

EXTRATO DE PRÓPOLIS VERDE NA MOTILIDADE E INTEGRIDADE DE MEMBRANA DE SÊMEN EQUINO RESFRIADO

FERNANDA CARLINI CUNHA DOS SANTOS^{1*}; CARINE DAHL CORCINI¹; VITÓRIA GASPERIN GUAZZELLI COSTA¹; LUZIA HALLAL DUVAL¹; STELA MARI MENEGUELLO GHELLER¹; GEFERSON FISCHER¹; BRUNA ROSA CURCIO¹; CARLOS EDUARDO WAYNE NOGUEIRA¹, ANTONIO SERGIO VARELA JUNIOR^{1,2**}

¹ Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, RS. *carlini@portoweb.com.br

² Universidade Federal de Rio Grande, Rio Grande, RS. ** varelaajs@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

O resfriamento seminal tem como principal objetivo o prolongamento da viabilidade espermática e capacidade fecundante pela redução no metabolismo energético dos espermatozoides, proporcionando período hábil para transporte do sêmen (GRAHAM, 2011). O espermatozoide é uma célula haploide altamente especializada, sendo que sua principal função é a fecundação do ócito. Para que o espermatozoide exerça esta função são necessários alguns atributos, tais como motilidade progressiva, produção de energia via metabolismo celular (PICKETT & AMANN, 1993) e organelas celulares íntegras e funcionais.

O processo de criopreservação pode causar danos ultraestruturais, bioquímicos e funcionais na célula espermática (WATSON et al., 2000). A constituição da membrana plasmática, com elevada taxa de ácidos graxos insaturados, predispõe ao choque térmico e aumenta a susceptibilidade dos espermatozoides frente danos oxidativos causados pelas espécies reativas de oxigênio (ROS). Em baixa concentração, as ROS são consideradas fisiológicas, atuando como mediadoras da função espermática (GRIVEAU et al., 1997). Porém, em alta concentração as ROS podem prejudicar a motilidade e capacidade de fertilização (BAUMBER et al., 2000).

O processo de resfriamento resulta em injúrias às organelas da célula espermática, sendo que a adição de substâncias com ação antioxidante ao meio diluidor auxilia na proteção do espermatozoide. Neste contexto, a própolis é uma substância resinosa de composição complexa, coletada pelas abelhas (*Apis mellífera*) a partir de heterogêneos tipos de plantas. A diferença entre os tipos de própolis esta relacionada à origem botânica e à espécie de abelha. A própolis verde é um composto encontrado somente no Brasil, principalmente na região de São Paulo e Minas, e está associada à planta *Baccharis dracunculifolia* (PARK et al., 2002). A própolis apresenta amplo espectro de atividades biológicas, incluindo: antibiótica, antifúngica, antiviral, antiinflamatória, antitumoral e antioxidante (CASTILHO, 2009). A adição de substâncias antioxidantes em concentrações adequados ao diluente de resfriamento tem como intuito auxiliar o prolongamento da viabilidade espermática.

Este trabalho teve como objetivo avaliar o efeito do extrato de própolis verde adicionado ao diluente para resfriamento de sêmen equino sobre os parâmetros de motilidade espermática e integridade de membrana plasmática.

2. METODOLOGIA

Foram coletados 4 ejaculados de 5 garanhões da raça Crioula e Quarto de Milha (n=20), com auxílio de vagina artificial modelo Hannover (Minitub™) e uma égua em estro contida, e transportados até o Laboratório de Reprodução Animal da UFPel.

Foram incluídos no experimento ejaculados com motilidade e células com morfologia normal $\geq 70\%$. Estas amostras seminais foram diluídas com diluente KENNEY (1975) até a concentração de 50×10^6 espermatozoides/mL e submetidos aos tratamentos: T1 (controle; diluente a base de leite desnatado), T2 (2,5µl/mL de extrato de própolis verde adicionado ao diluente base), T3 (5µl/mL), T4 (7,5 ul/ml) e T5 (10µl/mL). A própolis verde foi produzida pela empresa Apis Nativa Produtos Naturais Ltda (PRODAPYS) e o extrato hidroalcolólico foi extraído de acordo com a metodologia descrita por Fischer et al. (2010).

