

EFEITO DA ADIÇÃO DE NANOPARTÍCULAS DE ÓXIDO DE ZINCO AO DILUENTE DE CONGELAÇÃO DO SÊMEN OVINO

(Effect of adding zinc oxide nanoparticles to the freezing extender of ram semen)

Lucas Facundo Moura TOBAL*, Lúcia Cristina Pereira ARRUDA, Aline Saraiva de OLIVEIRA¹; Gustavo Ferrer CARNEIRO; Maria Madalena Pessoa GUERRA

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

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the effect of adding zinc oxide nanoparticles to the ram semen cryopreservation diluter. Semen pools (n=6), from three Santa Inês breeders, were diluted in Tris-yolk (5% glycerol), supplemented with zinc oxide nanoparticles (0, 25, 75 and 150µg/mL) at a concentration of 200x10⁶ sperm/mL. The samples were frozen in an automated system and stored in liquid nitrogen (-196 °C). At the time of analysis, the semen samples were thawed (37 °C/30s) and evaluated for sperm kinetics, plasma and acrosomal membrane integrity and mitochondrial membrane potential. There was no significant difference (p>0.05) between the experimental groups in the parameters of kinetics, plasma membrane and acrosome integrity. As for the potential of mitochondrial membrane, all treated groups were significantly (p≤0.05) larger than the control. It was concluded that the zinc oxide nanoparticles increase the mitochondrial membrane potential of ram sperm submitted to the freezing/thawing process.

Key Words: Nanotechnology, ram, cryopreservation.

INTRODUÇÃO

A criopreservação de sêmen é uma importante ferramenta para conservação de patrimônio genético. No entanto, danos a essas células são comuns durante o processamento e determinam baixos índices de fertilidade após o uso em programas de inseminação artificial, o que limita a utilização do sêmen congelado na espécie ovina. Portanto, melhorias na produção de diluentes de criopreservação são necessárias e, para isso, pode-se lançar mão do uso de nanotecnologias, que trata-se de uma ferramenta que pode contribuir de forma benéfica para a sobrevivência das células espermáticas durante o processamento e a criopreservação. As nanopartículas vêm sendo utilizadas em diversos ramos da ciência veterinária, particularmente na tecnologia do sêmen, onde nanopartículas de óxido de zinco (NpOZn) foram testadas em algumas espécies, como humanos (BARKHORDARI *et al.*, 2013; ISAAC *et al.*, 2017), bovinos (JAHANBIN *et al.*, 2020), camelos (SHAHIN *et al.*, 2020) e ovinos (HEIDARI *et al.*, 2019).

Estes estudos demonstraram ação protetora às membranas plasmática e acrossomal, e ao DNA espermático, reduzindo o estresse oxidativo e a peroxidação lipídica quando adicionadas aos meios de diluição de sêmen (ISAAC *et al.*, 2017; HEIDARI *et al.*, 2019; SHAHIN *et al.*, 2020; JAHANBIN *et al.*, 2021). Com isso, objetivou-se com esse estudo avaliar o efeito da adição de nanopartículas de óxido de zinco ao diluente de congelação de sêmen ovino.

MATERIAL E MÉTODOS

Local, coleta, avaliação e congelação do sêmen

Todos os procedimentos experimentais foram aprovados pelo Comitê de ética no uso de animais (CEUA) da Universidade Federal Rural de Pernambuco (Licença 6719080520 - ID 000304). Foram utilizados 3 ovinos da raça Santa Inês. As colheitas de sêmen foram realizadas três vezes por semana, totalizando 6 ejaculados por reprodutor. Após a coleta, os ejaculados foram submetidos a avaliações macroscópicas e microscópicas de forma subjetiva, em microscópio de contraste de fase (Olympus, Japão; 100x). Em seguida, os ejaculados que apresentaram motilidade $\geq 70\%$ foram aprovados e destinados à formação do *pool* (n=6). Após a formação do *pool* determinou-se a concentração espermática, em câmara de Neubauer.

Para congelação, o *pool* de sêmen foi diluído em Tris-gema de ovo (375mM de Tris, 124mM de ácido cítrico, 41,6mM de frutose, 20% de gema de ovo, 5% de glicerol, 100 UI de penicilina e 50 mg de estreptomicina, com pH 6,8), acrescido de nanopartículas de óxido de zinco (0, 25, 75 e 150 $\mu\text{g/mL}$), na concentração final de 200 $\times 10^6$ spz/mL. Posteriormente, as amostras foram envasadas em palhetas (0,25mL), congeladas em sistema automatizado (TK 3000[®] - TK Tecnologia em Congelamento Ltda., Brasil) e estocadas em nitrogênio líquido (-196 °C).

