

# UTILIZAÇÃO DO AZUL DE BROMOFENOL CONSERVADO A 4°C E 29°C, COMO MÉTODO DE COLORAÇÃO VITAL PARA AVALIAÇÃO DO ESPERMATOZÓIDE OVINO<sup>1</sup>

**Alexandre Amaral MEDEIROS<sup>2</sup>**

**Airton Alencar de ARAÚJO<sup>3</sup>**

**Arlindo de Alencar Araripe MOURA<sup>4</sup>**

**José Mauricio Maciel CAVALCANTE<sup>5</sup>**

**Emmanuelle Lima de FIGUEIRÊDO<sup>6</sup>**

**Luiz Fernando de Souza RODRIGUES<sup>7</sup>**

**RESUMO:** 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 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: 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 e mortas com os seguintes percentuais: EN4°C=86,60; EN29°C=86,30; ABR4°C=84,27 e ABR29°C=86,70. Ambas as colorações foram também eficientes para avaliação das patologias espermáticas, não apresentando diferença significativa entre elas, independente da temperatura de estocagem. Entretanto, o azul de bromofenol foi mais eficiente à temperatura ambiente. Às lâminas coradas com o azul de bromofenol apresentaram melhor visualização ao microscópio, sem partículas que podem provocar artefatos que dificultam a avaliação da célula espermática, o que possibilita a utilização em condições de campo para exames andrológicos de carneiros.

**TERMOS PARA INDEXAÇÃO:** Espermatozóide, Ovino, Azul de Bromofenol, Coloração Vital, Método de Avaliação

<sup>1</sup> Aprovado para publicação em 14.12.06

<sup>2</sup> Médico Veterinário, Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Estadual do Ceará-FAVET-UECE. Campus do Itaperi. Fortaleza (CE). E-mail: alex\_am@terra.com.br

<sup>3</sup> Médico Veterinário, Dr., Professor da FAVET-UECE. Campus do Itaperi. Fortaleza (CE). E-mail: aaalencar2002@yahoo.com.br

<sup>4</sup> Engenheiro Agrônomo, PhD, Professor Adjunto da Universidade Federal do Ceará. Departamento de Zootecnia. Campus do Pici. Fortaleza (CE).

<sup>5</sup> Médico Veterinário, FAVET-UECE. Campus do Itaperi. Fortaleza (CE). E-mail: jmmcavalcante@bol.com.br

<sup>6</sup> Médica Veterinária, FAVET-UECE. Campus do Itaperi. Fortaleza (CE). E-mail: lukafig@ig.com.br

<sup>7</sup> Médico Veterinário, Dr., Professor Associado da UFRA. Av. Tancredo Neves, nº 2501- Montese - Belém(PA). E-mail:lfer@ufra.edu.br

## USE OF BLUE OF BROMOPHENOL PRESERVED AT 4°C and 29°C AS VITAL STAIN METHOD FOR EVALUATION OF OVINE SPERMATOZOON.

**ABSTRACT:** Smears of semen (N=320) were stained with blue of bromophenol (ABR=160) and eosine-nigrosine (EN=160) for evaluation of the ovine spermatozoon morphology. 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 spermatozoon were identified in both stains: 1. living spermatozoon without any staining; 2. dead acrossome reacted spermatozoon stained completely purple (EN) or completely blue (ABR) and 3. dead spermatozoon with non-reacted acrossome (white acrossome) stained in purple (EN) or blue (ABR). Comparison between the two staining methods showed that both were 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 difference for both temperature of storage. However, the blue of bromophenol was more efficient at ambient temperature because provided a better visualization on the microscope without stained particles. These stained particles can form artifacts which would make difficult the evaluation of the spermatid cell thus making possible its use in the field for soundness examination in sheep.

**INDEX TERMS:** Spermatozoa, Stain, Ram, Bromofenol Blue, Vital Stain.

### 1 INTRODUÇÃO

Os espermatozoides são células haplóides, e, por isso, muito diferenciadas, possuindo propriedades únicas entre as células do organismo. Suas reservas energéticas são limitadas, possuem pouco citoplasma, não realizam síntese protéica, possuem 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 espermatozoides de boa motilidade podem ser não-fecundantes (LIGHTFOOT; RESTAL, 1971; EPPLESTON; MAXWELL, 1993).

