



Uso da citometria de fluxo na avaliação da membrana plasmática do espermatozoide caprino

Autores: Marciane Da Silva Maia - 1º Autor (Embrapa Semiárido);
Claudio Avelino De Oliveira Lucena - Co-Autor (UFRN);
Carlos Eduardo Bezerra De Moura - Co-Autor (UFERSA)

Auxílio Financeiro:

Palavras-Chave: criopreservação, fluorescência, sêmen, viabilidade espermática

Resumo: A avaliação rápida e precisa da viabilidade espermática é importante na determinação da qualidade seminal. O método clássico usado, coloração supra vital, é muito demorado e avalia relativamente poucos espermatozoides. A associação de sondas fluorescentes com a citometria de fluxo permite quantificar rapidamente características específicas de um grande número de células individuais. O objetivo deste estudo foi avaliar a eficácia da citometria de fluxo para analisar a viabilidade espermática em comparação com a técnica de coloração vital, bem como comparar os resultados obtidos no sêmen caprino criopreservado em diferentes diluidores. Os ejaculados, foram divididos em partes iguais e após a remoção do plasma seminal (centrifugação 2 x 600 x g / 10 min) o sêmen foi diluído (400 x 10⁶ spz/ml) em diluidor à base de leite desnatado-glicosado ou Tris-glicose-gema, envasado em palhetas de 0,25 ml e congelado em sistema automatizado. Após a descongelação (37 °C/30s) uma amostra era corada com uma solução de sondas contendo Diacetato de carboxifluoresceína (DIC) e Iodeto de propídio (IP) na concentração de 0,002 mg/ml de DIC e 0,01 mg/ml de IP (Peña et al. Theriogenology, v.50, p.1211-1220, 1998) e analisada em Citômetro de Fluxo (FACS Canto II, BD Bioscience) contando-se 20.000 células/amostra. Para a coloração vital uma gota de sêmen era colocada sobre uma lâmina de vidro pré-aquecida (37°C) e misturada com uma gota de corante supra vital (eosina 1 g/100 ml; nigrosina 5g/100 ml; citrato de sódio 2,9 g/100 ml). Em seguida fazia-se um esfregaço e após secagem, 200 células/lâmina eram examinadas com aumento de 1000 x em microscópio de contraste de fase (Leica DM 750). O experimento foi replicado oito vezes utilizando um pool de dois ejaculados de um mesmo bode. A relação entre as populações de espermatozoides quantificadas pela citometria de fluxo e pela coloração vital foi estabelecida pela análise de correlação simples e o efeito do diluidor sobre os parâmetros estudados pela ANOVA com comparação de médias pelo teste de Duncan a P<0,05. A citometria de fluxo permitiu a identificação de três populações de espermatozoides: A= células positivas para IP (fluorescência vermelha); B= células coradas por IP e que também retiveram DIC e C= células que retiveram apenas DIC (fluorescência verde). A porcentagem de espermatozoides viáveis (fluorescência verde) foi maior nas amostras congeladas em Tris-gema (49,1± 14,5%) que no leite (32,8 ± 13,6%). Comportamento semelhante foi observado na coloração vital com 72,3% de viáveis no Tris-gema e 58% no Leite. Diferenças na retenção de viabilidade entre os diluidores foram detectadas mesmo entre amostras de espermatozoides oriundas do mesmo ejaculado sugerindo que o diluidor Tris-gema proporcionou uma melhor proteção à membrana plasmática durante a congelamento e descongelamento, do que o diluidor à base de leite. A porcentagem de espermatozoides viáveis, determinada pela análise de citometria de fluxo foi altamente correlacionada com a técnica de microscopia com coloração vital (r = 0,69; P<0,01) demonstrando que a combinação de DIC e IP analisados por citometria de fluxo é um método rápido e preciso para avaliar a viabilidade do espermatozoide caprino.

Disponível em:

<http://www.renorbio.org/congresso/renorbio2017/index.php?class=TrabalhosPublic&method=onView&key=50&id=50>