

Correlação entre métodos de avaliação da integridade da membrana plasmática do espermatozóide bovino criopreservado

Correlation among methods to evaluate sperm membrane integrity of bovine cryopreserved sperm

ZÚCCARI, Carmem Estefânia Serra Neto^{1*}; LEITE, Patrícia Arakaki²; PASSOS, Thaíse Silva², CARRIJO, Paula Rosa²; KIEFER, Charles²

¹Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Departamento de Zootecnia, Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brasil.

²Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brasil.

*Endereço para correspondência: zuccari@nin.ufms.br

RESUMO

O objetivo, com este trabalho, foi verificar a correlação entre métodos de avaliação da integridade da membrana plasmática (IMP), no sêmen congelado comercial de cinco touros da raça Nelore, com três repetições por animal. Após o descongelamento a 37°C/30 segundos, foram analisadas as variáveis motilidade (%), concentração ($\times 10^6/\text{ml}$), morfologia (%) e IMP. Para a avaliação da IMP, foram usados o teste hiposmótico (HOS), fluorescência (FLU) e eosina/nigrosina (EN), e contadas 100 células/lâmina. Os dados foram submetidos à análise de correlação de Pearson. Houve correlação entre as técnicas de fluorescência vs eosina/nigrosina ($r = 0,74$; $p < 0,0013$), fluorescência vs teste hiposmótico ($r = 0,71$; $p < 0,0029$) e correlação de média intensidade entre eosina/nigrosina vs teste hiposmótico ($r = 0,59$; $p < 0,0202$). Houve correlação entre motilidade e fluorescência ($r = 0,70$; $p < 0,0036$); teste hiposmótico ($r = 0,78$; $p < 0,0006$) e eosina/nigrosina ($r = 0,52$; $p < 0,0436$). Concluiu-se que os métodos hiposmótico, da fluorescência e eosina/nigrosina foram eficazes para a avaliação da integridade da membrana plasmática do espermatozóide congelado de touro, e a escolha do mais indicado dependerá da disponibilidade de equipamentos de cada laboratório.

Palavras-chave: eosina/nigrosina, fluorocromos, teste hiposmótico, sêmen, touro

SUMMARY

It were established correlations among methods of sperm plasmatic membrane evaluation, by analyzing cryopreserved semen of five Nelore bulls, within three replicates / bull. After thawing at 37°C/30 seconds, there were assessed motility (%), concentration ($\times 10^6$), morphology (%) and membrane integrity. To evaluate membrane integrity, hypoosmotic test (HOS), fluorescence (FLU) and eosin/nigrosin (EN) were used. Data were submitted to Pearson's correlation analysis. According to the results, there was correlation between fluorescence vs eosin/nigrosin ($r = 0.74$; $p < 0.0013$), fluorescence vs hypoosmotic test ($r = 0.71$; $p < 0.0029$) and eosin/nigrosin vs hypoosmotic test ($r = 0.59$; $p < 0.0202$). There was also correlation among motility and fluorescence ($r = 0.70$; $p < 0.0036$), hypoosmotic test ($r = 0.78$; $p < 0.0006$) and eosin/nigrosin ($r = 0.52$; $p < 0.0436$). We conclude that the three methods were efficacious in evaluating plasmatic membrane integrity of bovine frozen-thawed spermatozoa, and each laboratory could make its choice according to disposable equipments.

Keywords: bull, eosin/nigrosina, fluorochromes, hypoosmotic test, semen

INTRODUÇÃO

Os testes utilizados na rotina de análise do sêmen congelado de touros consistem, basicamente, na avaliação da concentração, morfologia e motilidade espermáticas (CBRA, 1998), porém essas, não são conclusivas em atestar a fertilidade das doses de sêmen. A análise de apenas uma variável, muitas vezes, não detecta uma associação com a fertilidade e, dessa forma, a associação de testes permite obter resultados mais confiáveis (LARSSON & RODRIGUEZ-MARTINEZ, 2000; PEREZ et al., 1997).

Para Pintado et al. (2000), um dos principais parâmetros a ser considerado na avaliação da fertilidade do macho, ou na análise dos métodos de preservação espermática, é o estudo da viabilidade do espermatozóide. Testes para avaliar a integridade da membrana plasmática do espermatozóide incluem a permeabilidade a corantes e a análise da função bioquímica, cujos resultados variam de acordo com o método utilizado (BRITO et al., 2003).

