

# Padrões de Expressão dos Receptores de D-manose em Espermatozóides de Homens Férteis

## *Patterns of Expression of D-mannose Receptors In Spermatozoa of Fertile Men*

**Carolina Fernanda Silveira**<sup>1</sup>  
**Paulo Augusto Neves**<sup>1,2</sup>  
**Francisco Antônio Techianti Fazano**<sup>1</sup>  
**Mara Aparecida de Lúcio**<sup>1</sup>  
**Sirlei Siani Morais**<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Laboratório de Reprodução Humana do Departamento

de Tocoginecologia; <sup>2</sup> Divisão de Urologia; <sup>3</sup> Setor de Estatística do Departamento de Tocoginecologia da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Campinas - São Paulo, Brasil

Recebido em: 22/09/2004

Avaliado e aceito em: 17/12/2004

### Abstracts

*The objective of the study was to evaluate the patterns of expression of D-mannose receptors at the surface of spermatozoa of fertile men, during capacitation and following induction of acrosomal reaction with incubation for 20 hours. Thirty patients who were candidate for vasectomy provided one semen sample before the surgery, after signing an informed consent. All men had normal general and urological physical exams and all samples met the normal criteria of the World Health Organization. All semen samples, after routine sperm analysis, were submitted to D-mannose test and to acrosomal reaction test according to the protocol proposed by Benoff et al. (1993a). All semen samples were evaluated at three different moments: after liquefaction and washing (0 hour), after swim-up (sperm processing) (1 hour), and after incubation of the samples for 20 hours, in order to induce acrosomal reaction (20 hour). Five main patterns of expression of D-mannose receptors with intact acrosome were observed. There was no statistical difference among the patterns in the three moments of observation. It was possible to establish normal patterns of expression of D-mannose receptors of normal fertile men that could be compared with semen samples from infertile men.*

**Key words:** male infertility; D-mannose receptors; acrosomal reaction

### Introdução

A fertilização em mamíferos é um processo complexo, dependente de reconhecimento e interação molecular entre a membrana plasmática do espermatozóide e a zona pelúcida do óvulo (Mori *et al.*, 1989; Tesarik *et al.*, 1991; Youssef *et al.*, 1996; Yavetz *et al.*,

Endereço para correspondência  
Carolina Fernanda Silveira  
Avenida Maria E. A. S. de Angelis, 121, Apto. 52/T2  
Campinas, 13440-901, SP, Brasil  
Tels: (19) 3276-6074/3243-1317  
e-mail: carolsilveira@mpcnet.com.br

2001; Flesh & Gadella, 2000). O fator masculino é responsável por 40 a 50% das causas de infertilidade e deve ser adequadamente avaliado. Análises espermáticas podem apresentar alterações quantitativas e qualitativas, podendo ser acompanhadas de estudos funcionais dos espermatozoides que detectam defeitos intrínsecos que podem ocorrer durante o processo de fertilização (Santos e Neves, 2002).

Estudos prévios em mamíferos mostraram que existe uma interação dependente entre os gametas masculino e feminino através de um carboidrato conhecido como D-manose, presente em altas concentrações na superfície dos óvulos. Na superfície dos espermatozoides existem receptores para este tipo de carboidrato, que, durante o processo de interação que precede a fertilização, liga-se à D-manose como um sistema chave-fechadura (Mori, 1989).

Os espermatozoides apresentam duas membranas, a plasmática (externa) e a acrossomal (interna). Durante o trajeto no trato feminino, os espermatozoides são capacitados e neste momento ocorre o efluxo de colesterol que está associado à exteriorização dos receptores de D-manose, possibilitando a interação com o óvulo, seguida da reação acrossomal, permitindo assim a entrada do espermatozoide na zona pelúcida do óvulo (Flesh & Gadella, 2000).

