



ASSOCIAÇÃO DE ANTIOXIDANTES PARA A CRIOPRESERVAÇÃO DE SÊMEN BOVINO: ANÁLISE DE DADOS

Beatriz Vanderlei Ribeiro¹ – Unifesspa

beatriz.ribeirovet@gmail.com

Lucas Jacomini Abud² - Unifesspa

lucas.abud@unifesspa.edu.br

Agência Financiadora: FAPESPA

Eixo Temático/Área de Conhecimento: Reprodução Animal

1. INTRODUÇÃO

A criopreservação baseia-se na interrupção do metabolismo celular com a conservação das estruturas celulares íntegras e do seu potencial de fecundação por períodos prolongados. A interação dos espermatozoides com o meio de criopreservação é de grande importância, pois seus constituintes afetam a integridade das células e consequentemente sua viabilidade e habilidade de fecundação.

Assim, objetiva-se com este projeto analisar dados que propiciarão verificar a eficiência de meios que utilizaram uma da associação dos antioxidantes e diferentes agentes crioprotetores com a finalidade de combater as espécies reativas de oxigênio e manter a qualidade dos espermatozoides criopreservados de bovinos.

2. MATERIAS E MÉTODOS

Foram analisados dados referentes a qualidade espermática de sêmen bovino criopreservado em com associação de antioxidantes e sem a adição de antioxidante. A associação de antioxidantes utilizada foi catalase na dose de 20 UI e piruvato de sódio 1,5 Mm. A eficiência do antioxidante em combater as espécies reativas de oxigênio, e em manter a viabilidade espermática pós-criopreservação foi determinada por uma avaliação detalhada envolvendo os seguintes exames: grau de peroxidação lipídica; integridade da membrana plasmática, acrossoma e cinética de movimento pelo sistema computadorizado (CASA). Assim, para verificação da eficiência dessa associação é necessária a concretização das análises do banco de dados relativo aos testes do sêmen criopreservado.

As análises realizadas no sêmen após a criopreservação foram a cinética do movimento pelo sistema computadorizado (CASA), integridade das membranas plasmática, integridade acrossomal por microscopia de epifluorescência (AxiophotZeiss) na Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Avaliação de peroxidação lipídica por leitura de absorbância feita na USP.

A análise computadorizada da motilidade (CASA) foi realizada nas amostras após o descongelamento em banho maria a 37°C/ 30 segundos, em seguida o material foi transferido para um microtubo de 1,5 ml que foi mantido na mesma temperatura para posteriores avaliações. Retirou-se 2µL da amostra que foi colocada na lâmina de leitura (Makler) previamente aquecida a 37°C. Utilizou-se o aparelho modelo Ivos-Ultimate 12 da Hamilton Thorne Biosciences, previamente ajustado para análise de sêmen bovino. As características de movimento espermático analisadas foram: Motilidade Total (MT, %), Motilidade progressiva (MP, %), velocidade do trajeto (VAP, µm/s), velocidade progressiva (VSL, µm/s), velocidade

¹ Graduanda em Medicina Veterinária - Universidade Federal do Sul e Sudeste do Pará

² Doutor em Ciência Animal - Professor Titular Adjunto da Universidade Federal do Sul e Sudeste do Pará (Unifesspa). Coordenador do projeto.



curvilínea (VCL, $\mu\text{m/s}$), deslocamento lateral da cabeça (ALH, μm), frequência de batimento (BCF, Hz), retilinearidade (STR, %) e linearidade (LIN, %).

Para avaliação da integridade da membrana plasmática utilizou-se o diacetato de 6 carboxifluoresceína (C-FDA) e iodeto de Propídio (IP) conforme descrição de HARRISON & VICKERS (1990). Uma amostra de sêmen ($10\mu\text{l}$) foi adicionada a $40\mu\text{l}$ de solução de corante e incubadas por 10 minutos em microtubos protegidos da luz. Uma alíquota de $7\mu\text{l}$ de solução corante com o sêmen foi colocada em uma lâmina e coberta por uma lamínula e observada em microscópio de epifluorescência (AxiophotZeiss: filtro de comprimento de onda de $395/420\text{ nm}$ de excitação/emissão). Foram contadas 200 células espermáticas, sendo classificadas de acordo com a coloração das células em: Membrana íntegra (coloração verde) e membrana lesada (as células com coloração vermelha e as que coravam de verde e vermelho).

A avaliação da integridade do acrossoma utilizou-se uma conjugação de isotiocianato de Fluoresceína – FITC (sonda fluorescente) com lecitina de amendoim (peanutaglutinin – PNA) e IP, como descrito por KLINC & RATH (2007). Amostra de sêmen ($10\mu\text{L}$) foi diluída em uma solução de corante ($30\mu\text{L}$) e incubada por 10 minutos. Uma alíquota de $7\mu\text{l}$ de solução corante com o sêmen foi colocada em uma lâmina e coberta por uma lamínula e observada em microscópio de epifluorescência (AxiophotZeiss: filtro de comprimento de onda de $494/517\text{ nm}$ de excitação/emissão). Foram contadas 200 células espermáticas, sendo classificados em quatro categorias: morto com acrossoma íntegro (coloração vermelha na cabeça e ausência de coloração no acrossomo); morto com acrossoma reagido (coloração vermelha na cabeça e verde na região acrossomal); vivo com acrossoma íntegro (ausência de coloração na cabeça e acrossoma) e vivo com acrossoma reagido (ausência de coloração na cabeça e presença de coloração verde na região acrossomal).

