

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO CEARÁ
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS
ALEXANDER AMARAL MEDEIROS**

**“UTILIZAÇÃO DO AZUL DE BROMOFENOL COMO MÉTODO DE
COLORAÇÃO VITAL PARA A AVALIAÇÃO DA MORFOLOGIA DO
ESPERMATOZÓIDE OVINO”**

**Fortaleza - CE
Dezembro de 2004**

Universidade Estadual do Ceará
Pró-reitoria de Pós-graduação e Pesquisa
Faculdade de Veterinária
Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias

AUTOR: Alexander Amaral Medeiros

“UTILIZAÇÃO DO AZUL DE BROMOFENOL COMO MÉTODO DE
COLORAÇÃO VITAL PARA A AVALIAÇÃO DA MORFOLOGIA DO
ESPERMATOZÓIDE OVINO”

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da Faculdade de Veterinária da Universidade Estadual do Ceará, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências Veterinárias.

Área de Concentração: Reprodução e Sanidade Animal.

Orientador: Prof. Dr. Airton Alencar de Araújo.

Fortaleza - CE
Dezembro de 2004

Universidade Estadual do Ceará
Pró-reitoria de Pós-graduação e Pesquisa
Faculdade de Veterinária
Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias

Título do Trabalho: “Utilização de Diferentes Métodos Rápidos de Colorações Vitais Para Avaliação da Morfologia do Espermatozóide Ovino”

Autor: Alexander Amaral Medeiros

Aprovada em _____

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Airton Alencar de Araújo
Orientador

Prof. Dr. José Ferreira Nunes
Examinador

Profa. Dra. Ana Claudia Nascimento Campos
Examinadora

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Airton Alencar de Araújo, pela confiança, paciência em me orientar e por servir de exemplo profissional e pessoal;

Ao Prof. Dr. Jose Ferreira Nunes, pelo apoio e pelo laboratório onde o experimento foi realizado;

Aos meus pais, pelo apoio durante esta etapa da minha vida;

Ao colega Mauricio Cavalcante, por ter estado sempre pronto a me ajudar durante toda a execução deste trabalho;

Aos Amigos Juliana Lima-Verde, Darcio Ítalo Teixeira, pelos bons momentos e apoio nas horas em que precisei;

Ao PPGCV pela oportunidade de realizar um curso de pós – graduação;

A CAPES e ao CNPq pelo apoio financeiro;

RESUMO

UTILIZAÇÃO DO AZUL DE BROMOFENOL COMO MÉTODO DE COLORAÇÃO VITAL PARA AVALIAÇÃO DA MORFOLOGIA DO ESPERMATOZÓIDE OVINO

Medeiros, AA; Araújo, AAA; Moura, A.A.A; Cavalcante, M.M; Figueiredo, E. L.

Rodrigues, L.F.

Para avaliação da morfologia do espermatozóide ovino, esfregaços de sêmen (N=320) foram corados com azul de bromofenol (ABR=160) e eosina-nigrosina (EN=160). Os corantes foram estocados em duas diferentes temperaturas: 4°C e 29°C (temperatura ambiente) e utilizados após 30 dias de estocagem. Pela observação por microscopia ótica, três tipos de espermatozóides foram identificados em ambas colorações: espermatozóides vivos que não apresentaram nenhuma coloração, espermatozóides mortos com acrossoma reagido corados completamente de púrpura (EN) ou completamente azul (ABR); espermatozóides de cor púrpura com acrossoma intacto (acrossoma branco) ou corado em azul com acrossoma intacto (acrossoma branco). A comparação entre os dois corantes mostrou que ambos são eficientes para avaliação do percentual de células vivas com os seguintes percentuais: EN4°C=86,60; EN29°C=86,30; ABR4°C=84,27 e ABR29°C=86,70: Ambas colorações foram também eficientes para avaliação das patologias espermáticas não apresentando diferença significativa entre elas, independente da temperatura de estocagem. Ambos corantes quando estocados a 4°C são igualmente eficientes para avaliação da morfologia espermática do sêmen ovino, porém à temperatura ambiente de estocagem de 29°C, o azul de bromofenol apresenta melhor visualização ao microscópio, sem partículas que podem provocar artefatos que dificultam a avaliação da célula espermática, o que possibilita sua utilização em condições de campo para exames andrológicos de carneiros.

ABSTRACT

USE OF BROMOPHENOL BLUE AS VITAL STAIN METHOD FOR ASSESEMENT OF RAM SPERMATOOA MORPHOLOGY

**Medeiros, AA; Araújo, AA; Moura, A.A. A; Cavalcante, M.M; Figueiredo, E. L.
Rodrigues, L.F.**

For evaluation of the ram spermatozoa morphology, smears of semen (N=320) were stained with bromorfenol blue (ABR=160) and eosine-nigrosine (EN=160). The stains were stored in two different temperatures: 4°C and 29°C (ambient temperature) and used after 30 days of storage. Three different types of spermatozoa were identified in both stains: living spermatozoa that had not presented any staining; dead acrossome reacted spermatozoa stained completely purple (EN) or completely blue (ABR); dead spermatozoa with non-reacted acrossome (white acrossome) stained in purple (EN) or blue (ABR). Comparison between the two staining methods showed that both are efficient for the evaluation of living and dead cells, with the following percentages: EN4°C=86.60; EN29°C=86.30; ABR4°C=84.27 e ABR29°C=86.70: Both types of stain were also efficient for evaluation of sperm pathology showing no significant diference. However, the bromophenol blue was more efficient at ambient temperature. The slides stained with ABR lack stained particles, which would make difficult the evaluation of the spermatic cell. They also provided better visualization on the microscope, thus making possible its use in the field for soundness examination in rams.

SUMÁRIO

| | |
|---------------------------------------------------------------|-----------|
| 1- INTRODUÇÃO..... | 1 |
| 2- REVISÃO DE LITERATURA..... | 3 |
| 2.1 O Espermatozóide | 3 |
| 2.1.1 Morfologia do Espermatozóide | 3 |
| 2.1.2 Alterações morfológicas dos espermatozóides..... | 4 |
| 2.1.2.1 Alterações acrossômicas..... | 4 |
| 2.1.2.2 Alterações da cabeça..... | 5 |
| 2.1.2.3 Alteração de peça intermediária..... | 6 |
| 2.1.2.4 Alterações de cauda. | 6 |
| 2.2 Exame do sêmen | 6 |
| 2.2.1 Exame microscópico do sêmen | 7 |
| 2.2.1.1 Mobilidade massal e individual..... | 7 |
| 2.2.1.2 Determinação da concentração do sêmen | 8 |
| 2.2.2 Estudo morfológico do espermatozóide | 8 |
| 2.2.2.1 Coloração total | 9 |
| 2.2.2.2 Coloração vital | 9 |
| 3- JUSTIFICATIVA..... | 10 |
| 4 – HIPOTESE | 11 |

| | |
|--------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 5- OBJETIVOS..... | 12 |
| 6- MATERIAIS E MÉTODOS..... | 13 |
| 6.1- Animais Experimentais..... | 13 |
| 6.2- Coleta e avaliação do sêmen..... | 13 |
| 6.3- Delineamento Experimental..... | 13 |
| 6.3.1 Coloração com eosina-nigrosina..... | 14 |
| 6.3.2 Coloração com azul de bromo-fenol | 14 |
| 6.3.3 Avaliação da porcentagem de espermatozóides mortos e patologias espermáticas..... | 14 |
| 6.4- Análise Estatística..... | 15 |
| 7- RESULTADOS | 16 |
| 8- DISCUSSÃO..... | 18 |
| 9- CONCLUSÕES..... | 21 |
| 10- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 22 |
| 11- FIGURAS | 27 |
| 12- ANEXOS..... | 29 |

