

EFEITO DA FIXAÇÃO DO SÊMEN PÓS-TESTE HIPOSMÓTICO PARA AVALIAÇÃO DA MEMBRANA ESPERMÁTICA DE CAPRINOS

**EFFECT OF FIXING THE SEMEN POST-TEST FOR EVALUATION OF MEMBRANE
HYPOSMOTIC SPERM OF GOATS**

SALVIANO, Maurício Barbosa

Departamento de Zootecnia da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da
Universidade Estadual Paulista (FCAV/UNESP). Jaboticabal, SP, Brasil.

SOUZA, José Adalmir Torres de

VIDIGAL, Kamilla Figueiredo

Laboratório de Biotecnologia da Reprodução do Departamento de Clínica e Cirurgia
Veterinária da Universidade Federal do Piauí (UFPI). Teresina, PI, Brasil.

RESUMO

O espermatozóide é composto de muitas estruturas que, se afetadas, comprometem a capacidade de fecundação, em especial, as membranas plasmática e acrossomal são fundamentais durante a capacitação espermática, sendo limitante sua integridade estrutural e funcional. Este trabalho objetivou corroborar para a padronização do teste hiposmótico em caprinos, com a utilização da fixação como método de manter a viabilidade do teste durante um longo período. Os resultados indicam que a utilização da solução de citrato de sódio formolada a 4% não influencia negativamente na classificação dos espermatozóides quanto à reatividade ou não ao HOST. Sugere-se que, em caso de impossibilidade da leitura de lâminas no momento do teste, pode-se utilizar este fixador para preservação espermática osmoticamente ativada.

Palavras-chave: bodes, espermatozóide, formol, membrana plasmática

ABSTRACT

In common spermgram, we evaluate the volume, mass movement, total motility, vigor, concentration of spermatozoon and morphology of cells trying to discover the ability of sperm



to fertilization the oocytes. However, these characteristics are not predicting real ability of sperm because the spermatozoon has many structures affecting this ability as plasma membrane, acrosome, nucleo condensation and more. Actually, we know about the importance of plasma membrane on capacitation of spermatozoon and to evaluate this structure have many tests between this the hypoosmotic swelling test (HOST). The HOST in goats is not standardized and to do it we test the fixation using citrate of sodium solution with 4% of formaldehyd after that. The results indicated formaldehyde not affects goat sperm activated by hypoosmotic test.

Key works: goats, sperm, formaldehyde, plasma membrane

INTRODUÇÃO

Na rotina de avaliação de sêmen para a predição da fertilidade do macho, são realizadas, convencionalmente, a avaliação da motilidade, vigor, concentração e morfologia espermática, na tentativa de se obter informações sobre o estado da espermatogênese e do potencial dos gametas. Porém, estes testes são limitados e não podem avaliar a real habilidade de fertilização (CORREA et al., 1997).

Com o intuito de avaliar a atividade bioquímica da membrana espermática, foi sugerido por Jeyendran et al. (1984) a utilização do teste hiposmótico (HOST) para espécie humana. Esse teste baseia-se na observação de que um espermatozóide com uma membrana celular íntegra, quando colocado em solução hiposmótica, permite a passagem da água pela membrana celular até a estabilização do equilíbrio osmótico entre os fluidos extra e intracelulares (SANTOS et al., 2001). Com o influxo da água para o interior da célula, há um aumento do volume celular (edema), com posterior dobramento da cauda (JEYENDRAN et al., 1984).

O HOST tem sido utilizado como protocolo de avaliação da viabilidade funcional da membrana espermática de diversas espécies: humanos (JEYENDRAN et al., 1984), eqüinos (MELO & HENRY, 1999; ALVES et al., 2005), caninos (KUMI-DIAKA, 1993), ovinos (OBERST et al., 2003) e caprinos (FONSECA et al., 2001; SANTOS et al., 2001; SALGUEIRO et al., 2003).

