

DILUENTE QUIMICAMENTE DEFINIDO E ANTIOXIDANTES POLIFENOIS NA CRIOPRESERVAÇÃO DE SÊMEN OVINO

*(Chemically defined diluter and polyphenolic antioxidants
in the cryopreservation of sheep semen)*

Lucas Facundo Moura TOBAL*, Lúcia Cristina Pereira ARRUDA, Aline Saraiva de
OLIVEIRA; Gustavo Ferrer CARNEIRO; Maria Madalena Pessoa GUERRA

Laboratório de Andrologia da Universidade Federal de Pernambuco. Rua Dom Manuel
de Medeiros, s/n, CEP: 52.171-900, Recife/PE. *E-mail: facundotbl@gmail.com

ABSTRACT

The objective of this study was to elaborate chemically defined extender based on casein, added with polyphenolic antioxidants, for the freezing of semen from ram breeders. To evaluate Tris-casein (5% glycerol), plus polyphenols, four semen pools from three rams sires were frozen (0 μ M; 10 μ M resveratrol; 5 μ M quercetin; 25 μ M catechin; 25 μ M catechin + 10 μ M resveratrol; 25 μ M catechin + 5 μ M quercetin; 10 μ M resveratrol + 5 μ M quercetin; 25 μ M catechin + 10 μ M resveratrol + 5 μ M quercetin). After thawing, the samples were evaluated for sperm kinetics, plasma and acrosomal membrane integrity and mitochondrial membrane potential. There was no significant difference ($p \geq 0.05$) between the control group and the treatments for any of the evaluated parameters. However, it can be seen that the Tris-casein extender was efficient in cryopreserving ram semen. It is concluded that the Tris-casein extender can be used for freezing ram semen.

Key words: casein, resveratrol, quercetin, catechin

INTRODUÇÃO

A criopreservação de sêmen é uma biotecnologia que apresenta grande potencial para produção de animais geneticamente superiores (WATSON, 2000), fornecendo subsídios para o crescimento efetivo da ovinocultura na região Nordeste brasileira (CARNEIRO, 2008). Apesar de ser uma importante ferramenta, são necessárias melhorias nos protocolos de criopreservação e na produção de diluentes mais eficientes, que permita maior proteção às células espermáticas durante o processamento (STORNELLI *et al.*, 2005). É importante ressaltar a necessidade de diluentes livres de produtos de origem animal, uma vez que estes diferem em composição e entre partidas, assim como apresentam riscos biológicos de contaminação bacteriana e disseminação de patógenos (HAFEZ e HAFEZ, 2004).

Além disso, danos provocados pelo estresse oxidativo durante a congelamento do sêmen precisam ser minimizados (GUERRA, 2004). Para tanto, lança-se mão das terapias antioxidantes, onde diversos constituintes estão disponíveis, como os flavonóides (quercetina e catequina) e o não-flavonóide (resveratrol) (SILVA, 2012). Estes compostos polifenólicos são utilizados visando a manutenção da qualidade e da capacidade fertilizante dos espermatozoides, após a descongelamento. Diante do exposto, o presente estudo teve por objetivo produzir um diluente para congelamento de sêmen ovino, à base de caseína e acrescido de substâncias antioxidantes.

MATERIAL E MÉTODOS

Local do experimento, coleta, avaliação e congelamento do sêmen

Todos os procedimentos experimentais foram aprovados pelo Comitê de ética no uso de animais (CEUA) da Universidade Federal Rural de Pernambuco (n° 051/2019 CEUA / UFRPE). Foram utilizados 3 ovinos da raça Dorper, sendo coletados 4 ejaculados por reprodutor. Após coleta, os ejaculados foram avaliados macro e microscópicamente. Em seguida, os ejaculados que apresentaram motilidade $\geq 70\%$ foram aprovados, formados *pools* (n=4), e determinada a concentração espermática, em câmara de Neubauer.

Para congelamento, o *pool* de sêmen foi diluído em Tris-caseína (375mM de Tris, 124mM de ácido cítrico, 41,6mM de frutose, 0,25% de caseína, 5% de glicerol, 100 UI de penicilina e 50mg de estreptomicina, com pH 6,8), acrescido de antioxidantes: 0 μ M; 10 μ M resveratrol; 5 μ M quercetina; 25 μ M catequina; 25 μ M catequina + 10 μ M resveratrol; 25 μ M catequina + 5 μ M quercetina; 10 μ M resveratrol + 5 μ M quercetina; 25 μ M catequina + 10 μ M resveratrol + 5 μ M quercetina, na concentração final de 200×10^6 spz/mL. As amostras foram congeladas em sistema automatizado (TK 3000[®] - TK Tecnologia em Congelamento Ltda., Brasil) e estocadas em nitrogênio líquido (- 196 °C).

