

## DILUENTE QUIMICAMENTE DEFINIDO E ANTIOXIDANTES POLIFENOIS NA CRIOPRESERVAÇÃO DE SÊMEN OVINO

*(Chemically defined diluter and polyphenolic antioxidants  
in the cryopreservation of sheep semen)*

Lucas Facundo Moura TOBAL\*, Lúcia Cristina Pereira ARRUDA, Aline Saraiva de  
OLIVEIRA; Gustavo Ferrer CARNEIRO; Maria Madalena Pessoa GUERRA

Laboratório de Andrologia da Universidade Federal de Pernambuco. Rua Dom Manuel  
de Medeiros, s/n, CEP: 52.171-900, Recife/PE. \*E-mail: [facundotbl@gmail.com](mailto:facundotbl@gmail.com)

### ABSTRACT

The objective of this study was to elaborate chemically defined extender based on casein, added with polyphenolic antioxidants, for the freezing of semen from ram breeders. To evaluate Tris-casein (5% glycerol), plus polyphenols, four semen pools from three rams sires were frozen (0 $\mu$ M; 10 $\mu$ M resveratrol; 5 $\mu$ M quercetin; 25 $\mu$ M catechin; 25 $\mu$ M catechin + 10 $\mu$ M resveratrol; 25 $\mu$ M catechin + 5 $\mu$ M quercetin; 10  $\mu$ M resveratrol + 5 $\mu$ M quercetin; 25 $\mu$ M catechin + 10 $\mu$ M resveratrol + 5 $\mu$ M quercetin). After thawing, the samples were evaluated for sperm kinetics, plasma and acrosomal membrane integrity and mitochondrial membrane potential. There was no significant difference ( $p \geq 0.05$ ) between the control group and the treatments for any of the evaluated parameters. However, it can be seen that the Tris-casein extender was efficient in cryopreserving ram semen. It is concluded that the Tris-casein extender can be used for freezing ram semen.

**Key words:** casein, resveratrol, quercetin, catechin

### INTRODUÇÃO

A criopreservação de sêmen é uma biotecnologia que apresenta grande potencial para produção de animais geneticamente superiores (WATSON, 2000), fornecendo subsídios para o crescimento efetivo da ovinocultura na região Nordeste brasileira (CARNEIRO, 2008). Apesar de ser uma importante ferramenta, são necessárias melhorias nos protocolos de criopreservação e na produção de diluentes mais eficientes, que permita maior proteção às células espermáticas durante o processamento (STORNELLI *et al.*, 2005). É importante ressaltar a necessidade de diluentes livres de produtos de origem animal, uma vez que estes diferem em composição e entre partidas, assim como apresentam riscos biológicos de contaminação bacteriana e disseminação de patógenos (HAFEZ e HAFEZ, 2004).

Além disso, danos provocados pelo estresse oxidativo durante a congelamento do sêmen precisam ser minimizados (GUERRA, 2004). Para tanto, lança-se mão das terapias antioxidantes, onde diversos constituintes estão disponíveis, como os flavonóides (quercetina e catequina) e o não-flavonóide (resveratrol) (SILVA, 2012). Estes compostos polifenólicos são utilizados visando a manutenção da qualidade e da capacidade fertilizante dos espermatozoides, após a descongelamento. Diante do exposto, o presente estudo teve por objetivo produzir um diluente para congelamento de sêmen ovino, à base de caseína e acrescido de substâncias antioxidantes.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Local do experimento, coleta, avaliação e congelação do sêmen

Todos os procedimentos experimentais foram aprovados pelo Comitê de ética no uso de animais (CEUA) da Universidade Federal Rural de Pernambuco (n° 051/2019 CEUA / UFRPE). Foram utilizados 3 ovinos da raça Dorper, sendo coletados 4 ejaculados por reprodutor. Após coleta, os ejaculados foram avaliados macro e microscópicamente. Em seguida, os ejaculados que apresentaram motilidade  $\geq 70\%$  foram aprovados, formados *pools* (n=4), e determinada a concentração espermática, em câmara de Neubauer.

Para congelação, o *pool* de sêmen foi diluído em Tris-caseína (375mM de Tris, 124mM de ácido cítrico, 41,6mM de frutose, 0,25% de caseína, 5% de glicerol, 100 UI de penicilina e 50mg de estreptomicina, com pH 6,8), acrescido de antioxidantes: 0 $\mu$ M; 10 $\mu$ M resveratrol; 5 $\mu$ M quercetina; 25 $\mu$ M catequina; 25 $\mu$ M catequina + 10 $\mu$ M resveratrol; 25 $\mu$ M catequina + 5 $\mu$ M quercetina; 10 $\mu$ M resveratrol + 5 $\mu$ M quercetina; 25 $\mu$ M catequina + 10 $\mu$ M resveratrol + 5 $\mu$ M quercetina, na concentração final de 200 x10<sup>6</sup> spz/mL. As amostras foram congeladas em sistema automatizado (TK 3000<sup>®</sup> - TK Tecnologia em Congelamento Ltda., Brasil) e estocadas em nitrogênio líquido (- 196 °C).