Assim, um exame morfológico mais detalhado se faz necessário para a avaliação da viabilidade da célula espermática. Para esses exames, diversos corantes têm sido utilizados, podendo ser divididos em duas classes: os corantes totais, que coram indiscriminadamente todas as células, e corantes vitais, que coram distintivamente espermatozoides vivos e mortos (DERIVAUX, 1980).

Dentre os corantes vitais, a eosina-nigrosina (HANCOCK, 1951; CAMPBELL; DOTT; GLOVER, 1956) e o método Giemsa (WATSON, 1975) são ainda os mais utilizados para a avaliação do espermatozoide ovino. Tamuli e Watson (1994) utilizaram uma coloração simples

mista com Eosina-nigrosina-Giemsa (NEG) para avaliação da morfologia espermática de cachacos 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 a 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) relatou que para o sêmen de cachacos essa coloração é considerada ineficiente para avaliação de mortos e vivos, não apresentando também boa eficiência.

Derivaux (1980) descreveu uma coloração que há muito tempo foi utilizada para sêmen bovino a base de azul de bromofenol. É uma coloração simples, de fácil preparação e baixo custo. Um produto semelhante, o azul de bromoclorofenol se mostrou eficiente para coloração de eritroblastos em vários estágios e maturação (KASS; GARDNER, 1979).

Na literatura não existe relato da utilização do azul de bromofenol como corante de espermatozóide ovino ou de outras espécies.

Este trabalho tem como objetivo testar o azul de bromofenol, comprando-o com o corante clássico, eosina-nigrosina, para avaliação da morfologia espermática do sêmen ovino. Avaliar também a eficiência dos dois corantes em duas temperaturas diferente de conservação, 4 °C e 29 °C (termoestabilidade), para saber qual coloração é mais indicada para avaliação do sêmen de reprodutores em condições de campo.

## 2 MATERIALE 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.

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

Após a colheita em vagina artificial, os ejaculados foram identificados e transportados imediatamente para o laboratório, onde foram mantidos aquecidos em banho-maria a 32°C. As amostras de sêmen foram avaliadas quanto ao volume (mL), turbilhonamento (escore de 0-5) e concentração espermática por espectrofotometria (550 nanômetros),

conforme descrito pelo Colegio Brasileiro de Reprodução Animal-CBRA (1998).

Foram realizadas 10 colheitas de sêmen de cada reprodutor perfazendo um total de 40 colheitas. Do ejaculado de cada reprodutor foram confeccionados quatro esfregaços por corante, segundo metodologia de Colas (1980), sendo dois para cada temperatura de armazenamento (4oC e 29oC), 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 suas regiões, acrossoma, cabeça e cauda, bem como as patologias espermáticas totais.

O corante eosina nigrosina foi preparado utilizando-se 3g de nigrosina, 2g de eosina e 3g citrato de sódio, diluídos em 100mL de água destilada (COLAS, 1980). O azul de bromofenol foi preparado segundo a formulação descrita por Derivaux (1980) utilizando-se 1g de azul de bromofenol, 4g de citrato de sódio, diluídos em 100mL de água destilada. Após preparo de ambos os corantes, o pH e a osmolaridade foram ajustadas para as condições fisiológicas dos espermatozóides (pH 6,8; 300mOms; 32°C) e estocados por um mês nas temperaturas de 4oC e 29o C.

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. Foram contados duzentos

espermatozóides em vários campos aleatórios, em aumento de 400 vezes.

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 Tukey por meio de comparações múltiplas (matriz de probabilidade de comparação dois a dois) ao nível de significância de 5%.

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os valores médios dos parâmetros seminais foram de: volume de 1,2 mL; turbilhonamento, 3,0; concentração,  $3,8 \times 10^8$  céls/mL; 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).

