



## USO DE SONDAS DE EPIFLUORESCÊNCIA PARA A AVALIAÇÃO DE SÊMEN CRIOPRESERVADO BUBALINO

Késya de Freitas Pereira<sup>1</sup>, Alexandre Rossetto Garcia<sup>2</sup>, Benjamim de Sousa Nahúm<sup>3</sup>,

Priscila dos Reis Kahwage<sup>4</sup>

<sup>1</sup> Acadêmica de Medicina Veterinária (UFRA) e Bolsista Pibic Embrapa Amazônia Oriental; kesya\_kx@hotmail.com

<sup>2</sup> Pesquisador A em Biotecnologia da Reprodução Animal, Embrapa Pecuária Sudeste; argarcia@cppse.embrapa.br

<sup>3</sup> Pesquisador B em Sistemas de Produção Animal, Embrapa Amazônia Oriental; nahum@cpatu.embrapa.br

<sup>4</sup> Dotoranda em Ciência Animal (PPGCAN - UFPA/Embrapa/UFRA); priscila.kahwage@hotmail.com

**Resumo:** Este ensaio foi realizado para avaliar o uso de sondas fluorescentes isoladas na avaliação de sêmen criopreservado bubalino. Foram usadas as sondas SYBR-14 e H342 para avaliação de integridade de membrana plasmática e MITO para avaliação do potencial mitocondrial. Após descongelamento e ressuspensão celular, uma alíquota de cada amostra seminal foi submetida ao congelamento rápido em nitrogênio líquido (*flash-frozen*), originando três tipos de subamostras (n=18): controle (C), controle+flash-frozen (CF) e *flash-frozen* (FF). A capacidade de detecção de injúrias foi avaliada e o método SYBR-14 foi comparado ao teste hiposmótico (HOS). A análise foi realizada por ANOVA, seguida do teste de Tukey ( $P < 0,05$ ). Concluiu-se que as sondas de epifluorescência podem ser usadas na avaliação de sêmen bubalino, com destaque para SYBR-14 e MITO. A SYBR-14 foi mais sensível que HOS para avaliar a integridade de membrana plasmática.

**Palavras-chave:** epifluorescência, sêmen criopreservado, sondas fluorescentes

### Introdução

A criopreservação seminal é uma ferramenta fundamental para a reprodução assistida. Contudo, sua eficiência é parcial, pois parte dos espermatozoides sofre algum tipo de injúria durante os processos de congelação e/ou descongelação. Considerando o valor biológico e econômico do sêmen, é importante avaliar os danos impostos pela criopreservação, que podem levar à diminuição de células viáveis, aquelas que têm morfologia, atividade metabólica e membranas plasmáticas normais (ARRUDA, 2011). Como o potencial de fertilização depende da integridade e funcionalidade de diferentes estruturas espermáticas, o desenvolvimento de um único teste laboratorial para determinar a fertilidade seminal se torna difícil (GARCIA, 2005). Nesse sentido, os corantes fluorescentes (sondas epifluorescentes ou fluorocromos) são indicadores sensíveis e específicos da condição subcelular, podendo ser aplicados para mensurar alterações estruturais e metabólicas no interior das células.



Desse modo, o uso de sondas para avaliar a integridade da membrana plasmática, como o SYBR-14, é relevante. Esse fluorocromo tem especificidade ao DNA, atravessa a membrana plasmática íntegra e cora o núcleo dos espermatozoides em verde, tendo sido usado em associação com o iodeto de propídio, o qual cora as células com membrana lesada em vermelho (THOMAS et al., 1998). Já o Hoechst 33342 (H342) se liga especificamente ao DNA e marca em azul o núcleo da célula com membrana íntegra. Também podem ser usadas sondas que avaliam o potencial mitocondrial, como o MitoTracker Green FM (MITO) (CELEGHINE, 2005). Tendo em vista a escassez de informações sobre uso de sondas epifluorescentes em sêmen bubalino, o presente trabalho teve como objetivo investigar a viabilidade do uso isolado das sondas de epifluorescência SYBR-14, H342 e MITO na avaliação de sêmen criopreservado e comparar a eficiência das técnicas de SYBR-14 e HOS na detecção da integridade de membrana espermática.

