUDE, P.; BOLTON, V.; MOORE, S. Human gene expression first occurs between the four- and eight-cell stages of preimplantation development. **Nature**, London, v. 332, p. 459-461, Mar. 1988.

COLLINS, A. R.; DOBSON, V. L.; DUSINSKÁ, M.; KENNEDY, G.; ST-TINA, R. The comet assay: what can it really tell us? **Mutation research**, AL Leiden, v. 375, p. 183-193, Apr. 1997.

CÓRDOVA-IZQUIERDO, A.; OLIVA, J.; HLEÓ, B.; GARCÍA-ARTIGA, C.; DORIS CORCUERA B.D.; PÉREZ-GUTIÉRREZ, J. F. Effect of different thawing temperatures on the viability, in vitro fertilizing capacity and chromatin condensation of frozen boar semen packaged in 5 mL straws. **Animal Reproduction Science**, Atlanta, v. 92, p. 145-154, Mar. 2006.

DADOUNE, J. P. Expression of mammalian spermatozoal nucleoproteins. **Microscopy Research and Technique**, Hoboken v. 61, p. 56-75, May 2003.

DE YEBRA, L.; BALLESCA, J. L.; VANRELL, J. A.; CORZETT, M.; BALHORN, R.; OLIVA, R. Detection of P2 precursors in the sperm cells of infertile patients who have reduced protamine 2 levels. **Fertility and Sterility**, Atlanta, v. 69, p. 755-759, Apr. 1998.

DURAN, E. H.; GURGAN, T.; GUNALP, S.; ENGINSU, M. E.; YARALI, H.; AYHAN, A. A logistic regression model including DNA. **Human Reproduction**, Oxford, v. 13, p. 1235-1239, Feb. 1998.

EVENSON, D. P. Loss of livestock breeding efficiency due to uncompensable sperm nuclear defects. **Reproduction Fertility and Development**, Collingwood, v. 11, p. 1-15, Nov. 1999.

EVENSON, D. P.; DARZYNKIEWICZ, Z.; MELAMED, M. Relation of mammalian sperm chromatin heterogeneity to fertility. **Science**, Washington, v. 240, p. 1131-1133, Dec. 1980.

EVENSON, D. P.; JOST, L. K.; MARSHALL, D.; ZINAMAN, M. J.; CLEGG, E.; PURVIS, K.; DE ANGELIS, P.; CLAUSSEN, O. P. Utility of the sperm chromatin structure assay as a diagnostic and prognostic tool in the human fertility clinic. **Human Reproduction**, Oxford, v. 14, p. 1039-1049, Apr. 1999.

EVENSON, D. P.; LARSON, K. L.; JOST, L. K. Sperm chromatin structure assay: its clinical use for detecting sperm DNA fragmentation in male infertility

and comparisons with other techniques. **Journal of Andrology**, Madison, v. 23, p. 25-43, Jan. 2002.

HAAF, T.; WARD, D. C. Higher order nuclear structure in mammalian sperm revealed by in situ hybridization and extended chromatin fibers. **Experimental Cell Research**, Atlanta, v. 219, p. 604-611, Aug. 1995.

HOST, E.; LINDENBERG, S.; SMIDT-JENSEN, S. DNA strand breaks in human spermatozoa: correlation with fertilisation in vitro in oligozoospermic men and in men with unexplained fertility. **Acta Obstetricia et Gynecologica Scandinavica**, Copenhagen, v. 79, p.189-193, Mar. 2000.

IRVINE, D. S.; TWIGG, J. P.; GORDON, E. L.; FULTON, N.; MILNE, P. A.; AITKEN, R. J. DNA integrity in human spermatozoa: relationships with semen quality. **Journal of Andrology**, Madison, v. 21, p. 33-44, Feb. 2000.

KARABINUS, D. S.; VOGLER, C. J.; SAACKE, R. G.; EVENSON, D. P. Chromatin structural changes in sperm after scrotal insulation of Holstein bulls. **Journal of Andrology**, Madison, v. 18, p. 549-555, Oct. 1997.

KORNBERG, R. D. Chromatin structure: repeating unit of histones and DNA. **Science**, Washington, v.184, p. 868-871, May 1974.

LARSON-COOK, K. L.; BRANNIAN, J. D.; HANSEN, K. A.; KASPERSON K. M. Relationship between the outcomes of assisted reproductive techniques and sperm DNA fragmentation as measured by the sperm chromatin structure assay. **Fertility and Sterility**, Atlanta, v. 80, p. 895-902, Oct. 2003.

LOIR, M.; BOUVIER, D.; FORNELLS, M.; LANNEAU, M.; SUBIRANA, J. A. Interactions of nuclear proteins with DNA during sperm differentiation in the ram. **Chromosoma**, Berlin, v. 92, p. 304-312, Feb. 1985.

LOVE, C. C.; THOMPSON, J. A.; LOWRY, V. K.; VARNER, D. D. Effect of storage time and temperature on stallion sperm DNA and fertility. **Theriogenology**, Atlanta, v. 57, p. 1135-1142, Feb. 2002.

MADRID-BURY, N.; PÉREZ-GUTIÉRREZ, J. F.; PÉREZ-GARNELO, S.; MOREIRA, P.; PINTANDO, B.; GUTIÉRREZ-ADÁN, A. Relationship between non-return rate and chromatin condensation of deep frozen bull spermatozoa. **Theriogenology**, Atlanta, v. 64, p. 232-241, July 2005.

