

INFLUÊNCIA DE UM ÁCIDO GRAXO ADICIONADO AO DILUENTE SEMINAL SOBRE A INTEGRIDADE DA MEMBRANA PLASMÁTICA DE ESPERMATOZOIDES CAPRINOS CRIOPRESERVADOS

(Influence of a fatty acid added to the seminal extender on the integrity of the plasmatic membrane of cryopreserved caprine sperm)

Filipe Nunes BARROS^{1*}; Marlon de Araújo CASTELO BRANCO²; Misael das Virgens SANTANA¹; Wallisson Bruno de Moraes PACHECO¹; Jefferson Hallisson Lustosa da SILVA¹; Isôlda Márcia Rocha do NASCIMENTO³; José Adalmir Torres de SOUZA¹

¹Universidade Federal do Piauí (UFPI), Campus Universitário Ministro Petrônio Portella, Bairro Ininga, Teresina/PI. CEP: 64.049-550; ²Profissional Autônomo; ³Colégio Técnico de Teresina (CTT). *E-mail: filipenbarros@hotmail.com

ABSTRACT

The objective of this study was to evaluate the antioxidant effects of supplementing different concentrations (0.5µM, 5µM and 50µM) of polyunsaturated fatty acid, arachidonic acid to the TRIS-yolk diluter on the integrity of the plasma membrane during the cryopreservation of goat sperm. For this purpose, four Anglo-nubian goats were used, in which five samples / animal were collected, using artificial vagina. After evaluating the swirling and motility of the ejaculates, the pool was made, then diluted in TRIS-Gem and divided according to the treatments. After processing, the samples were packaged in 0.25mL straws and cryopreserved using the TK 3000[®] machine. Defrosting occurred after at least 5 days of storage in a cryogenic cylinder. Then, the integrity of the plasma membrane of goat sperm post cryopreservation was carried out, using the double staining method, where carboxyfluorescein diacetate (DCF) and propidium iodide (IP) were used. The data were analyzed and the results of the researched variable were subjected to analysis of variance (ANOVA) using the general linear models procedure (Proc GLM) and the Duncan test was used to compare the means, with a 5% probability. The analyzes were performed using the Statistical Analysis System program (SAS Institute Inc, 2013). After analysis, it was observed that the control group had the best percentage, and differed significantly ($p < 0.05$) from the treatment with 50µM of arachidonic acid. It was concluded that the 50µM arachidonic acid concentration is not effective to maintain the integrity of the plasma membrane, and to minimize the oxidative stress of cryopreservation.

Key words: Antioxidants, plasmatic membrane, cryopreservation.

INTRODUÇÃO

A caprinocultura é uma atividade em plena expansão na região Nordeste, apresentando um crescimento de 18,38% entre os anos de 2006 e 2017, passando de cerca de 6,4 milhões de cabeças para 7,6 milhões, de acordo com o mais recente censo agropecuário do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) (EMBRAPA, 2018). Essa busca pela maximização da produção e difusão do material genético de excelente qualidade, fez com que a criopreservação seminal se destacasse.

Entretanto, a criopreservação é uma técnica bastante prejudicial para a célula, por induzir a elevada produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), resultando em danos morfológicos e funcionais das membranas espermáticas, prejudicando a motilidade, a integridade da membrana e o potencial de fertilização dos espermatozoides (HU *et al.*, 2010). Com isso, surgiu a necessidade de adicionar substâncias antioxidantes no meio diluidor de sêmen, no intuito de minimizar a instabilidade entre antioxidantes e oxidantes

(NASCIMENTO *et al.*, 2016), e reduzir os efeitos nocivos da peroxidação lipídica das membranas durante a criopreservação.

Nesse sentido, inúmeras pesquisas têm avaliado o potencial antioxidante de novas substâncias visando a adição ao diluidor convencional para criopreservação seminal. Uma delas, o ácido araquidônico, um ácido graxo poli-insaturado (PUFA), presente nos fosfolípidios das membranas, foi capaz de melhorar a fluidez da membrana e reduzir a ação dos radicais livres sobre as células em bovinos (NASIRI *et al.*, 2012; TOWHIDI e PARKS, 2012).

Tendo em vista as pouquíssimas informações sobre atuação desse PUFA como um antioxidante, na espécie caprina, pressupõe-se que o ácido araquidônico pode contribuir para a melhoria da viabilidade dos espermatozoides após o processo de criopreservação. Assim, objetivou-se avaliar os efeitos da suplementação de diferentes concentrações do ácido araquidônico (0,5µM, 5µM e 50µM) ao diluidor TRIS-gema sobre a integridade da membrana plasmática durante a criopreservação de espermatozoides caprinos.