LISTA DE FIGURAS, TABELAS E ANEXOS

| | |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 1: Espermatozoides corados com EN, conservada a 4°C. A – Espermatozóide morto; B – Espermatozóide vivo; C – Espermatozóide morto com acrossoma intacto. Aumento de 400x | 27 |
| Figura 2: Espermatozoides corados com ABR, conservada a 4°C. A – Espermatozóide vivo; B – Espermatozóide morto; C – Espermatozóide morto com acrossoma intacto. Aumento de 400x | 27 |
| Figura 3: Espermatozoides corados com EN, conservada a 29°C. A – Espermatozóide vivo; B – Espermatozóide morto; C – Espermatozóide morto com acrossoma intacto. Aumento de 400x | 28 |
| Figura 4: Espermatozoides corados com ABR, conservado a 29°C. B – Espermatozóide morto; C – Espermatozóide morto com acrossoma intacto. Aumento de 400x | 28 |
| Tabela 1. Porcentagem de espermatozoides vivos/mortos | 16 |
| Tabela 2. Patologias espermáticas encontradas..... | 17 |
| Anexo 1: Espermatozoides corados com ABR, conservado a 29°C. A - Espermatozóide morto com gota citoplasmática; B – Espermatozóide vivo. Aumento de 600x | 29 |
| Anexo 2: Espermatozoides corados com EN, conservado a 29°C. Aumento de 600x | 30 |

1. INTRODUÇÃO

Os espermatozóides são células haplóides e por isso muito diferenciadas, possuindo propriedades únicas entre as células do organismo suas reservas energéticas são limitadas, possui pouco citoplasma, não realiza síntese protéica, possui uma membrana plasmática bastante polarizada contendo várias proteínas, e um citoesqueleto inteiramente especializado para o deslocamento (GATTI & DACHEUX, 1995).

Entretanto, observar somente a motilidade do gameta é insuficiente para avaliar a qualidade do sêmen, pois os espermatozóides de boa motilidade podem ser encontrados como não fecundantes (EPPLESTON & MAXWELL, 1993; LIGHTFOOT & RESTAL, 1971). Assim um exame morfológico mais detalhado se faz necessário para a avaliação da viabilidade da célula espermática. Para estes exames diversos corantes têm sido utilizados, podendo ser divididos em duas classes: os corantes totais, que coram indiscriminadamente todas as células ou corantes vitais que coram distintivamente espermatozóides vivos e mortos (DERIVAUX, 1980).

Dentre os corantes vitais a eosina-nigrosina (CAMPBELL ET AL., 1956; HANCOCK, 1951) e o método Giemsa (WATSON, 1975) são ainda o mais utilizado para a avaliação do espermatozóide ovino. TAMULI & WATSON (1994), utilizaram uma coloração simples mista com Eosina-nigrosina-Giemsa (ENG) para avaliação da morfologia espermática de cachorros e carneiros que se mostrou eficiente na distinção de diferentes tipos espermáticos corados. Outros métodos utilizados para avaliação da viabilidade espermática são a microscopia de fluorescência (CENTOLA ET AL., 1990; GARNER ET AL., 1986) e citometria de fluxo que utilizam corantes fluorescentes como o iodo de propidium e o diacetato de carboxifluoresceína (GARNER ET AL., 1986; HARRISON & VICKERS, 1990).

Porém, esses métodos, apesar de mais eficientes, são sofisticados e caros não podendo ser utilizados quando se necessita uma avaliação rápida. Para o sêmen ovino o corante clássico eosina-nigrosina (COLAS, 1980) tem sido o mais comumente empregado. HANCOCK (1951) relata que para o sêmen de cachaaos esta coloraação é considerada ineficiente para avaliaaação de mortos e vivos não apresentando tambem boa eficiênciia. Temos constatado na prática que nem sempre se observa com nitidez à célula espermática em função da presença de artefatos quando este corante não é conservado a 4°C.

Derivaux (1980) descreve uma coloraação que há muito tempo foi utilizada para sêmen bovino a base de azul de bromofenol. É uma coloraação simples, de fácil preparaaação e baixo custo. O azul de bromofenol tambem se mostrou eficiente para coloraação de eritroblastos em vários estágios e maturaaação (Kass & Gardner, 1979).

Na literatura não existe relato da utilizaaação do azul de bromofenol como corantes de espermatozóides ovino ou de outras espécies. Este trabalho tem como objetivo testar o azul de bromofenol, comprando-o com o corante clássico (eosina-nigrosina) para avaliaaação da morfologia espermática do sêmen ovino. Avaliar tambem eficiênciia dos dois corantes em duas temperaturas diferentes de conservaaação: 4°C e 29°C (termoestabilidade) para saber qual coloraação é mais indicada para avaliaaação do sêmen de reprodutores em condições de campo.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 O Espermatozóide

Os espermatozóides são células haplóides, altamente especializadas e dotadas de movimento. Estas células são responsáveis pelo transporte da porção do material genético proveniente do macho e ainda pela determinação do sexo, pois estes, após a redução da cromatina contém um cromossomo y ou um x. Tais variedades, não podem ser diferenciadas morfológicamente, mas podem ser separadas quando técnicas de sedimentação, citometria de fluxo ou ainda, quando sondas de DNA são empregadas. A morfologia espermática por sua vez pode ser analisada através da observação sob microscópio de lâminas a fresco utilizando-se a microscopia de interferência ou contraste de fase (HANCOCK, 1959), ou coradas por diversos métodos como a eosina-nigrosina (GALLOWAY, 1974).

2.1.1 Morfologia do Espermatozóide

O espermatozóide é dividido em três regiões fundamentais: cabeça, acrossoma e cauda, que são facilmente estudadas através da utilização de técnicas de coloração. As formas e os tamanhos variam consideravelmente segundo a espécie. O espermatozóide da espécie ovina tem forma de clava e mede aproximadamente 9 μ m de altura por 5 μ m de diâmetro em sua maior circunferência (DERIVAUX, 1980).

A cabeça contém o núcleo na parte posterior a zona equatorial, onde está contido o material hereditário (DNA). Perto do núcleo existe ainda uma zona proximal, que esta relacionada com a divisão celular. É observada ainda, uma estrutura denominada acrossômo que é originado do complexo de Golgi da espermátide (GUITON & HALL, 1996).

O acrossoma é uma dupla membrana que cobre o terço anterior da cabeça do espermatozóide. Esta estrutura contém diversas enzimas hidrolíticas, responsáveis pela reação acrossômica durante o processo de fertilização (MANN & LUTWAK-MANN, 1981).

A cauda é constituída por um filamento longo, o flagelo, que é dotado de mobilidade (GUITON & HALL, 1996). A peça intermediária, região mais alargada da cauda, logo após a cabeça, contém um centríolo distal longo que dá origem ao flagelo. Este segmento é composto por nove pares de microtubúlos envolvendo 2 filamentos centrais (HAFEZ, 1987). Ao redor encontram-se as mitocôndrias que produzem energia para o movimento do flagelo (GUITON & HALL, 1996).

2.1.2 Alterações morfológicas dos espermatozoides

A presença de alterações morfológicas nos espermatozoides pode ser indicativo do seu poder fecundante. Estas alterações podem atingir diversas estruturas como o acrossômo, cabeça, peça intermediária, cauda, podendo ainda atingir simultaneamente mais de uma parte da célula (COLAS, 1980). Usualmente alterações morfológicas inferiores a 20% não é indicativo de fertilidade reduzida (HAFEZ, 1987). GOMES (1977), refere-se a esse valor Maximo, em ovinos, como sendo da ordem de 10%.

2.1.2.1 Alterações acrossômicas

A integridade acrossômica é de grande importância nos eventos que precedem, e nos que ocorrem durante os processos de interação entre o espermatozóide e a zona pelúcida dos oócitos. A normalidade desta estrutura é essencial para a fertilização, pois a reação acrossômica e a determinação da capacidade do espermatozóide de realizá-la tem provado ser um parâmetro útil na

avaliação de animais inférteis. Esta reação é caracterizada pela fusão entre a membrana plasmática e a acrossomal externa, resultando na formação de vesículas, permitindo ainda a liberação de enzimas do conteúdo acrossômico (SÁ et al., 2002).

Entre as alterações morfológicas mais encontradas no acrossômo enumera-se o enrugamento, contorno defeituoso ou podendo ainda esta destacado do espermatozóide.