Independente da temperatura de conservação do corante, os percentuais de mortos e vivos encontrados foram idênticos para ambas as colorações (Tabela 1) e são semelhantes aos relatados por Tamuli e Watson (1994), que encontraram, em média, 85% de espermatozóides vivos com a coloração Giemsa-eosina-nigrosina.

A análise da porcentagem de espermatozóides vivos e mortos é um importante parâmetro para predizer o

potencial fecundante de um reprodutor. No carneiro existe uma boa correlação entre a porcentagem de espermatozóides vivos e fertilidade (CHEMINEAU et al., 1991; GARNER et al., 1986).

Com a coloração Eosina Nigrosina (EN) conservada a 4°C e 29°C, os espermatozóides mortos apresentaram uma coloração púrpura (Figuras 1-A e 3-B), enquanto os vivos não apresentam coloração (Figuras 1-B e 3-A). Porém, alguns espermatozóides apresentaram na cabeça somente a região pós acrossomal não corada, com cauda corada, e alguns se encontram fracamente corados (Figura 1-C).

Com Azul de Bromofenol (ABR) conservado a 4°C e 29°C, observou-se, também boa definição dos vivos e mortos: os espermatozóides mortos foram corados em azul (Figuras 2-B e 4-B), enquanto os vivos não apresentavam coloração (Figura 1-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 (Figura 2-C).

Contudo, nos espermatozóides vivos (não-corados) não foi possível avaliar a integridade do acrossoma, tanto com o ABR quanto com o EN. Esta avaliação é importante, pois é altamente correlacionada com a fertilidade do sêmen (GARNER et al., 1986).

Watson (1975) utilizando o Giemsa e Tamuli e Watson (1994) combinando o

Giemsa à EN mostraram que estas colorações foram capazes de avaliar com eficiência o status do acrossoma (acrossoma reagido e não- reagido) identificando um tipo a mais do que observado neste experimento, isto é, espermatozóide vivo com acrossoma intacto. Isto significa que o ABR e a EN não são capazes de distinguir com precisão a integridade do acrossoma.

Foi observado, ainda, que alguns espermatozóides apresentaram 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 espermatozóide moribundo que não retém com eficiência o corante no seu citoplasma. Espermatozóides 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 conforme mencionado por Garner et al. (1986).

Quando se compararam os corantes em temperaturas diferentes de estocagem (4°C e 29°C) observou-se que um fenômeno ocorre com a coloração EN à 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 espermatozóide, dificultando sua visualização (Figura 3).

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 a uma conservação a temperatura elevada (29°C).

temperatura de estocagem do corante. Hafez, Badreldin e Darwish (1955); Smith e Gordon

Chemineau et al. (1991) ressaltaram que o pH da solução de eosina-nigrosina deve ser avaliado mensalmente e que a solução deve ser conservada a 4°C para a boa manutenção 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 espermatozóide (Figura 4). Esta qualidade do ABR mostra que este pode ser utilizado tanto em laboratório quanto em campo para realização de exames andrológicos de reprodutores.

As patologias espermáticas foram igualmente identificadas em ambos corantes, estando seus valores em consonância aos estabelecidos pelo CBRA (1998), segundo o qual o percentual de patologias espermáticas total para o macho ovino não deve ultrapassar 15%. Os defeitos mais comumente encontrados em ambas as colorações foram de flagelo ou cauda, independente da

Tabela 1 - Valores médios e erro padrão (e.p) referentes a percentagem de espermatozóides vivos encontrada em esfregaços de sêmen ovino, corados com EN e ABR nas temperaturas de 4°C e 29°C

| 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    |

Tabela 2 - Valores médios de patologias espermáticas encontradas em esfregaços de sêmen ovino, corados com EN e ABR conservados nas temperaturas de 4°C e 29°C.

| Corante  | Cabeça (%) | PI (%) | Cauda (%) | GCP (%) | GCD (%) | 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       |

Nota: PI – Peça intermediária; GCP – Gota citoplasmática proximal; GCD – Gota citoplasmática distal.