Vários estudos propuseram avaliar a presença de receptores de D-manose e também a reação acrossomal, como o protocolo proposto por Benoff *et al.* (1993a). Nesse trabalho, os resultados obtidos diferem de outros estudos realizados que utilizaram o mesmo protocolo, como os trabalhos descritos por Youssef *et al.* (1996) e Gamzu *et al.* (1998), que não apresentaram os mesmos padrões de expressão encontrados por Benoff e cols. Assim, fica inconclusivo um padrão específico para homens férteis.

O objetivo deste estudo foi avaliar os padrões de receptores de D-manose e integridade acrossomal de homens férteis e compará-los com os padrões encontrados nesses estudos anteriores, estabelecendo um padrão normal de expressão para o teste D-manose que poderá ser utilizado em casais que apresentarem esterilidade sem causa aparente (ESCA), sendo, assim, mais um teste para elucidar estes casos em que as alterações entre os gametas apresentam dificuldade de interação.

## Materiais e Métodos

O estudo foi realizado pela Divisão de Urologia e pelo Laboratório de Reprodução Humana do Departamento de Obstetrícia e Ginecologia do Centro de Atenção Integral à Saúde da Mulher (CAISM) da Universidade Estadual de Campinas (Unicamp), Campinas, São Paulo, Brasil. O Comitê de Ética aprovou o trabalho e todos os homens inscritos no programa de vasectomia que manifestaram interesse em participar deste estudo assinaram o consentimento informado. Estes homens foram examinados fisicamente por um urologista e, sendo considerados normais, doaram uma amostra de sêmen antes da cirurgia de vasectomia. Inicialmente as amostras de sêmen foram submetidas a avaliação, de acordo com os critérios da Organização Mundial de Saúde (2001), sendo excluídas as que não se encontravam dentro do padrão de normalidade. Trinta amostras foram selecionadas para este estudo.

Todas as amostras de sêmen, após análises, foram colocadas em tubo estéril de 15 ml e centrifugadas uma vez com PBS (*Dulbecco's phosphate-buffered saline*, Gibco BRL®, 14190-136), durante 10 minutos, a 300g. O sedimento formado após centrifugação foi ressuspenso em 1 ml de PBS, e uma alíquota de 192 µl foi retirada. Foi adicionado mais 1 ml de PBS e levado à centrifugação novamente. Sobre o sedimento formado foi adicionado cuidadosamente 1 ml, meio HTF Medium (Irvine #90125), com 10% de soro (SSS – Irvine #99193) e submetido ao processamento espermático *swim-up* utilizando uma estufa com 5% de CO<sub>2</sub>. Após uma hora de incubação, uma alíquota de 192 µl foi retirada. A incubação foi estendida durante 20 horas e outra alíquota de 192 µl foi coletada. As três alíquotas (zero hora, uma hora e 20 horas) foram submetidas aos testes D-manose e reação acrossômica. Todas as análises foram realizadas nos três momentos, utilizando-se um microscópio KS Zeiss equipado com epifluorescência. O teste de D-manose utilizou fluoresceína, Man-FITC-BSA (Sigma – A7790), que durante a observação no microscópio apresenta coloração verde maçã, e para o teste acrossomal foi utilizada fluoresceína RITC-PSA (Vector – RL – 1052), que apresentou coloração vermelha.

Durante a avaliação no microscópio foram contados cinco espermatozóides por campo, sendo avaliada primeiramente a integridade acrossomal, utilizando filtro com excitação de 545 BP, lâmpada 580 e filtro de barreira LP590. Mantendo o mesmo campo, houve troca do filtro de excitação para BP490, lâmpada 500 e filtro de barreira LP 515, para avaliar a expressão dos receptores de D-manose. Quando o espermatozóide apresentava expressão dos receptores de D-manose, registrava-se a região marcada. Foram avaliados 100 espermatozóides em cada um dos três momentos para cada doador (total de 3.000 espermatozóides em cada momento: zero, uma e 20 horas).