O destacamento acrossômico, segundo BLOM (1950a), deve-se a abstenção prolongada do reprodutor. Este autor encontrou também uma relação direta entre a percentagem de células com esta alteração e baixas taxas de fertilidade. O acrossômo pode também apresentar uma anormalidade de caráter hereditário e que consiste na persistência de um granulo no acrossoma. Esta estrutura foi detectada sob forma de um ponto refringente na margem anterior da cabeça do espermatozóide. Foi relatado, que esta anormalidade pode, com freqüência, levar a esterilidade absoluta possivelmente devido à inabilidade destes espermatozoides realizarem a reação acrossômica. Esta anomalia pode ser identificada através da observação de esfregaços de células coradas ou ainda por amostras úmidas fixadas pelo formol e examinadas ao microscópio de contraste de fase.

PURSEL et al. (1972) adotaram letras convencionais para designar alterações acrossômicas. DAR (defective apical ridge), caso os espermatozoides apresentem irregularidades na margem anterior do acrossomo; MAR (missing apical ridge), quando não pode ser definida a estrutura semilunar que assinala a integridade da dobra apical; LAC (loose acrossomal cap), a qual é caracterizada pelo destacamento do acrossômo; NAR (normal apical ridge), para o acrossomo normal.

2.1.2.2 Alterações da cabeça

Os espermatozoides ovinos podem apresentar diversas alterações morfológicas na cabeça. Entre elas podem ser encontradas formas: piriformes; estreitas; pequenas; grandes; estreitas na base; globuliformes; lanciformes; com contorno anormal ou ainda células que apresentem duas cabeças. Nem todas as alterações morfológicas são consideradas como da mesma importância. Cabeças piriformes e estreitas na base podem indicar uma má distribuição do material genético durante os processos de divisão celular. Espermatozoides com cabeças duplas e contornos irregulares também são caracterizados como de baixa qualidade. O aparecimento de um grande número de formas alteradas, geralmente está relacionado aos casos de degeneração e hipoplasia testicular. (DERIVAUX, 1980)

2.1.2.3 Alteração de peça intermediária

As alterações da peça intermediária são em sua maior parte devido a uma distribuição irregular de uma ou mais camadas de mitocôndrias. Esta organização irregular leva a peça intermediária a apresentar-se de forma espiralada. Outra alteração geralmente encontrada é caracterizada pela presença de uma gota proximal. Esta gota deve-se também a uma distribuição anormal de camadas de mitocôndrias que impedem a liberação da gota durante os processos de maturação celular (BLOM, 1971).

2.1.2.4 Alterações de cauda:

Assim como a cabeça à cauda espermática pode apresentar diversas alterações morfológicas. Estas alterações estão relacionadas com uma disfunção epididimária. As caudas anormais podem se apresentar dobradas, enroladas na extremidade ou ainda apresentarem gotas citoplasmáticas nas porções distal ou

proximal (DERIVAUX, 1980). BLOM (1966) relata que o forte enrolamento encontrado nas caudas dos espermatozoides é devido ao rompimento de fibrilas.

Espermatozoides com formações teratológicas, possuindo duas ou mais caudas também podem ser encontrados.

2.2 Exame do sêmen

A composição do sêmen é extremamente variável, não somente entre as espécies, mas também entre indivíduos da mesma espécie. Estas características podem ser avaliadas por diferentes métodos que se completam, tais como:

- O exame macroscópico onde são observados o volume, a viscosidade e o aspecto - que pode variar de marmóreo, leitoso, opaco e até aquoso (ZEMJANIS, 1970);
- As provas bioquímicas que são capazes de fornecer dados sobre o metabolismo espermático; provas de resistência frente às modificações de temperatura, diluição, pH e condutividade elétrica;
- Exame microscópico onde é avaliada a motilidade total (BLOM, 1950a), individual (MIES FILHO, 1975) e a porcentagem de vivos e mortos através da utilização de corantes vitais como a eosina-nigrosina (GALLOWAY, 1974). Na análise microscópica também é verificada a existência de células anormais.

2.2.1 Exame microscópico do sêmen

No exame microscópico do sêmen são observados parâmetros como o movimento em massa e a motilidade individual dos espermatozoides, a concentração seguida do estudo morfológico destas células. As técnicas empregadas neste exame são de fácil realização. O sêmen deve ser analisado o

mais breve possível a uma temperatura próxima a corpórea a fim de evitar choques térmicos.

2.2.1.1 Mobilidade massal e individual

A motilidade massal pode ser analisada quando o sêmen é observado sob um pequeno aumento (100x). Utiliza-se uma pequena quantidade de sêmen sem diluição, onde são observados os movimentos ondulares provocados pelo deslocamento dos espermatozóides. O sêmen é classificado em graus que vão de um a cinco onde: 5 = deslocamento intenso com ondas espessas; 4 = ondas com rápidos movimentos; 3 = ondas aparentes com movimentos moderados; 2 = ondas em movimentos pouco perceptíveis; 1 = sem ondas (Blom 1950c). Este exame apenas dá idéia da porcentagem de espermatozóides móveis sendo necessária à observação da mobilidade individual para um índice mais acurado.

A motilidade progressiva individual ou vigor do espermatozóide é dado em uma escala de zero a cinco, que representa a intensidade de deslocamento da célula no campo do microscópio. O número representa a totalidade dos espermatozóides em movimento progressivo retilíneo, com a nota de cinco a um, onde cinco - representa o deslocamento máximo e um - quando a amostra está com todas as células imóveis. A nota zero é atribuída à ausência de espermatozóides (WALTON, 1933).

2.2.1.2 Determinação da concentração do sêmen

A avaliação da concentração espermática é necessária para julgar a qualidade do sêmen, e exprime o número de espermatozóides por milímetro cúbico. Este parâmetro pode ser definido utilizando-se técnicas como a contagem direta onde são utilizadas câmaras para contagem de células ou através da determinação da densidade óptica, onde a quantidade de luz absorvida ou

transmitida pela amostra seminal, no comprimento de onda na faixa dos 550nm, é medida com o auxílio de um espectrofotômetro (FOOTE et al., 1978).

2.2.2 Estudo morfológico do espermatozóide

A avaliação dos elementos figurados do sêmen é igualmente importante para a determinação da qualidade deste. Para tanto devem ser montadas lâminas contendo esfregaços delgados de sêmen. Estas lâminas são então coradas com preparações apropriadas (Williams modificado por LAGERLOF (1934), eosina-nigrosina (GALLOWAY, 1974), vermelho-congo (CEROVSKY, 1976). Os esfregaços devem ser realizados utilizando-se uma quantidade mínima de sêmen, que é depositado sobre uma extremidade da lâmina, sendo em seguida espalhado por toda sua extensão utilizando-se uma outra lâmina com uma inclinação de 45°.

Lâminas úmidas podem ser utilizadas para avaliar a morfologia seminal através da microscopia de contraste de fase (HANCOCK, 1959). Nesta técnica, após homogeneização, uma gota da solução de formol-salina/sêmen é colocada entre lâmina e lamínula (preparação úmida), sendo observados 200 espermatozóides com um aumento de 400 a 600 vezes.

2.2.2.1 Coloração total

As colorações totais podem empregar um ou mais corantes e coram indiscriminadamente espermatozóides vivos e mortos (azul de metileno, azul de toluidina) ou destacando diferenças morfológicas (Giemsa, Karras).

Soluções de contraste que coram não os espermatozóides (aderem ao fundo das lâminas) também podem ser utilizadas com bons resultados. A utilização do violeta de genciana, da tinta da china ou do azul de opala como coloração de contraste também trouxe bons resultados para a avaliação espermática. Estas

colorações são simples, de baixo custo e realçam perfeitamente a forma da cabeça e a existência de gota protoplasmática (SILSBURY & VAN DEMARK, 1978).

2.2.2.2 Coloração vital

As colorações vitais permitem a observação e o estabelecimento do número de espermatozoides vivos em uma mostra. Corantes vitais como a eosina e o rosa bengala são utilizados rotineiramente para esta diferenciação. Estes corantes podem, ainda, serem auxiliados por corantes de contraste.