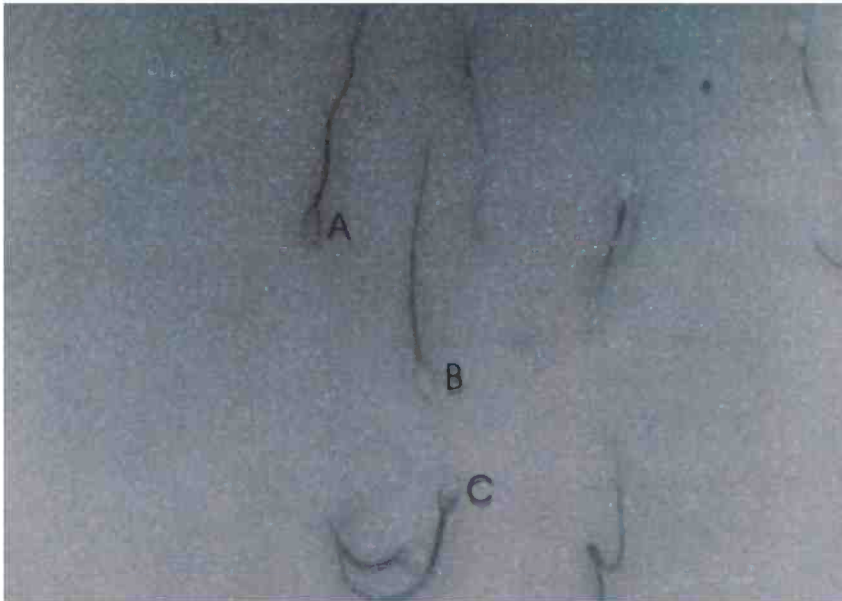


Figura 1 - Espermatozoides corados com Eosina Nigrosina, conservado a 4°C. A Espermatozóide morto; B Espermatozóide vivo; C Espermatozóide morto com acrossoma intacto. Aumento de 400x

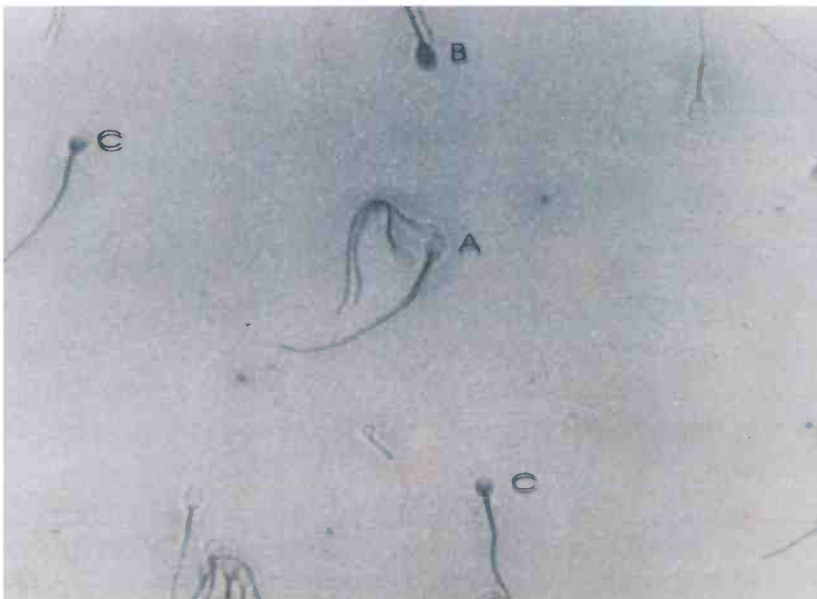


Figura 2 - Espermatozoides corados com Azul de Bromofenol, conservado a 4°C. A Espermatozóide vivo; B Espermatozóide morto; C Espermatozóide morto com acrossoma intacto. Aumento de 400x





Figura 3 - Espermatozoides corados com Eosina Nigrosina, conservado a 29°C. A Espermatozóide vivo; B Espermatozóide morto; C Espermatozóide morto com acrossoma intacto. Aumento de 400x

