

## AVALIAÇÃO SEMINAL DE RATOS WISTAR (*Rattus norvegicus*) SUPLEMENTADOS COM ÁCIDO LIPÓICO SUBMETIDOS A EXERCÍCIO FÍSICO

GEÓRGIA DA CRUZ TAVARES<sup>1</sup>; FRANCIELE PEREIRA<sup>2</sup>; CARLA AMORIM  
NEVES GONÇALVES<sup>2</sup>; ANTONIO SERGIO VARELA JR<sup>2</sup>; CARINE DAHL CORCINI<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Universidade Federal de Pelotas – [georgiadacruz.tavares@gmail.com](mailto:georgiadacruz.tavares@gmail.com)

<sup>2</sup>Universidade Federal de Rio Grande

<sup>3</sup>Universidade Federal de Pelotas – [corcincd@gmail.com](mailto:corcincd@gmail.com)

### 1. INTRODUÇÃO

A realização de atividades físicas apesar de apresentar um ganho na qualidade de vida, está correlacionada com o aumento do consumo de oxigênio e produção de espécies reativas do oxigênio (ERO) (AYRES et al. 1998). Em condições fisiológicas, a produção de ERO é mínima e o organismo através do seu sistema antioxidante impede a progressão para o estresse oxidativo, que quando presente gera uma oxidação com potencial de danificar DNA, proteínas e lipídeos (WILLIAMS, 2010).

Na reprodução a ação dos radicais livres pode gerar efeitos deletérios tanto no sistema reprodutor feminino quanto no masculino. A membrana plasmática é rica em ácidos graxos poli-insaturados sendo eles os responsáveis pela fluidez necessária para eventos associados a fertilização nos espermatozoides (AITKEN, 1995). A primeira indicação de que o estresse oxidativo pode afetar a viabilidade e função dos espermatozoides foi em 1943, quando um pesquisador detectou que o espermatozoide humano perdia a motilidade quando incubado com elevadas concentrações de oxigênio e a adição de catalase oferecia proteção (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1999).

Uma alternativa para diminuir a presença de radicais livres e melhorar o desempenho reprodutivo é a utilização de antioxidantes na dieta, que podem agir removendo os radicais ou os destruindo. A suplementação de ácido lipóico (ALA), antioxidante não enzimático (TEICHERT et al. 2005), em associação com a prática de exercícios físicos com intenção de reduzir gordura acumulada é uma prática bastante utilizada em humanos, no entanto, a influência dessa associação na reprodução ainda não é conhecida.

O objetivo desse trabalho foi avaliar os efeitos na reprodução de ratos wistar (*Rattus norvegicus*) submetidos a exercício físico suplementados com ácido lipóico, utilizando como parâmetro avaliações seminais *in vitro*.

### 2. METODOLOGIA

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Uso de Animais (CEUA n<sup>o</sup> P059/2011) da Universidade Federal do Rio Grande - FURG, Brasil e os animais foram tratados de acordo com as Diretrizes Brasileiras de Prática para o Cuidado e Uso de Animais de Desenvolvimento Científico propósitos e Ensino (DBPA).

Foram utilizados como modelos experimentais machos da espécie *Rattus norvegicus* obtidos no Biotério Central da Universidade Federal do Rio Grande - FURG, foram alojados em gaiolas coletivas (cinco animais por gaiola). Os animais foram divididos em 4 grupos: grupo controle (C), submetidos a um tanque de

natação para imitar o estresse da água, durante 1 minuto, 5 vezes por semana, durante 17 semanas, receberam 1mL/Kg/dia da 10<sup>o</sup> até a 17<sup>o</sup> semana de solução salina via intraperitoneal (IP); grupo exercício (E), submetidos ao programa de adaptação e treinamento de natação, 5 vezes por semana, com 5% da carga de peso corporal; grupo ácido lipóico (LA), submetidos à simulação do estresse hídrico como o grupo controle e foram suplementados com solução de ácido lipóico, 5 vezes por semana, 60mg/kg/dia da 10<sup>a</sup> até 17<sup>a</sup> semana via IP; grupo associação (ELA), submetidos ao programa de adaptação e treinamento de natação, 5 vezes por semana e suplementados com ácido lipóico, 5 vezes por semana, 60mg/kg/dia da 10<sup>a</sup> até 17<sup>a</sup> semana.

Foi realizada a eutanásia desses animais segundo o protocolo do CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais - após esse procedimento, realizou-se a remoção dos epidídimos e ductos deferentes- direito e esquerdo- dos indivíduos e fez-se a manutenção em PBS (Phosphate-buffered saline) pré-aquecido (37°C), que procedia-se com a dilaceração destes no mesmo poço da placa com agulhas descartáveis; as amostras eram mantidas sempre sobre uma placa aquecedora com temperatura de 37°C e logo em seguida eram encaminhadas ao laboratório para a realização das análises seminais.

A funcionalidade mitocondrial foi realizada com a adição de uma sonda específica contendo iodeto de propídeo (IP) e rhodamine123 segundo protocolo ARRUDA et al. (2005). A avaliação da integridade de membrana era realizada conforme protocolo descrito por HARRISON; VICKERS (1990), com uso de sonda específica contendo IP e diacetato de carboxifluoresceína (CFDA). A integridade de DNA foi avaliada através da sonda Acridine Orange (A6014, Sigma) com protocolo adaptado de EVENSON et al. (1999). A integridade de acrossoma foi realizada em microscópio de epifluorescência (Olympus BX 51, América INC, São Paulo – Brasil) pelo protocolo modificado por KAWAMOTO et al. (1999). Essas análises foram realizadas em microscópio de fluorescência em objetiva de 400x (Olympus BX 51, América INC, São Paulo – Brasil), filtro UV com excitações de 450-490 nm e emissão 520 nm. Para cada análise se considerou 200 células. A análise estatística foi realizada no software Statistix 9.0.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A partir da análises dos resultados não observou-se diferença estatística entre os tratamentos nas avaliações de integridade de acrossoma e DNA, entretanto a funcionalidade de mitocôndria e integridade de membrana diferiram entre os grupos (Tab.1).

Os animais submetidos ao exercício mais intenso (E) apresentaram percentual de mitocôndrias funcionais superior ao dos animais do grupo controle (C) e do grupo associação do ácido lipóico mais o exercício (ELA), porem o grupo em que os animais receberam a suplementação do ácido lipóico (LA) foram iguais aos demais.

Na avaliação de integridade de membrana, os animais do grupo controle apresentaram resultados superiores aos demais grupos.

**Tabela 1.** Percentual de funcionalidade de mitocôndria, integridade da membrana plasmática, integridade de DNA e integridade de acrossoma (média  $\pm$  erro padrão) de espermatozoides de *Rattus norvegicus* dos diferentes grupos.

Grupos	Funcionalidade Mitocôndria	Integridade Membrana	Integridade DNA	Integridade Acrossoma
C	87,0 $\pm$ 4,7 <sup>B</sup>	36,2 $\pm$ 8,7 <sup>A</sup>	93,0 $\pm$ 4,1 <sup>A</sup>	92,8 $\pm$ 5,7 <sup>A</sup>
E	94,1 $\pm$ 3,7 <sup>A</sup>	16,6 $\pm$ 8,5 <sup>B</sup>	86,2 $\pm$ 19,8 <sup>A</sup>	95,1 $\pm$ 5,1 <sup>A</sup>
LA	94,0 $\pm$ 3,4 <sup>AB</sup>	13,5 $\pm$ 2,8 <sup>B</sup>	95,5 $\pm$ 4,0 <sup>A</sup>	100,0 $\pm$ 0 <sup>A</sup>
ELA	91,0 $\pm$ 8,1 <sup>AB</sup>	15,0 $\pm$ 5,7 <sup>B</sup>	76,7 $\pm$ 19,2 <sup>A</sup>	97,7 $\pm$ 3,0 <sup>A</sup>

<sup>A,B</sup> Letras distintas indicam diferença estatística na coluna ( $P < 0,05$ ). Animais submetidos ao exercício mais intenso (E); grupo controle (C); grupo associação do ácido lipóico mais o exercício (ELA) e grupo só com suplementação do ácido lipóico (LA).

Os resultados superiores de integridade de membrana para o grupo controle corroboram com o que MARTINS (2011) descreve sobre a atividade física regular e moderada promover melhorias no sistema de defesa antioxidante através do processo adaptativo induzido pela própria geração de ROS.

No exercício intenso a funcionalidade de mitocôndria apresentou-se superior aos demais que pode ser respondido pelo fato que nessas condições em torno de 2% de todo oxigênio consumido pelas mitocôndrias não convertido à água, são reduzidos a EROs, sendo possível afirmar que durante o exercício físico pode ocorrer um aumento na formação mitocondrial de EROs, pois sabe-se que nesta condição o consumo de oxigênio corporal eleva-se (PEREIRA; SOUZA JUNIOR, 2008).

#### 4. CONCLUSÕES

Conclui-se com este trabalho que a associação de atividade física com suplementação de ácido lipóico não obteve efeito deletério nas características seminais analisadas, não interferindo na reprodução de ratos Wistar machos.

#### 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARRUDA R.P., CELEGHINI E.C.C., SOUZA L.W.O., NASCIMENTO J., ANDRADE A.F.C., RAPHAEL C.F., GARCIA A.R. Importância da qualidade do sêmen em programas de IATF e TETF. **1º Simpósio de Reprodução Animal**, v.33, supl.1, p.145-150, 2005.

AITKEN, R.J. Free radicals, lipid peroxidation and sperm function. **Reprod. Fertil. Devel.**, v. 7, p. 659-668, 1995.

AYRES, S.; BAER, J.; SUBBIAH, R. Exercised-induced increase in lipid peroxidation parameters in amenorrheic female athletes. **Fertility and Sterility**, 1998; 69(1): 73-7.

BEARDEN, H.J.; FUQUAY, J.W. Semen evaluation. In: **applied Animal Reproduction**, 4th Ed. New Jersey: Prentice Hall, 1997, pp.159-170.

BENETTI, M.; ARAUJO, C.L.P.; SANTOS, R.Z. Cardiorespiratory fitness and quality of life at different exercise intensities after myocardial infarctio. **Arq. Bras. Cardiol.**, 95: C399-C404, 2010.

CBRA: COLÉGIO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL. **Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal**. Belo Horizonte: CBRA, 1998, 49 p.

EVENSON, D.P.; JOST, L.K.; MARSHALL, D. et al. Utility of the sperm chromatin structure as a diagnostic and prognostic tool in the human fertility clinic. **Human Reproduction**, Oxford, v. 14, n. 4, p. 1039-1049, 1999.

FOLKMAN, J.; SHING, Y. Angiogenesis. **J. Biol. Chem.**, 267: C10931-C10934, 1992.

HALLIWELL, B e GUTTERIDGE, J.M.C. **Free Radicals in Biology and Medicine**. 3ed., Oxford University Press: New York, 1999. 936p.

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

KAWAMOTO, A.; KAZUTOMO, O.; KISHIKAWA, H.; ZHU, L.; AZUMA, C.; MURATA, Y. Two-color fluorescence staining of lectin and anti-CD46 antibody to assess acrosomal status. **Fertility and Sterility**, v.71, p. 497-501, 1999.

MARTINS, R. R. Influência do ácido lipóico na adaptação antioxidante ao exercício físico em ratas Wistar hígdas e ovariectomizadas. Natal, RN: Universidade Federal do Rio Grande do Norte, 2011. 62 p. (tese de doutorado).

PEREIRA, B.; SOUZA JUNIOR, T. P. Exercício físico intenso como pró-oxidante, mecanismos de indução de estresse oxidativo e consequências. **Revista Brasileira de Ciência e Movimento**, Vol. 16, Nº 3, 2008.

TEICHERT, J.; TUEMMERS, T.; ACHENBACH, H.; PREISS, C.; HERMANN, R.; RUUS, P.; PREISS, R. Pharmacokinetics of  $\alpha$ -lipoic acid in subjects with severe kidney damage and end-stage renal disease. **J Clin Pharmacol**, v.45, p.313-328, 2005.

WILLIAMS, C.A.; Antioxidant supplementation to the exercising horse. **R. Bras. Zootec.**, v.39, p.145-150, 2010.