### Cinética espermática, integridade e potencial de membrana

Amostras de sêmen foram descongeladas (37 °C/30s.) e incubadas em banho-maria (37 °C/10min). A seguir, a amostra foi avaliada em microscópio de contraste de fase (Eclipse 50i; Nikon, Japão; 100x), onde os parâmetros cinéticos foram avaliados utilizando o software SCA<sup>™</sup>, versão 5.1 (Microoptics, S.L., Barcelona, Espanha).

As análises de citometria de fluxo foram realizadas de acordo com metodologia descrita por Arruda *et al.* (2018), com modificações. Para avaliação da integridade de membrana plasmática e acrossomal (iMPA), adicionaram-se à amostra FITC-PNA e Iodeto de Propídio. Para análise do PMM, utilizou-se o fluorocromo catiônico lipofílico JC-1. As avaliações foram realizadas utilizando-se aparelho ImageStream<sup>®</sup>X, versão Mark II (Amnis, Seattle, WA, EUA). As aquisições dos dados foram realizadas usando-se o software INSPIRE<sup>®</sup>, versão 200.1.388.0 (Amnis, Seattle, WA, EUA).

### Análise Estatística

As análises estatísticas foram realizadas no GraphPad InStat (versão 3.10, 2009). Os dados foram testados quanto à normalidade e homogeneidade de variância, pelo método Kolmogorov-Smirnov. Posteriormente, os dados de cada grupo experimental foram submetidos à análise de variância (ANOVA), para determinar os efeitos dos tratamentos, considerando a significância de 5% (p<0,05). Os resultados foram expressos em média $\pm$ desvio padrão.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nas análises de cinética, integridade de membranas plasmática e acrossomal, e potencial de membrana mitocondrial dos espermatozoides, não houve diferença significativa (Tab. 01; p<0,05) entre o grupo controle e os tratados com antioxidantes polifenóis.

**Tabela 01:** Parâmetros cinéticos (CASA) e avaliação por citometria de fluxo da integridade de membrana plasmática e acrossomal e potencial de membrana mitocondrial de espermatozoides ovinos, após congelamento.

	CON	R	Q	C	C+R	C+Q	R+Q	C+R+Q
<b>MT</b>	31.7±3.9	27.1±6.0	34.4±10.8	25.8±10.5	24.2± 7.7	22.6±8.6	31.1±5.8	30.2±4.8
<b>MP</b>	12.0± 1.3	11.0±3.6	14.8± 1.1	12.7±5.5	9.8± 4.4	9.5± 5.0	16.0±7.0	13.8± 5.2
<b>RAP</b>	17.3±3.5	15.1±5.9	18.5± 4.3	15.1± 5.3	11.2±5.5	12.5± 7.5	17.9 ± 6.0	15.9± 3.8
<b>LIN</b>	53.4±4.6	55.8±5.4	57.3± 5.8	58.5±4.2	56.7± 5.4	55.6 ± 6.2	58.2±7.0	52.6±7.6
<b>STR</b>	71.8±6.9	73.9±2.6	74.8±3.9	76.1± 3.3	75.0± 4.6	71.7±1.9	76.7±5.6	70.1± 6.8
<b>WOB</b>	74.5±1.5	75.5± 5.3	76.4± 4.5	76.8±3.1	75.5±4.8	77.4± 7.0	75.8± 6.5	74.7±4.3
<b>VCL</b>	110.0±7.9	108.6±15.1	107.7±8.7	111.4 ±5.6	96.6±6.9	103.9±14.9	109.1 ±11.3	108.6 ±1.9
<b>VSL</b>	58.5±1.0	61.2±14.2	61.6±5.4	65.2± 6.1	55.0± 8.6	58.2±13.6	63.7±11.8	57.1± 8.0
<b>VAP</b>	81.9±6.6	82.6±17.0	82.1± 4.0	82.2±3.5	73.1± 9.8	81.1±18.0	82.8±12.3	81.1± 4.6
<b>ALH</b>	3.4± 0.1	3.2±0.2	3.1± 0.1	3.0 ± 0.1	3.1± 0.3	3.1 ± 0.6	3.1±0.5	3.0±0.3
<b>BCF</b>	10.9±1.0	11.2±0.5	11.0±0.8	11.± 0.8	11.3± 1.3	10.2± 0.8	10.8± 1.3	10.6± 1.3
<b>PMM</b>	21.5±3.6	15.0± 4.9	7.7±4.5	26.9±20.9	8.7±4.9	8.2±5.7	23.1±12.4	10.8± 5.5
<b>PNA-/IP-</b>	17.1±5.0	17.7± 4.0	15.8± 4.2	17.6± 4.4	19.3±1.8	12.3± 2.2	19.0± 2.5	17.2± 6.5

MT: Motil total (%); MP; Motil progressiva (%); RAP: Rápidos (%); LIN: Linearidade (%); STR: Retilinearidade (%); WOB: Índice oscilação; VCL: Veloc. Curvilínea ( $\mu\text{m/s}$ ); VSL: Veloc. linha reta ( $\mu\text{m/s}$ ); VAP: Veloc. média trajetória ( $\mu\text{m/s}$ ); ALH: Deslocamento lateral cabeça ( $\mu\text{m}$ ); BCF: Frequência batimento cruzado (Hz); PMM: Potencial memb. Mitocond. (%); PNA-/IP: Memb. Plasm. e across. intactas (%). CON=Controle. Tris-caseína (5% glicerol) + Resveratrol (R), Quercetina (Q), Catequina (C) e associações.

