

## SUPLEMENTAÇÃO DO ÁCIDO OLEICO NO DILUENTE SEMINAL SOBRE O POTENCIAL MITOCONDRIAL DE ESPERMATOZOIDES CAPRINOS CRIOPRESERVADOS

*(Supplementation of oleic acid to the seminal diluter on the mitochondrial potential of cryopreserved caprine sperm)*

Filipe Nunes BARROS<sup>1\*</sup>; Marlon de Araújo CASTELO BRANCO<sup>2</sup>; Misael das Virgens SANTANA<sup>1</sup>; Wallisson Bruno de Moraes PACHECO<sup>1</sup>; Jefferson Hallisson Lustosa da SILVA<sup>1</sup>; Isôlda Márcia Rocha do NASCIMENTO<sup>3</sup>; José Adalmir Torres de SOUZA<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Universidade Federal do Piauí (UFPI), Campus Universitário Ministro Petrônio Portella, Bairro Ininga, Teresina/PI. CEP: 64049-550; <sup>2</sup>Profissional Autônomo; <sup>3</sup>Colégio Técnico de Teresina;

<sup>4</sup>Universidade Federal do Piauí. \*Email: [filipenbarros@hotmail.com](mailto:filipenbarros@hotmail.com)

### ABSTRACT

The research aimed to evaluate the antioxidant effect of supplementation of 0.5µM, 5µM and 50µM of oleic acid to the TRIS-yolk extender on the mitochondrial potential (MIT) during the cryopreservation of goat sperm. For that, four Anglo-nubian goats were used, in which five samples / animal were collected, using artificial vagina. After evaluating the swirling and motility of the ejaculates, the pool was made, then diluted in TRIS-Gem and divided according to the treatments. After processing, the samples were packaged in 0.25mL straws and cryopreserved using the TK 3000<sup>®</sup> machine. After a minimum of 5 days of storage in a cryogenic cylinder, thawing was performed to assess the MIT of goat sperm after cryopreservation, using the lipophilic cationic fluorochrome JC-1. The data were submitted to analysis of variance (ANOVA), using the general linear models procedure (Proc GLM), and the Duncan test was used to compare the averages, with a 5% probability. The analyzes were performed using the Statistical Analysis System program (SAS Institute Inc, 2013). Thus, it was observed that the concentrations of 0.5µM and 5µM of oleic acid maintained the mitochondrial potential similar to the control, differing ( $p < 0.05$ ) only the concentration of 50µM. It can be concluded that 0.5µM and 5µM oleic acid are able to maintain the mitochondrial potential, prolonging the viability of cryopreserved goat sperm.

**Keywords:** Antioxidants, mitochondrial potential, cryopreservation.

### INTRODUÇÃO

A produção e o consumo de produtos oriundos da caprinocultura têm aumentado nos últimos anos, seja devido ao crescimento populacional, ou devido a organização destes setores produtivos (NÓBREGA, 2016). Isso, vem incentivando inúmeros pesquisadores a desenvolver ou melhorar as condições de criação e as técnicas de produção.

Com isso, a criopreservação seminal notabilizou-se devido seus benefícios, como armazenamento do sêmen por um longo período de tempo, ampliação da capacidade reprodutiva do macho e redução de custos com reprodutores. No entanto, a manipulação espermática gera danos à estrutura do espermatozoide, motivados pelo acúmulo de metabólitos, como as espécies reativas ao oxigênio (ROS), levando ao estresse oxidativo, e consequentemente, prejudicando a suas funções biológicas, como motilidade e capacidade respiratória (SANTOS *et al.*, 2015).

Relacionada a estas funções, estão as mitocôndrias, organelas subcelulares que carregam genes codificadores de subunidades centrais da cadeia de transporte de elétrons respiratórios, que são responsáveis por gerar ATP por meio da fosforilação oxidativa (MITCHELL, 1961), na qual, também tem sua função afetada pelo estresse oxidativo.

