

**TÉCNICA DO COMETA PARA AVALIAÇÃO DA INTEGRIDADE
DO DNA DE ESPERMATOZOIDES CAPRINOS
CRIOPRESERVADOS EM ACP-101/102®**

*(Comet technique to assess the DNA integrity of
cryopreserved goat sperm in ACP-101/102®)*

Sara Camila da Silveira COSTA; Laércio Fontinele Bandeira de MACÊDO²; Clarissa de Castro e BRAGA; Letícia Soares de Araújo TEIXEIRA; Kenney de Paiva PORFIRIO; Ana Lys Bezerra Barradas MINEIRO; Ney Rômulo de Oliveira PAULA

Universidade Federal do Piauí (UFPI), Campus Universitário Ministro Petrônio Portella, Ininga, Teresina/PI, CEP: 64.049-550. *E-mail: scscmila@gmail.com

ABSTRACT

Animal reproduction represents one of the most important factors, and the use of reproductive biotechnologies that help increase production is essential. The comet technique is the simple and quick way to detect pre-mutagenic lesions and assist in studies on environmental biomonitoring, toxicological genetics, biological radiation, DNA repair process and genetic ecotoxicology. The objective of this study was to evaluate the viability of DNA from sperm cells from goat semen submitted to the cryopreservation process in powdered coconut water (ACP-101c/102c). The experiment was carried out at the Federal University of Piauí with two goats of reproductive age. The evaluation of the spermatic DNA integrity was performed using an immunofluorescence microscope. Classes from 0 to 3 were used, 0 being no damage and 3, the tail of the comet greater than twice the size of the nucleoid. The results obtained in the G2 test group (ACP 101c-102c) showed a slight tail formation, indicating a slight fragmentation of DNA. It was concluded that in the control group GC1 (TRIS + egg yolk of *Gallus gallus domesticus*) and experimental group (ACP 101c - 102c) there was no significant difference.

Key words: goat, semen, comet test, small ruminants, animal reproduction

INTRODUÇÃO

A espécie caprina pode ser encontrada em todos os continentes, sendo assim, mundialmente seu rebanho se concentra em 1,06 bilhões de cabeças (FAO, 2016). No Brasil, o rebanho cresceu 16,1 % entre 2016 a 2017 segundo o IBGE, chegando a 8,2 milhões de cabeça no país, sendo que a região nordeste detém o maior rebanho do país com 7,6 milhões, representando 92,8%.

A reprodução animal representa um dos fatores de maior importância que afeta diretamente a rentabilidade dos sistemas produtivos. Com isso é imprescindível o uso de biotecnias reprodutivas que auxiliam no aumento da produção. A técnica cometa é a forma simples, rápida e de baixo custo para detectar e avaliar lesões pré-mutagênicas e auxiliar em estudos sobre biomonitoramento ambiental, genética toxicológica, radiação biológica, processo de reparo do DNA e ecotoxicologia genética (ERDTMANN, 2003).

Já a criopreservação, estuda os efeitos de baixas temperaturas em órgãos e tecidos vivos onde são preservados a temperaturas abaixo do ponto de congelamento da água, tendo em vista a preservação da composição e da viabilidade das células por tempo indefinido (PEGG, 2002). O congelamento do sêmen possibilita sua utilização por um período longo e indeterminado (CASTELO *et al.*, 2008).

A água de coco *in natura* ou em pó, atualmente vem demonstrando resultados positivos na manutenção da viabilidade e poder de fecundação dos espermatozoides, podendo ser utilizada em biotécnicas reprodutivas sem grandes custos com diluentes importados, além do mais, diminui os riscos sanitários por ser um produto de origem vegetal (SIMÕES, 2010). Portanto, foi desenvolvido um diluidor comercial, a água de coco em pó (ACP), a qual é produzida pela desidratação da água de coco, ajustes no pH e na osmolaridade para cada espécie (SALGUEIRO *et al.*, 2002).

