

USO DA BROMELINA NA QUALIDADE DO SÊMEN CAPRINO CONGELADO/DESCONGELADO

(Use of bromelain in the quality of frozen/thawed goat sêmen)

Clarissa de Castro e BRAGA^{1*}; Wcleudem Matias NASCIMENTO²; Leticia Soares de Araújo TEIXEIRA¹; Laércio Fontinele Bandeira de MACÊDO²; Kenney de Paiva PORFIRIO³; Ney Rômulo de Oliveira PAULA³; Rômulo José VIEIRA³

¹Residência Multiprofissional, Universidade Federal do Piauí, Campus Universitário Ministro Petrônio Portella, Ininga, Teresina/PI CEP: 64.049-550; ²Mestrado Profissional;

³Universidade Federal do Piauí. *E-mail: clarissamedicavet@gmail.com

ABSTRACT

The objective of this study was to evaluate the effect of bromelain on sperm quality, after defrosting, in goats. For this purpose, five Anglo Nubian goats were used. Semen collection was performed with the aid of an artificial vagina. The semen was evaluated for its macroscopic and microscopic parameters. After the analysis, the total volume of the pool was divided into three groups. One belonging to the control group (ACP-101/102[®]) and two treatment groups with ACP-101/102[®] enriched with bromelain in concentrations of 5% and 10%. The samples were cryopreserved with the aid of the Tk3000 device. Then, the straws were immersed in liquid nitrogen and stored in cryogenic cylinders. After one week the samples were thawed and evaluated by the system CASA (Computer Assisted Sperm Analysis). After thawing, the total sperm motility assessed by the system CASA was preserved in the control group and in the treatment group at a concentration of 5%. The curvilinear speed (LCV) and mean trajectory speed (VAP) of sperm were higher in the control group compared to the others. Thus, it is concluded that bromelain does not present genotoxicity to goat sperm, as well as its use is satisfactory in terms of the quality of seminal parameters after thawing.

Key words: Goat Breeding, sperm, motility.

INTRODUÇÃO

As biotécnicas aplicadas à reprodução animal como inseminação artificial, transferência e produção *in vitro* de embriões, indução e sincronização de estro e criopreservação de gametas vêm sendo cada vez mais utilizadas como prática zootécnica no manejo reprodutivo de caprinos. No entanto, algumas biotécnicas ainda não alcançaram o seu total aperfeiçoamento técnico dentro da reprodução caprina, como a criopreservação de sêmen. Os grandes entraves encontrados referem-se ao menor potencial fecundante do sêmen após a descongelação, maiores custos com materiais, inseminação no momento mais próximo da ovulação e técnicas utilizadas durante inseminação artificial (MILLER, 2008).

O desenvolvimento de técnicas adequadas para preservação e armazenamento de sêmen possibilita o melhor aproveitamento de animais com alto valor zootécnico, diminui gastos e riscos com transporte de animais e permite a conservação de material genético por tempo indeterminado (NASCIMENTO *et al.*, 2015).

Os espermatozoides possuem a capacidade inerente de produzir espécies reativas ao oxigênio (ROS), responsáveis por alterações espermáticas indispensáveis ao processo de fertilização. Entretanto, a produção excessiva de ROS determina estresse oxidativo que prejudica a sobrevivência e a manutenção da capacidade fertilizante desses gametas. Alguns procedimentos utilizados em laboratório para a congelação aumentam a produção de ROS.

Visando reduzir danos oxidativos causados pela elevada concentração de ROS, alguns pesquisadores têm adicionado substâncias antioxidantes em amostras de sêmen de várias espécies (SILVA *et al.*, 2008).

Segundo Miranda (2014), a bromelina é um complexo enzimático constituído, principalmente, por proteases e obtido a partir dos tecidos vegetais de abacaxizeiro, bem como de outros representantes da família Bromeliácea. Tem seu aproveitamento ligado a inúmeras aplicações, especialmente terapêuticas, que são atribuídas tanto à sua atividade proteolítica, como a de outros componentes do extrato.

Sua gama de aplicações abrange a indústria de alimentos, no amaciamento de carne, clarificação de bebidas, produção de hidrolisados de proteína, indústria têxtil, couro, cosméticos e, especialmente, a indústria farmacêutica, tendo inúmeras atividades terapêuticas relatadas (BALA *et al.*, 2012). Suas ações biológicas descritas são: fibrinolítica, anti-inflamatória, antioxidante, anticoagulante, imunomoduladora, desbridante de ferimentos e queimaduras, antiedematosa, antineoplásica, bem como aumento da absorção de antibióticos, dentre outros (BROMELAIN, 2010). Diante do exposto, objetivou-se avaliar o efeito da bromelina sobre a qualidade espermática caprina pós descongelação.