Avaliação da cinética espermática, integridade e potencial de membrana

Amostras de sêmen foram descongeladas (37 °C/30s) e incubadas em banho-maria (37 °C/5min). Em seguida, uma alíquota de sêmen foi diluída para concentração de 50 $\times 10^6$ spz/mL e avaliada em microscópio de contraste de fase (Eclipse 50i; Nikon, Japão; 100x). Os parâmetros cinéticos foram avaliados utilizando o software SCA[™], versão 5.1 (Microptics, S.L., Barcelona, Espanha).

As análises de integridade de membrana plasmática, integridade acrossomal e potencial de membrana mitocondrial foram realizadas em microscopia de epifluorescência (Carl Zeiss, Göttingen, Alemanha), seguindo metodologia descrita por Araújo Silva *et al.* (2019). Para avaliação da integridade de membrana plasmática foi utilizado o método de dupla coração com diacetato de carboxifluoresceína e iodeto de propídio. Para integridade de acrossoma utilizou-se o FITC-conjugado a *peanut agglutinin*, e para análise do potencial de membrana mitocondrial (PMM) adicionou-se o fluorocromo catiônico lipofílico JC-1 à amostra de sêmen. A seguir, as amostras foram incubadas (5min) em temperatura ambiente e procedeu-se a avaliação de 200 células de cada amostra.

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% ($p < 0,05$). Quando apresentou significância, o teste de comparação múltipla de Tukey-Kramer foi realizado para comparação das médias. Os resultados foram expressos em média e desvio padrão (média \pm desvio padrão).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

De acordo com os dados demonstrados na Tab. 01, pôde-se observar que a adição de nanopartículas de óxido de zinco (25, 75, e 150µg/mL), ao diluente de congelação de sêmen ovino não influenciou ($p>0,05$) os parâmetros de cinética espermática (MT, MP, VCL, VSL, VAP, LIN, STR, ALH e BCF). Além disso, não foram observadas diferenças ($p>0,05$) entre os grupos experimentais para a integridade de membrana plasmática e acrossomal (Tab. 01). No entanto, o potencial de membrana mitocondrial dos gametas de todos os grupos tratados, apresentaram resultados superiores ($p\leq 0,05$) ao do grupo controle.

Tabela 01: Cinética (CASA), integridade de membrana plasmática e acrossomal, e potencial de membrana mitocondrial de espermatozoides de ovinos, submetidos à congelação em meio suplementado com diferentes concentrações de nanopartículas de óxido de zinco.

	Controle	25µg/mL	75µg/mL	150µg/mL
MT (%)	42,60±8,96	48,03±7,6	48,73±7,66	42,08±8,12
MP (%)	32,58±10,15	29,6±1,39	35,43±6,62	30,50±5,69
VCL (µm/s)	87,35±5,54	85,45±8,69	85,83±5,52	81,93±6,56
VSL (µm/s)	73,50±7,60	70,20±7,25	72,53±7,86	67,38±6,57
VAP (µm/s)	81,00±6,79	78,35±7,23	79,53±6,75	75,05±6,34
LIN (%)	84,15±3,49	82,20±3,18	85,40±3,08	82,20±2,49
STR (%)	90,53±2,17	89,78±1,31	92,15±1,43	89,85±2,00
ALH (µm)	1,80±0,08	1,88±0,10	1,80±0,00	1,78±0,10
BCF (Hz)	7,83±0,42	8,15±0,48	8,00±0,32	8,43±0,17
iMP (%)	34,63±7,24	42,13±8,55	39,88±3,82	34,25±4,37
iAC (%)	36,63±4,31	37,75±2,63	41,25±8,57	39,5±6,82
aPMM (%)	40,17±8,17 ^b	94,75±4,50 ^a	85,25±12,53 ^a	86,38±10,14 ^a

^{a,b}: letras minúsculas diferentes na mesma linha indicam diferença significativa entre os grupos ($p\leq 0,05$ MT: motilidade total, MP: motilidade progressiva, VCL: velocidade curvilínea, VSL: velocidade em linha reta, VAP: velocidade média da trajetória, LIN: linearidade, STR: retilinearidade, WOB: índice de oscilação, ALH: deslocamento lateral da cabeça, BCF: frequência de batimento cruzado), iMP: integridade de membrana plasmática, iAC: integridade de acrossoma e aPMM: alto potencial de membrana mitocondrial.