Na sequência, as amostras foram resfriadas a 5°C e mantidas em geladeira comercial (Minitub™), sendo avaliadas após 5 minutos de aquecimento a 37°C em banho-maria nos momentos 0; 30; 60; 120; 180; 240; 300; 360 e 1440 minutos.

Os parâmetros seminais avaliados foram motilidade e integridade de membrana plasmática. A motilidade foi determinada pelo percentual de células móveis identificadas no campo do microscópio ótico com contraste de fases (Olympus BX41-PH-III América INC, São Paulo - Brasil), com escala entre 0 a 100%, sempre pelo mesmo técnico treinado. A integridade de membrana plasmática foi avaliada através das sondas fluorescentes Diacetato de Carboxifluoresceína e Iodeto de Propídio (Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, USA) conforme descrito por HARRISON & VICKERS (1990). A avaliação foi realizada com microscópio de epifluorescência (Olympus BX 51, América INC, São Paulo - Brasil). As células espermáticas apresentando fluorescência verde foram consideradas íntegras, enquanto que as com fluorescência vermelha ou com ambas as cores foram consideradas danificadas.

As variáveis foram distribuídas de acordo com teste Shapiro-Wilk. Para a avaliação estatística foi realizada análise descritiva, ANOVA e comparação entre médias pelo teste de Tukey, com auxílio do programa Statistix9® (Statistix, Statistix 9 for Windows, Analytical Software, Tallahassee, FL, USA, 2008). O nível de significância foi de $p < 0,05$.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A partir de 60 minutos a motilidade declinou significativamente em todos os tratamentos. Após 30 minutos, a motilidade nos grupos com própolis verde apresentou valores médios inferiores ao grupo controle ($p < 0,05$). Após 360 minutos de resfriamento, a motilidade atingiu 0% nos tratamentos com adição de própolis (Tabela 1).

Tabela 1. Motilidade (média \pm erro padrão da média) de sêmen equino (n=20) submetido a diferentes tratamentos com extrato de própolis verde adicionado ao diluente seminal e resfriado a 5°C por 1440 minutos.

Minutos	0	2,5µl/mL	5µl/mL	7,5µl/mL	10µl/mL
0	94,0 \pm 0,4 ^{A a}				
30	92,0 \pm 0,5 ^{A ab}	75,0 \pm 1,7 ^{B ab}	75,2 \pm 1,9 ^{B ab}	73,0 \pm 1,3 ^{B b}	65,7 \pm 3,7 ^{B ab}
60	91,5 \pm 0,5 ^{A abc}	60,5 \pm 3,6 ^{B bc}	53,5 \pm 4,4 ^{B bc}	52,0 \pm 3,6 ^{B bc}	47,5 \pm 3,9 ^{B bc}
120	90,0 \pm 0 ^{A bc}	44,5 \pm 3,5 ^{B bcd}	44,2 \pm 3,9 ^{B bcd}	43,5 \pm 4,5 ^{B bcd}	39,5 \pm 4,1 ^{B bcd}

180	89,5 ± 0,3 ^{A bc}	34,7 ± 4 ^{B bcd}	32,2 ± 3,2 ^{B bcd}	33,0 ± 3,2 ^{B bcd}	28,5 ± 3 ^{B bcd}
240	88,0 ± 0,5 ^{A bc}	28,2 ± 4,2 ^{B bcd}	23,7 ± 2 ^{B,cd}	22,7 ± 1,7 ^{B bcd}	19,7 ± 2,2 ^{B bcd}
300	88,0 ± 0,5 ^{A cd}	10,0 ± 1,4 ^{B cde}	7,7 ± 1 ^{B cde}	9 ± 1,2 ^{B cde}	7,2 ± 1,4 ^{B cde}
360	88,0 ± 0,5 ^{A cd}	0,0 ± 0,0 ^{B de}			
1440	54,0 ± 4,1 ^{A d}	0,0 ± 0,0 ^{B e}			

^{A,B} Diferentes letras indicam diferença estatística entre linhas (ANOVA, p<0,05)

^{a,b,c,d,e} Diferentes letras indicam diferença estatística entre colunas (ANOVA, p<0,05)

Grupo controle (somente diluente Kenney) e grupos com adição de extrato de própolis verde nas concentrações 2,5µl/mL; 5µl/mL; 7,5µl/mL; 10µl/mL

A integridade de membrana plasmática declinou conforme o aumento do período de resfriamento em todos os tratamentos. A partir de 300 minutos, a integridade de membrana plasmática declinou significativamente no grupo controle. Não foi observada diferença estatística entre os tratamentos em nenhum momento (Tabela 2).

