

## **Avaliação da membrana plasmática do espermatozoide caprino usando sondas fluorescentes e citometria de fluxo**

*Assessment of the plasma membrane of goat spermatozoa using fluorescent probes and flow cytometry*

**Marciane da Silva Maia<sup>1\*</sup>, Claudio Avelino de Oliveira Lucena<sup>2</sup>,  
Carlos Eduardo Bezerra de Moura<sup>3</sup>**

<sup>1</sup>Embrapa Semiárido, Petrolina, PE; <sup>2</sup>Unidade Acadêmica Especializada em Ciência Animal, UFRN, Macaíba, RN;

<sup>3</sup>Departamento de Ciências Animais, UFERSA, Mossoró, RN, Brasil.

\*E-mail: marciane.maia@embrapa.br

Para melhorar a análise de rotina dos espermatozoides, é necessário desenvolver métodos rápidos, objetivos e acessíveis de avaliação de diferentes aspectos da viabilidade espermática. A membrana plasmática é essencial para a função espermática, uma vez que fornece proteção física à célula, atua como uma barreira seletiva e desempenha um papel fundamental nas interações intercelulares. Muitos dos métodos atualmente utilizados para avaliar o seu status baseiam-se no aumento da permeabilidade das membranas espermáticas danificadas a diferentes substâncias, incluindo a eosina-nigrosina e diversas sondas fluorescentes. A associação das sondas fluorescentes com a citometria de fluxo tem a vantagem possibilitar a avaliação rápida de características específicas de um grande número de espermatozoides. O sêmen, oriundo de um pool de dois ejaculados de um mesmo bode (n=8) foi dividido em duas partes iguais submetido à centrifugação (2 x 600 g por 10min) e em seguida diluído (400 x 106 sptz/ml) em diluidor à base de leite desnatado-glicosado ou Tris-glicose-gema e submetido a criopreservação. A integridade da membrana foi analisada por citometria de fluxo (Citômetro de fluxo FACS Canto II; BD Bioscience, CA, EUA) após coloração com Diacetato de carboxifluoresceína (DIC, 0,002 mg/ml) e Iodeto de propídio (IP, 0,01 mg/ml) e por microspia ótica (Leica DM 750, 1000x) após coloração vital Eosina-nigrosina. 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 coloração dupla de DIC/IP analisada em 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 que retiveram fluorescência verde (viáveis) após a descongelação foi maior nas amostras congeladas em Tris-gema ( $49,1 \pm 14,5\%$ ) comparada ao Leite ( $32,8 \pm 13,6\%$ ). Comportamento semelhante foi observado na avaliação por 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 congelação e descongelação, do que o diluidor à base de leite. Observou-se também uma alta correlação positiva entre a população C com a porcentagem de espermatozoides viáveis determinada por coloração vital ( $r = 0,69$ ;  $P < 0,01$ ), demonstrando que a combinação de DIC e IP analisados por citometria de fluxo é um método viável para avaliar a viabilidade do espermatozoide caprino além de ser mais rápido e preciso. Nossos resultados validam o método da citometria de fluxo para avaliar a integridade da membrana plasmática do espermatozoide caprino e indicam que o diluidor Tris-gema, na formulação utilizada, é menos prejudicial para os espermatozoides dessa espécie do que o leite desnatado.

**Palavras-chave:** criopreservação, citometria de fluxo, sondas fluorescente, sêmen, viabilidade espermática.

**Keywords:** cryopreservation, flow cytometry, fluorescent probes, semen, sperm viability.