O teste hiposmótico foi desenvolvido para avaliar a atividade bioquímica da membrana plasmática. Em condições de hiposmolaridade, as trocas de fluidos realizadas pela membrana plasmática têm continuidade até que o equilíbrio osmótico seja atingido. Devido ao influxo de líquido, a membrana plasmática se expande, e causa o aumento do volume da célula, especialmente na região da cauda, o que provoca enrolamento (CORREA & ZAVOS, 1994; ROTA et al., 2000).

Na técnica de fluorescência, é utilizada a associação de dois fluorocromos. O iodeto de propídeo atravessa a membrana plasmática lesada, ligando-se ao DNA da célula, e o diacetato de 6-

carboxifluoresceína penetra através da membrana íntegra e é hidrolisado por esterases não específicas, que produz fluoresceína, a qual fica retida por mais tempo dentro da célula (BRITO et al., 2003).

A eosina é um corante supra vital que, ao penetrar na membrana plasmática lesada, liga-se aos ácidos nucléicos, e confere uma coloração rosa ao espermatozóide lesado (BRITO et al., 2003; BRITO, 2007).

Buscou-se, no presente trabalho, determinar as correlações entre métodos de avaliação da integridade da membrana plasmática do espermatozóide bovino criopreservado. Para tanto, foram empregados o teste hiposmótico, a fluorescência e eosina/nigrosina.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizadas doses de sêmen congelado provenientes de cinco touros da raça Nelore, e realizou-se três repetições por touro, com doses da mesma partida. O descongelamento das palhetas de 0,5 ml foi feito por imersão em água a 37°C/30 segundos. As amostras foram submetidas às seguintes técnicas laboratoriais: teste hiposmótico (HOS); fluorescência (FLU) e eosina/nigrosina (EN). Foram analisadas as variáveis pós-descongelamento para motilidade, concentração e morfologia espermáticas, além da integridade da membrana plasmática.

A avaliação da motilidade foi realizada mediante a deposição de uma gota de sêmen sobre lâmina aquecida (35 a 37°C), recoberta por lamínula. O exame foi efetuado em microscópio de contraste de fase, nos aumentos de 100 e 400x, e os valores de motilidade foram expressos em porcentagem.

A análise da morfologia foi feita a partir de alíquotas que foram fixadas em formol salina, e montadas preparações úmidas para análise em microscopia de contraste de fase (1000x). Foram contadas 100 células por lâmina e a frequência de anormalidades de cabeça, peça intermediária e cauda, registradas como percentagem do total de células avaliadas. A concentração foi determinada por meio da contagem de células em Câmara de Neubauer, após diluição de 1:100 em água, e o número de espermatozoides, expresso por ml ($\times 10^6$).

Para a avaliação da integridade da membrana plasmática, foram utilizados três métodos.

Aplicou-se o teste Hiposmótico (HOS), em que a solução hiposmótica constituiu-se de citrato de sódio (7,35 g/l; Sigma-Aldrich) e frutose (13,51 g/l; Sigma-Aldrich), conforme técnica desenvolvida por Correa & Zanos (1994), com osmolaridade final ajustada para 110 mOsm/Kg.H₂O. Após a descongelação, o sêmen foi lavado por centrifugação, durante 10 minutos, com 2000 µl de sp-TALP, sem adição de albumina sérica bovina. Em tubete plástico, alíquotas de 100 µl de sêmen foram acrescidas de 500 µl da solução hiposmótica pré-aquecida e incubadas a 37°C/45 minutos. Após a incubação, 20 µl foram depositados sobre lâmina aquecida e, então, recobertos por lamínula. Foram contadas 100 células sob microscopia de campo claro em aumento de 1000x e feita uma correção pela dedução do número de caudas enroladas, encontradas na análise da morfologia pós-descongelação do total de caudas enroladas pós-teste hiposmótico.

Fluorescência (FLU): foi usada a associação dos fluorocromos iodeto de propídeo e diacetato de 6-carboxifluoresceína (NUNES et al., 2008).

A avaliação foi realizada no conteúdo entre lâmina e lamínula, em microscópio de epifluorescência modelo Axioskop (Carl Zeiss, Alemanha), com objetiva de 40x e campo visual de 20 mm. Para leitura, foram usados conjuntos de filtros de fluorescência 09 para excitação azul nos comprimentos de onda de 450-490 nm e, 15 para excitação verde H 546. Foram contadas 100 células, classificadas como íntegras – emissão de fluorescência verde e lesadas – núcleo fluorescendo em vermelho.