As células espermáticas, em decorrência dos processos oxidativos oriundos das etapas de criopreservação, podem apresentar alterações. Devido a isso, objetivou-se por meio deste estudo avaliar a viabilidade do DNA de espermatozoides caprinos submetidas ao processo de criopreservação em água de coco em pó (ACP-101c/102c®).

MATERIAL E MÉTODOS

Doadores e coleta de Sêmen

O experimento foi realizado no Setor de Reprodução Animal do Hospital Veterinário Universitário, localizado no Centro de Ciências Agrárias (CCA) da Universidade Federal do Piauí, Campus Ministro Petrônio Portella, cidade de Teresina, Estado do Piauí, Brasil, e também 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. Este estudo foi aprovado pela Comissão de Ética para uso de animais da Universidade Federal do Piauí (UFPI) com o número de protocolo nº 522/2018.

Para a realização deste experimento foram utilizados dois caprinos, sendo eles de aptidão leiteira, um da raça Pardo Alpina e um mestiço de Gurguéia todos em idade reprodutiva com escore de condição corporal 3,5 (escala de 0-5). Antes do início do experimento os bodes foram submetidos ao exame andrológico de modo a verificar a higidez geral, bem como dos órgãos reprodutivos. Para a realização desta pesquisa foi utilizado o seguinte desenho experimental: Formaram dois grupos para avaliar a integridade do DNA espermático: grupo controle (GC1), que corresponde ao sêmen criopreservado em meio diluente padrão TRIS (2,11g de ácido cítrico mono hidratado, 1g de frutose e 100mL de água destilada) + 2,5% de gema de ovo e 7% de glicerol; e grupo (G2), sêmen criopreservado em ACP101/102c® + 2,5% gema + 7% Glicerol.

No total foram colhidos 10 ejaculados de cada reprodutor caprino, totalizando 20 ejaculados. Logo após foram realizadas as análises individuais do sêmen, e formado um pool das amostras seminais, objetivando desprezar uma possível variação individual. Em seguida foi realizada a avaliação dos parâmetros espermáticos do *pool*. No total foram utilizados 10 *pools* de sêmen caprino.

As coletas foram realizadas pelo método de vagina artificial específica para pequenos ruminantes, pré-aquecida a uma temperatura de 39 °C acoplado a um tubo coletor graduado tipo falcon. As coletas foram realizadas com auxílio de um manequim fêmea (sem indução de estro), visto que os animais são condicionados a coleta. Após cada coleta, o ejaculado foi protegido da incidência direta de luz solar, transportado ao laboratório e mantido em banho-maria à temperatura de 37 °C.

Avaliações seminais

Imediatamente foram realizadas as avaliações macroscópicas (volume, cor e aspecto). Posteriormente procedeu-se as avaliações dos parâmetros espermáticos retirando 20µL de sêmen de cada ejaculado. O turbilhonamento foi avaliado colocando-se uma gota de sêmen sobre uma lâmina previamente aquecida a 37 °C observando o movimento em forma de ondas. A interpretação foi expressa numa classificação de zero a cinco, sendo que zero representará a ausência de movimento e cinco o valor máximo dado a um acentuado movimento de massa (CBRA, 2013).

Para realizar a avaliação da motilidade espermática (escala de 0-100%) e vigor espermático (0-5) foi utilizado um microscópio óptico com objetiva de 20 ou 40x. A realização da análise morfológica foi obtida a partir da confecção de lâminas com esfregaço da amostra do sêmen dos bodes, e posteriormente coradas pelo método Panótico® rápido. As lâminas foram analisadas em microscópio óptico com aumento de 400x, e posteriormente, contados 200 espermatozoides por lâmina. Foram utilizados apenas os ejaculados que atenderem as exigências do CBRA (2013).

