

## **ADIÇÃO DE EXTRATO DE PRÓPOLIS VERDE SOBRE INTEGRIDADE DE DNA DE ESPERMATOZOIDES EQUINOS**

VITÓRIA GASPERIN GUAZZELLI COSTA<sup>1</sup>, FERNANDA CARLINI CUNHA DOS SANTOS<sup>1</sup>; LUZIA HALLAL DUVAL<sup>1</sup>; BRUNA DA ROSA CURCIO<sup>1</sup>; GEFERSON FISCHER<sup>3</sup>; ANTONIO SÉRGIO VARELA JÚNIOR<sup>1,2</sup>

1: *Laboratório de Reprodução Animal – ReproPEL– Universidade Federal de Pelotas*

2: *Laboratório de Reprodução Animal Comparada – FURG*

3: *Departamento de Medicina Veterinária Preventiva*

[vitoria.guazzelli@hotmail.com](mailto:vitoria.guazzelli@hotmail.com)

[carlini@portoweb.com.br](mailto:carlini@portoweb.com.br)

[luzia\\_hallal\\_duval@hotmail.com](mailto:luzia_hallal_duval@hotmail.com)

[curciobruna@hotmail.com](mailto:curciobruna@hotmail.com)

[corcinicd@gmail.com](mailto:corcinicd@gmail.com)

[varelajras@hotmail.com](mailto:varelajras@hotmail.com)

### **1.INTRODUÇÃO**

A criação de cavalos Crioulos é economicamente e socialmente importante (Pons, 1993). A crescente valorização cultural e econômica da espécie equina possibilita manejos reprodutivos controlados, com implantação de biotecnologias que possibilitem a manutenção de material genético de animais com alto valor zootécnico, sendo que entre estas destaca-se a inseminação artificial com sêmen refrigerado ou congelado.

A célula espermática gera e degrada espécies reativas de oxigênio (ERO), sendo que em pequena quantidade as EROs são necessárias para o funcionamento fisiológico da célula, principalmente ligadas a função fertilizante. A excessiva produção de EROS torna o espermatozoide susceptível aos efeitos citotóxicos, sendo o plasma seminal rico em antioxidantes, tendo como função reduzir este efeito.(MAIA E BICUDO, 2009).

O processo de criopreservação acarreta em estresse oxidativo (EO) à célula espermática. Com intuito de reduzir os danos causados pelo EO é necessário redução na produção de ERO ou aumento na quantidade de antioxidantes disponíveis (ANDRADE et al., 2010). Contudo, a adição de antioxidantes aos meios de refrigeração e congelamento pode reduzir os danos produzidos ao espermatozoide pelos radicais livres (MAIA E BICUDO, 2009).

O extrato de própolis verde é uma substância com diversas atividades biológicas, entre elas: antioxidante, antibiótica, antifúngica, antiviral, anti-inflamatória e antitumoral (KIMOTO et al., 1998; PARK et al., 1998; KUJUMGIEV et al., 2005; CASTILHO, 2009). Russo et al. (2006) demonstraram o efeito protetor do própolis na membrana plasmática da célula espermática humana *in vivo*, sendo relacionado a atividade antioxidante com redução na produção de ERO.

Sendo assim, este trabalho objetivou avaliar o efeito da adição de extrato hidro-alcoólico de própolis verde ao diluente de resfriamento de sêmen equino sobre os parâmetros de integridade de DNA e motilidade espermática.

## 2. METODOLOGIA

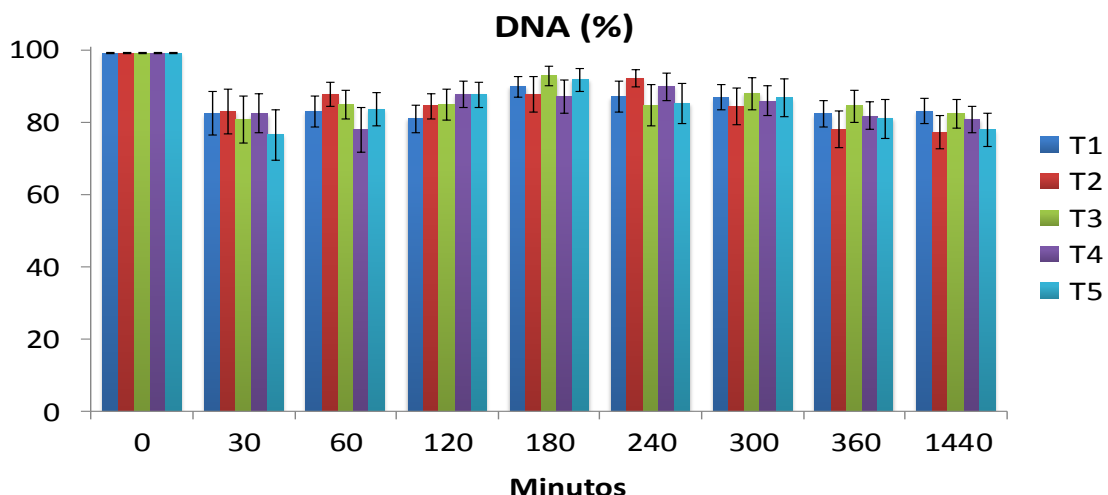
Foram utilizados 20 ejaculados de garanhões da raça Crioula e Quarto de Milha obtidos pelo método de coleta com vagina artificial. Cada ejaculado foi adicionado de diluente Kenney (1975) até a concentração final de  $50 \times 10^6$  espermatozoides por mL e submetido a cinco tratamentos: T1 (controle); T2 (2,5µl/mL de extrato hidro-alcoólico de própolis verde); T3 (5µl/mL); T4 (7,5µl/mL); T5 (10µl/mL). As amostras seminais foram mantidas refrigeradas a 5°C e analisadas às 0, 30, 60, 120, 180, 240, 300, 360 e 1440 minutos. As análises incluíram motilidade, realizada aquecendo-se uma alíquota de 20µl da amostra em banho-maria. Após, utilizando lâmina e lamínula pré-aquecidas, a leitura era realizada em microscópio ótico com placa aquecedora por técnico treinado. E integridade de DNA, realizada em microscópio de epifluorescência (Olympus BX 51, América INC, São Paulo – Brasil) pela técnica descrita por Bencharifet et al. (2008). Em uma alíquota de 20 µL de sêmen colocou-se 10 µL de TNE (0,01 M Tris-HCl, 0,15 M NaCl, 0,001 M EDTA; pH 7,2), após 30 segundos adicionou-se 100 µL de Triton 1x e passado 30 segundos, adicionou-se 50 µL de Acridine Orange (2 mg/mL em H<sub>2</sub>O deionizada). Após 5 minutos de incubação, foram avaliadas 100 células, sendo as de coloração laranja consideradas com DNA lesado e as de coloração verde com DNA íntegro. Para a avaliação estatística foi realizado análise descritiva e comparação entre médias pelo teste de Tukey, com auxílio do programa Statistix9®

## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Em todos os grupos foi observado redução na motilidade com o aumento do período em resfriamento. O grupo controle apresentou espermatozoides com 54% de motilidade aos 1440 minutos. Aos 360 minutos os grupos tratados apresentaram nenhuma motilidade

Na Tabela 1, observam-se os resultados encontrados para integridade de DNA em cada um dos momentos avaliados. Para este parâmetro, não foi observado diferença significativa entre os grupos em nenhum momento de avaliação.

Tabela 1: Porcentagem de integridade de DNA de sêmen equino durante resfriamento a 5°C, conforme tratamento.



Segundo Lopes et al. (1998), quantidades excessivas de EROs provocam danos ao DNA e diminuição da motilidade das células (GUTHRIE & WELCH, 2006). No presente estudo o DNA não foi lesado e a motilidade declinou até os 360 minutos de resfriamento, atingindo 0% nos grupos tratados.

Cardoso (2013) verificou que o extrato de própolis verde não foi eficaz como antioxidante durante criopreservação de sêmen suíno. Após descongelamento deste material, o grupo controle apresentou 94,7 espermatozoides com DNA íntegro. Entre as concentrações de própolis utilizadas a integridade de DNA variou numericamente entre 94,7 e 98,3. Dados estes que corroboram com os resultados encontrados neste estudo com sêmen equino.

## CONCLUSÕES

A adição de extrato hidro-alcoólico de própolis verde nas concentrações de 2,5 a 10µl/mL ao sêmen equino resultou em redução total de motilidade em 360 minutos. Não foi observado redução na integridade de DNA em nenhum dos grupos avaliados.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Bencharif, D., Amirat, L., Anton, M., Schmitt, E., Desherces, S., Delhomme, G., Langlois, M.L., Barriere, P., Larrat, M., Tainturier, D. 2008. The advantages of LDL (Low Density Lipoproteins) in the cryopreservation of canine semen. **Theriogenology**. 70, 1478–1488.

CARDOSO, T.F. **Utilização de extrato de própolis no congelamento de sêmen suíno** / Tainã Figueiredo Cardoso. – 64f. – Monografia (Conclusão de curso) Bacharelado em Biotecnologia. Universidade Federal de Pelotas. Centro de Desenvolvimento Tecnológico, 2013.

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

ANDRADE E.R., MELO-STERZA F.A., SENEDA M.M., ALFIERI A.A. Consequências da produção das espécies reativas de oxigênio na reprodução e principais mecanismos antioxidantes. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v.34, n.2, p.79-85, abr./jun. 2010.

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 Animal Science**, n. 84, p.2089–2100. 2006.

KIMOTO, T.; ARAI, S.; KOHGUCHI, M. Apoptosis and supression of tumor growth by artemillin C extracted from Brazilian propolis. **Cancer Detection and Prevention**, n.22, p.506-515, 1998.

KUJUMGIEV, A.; TSVETKOVA, I.; SERKEDJIEVA, Y.; BANKOVA, V.; CHRISTOV, R.; POPOV, S. Antibacterial, antifungal and antiviral activity of propolis of different geographic origin. **Journal of Ethnopharmacology**, n.64, p.235-240.1999.

LOPES, S.; JURISICOVA, A.; SUN, J.G.; CASPER, R.F. Reactive oxygen species: potential cause for DNA fragmentation in human spermatozoa. **Human Reproduction**, n.13, p.896–900. 1998.

M.S. MAIA, S.D. BICUDO, 2009. Radicais livres, antioxidantes e função espermática em mamíferos: uma revisão. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v.33, n.4, p.183-193, Oct./Dez. 2009.

PARK, Y.K.; KOO, M.H.; ABREU, J.A.S. Antimicrobial activity of propolis on oral microorganism. **Current Microbiology**, v.34, n.1, p.24-28, 1998.

PONS, D.S., 1993. **O Cavalo Crioulo: seis décadas de experiência**. Guaíba, Agropecuária, 143p.

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**, n.78, p.1401 – 1406. 2006.