Eosina/Nigrosina (EN): alíquotas de 10 µl da solução corante foram adicionadas a 20 µl de sêmen. Após confecção do esfregaço e sob imersão em microscopia de campo claro (1000x), os espermatozoides com membrana plasmática lesada apresentaram o núcleo corado em rosa e foram classificados como mortos. Células coradas pela eosina apenas na região pós-acrossomal foram igualmente consideradas mortas. As células vivas, portanto, com membrana plasmática íntegra, não se coraram e sua visualização foi possível pelo contraste dado pela nigrosina (ZÚCCARI et al., 2008; BRITO, 2007; BRITO et al., 2003).

A existência de associação entre os métodos de avaliação da integridade da membrana plasmática e desses com a motilidade foi estudada com emprego da análise de correlação de Pearson, mediante o programa estatístico SAS (1996).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

De acordo com o Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA, 1998), para sêmen congelado de touros, a motilidade pós-descongelação deve ser superior a 30%, os defeitos maiores inferiores a 20%

e os defeitos totais não superiores a 30%. Neste trabalho, os percentuais médios encontrados para motilidade ($52,0 \pm 8,6$), defeitos maiores ($5,5 \pm 4,7$), menores ($9,3 \pm 6,3$) e totais ($15,8 \pm 5,5$) atendem ao preconizado pelo CBRA (1998) e estão de acordo com os registros encontrados por outros pesquisadores para a espécie (CORREA & ZAVOS, 1994; TARTAGLIONE & RITTA, 2004).

Anchieta et al. (2005) relatam que o sêmen de touros de raças taurinas apresentou melhor recuperação da motilidade ($p < 0,05$), do que o sêmen de touros zebuínos, após o processo de congelamento, com valores iguais a $41,5 \pm 7,7$ e $38,0 \pm 8,2\%$, respectivamente.

Neste experimento o número de células espermáticas móveis por dose foi o dobro do mínimo de 10×10^6 recomendado pelo CBRA (1998), para sêmen bovino congelado. A concentração média das doses de sêmen foi de $77,3 \pm 23,8 \times 10^6$ / ml.

Tanto a coloração pela eosina/nigrosina como pelo diacetato de 6-carboxifluoresceína + iodeto de propídeo, são indicadores de integridade da membrana plasmática, enquanto o teste hiposmótico demonstra sua atividade bioquímica (BRITO et al., 2003). Segundo Tartaglione & Ritta (2004), se a membrana estiver intacta, mas bioquimicamente inativa, não ocorrerá fecundação, portanto, o teste hiposmótico pode ser considerado mais acurado que a eosina/nigrosina.

Os percentuais médios de espermatozoides com membrana plasmática íntegra foram $19,2 \pm 9,9$, $33,7 \pm 11,4$ e $51,6 \pm 15,9$, para teste hiposmótico, fluorescência e eosina/nigrosina, respectivamente.

Os resultados obtidos estão de acordo com Brito et al. (2003), com relação à proporção de espermatozoides com membrana plasmática intacta, superestimada pela eosina/nigrosina em comparação aos valores obtidos com os corantes fluorescentes. Os autores consideraram como possível explicação, para essa diferença entre métodos, o tempo de exposição aos corantes, que variou de poucos segundos para eosina/nigrosina a 10 - 30 minutos, no caso dos corantes fluorescentes. No presente estudo, as amostras foram expostas à eosina/nigrosina por cerca de 30 segundos, conforme preconizado por Barth & Oko (1989). Para os corantes fluorescentes, a exposição se deu por um período máximo de 45 minutos. Assim, a leitura das amostras deste trabalho não excedeu o tempo recomendado, e obtiveram-se valores similares aos relatados por Pintado et al. (2000), que encontraram maior percentual de células lesadas coradas pelo iodeto de propídeo ($58,0 \pm 4,4$) do que pela eosina/nigrosina + Giemsa ($42,0 \pm 3,9$).

Quando submetidos ao choque hiposmótico, o percentual médio de gametas com cauda enrolada ($19,2 \pm 9,9$) foi inferior aos relatados na literatura para sêmen bovino congelado, de $48 \pm 4,7$ (CORREA & ZAVOS, 1994), $43,8 \pm 13,4$ (ROTA et al., 2000), $58,8 \pm 2,6$ (TARTAGLIONE & RITTA, 2004), $37,9 \pm 7,9$ (SIQUEIRA et al., 2007).