Para verificar a suscetibilidade do espermatozóide ao estresse oxidativo utilizou-se a metodologia descrita por OHKAWA et al. (1979). Esse procedimento é conhecido como lipoperoxidação induzida, e tem como objetivo quantificar o potencial que a amostra teria de gerar os radicais em questão. As palhetas de sêmen foram descongeladas em banho-maria a $37^\circ\text{C}/30\text{min}$ e em seguida foi realizada a lavagem das amostras com PBS. Após este procedimento pipetou-se $300\mu\text{l}$ do sêmen lavado em um microtubo, adicionando $75\mu\text{l}$ de ácido ascórbico e $75\mu\text{l}$ de sulfato de ferro e incubando a solução por 90 minutos a 37°C para a geração de espécies reativas de oxigênio (ROS). Após o período de incubação, foram adicionados $900\mu\text{l}$ de solução de ácido tricloroacético a 10% (TCA 10%) e centrifugadas por 15 min a 20.000g , para precipitação de proteínas. Alíquotas de $600\mu\text{l}$ do sobrenadante foram colocadas nos criotubos e congeladas para posteriormente serem avaliadas. Após todas as amostras do experimento estarem preparadas, descongelou-se e acrescentou-se $600\mu\text{l}$ de ácido tiobarbitúrico a 1% (TBA1%), dissolvido em hidróxido de sódio ($\text{NaOH } 0,05\text{M}$), preparado instantes antes de ser utilizado. Os tubos contendo esta mistura foram incubados em banho-maria ($90-100^\circ\text{C}$) por 15 min e resfriados imediatamente em banho de gelo, no intuito de parar a reação. A absorvância das amostras foi quantificada através de leitura em espectrofotômetro (Ultrospec 3300pro, Amersham Pharmacia), no comprimento de onda de 532nm . Os resultados foram comparados com uma curva padrão feita previamente com malondialdeído (MDA). O MDA é uma das principais substâncias que reagem com o ácido tiobarbitúrico e a concentração de TBARS é determinada utilizando-se o valor $1,56 \times 10^5 \text{ xM} \cdot 1\text{ml}^{-1}$ como coeficiente de extinção molar do malondialdeído (BUEGE & AUST, 1978). O índice de peroxidação lipídica das amostras foi expresso em nanogramas de TBARS por 1×10^6 espermatozoides ($\text{ng}/10^6 \text{ sptz}$).

Os dados foram analisados em delineamento de blocos ao acaso, com seis tratamentos e cinco blocos (bovinos), sendo realizado análise descritiva.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados da morfologia espermática dos touros estão apresentados na tabela 1, os animais utilizados para o experimento tiveram resultados satisfatórios no exame andrológico com defeitos maiores inferior a 20%, defeitos menores inferior a 30% e total de defeitos inferior a 20%, conforme as indicações do Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA 2013), sendo portando indicado para criopreservação do sêmen.



Tabela 1. Resultado da avaliação morfologia dos touros participantes do projeto antes da criopreservação espermática.

Morfologia			
	Defeitos Maiores	Defeitos Menores	Totais
Animal	%	%	%
1	5.4	1	6.4
2	6	4.6	10.6
3	7.5	3.5	11
4	5.3	8.7	14
5	2.7	4	6.7
Média	5.38	4.36	9.74
Desvio Padrão	1.74	2.79	3.20

Após o descongelamento do sêmen foi avaliado a integridade da membrana e do acrossoma dos espermatozoides, ao analisar os resultados (Tabela 2) não foi observado diferença entre os espermatozoides que receberam a associação de antioxidante com os que não receberam. A literatura descreve a viabilidade dos antioxidantes como forma de proteção dos espermatozoides aos radicais livre formados durante o processo de criopreservação (KLINC & RATH, 2007), e que sua adição no meio criopreservado eleva a viabilidade dos espermatozoides, (SOUZA et al. 2016) minimizando os efeitos deletérios do estresse oxidativo. No entanto, neste estudo não foi observado essa proteção, possivelmente em decorrência da concentração dos antioxidantes utilizados e/ou da associação deles. A literatura descreve que para obter resultados com a utilização destes aditivos nos meios, deve-se buscar disponibilizar quantidade suficiente para neutralizar os efeitos dos radicais livres e assim conseguir a proteção da membrana plasmática (GUIMARÃES, 2011).

Tabela 2. Resultados da integridade de membrana plasmática e de acrossoma do sêmen bovino criopreservado com e sem a adição de antioxidante.

