

EQUIVALÊNCIA DE TÉCNICAS PARA AVALIAÇÃO DA INTEGRIDADE DE MEMBRANA PLASMÁTICA EM SÊMEN CRIOPRESERVADO DE BÚFALOS (*BUBALUS BUBALIS*)

*Equivalence of techniques to assess plasma membrane integrity of cryopreserved buffalo semen (*Bubalus bubalis*)*

Abstract

This study aimed to determine the association level among laboratorial techniques for assessment of plasma membrane integrity (PMI). Eleven adult buffalo bulls (3.5 ± 1.0 years and 536.9 ± 73.0 kg) were used as semen donors. Semen was collected using an artificial vagina, totaling one hundred samples ($n=100$). Semen was cryopreserved in TES-TRIS extender. Further, semen was thawed at 37°C during 30 seconds. Each sample was analyzed according the following methods: IP-H342 (propidium iodide 0.5 mg/mL and Hoechst 33342 5 mg/mL); E-N (nigrosin-eosin: 1% eosin B, 5% nigrosin and 3% sodium citrate); and HOST (hypo-osmotic swelling test: 0.735 g sodium citrate, 1.351 g fructose, 100 mL *Milli-Q* water, 190 mOsm kg^{-1}). The IP-H342 was performed in epifluorescent microscopy, E-N was implemented in optical microscopy, while HOST was executed in phase contrast microscopy. Two hundred cells were analyzed in each sample, according different techniques. Data were analyzed with SAS software in order to perform Pearson's correlations test and regression analysis ($P < 0,05$). The correlation observed ($r=0.90$; $P < 0.0001$) and regression equation calculated ($Y=0.9155x+2.9843$; $R^2=82.36\%$) are indicatives of high equivalence between IP-H342 and E-N tests. In conclusion, staining with eosin-nigrosin can be used safely and efficiently as a predictor of the level of PMI, especially when conditions for fluorescent probes technique implementing are not available.

INTRODUÇÃO

A avaliação da integridade de membrana plasmática dos espermatozoides é de suma importância para determinar a capacidade de fertilização do sêmen (1). Programas de inseminação artificial em bubalinos são executados, tendo como base o uso do sêmen congelado (2). Contudo, tanto em bubalinos como em outras espécies, o processo de criopreservação causa inúmeras injúrias nas células espermáticas, ocasionando decréscimo ou perda da capacidade de fertilização do espermatozoide (3). Com isso, a implementação diversas metodologias de análise espermática, como avaliação da integridade de membrana plasmática, são indispensáveis para avaliar o potencial fertilizante do espermatozoide, que compreende a capacitação, ligação à zona pelúcida, reação acrossomal e fusão dos gametas

(4). Portanto, o objetivo deste estudo foi determinar o grau de associação entre as técnicas de eosina-nigrosina, teste hiposmótico e coloração fluorescente com iodeto de propídio/Hoechst 33342, para avaliação da integridade de membrana plasmática dos espermatozoides de bubalinos após o descongelamento.