Foi observada correlação significativa entre os métodos quanto ao número de células íntegras e desses com a motilidade pós-descongelamento (Tabela 1).

Tabela 1. Coeficientes de correlação (r) entre os métodos de avaliação da integridade da membrana plasmática do espermatozóide criopreservado de touro e destes com a motilidade espermática

Correlações	r	Probabilidade
Motilidade vs Hiposmótico*	0,78	0,0006
Motilidade vs Fluorescência**	0,70	0,0036
Motilidade vs Eosina/Nigrosina	0,52	0,0436
Fluorescência vs Eosina/Nigrosina	0,74	0,0013
Fluorescência vs Hiposmótico	0,71	0,0029
Eosina/Nigrosina vs Hiposmótico	0,59	0,0202

*Hiposmótico = solução de citrato de sódio + frutose a 110 mOsm/Kg.H₂O

** Fluorescência = diacetato de 6-carboxifluoresceína + iodeto de propídeo

Dentre os atributos necessários para a fecundação, está a motilidade e esta é fundamental para que o espermatozóide percorra o trato reprodutivo feminino até sua ligação com o ovócito. Apesar de significativas, as correlações entre motilidade e fertilidade têm variado de 0,15 – 0,83 entre os estudos (JANUSKAUSKAS et al., 2000; RODRIGUEZ-MARTINEZ, 2005). No entanto, motilidade e morfologia ainda continuam como as características seminais mais usadas para estimar a fertilidade.

Os resultados do presente trabalho estão em concordância com Brito et al. (2003), que encontraram correlação entre o teste hiposmótico e eosina/nigrosina ($r = 0,55$; $p < 0,01$); hiposmótico e fluorescência ($r = 0,59$; $p < 0,01$); entre eosina/nigrosina e fluorescência ($r = 0,92$; $p < 0,01$). Observou-se maior proporção de células com membrana plasmática íntegra submetidas a coloração com eosina/nigrosina, do que pela fluorescência e teste hiposmótico ($p < 0,0001$). Da mesma forma, Perez et al. (1997) obtiveram correlação entre fluorescência e teste hiposmótico ($r = 0,53$) e mencionaram que os maiores coeficientes foram obtidos entre

fluorescência e qualquer outro parâmetro, de maneira semelhante ao observado no presente estudo, em que houve altas correlações entre essa técnica e as demais. Também foi detectada correlação significativa entre espermatozóides com membrana íntegra mediante a eosina/nigrosina e teste hiposmótico ($r = 0,81$), em trabalho realizado por Correa & Zavos (1994), em que essa foi superior à encontrada no presente trabalho ($r = 0,59$). Igualmente significativa foi a correlação relatada por Correa et al. (1997), entre fertilidade a campo e espermatozóide reativos ao teste hiposmótico. Seus resultados indicaram que touros de alta e baixa fertilidade apresentaram correlação com o hiposmótico ($r = 0,57$; $p < 0,01$), cujo número médio de espermatozóides com cauda enrolada foi significativamente maior ($p < 0,05$) nos touros de alta fertilidade ($41,9 \pm 7,3$) em relação aos de baixa ($31,7 \pm 9,9$).

No que se refere à correlação entre motilidade e integridade da membrana plasmática, pelas diferentes técnicas usadas, os resultados registrados neste estudo são similares aos de Perez et al. (1997), que obtiveram correlações entre fluorescência vs motilidade ($r = 0,54$) e

teste hiposmótico vs motilidade ($r = 0,43$), ao comparar técnicas para avaliação da qualidade espermática. Correa & Zavos (1994), da mesma forma, encontraram correlação entre motilidade e teste hiposmótico ($r = 0,73$).

Os resultados obtidos no presente estudo demonstram a correlação significativa existente entre as técnicas utilizadas, bem como entre as técnicas e a motilidade pós-descongelamento, o que indica a aplicabilidade das mesmas nas análises laboratoriais de rotina do sêmen congelado de touros.

Conclui-se que os métodos hiposmótico, da fluorescência e eosina/nigrosina foram eficazes para a avaliação da integridade da membrana plasmática do espermatozoide criopreservado de touros e que a escolha do mais indicado dependerá da disponibilidade de equipamentos de cada laboratório.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq pela concessão das bolsas de Iniciação Científica e de Mestrado.