### **Material e Métodos**

O experimento foi conduzido no Laboratório de Reprodução Animal, na UPA “Sen. Álvaro Adolpho”, Embrapa, Belém-PA. Amostras de sêmen congelado comercial de touros bubalinos (*Bubalus bubalis*) envasadas em palhetas plásticas de 0,25 mL foram utilizadas no ensaio. O sêmen foi descongelado e lavado. Após a ressuspensão celular, uma alíquota de cada amostra seminal foi submetida ao congelamento rápido em nitrogênio líquido (*flash-frozen*) para indução de crionjúrias e lesão das membranas espermáticas. Cada amostra seminal deu origem, portanto, a três tipos de subamostras (n=18) de volumes e concentração iguais: controle (C), controle+flash-frozen (CF) e flash-frozen (FF). As amostras foram submetidas concomitantemente a protocolos de coloração por sondas fluorescentes.

Para a avaliação fluorimétrica foram utilizadas três sondas: SYBR-14 (Molecular Probes), Hoechst 33342 (Sigma Aldrich) e MitoTracker Green FM (Molecular Probes), conforme Celeghine (2005). A leitura das colorações (7 µL) foi realizada em microscopia de epifluorescência, com filtro duplo F/R 96351 (excitação 475-494 e 545-565; barreira 503-533 e 582-622) e filtro triplo D/F/R 96355 (385-400, 475-493 e 545-565; barreira 450-465, 503-533 e 582-622). Duzentas células foram contadas por amostra e classificadas como tendo membrana plasmática íntegra ou lesada (SYBR-14 e H342) e quanto à presença ou ausência de potencial mitocondrial (MITO). Para o teste hiposmótico (HOS), 50µL de sêmen foram adicionados a 500µL da solução hiposmótica (citrato trissódico e frutose; 125 mOsm/L), sendo contadas e classificadas duzentas células, após incubação, conforme Fonseca et al. (2005). As análises estatísticas foram realizadas com o programa BioEstat 5.0. A



capacidade em detectar injúrias de cada sonda e a comparação de eficiência entre SYBR-14 e HOS foram avaliados por ANOVA, sendo as médias comparadas pelo teste de Tukey ( $P < 0,05$ ).

### Resultados e Discussão

Espermatozoides avaliados com SYBR-14 apresentaram fluorescência nítida, sem margem para dúvidas, pois células com integridade de membrana plasmática foram observadas em verde, enquanto células com membrana plasmática lesada foram observadas em vermelho, devido à coloração com iodeto de propídio, constante no *kit* adotado (Figura 1). A sonda MITO, por se ligar às mitocôndrias, destacadamente marcou a peça intermediária de células com potencial mitocondrial em verde brilhante, enquanto células sem potencial mitocondrial foram marcadas em verde opaco, conforme o esperado. O uso da sonda H342 não se mostrou satisfatório, já que não houve a emissão esperada, por ser uma sonda que marcaria em azul apenas células com integridade de membrana plasmática. Contudo, em todas as amostras foi observado grande número de células marcadas em azul, inclusive em FF, indicando que novos testes devem ser conduzidos para ajustes no uso de H342 em sêmen congelado bubalino. Pela inconsistência de resultados, o H342 foi excluído das análises estatísticas.

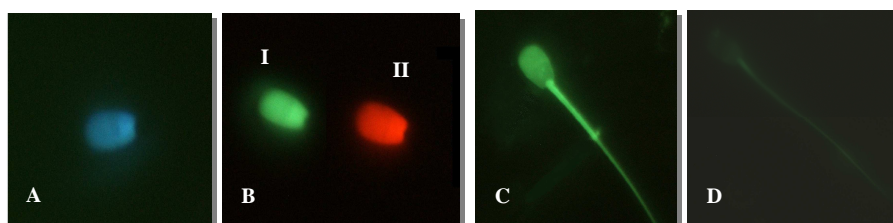


Figura 1: Fotomicrografia da epifluorescência de células espermáticas coradas pelas técnicas de H342 (A), SYBR-14 (B) e MITO (C, D). **A.** Célula com membrana plasmática intacta. **B.** I- Célula com membrana plasmática intacta, II- Célula com membrana plasmática lesada. **C.** Célula com potencial mitocondrial. **D.** Célula sem potencial mitocondrial.