Cinética espermática, integridade e potencial de membrana

Amostras de sêmen foram descongeladas (37 °C/30s.) e incubadas em banho-maria (37 °C/10min). A seguir, a amostra foi avaliada em microscópio de contraste de fase (Eclipse 50i; Nikon, Japão; 100x), onde os parâmetros cinéticos foram avaliados utilizando o software SCA[™], versão 5.1 (Microoptics, S.L., Barcelona, Espanha).

As análises de citometria de fluxo foram realizadas de acordo com metodologia descrita por Arruda *et al.* (2018), com modificações. Para avaliação da integridade de membrana plasmática e acrossomal (iMPA), adicionaram-se à amostra FITC-PNA e Iodeto de Propídio. Para análise do PMM, utilizou-se o fluorocromo catiônico lipofílico JC-1. As avaliações foram realizadas utilizando-se aparelho ImageStream[®]X, versão Mark II (Amnis, Seattle, WA, EUA). As aquisições dos dados foram realizadas usando-se o software INSPIRE[®], versão 200.1.388.0 (Amnis, Seattle, WA, EUA).

Análise Estatística

As análises estatísticas foram realizadas no GraphPad InStat (versão 3.10, 2009). Os dados foram testados quanto à normalidade e homogeneidade de variância, pelo método Kolmogorov-Smirnov. Posteriormente, os dados de cada grupo experimental foram submetidos à análise de variância (ANOVA), para determinar os efeitos dos tratamentos, considerando a significância de 5% ($p < 0,05$). Os resultados foram expressos em média \pm desvio padrão.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nas análises de cinética, integridade de membranas plasmática e acrossomal, e potencial de membrana mitocondrial dos espermatozoides, não houve diferença significativa (Tab. 01; $p < 0,05$) entre o grupo controle e os tratados com antioxidantes polifenóis.

Tabela 01: Parâmetros cinéticos (CASA) e avaliação por citometria de fluxo da integridade de membrana plasmática e acrossomal e potencial de membrana mitocondrial de espermatozoides ovinos, após congelamento.

	CON	R	Q	C	C+R	C+Q	R+Q	C+R+Q
MT	31.7±3.9	27.1±6.0	34.4±10.8	25.8±10.5	24.2± 7.7	22.6±8.6	31.1±5.8	30.2±4.8
MP	12.0± 1.3	11.0±3.6	14.8± 1.1	12.7±5.5	9.8± 4.4	9.5± 5.0	16.0±7.0	13.8± 5.2
RAP	17.3±3.5	15.1±5.9	18.5± 4.3	15.1± 5.3	11.2±5.5	12.5± 7.5	17.9 ± 6.0	15.9± 3.8
LIN	53.4±4.6	55.8±5.4	57.3± 5.8	58.5±4.2	56.7± 5.4	55.6 ± 6.2	58.2±7.0	52.6±7.6
STR	71.8±6.9	73.9±2.6	74.8±3.9	76.1± 3.3	75.0± 4.6	71.7±1.9	76.7±5.6	70.1± 6.8
WOB	74.5±1.5	75.5± 5.3	76.4± 4.5	76.8±3.1	75.5±4.8	77.4± 7.0	75.8± 6.5	74.7±4.3
VCL	110.0±7.9	108.6±15.1	107.7±8.7	111.4 ±5.6	96.6±6.9	103.9±14.9	109.1 ±11.3	108.6 ±1.9
VSL	58.5±1.0	61.2±14.2	61.6±5.4	65.2± 6.1	55.0± 8.6	58.2±13.6	63.7±11.8	57.1± 8.0
VAP	81.9±6.6	82.6±17.0	82.1± 4.0	82.2±3.5	73.1± 9.8	81.1±18.0	82.8±12.3	81.1± 4.6
ALH	3.4± 0.1	3.2±0.2	3.1± 0.1	3.0 ± 0.1	3.1± 0.3	3.1 ± 0.6	3.1±0.5	3.0±0.3
BCF	10.9±1.0	11.2±0.5	11.0±0.8	11.± 0.8	11.3± 1.3	10.2± 0.8	10.8± 1.3	10.6± 1.3
PMM	21.5±3.6	15.0± 4.9	7.7±4.5	26.9±20.9	8.7±4.9	8.2±5.7	23.1±12.4	10.8± 5.5
PNA-/IP-	17.1±5.0	17.7± 4.0	15.8± 4.2	17.6± 4.4	19.3±1.8	12.3± 2.2	19.0± 2.5	17.2± 6.5

MT: Motil total (%); MP; Motil progressiva (%); RAP: Rápidos (%); LIN: Linearidade (%); STR: Retilinearidade (%); WOB: Índice oscilação; VCL: Veloc. Curvilínea ($\mu\text{m/s}$); VSL: Veloc. linha reta ($\mu\text{m/s}$); VAP: Veloc. média trajetória ($\mu\text{m/s}$); ALH: Deslocamento lateral cabeça (μm); BCF: Frequência batimento cruzado (Hz); PMM: Potencial memb. Mitocond. (%); PNA-/IP: Memb. Plasm. e across. intactas (%). CON=Controle. Tris-caseína (5% glicerol) + Resveratrol (R), Quercetina (Q), Catequina (C) e associações.