Criopreservação e descongelação seminal

O sêmen diluído foi envasado em palhetas de 0,25mL, e lacradas utilizando álcool polivinílico. Cada palheta continha 100×10^6 de sptz. O processo de criopreservação foi realizado por meio de congelador automatizado programável TK 3000® (TK Tecnologia em Congelamento LTDA, Uberaba, Brasil). Posteriormente as amostras foram imersas em nitrogênio líquido (-196 °C) e, finalmente foram colocadas em raques e armazenadas em botijões criogênicos. As amostras foram descongeladas a 37 °C durante 30s em banho-maria sete dias após a criopreservação, e foi realizada a análise de integridade do DNA espermático.

Análise do DNA

Para a análise da integridade do DNA espermático foi utilizada a técnica cometa. As amostras de sêmen foram descongeladas sendo transferida 5µL desta amostra para microtubos contendo 75µL de agarose de baixo ponto de fusão (1,5%) a 37 °C. Posteriormente, esta mistura homogeneizada e transferida para lâminas pré-revestidas com agarose. Em seguida, as lâminas foram cobertas com lamínulas e colocadas a 3 °C durante 20 minutos. Por fim, as lamínulas foram removidas e as lâminas e foram imersas em solução de lise por 48 horas.

Em seguida, as lâminas foram colocadas em cuba de eletroforese contendo uma solução tampão, para a desnaturação do DNA. Foi realizada a eletroforese e as lâminas foram neutralizadas e, em seguida, secas e armazenadas para análise posterior. Finalmente, as lâminas foram coradas com brometo de etídeo (20mg/mL) e cobertos com uma lamínula.

A avaliação das lâminas foi feita em microscópio de imunofluorescência em um aumento de 40x, em ensaio cego. Posteriormente, foram contabilizadas 200 células por animal (100 para cada exposição-aguda e crônica). Para as formas dos cometas foram utilizadas classes de 0 a 3, sendo 0 nenhum dano e 3, cauda do cometa superior a duas vezes o tamanho do nucleóide. A partir destes dados foi calculado o Índice de Danos e a Frequência de Danos, variando de 0 (ausência de danos) até 100 (dano máximo).

Análise Estatística

Para a obtenção das médias e desvio-padrão foi feita a análise de variância (ANOVA) do parâmetro espermático (Integridade do DNA). Para tanto, foi utilizado o PROC GLM (General Linear Models) do Software SAS (Statistical Analysis System) for Windows versão 9.0.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nos resultados do grupo teste G2 (ACP 101c/102c[®]), observou-se na análise do OpenComet que houve apenas uma leve formação de cauda, indicando uma leve fragmentação do DNA. Ao analisar os dados obtidos do grupo controle GC1 (TRIS + gema de ovo de *Gallu gallus domesticus*) e os obtidos no grupo experimental (ACP 101c/102c[®]) foi possível verificar que estatisticamente não houve diferença significativa.

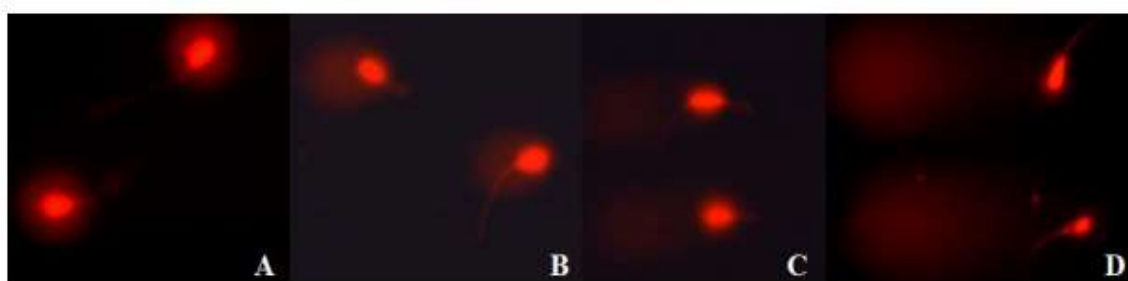


Figura 01: Células com núcleo corado e halo ao redor do núcleo. (Fonte: ALVES *et al.*, 2015)

Obs.: Pouca fragmentação do DNA (A); núcleo corado com formação de cauda de cometa (leve fragmentação do DNA - B); núcleo corado e cauda de cometa evidente (moderada fragmentação de DNA - C); núcleo fracamente corado e com cauda de cometa bem evidente (intensa fragmentação do DNA - D)

Neste estudo, a criopreservação não afetou o percentual de espermatozoides com integridade estrutural e funcional de membrana para ambos os diluentes.