Outros autores têm recomendado a tinta da china como corante de fundo, uma vez que esta evidencia de forma eficaz o acrossômo. Pois a observação desta estrutura é comumente prejudicada devido a possíveis choques térmicos que estas células venham a sofrer (HANCOCK et al, 1956).

3. JUSTIFICATIVA:

A análise das patologias espermáticas e percentagem de mortos vivos é uma das etapas de grande importância para fechar o quadro de avaliações de um espermograma, pois as informações sobre a morfologia espermática e integridade de membrana completam as análises de motilidade (% de moveis e vigor) primeiramente avaliadas.

A utilização da solução de eosina-nigrosina é rotineiramente utilizada, mas torna-se inadequada para a utilização em campo, pois choques térmicos, demora no tempo de secagem e alterações de pH podem causar o aparecimento de artefatos que dificultam o exame do esfregaço corado.

Contudo, outras colorações poderão ser utilizadas para este objetivo. Entre elas o azul de bromo-fenol, coloração indicada para o sêmen bovino, pode ser testada também com sucesso para o sêmen ovino. Esta coloração pode se mostrar como alternativa, pois além de uma possível maior estabilidade à temperatura ambiente, a relação custo vs. benefício do azul de bromo-fenol é mais favorável que a da eosina-nigrosina.

4. HIPÓTESE CIENTÍFICA

A coloração vital: azul de bromo-fenol poderá apresentar a mesma eficiência para a análise de alterações morfológicas do espermatozói­de ovino que a eosina-nigrosina usualmente utilizada para esta finalidade.

5. OBJETIVOS

5.1 Geral

- Comparar diferentes métodos de coloração vital para a avaliação da morfologia do espermatozóide ovino.

5.2. Específicos

- Avaliar a eficiência de diferentes métodos de coloração vital para a análise da morfologia espermática.
- Elaborar um método rápido de coloração vital de tão eficiente quanto a eosina-nigrosina para o uso em exame andrológico ao campo.
- Avaliar a relação custo benefício dos corantes trabalhados.

6. MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi realizado no Laboratório de Tecnologia de Sêmen Ovino e Caprino da Faculdade de Veterinária da Universidade Estadual do Ceará, localizado em Fortaleza-CE a 3°43'47" de latitude Sul e 38°30'37" de longitude Oeste.

6.1 Animais experimentais

Foram utilizados para colheita de sêmen quatro reprodutores ovinos adultos da raça Santa Inês com idade média de dois anos. Os animais foram mantidos em regime de estabulação, recebendo como alimentação capim elefante picado e 500g de concentrado ao dia, água e sal mineral *ad libitum*.

6.2. Coleta e avaliação do sêmen

Após a colheita em vagina artificial, os ejaculados dos quatro carneiros foram identificados e transportados imediatamente para o laboratório onde foram mantidos aquecidos em banho-maria a 32°C para avaliação.

Logo após a coleta, as amostras de sêmen foram avaliadas quanto ao volume, por observação visual no tubo de coleta graduado (ml), quanto ao turbilhonamento (escore de 0-5) por observação de uma gota de sêmen puro ao microscópio (100X), e quanto à concentração espermática através de espectrofotometria, na qual foi adicionado a tubo de leitura contendo quatro ml de uma solução salina formolizada a 0,1%, um volume de 10 µl de sêmen para avaliação com comprimento de onda de 550 nanômetros.

6.3 Delineamento experimental

Comparou-se o corante do Azul de Bromofenol com a Eosina-nigrosina que é o corante clássico utilizado para o sêmen ovino. Avaliou-se a termo-estabilidade dos corantes em duas temperaturas distintas de estocagem: a 4°C e a temperatura ambiente de 29°C, comparando os esfregaços feitos com estes corantes após trinta dias de conservação dos mesmos a estas temperaturas.

Foram realizadas 10 colheitas de cada reprodutor (04) perfazendo um total de 40 colheitas. Para cada reprodutor foram confeccionados quatro esfregaços por corante, segundo metodologia de COLAS (1980), sendo dois para cada temperatura de armazenamento (4°C e 29°C), perfazendo um total de 320 esfregaços.

Em cada esfregaço foram avaliados os percentuais de espermatozóides vivos e mortos, os tipos de espermatozóides corados de acordo com seus compartimentos (acrossoma, cabeça e cauda) bem como as patologias espermáticas totais.

6.3.1 Coloração com eosina-nigrosina

O corante eosina-nigrosina foi preparado utilizando-se 3g de nigrosina, 2g de eosina e 3 gramas citrato de sódio, diluídos em 100ml de água destilada. Após preparo da solução, o pH foi ajustado para as condições fisiológicas do espermatozóide (pH 6,8; 300mOms; 32°C) e estocados por um mês nas temperaturas de 4°C e 29°C.

6.3.2 Coloração com azul de bromofenol

O azul de bromo-fenol foi preparado utilizando-se 1g de azul de bromofenol, 4g de citrato de sódio, diluídos em 100ml de água destilada. Após preparo da solução, o pH foi ajustado para as condições fisiológicas do espermatozóide (pH 6,8; 300mOms; 32°C) e estocados por um mês nas temperaturas de 4°C e 29°C.

6.3.3 Avaliação da porcentagem de espermatozóides mortos e patologias espermáticas

A porcentagem de espermatozóides mortos e vivos e as patologias espermáticas: defeitos menores e maiores foram analisados com o auxílio de um microscópio óptico.

Para tal, utilizou-se uma gota de 10 μ l do corante que foi colocada sobre lâmina previamente aquecida a 32°C em chapa aquecedora e uma pequena gota do sêmen puro de cada macho foi adicionada a esta e misturada durante 10 segundos. Em seguida com a lamínula esta mistura foi espalhada homoganeamente sobre a lâmina em uma fina camada, constituindo-se o esfregaço.

Para contagem dos espermatozóides mortos e vivos, as lâminas foram colocadas sobre a placa do microscópio aquecida (37-38°C para prevenir hidratação) e contados duzentos espermatozóides em vários campos aleatórios em aumento de 200 vezes.

A morfologia espermática foi classificada segundo Colas (1980) em espermatozóides normais, defeitos de cabeças, defeitos de peça intermediária, gota citoplasmática proximal, gota citoplasmática distal, anormalidades de flagelo e patologias totais.

6.4. Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o programa SYSTAT versão 7.0. As diferenças das proporções de espermatozóides mortos e vivos e patologias espermáticas entre os tratamentos, e as comparações de temperaturas de estocagem dos corantes foram avaliadas por ANOVA e pelo teste de Turkey

através de comparações múltiplas (matriz de probabilidade de comparação dois a dois).

7. RESULTADOS

Os valores médios dos parâmetros seminais dos carneiros utilizados neste experimento foram de: Volume=1,2(ml); turbilhonamento=3,0 concentração=3,8x10⁹, motilidade= 82%; vigor=3,0. Estes valores estão dentro da normalidade em termos de qualidade seminal para utilização de reprodutores ovinos, estando em consonância com os valores estabelecidos pelo CBRA (1998).

Os esfregaços de sêmen examinados pela microscopia óptica mostraram que ambas colorações são capazes de discriminar os espermatozóides mortos e vivos. Com a EN os espermatozóides mortos apresentaram uma coloração púrpura (Fig. 1-A), enquanto os vivos não apresentam coloração (Fig. 1-B). Porém, alguns espermatozóides apresentaram na cabeça somente a região pós acrossomal corada com cauda corada e alguns se acham fracamente corados (Fig. 1-C).

Com o ABR observou-se também uma boa definição dos vivos e mortos: os espermatozóides mortos foram corados em azul (Fig. 2-B) enquanto os vivos não apresentavam coloração (Fig 2-A) e da mesma forma que na EN alguns apresentam somente a cauda e a região pós acrossomal coradas. Alguns espermatozóides apresentaram ainda uma fraca coloração azul claro (Fig 2-C)

Os percentuais de mortos e vivos foram idênticos para ambas colorações independente da temperatura de conservação do corante a 4°C ou a 29°C (Tabela 1).

