

CONSTRUINDO SABERES, FORMANDO PESSOAS E TRANSFORMANDO A PRODUÇÃO ANIMAL

INTEGRIDADE DAS MEMBRANAS PLASMÁTICA E ACROSSOMAL DE CÉLULAS ESPERMÁTICAS SUBMETIDAS A ESTRESSE TÉRMICO

Marina Marie Bento NOGUEIRA*¹, Laine Oliveira da SILVA¹, Éderson Silva SILVEIRA¹, Antônio José Souza da SILVA¹, Elivan Neuton Lira LOPES¹, Marcelo Helder Medeiros SANTANA¹, Jefferson Viana Alves DINIZ¹, Rodolpho SATRAPA²

*autor para correspondência: nogmarie@gmail.com

¹Instituto Federal do Acre, Sena Madureira, Acre, Brasil

²Secretaria de Estado de Agropecuária, Rio Branco, Acre, Brasil

Abstract:

The objective of this experiment was to evaluate the plasma membrane and acrossomal membrane integrity of sperms after thawing and subjected to thermal stress. Four bulls Holstein Breed were used, with proven fertility the ejaculates were cryopreserved using the Botu-Bov® diluent with 20% egg yolk. After cryopreservation, the straws were thawed in a water bath at 37°C and your content placed in micro tubes heated to 37°C. The first evaluation was conducted after defrosting (Group T0) and another after being kept in a water bath for 90 minutes (Group T90). The morphofunctional evaluation was performed by flow cytometry. To assess the integrity of plasma and acrossomal membranes. The protocol described by Freitas-Dell'Aqua et al., 2016 was used. The averages and standard error were evaluated by the t test at 5% significance. There was difference between the group evaluated immediately after thawing (Group T0) and the Group subjected to thermal stress (Group 90), where the condition of stress interfered on plasma membrane and acrossomal membrane integrity. The damage to the sperm occurring membranes while the cryopreservation process directly affect the viability of the sperm and are intensified as the sperm are subjected to challenging temperatures.

Palavras-chave: citometria de fluxo, criopreservação, fertilidade, sêmen

Promoção e Realização:



Apoio Institucional:



Organização:



CONSTRUINDO SABERES, FORMANDO PESSOAS E TRANSFORMANDO A PRODUÇÃO ANIMAL

Introdução

O fenômeno da fertilização está intimamente relacionado com a integridade da membrana plasmática e acrossomal das células espermáticas. Durante o processo de criopreservação do sêmen podem ocorrer danos a tais membranas, acarretando redução significativa na viabilidade dos espermatozoides.

Fatores como ruptura e desestabilização das membranas espermáticas, da falta de atividade reparadora de crescimento e de divisão, já que os espermatozoides são desprovidos de atividades biossintéticas, contribuem para a queda da fertilidade espermática após a criopreservação (PAPA et al., 2010).

A técnica mais estudada e utilizada na determinação da integridade da membrana plasmática é a citometria de fluxo, devido aos dados quantitativos gerados sobre a permeabilidade relativa das membranas e por conferir especificidade na diferenciação entre células funcionais e afuncionais (MARTÍNEZ-RODRÍGUEZ, 2003).

As novas técnicas que utilizam as sondas fluorescentes vêm ganhando importância por sua característica de marcar estruturas específicas das células, principalmente certas formas de anormalidades morfológicas nos espermatozoides, como as que ocorrem devido à translocação de fosfatidilserina consequente do processo de criopreservação, possibilitando assim, avaliar a criocapacitação e os vários compartimentos celulares ao mesmo tempo (DHURVEY et al., 2012).

Objetivou-se com esse experimento avaliar a integridade das membranas plasmática e acrossomal (IMPA) de espermatozoides após a descongelação e submetidos a estresse térmico.

Promoção e Realização:



Apoio Institucional:



Organização:



CONSTRUINDO SABERES, FORMANDO PESSOAS E TRANSFORMANDO A PRODUÇÃO ANIMAL

Material e Métodos

Foram utilizados quatro touros da raça holandesa com idade entre cinco e seis anos, pesando em média 764 Kg (\pm 56), com histórico de fertilidade comprovada, alojados em central de coleta de sêmen, localizada no município de Botucatu (latitude 22°53'09" Sul e longitude 48°26'42" Oeste), Estado de São Paulo.

Os ejaculados foram obtidos por meio de vagina artificial, aquecida a 42°C e os volumes de sêmen determinados em tubos graduados, posteriormente mantidos em banho-maria a 37°C, até serem processados para criopreservação. Para o processamento do sêmen, adotou-se como ponto de corte valores iguais ou superiores à concentração espermática de $300 \times 10^6 \text{ mL}^{-1}$ e motilidade superior a 70% de espermatozoides móveis.