Uma vez que a ação desses compostos fenólicos depende da sua estrutura, dose e método de administração (LIMA *et al.*, 2001), as concentrações utilizadas podem não ter sido suficientes para provocar mudanças na cinética espermática, após a descongelamento. Esses resultados corroboram com os de Silva *et al.* (2012), ao demonstrarem que não houve efeito da adição de quercetina e resveratrol ao diluente de congelamento, sobre a cinética dos espermatozoides de ovinos. Entretanto, Chunrong *et al.* (2019) observaram que altas concentrações (100 e 250 $\mu\text{M}$ ) de resveratrol reduziram a motilidade total de espermatozoides caprinos congelados-descongelados. Por outro lado, baixas concentrações (10 e 50 $\mu\text{M}$ ) de resveratrol favoreceram a motilidade total e progressiva. Com isso, observa-se que o uso de polifenóis como uma terapia antioxidante, durante a criopreservação de espermatozoides, tem mostrado resultados muito variados.

Quanto à ausência de ação benéfica da catequina neste estudo, pode ter ocorrido devido à interferência de inúmeros fatores, dentre os quais o pH e a composição do meio (CHOBOT *et al.*, 2009). Com relação ao pH, as catequinas são estáveis em pH ácido (pH<4) e perdem sua estabilidade à medida que o pH aumenta, tornando-se instável em pH alcalino (pH>8), onde são degradadas (CHOBOT *et al.*, 2009). Uma vez que o diluente utilizado nesse estudo apresentava pH 6.8, a molécula de catequina pode ter se tornado instável e ter sido degradada, não resultando em nenhum benefício para as células.

No entanto, o diluidor quimicamente definido, à base de caseína, foi capaz de manter a MT no grupo controle dentro do percentual esperado ( $\geq 30\%$ ) para sêmen congelado-descongelado de ovinos, de acordo com o preconizado pelo CBRA (2013). O uso do diluente à base de caseína pode ser recomendado como uma alternativa que eliminaria problemas relacionados aos diluidores à base de leite ou gema de ovo.

Quanto à integridade das membranas plasmática e acrossomal, e o potencial de membrana mitocondrial, também não foram observadas diferenças entre os grupos

experimentais, o que corrobora com os resultados de Silva *et al.* (2012), quando utilizaram resveratrol (5,10,15, 20µg/mL) no diluente de congelação de sêmen ovino.

Diante do exposto, conclui-se que o diluidor Tris-caseína pode ser utilizado para congelação de sêmen ovino. No entanto, a adição de antioxidantes polifenóis não melhoram os parâmetros espermáticos, pós-descongelação.

### CONCLUSÕES

Diante do exposto, conclui-se que o diluidor Tris-caseína pode ser utilizado para congelação de sêmen ovino. No entanto, a adição de antioxidantes polifenóis não melhoram os parâmetros espermáticos, pós-descongelação

### REFERÊNCIAS

- ARRUDA, L.C.P.; ARAÚJO SILVA, R.A.J.; MONTEIRO, M.M.; SILVA, R.P.F.; OLIVEIRA, A.S.; MERGULHÃO, F.C.C.; MONTEIRO JR, P.L.J.; BATISTA, A.M.; GUERRA, M.M.P. In vitro evaluation of ram sperm frozen with extender supplemented with myricetin. Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia, v.70, n.1, p.153-159, 2018.
- CBRA. Manual para exame andrológico e avaliação do sêmen animal. 2ª ed., Colégio Brasileiro de Reprodução Animal, 2013. 114p.
- CHOBOT, V.; HUBER, C.; TRETTEHNAHN, G.; HADACEK, F. Catechin: Chemical weapon, antioxidant, or stress regulator? Journal of Chemical Ecology, v.35, p.980-996, 2009.
- CHUNRONG, L.V.; LARBI, A.; WU, G.; HONG, Q.; QUAN, G. Improving the quality of cryopreserved goat semen with a commercial bull extender supplemented with resveratrol. Animal Reproduction Science, v.208, p.106-127, 2019.
- LIMA, L.R.P.; OLIVEIRA, T.T.; NAGEM, T.J.; PINTO, A.S.; STRINGHETA, P.C.; TINOCO, A.L.A.; SILVA, J.F. Bixina, Norbixina e Quercetina e seus efeitos no metabolismo lipídico de coelhos. Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science, v.38, n.4, p.196-200, 2001.
- SILVA, E.C.B.; CAJUEIRO, J.F.P.; SILVA, S.V.; SOARES, P.C.; GUERRA, M.M.P. Effect of antioxidants resveratrol and quercetin on in vitro evaluation of frozen ram sperm. Theriogenology, v.77, p.1722-1726, 2012.