MATERIAL E MÉTODOS

Animais, coleta e avaliação inicial

O procedimento, de coleta seminal, foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal do Piauí (UFPI), registrado com o número 643/2020. No experimento foram utilizados quatro caprinos da raça Anglo-nubiana, provenientes de uma propriedade localizada no município de Brasileira – Piauí. Os animais possuíam um histórico de fertilidade satisfatório, sendo feita também uma prévia avaliação quanto à saúde geral, à integridade dos órgãos reprodutivos e quanto à qualidade espermática, sendo mantidos em regime semiextensivo. Então, foi realizada uma coleta por semana, durante cinco semanas, totalizando 5 ejaculados/animal, pelo método da vagina artificial. Os ejaculados foram avaliados individualmente, quanto a cor, aspecto, volume (mL) e aos demais parâmetros conforme recomendações do Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA, 2013). Após essa etapa, as amostras viáveis dos quatro ejaculados foram misturadas para formação de um “*pool*” (com objetivo de eliminar a variabilidade individual entre as amostras) por coleta.

Diluição e criopreservação seminal

Posteriormente, foi adicionado o meio diluente TRIS Gema para finalmente suplementar as amostras com diferentes concentrações de ácido araquidônico (ácido araquidônico $\geq 98,5\%$ (GC), Sigma-Aldrich®). As amostras foram divididas nos seguintes tratamentos: Controle (Tris-Gema sem adição de ácido araquidônico); Tris-Gema + 0,5µM; Tris-Gema + 5µM e Tris-Gema + 50µM de ácido araquidônico. Após diluição e fracionamento, as amostras de sêmen foram envasadas em palhetas de 0,25mL, para uma concentração final de 20×10^6 espermatozoides viáveis/palheta, e então foram congeladas em máquina TK 3000®, utilizando a curva rápida de congelamento, e armazenadas em botijão criogênico. Após, no mínimo, 5 dias de armazenamento, as amostras foram descongeladas para avaliação da integridade da membrana plasmática, conforme descrito a diante.

Avaliação da integridade da membrana plasmática

Para avaliação da integridade da membrana plasmática, foi utilizado o método de coloração dupla com diacetato de carboxifluoresceína (DCF; Sigma-Aldrich[®], St. Louis, MO, USA) e iodeto de propídio (IP; Sigma-Aldrich[®], St. Louis, MO, USA), modificado por Coletto *et al.* (2002), em que alíquotas de 50µL de sêmen pós descongelados foram diluídas em 150µL de Tris, 5µL de DCF e 20µL de IP e incubadas por 10 min a 37°C. Avaliou-se 200 espermatozoides em microscópio de epifluorescência (400x), usando-se filtro de emissão DBP 580 - 630nm e excitação DBP 485/20nm. Os espermatozoides foram classificados em: membrana intacta, quando se apresentaram corados em verde, e membrana danificada, quando corados em vermelho.

Análise Estatística

Para análise estatística dos dados, foram obtidas as médias e desvios-padrão da variável pesquisada e foram submetidos a análise de variância (ANOVA), utilizando-se o procedimento modelos lineares gerais (Proc GLM). Para comparação das médias foi utilizado o teste de Duncan, na probabilidade de 5%. As análises foram executadas através do programa *Statistical Analysis System* (SAS Institute Inc, 2013).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Após as análises da integridade da membrana plasmática (Tab. 01) dos espermatozoides caprinos pós-criopreservação, observou-se que o grupo controle apresentou resultado superior e diferente significativamente ($p < 0,05$) do tratamento suplementado com 50µM de ácido araquidônico ao diluente.

Tabela 01: Integridade da MP dos espermatozoides caprinos pós-descongelados após suplementação com diferentes concentrações de ácido araquidônico no diluente.

Tratamentos	MP (%)
Controle	45,2±11,16 ^a
0,5 µM de ácido araquidônico	42,6±15,86 ^a
5 µM de ácido araquidônico	42,8±11,00 ^a
50 µM de ácido araquidônico	19,2±2,48 ^b

Os valores são expressos como média ± desvio padrão. Valores de média com letras sobrescrito diferentes na mesma coluna indicam diferenças significativas ($p < 0,05$) pelo teste de DUNCAN.

O presente estudo expande o conhecimento sobre os efeitos da adição de concentrações diferentes de ácido araquidônico ao meio diluente de criopreservação do sêmen caprino. Sabe-se, que integridade das membranas espermáticas e a manutenção da sua semipermeabilidade são de grande importância para a viabilidade espermática (PEÑA *et al.*,

2005), essenciais à fertilização, além da membrana plasmática ser responsável pela manutenção da homeostase celular (CAMPANHOLI *et al.*, 2017).