#### Teste D-manose

Em local escuro, após a primeira centrifugação da amostra de sêmen, foi adicionada uma alíquota de 192  $\mu$ l desta amostra em um microtubo previamente preparado contendo 8  $\mu$ l de solução-estoque de Man-FITC-BSA, cuja concentração final deve ser igual a 100  $\mu$ g/ml. Este tubo foi incubado por 30 minutos em estufa de 5% CO<sub>2</sub> a 37° C. Após este período foram adicionados 800  $\mu$ l de PBS (completando o volume total de 1 ml) e centrifugados a 300 g durante 10 minutos. A centrifugação foi repetida e o sedimento ressuspenso em 50  $\mu$ l de PBS para realizar um esfregaço em lâmina, que secou em temperatura ambiente. Todas as lâminas foram lidas em microscópio equipado com epifluorescência.

#### Teste da Reação Acrossômica

Em local escuro, cada lâmina previamente preparada com o teste D-manose foi tratada com metanol durante 30 segundos e secou em temperatura ambiente. Em seguida foi corada durante 30 minutos em câmara úmida com a solução rodamina (RITC-PSA, laboratório Vector, CA, RL – 1052). Esta solução foi alíquotada em vários microtubos, com 8  $\mu$ l cada. No momento da coloração foram adicionados 208  $\mu$ l de solução PBS em cada um, mantendo a concentração final da solução em 100  $\mu$ g/ml. Após o período da coloração, as lâminas foram lavadas duas vezes em PBS e secas em temperatura ambiente. No momento da leitura em micros-

cópio equipado com epifluorescência, as lâminas receberam glicerol, foram montadas com lamínulas e selanizadas com esmalte incolor.

Trezentos espermatozóides foram analisados em cada momento. Os padrões de expressão de receptores para D-manose eram avaliados juntamente com o *status* acrossomal, sendo observado se a membrana acrossomal estava intacta ou não (Figura 1). Os resultados foram analisados com o teste não paramétrico de Wilcoxon para dados assimétricos (Conover, 1999). Foram comparadas as amostras iniciais, após uma hora e 20 horas de incubação, utilizando um valor médio com 95% de confiança para determinar o padrão de expressão de receptores de D-manose e membrana acrossomal íntegra.

## Resultados

Analisando os dados, observamos uma reação acrossômica significativa nos espermatozóides após 20 horas de incubação. Comparamos o total de espermatozóides reagidos entre as amostras inicial e de 20 horas e as amostras de uma e 20 horas de incubação, confirmando a indução da reação acrossômica após 20 horas de incubação (Tabela 1).

A expressão dos receptores para D-manose, independente do *status* acrossomal, foi observada em 18,0% dos espermatozóides nas amostras iniciais, 20,5% após uma hora de incubação e 26,5% após 20 horas de incubação (Gráfico 1).

O padrão de expressão de receptores de D-manose, cuja membrana acrossomal apresentou-se intacta, foi de 4,0% no momento inicial, 5,5% após uma hora e 5,0% nas amostras após 20 horas de incubação, não sendo estatisticamente significativo (Tabela 2).

Foram observados neste estudo cinco padrões de expressão de receptores de D-manose em espermatozóides com acrossoma intacto (Figura 2):

Padrão 1: peça intermediária: 25,1%

Padrão 2: contorno da cabeça: 12,2%

Padrão 3: todo o corpo: 12,2%

Padrão 4: região equatorial: 7,6%

Padrão 5: toda a cabeça: 6,3%

Outros padrões: 36,6%

**Tabela 1**  
**Comparação Entre as Amostras Inicial (0 h), Após Processamento (1 h) e Após Incubação (20 h), em Relação ao Status Acrossomal ( $p < 0,5$ )**

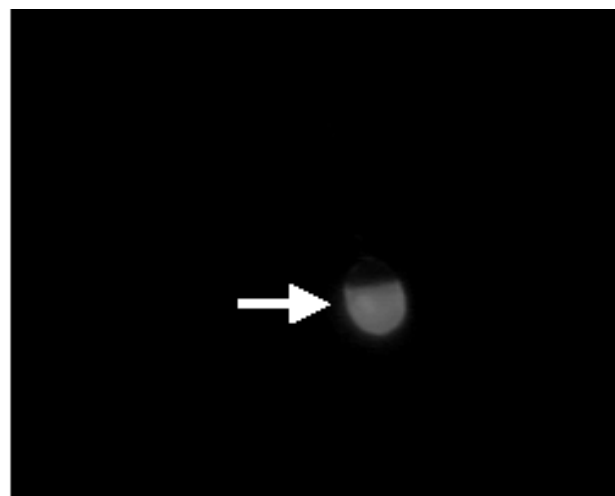
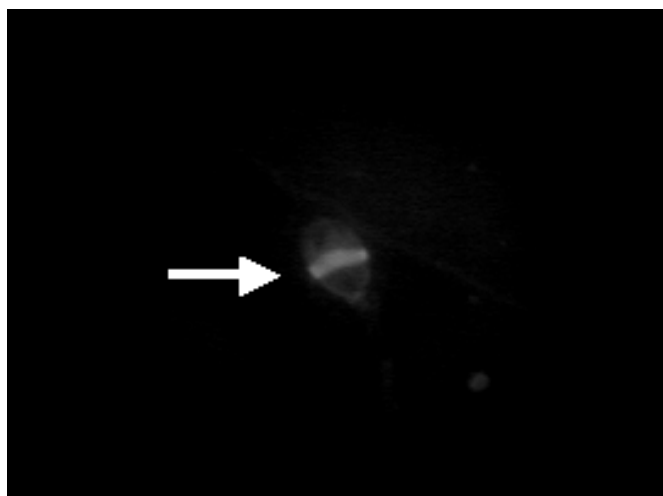
Status acrossomal	Zero hora	$p^*$	1 hora	$p^*$	20 horas
Acrossoma intacto	49,5	0,8887	49,0	0,0018	38,0
Acrossoma reagido	50,5	0,8887	51,0	0,0018	62,0

\* Teste de Wilcoxon.

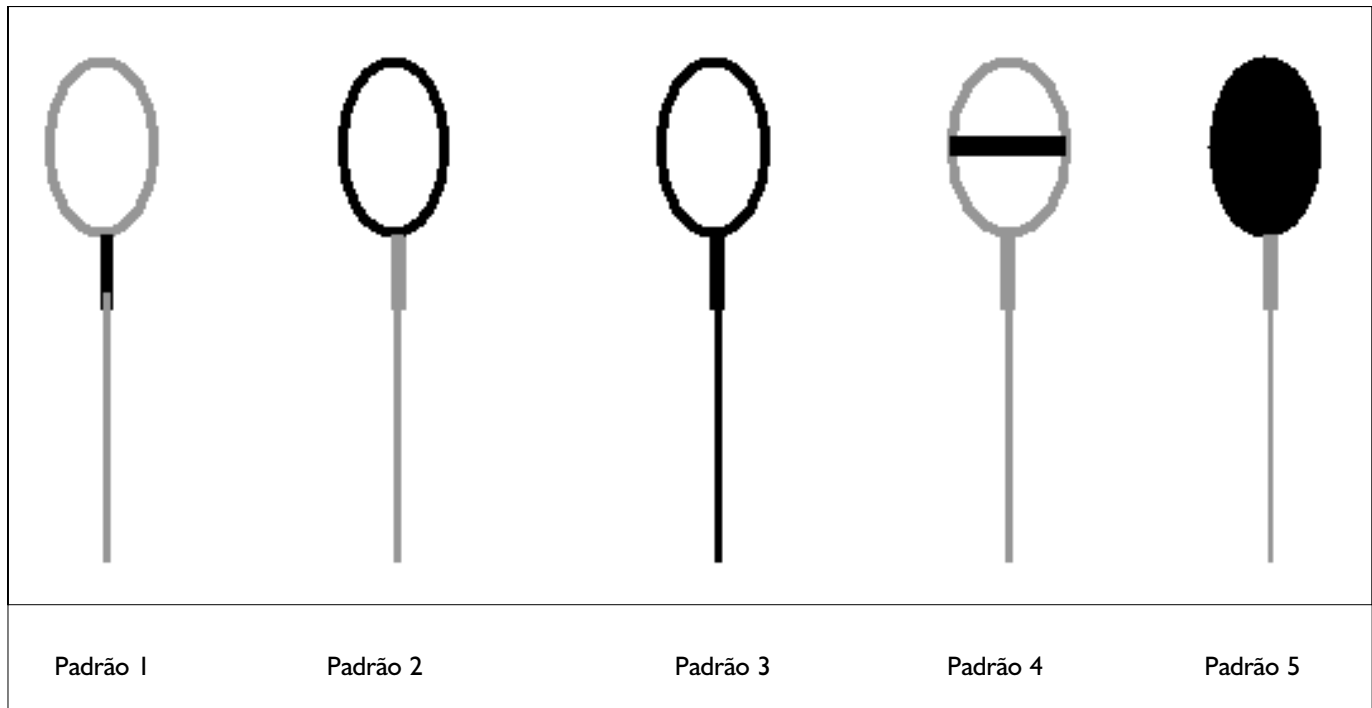
**Tabela 2**  
**Comparação Entre a Amostra Inicial (0 h), Após Processamento (1 h) e Após Incubação (20 h), Correlacionando a Integridade Acrossomal e a Presença de Sítios Receptores de D-manose ( $p < 0,05$ )**

Padrões encontrados	Amostra 0 h	Valor $p^*$	Amostra 1 h	Valor $p^*$	Amostra 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



**Figura 1** – Status acrossomal visualizado pelo corante rodamina. A: espermatozóide com acrossoma reagido, apresentando uma faixa na região acrossomal. B: espermatozóide com acrossoma íntegro.



**Figura 2** – Padrões de expressão de sítios receptores de D-manose mais visualizados: Padrão 1: somente a peça intermediária. Padrão 2: somente contorno da cabeça marcada. Padrão 3: contorno de todo o corpo. Padrão 4: somente a região equatorial marcada. Padrão 5: cabeça toda marcada.

## Discussão

O espermatozóide sofre algumas modificações antes de encontrar o óvulo que o torna apto ao processo de fertilização. O primeiro evento é a capacitação, ou seja, uma série de alterações bioquímicas e estruturais na membrana plasmática, permitindo a interação do espermatozóide com o óvulo (Moore & Persaud, 2000; Santos & Neves, 2002). Esta interação ocorre após o influxo de colesterol e exposição dos receptores de D-manose (Benoff *et al.*, 1993b).

Tesarik *et al.* (1991) propuseram quatro padrões de expressão de receptores de D-manose, comparando homens férteis e inférteis. As amostras de sêmen foram analisadas após duas centrifugações, após uma hora e quatro horas de incubação. Os autores consideraram o período de indução para reação acrossomal de quatro horas suficiente, porém não encontraram um padrão normal para homem fértil.

Benoff *et al.* (1993a) correlacionaram o teste da D-manose com a reação acrossomal utilizando amostras de sêmen de homens férteis candidatos do programa de fertilização *in vitro* (FIV). Eles propuseram

três momentos no estudo: zero hora, uma hora e 20 horas de incubação. No presente trabalho foi usado o protocolo proposto pelos autores já citados, mas com poucas alterações: a centrifugação inicial da amostra de sêmen foi feita em 10 minutos utilizando PBS e a técnica de *swim-up* foi realizada utilizando HTF *medium* suplementado com 10% de soro (SSS). A incubação do teste de D-manose foi estendida para 30 minutos, desde que nós observamos a não coloração dos receptores utilizando o período proposto pelo estudo de 15 minutos. Os padrões descritos por Benoff *et al.* foram diferentes dos obtidos em nosso trabalho.