Tabela 1. Porcentagem de espermatozóides vivos.

| Corante | %Vivos ± e. p |
|---------|---------------|
| EN 4°C | 86,5± 0,3 |
| EN 29°C | 86,3± 0,3 |

| | |
|-----------|-----------|
| ABR 4° C | 84,3± 0,4 |
| ABR 29° C | 86,7± 0,4 |

Porém, uma diferença foi marcadamente notada quando se compararam os corantes em temperaturas diferentes. Os esfregaços corados com EN a temperatura ambiente (29°C) apresentaram partículas coradas ao exame microscópio (Fig. 3) não apresentando, portanto, um campo visual limpo o que não ocorreu com ABR a esta temperatura (Fig. 4).

Na tabela 2 estão representadas as patologias avaliadas com os dois corantes em duas diferentes temperaturas de estocagem diferentes. Os vários tipos de alterações espermáticas foram encontradas nos esfregaços de ambas colorações e, independente da temperatura de estocagem, não houve diferença significativa entres os percentuais de patologias totais. O tipo de patologia espermática mais presente foram as de cauda, independente do corante ou temperatura.

Tabela 2. Alterações espermáticas encontradas.

| Corante | Cabeça (%) | PI (%) | Cauda (%) | Gota p (%) | Gota d (%) | Total (%± e. p) |
|-----------|------------|--------|-----------|------------|------------|-----------------|
| EN 4°C | 0,6 | 1,52 | 11,25 | 0,37 | 0,47 | 14,2±0,4 |
| EN 29°C | 0,35 | 0,65 | 10,90 | 0,20 | 0,27 | 14,2±0,2 |
| ABR 4° C | 0,75 | 1,22 | 10,8 | 0,25 | 0,17 | 13,2±0,4 |
| ABR 29° C | 0,42 | 0,32 | 11,05 | 0,60 | 0,45 | 12,8±0,4 |

8. DISCUSSÃO

A análise da porcentagem de espermatozóides vivos e mortos é um importante parâmetro para prever o potencial fecundante do sêmen de um reprodutor. No carneiro, existe uma boa correlação entre a porcentagem de espermatozóides móveis e a fertilidade (CHEMINEAU et al., 1991; GARNER et al., 1986).

Em ambas colorações (EN e ABR) três tipos de espermatozóides foram encontrados nos esfregaços examinados: espermatozóides sem coloração (vivos) espermatozóides corados (mortos) e um terceiro tipo que apresenta somente a região pós acrossomal corada. Estes últimos podem ser interpretados como espermatozóides mortos que apresentam ainda o acrossoma intacto, pois o corante não foi capaz de penetrar nesta região. A porcentagem de vivos e mortos encontrada neste experimento em ambas colorações (Tabela 1) são semelhantes às relatadas por TAMULI e WATSON (1994) - foram em média 85% de espermatozóides vivos com a coloração Giemsa-eosina-nigrosina.

Contudo, nos espermatozóides vivo (não corados) não foi possível com o ABR e a EN avaliar o status do acrossoma. Esta avaliação é importante, pois está bem correlacionada com a fertilidade do sêmen (GARNER et al., 1986).

WATON, (1975) utilizando o GIEMSA e TAMULI e Watson (1994) combinado o GIEMSA a EN mostraram que estes corantes foram capazes de avaliar com eficiência o status do acrossoma (acrossoma reagido e não reagido) identificando um tipo a mais que neste experimento, isto é, espermatozóide vivo com acrossoma intacto. Isto significa que o ABR e a EN não são capazes de distinguir com precisão o status do acrossoma. Uma combinação do ABR ao Giemsa possibilitará, provavelmente, uma avaliação do status do acrossoma assim como ocorreu com a EN.

Foram observados ainda que alguns espermatozoides apresentam tanto no EN quanto no ABR uma fraca coloração que pode deixar dúvida se estão realmente vivos ou mortos. Este terceiro tipo pode ser interpretado como espermatozoide moribundo que não permite a passagem eficiente do corante para o seu citoplasma. Espermatozoides ditos moribundos foram relatados em várias espécies com o uso de uma dupla coloração de fluorescência (carboxifluoroceína e iodo de Propidium), com o uso da citometria em fluxo que é um método eficiente, porém muito sofisticado (GARNER et al., 1986).

Quando se compararam os corantes em temperaturas diferentes de estocagem, (4°C e 29°C) observamos que um fenômeno ocorre com a eosina-nigrosina a temperatura de 29°C. A formação de partículas que se coram deixando o esfregaço com um aspecto sujo, o que dificulta a leitura da lâmina, originando também artefatos que podem ser confundidos com gotas citoplasmáticas ou alterar o contorno do espermatozoide dificultando sua visualização. Este fato não se encontra relatado na literatura consultada e supõe-se que isto se deva a uma alteração na eosina-nigrosina que não resiste bem uma conservação a temperatura de estocagem utilizada (29°C).

CHEMINEAU et al. (1991) ressaltam que o pH da solução de eosina-nigrosina deve ser avaliado mensalmente e que a solução deve ser conservada a 4°C para uma boa conservação de suas propriedades. Provavelmente, temperaturas superiores à indicada possam causar danos ao corante alterando sua composição e, portanto diminuindo sua eficiência como coloração.

Este fenômeno não ocorreu com o corante ABR mostrando que independente da temperatura de conservação, os esfregaços apresentaram-se sempre limpos e sem artefatos que possam prejudicar a observação do espermatozoide (fig. 4). Esta qualidade do ABR mostra que este pode ser utilizado

tanto em laboratório quanto em campo para realização de exames andrológicos de reprodutores.

A avaliação das patologias espermáticas é um importante parâmetro de avaliação da qualidade do sêmen de reprodutores, pois uma alta correlação foi encontrada entre esta avaliação e a fertilidade (COLAS, 1980; COLAS, 1983; CHEMINEAU et al. 1991). Para tal, uma coloração deve permitir uma boa visualização do contorno e compartimento da célula espermática, permitindo identificar alterações na sua morfologia (CHEMINEAU et al. 1991; DERIVAUX 1980).

As patologias espermáticas foram igualmente identificadas em ambos corantes estando estes valores em consonância aos estabelecidos pelo CBRA (1998) em que o percentual de patologias espermáticas para o macho ovino não deve ultrapassar 15%. Os defeitos mais comumente encontrados em ambas colorações foram de flagelo ou cauda, independente da temperatura de estocagem do corante. (COLAS, 1980; SMITH & GORDON, 1967; HAFEZ et al., 1955;) relatam que, no carneiro, as anomalias de flagelo são mais freqüentes que em outras espécies, o que justifica os resultado deste experimento.

Porém com relação à análise da presença de gotas citoplasmáticas (GCP e GCD) a EN a 29°C dificulta esta avaliação, pois a presença de partículas coradas sobre a cauda pode, ser confundida, por um examinador pouco experiente, e até mesmo para uma pessoa com boa experiência pode dificultar esta análise.

O ABR apresenta outras vantagens em relação à EN, é um produto de mais baixo custo (R\$2,50/100mL contra R\$ 53,00/100mL da EN) e de simples preparação, uma vez que a Eosina-nigrosina é uma dupla coloração e necessita ser filtrada após preparação e o pH corrigido mensalmente, enquanto que o ABR é uma coloração simples necessitando somente de uma solução de citrato a 4% na sua composição.

9. CONCLUSÕES

Ambos os corantes, quando estocados a 4°C, são igualmente eficientes para avaliação da morfologia espermática do sêmen ovino, com exceção do status do acrossoma. Porém à temperatura ambiente de estocagem de 29°C, o azul de bromofenol possibilitou uma melhor visualização da célula espermática ao microscópio quando da análise das patologias espermáticas.

Por ser uma coloração de baixo custo, de fácil preparação e simples estocagem, o ABR possibilita sua utilização em condições de campo para realização de exame andrológico em carneiros. Estudos com o uso deste corante em outras espécies são necessários para confirmar sua eficiência como coloração de células espermáticas.