Tabela 2. Integridade de membrana (média ± erro padrão da média) de sêmen equino (n=20) submetido a diferentes tratamentos com extrato de própolis verde adicionado ao diluente seminal e resfriado a 5°C por 1440 minutos.

Minutos	0	2,5µl/mL	5µl/mL	7,5µl/mL	10µl/mL
0	82,8 ± 1,7 ^a	82,8 ± 1,7 ^a	82,8 ± 1,7 ^a	82,8 ± 1,7 ^a	82,8 ± 1,7 ^a
30	79,7 ± 2,8 ^{ab}	83,3 ± 2,4 ^a	80,3 ± 3,2 ^a	77,6 ± 3,7 ^a	79,6 ± 2,8 ^a
60	75,5 ± 2,9 ^{ab}	76,1 ± 4,7 ^{ab}	79,0 ± 3,7 ^{ab}	76,2 ± 3,9 ^a	76,9 ± 3,8 ^{ab}
120	68,8 ± 3,0 ^{abc}	69,4 ± 2,9 ^{abc}	71,3 ± 3,0 ^{abc}	69 ± 3,2 ^{ab}	67,9 ± 3,8 ^{abc}
180	58,9 ± 4,2 ^{bc}	60,5 ± 4,2 ^{cd}	66,6 ± 4,6 ^{bcd}	60,5 ± 4,6 ^{bc}	57,7 ± 4,3 ^{cd}
240	65,2 ± 3,6 ^{abc}	53,7 ± 6,3 ^{bcd}	50,4 ± 6,2 ^{cd}	46,3 ± 5,7 ^{bc}	54,7 ± 6,1 ^{bcd}
300	52,5 ± 5,5 ^c	39,7 ± 5,2 ^d	41,7 ± 5,5 ^d	43,5 ± 6,3 ^c	43,2 ± 7,0 ^d
360	51,1 ± 5,8 ^c	38,2 ± 5,6 ^d	41,6 ± 6,4 ^d	43,6 ± 6,8 ^c	38,9 ± 6,3 ^d
1440	52,2 ± 3,6 ^c	36,6 ± 4,5 ^d	43,2 ± 4,6 ^d	37,6 ± 4,3 ^c	37,6 ± 5,1 ^d

^{a,b,c,d,e} Diferentes letras indicam diferença estatística entre colunas (ANOVA, p<0,05)

Grupo controle (somente diluente Kenney) e grupos com adição de extrato de própolis verde nas concentrações 2,5µl/mL; 5µl/mL; 7,5µl/mL; 10µl/mL

A ação antioxidante da própolis é atribuída aos seus componentes naturais, principalmente aos compostos fenólicos e flavanoides. Em seus estudos, RUSSO et al. (2006) concluíram que adição de extrato de própolis reduziu liberação de radicais livres e protegeu o espermatozoide humano, integridade de DNA, frente a ação do benzo[a]pyrene *in vitro*. Em bodes, CASTILHO et al. (2009) avaliaram o efeito da adição de 0,25-0,5% de própolis ao diluente de congelamento seminal e constaram que esta não foi eficiente na manutenção da integridade de membrana plasmática e motilidade pós descongelamento. Em equinos, CHAVES et al. (2008) reportaram que o diluente seminal com própolis nas concentrações de 0,25 e 0,5% apresentaram menos taxas de motilidade e vigor espermático durante 24h de resfriamento a 5°C e 15°C. No presente estudo, o extrato de própolis verde (2,5-10µl/mL) adicionado ao diluente de resfriamento seminal não apresentou efeito negativo no parâmetro de integridade de membrana plasmática. Referente a motilidade, foi verificada redução total deste parâmetro própolis em 360 minutos de resfriamento nos tratamentos, sendo considerado um efeito negativo. Nesta condição, o extrato de própolis verde foi capaz de manter a características

morfológicas do espermatozoide, diferentemente do observado nas características funcionais. Estes resultados foram atribuídos principalmente a concentração testada, sendo considerada muito alta para este tipo celular, sugerindo que menores concentrações possam exercer efeito benéfico nos parâmetros espermáticos de sêmen equino durante resfriamento.