REFERÊNCIAS

ANCHIETA, M.C.; VALE FILHO, V.R.; COLOSIMO, E.; SAMPAIO, I.B.M.; ANDRADE, V.J. Descarte e congelabilidade do sêmen de touros de raças zebuínas e taurinas em central de inseminação artificial no Brasil. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.57, n.2, p.196-204, 2005. [Links].

BRITO, L.F.C. Evaluation of stallion sperm morphology. **Clinical Techniques in Equine Practice**, v.6, p.249-264, 2007. [Links].

BRITO, L.F.C.; BARTH, A.D.; BILODEAU – GOESSELS, S.; PANICH, P.L.; KASTELIC, J.P. Comparison of methods to evaluate the plasmalemma of bovine sperm and their relationship with *in vitro* fertilization rate. **Theriogenology**, v.60, p.1539-1551, 2003. [Links].

COLÉGIO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL - CBRA. **Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal**. Belo Horizonte, 1998. 65p. [Links].

CORREA, J.R.; PACE, M.M.; ZAVOS, P.M. Relationships among frozen-thawed sperm characteristics assessed via the routine semen analysis, sperm functional tests and fertility of bulls in an artificial insemination program. **Theriogenology**, v.48, p.721-731, 1997. [Links].

CORREA, J.R.; ZAVOS, P.M. The hypoosmotic swelling test: its employment as an assay to evaluate the functional integrity of the frozen-thawed bovine sperm membrane. **Theriogenology**, v.42, p.351-360, 1994. [Links].

JANUSKAUSKAS, A.; GIL, J.; SÖDERQUIST, L.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Relationship between sperm response to glycosaminoglycans *in vitro* and non-return rates of Swedish dairy AI bulls. **Reproduction in Domestic Animal**, v.35, p.207-212, 2000. [Links].

LARSSON, B.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Can we use *in vitro* fertilization tests to predict semen fertility? **Animal Reproduction Science**, v.60-61, p.327-336, 2000. [Links].

NUNES, D.B.; ZORZATTO, J.R.; SILVA, E.V. C.; ZÚCCARI, C.E.S.N. Efficiency of short-term storage of equine semen in a simple-design cooling system. **Animal Reproduction Science**, v.104, p.434-439, 2008. [Links].

PEREZ, L.J.; VALCÁRCCEL, A.; HERAS, M.A.; BALDASSARRE, H. Comparative study of four techniques for evaluation of sperm quality in ovine and bovine frozen-thawed samples. **Reproduction in Domestic Animal**, v.32, p.157-160, 1997. [Links].

PINTADO, B.; FUENTE, J.; ROLDAN, E.R.S. Permeability of boar and bull spermatozoa to the nucleic acid stains propidium iodide or Hoechst 33258, or to eosin: accuracy in the assessment of cell viability. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.118, p.145-152, 2000. [Links].

RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Methods for sperm evaluation and their relationship to fertility. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL, 16, 2005, Goiânia, GO. **Anais...Goiânia, GO:Colégio Brasileiro de Reprodução**, 2005. [Links].

ROTA, A., PENZO, N., VICENTI, L., MANTOVANI, R. Hypoosmotic swelling test (HOS) as a screening assay for testing *in vitro* fertility of bovine spermatozoa. **Theriogenology**, v.53, p.1415-1420, 2000. [Links].

SAS INSTITUTE. **Statistical Analysis System: user's guide**. 4 ed. Cary: 1996. 1686p. [Links].

SIQUEIRA, J.B.; GUIMARÃES, J.D.; COSTA, E.P.; HENRY, M.; TORRES, C.A.A.; SILVA, M.V.G.B.; SILVEIRA, T.S. Relação da taxa de gestação com sêmen bovino congelado e testes de avaliação espermática *in vitro*. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.36, n.2, p.387-395, 2007. [Links].

TARTAGLIONE, C.M.; RITTA, M.N. Prognostic value of spermatological parameters as predictors of *in vitro* fertility of frozen-thawed bull semen. **Theriogenology**, v.62, p.1245-1252, 2004. [Links].

ZÚCCARI, C.E.S.N.; CARRIJO, P.R.; LEITE, P.A.; SCALDELAI, P.R.R.; RODOVALHO, N.C.M.; ZANENGA, C.A.; KIEFER, C.; COSTA E SILVA, E.V. Seleção em gradiente de *Percoll*® sobre os parâmetros espermáticos do sêmen bovino congelado. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v.9, n.2, p.358-366, 2008. [Links].

Data de recebimento: 08/12/2008
Data de aprovação: 21/07/2009