Embora a aplicação deste teste, para a maioria dos animais não esteja padronizado, o HOST pode ser considerado, dentre outros, como um indicador de fertilidade, já que a



viabilidade da membrana é um requisito básico para que ocorra a capacitação espermática (MELO & HENRY, 1999). Em 2005, Bittencourt et al. reportam que o HOST mostrou-se um método eficiente para avaliação da membrana espermática. Porém, é necessário o desenvolvimento de novos estudos para a padronização da técnica, com a confirmação dos melhores solutos e da melhor osmolaridade a serem empregados, além da durabilidade do material para avaliação (MELO & HENRY, 1999).

Este trabalho teve como objetivo avaliar a fixação do sêmen após descongelação e teste hiposmótico como meta de aperfeiçoar a avaliação da membrana sem necessidade de urgência na leitura de lâminas.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados sete machos caprinos, adultos, sem padrão racial definido e previamente testados quanto a morfologia e funcionalidade dos órgãos reprodutivos através de exames ultrassonográficos e espermogramas, de acordo com proposto pelo Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA, 1998) e atestando características seminais normais para a espécie (SALVIANO & SOUZA, 2008). Realizou-se seis colheitas por animal (uma colheita/semana/animal), sempre no período da manhã, utilizando-se vagina artificial, na presença de uma fêmea caprina em estro induzido.

Imediatamente após a colheita, o sêmen foi avaliado conforme as recomendações do Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA, 1998). Uma vez realizadas essas as avaliações, o sêmen foi diluído em solução TRIS-gema em uma proporção pré-estabelecida de 1:9 (sêmen:diluidor) e envasado em palhetas de 0,5 mL, previamente identificadas quanto ao número do animal e a partida (data da colheita). A congelação do sêmen foi realizada utilizando técnica de criopreservação automatizada (TK 3000®) obedecendo a uma curva de resfriamento de 0,25°C/minuto até 5°C, com duração de aproximadamente 1 hora e 15 minutos e uma curva de congelação de -15°C/minuto de 5°C até -80°C e, posteriormente, 10°C/minuto até -120°C para, finalmente, serem mergulhadas diretamente em nitrogênio líquido. Após congeladas, as amostras de sêmen foram armazenadas em botijão criogênico até sua utilização (período maior que 15 dias).



Para realizar a avaliação da integridade da membrana plasmática, as amostras de sêmen foram descongeladas mediante imersão das palhetas em Banho-Maria à temperatura de 37°C durante 30 segundos, após o que 250 µL de sêmen foram misturados a 2 mL da solução hiposmótica constituída por partes iguais de citrato tri-sódico e frutose obedecendo uma concentração de 125 mOsm/L, conforme Fonseca et al. (2005) e incubados em Banho-Maria durante 60 minutos a 37°C. Transcorrido esse tempo, foram depositados 20µL da solução contendo sêmen sobre lâmina, coberta com lamínula e observada em microscópio de contraste de fase com aumento de 1000 vezes. O restante das amostras foram formolizadas em solução de formol-salina tamponada na proporção de 10:1 (sêmen diluído ativado por HOST:fixador), estocadas em eppendorf e avaliado após sete dias, seguindo as mesmas metodologias da avaliação pós-descongelção.

Contou-se um total de 200 espermatozóides por lâmina/tratamento (fixadas ou não) registrando-se a percentagem dos que apresentaram endosmose positiva (cauda enrolada) seguindo o proposto por Revell & Mrode (1994).

O cálculo do número de espermatozóides reativos ao teste hiposmótico foi feito por intermédio da fórmula citada por Melo & Henry (1999), onde: $HOST (\%) = (\% \text{ de alterações na região da cauda após HOST}) - (\% \text{ de alterações na região da cauda antes do HOST})$.

Os resultados referentes à percentagem de células reativas ao HOST sofreram transformação arco-seno e foram submetidas ao teste de normalidade de Shapiro-Wilk e conseqüentemente comparados pelo teste não paramétrico de Wilcoxon.

RESULTADOS

A tabela 1 apresenta as médias e desvios padrão dos espermatozóides reativos ao teste hiposmótico pré e pós-fixação. Podemos observar que apenas no animal 4 ocorreu diferença significativa ($P < 0,05$) entre a utilização da solução de citrato de sódio formolada a 4%. Esta diferença não foi suficiente para impossibilitar a afirmação de que a utilização de solução formolada é para preservação de células espermáticas osmoticamente ativadas. Podemos observar também que, com a fixação na solução de formol o coeficiente de variação reduz de 23,63 para 8,95.