Youssef *et al.* (1996) compararam amostras de sêmen de homens férteis com amostras de homens inférteis, correlacionando os padrões obtidos nos testes D-manose e reação acrossomal com a morfologia dos espermatozóides, utilizando o critério estrito de Kruger. Eles correlacionaram alterações na expressão dos receptores de D-manose com morfologia anormal. Gamzu *et al.* (1998) avaliaram a expressão dos receptores de D-manose e a habilidade de interação do espermatozóide em penetrar o óvulo utilizando o

teste da hemizona. Eles compararam homens férteis com inférteis e descreveram três padrões de expressão, sendo que alguns destes foram observados em nosso estudo. Também foi feita uma correlação entre a expressão dos receptores de D-manose com a morfologia, seguindo o mesmo trabalho proposto anteriormente por Youssef *et al.* (1996), mas não encontraram os mesmos cinco padrões descritos pelo mesmo.

Em nosso trabalho, determinamos o período de 20 horas de incubação como adequado para induzir a reação acrossômica. Não houve alterações na expressão dos receptores de D-manose entre as amostras inicial, de uma hora e 20 horas de incubação, como pudemos observar nos dados: 4,0%, 5,5% e 5,0%, respectivamente, em espermatozóides com acrosso-soma intacto.

Cinco padrões foram determinados para amostras de sêmen de homens férteis: Padrão 1: somente peça intermediária, 25,1%; Padrão 2: contorno da cabeça, 12,2%; Padrão 3: todo o corpo marcado, 12,2%; Padrão 4: somente a região equatorial, 7,6%; e Padrão 5: somente a cabeça, 6,3%; outros padrões: 36,6%, sendo estes observados durante os três períodos do estudo, mas não faziam parte de algum padrão específico e também não foram observados com frequência.

Nossos padrões não foram os mesmos descritos por Benoff *et al.* (1993) e por Tesarik *et al.* (1991).

O presente trabalho realizou os testes D-manose e reação acrossômica em amostras de sêmen de homens férteis, na tentativa de definir padrões de expressão de receptores de D-manose. Após análise dos dados, concluímos que a expressão dos receptores de D-manose é independente do *status* acrossomal, pois a incubação de 20 horas foi suficiente para induzir a reação acrossômica, mas não alterou a porcentagem de espermatozóides intactos que expressaram receptores para D-manose.

Assim, uma vez estabelecidos os padrões de expressão de receptores de D-manose para homens férteis, o teste poderá ser aplicado em homens considerados inférteis, com alguma patologia associada, além de casais com falha em ciclos de FIV convencional que poderão apresentar possíveis alterações na

expressão dos receptores de D-manose, justificando a indicação de ICSI. A inclusão do teste D-manose padronizado poderá tornar-se uma atitude valiosa para ampliar a investigação da infertilidade masculina.

## Resumo

O objetivo do estudo foi avaliar os padrões de expressão dos receptores de D-manose presentes na superfície dos espermatozóides de homens férteis, durante a capacitação e após a indução da reação acrossômica, incubando as amostras durante 20 horas. Trinta pacientes candidatos do programa de vasectomia doaram uma amostra de sêmen antes de realizarem a cirurgia e assinaram o consentimento informado. Todos os homens considerados férteis passaram por exames físicos e todas as amostras apresentaram-se dentro dos critérios de normalidade propostos pela Organização Mundial de Saúde. Todas as amostras de sêmen, após as análises de rotina, foram submetidas aos testes D-manose e de reação acrossômica, de acordo com o protocolo proposto por Benoff *et al.* (1993a.) Todas as amostras de sêmen foram avaliadas em três diferentes momentos: após liquefação e lavagem (zero hora), após técnica de processamento espermático *swim-up* (uma hora) e após incubação por 20 horas, para induzir a reação acrossômica (20 horas). Cinco tipos de padrões de expressão de receptores de D-manose com acrosso-soma intacto foram observados, não havendo diferença estatística entre os padrões nos três momentos observados. Assim, foi possível estabelecer padrões normais de expressão de receptores de D-manose para homens férteis, podendo ser comparados com amostras de homens inférteis.