Os resultados à análise com SYBR-14 foram semelhantes ao do teste hiposmótico para CF e FF (Tabela 1). Contudo, para o controle, a técnica de SYBR-14 apresentou maior nível de detecção de membranas espermáticas lesadas quando comparada ao HOS, a qual é uma técnica amplamente utilizada na rotina de avaliação seminal (ARRUDA, 2011). Isso mostra que SYBR-14 pode ser uma sonda segura para a avaliação seminal em bubalinos, com maior sensibilidade que HOS. A percentagem de células com integridade de membrana plasmática foi superior em C quando comparada a CF e FF, de acordo com o esperado, por consequência do tratamento *flash-frozen* a que foram submetidas. Já a sonda MITO não detectou diferença estatística entre C e CF, porém houve diferença destes com FF (Tabela 2).



Tabela 1. Comparação da capacidade de detecção da integridade de membrana plasmática (médias±DP) de sêmen bubalino criopreservado, avaliada pela sonda SYBR-14 e pela técnica de HOS.

Sondas	Grupos		
	C	CF	FF
SYBR-14	34,7±9,8 <sup>a</sup>	12,8±3,2 <sup>a</sup>	1,0±0,9 <sup>a</sup>
HOS	17,5±4,6 <sup>b</sup>	14,9±6,0 <sup>a</sup>	3,1±2,1 <sup>a</sup>

Letras diferentes na coluna = diferença estatística (P<0,0001).  
C: Controle; CF: Controle+Flash-frozen; FF: Flash-frozen

Tabela 2. Integridade de membrana plasmática e potencial mitocondrial (médias±DP) de sêmen bubalino criopreservado avaliados por SYBR-14 e MITO, respectivamente.

Grupos	Sondas	
	SYBR-14	MITO
C	34,7±9,8 <sup>a</sup>	43,5±19,2 <sup>a</sup>
CF	12,8±3,2 <sup>b</sup>	31,6±6,9 <sup>a</sup>
FF	1,0±0,9 <sup>c</sup>	7,8±10,6 <sup>b</sup>

Letras diferentes na coluna = diferença estatística (P<0,0001).  
C: Controle; CF: Controle+Flash-frozen; FF: Flash-frozen

### Conclusão

As sondas de epifluorescência podem ser consideradas como técnica segura e precisa para a avaliação de sêmen bubalino, com destaque para SYBR-14 e MITO, que apresentaram resultados interessantes. A sonda SYBR-14 se mostrou mais sensível que o teste HOS para avaliar a integridade de membrana plasmática dos espermatozoides criopreservados bubalinos.

### Agradecimentos

Ao Projeto Rede BIOTEC (Código 01.07.01.002.04.00) pelo apoio financeiro e ao CNPq pela bolsa de iniciação científica concedida.

### Referências Bibliográficas

- ARRUDA, R.P.; CELEGHINI, E.C.C.; ALONSO, M.A.; CARVALHO, H.F.; OLIVEIRA, L.Z.; NASCIMENTO, J.; SILVA, D.F.; AFFONSO, F.J.; LEMES, K.M.; JAIMES, J.D. Métodos de avaliação da morfologia e função espermática: momento atual e desafios futuros. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.35, n.2, p.145-151, 2011.
- CELEGHINI, E.C.C. **Efeitos da criopreservação do sêmen bovino sobre as membranas plasmática, acrossomal e mitocondrial e estrutura da cromatina dos espermatozoides utilizando sondas fluorescentes**. 2005. 186 f. Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Faculdade de medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Reprodução Animal, São Paulo, 2005.
- FONSECA, J.F.; TORRES, C.A.A.; MAFFILI, V.V.; BORGES, A.M.; SANTOS, A.D.F.; RODRIGUES, M.T.; OLIVEIRA, R.F.M. The hypoosmotic swelling test in fresh goat spermatozoa. **Animal Reproduction**, v.2, p.139-144, 2005.
- GARCIA, A.R. O uso de sondas fluorescentes na avaliação morfofuncional de espermatozoides bovinos. **Revista de Ciências Agrárias de Belém**, Suplemento, n.43, jun./jul. 2005.
- THOMAS, C. A.; GARNER, D. L.; DEJARNETTE, J. M.; MARSHALL, C. E. Effects of cryopreservation on bovine sperm organelle function and viability as determinate by flow cytometry. **Biology of Reproduction**, v.58, n.3, p.786-793, 1998.