



Evento	Salão UFRGS 2019: FEIRA DE INOVAÇÃO TECNOLÓGICA DA UFRGS - FINOVA
Ano	2019
Local	Campus do Vale - UFRGS
Título	Importância do solvente na diluição de corantes para determinação de viabilidade espermática de zebrafish (Danio rerio)
Autor	JHONY LISBÔA BENATO
Orientador	LEANDRO CESAR DE GODOY

RESUMO

TÍTULO DO PROJETO: Importância do solvente na diluição de corantes para determinação de viabilidade espermática de zebrafish (*Danio rerio*)

Aluno: Jhony Lisbôa Benato

Orientador: Leandro Cesar de Godoy

RESUMO DAS ATIVIDADES DESENVOLVIDAS PELO BOLSISTA

O zebrafish (*Danio rerio*) é uma espécie de peixe teleósteo nativo da Ásia, que ganhou grande importância nos últimos anos como modelo experimental para outras espécies animais e humanos. Essa espécie compartilha aproximadamente 71% de seu genoma com a espécie humana e, portanto, estudos realizados com o zebrafish podem ser translacionados para humanos. Muitas biotecnologias da reprodução podem ser aplicadas nessa espécie e é comum ser realizada a reprodução desses animais em laboratório. Para o sucesso na reprodução desses animais é essencial que seus gametas possuam uma boa qualidade e para isso foram desenvolvidos inúmeros protocolos para avaliação da qualidade de gametas. Para avaliação de espermatozoides de zebrafish, uma importante técnica utiliza os corantes eosina/nigrosina para avaliar a integridade de membrana das células espermáticas.

De anos em anos a Organização Mundial da Saúde (OMS) lança recomendações para avaliação de qualidade espermática com o uso dos corantes eosina/nigrosina, mas em 3 dos 4 manuais publicados (até 2003) foram realizadas alterações na solução base de diluição dos corantes sem nenhum apoio experimental. O solvente para a diluição dos corantes tem grande importância no processo de avaliação de viabilidade espermática, pois a solução de diluição pode causar vários danos às células espermáticas, inclusive matá-las, principalmente por causa da diferença de osmolaridade em relação ao meio em que os espermatozoides naturalmente são liberados.

Com base nisso, a ideia do estudo foi analisar a diferença nos resultados de integridade de membrana nos espermatozoides de zebrafish com o uso de diferentes soluções para diluição dos corantes. Primeiramente os animais foram eutanasiados com dose letal (0,6mg/mL) de triclaína metano sulfato (MS-222) e as gônadas foram coletadas, sendo o sêmen diluído para a preparação de um *pool* com as amostras de três animais. Desse *pool*, foram separadas quatro alíquotas iguais para aplicação dos corantes em cada uma das soluções de diluição.

Foram definidas quatro soluções base para diluição dos corantes, sendo elas água destilada, solução PBS, solução de Ginsburg (diluidor de sêmen) e solução de NaCl 0,9% e foi utilizada a técnica de um passo para aplicação dos corantes. Além disso, foi medida a osmolaridade de cada uma das soluções para analisar se a diferença nos resultados estava relacionada às diferentes osmolaridades encontradas. Após a diluição e preparação das alíquotas, os corantes foram aplicados e após 30 segundos foram confeccionadas seis lâminas com cada uma das soluções de diluição, as quais foram secas ao ar para posterior contagem das células com membrana íntegra e membrana danificada.

Foram contados 200 espermatozoides de cada repetição com o auxílio de um microscópio com aumento total de 40 vezes. Os dados foram submetidos a teste de normalidade e de homogeneidade de Kolmogorov-Smirnov e Levene, respectivamente. Como os dados apresentaram-se não paramétricos, foram submetidos a análise de Kruskal-Wallis com 5% de significância, seguido de teste de Dunn.

As soluções de NaCl 0,9% e com água destilada apresentaram maior integridade de membrana dos espermatozoides que a solução PBS, mas não diferiram estatisticamente da solução de Ginsburg, sendo que essa não diferiu estatisticamente das demais.

Para a avaliação de integridade de membrana espermática para sêmen fresco de zebrafish as soluções que apresentaram os melhores resultados foram solução salina (NaCl 0,9 %), água destilada e solução de Ginsburg. Porém, mais estudos serão realizados para verificar se os resultados se repetem quando utilizado sêmen criopreservado, já que as células que passam por esse processo ficam mais fragilizadas e podem ser mais sensíveis às diferenças de osmolaridade das soluções para diluição dos corantes utilizados para avaliar a integridade de membrana.