Logo, faz-se necessária a adição de substâncias que possam melhorar as defesas antioxidantes dos sistemas biológicos, combatendo a alta produção das ROS. Neste intuito, pesquisas demonstraram que o ácido oleico apresenta potencial antioxidante. Sendo assim, o objetivo dessa pesquisa foi avaliar o efeito antioxidante da suplementação de diferentes concentrações do ácido oleico ao diluente TRIS-gema sobre o potencial mitocondrial (MIT) durante a criopreservação de espermatozoides caprinos.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Animais, coleta e avaliação inicial

O procedimento, de coleta seminal, foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal do Piauí (UFPI), registrado com o número 643/2020. Foram utilizados quatro caprinos da raça Anglo-nubiana, provenientes de uma propriedade localizada no município de Brasileira – Piauí. Os animais possuíam um histórico de fertilidade satisfatório, sendo feita também uma prévia avaliação quanto à saúde geral, à integridade dos órgãos reprodutivos e quanto à qualidade espermática, sendo mantidos em regime semiextensivo. Então, foi realizada uma coleta de sêmen por semana, durante cinco semanas, totalizando 5 ejaculados/animal, pelo método da vagina artificial. Os ejaculados foram avaliados individualmente, quanto a cor, aspecto, volume (mL), e aos demais parâmetros conforme recomendações do Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA, 2013). Após essa etapa, as amostras viáveis dos quatro ejaculados foram misturadas para formação de um “*pool*” (com objetivo de eliminar a variabilidade individual entre as amostras) por coleta.

### Diluição e criopreservação seminal

Posteriormente, foi adicionado o meio diluente TRIS-gema para finalmente suplementar as amostras com diferentes concentrações de Ácido oleico (Ácido oleico, grau reagente ~ 99%, Sigma-Aldrich®). As amostras foram divididas nos seguintes tratamentos: Controle (Tris-Gema sem adição de ácido oleico); Tris-Gema + 0,5µM de ácido oleico; Tris-Gema + 5µM de ácido oleico e Tris-Gema + 50µM de ácido oleico. Após diluição e fracionamento, as amostras de sêmen foram envasadas em palhetas de 0,25mL, à temperatura ambiente, para uma concentração final de  $20 \times 10^6$  espermatozoides viáveis / palheta, e então foram congeladas em máquina TK 3000®, utilizando curva rápida de congelamento, e armazenadas. Após, no mínimo, 5 dias de armazenamento, as amostras foram descongeladas para avaliação da integridade da membrana plasmática, conforme descrito a diante.

### Análise do potencial de membrana mitocondrial

Realizou-se a análise do potencial de membrana mitocondrial com utilização do fluorocromo catiônico lipofílico JC-1 (GUTHRIE e WELCH, 2006). Alíquotas de 50µL de sêmen pós-descongelado foram diluídas em 150µL de Tris contendo 5µL de JC-1 (0,15mM em DMSO) e incubadas por 10 minutos a 38 °C. Então 200 espermatozoides foram avaliados em microscópio de epifluorescência, com aumento de 1000x, sob óleo de imersão, utilizando o filtro de emissão LP 515nm e BP 450-490nm para excitação. Os espermatozoides corados em laranja foram classificados com alto potencial de membrana mitocondrial, e aqueles corados em verde foram classificados com baixo potencial de membrana.

### Análise Estatística

Para análise estatística dos dados, foram obtidas as médias e desvios-padrão da variável pesquisada e foram submetidos a análise de variância (ANOVA), utilizando-se o procedimento modelos lineares gerais (Proc GLM). Para comparação das médias foi utilizado o teste de Duncan, na probabilidade de 5%. As análises foram executadas através do programa *Statistical Analysis System* (SAS Institute Inc, 2013).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

A avaliação do potencial mitocondrial (MIT) dos espermatozoides caprinos após suplementação (Tab. 01) mostrou que a concentração de 50 $\mu$ M de ácido oleico diferiu ( $p<0,05$ ) dos demais tratamentos, apresentando valores inferiores.

**Tabela 01:** Avaliação do potencial mitocondrial (MIT) dos espermatozoides caprinos criopreservados após suplementação de diferentes concentrações de ácido oleico no diluente.

Tratamentos	MIT (%)
Controle	44,0 $\pm$ 8,45 <sup>a</sup>
0,5 $\mu$ M de ácido oleico	38,6 $\pm$ 9,07 <sup>a</sup>
5 $\mu$ M de ácido oleico	38,4 $\pm$ 20,50 <sup>a</sup>
50 $\mu$ M de ácido oleico	27,4 $\pm$ 14,08 <sup>b</sup>

Os valores são expressos como média $\pm$ desvio padrão. Valores de média com letras sobrescritas diferentes na mesma coluna indicam diferenças significativas ( $p<0,05$ ) pelo teste de DUNCAN.