O gráfico 1 mostra a média e o desvios padrão por animal da porcentagem de espermatozóides reativos ao teste hiposmótico e no gráfico 2 estão as médias e os desvios padrões desconsiderando a classificação por animal.

De acordo com a correlação de Spearman as células reativas ao teste hiposmótico antes e após a fixação em solução de citrato de sódio formolada a 4% é de -0,58 ($P < 0,05$). Ao aplicar a regressão linear ($P < 0,04$) considerando como variável dependente a porcentagem de células reativas ao HOST após a fixação (y) e a variável dependente sendo as células reativas antes da fixação (x) obtivemos a equação: $y = 0,777 - 0,210 x$.

Tabela 1. Médias e desvios padrão das porcentagens de espermatozóides caprinos reativos ao teste hiposmótico antes e após fixação em Citrato de sódio formolado 4%

Table 1. Means and standard deviation of percent of goat sperm reactive to hyposmotic swelling test (HOST) before and after sperm fixation

Animal	Pré-Fixação	Pós-Fixação
1	57,50 ± 16,12	59,17 ± 5,81
2	68,00 ± 10,06	57,50 ± 5,17
3	58,50 ± 13,43	60,17 ± 3,54
4	76,33 ± 7,87*	54,50 ± 3,45*
5	56,00 ± 11,97	59,00 ± 4,38
6	64,67 ± 10,41	62,33 ± 2,80
7	69,83 ± 10,34	58,00 ± 3,74
Média	64,40 ± 12,91	58,67 ± 4,53

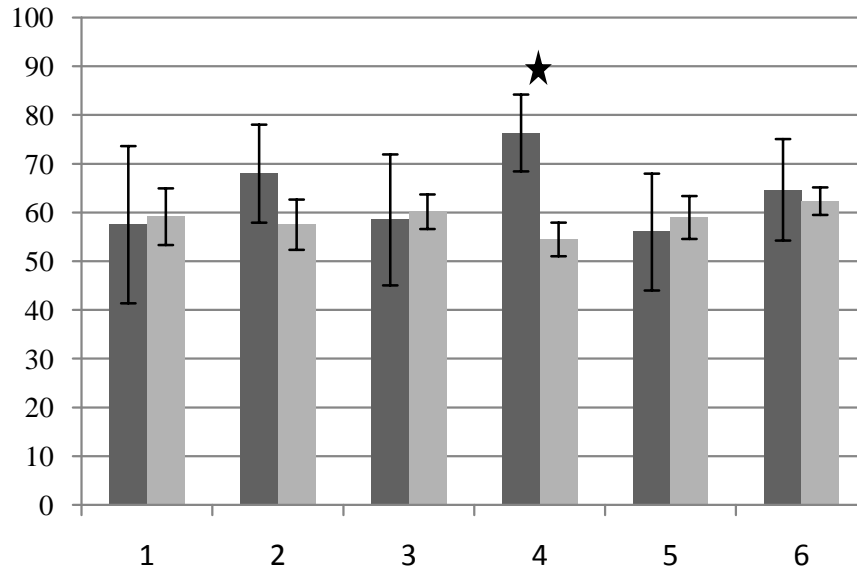
Médias seguidas de asterisco (*) na mesma linha são significativamente diferentes ($P < 0,05$) pelo teste de Wilcoxon.