MARTINS, C. F.; BÁO, S. N.; DODE, M. N.; CORREA, G. A.; RUMPF, R. Effects of freeze-drying on cytology, ultrastructure, DNA fragmentation, and

fertilizing ability of bovine sperm. **Theriogenology**, Atlanta, v. 67, n. 8, p.1307-1315, May 2007a.

MARTINS, C. F.; DODE, M. N.; BÁO, S. N.; RUMPF, R. The use of the acridine orange test and the TUNEL assay to assess the integrity of freeze-dried bovine spermatozoa DNA. **Genetics and Molecular Research**, Ribeirão Preto, v. 6, n. 1, p. 94-104, Mar. 2007b.

MORRIS, I. D.; ILOTT, S.; DIXON, L.; BRISON, D. R. The spectrum of DNA damage in human sperm assessed by singlecell gel electrophoresis (Comet assay) and its relationship to fertilisation and embryo development. **Human Reproduction**, Oxford, v. 17, p. 990-998, Apr. 2002.

PERREAULT, S. D.; BARBEE, R. R.; ELSTEIN, K. H.; ZUCKER, R. M.; KEEFER, C. L. Interspecies differences in the stability of mammalian sperm nuclei assessed in vivo by sperm microinjection and in vitro by flow cytometry. **Biology Reproduction**, Madison, v. 39, p. 157-167, Aug. 1988.

POTTS, R. J.; NEWBURY, C. J.; SMITH, G.; NOTARIANNI, L. J.; JEFFERIES, T. M. Sperm chromatin changes associated with male smoking. **Mutation research**, AL Leiden, v. 423, p. 103-111, Jan. 1999.

PRIMAKOFF, P.; MYLES, D. G. Penetration, adhesion, and fusion in mammalian sperm-egg interaction. **Science**, Washington, v. 21, p. 2183-2185, June 2002.

SAKKAS, D.; URNER, F.; BIZZARO, D.; MANICARDI, G. C.; BIANCHI, P. G.; SHOUKIR, Y. CAMPANA, A. Sperm nuclear DNA damage and altered chromatin structure: effect on fertilization and embryo development. **Human Reproduction**, Oxford, v. 13, n. 4, p. 11-19, Dec. 1998.

SALEH, R. A.; AGARWAL, A.; SHARMA, R. K.; NELSON, D. R.; THOMAS, A. J. Effect of cigarette smoking on levels of seminal oxidative stress in infertile men: a prospective study. **Fertility and Sterility**, Atlanta, v. 78, p. 491-499, Sept. 2002.

WARD, W. S. The structure of the sleeping genome: implication of sperm DNA organization for somatic cells. **Journal of Cellular Biochemistry**, Hoboken, v. 55, p. 77-82, May 1994.

WARD, W. S.; ZALENSKY, A. O. The unique complex organization of the transcriptionally silent sperm chromatin. **Critical Reviews in Eukaryotic Gene Expression**, California, v. 6, p. 139-147, Jan. 1996.

WARD, W. S.; KISHIKAWA, H.; AKUTSU, H.; YANAGIMACHI, H.; YANAGIMACHI, R. Further evidence that sperm nuclear proteins are necessary for embryogenesis. **Zygote**, Cambridge, v. 8, p. 51-56, Feb. 2000.

WOLFFE, A. P. Transcriptional regulation in the context of chromatin structure. **Essays in Biochemistry**, Eagle House, v. 37, 45-57, 2001.

YANAGIMACHI, R. Stability of the mammalian sperm nucleus. **Zygote**, Cambridge, v. 2, p. 383-384, Nov. 1994.

YOUNG, K. E.; ROBBINS, W. A.; XUN, L.; ELASHOFF, D.; ROTHMANN, S. A.; PERREAULT, S. D. Evaluation of chromosome breakage and DNA integrity in sperm: an investigation of remote semen collection conditions. **Journal of Andrology**, Madison, v. 24, p. 853-861, Dec. 2003.

ZAVOS, P. M.; CORREA, J. R.; ANTYPAS, S.; ZARMAKOUPIZ-ZAVOS, P. N.; ZARMAKOUPIZ, C. N. Effects of seminal plasma from cigarette smokers on sperm viability and longevity. **Fertility and Sterility**, Atlanta, v. 69, p. 425-429, Mar. 1998.

ZHAO, M.; SHIRLEY, C. R.; YU, Y. E.; MOHAPATRA, B.; ZHANG, Y.; UNNI, E.; DENG, J. M.; ARANGO, N. A.; TERRY, N. H. A.; WEIL, M. M.; RUSSELL, L. D.; BEHRINGER, R. R.; MEISTRICH, M. L. Targeted disruption of the transition protein 2 gene affects sperm chromatin structure and reduces fertility in mice. **Molecular Cellular Biology**, Washington, v. 21, p. 7243-7255, Nov. 2001.

TUNEL Method: an alternative to assess the integrity of bovine spermatozoa DNA

Abstract

The success of the assisted reproductive techniques (ART) in both humans and domestic animals depends of the semen quality. Since there is no test that alone can predict sperm fertility, as more sperm parameters are analyzed during evaluation, more acurated will the result. The evaluation of the DNA integrity during the exam of bovine fresh and frozen sperm is of fundamental importance to avoid embryonic losses. The terminal deoxynucleotidyl transferase mediated dUTP nick end labeling assay (TUNEL) has been an efficient method to detect sperm DNA fragmentation, avoiding problems of embryonic development and decrease of the animal reproductive efficiency. This work presents and describes with the TUNEL technique (principles, advantages and detailed protocol), indicating this tool to evaluate the bovine sperm DNA.

Index terms: assisted reproduction, DNA integrity, spermatozoa.