10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARAÚJO, A. A. Mise au point d'un dilueur de conservation en milieu liquide pour la semence ovine en vue de l'insémination artificielle. 81p. Tese (Doutorado em Ciências da Vida) Université François Rabelais de Tours, Tours, 2000.

BLOM, E. Interpretation of spermatic cytology in bulls. *Fertility and Sterility*. v.1, p.23-35, 1950a.

BLOM, E. A one minute live dead sperm stain by means of eosin-nigrosin. *Fertility and Sterility*. v.1, p.176-177, 1950b.

BLOM, E. Om bedømmelsen af tyresperma. Specielt med henblik på anvendelsen ved den kustrige sal deverfring. Kopenhagen, 1950c. 223p. Tese Doutorado. Citado por Garcia 1971.

BLOM, E. A new sterilizing and hereditary defect (the 'Dag defect') located in the bull sperm tail. *Nature*. v. 209, p.739-740, 1966.

CAMPBELL, R.C., DOTT, H.M., GLOVER, T.D. Nigrosin eosin as a stain for differentiating live and dead spermatozoa. *J. Agric. Sci.* v. 48, p. 1-8, 1985.

CBRA. Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal. 2a edição, Belo Horizonte. 1998, 49 p.

CENTOLA, G.M. MATTOX, J.H., BURDE,S., LEARY, J.F. Assessment of viability and acrosome status of fresh and frozen-thawed human spermatozoa using single wave-length fluorescence microscopy. *Mol. Reprod. Dev.* v. 27, p. 130-135, 1990.

CHEMINEAU, P., COGNIE, Y., GUÉRIN, Y., ORGEU, P., VALLET, J.C. Training Manual on Artificial Insemination in Sheep and Goats. FAO. Animal Production and Health Paper. Rome, 1991, 222p.

COLAS, G., DAUZIER, I., COUROT, M., ORTAVANT, R., SIGNORET, J.P. Résultats obtenus au cours de l'étude de quelques facteurs importants de l'insémination artificielle ovine. Ann Zootech. (Paris). v. 16, p.47-57, 1968.

COLAS, G. Variations saisonnières de la qualité du sperme chez la belier Ili-de-france. I. étude de la morphologie cellulaire et de la motilité massale. Reprod. Nutr. Dévelop.. v. 20, p.1789-1799, 1980.

COLAS, G. Factors affecting the quality of ram semen. In Haresign, W., (éd.), Sheep production. Butterworth, Londres. p. 453-465, 1984.

DACHEUX, J.L. & GATTI, J.L. Bases moléculaires du mouvement flagellaire. Andrologie. v.5, p.15-30, 1995.

Dacheux, J.L., Druart, X., Fouchécourt, Syntin, P., Gatti, J.L., Okamura, N. Dacheux, F. Role of epididymal secretory proteins in sperm maturation with particular reference to the boar. J Reprod Fertil Suppl.. v.53, p. 99-107, 1998.

DERIVAUX, J. Reprodução dos animais domésticos. Editorial Acribia. Zaragoza. 1980. 446p.

EPPELSTON, J., MAXWELL, WMC. Recent Attempts to improve the fertility of frozen semen inseminated into the cervix. Woll Tech Sheep Breed. v.41, p. 291-302, 1993.

GALLOWAY, D.B. Introductory review; factors affecting fertility In bulls. Course held at the University of Queensland Veterinary School, 18-22 February. p.2-23, 1974.

GARNER, D.L., PINKEL, D., JOHNSON, L.A., PACE, M.M. Assesment os spermatozoal function using dual fluorescent staining and flow cytometric analyses. Biol. of Reprod., v.24, p. 127-18, 1986.

GATTI, J.L., DACHEUX, J.L. Bases moléculaires du mouvement flagellaire. Adrologie. v.5, p.15-30, 1995.

GATTI, J.L., DACHEUX, J.L. Sperm motility controls at the membrane level. Role for the seminal plasma and ionic environment. C. R. Acad. Agric. Fr., v.5, p.167-176, 1995.

GUIFON & HALL - Text Book of Medical Physiology, 9th edition, p. 911-923, 1996.

HAFEZ, E.S.E., BADRELDIN, A.L., DARWISH, Y. Seasonal variations in semen characteristics of sheep in the subtropics. J. agric. Sci., v.45, p. 283-292, 1955.

HANCOCK, J.L. A staining technique for the study of temperature shock in semen. Nature (lond). v. 167: p.323, 1951.

HANCOCK, G.L. The morphologic characteristics of spermatozoa and fertility. Int. J. Fert.. v.4, p.347-59, 1959.

Hancock J. L. The morphology of boar spermatozoa. J. Roy Microscopy Soc.. v. 76. p. 84–97, 1956.

HARRISON, R.A.P., VICKERS, S.E. Use of fluorescent probes to assess membrane integrity in mammalian spermatozoa. *Reprod. Fert.* v. 88, p. 34-352, 1990.

KASS, L., GARDNER, .F.H. Bromochlorophenol blue. A new stain for erythroblasts. *Arch Pathol. Lab. Med.* v.103(11), p.565-6, 1979

LIGHTFOOT, R.J., RESTAL, B.J. Effects os site of insemination, sperm motility and genital tract contractions on transport of spermatozoa in the ewe. *J. Reprod. Fertil.* v.26, p.1-3, 1971.

LIGHTFOOT, RJ, RESTALL, BJ. Effects of site of insemination, sperm motility and genital tract contractions on transport of spermatozoa in the ewe. *J Reprod Fertil.* v.26, p.1-3, 1971.

FOOTE, R.H.; ARRIOLA, J.; WALL, R.J. Principies and procedures for photometric measurement of sperm cell concentration. In: *TECHNICAL CONFERENCE ON ARTIFICIAL INSEMINATION AND REPRODUCTION, 7.*, Madison, 1978. *Proceedings... s.l., NAAB.* p.55-61,1978.

MALMGREN, L. Assessing the quality of raw semen: a review. *Theriogenology*, v.48, p.523-530, 1997.

MANN, T.; LUTWAK-MANN, C. Male reproductive function and semen. New York: Springer-Verlag, . 495p, 1981.

MIES FILHO, A. Reprodução dos animais e inseminação artificial. 3.ed. Porto Alegre, Sulina,. 545p, 1975.

PURSEL, V.G., JOHNSON, L.A., RAMPACEK, G.B. Acrosome morphology of boar spermatozoa incubated before cold shock. *J Anim Sci.*, v.34, p.278-283,1972.

SÁ, W.F., LOPES, C.F., CAMARGO, L.S.A., FERREIRA, A.M., RAMOS, A.A., VIANA, J.H.M., NOGUEIRA, L.A.G. Avaliação da capacitação espermática *in vitro* pela viabilidade e reação acrossômica. Revista Brasileira de Ciência Veterinária. v.9, n.2, p.68 - 71, 2002

SMITH, P., GORDON, I. Seasonal and breed variations in the semen characteristics of ram. Ireland. Irish Vet. J., v 21, p. 222-223, 1967.

SALISBURY, G.W. and VAN DEMARK, N.L.. Physiology of Reproduction and Artificial Insemination in Cattle. W.H. Freeman and Co. London, San Francisco , 2.ed., 1978.

TAMULI, M.K., WHATSON, .P.F. Use of a simple staining technique to distinguish acrosomal changes in the live sperm sub-population. Anim. Reprod. Scien.. v.35, p. 247-254, 1994.

WALTON, A. Notes on Art. Ins. Of Sheep and Cattle and hoeses. Lodres. 1933

WATSON, P.F. Use of Giensa stain to detect changes in acrosomes of frozen ram spermatozoa. The Vet. Record. v. 97, p. 12-15, 1975.

WILLIAMS, W.W. Technique of collecting semen for laboratory examination with a review of several diseased bulls. Cornell Veterinarian, Ithaca, v.10, p.87-94, 1920.

ZEMJANIS, R. Diagnostic and therapeutic techniques in animal reproduction. 2.ed. Baltimore, Williams Wilkins Co, 242p, 1970.

11 FIGURAS

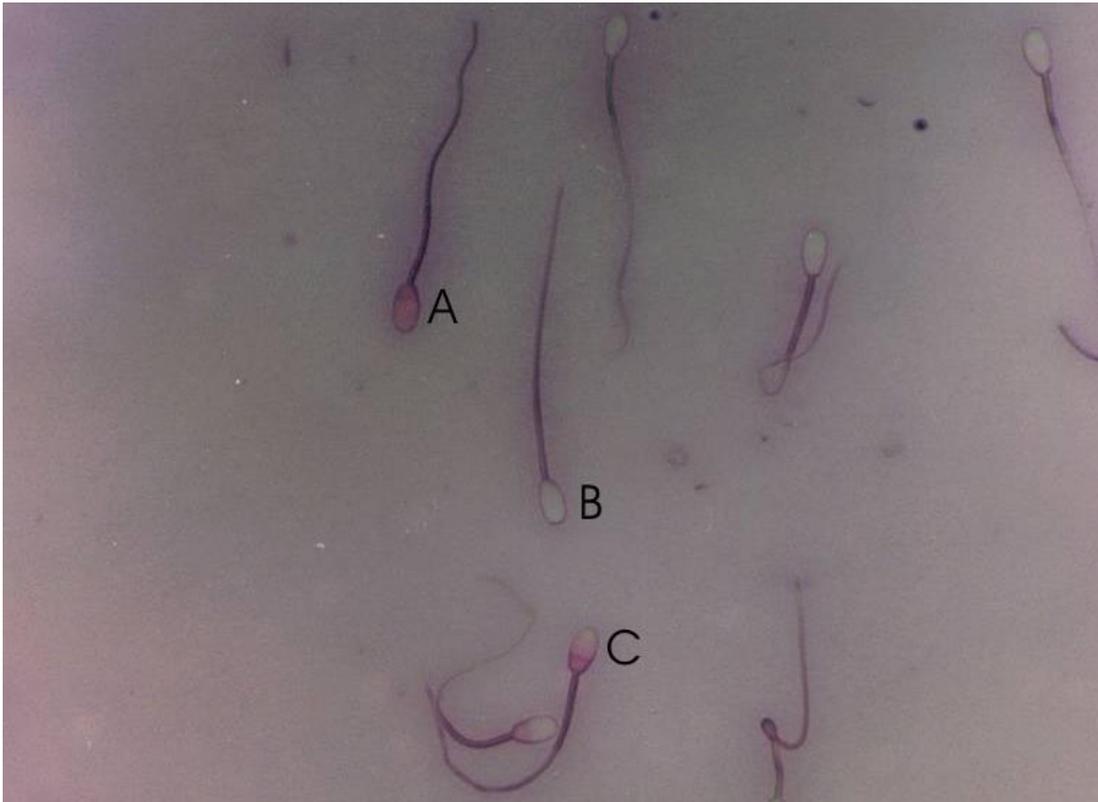


Figura 1: Espermatozóides corados com EN, conservada a 4°C. A – Espermatozóide morto; B – Espermatozóide vivo; C – Espermatozóide morto com acrossoma intacto. Aumento de 400x

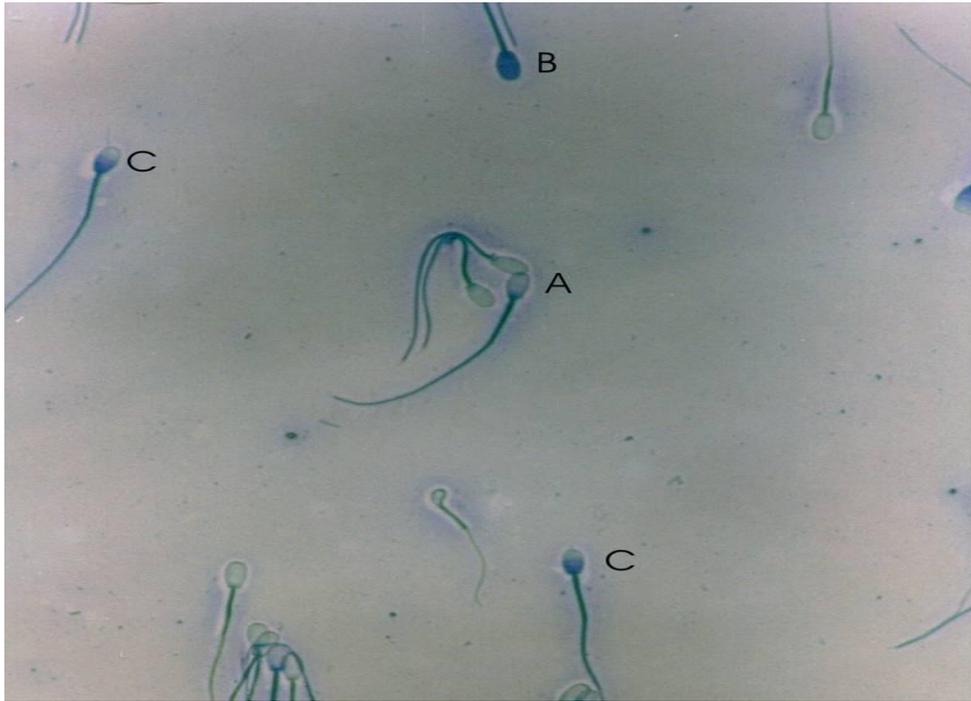


Figura 2: Espermatozoides corados com ABR, conservada a 4°C. A – Espermatozóide vivo; B – Espermatozóide morto; C – Espermatozóide morto com acrossoma intacto. Aumento de 400x

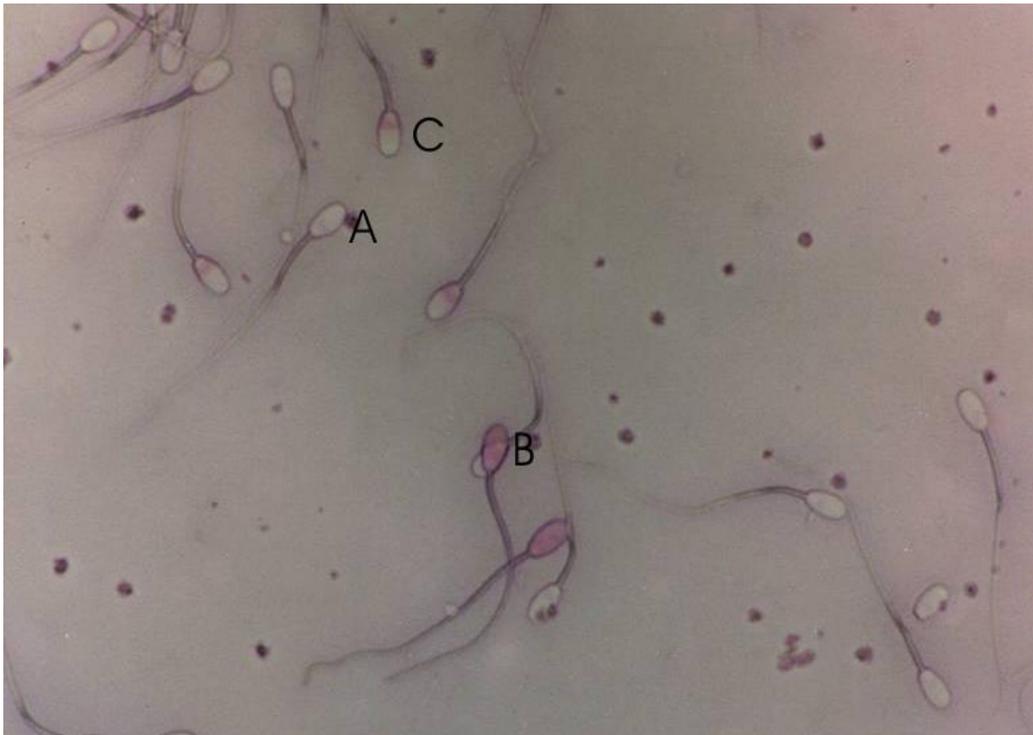


Figura 3: Espermatozoides corados com EN, conservada a 29°C. A – Espermatozóide vivo; B – Espermatozóide morto; C – Espermatozóide morto com acrossoma intacto. Aumento de 400x