Means followed by asterisk () in the same line are significantly different ($P < 0.05$) by Wilcoxon Test.*

Gráfico 1. Média por animal das porcentagens de espermatozóides reativos ao teste hiposmótico antes e pós fixação em solução de citrato de sódio formolado a 4%



Graphic 1. Means by animal of percents of sperm reactive to hyposmotic swelling test before and after sperm fixation



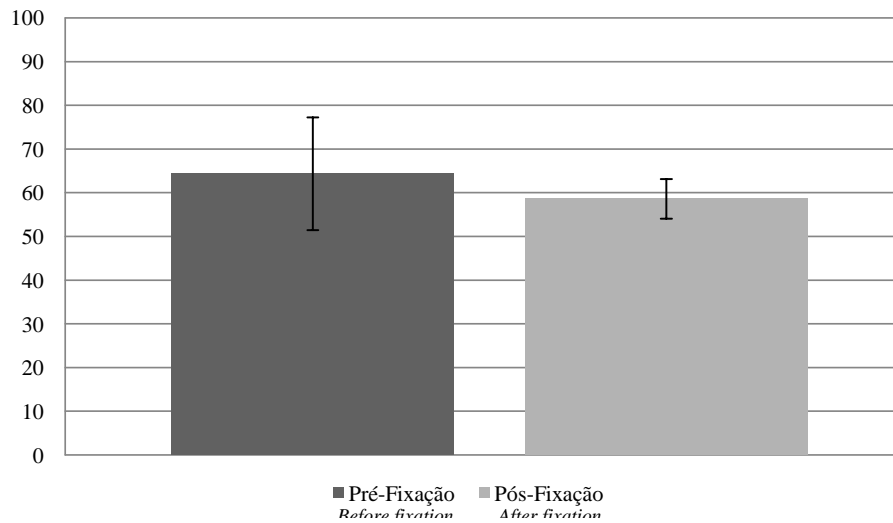
A estrela negra mostra o único animal (4) que teve diferença estatística ($P < 0,05$), pelo teste de Wilcoxon, entre as amostras antes e após fixação de espermatozóides reativos ao teste hiposmótico.

The black star shows an animal (4) that differ ($P < 0.05$) by Wilcoxon Test between treatments (before and after sperm fixation on hyposmotic swelling test).

Gráfico 2. Média por animal das porcentagens de espermatozóides reativos ao teste hiposmótico antes e pós-fixação em solução de citrato de sódio formulado a 4%

Graphic 2. Means by animal of percents of sperm reactive on hyposmotic swelling test before and after sperm fixation





DISCUSSÃO

A partir da descoberta do formaldeído em 1867 por Von Hoffman, este passou a ser empregado nas técnicas anatômicas e microscópicas (Rodrigues, 2005). As soluções comerciais de formol ou formalina apresentam diluições a partir de concentrações de formaldeído entre 37% a 40%, que é chamado comercialmente puro. A formalina em solução aquosa a 10% (formaldeído a 4%) é amplamente empregada na fixação e conservação de tecidos (SESSO, 1998; RODRIGUES, 2005).

A busca pela padronização de técnicas seminais tem sido descrita de várias formas objetivando facilitar e minimizar a subjetividade que já é inerente à avaliação seminal tradicional (SANCHO et al., 1998). A utilização de soluções formoladas (que levam formol em sua constituição) como fixadores espermático já são empregados na rotina de muitos laboratórios devido sua eficiência e baixa toxicidade, quando comparados com outros fixadores, por exemplo, o gluteraldeído.

Quando os espermatozóides osmoticamente ativados foram submetidos ao processo de fixação observou-se a redução no coeficiente de variação (CV), tornando as amostras mais homogêneas. Este fato pode estar relacionado com a presença do grupamento químico aldeído (que é o caso da formalina) na formulação da solução fixadora, pois, de acordo com os achados de Sancho et al. (1998), ao analisarem quatro diferentes fixadores para células



espermáticas, observaram que a utilização de fixadores a base de aldeídos tiveram baixos CVs, no entanto, essa redução não foram estatisticamente comprovadas.

Outro fator importante é que a fixação espermática causa a redução do comprimento da cabeça do espermatozóide humano em aproximadamente 15% (KATZ et al., 1986) e 20% eqüino (BALL & MOHAMMED, 1995), isso aparentemente ocorreu no presente trabalho, pois houve a redução do CV quando adicionado o fixador, no entanto esta redução não foi estatisticamente suficiente ($P>0,05$) para ocasionar diferenças significativas entre o tratamento com fixador.

Em carneiros, a fixação do sêmen obteve diferenças significativas ($P<0,05$) na área, perímetro, comprimento, largura, massa e forma dos espermatozóides quando fixados em diferentes soluções (SANCHO et al. 1998).