4. CONCLUSÕES

O extrato de própolis verde apresentou efeito negativo sobre a motilidade espermática de equinos durante o período de resfriamento. Em relação ao parâmetro de integridade de membrana, a própolis não apresentou efeito prejudicial.

BAUMBER, J.; BALL, B.A.; GRAVANCE, C.G.; MEDINA, V.; DAVIES-MOREL, M.C.G. The effect of reactive oxygen species on equine sperm motility, viability, acrosomal integrity, mitochondrial membrane potential and membrane lipid peroxidation. **Journal of Andrology**, v.21, n.6, p.895–902, 2000.

CASTILHO, E. F.; GUIMARÃES, J. D.; MARTINS L.F. Uso de própolis e ácido ascórbico na criopreservação do sêmen caprino. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.38, n.12, p.2335-2345, 2009.

CHAVES, K. R.; OLIVEIRA, R.R.; CARVALHO, G.R., MARTINS, L.F.; MESSAGE, D.; GUIMARÃES, J.D. Efeito da adição da própolis ao meio diluidor sobre as características físicas do sêmen equino resfriado A 5°C E 15°C. In: **CONFERÊNCIA ANUAL DA ABRAVEQ**, 9, Campinas, SP, 2008, Anais...Campinas, 2008.

FISCHER, G.; PAULINO, N.; MARCUCCI, M.C.; SIEDLER, B.S.; MUNHOZ, L.S.; FINGER, P.F.; VARGAS, G.D.; HÜBNER, S.O.; VIDOR, T.; ROEHE, P.M. Green propolis phenolic compounds act as vaccine adjuvant, improving humoral and cellular responses in mice inoculated with inactivated vaccines. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.105, n.7, p.908-913, 2010.

GRAHAM, J.K. Principles of cooled semen. In: MCKINNON, A.O.; SQUIRES, E.L. **Equine Reproduction**. Publishing Ltda. 2011, v.1, cap.127, p.1308-1315.

GRIVEAU, J.F.; LE LANNOU, D. Reactive oxygen species and human spermatozoa: physiology and pathology. **International Journal of Andrology**, v.20, n.2, p.61-69, 1997.

HARRISON, R.A.P.; VICKERS, S.E. Use of fluorescent probes to assess membrane integrity in mammalian spermatozoa. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.88, n.1, p.343-352, 1990.

KENNEY, R.M.; BERMAN, R.V.; COOPER, W.L. Minimal contamination techniques for breeding mares: technique and preliminary findings. In: **ANNUAL CONVENTION AMERICAN ASSOCIATION EQUINE PRACTITIONERS**, 21, Boston, 1975. Proceedings..., AAEP, Boston, 1975, p.327-336.

PICKETT, B.W.; AMANN, R.P. Cryopreservation of semen. In: MCKINNON, A.O.; VOSS, J.L. **Equine Reproduction**. Philadelphia: Lea & Febiger, 1993. p.769-789

PARK, Y.K.; ALENCAR, S.M.; AGUIAR, C.L. Botanical origin and chemical composition of Brazilian propolis. **Journal of Agricultural Food and Chemistry**, v. 50, p. 2502-2506, 2002.

RUSSO A.; TRONCOSO N.; SANCHEZ F. Propolis protects human spermatozoa from DNA damage caused by benzo[a]pyrene and exogenous reactive oxygen species. **Life Sciences**, v.78, n.13, p.1401-1406, 2006.

WATSON, P.F. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. **Animal Reproduction Science**, v.61, n.2, p.481-92, 2000.