Sabe-se, que grande parte do ATP necessário ao metabolismo total do espermatozoide vem das mitocôndrias. Então, avaliar a função mitocondrial espermática através das sondas fluorescentes permite observar quais células possuem respiração ativa. Assim, quanto mais ativa a respiração mitocondrial, mais corante é transportado e acumulado nesta organela (GRAHAM e MOCÉ, 2005).

Nesta pesquisa, observou-se que a concentração de 50 $\mu$ M de ácido oleico diferiu ( $p<0,05$ ) dos demais tratamentos, diminuindo o MIT dos espermatozoides caprinos pós criopreservação. Possivelmente, isto ocorreu devido ao aumento na produção das ROS, acarretando um desequilíbrio entre os antioxidantes e oxidantes. Provocando, assim, danos que podem induzir as alterações na integridade da membrana mitocondrial, ocorrendo a depleção do ATP intracelular e insuficiente fosforilação da proteína do axonema (CASTELO BRANCO, 2018).

Como observado nesta pesquisa, SAMPAIO *et al.* (2015), verificaram que concentrações de 37 $\mu$ M e 74 $\mu$ M de ácido oleico-linoleico não alteraram os níveis da atividade mitocondrial e peroxidação lipídica durante a criopreservação de espermatozoides bovinos e equinos, sendo ineficazes na preservação da integridade estrutural das membranas e no aumento da resistência à criopreservação.

## CONCLUSÕES

A suplementação ao diluente com 0,5 $\mu$ M e 5 $\mu$ M de ácido oleico mantiveram os percentuais do potencial mitocondrial dos espermatozoides durante o processo de criopreservação do sêmen caprino. Levando em consideração que o sêmen da espécie caprina apresenta inúmeras particularidades, e que existem poucas pesquisas envolvendo o ácido em questão nesta espécie, um maior aprofundamento destas pesquisas seria benéfico no intuito de reduzir o estresse oxidativo e melhorar a viabilidade de espermatozoides caprinos pós-descongelamento.

## REFERÊNCIAS

- CASTELO BRANCO, Y.N.T.C. Efeito da suplementação dos ácidos oleico e palmítico e do eugenol na criopreservação de sêmen bovino. 2018. 110p. (Tese de Doutorado). Universidade Federal do Piauí, Teresina, Piauí, 2018.
- CBRA. Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal. 2<sup>a</sup> ed., Colégio Brasileiro de Reprodução Animal, Belo Horizonte, Minas Gerais, 2013. 114p.
- GRAHAM, J.K.; MOCÉ, E. Fertility evaluation of frozen/thawed semen. *Theriogenology*, v.64, p.492-504, 2005.
- GUTHRIE, H.D.; WELCH, G.R. Determination of intracellular reactive oxygen species and high mitochondrial membrane potential in Percoll-treated viable boar sperm using fluorescence-activated flow cytometry. *Journal of Animal Science*, v.84, p.2089-2100, 2006.
- MITCHELL, P. Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemi-osmotic type of mechanism. *Nature*, v.191, p.144–148, 1961.
- NOBREGA, A. Estudo aponta tendências para caprinocultura e ovinocultura nos cenários nacional e internacional. Disponível em: <https://www.embrapa.br/busca-de-noticias/-/noticia/8698648/estudo-aponta-tendencias-para-caprinocultura-e-ovinocultura-nos-cenarios-nacional-e-internacional> , Embrapa, 2016, acesso:05 de dezembro de 2020.
- SANTOS, V.S.; SANTOS, A.D.F.; OLIVEIRA, D.A.; NASCIMENTO, A.L.C.; SANTOS, E.M. Adição da polpa liofilizada do Noni em diluente para congelamento de sêmen sobre a integridade da membrana plasmática de espermatozoides ovinos. *Scientia Plena*, v.11, n.4, 2015.
- SAMPAIO, B.F.B.; BENDER, E.S.C.; COSTA e SILVA, E.V.; ZÚCCARI, C.E.S.N. Effect of oleic-linoleic acid and  $\beta$ -sitosterol to freezing extender of bulls and stallions sêmen. *Semina: Ciências Agrárias*, v.36, n.3, p.1369-1384, 2015.