Membrana íntegra e acrossoma íntegro		
	Com antioxidante	Controle
Animal	%	%
1	22	39
2	34	32
3	38	42
4	27	20
5	31	21
Média	30.40	30.80
Desvio Padrão	6.19	10.08

Os resultados dos parâmetros da cinética espermática (Tabela 3) não diferiram entre os tratamentos, resultados semelhantes foi observado por GUIMARÃES (2011). A não diferenciação dos parâmetros pode ser justificada pela possível falta de proteção dos antioxidantes utilizados as células espermáticas, a mesma autora sugere que a proteção das membranas pelos antioxidantes melhoraria os resultados de cinética espermática.

Tabela 3. Resultado dos parâmetros da cinética espermática: motilidade total (MT), motilidade progressiva (MP), velocidade de trajeto (VAP), velocidade progressiva (VSL), velocidade curvilínea (VCL),

VI Seminário de Iniciação Científica
Pesquisa na Amazônia: Novos cenários
 27, 29 e 30 de Outubro de 2020
 On-line pela plataforma Google Meet
 UNIFESSPA | PROPIT

amplitude de deslocamento lateral da cabeça (ALH), frequência de batimento flagelar (BCF), retilinearidade (STR) e linearidade (LIN), obtidos pelo sistema de análise computadorizada (CASA) do sêmen bovino criopreservado com antioxidante (CA) e sem antioxidantes (AS).

Animal	MT		MP		VAP		VSL		VCL		ALH		BCF		STR		LIN	
	CA	SA	CA	SA	CA	SA	CA	SA	CA	SA	CASA	CA	SA	CA	SA	CA	SA	
	%		%		µm/s		µm/s		µm/s		µm		Hz		%		%	
1	85	88	62	62	84.2	80	71.4	67.5	139.1	132.4	5.7	5.6	34.1	34.1	84	83	53	52
2	69	57	55	42	93.9	82	83.9	75	140.7	124.6	4.7	4.1	39.8	41.8	90	90	63	61
3	59	64	40	46	67.6	72.8	59.6	63.8	108.3	116.2	4.4	4.7	34.5	35	87	87	57	57
4	58	57	32	32	58.2	68.1	51.8	57.8	87.2	109.3	3.8	5.1	32.6	31.3	89	85	64	57
5	91	41	52	21	83.4	79.5	65.2	58.4	147.6	154.1	6.7	7.4	26.3	23	77	75	45	40
Média	72.4	61.4	48.2	40.6	77.4	76.4	66.3	64.5	124.5	127.3	5.0	5.3	33.4	33.0	85.4	84.0	56.4	53.4
Desvio	0	0	0	0	6	8	8	0	8	2	6	8	6	4	0	0	0	0
Padrão	3	0	5	9	1		7				5	6						

O efeito da associação de antioxidantes sob nível de proteção e de peroxidação lipídica nos espermatozoides foi avaliado e para isso utilizou-se a geração artificial de ROS com a mensuração das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS). Ao analisar os resultados não houve diferença estatística nas respostas a resistência dos espermatozoides a peroxidação entre os tratamentos, resultados semelhantes foram descritos por GUIMARÃES (2011) ao avaliar diferentes antioxidantes na criopreservação de sêmen.

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A associação de antioxidante não melhorou os resultados da qualidade do sêmen após o descongelamento na presente pesquisa, sugere-se a necessidade de continuar a pesquisa para buscar novos antioxidantes a determinar a concentração viável para proteger as células no processo de congelamento e de descongelamento.

REFERÊNCIAS

- CHATTERJEE, S.; GAGNON, C. Production of reactive oxygen species by spermatozoa undergoing cooling, freezing, and thawing. *Molecular Reproduction and Development*, New York, v. 59, p. 451-458, 2001.
- GUIMARÃES, C. O. Efeito da adição de antioxidantes na qualidade do sêmen criopreservado de bovinos. Dissertação, Universidade Federal de Goiás, Escola de Veterinária e Zootecnia, 67 f, 2011.
- HALLIWELL, B. Reactive oxygen species in living systems: source, biochemistry and role in human disease. *The American Journal of Medicine*, New York, v. 91, p. 14-22, 1991.
- HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. *Free radicals in Biology and Medicine*. Oxford, 543 p, 1989.
- HOLT, W. V. Basic aspects of frozen storage of semen. *Animals Reproduction Science*, Amsterdam, v.62, p. 3-22, 2000.
- KLINC, P & RATH, D. Reduction of Oxidative Stress in Bovine Spermatozoa During Flow Cytometric Sorting. *Reproduction in Domestic Animals*, Berlin, v. 42, p.63-67, 2007.
- RASUL, Z.; AHMAD, N.; ANZAR, M. Changes in motion characteristics, plasma membrane integrity, and acrossome morphology during cryopreservation of buffalo spermatozoa. *Journal of Andrology*, Philadelphia, v. 22, n. 2, p. 278-284, 2001.
- SOUZA, W.L.; MORAES, E.A.; COSTA, J.M.S.; SOUSA, P.H.F.; LOPES JUNIOR, E.S.; OLIVEIRA, R.P.; TONIOLLI, R. Efeito de diferentes concentrações de melatonina em espermatozoides de carneiros sobre estresse oxidativo após criopreservação. *Pesqui. Vet. Bras.*, v.36, n.7, p.657-664, 2016.