---

**Unitermos** infertilidade masculina; receptores de D-manose; reação acrossomal.

---

## Agradecimentos

À Sra. Cyleny Camargo, pela revisão lingüística e ortográfica, e ao Professor Dr. Luís G. Bahamondes, pela revisão final.

## Referências

1. BENOFFS, COOPER GW, HURLEY I, NAPOLITANO B, OSENFELD DL, SCHOLL GM *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.
2. BENOFF S, HURLEY I, COOPER GW, MANDEL FS, HERSHLAG A, SCHOLL GM *et al.* – Fertilization potential in vitro is correlated with heads specific mannose-ligand receptor expression, acrosome status and membrane cholesterol content. *Hum Reprod.*, 8:2155-66, 1993 b.
3. CONOVER WJ – Practical nonparametric statistics. New York: Wiley, 1999.
4. FLESCHE FM, GADELLA MB – Dynamics of the mammalian sperm plasma membrane in the process of fertilization. *Bioch. Biophys. Acta.*, 1469:197-235, 2000.
5. GAMZU R, YOGEV L, KLEIMAN S, BOTCHAN A, HAUSER R, LESSING JB *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.
6. MOORE KL, PERSAUD TVN (eds) – Embriologia clínica. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p 15-43, 2000.
7. MORI K, DAITOH T, IRAHARA M, KAMADA M, AONO T – Significance of D-mannose as a sperm receptor site on the zona pellucida in human fertilization. *Am J Obstet Gynecol.*, 161:207-11, 1989.
8. 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.
9. SANTOS JRF, NEVES PA – Capacitação e reação acrossômica In: NEVES P, RODRIGUES NETTO JR., N. Infertilidade masculina. São Paulo: Atheneu; p.45-8, 2002.
10. 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.
11. YAVETZ H, ROSENBLAT Y, YOGEV L, BOTCHAN A, LESSING JB, 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.
12. YOUSSEF HM, DONCEL GF, BASSIOUNI BA, ACOSTA AA – Mannose binding sites on human spermatozoa and sperm morphology. *Fertil Steril.*, 66:640-5, 1996.



# Congresso Geral

## 8 a 10 de abril de 2005

**Como parte do Programa de Educação Continuada, a REDE realizará de 08 a 10 de Abril de 2005 o VII Congresso Geral da Rede Latino-americana de Reprodução Assistida na Ilha de Itaparica – Bahia, evento que contará com aproximadamente 500 profissionais de toda América Latina, com a presença de renomados professores que abordarão assuntos atuais sobre as técnicas de reprodução assistida.**

A Rede Latino-americana de Reprodução Assistida (REDE) é uma associação científica que reúne mais de 90% dos centros que realizam técnicas de reprodução assistida na América Latina. Formada em 1995, com a participação de 50 centros, atualmente possui um total de 110 centros acreditados e associados.

### Entre os objetivos da REDE, os principais são:

- Elaboração e publicação anual do Registro Latinoamericano;
- Treinamento e educação a profissionais da área de reprodução assistida, através do Programa de Educação Continuada;
- Difusão de documentos técnicos e legais;
- Manutenção de um programa de controle de qualidade e acreditação dos centros integrantes.

Informações: [www.redlara.com](http://www.redlara.com)

Inscrições: LM Eventos – [congresso@lmeventos.com.br](mailto:congresso@lmeventos.com.br)



Red Latinoamericana  
de Reprodução Assistida