Ambos os diluentes seminais utilizados ACP (101c/102c[®]) e TRIS+GEMA não apresentaram diferença significativa, para obtenção de bons índices de viabilidade seminal, por isso é importante fazer a escolha de bons diluentes e se atentar as características fisiológicas do sêmen. Os diluentes seminais têm a função de proteger a membrana do espermatozoide contra os danos provocados pelo choque térmico e pelas injúrias causadas durante o transporte, além de fornecer nutrientes como fonte de energia, ter efeito tamponante, manter a pressão osmótica (285mOsm) e aumentar o volume do ejaculado, a fim de obter múltiplas doses inseminantes (AISEN, 2008).

Concluindo-se que espermatozoides caprinos, diluídos em ACP (101c/102c[®]), apresentaram uma leve fragmentação do DNA, após o processo de congelação/descongelação. Assim, demonstrando que a criopreservação não influenciou significativamente a fragmentação das moléculas de DNA das células espermáticas, uma vez que também é possível a presença de espermatozoides no ejaculado (sêmen fresco) com fragmentação de DNA, ou seja, antes de serem submetidos a protocolos de criopreservação.

CONCLUSÕES

Concluiu-se que as células espermáticas do sêmen caprino, diluídas em ACP (101c/102c), apresentaram uma leve fragmentação do DNA, após o processo de congelação/descongelação. Assim, demonstrando que a criopreservação não influenciou significativamente a fragmentação das moléculas de DNA das células espermáticas, uma vez que é possível a presença de espermatozoides no ejaculado (sêmen fresco) com fragmentação de DNA, ou seja, antes de serem submetidos a protocolos de congelação.

REFERÊNCIAS

- AISEN, E.G. Reprodução ovina e caprina. São Paulo: MedVet, v.1, 2008. 203p.
- CASTELO, T.S.; FROTA, T.R, SILVA, A.R. Considerações sobre a criopreservação do sêmen de caprinos. Acta Veterinária Brasília, v.2, n.3, p.67-75, 2008.
- CBRA. Colégio Brasileiro de Reprodução Animal. 2013. Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal. 3ª ed., Belo Horizonte: CBRA. 2013. 104p.
- ERDTMANN, B. A genotoxicidade nossa de todos os dias. In: SILVA, J.; ERDTMANN, B.; HENRIQUES, J.A.P. Genética Toxicológica. 1ª ed., Porto Alegre: Alcance, cap.1, p.26-27, 2003.
- FAO. Food and Agriculture Organization of the United Nations. 2017. Available from: <<http://www.fao.org/faostat/en/#data/QL>>. Accessed: Fev. 15, 2020.
- IBGE. Anuário estatístico do Brasil. 2016. Disponível em <https://www.ibge.gov.br/estatisticasnovportal/economicas/agricultura-e-pecuaria/9107-producao-da-pecuaria-municipal.html?=&t=downloads>. Acesso em 15/03/2018.
- PEGG, D.E. The History and Principles of Cryopreservation. Seminars in Reproductive Medicine, v.20, n.1, p.5-14, 2002.
- SALGUEIRO, C.C.M.; NUNES, J.F.; OLIVEIRA, K.P.L. Utilização de diluentes à base de água de coco in natura e em pó na inseminação artificial programada de cabras. Revista Brasileira de Reprodução Animal, v.1, n.5, p.175-182, 2002.
- SIMÕES R. Influência da fragmentação de DNA espermático na produção in vitro de embriões bovinos. 2010. 106p. (Tese de Doutorado em Ciências). Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, São Paulo, 2010.