Uma vez que a ação desses compostos fenólicos depende da sua estrutura, dose e método de administração (LIMA *et al.*, 2001), as concentrações utilizadas podem não ter sido suficientes para provocar mudanças na cinética espermática, após a descongelamento. Esses resultados corroboram com os de Silva *et al.* (2012), ao demonstrarem que não houve efeito da adição de quercetina e resveratrol ao diluente de congelamento, sobre a cinética dos espermatozoides de ovinos. Entretanto, Chunrong *et al.* (2019) observaram que altas concentrações (100 e 250 μM) de resveratrol reduziram a motilidade total de espermatozoides caprinos congelados-descongelados. Por outro lado, baixas concentrações (10 e 50 μM) de resveratrol favoreceram a motilidade total e progressiva. Com isso, observa-se que o uso de polifenóis como uma terapia antioxidante, durante a criopreservação de espermatozoides, tem mostrado resultados muito variados.

Quanto à ausência de ação benéfica da catequina neste estudo, pode ter ocorrido devido à interferência de inúmeros fatores, dentre os quais o pH e a composição do meio (CHOBOT *et al.*, 2009). Com relação ao pH, as catequinas são estáveis em pH ácido (pH<4) e perdem sua estabilidade à medida que o pH aumenta, tornando-se instável em pH alcalino (pH>8), onde são degradadas (CHOBOT *et al.*, 2009). Uma vez que o diluente utilizado nesse estudo apresentava pH 6.8, a molécula de catequina pode ter se tornado instável e ter sido degradada, não resultando em nenhum benefício para as células.

No entanto, o diluidor quimicamente definido, à base de caseína, foi capaz de manter a MT no grupo controle dentro do percentual esperado ($\geq 30\%$) para sêmen congelado-descongelado de ovinos, de acordo com o preconizado pelo CBRA (2013). O uso do diluente à base de caseína pode ser recomendado como uma alternativa que eliminaria problemas relacionados aos diluidores à base de leite ou gema de ovo.

Quanto à integridade das membranas plasmática e acrossomal, e o potencial de membrana mitocondrial, também não foram observadas diferenças entre os grupos

experimentais, o que corrobora com os resultados de Silva *et al.* (2012), quando utilizaram resveratrol (5,10,15, 20µg/mL) no diluente de congelação de sêmen ovino.

Diante do exposto, conclui-se que o diluidor Tris-caseína pode ser utilizado para congelação de sêmen ovino. No entanto, a adição de antioxidantes polifenóis não melhoram os parâmetros espermáticos, pós-descongelação.

CONCLUSÕES

Diante do exposto, conclui-se que o diluidor Tris-caseína pode ser utilizado para congelação de sêmen ovino. No entanto, a adição de antioxidantes polifenóis não melhoram os parâmetros espermáticos, pós-descongelação

REFERÊNCIAS

- ARRUDA, L.C.P.; ARAÚJO SILVA, R.A.J.; MONTEIRO, M.M.; SILVA, R.P.F.; OLIVEIRA, A.S.; MERGULHÃO, F.C.C.; MONTEIRO JR, P.L.J.; BATISTA, A.M.; GUERRA, M.M.P. In vitro evaluation of ram sperm frozen with extender supplemented with myricetin. Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia, v.70, n.1, p.153-159, 2018.
- CBRA. Manual para exame andrológico e avaliação do sêmen animal. 2ª ed., Colégio Brasileiro de Reprodução Animal, 2013. 114p.
- CHOBOT, V.; HUBER, C.; TRETTEHAHN, G.; HADACEK, F. Catechin: Chemical weapon, antioxidant, or stress regulator? Journal of Chemical Ecology, v.35, p.980-996, 2009.
- CHUNRONG, L.V.; LARBI, A.; WU, G.; HONG, Q.; QUAN, G. Improving the quality of cryopreserved goat semen with a commercial bull extender supplemented with resveratrol. Animal Reproduction Science, v.208, p.106-127, 2019.
- LIMA, L.R.P.; OLIVEIRA, T.T.; NAGEM, T.J.; PINTO, A.S.; STRINGHETA, P.C.; TINOCO, A.L.A.; SILVA, J.F. Bixina, Norbixina e Quercetina e seus efeitos no metabolismo lipídico de coelhos. Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science, v.38, n.4, p.196-200, 2001.
- SILVA, E.C.B.; CAJUEIRO, J.F.P.; SILVA, S.V.; SOARES, P.C.; GUERRA, M.M.P. Effect of antioxidants resveratrol and quercetin on in vitro evaluation of frozen ram sperm. Theriogenology, v.77, p.1722-1726, 2012.