MATERIAL E MÉTODOS

Área de Estudo

O experimento foi realizado no setor de Reprodução Animal do Hospital Veterinário Universitário, Centro de Ciências Agrárias (CCA) da Universidade Federal do Piauí, Campus Ministro Petrônio Portela, cidade de Teresina, Estado do Piauí, Brasil, situada à 5°03'23.1" de latitude Sul e 42°47'27.9" de longitude Oeste, com altitude média de 72,7 metros, sendo realizados nesse setor as análises subjetivas do sêmen (turbilhonamento, motilidade, vigor, morfologia, espermática e concentração espermática). A pesquisa foi aprovada pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UESPI) da Universidade Estadual do Piauí (UFPI), sob o protocolo de N° 0206/2018.

A análise computadorizada do sêmen por meio do sistema CASA foi realizada no Laboratório de Tecnologia do Sêmen Caprino e Ovino (LTSCO), inserido no Núcleo Integrado de Biotecnologia (NIB) da Universidade Estadual do Ceará (UECE), Fortaleza, Brasil, com latitude de 3°43'47" sul e longitude de 38°30'37" oeste e altitude de 16 metros acima do nível do mar (IBGE/IPECE, 2019).

Doadores e coleta de sêmen

Foram utilizados cinco caprinos adultos da raça Anglo Nubiana (P.O), todos em idade média reprodutivas (5 anos), clinicamente saudáveis e com escore de condição corporal de 3,5 em uma escala de 0 a 5.

Antes do início do experimento os bodes foram submetidos ao exame clínico/reprodutivo de modo a verificar a higidez geral, bem como dos órgãos reprodutivos, conforme estabelecido pelo Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA, 2013). Os bodes foram manejados de forma intensiva, em baia coletiva, e a fêmea em baia individual, todos com fornecimento diário de capim elefante (*Penisetum purpureum*) picado (volumoso),

concentrado proteico comercial contendo 16% PB (400g/animal/dia), sal mineral específico para caprinos e água ad libitum.

A colheita do sêmen foi realizada com o auxílio de uma vagina artificial específica para pequenos ruminantes, pré-aquecida a uma temperatura média de 39 °C e acoplada a um tubo coletor graduado, o sêmen foi colocado em banho-maria à temperatura de 37 °C e mantido nessa temperatura durante todo o processo de análise do sêmen. Os parâmetros avaliados foram relacionados ao volume (tubo graduado), aspecto, cor, turbilhonamento (0-5), motilidade (0 a 100%), concentração espermática e morfologia espermática.

Para avaliação microscópica (análise subjetiva), uma alíquota de 5µL de sêmen fresco foi colocada entre uma lâmina e uma lamínula, previamente aquecidas em placa aquecedora a 37 °C, para avaliação em microscópio óptico (aumento de 100 e 400x) da motilidade espermática progressiva, expressa em percentagem (0 a 100%), e do vigor espermático (0 a 5), numa escala de 0 (imobilidade) a 5 (rápida mobilidade), de acordo com a metodologia empregada e recomendada pelo manual do Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (2013). Para o cálculo da concentração espermática, foi utilizada câmara de Neubauer, com sêmen diluído na proporção de 5µL para 2mL (1:400) de solução de formol-salina tamponada. Após procedida a concentração espermática, por contagem em câmara de Neubauer, foi calculado o número de doses (100 milhões de espermatozoides/dose) e realizado o ajuste do volume final do diluente a ser adicionado.

Após as análises foi realizado um pool dos ejaculados e logo em seguida foi centrifugado a 2.500g, durante 10 minutos para remoção do plasma seminal e substituição por igual volume de PBS.

Grupo controle e tratamento (enriquecido com bromelina)

Utilizou-se 15 pools que foram divididos em três alíquotas iguais em tubos tipo falcon (15mL). Posteriormente foram definidos os tratamentos experimentais: grupo controle (ACP® - 101/102c - 2,5% gema de ovo, 7% Glicerol 40mg Gentamicina); grupos experimentais: Bromelina 5% (ACP® - 101/102c, 2,5% gema de ovo, 7% Glicerol, 40mg Gentamicina, 5% Bromelina - 5mg/mL) e Bromelina 10% (ACP® - 101/102c, 2,5% gema de ovo, 7% Glicerol, 40mg Gentamicina, 10% Bromelina - 10mg/mL).

Análise do sêmen pós-descongelção

As análises do sêmen pós-descongelção foram por meio do sistema CASA (Computer-Assisted Sperm Analyses), utilizando Software Sperm Class Analyser® (SCA) (Microptics, SL, versão 3.2.0, Barcelona, Espanha). Para proceder as análises uma amostra de 10µL de sêmen descongelado foi diluída em 50µL de meio ACP-101c/102c® (3,25g; 50mL de água destilada). Em seguida 10µL dessas diluições foram inseridas na câmara de Makler previamente aquecida a 37 °C e avaliado com auxílio de microscópio de contraste de fase acoplado a uma vídeo-câmera adaptada ao sistema (Nikon™ H5505, Eclipse 50i, Japão).