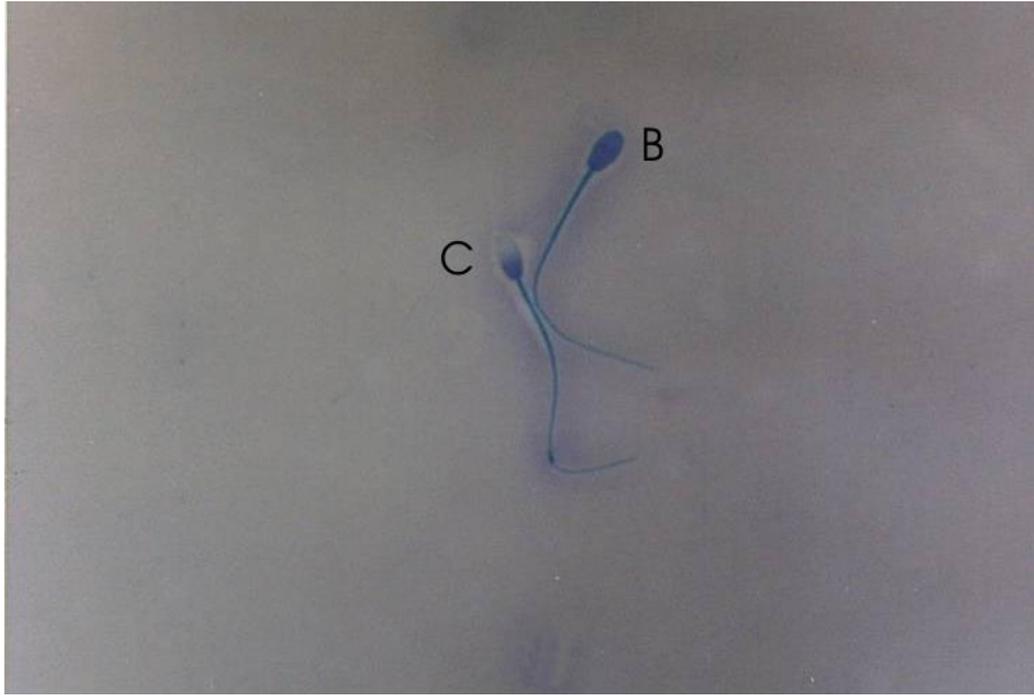
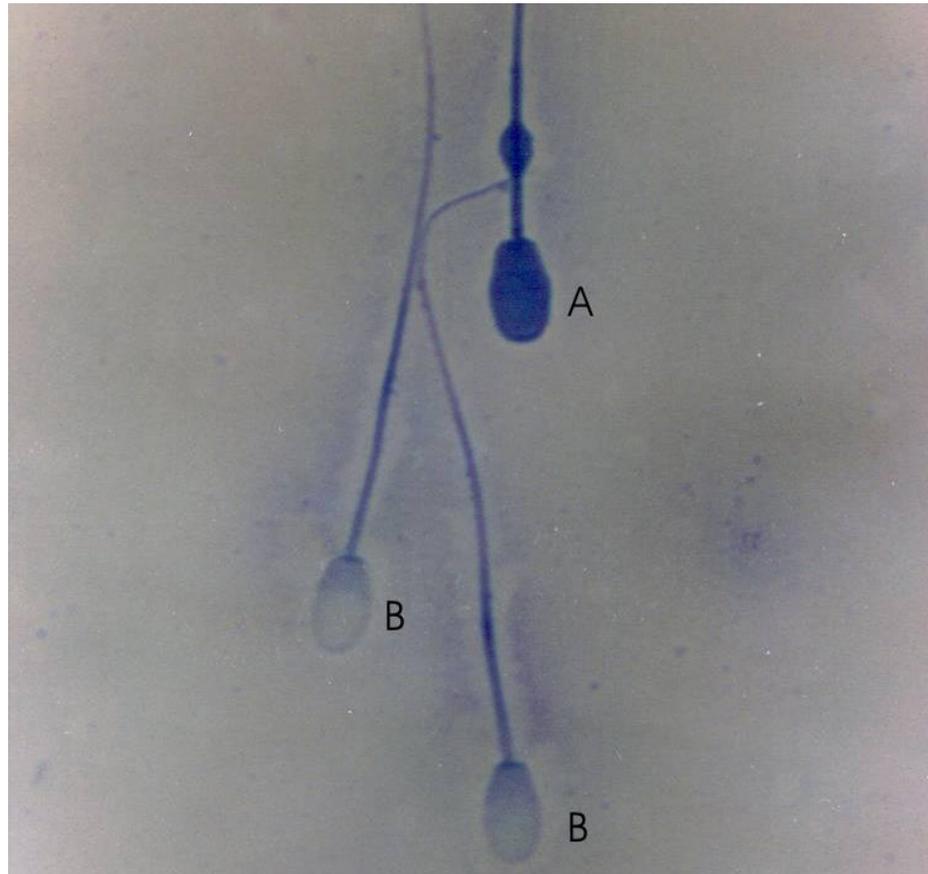
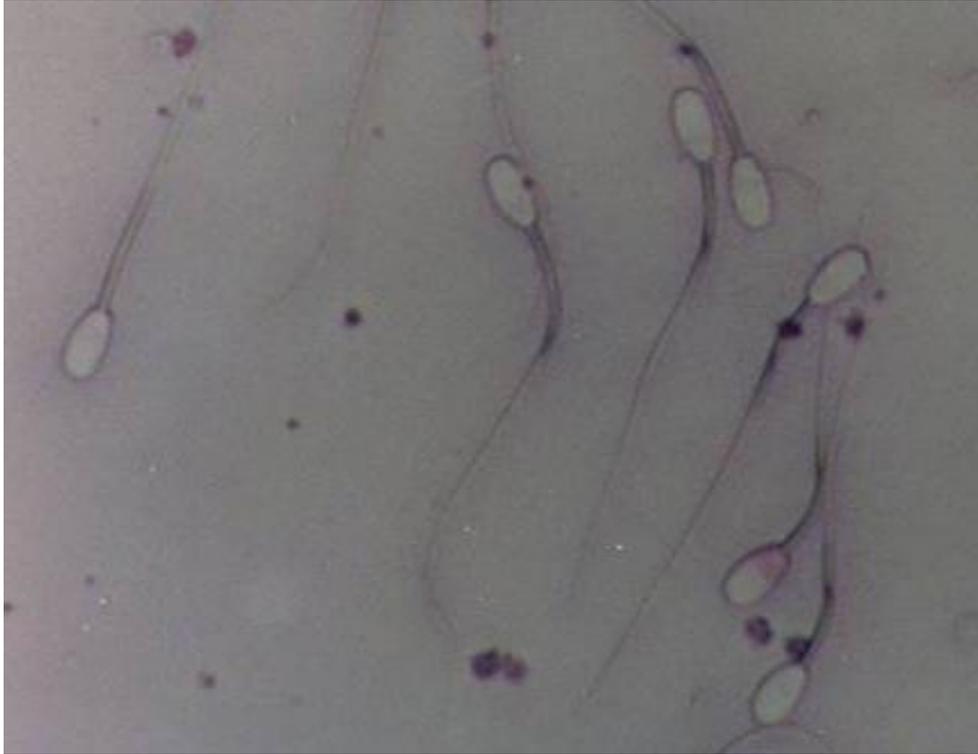


Figura 4: Espermatozóides corados com ABR, conservado a 29°C. B – Espermatozóide morto; C – Espermatozóide morto com acrossoma intacto. Aumento de 400x

12 ANEXOS



Anexo 1: Espermatozóides corados com ABR, conservado a 29°C. A - Espermatozóide morto com gota citoplasmática; B – Espermatozóide vivo. Aumento de 600x



Anexo 2: Espermatozoides corados com EN, conservado a 29°C. Aumento de 600x