O presente trabalho observou que a suplementação de 50µM de ácido araquidônico ao diluidor não foi eficaz na manutenção da integridade da membrana plasmática, diferindo significativamente ($p < 0,05$) dos demais tratamentos. Observou-se que as concentrações de 0,5µM e 5µM de ácido araquidônico apresentaram praticamente a mesma taxa de integridade da membrana plasmática. Então, supõe-se que a concentração de 50µM de ácido adicionada ao meio diluidor tornou a célula um alvo preferencial da lipoperoxidação (LONE *et al.*, 2018), tendo em vista que as insaturações são mais facilmente clivadas pelas ROS (NICHII *et al.*, 2007), tornando-se mais susceptível ao estresse oxidativo, e consequentemente, causando a perda da integridade estrutural e funcional das membranas espermáticas.

CONCLUSÕES

Conclui-se, que a suplementação do diluente com 0,5µM e 5µM de ácido araquidônico, durante o processo de criopreservação, não prejudicou a integridade da membrana plasmática dos espermatozoides caprinos pós criopreservação. Contudo, faz-se necessários mais estudos, no que se refere à dose desse PUFA a ser utilizada, devido à escassez de pesquisas do mesmo relacionado ao estresse oxidativo.

REFERÊNCIAS

- CAMPANHOLI, S.P.; MONTEIRO, F.M.; DIAS, E.A.R.; MERCADANTE, M.E.Z.; PAZ, C.C.P.; DELL'AQUA JUNIOR, J.A.; PAPA, F.O.; DELL'AQUA, C.P.F.; VANTINI, R.; GARCIA, J.M. Effect of seminal plasma removal before cryopreservation of bovine semen obtained by electroejaculation on semen quality and in vitro fertility. *Theriogenology*, v.89, p.114-121, 2017.
- CBRA. Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal. 2ª ed., Colégio Brasileiro de Reprodução Animal, Belo Horizonte, Minas Gerais, 2013. 114p.
- COLETO, Z.F.; GUERRA, M.M.P.; BATISTA, A.M. Avaliação do sêmen congelado de caprinos com drogas fluorescentes. *Revista Brasileira de Medicina Veterinária*, v.24, p.101-104, 2002.
- Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, EMBRAPA. 2018. Acesso em 07 de dezembro de 2020. Disponível em: <https://www.embrapa.br/cim-inteligencia-e-mercado-de-caprinos-e-ovinos/busca-de-noticias/-/noticia/36365362/novo-censo-agropecuario-mostra-crescimento-de-efetivo-de-caprinos-e-ovinos-no-nordeste>.
- HU, J.H.; ZAN, L.S.; ZHAO, X.L.; LI, Q.W.; JIANG, Z.L.; LI, Y.K.; LI, X. Efeitos da suplementação de trealose sobre a qualidade do sêmen e variáveis de estresse oxidativo em sêmen bovino congelado-descongelado. *Journal of Animal Science*, v.88, p.1657–1662, 2010.
- LONE, S.A.; PRASAD, J.K.; GHOSH, S.K.; DAS, G.K.; BALAMURUGAN, B.; VERMA, M.R. Study on correlation of sperm quality parameters with antioxidant and oxidant status of

buffalo bull semen during various stages of cryopreservation. *Andrologia*, v.50, n.4, p.1–8, 2018.

NASCIMENTO, A.L.C.; SANTOS, A.D.F.; AZEVEDO, H.C.; DUARTE, C.L.; DE OLIVEIRA, V.S. Atividade antioxidante do extrato aquoso de noni em diluente para congelação de sêmen ovino. *Boletim de Indústria Animal*, v.73, n.1, p.68-74, 2016.

NASIRI, A.H.; TOWHIDI, A.; ZEINOALDINI, S. Combined effect of DHA and α -tocopherol supplementation during bull semen cryopreservation on sperm characteristics and fatty acid composition. *Andrologia*, v.44, Supl.1, p.550-555, 2012.

NICHI, M.; GOOVAERTS, I.G.; CORTADA, C.N.; BARNABE, V.H.; DE CLERCQ, J.B.; BOLS, P.E. Roles of lipid peroxidation and cytoplasmic droplets on in vitro fertilization capacity of sperm collected from bovine epididymides stored at 4 and 34 degrees C. *Theriogenology*, v.67, p.334-40, 2007.

OLIVEIRA, M.W.S. Potencial antioxidante e scavenger da taurina em concentrações fisiológicas contra espécies reativas de oxigênio e nitrogênio. 2008. 92p. (Dissertação de Mestrado). Curso de Ciências Biológicas, Bioquímica, UFRS, Porto Alegre, 2008.

PEÑA, F.J.; SARAVIA, F.; JOHANNISSON, A.; WALLGREN, M.; MARTÍNEZ RODRÍGUEZ, H. Um método novo e simples para avaliar as alterações da membrana início em congelados e descongelados espermatozoides javali. *International Journal of Andrology*, v.28, p.107-114, 2005.

TOWHIDI, A.; PARKS, J.E. Effect of n-3 fatty acids and α -tocopherol on post-thaw parameters and fatty acid composition of bovine sperm. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, v.29, p.1051-1056, 2012.