Foram utilizados os parâmetros do programa: velocidade limite para espermatozoides lentos: 30µm/s; limite para velocidade média: 60µm/s; retilinearidade mínima para espermatozoides progressivos: 80%, capturados em três campos. Os parâmetros avaliados incluíram: motilidade total (MT-%), motilidade progressiva (MP), velocidade curvilínea (VCL-µm/s), velocidade em linha reta (VSL-µm/s), velocidade média do percurso (VAP-µm/s),

linearidade (LIN-%), deslocamento lateral de cabeça (ALH- μ m), índice de oscilação ou wobble (WOB-%) e frequência de batimento cruzado (BCF-Hz), retilinearidade (STR-%) individual para cada célula espermática.

Análise Estatística

Os dados foram descritos em média e desvio padrão. Os dados foram analisados pela ANOVA e as médias comparadas teste PLSD de Fisher. Somente o vigor foi avaliado pelo teste de Kruskal Wallis. As diferenças foram consideradas significativas ao nível de 5% ($p < 0,05$).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste estudo, pode-se observar uma redução significativa ($p < 0,05$) da motilidade e vigor nos grupos experimentais em comparação ao grupo controle. Dentre os grupos experimentais, o uso de 5% de bromelina proporcionou melhor motilidade espermática após a diluição, não sendo observada diferença entre as demais.

Após a descongelação, a motilidade espermática total avaliada pelo sistema CASA foi preservada pelo grupo controle e no grupo utilizando a concentração de 5%. A velocidade curvilínea (VCL) e velocidade média da trajetória (VAP) dos espermatozoides foram maiores no grupo controle em comparação aos demais. A velocidade linear progressiva (VSL) foi significativamente maior ($p < 0,05$) no grupo controle em comparação aos grupos experimentais.

Verificou-se que a linearidade (LIN) foi maior no grupo controle quando comparado aos grupos contendo 5% e 10% de bromelina. Contudo, não foi observado diferença significativa ($p > 0,05$) entre as diferentes concentrações deste componente no meio diluente sobre este parâmetro espermático.

A retilinearidade (STR) e WOB também foram significativamente superiores ($p < 0,05$) no grupo controle em comparação ao uso de 10% de bromelina. Assim como em outros parâmetros, não foi verificada influência da concentração da bromelina da conservação destes parâmetros da cinética espermática.

A análise seminal computadorizada (CASA) contribuiu de forma expressiva para determinação de nossos resultados, pois de acordo com Oliveira *et al.* (2013) esse sistema fornece diversas informações sobre as características da motilidade dos espermatozoides.

Os resultados da presente pesquisa sugerem que quanto maior a concentração de bromelina menor é a qualidade seminal pós descongelamento. Essa hipótese pode ser atribuída ao poder proteolítico da bromelina, uma vez que trata-se de uma enzima proteolítica que pode gerar um efeito maléfico aos espermatozoides quando administrada em maiores concentrações aos diluidores seminais (SAYALI *et al.*, 2013).

De acordo com Sayali *et al.* (2013) essas enzimas funcionam como catalizadores biológicos, que são responsáveis por realizar catalização de reações em organismos vivos. Dessa forma, por se tratar de uma enzima catalizadora as suas principais funções é acelerar o metabolismo da célula, nesse caso podendo gerar um efeito indesejado aos espermatozoides, uma vez que o consumo de energia será grande no início, fazendo com que as reservas de ATP se esgotem rapidamente, levando assim a uma diminuição no seu poder de fertilização, sendo esse efeito observado na análise do sêmen do nosso trabalho.

CONCLUSÕES

Concluiu-se que o uso da bromelina adicionada ao diluente/crioprotetor do sêmen caprino mostrou-se satisfatório nos parâmetros seminais pós descongelação na concentração contendo 5%.

REFERÊNCIAS

BALA, M. Bromelain production: current trends and perspective. *Archives des Sciences*, v.65, p.369-399, 2012.

BROMELAIN. Monograph. *Alternative Medicine Review*, v.15, p.361-368, 2010.

COLÉGIO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL (CBRA). Manual para Exame Andrológico e Avaliação de Sêmen Animal, 3ª Ed., Belo Horizonte, 2013. 104p.

MILLER C.D. Optimizing the use of frozen-thawed equine semen. *Theriogenology*, v.70, p.463-468, 2008.

MIRANDA, Í.K. Obtenção, caracterização e atividade antitumoral in vitro de bromelina de diferentes partes de abacaxizeiros. Dissertação (Mestrado Acadêmico em Recursos Genéticos Vegetais) - Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana, 2014.

NASCIMENTO, J.N.; BLUME, H.; OLIVEIRA, F.J.G.; OLIVEIRA, R.A. Utilização de diferentes diluentes na criopreservação de espermatozoides de garanhões mangalarga marchador. *Ciência Animal Brasileira*, v.16, n.3, p.324-330, 2015.

SAYALI, K.; SADICHHA, P.; SUREKHA, S. Microbial esterases: an overview. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, v.2, p.135-146, 2013.

SILVA, K.M.G.; GAMBOA, S.C.; RODRIGUES, A.S; RAMALHO, J.S.; PESSOA GUERRA, M.M. Adição de piruvato de sódio e trolox ao diluidor utilizado para congelamento de sêmen de garanhões férteis e subférteis. *Ciência Rural*, v.38, p.2271-2277, 2008.