O aumento no potencial de membrana mitocondrial nos espermatozoides dos grupos tratados com nanopartículas de óxido de zinco também foi observado por Jahanbin *et al.* (2020), em sêmen congelado de touros. Este resultado, provavelmente, está relacionado à função do elemento Zn, já que este está associado ao ATP e desempenha papel importante na redução e regulação da energia de fosfolípidios, podendo resultar em um impacto direto no potencial de membrana mitocondrial (LEWIS-JONES *et al.*, 1996).

Quanto à análise de cinética espermática, Isacc *et al.* (2017) também não observaram mudanças significativas, tanto na motilidade total quanto na progressiva no sêmen congelado de humanos, utilizando as mesmas concentrações de nanopartículas de óxido de zinco. No entanto, segundo estes os autores, as NpOZn formam uma espécie de camada protetora em torno da membrana plasmática dos espermatozoides, a qual não é permeável na membrana

integra. Em contrapartida, no presente estudo, nenhum efeito protetor sobre a membrana plasmática ou acrossomal foi observado.

CONCLUSÕES

O estudo mostrou que a adição de nanopartículas de óxido de zinco ao diluente de congelamento de sêmen ovino aumenta o potencial de membrana mitocondrial das células espermáticas.

REFERÊNCIAS

- ARAÚJO SILVA, R.A.J.; BATISTA, A.M.; ARRUDA, L.C.P.; SOUZA, H.M.; NERY, I.H.A.V.; GOMES, W.A.; SOARES, P.C.; SILVA, S.V.; GUERRA, M.M.P. Concentration of soybean lecithin affects short-term storage success of goat semen related with seminal plasma removal. *Animal Reproduction*, v.16, p.895-901, 2019.
- BARKHORDARI, A.; HEKMATIMOGHADDAM, S.; JEBALI, A.; KHALILI, M.A.; TALEBI, A.; NOORANI, M. Effect of zinc oxide nanoparticles on viability of human spermatozoa. *Iranian Journal of Reproductive Medicine*, v.11, p.767-771, 2013.
- HEIDARI, J.; SEIFDAVATI, J.; MOHEBODINI, H.; SHARIFI, R.S.; BENEMAR, H.A. Effect of Nano Zinc Oxide on Post-Thaw Variables and Oxidative Status of Moghani Ram Semen. *Kafkas Universitesi Veteriner Fakultesi Dergisi*, v.25, p.71-76, 2019.
- ISAAC, A.V.; KUMARI, S.; NAIR, R.; URS, D.R.; SALIAN, S.R.; KALTHUR, G.; ADIGA, S.K.; MANIKKATH, J.; MUTALIK, S.; SACHDEV, D.; PASRICH, R. Supplementing zinc oxide nanoparticles to cryopreservation medium minimizes the freeze-thaw-induced damage to spermatozoa. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v.494, p.656-662, 2017.
- JAHANBIN, R.; YAZDANSHENAS, P.; RAHIMI, M.; HAJARIZADEH, A.; TVRDA, E.; NAZARI, S.N.; MOHAMMADI-SANGCHESHMEH, A.; GHANEM, N. In Vivo and In Vitro Evaluation of Bull Semen Processed with Zinc (Zn) Nanoparticles. *Biological Trace Element Research*, 2020. <https://doi.org/10.1007/s12011-020-02153-4>.
- LEWIS-JONES, D.I.; AIRD, I.A.; BILJAN, M.M.; KINGSLAND, C.R. Effects of sperm activity on zinc and fructose concentrations in seminal plasma. *Human Reproduction*, v.11, p.2465-2467, 1996.
- SHAHIN, M.A.; KHALIL, W.A.; SAADELDIN, I.M.; SWELUM, A.A.; EL-HARAIKY, M.A. Comparison between the Effects of Adding Vitamins, Trace Elements, and Nanoparticles to SHOTOR Extender on the Cryopreservation of Dromedary Camel Epididymal Spermatozoa. *Animals*, v.10, p.78-83, 2020.