Para a congelação, empregou-se o diluente Botu-Bov® (Botupharma, Botucatu, SP, Brasil) contendo 20% gema de ovo. Para as avaliações das características seminais, as palhetas foram descongeladas em banho-maria a 37°C por 30 segundos, sendo posteriormente abertas e seu conteúdo, individualmente colocado em micro tubos previamente aquecido a 37°C. A primeira avaliação foi realizada imediatamente após a descongelação (Grupo T0) e outra, após ter sido mantido em banho-maria por 90 minutos (Grupo T90).

A avaliação morfofuncional foi realizada por citometria de fluxo, empregando-se o equipamento BD LSR (Fortessa; Becton Dickinson, Mountain View, CA, USA). Após a análise, os dados foram avaliados por programa do mesmo fabricante BD FACSDiva™ 168 software v6.1. Para avaliação da integridade das membranas plasmática e acrossomal (IMPA) utilizou-se protocolo descrito por Freitas-Dell'Aqua et al., 2016. As médias e erro padrão foram avaliados pelo teste t a 5% de significância.

Promoção e Realização:



Apoio Institucional:



Organização:



CONSTRUINDO SABERES, FORMANDO PESSOAS E TRANSFORMANDO A PRODUÇÃO ANIMAL

Resultados e Discussão

Constatou-se diferença entre o grupo avaliado imediatamente após a descongelação (GT0) e o grupo submetido a estresse térmico (GT90), ou seja, a condição de estresse térmico interferiu na integridade das membranas plasmática e acrossomal (IMPA) (tabela 01).

Tabela 01 – Média e erro padrão das características de IMPA de espermatozoides criopreservados submetidos a estresse térmico

Parâmetro	GT0	GT90
IMPA (%)	57 ± 2,3 ^a	22 ± 2,5 ^b

^aIMPA: Integridade da Membrana Plasmática e Acrossomal; ^bGT0: Tempo zero; ^cGT90: Tempo 90 minutos. Letras minúsculas distintas na mesma linha diferem ($p < 0,05$)

O processo de criopreservação pode produzir injúrias irreversíveis às células espermáticas, particularmente aquelas impostas às condições estruturais de suas membranas plasmática e acrossomal, implicando em redução significativa da sua capacidade fecundante (PAPA et al., 2010). Em razão disso, é pertinente a preocupação com o uso de diluentes que sejam adequados para manter a qualidade espermática antes e após o processo de criopreservação.

A IMPA do espermatozoide exerce papel fundamental na manutenção da fertilidade e na sobrevivência celular no trato genital da fêmea, por serem responsáveis pela manutenção da cinética espermática, do equilíbrio osmótico e da penetração na zona pelúcida (MOUSSA et al., 2002). O grupo submetido a estresse térmico apresentou maior número de espermatozoides com alteração de IMPA, as quais, nas condições do experimento, podem ser atribuídas ao estresse provocado pelo tempo de exposição ao calor e a inabilidade do crioprotetor preservar a integridade das membranas naquelas condições.

Promoção e Realização:

Apoio Institucional:

Organização:

CONSTRUINDO SABERES, FORMANDO PESSOAS E TRANSFORMANDO A PRODUÇÃO ANIMAL

Conclusão

Os danos ocorrentes nas membranas espermáticas durante o processo de criopreservação interferem diretamente na viabilidade do sêmen, e são intensificados à medida que os espermatozoides são submetidos a temperaturas desafiadoras. Com isso, quanto mais prontamente o sêmen descongelado for utilizado para inseminação artificial, melhor sua capacidade fertilizante.

Agradecimentos

Ao Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Acre pelo apoio financeiro. A Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, campus de Botucatu-SP, onde foram gerados os dados dessa pesquisa.

Referências

- DHURVEY, M.; GRUPTA, V.K.; NEMA, S.P.; PATIDAR, A.; SHIVHARE, M.; SINGH, N.; SHAKYA, V. Modern semen evaluation techniques in domestic animals: a review. **DHR Int. J. Biomed. Life Sci.**, v.3, n.1, p.62-83, 2012.
- FREITAS-DELL'AQUA, C.P.; SANCLER-SILVA, Y.F.R.; DELL'AQUA JR., J.A.; PAPA, F.O. Multicolor protocol for evaluation of apoptosis or damage to the plasma membrane of the spermatozoa. **Animal Reproduction Science**, v.169, p.99–135, 2016.
- MARTÍNEZ-RODRÍGUEZ, H. Laboratory semen assessment and prediction of fertility: still utopia?. **Reprod. Dom. Anim.**, v.38, p.312-318, 2003.
- MOUSSA, M.; MARTINET, V.; TRIMECHE, A.; TAINURIER, D.; ANTON, M. Low density lipoproteins extracted from hen egg yolk by an easy method: cryoprotective effect on frozen-thawed bull semen. **Theriogenology**, v.57, p.1695-1706, 2002.
- PAPA, F.O.; FELÍCIO, G.B.; MELO, C.M.; ALVARENGA, M.A.; DE VITA, B.; AVANZI, B.R. Effect of substituting soybean lecithin for egg yolk in an extender used for the cryopreservation of stallion semen. **Animal Reproduction Science**, v.121, p.71-2, 2010.

Promoção e Realização:



Apoio Institucional:



Organização:

