

CONSTRUINDO SABERES, FORMANDO PESSOAS E TRANSFORMANDO A PRODUÇÃO ANIMAL

## **LONGEVIDADE DO SÊMEN OVINO CRIOPRESERVADO EM DILUIDOR TRIS-GEMA SUPLEMENTADO COM ÁCIDO LINOLÉICO CONJUGADO (CLA)**

Marislane Resende da SILVA\*<sup>1</sup>, Francisca Gonçalves de OLIVEIRA<sup>1</sup>, Claudiane Moraes dos SANTOS<sup>1</sup>, Marlon de Araújo Castelo BRANCO<sup>2</sup>, Antônio de Sousa JÚNIOR<sup>2</sup>, Isana Rocha COSTA<sup>2</sup>, Jefferson Hallisson Lustosa da SILVA<sup>2</sup>, Yndyra Nayan Teixeira Carvalho Castelo BRANCO<sup>1</sup>

\*autor para correspondência: janielfnsantos@hotmail.com

<sup>1</sup>Universidade Estadual do Piauí, Teresina, Piauí, Brasil

<sup>2</sup>Universidade Federal do Piauí, Teresina, Piauí, Brasil

**Abstract:** The production of reactive oxygen species (ROS) above critical levels alters sperm viability due to oxidative stress. The objective of this study was to evaluate the effects of different concentrations (0 $\mu$ M, 0.5 $\mu$ M and 5 $\mu$ M) of linoleic acid on the supplementation to the cryopreservation diluent of sheep semen. The cryopreserved spermatozoa were submitted to the evaluation of the total motility and the sperm vigor in the thermo resistance test (TTR) at 0, 60, 120 and 180 minutes under phase contrast microscopy. The results obtained in the present study showed the maintenance of the total post-thaw motility of the spermatozoa incubated at 37 °C for 60 minutes when cryopreserved with the addition of 0.5  $\mu$ M linoleic acid. It is concluded that the supplementation of linoleic acid to the TRIS-Gemma diluent of cryopreservation of ovine semen, at the concentration of 0.5  $\mu$ M, preserves the total motility within one hour after the thawing process.

**Palavras-chave:** antioxidante, criopreservação, teste de termoresistência

Promoção e Realização:



Apoio Institucional:



Organização:



CONSTRUINDO SABERES, FORMANDO PESSOAS E TRANSFORMANDO A PRODUÇÃO ANIMAL

## Introdução

Um dos fatores mais importantes que contribuem para a má qualidade do sêmen é o estresse oxidativo (EO), por ser uma condição associada ao desequilíbrio entre a produção de espécies reativas de oxigênio e a capacidade de um sistema biológico para desintoxicar os intermediários reativos ou reparar o dano resultante (DE LAMIRANDE, 1995). Diversos estudos experimentais e clínicos sobre a fisiopatologia do EO e seu impacto sobre a infertilidade têm demonstrado o papel benéfico de muitos antioxidantes em parâmetros espermáticos e as taxas de fertilidade (GHARAGOZLOO, 2011).

A identificação de tecnologias que venham a reduzir tais danos e melhorar as condições de criopreservação se torna relevante do ponto de vista biotecnológico, neste contexto surgem os ácidos graxos poliinsaturados como substâncias com ação potencial antioxidativa, introduzida ao diluidor de sêmen. Antioxidantes enzimáticos, tais como superóxido dismutase, catalase, glutathione peroxidase e vitaminas (por exemplo, vitamina E e C), são considerados como agentes muito eficientes para manter uma relação estável entre o EO e a capacidade antioxidante dos espermatozoides (AGARWAL, 2005).

A adição de ácidos graxos pode influenciar a estabilidade das membranas frente à criopreservação. Desta forma, devido à necessidade de preservar as membranas espermáticas, é necessária a ampliação dos conhecimentos relacionados aos procedimentos de criopreservação do sêmen, associada a estudos que evidenciem o grau de estresse oxidativo de amostras de sêmen de reprodutores ovinos, pós-criopreservação, com a finalidade de aumentar a capacidade fertilizante dessas células. Por conseguinte, o objetivo dessa pesquisa foi avaliar o efeito da adição de ácido linoléico conjugado (CLA) ao diluidor Tris-Gema sobre a viabilidade de sêmen ovino criopreservado.

Promoção e Realização:



Apoio Institucional:



Organização:



CONSTRUINDO SABERES, FORMANDO PESSOAS E TRANSFORMANDO A PRODUÇÃO ANIMAL

### Material e Métodos

Foram selecionados 4 ovinos da raça Doppet, segundo os parâmetros do manual do Colégio Brasileiro de Reprodução Animal, com idades entre 22 a 24 meses, pesando em média 60 Kg, em boa condição corporal, mantidos sob as mesmas condições ambientais e alimentares. Os animais foram submetidos a cinco coletas de sêmen, por vagina artificial, após cada coleta, o sêmen foi avaliado macroscopicamente (cor, aspecto e volume) e microscopicamente (turbilhonamento, motilidade e vigor) e posteriormente quanto a concentração espermática pela técnica da Câmara de Neubauer, na diluição de 1:400.

Os ejaculados foram manipulados a 37°C e misturados, formando um *pool*, depois foi diluído em meio Tris-Gema (3,605 g de Tris, 2,024 g de ácido Cítrico, 1,488g de frutose, 100 mL de água destilada, 20% de gema de ovo e 5% de glicerol, 300mOsm e pH de 6,8), adicionado de ácido linoleico em conformidade com os tratamentos experimentais [0 µM (Controle); 0,5µM; e 5µM] para uma concentração final de 20 X 10<sup>6</sup> espermatozoides viáveis por palheta de 0,25mL para todos os tratamentos, e congeladas em máquina TK 3000® (TK Tecnologia em Congelação Ltda, Uberaba, Brasil), e armazenadas em N<sub>2</sub> líquido.

Descongeladas a 37°C por 30 segundos, as amostras de sêmen foram avaliadas quanto ao teste de termorresistência lento. As mostras descongeladas foram acondicionadas em microtubos de 1,5 mL e incubadas a 37°C, avaliadas quanto à motilidade total (MT - %) e o vigor (1-5) espermático por meio de microscopia de contraste de fase (Olympus optical Co., Ltda., Tóquio, Japão) com placa aquecedora acoplada, com aumento de 400x, nos tempos 0, 60, 120 e 180 minutos pós-descongelamento.

A variável estudada foi submetida à análise de variância (ANOVA) e para comparação de média foi utilizado o teste paramétrico de Tukey e Duncan, na probabilidade de 5%. As análises foram executadas através do programa Statistical Analysis System (SAS Institute Inc, 2013).

Promoção e Realização:



Apoio Institucional:



Organização:



CONSTRUINDO SABERES, FORMANDO PESSOAS E TRANSFORMANDO A PRODUÇÃO ANIMAL

### Resultados e Discussão

O tempo de incubação reduziu a percentagem de espermatozoides com motilidade total, assim como diminuiu o vigor para todos os tratamentos. A criopreservação afetou significativamente ( $P < 0,05$ ) o percentual de viabilidade espermática avaliado pelo TTR, provocando uma interação entre tempos e tratamentos (Tabela 1).

Apenas na concentração de  $5\mu\text{M}$  de CLA, e no tempo de 0 minutos de incubação a  $37^\circ\text{C}$  após o descongelamento, a motilidade espermática total foi superior. No entanto, após 60 minutos incubados a  $37^\circ\text{C}$ , o tratamento de  $5\mu\text{M}$  de CLA mostrou-se semelhante aos demais. Nos tempos de 120 e 180 minutos não houve diferença na motilidade total entre os tratamentos estudados. Não houve diferença ( $P > 0,05$ ) para a variável vigor espermático entre os tratamentos para todos os tempos de incubação no TTR.

Tabela 1 - Motilidade total e vigor pós-descongelamento de espermatozoides ovinos, criopreservados em duas concentrações de ácido linoleico ( $0,5\mu\text{M}$  e  $5\mu\text{M}$ ), avaliados ao longo de diferentes tempos de incubação (0, 60, 120 e 180 minutos) a  $37^\circ\text{C}$ , pelo teste de termorresistência (TTR)

Parâmetros	Tempo (min.)	Tratamentos			Média
		Controle	$0,5\mu\text{M}$	$5\mu\text{M}$	
Mot. (%)	0	$16,00 \pm 0,18^a$	$21,00 \pm 5,47^a$	$28,00 \pm 4,47^b$	$21,66^a$
Vig. (1-5)	0	$1,60 \pm 0,54$	$1,60 \pm 0,54$	$2,00 \pm 0,0$	$1,73^A$
Mot. (%)	60	$15,00 \pm 3,53^a$	$14,00 \pm 4,18^a$	$16,00 \pm 4,18^a$	$15,00^b$
Vig. (1-5)	60	$1,20 \pm 0,44$	$1,20 \pm 0,44$	$1,60 \pm 0,54$	$1,33^B$
Mot. (%)	120	$9,00 \pm 6,51^c$	$9,00 \pm 7,41^c$	$8,00 \pm 5,70^{cd}$	$8,66^c$
Vig. (1-5)	120	$0,60 \pm 0,54$	$0,40 \pm 0,54$	$0,60 \pm 0,54$	$0,53^C$
Mot. (%)	180	$4,00 \pm 2,23^{cd}$	$4,00 \pm 2,23^{cd}$	$3,00 \pm 2,73^d$	$3,66^d$
Vig. (1-5)	180	$0,40 \pm 0,54$	$0,40 \pm 0,54$	$0,40 \pm 0,54$	$0,40^C$

Médias de motilidade com mesma letra minúscula não diferem entre si pelo Teste de Duncan a 5% ( $P > 0,05$ ). Médias de vigor com mesma letra maiúscula não diferem entre si pelo Teste de Duncan a 5% ( $P > 0,05$ ).



CONSTRUINDO SABERES, FORMANDO PESSOAS E TRANSFORMANDO A PRODUÇÃO ANIMAL

Castelo Branco et al. (2017), avaliando o efeito da suplementação do óleo essencial de limão ao diluidor TRIS-Gema para sêmen bovino, não observou diferença estatística ( $P>0,05$ ) entre os tratamentos para os parâmetros de motilidade e vigor, semelhante ao observado neste estudo, entretanto, com espécies animal diferente.

Já Kiernan et al. (2011), avaliando a adição de ácido  $\alpha$ -linolênico (CLA) (10 e 100  $\mu$ M), ácido palmítico (100  $\mu$ M) e ácido oleico (OA) (10 e 100 mM) em diluidores a base de citrato, com e sem gema de ovo, melhorou a motilidade progressiva, e a viabilidade de espermatozoides de touro refrigerados por 7 dias.

### Conclusão

A suplementação do ácido linoleico, nas concentrações de 0,5 $\mu$ M e 5 $\mu$ M ao diluidor TRIS-Gema de criopreservação do sêmen ovino, não produz efeitos significativos na qualidade espermática. No entanto, dependendo da concentração do ácido, a motilidade total e a integridade da membrana acrossomal espermática pós-descongelamento são preservadas.

### Referências

- DE LAMIRANDE, E.; GAGNON, C. Impact of reactive oxygen species on spermatozoa: a balancing act between beneficial and detrimental effects. **Hum. Reprod., Oxford**, v. 10, p. 15-21, 1995.
- GHARAGOZLOO, P., AITKEN, R.J. The role of sperm oxidative stress in male infertility and the significance of oral antioxidant therapy. **Hum. Reprod.** 26, 1628-1640, 2011.
- AGARWAL, A.; PRABAKARAN, S. A.; SAID T. M. Prevention of Oxidative Stress Injury to Sperm. **Journal of Andrology**, v.26, n.6, p.654-660, 2005.
- CASTELO BRANCO, M. A. et al. Plasminogen activator inhibitor and antipain preserve acrosome integrity of bovine spermatozoa during cryopreservation. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, JCR, 2017.
- KIERNAN, M. C. et al. Amyotrophic lateral sclerosis. **Lancet** 377, 942–955 (2011).