MATERIAL E MÉTODOS

Onze touros bubalinos adultos ($3,5 \pm 1,0$ anos e $536,9 \pm 73,0$ kg) foram utilizados como doadores de sêmen. O sêmen foi colhido com vagina artificial pré-aquecida a 42°C e as amostras com motilidade progressiva $\times 70\%$ foram selecionadas para criopreservação (5), totalizando cem ejaculados analisados ($n=100$). O sêmen foi diluído, envasado em palhetas plásticas (30×10^6 spzts) de 0,5 mL e criopreservado em TES-TRIS (6). O processo de criopreservação foi executado de modo automatizado em sistema programável (TK-3000, TK Equipamentos, Brasil), com curva de refrigeração e congelação controladas. Após a congelação, as palhetas foram submersas em nitrogênio líquido e estocadas a -196°C . Para as avaliações, duas palhetas de cada ejaculado foram descongeladas em banho-maria a 37°C durante 30 segundos, a fim de reduzir o efeito de amostragem sobre os resultados. A integridade estrutural da membrana plasmática dos espermatozoides foi avaliada com uso de sondas fluorescentes, em 150 μL de sêmen descongelado adicionado em 150 μL meio TALP, em concentração de 25×10^6 espermatozoides/mL. Em seguida, foi realizada adição de 3 μL de iodeto de propídio (Sigma-Aldrich, código P4170) a 0,5 mg/mL (7) e 2 μL de Hoescht 33342 (Molecular Probes, código H-1399) a 5 mg/mL. Posteriormente, a amostra foi incubada a 37°C por 8 minutos em ambiente escuro, e uma alíquota de 3 μL foi analisada entre lâmina e lamínula pré-aquecidas a 37°C , sob microscopia de epifluorescência com magnificação de 1000x. Para a coloração de eosina-nigrosina, uma alíquota de 8 μL de sêmen descongelado foi depositada sobre lâmina pré-aquecida a 37°C e gentilmente misturada a 10 μL do corante de eosina-nigrosina (1% de eosina B, 5% de nigrosina e 3% de citrato de sódio) e homogeneizada (8), sendo realizado o esfregão após dois minutos. Para o teste hiposmótico, uma alíquota de 50 μL de sêmen descongelado foi adicionada a 500 μL de solução hiposmótica (0,735g de citrato de sódio, 1,351g de frutose, 100 mL de água Milli-Q; 190 mOsm kg^{-1}) pré-aquecida a 37°C . A amostra foi, então, incubada por 30 minutos (9). Uma gota de 10 μL de cada amostra foi analisada em lâmina e lamínula, sendo visualizadas em microscópio de contraste de fase, com magnificação de 400x. Foram contadas duzentas células em cada técnica realizada, para quantificar os espermatozoides com membrana plasmática íntegra. Para calcular o grau de associação entre as técnicas, foram adotados o

teste de Correlação de Person e o cálculo das equação de regressão, com auxílio do programa SAS (SAS Instituto, Realese 9.1, Cary, NC, EUA, 2002/2003). O P adotado foi de 5%.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os testes de correlação entre técnicas apontaram alta correlação entre as técnicas de coloração por iodeto de propídio/Hoechst 33342 e com eosina-nigrosina ($r=0,90$; $P<0,0001$), sendo a equação de regressão calculada $Y=0,9155x+2,9843$ ($R^2=0,82$). Entre eosina-nigrosina e o teste hipo-osmótico, o coeficiente de correlação foi de baixa intensidade ($r=0,30$; $P<0,004$), com regressão obtida pela equação $Y=0,4147x+25,013$ ($R^2=0,11$). Entre o teste hipo-osmótico e a técnica de iodeto de propídio/Hoechst 33342, o coeficiente de correlação também foi de baixa intensidade ($r=0,36$; $P<0,001$) e equação de regressão obtida foi $Y=0,4531x+23,316$ ($R^2=0,13$). Os resultados corroboram informações de estudo prévio realizado com sêmen bovino criopreservado, no qual foi constatada alta correlação entre os resultados analíticos obtidos com as técnicas de eosina-nigrosina e de sondas fluorescentes, no caso o diacetato de 6-carboxifluoresceína associado ao iodeto de propídio (10). A coloração de eosina-nigrosina possui alta habilidade em diferenciar células com membrana plasmática lesada após a descongelação, assim como o corante fluorescente de iodeto de propídio (11). O corante eosina atravessa a membrana plasmática danificada corando o citoplasma em rosa (12). Da mesma forma, o iodeto de propídio ultrapassa a membrana plasmática lesada, ligando-se, porém, ao DNA do núcleo da célula emitindo fluorescência em vermelho. Já a sonda Hoescht 33342 atravessa a membrana intacta e se ao liga DNA nucleico, emitindo fluorescência azul (7). É provável que a semelhança entre os mecanismos de ação dos corantes favoreceu a associação matemática das técnicas, observadas no presente estudo. Os corantes fluorescentes são considerados os mais específicos indicadores do *status* funcional dos compartimentos subcelulares, e a importância de seu uso na rotina laboratorial é inquestionável. Contudo, em termos práticos, as avaliações andrológicas de rotina, especialmente aquelas realizadas por médicos veterinários a campo, não podem prescindir de técnicas eficientes e simples. Considerando esse aspecto, a técnica de eosina-nigrosina apresenta algumas vantagens, como o menor requerimento de insumos, o fato de ser executada com equipamentos portáteis e menos sofisticados, além de ser rápida e de baixo custo, facilitando seu uso a campo.

CONCLUSÃO

A coloração de eosina-nigrosina pode ser utilizada como preditora dos níveis de integridade de membrana plasmática, de forma segura e eficiente, quando as condições para execução da técnica com sondas fluorescentes de iodeto de propídio/Hoescht 33342 não sejam existentes.

REFERÊNCIAS

1. WATSON, PF. The cause of reduce fertility with cryopreserved semen. *Animal Reproduction Science*, v.60-61, p.481-492, 2000.
2. GARCIA, AR, NAHÚM BS, LOURENÇO JUNIOR JB, COSTA NA, GONÇALVES KS, MIYASAKI MYA, ANDRADE AFC, ARRUDA RP. Associação de medroxiprogesterona ao protocolo Ovsynch para inseminação artificial em tempo fixo de búfalas cíclicas (*Bubalus bubalis*) criadas na Amazônia Oriental. *Acta Amazonica*, v.38, p.369-378, 2008.
3. SWANSON, EW, BEARDEN HJ. An eosin-nigrosin stain for differentiating live and dead bovine spermatozoa. *Journal of Animal Science*, v.10, p.981-987, 1951.
4. ARRUDA RP, CELEGHINI ECC, SOUZA LWO, NASCIMENTO J, ANDRADE AFC, RAPHAEL CF, GARCIA AR. Importance of semen quality in fixed-time artificial insemination and embryo transfer programs. *Acta Scientiae Veterinariae*, v. 33, p.145-150, 2005.
5. COLÉGIO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL - CBRA. Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal. Belo Horizonte: CBRA, 1998. 49p.
6. VALE WG. Reproductive management of buffalo male aiming semen production for artificial insemination. In: BUFFALO SYMPOSIUM OF AMERICAS, 1, 2002. Anaisí Belém: PRODEPA ó Governo do Estado do Pará, 2002. p.156-171.
7. CELEGHINI ECC, ARRUDA RP, ANDRADE AFC, NASCIMENTO J, RAPHAEL CF. Practical techniques for bovine sperm simultaneous fluorimetric assessment of plasma , acrossomal and mitochondrial membranes. *Reproduction of Domestic Animals*, v.42, p.479-488, 2007.
8. KHAN, MIR, IJAZ A. Effect of osmotic pressure on motility, plasma membrane integrity and viability in fresh and frozen-thawed buffalo spermatozoa. *Animal*, v.2, p.548-553, 2008.
9. RASUL Z, ANZAR M, JALALI S, AHMAD N. Effect of buffering systems on post-thaw motion characteristic, plasma membrane integrity, and acrosome morphology of buffalo spermatozoa. *Animal Reproduction Science*, v.59, p.31-41, 2000.
10. BRITO LFC, BARTH AD, BILODEAU-GOESEELS S, PANICH PL, KASTELIC JP. 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.
11. PINTADO B, DE LA FUENTE J, ROLDAN ERS. Permeability of boar and bull spermatozoa to the nucleic acid stains propidium iodide or Hoescht 33258, or to eosin: Accuracy in the assessment of cell viability. *Journal of Reproduction and Fertility*, v.118, p.145-152, 2000.
12. FOSTER ML, LOVE CC, VARNER DD, BRINSKO SP, HINRICHS K, TEAGUE S, LaCAZE K, BLANCHARD TL. Comparison of methods for assessing integrity of equine sperm membranes. *Theriogenology*, v.76, p.334-341, 2011.