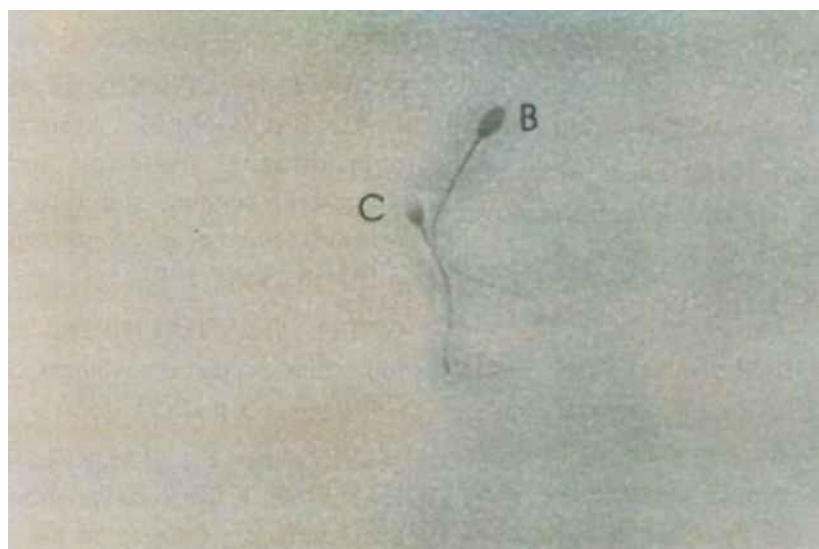


Figura 4 - Espermatozoides corados com ABR, conservado a 29°C. B Espermatozóide morto; C Espermatozóide morto com acrossoma intacto. Aumento de 400x

#### 4 CONCLUSÃO

Ambos corantes quando estocados a 4°C são igualmente eficientes para avaliação da morfologia espermática do sêmen ovino, com exceção da integridade do acrossoma, porém à temperatura de estocagem de 29°C, o azul de bromofenol possibilita melhor visualização da célula espermática ao microscópio, quando da análise das patologias espermáticas, uma vez que o esfregaço apresenta uma melhor qualidade.

Por ser uma coloração de baixo custo e de fácil preparação e simples estocagem, o ABR possibilita a 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.

#### REFERÊNCIAS

CAMPBELL, R.C.; DOTT, H.M.; GLOVER, T.D. Nigrosin eosin as a stain for differentiating live and dead spermatozoa. *Journal of Agricultural Science*, v. 48, p. 1-8, 1956.

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. *Molecular Reproduction and Development*, 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*. Rome: FAO, 1991. 222p.

COLAS, G. Variations saisonnières de la qualité du sperme chez le belier Ile-de-France.I. Étude de la morphologie cellulaire et de la motilité massale. *Reproduction Nutrition and Développement*, v. 20, p.1789-1799, 1980.

COLÉGIO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL. *Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal*. 2. ed. Belo Horizonte, 1998. 49 p.

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

EPPELSTON, J.; MAXWELL, W.M.C. Recent attempts to improve the fertility of frozen semen inseminated into the cervix. *Wool Tech Sheep Breed*, v.41, p. 291-302, 1993.

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

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

HAFEZ, E.S.E.; BADRELDIN, A.L.; DARWISH, Y. Seasonal variations in semen characteristics of sheep in the subtropics. *Journal of Agricultural Science*, v.45, p.283-292, 1955.

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

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

KASS, L.; GARDNER, F.H. Bromochlorophenol blue. A new stain for erythroblasts. *Archives of Pathology and Laboratory Medicine*, v.103, n.11, p.565-566, 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. *Journal of Reproduction and Fertility*, v.26, p.1-3, 1971.

SMITH, P.; GORDON, I. Seasonal and breed variations in the semen characteristics of ram. *Irish Veterinary Journal*, v. 21, p. 222-223, 1967.

TAMULI, M.K.; WATSON, P.F. Use of a simple staining technique to distinguish acrossomal changes in the live sperm sub-population. *Animal Reproduction Science*, v.35, p. 247-254, 1994.

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