De acordo com Barth & Oko (1989), a técnica utilizada por Ball & Mohammed (1995), coloração de Feulgen e a metodologia de Katz et al. (1986), coloração modificada de Papanicolaou, exigem a exposição das células espermáticas ao reagente de Schiff, que por sua vez possui o grupamento aldeído em sua formulação.

O formaldeído, devido a presença do grupamento aldeído é bastante estável e possui rápida difusão no interior das células, reagindo com o grupamento amino das proteínas da membrana plasmática (MULHOLLAND & BOTSTEIN, 2002).

De acordo com Mason e O'leary (1991), o grupamento formaldeído liga-se à α e β tubulina, despolimerizando a estrutura tubular e desnaturando as proteínas presentes na membrana plasmática. Esta desnaturação protéica altera a permeabilidade da membrana dificultando a troca de água entre os meios intra e extracelular (ZHU et al. 2002).

No entanto, ao fixar leveduras com 4% de formaldeído isosmótico, Mulholland & Botstein (2002) observaram que a membrana plasmática ainda apresentou-se semipermeável e osmoticamente ativa e quando fixadas em condições hiposmóticas foi observado por microscopia eletrônica de transmissão rupturas nas membranas plasmática e das organelas.

Corroborando com os relatos de Alves et al. (2005) em garanhões, a fixação de células espermáticas com formaldeído, neste trabalho, não influenciou negativamente na avaliação de membrana pelo HOST.



Na tentativa de mensurar o efeito da fixação sobre a técnica foi realizado uma regressão linear ($P < 0,04$) que deu origem a equação $y = 0,777 - 0,210 x$, onde y é a porcentagem de células osmoticamente ativadas pelo HOST após a fixação e x a porcentagem de células osmoticamente ativadas antes da fixação em solução de citrato de sódio formolado a 4%.

A equação de regressão segundo os tratamentos com e sem fixação apresentaram melhor ajuste aos dados, podendo afirmar ser bastante adequada para estimar a reatividade dos espermatozoides osmoticamente ativos à fixação em solução de citrato de sódio formolado a 4%. No entanto, não foi observado em literatura registros que reforçassem tal afirmação.

Alguns estudos posteriores poderão ajustar ou facilitar a utilização da fixação de espermatozoides que foram submetidos ao HOST, em especial a avaliação experimental de fixadores hiposmóticos para que seja diminuída a etapa de manutenção em solução hiposmótica.

De acordo com os resultados apresentados podemos concluir que a fixação em solução de citrato de sódio formolado a 4% é um método eficaz de manutenção de células espermáticas caprinas osmoticamente ativadas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVES, S. G. G.; RIBEIRO FILHO, A. L.; SNOECK, P. P. N.; CHALHOUB, M.; BITTENCOURT, R. F.; PORTELA, A. P. M.; ALMEIDA, A. K.; MELO, M. I. V.; HENRY M. Efeito da solução, da fixação em formol-salina e do tempo de incubação sobre os resultados do teste hiposmótico para sêmen equino congelado. **Ciência Animal Brasileira**, v. 6, n. 3, p. 219-225, 2005.

BALL, B.A.; MOHAMMED, H.O. Morphometry of stallion spermatozoa by computer-assisted image analysis. **Theriogenology**, v. 49, p. 367-377, 1995.

BARTH, A.D.; OKO, R.J. **Abnormal morphology of bovine spermatozoa**, Ames: Iowa State University Press, 1989.



BITTENCOURT, R.F.; RIBEIRO FILHO, A.L.; SANTOS, A.D.F.; CHALHOUB, M.; ALVES, S.G.G.; VASCONCELOS, M.F.; LEANDRO, E.E.S.; GUIMARÃES, J.D. Utilização do teste hiposmótico para avaliar a eficácia de diferentes protocolos de criopreservação do sêmen caprino. **Ciência Animal Brasileira**, v. 6, n. 3, p. 213-218, 2005.

CBRA – Colégio Brasileiro de Reprodução Animal. **Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal**. 2 ed. 1998.

CORREA, J.R.; PACE, M.M.; ZAVOS, P.P. Relationships among frozen-thawed sperm characteristics assessed via the routine semen analysis, sperm functional tests and fertility of bulls in artificial insemination program. **Theriogenology**, v.48, p.721-31, 1997.

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.

FONSECA, J.F.; TORRES, C.A.A.; ROVAY, H.; BORGES, A.M.; BARBOSA, L.P.; MAFFILI, V.V.; FRAGA, D.B.M. Hypoosmotic swelling test in goat spermatozoa. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.25, p.436-457, 2001.

JEYENDRAN, R.S.; VAN DER VEN, H.H.; PEREZ-PELAEZ, M.; CRABO, B.G.; ZANEVELD, L.J. Development of an assay to assess functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to other semen characteristics. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.70, p.219-228, 1984.

KATZ, D.F.; OVERSTREET, J.W.; SAMUELS, S.J. NISWANDER, P.W.; BLOOM, T.D.; LEWIS, E.L. Morphometric analysis of spermatozoa in the assessment of human male fertility. **Journal of Andrology**, v. 7, p. 203-210, 1986.



KUMI-DIAKA, J. Subjecting canine semen to the hypo-osmotic teste. **Theriogenology**, v. 39, p. 1279-1289, 1993.

MASON, J.T.; O'LEARY, T.J. Effects of formaldehyde fixation on protein secondary structure: a calorimetric and infrared spectroscopic investigation. **Journal of Histochemistry e Cytochemistry**, v.39, n.2, p.225-229, 1991.

MELO, M.I.V.; HENRY, M. Teste hiposmótico na avaliação do sêmen eqüino. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.51, n.1, p.71-78, 1999.

Mulholland, J.; Botstein, D. Immunology microscopy of aldehyde-fixed yeast cells, **Methods in Enzymology**, v. 351, p. 50-81, 2002.

OBERST, E.R.; JOBIM, M.I.M.; MATTOS, R.C.; KROTH, E.; LARA, G.; SMIDERIE, W.; BRONZATTO, M. Teste hiposmótico e sua relação com outros métodos da avaliação da integridade da membrana espermática do carneiro. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.27, n.3, p.375-376, 2003.

REVELL, S.G.; MRODE, R.A. An osmotic resistance test for bovine semen. **Animal Reproduction Science**, v.36, p.77-86, 1994.

RODRIGUES, H. **Técnicas anatômicas**. 3. ed. Vitória: Edson Arte, 2005.

SALGUEIRO, C.C.M.; NUNES, J.F.; MATEOS-REX, E.; CORDEIRO, M.A.; MAGALHÃES, D.M.; CAVALCANTE, J.M.M.; PALÁCIO, A.R.S. Avaliação da qualidade do sêmen caprino pós-descongelamento através do teste hiposmótico. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.27, n.3, 2003.

SALVIANO, M.B.; SOUZA, J.A.T. Avaliação andrológica e tecnologia do sêmen caprino. **Revista Brasileira Reprodução Animal**, v.32, n.3, p.159-167, 2008.



SANCHO, M; PÉREZ-SÁCHEZ, F.; TABLADO, L. et al. Computer assisted morphometric analysis of ram sperm heads: Evaluation of different fixative techniques. **Theriogenology**, v. 50, p. 27-37, 1998.

SANTOS, A.D.F.; TORRES, C.A.A.; FONSECA, J.F. Uso do teste hiposmótico (HOST) para avaliar a congelabilidade do sêmen de caprinos das raças Alpina e Saanen, jovens e adultos, submetidos ao manejo com luz artificial. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.25, n.3, 2001.

SESSO, A. Fixação de sistemas biológicos. In: SOUZA, W. (ed.). **Técnicas básicas de microscopia eletrônica aplicadas às ciências biológicas**. Rio de Janeiro: Sociedade Brasileira de Microscopia, 1998. p. 1-17.

ZHU, F.; TAJKHORSHID, E.; SCHULTEN, K. Pressure-induced water transport in membrane channels studied by molecular dynamics. **Biophysical Journal**, v.83, p.154-160, 2002.

