

CITOMETRIA DE FLUXO EM SÊMEN EQUINO RESFRIADO A 5°C COM FOSFATIDILCOLINA DE SOJA

NICOLE FREITAS GONÇALVES¹; CAROLINE VIÉGAS PINTO²; IZANI ACOSTA BONEL³; CARINE DAHL CORCINI⁴

¹Universidade Federal de Pelotas – nicolefreitasg@outlook.com

²Universidade Federal de Pelotas – carolineviegas18@gmail.com

³Universidade Federal de Pelotas – izanibonel@hotmail.com

⁴ Universidade Federal de Pelotas – corcinicd@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

A biotecnologia da reprodução se coloca como uma importante ferramenta a serviço da equideocultura mundial, como instrumento direto do melhoramento genético. Dadas as vantagens proporcionadas pela inseminação artificial (IA), esta talvez seja a biotecnologia com maior impacto na produção equina, pois um reprodutor pode deixar centenas de descendentes ao longo de sua vida reprodutiva quando a IA é usada eficientemente (CANISSO et al, 2008).

A inseminação artificial em equinos é largamente praticada em todo o mundo, e a maneira mais comumente usada nessa espécie é mediante o resfriamento e transporte de sêmen (LOOMIS, 2006). O aumento da demanda nos sistemas de criação equina levou a necessidade do desenvolvimento de técnicas que possibilitassem um maior e melhor aproveitamento do potencial produtivo e reprodutivo de várias espécies domésticas (BRANDÃO, 2008). A criopreservação do sêmen é uma dessas técnicas, que vieram para facilitar e otimizar a produção

A criopreservação do sêmen proporciona várias vantagens, como aumento da disponibilidade de espermatozoide, facilitando os trabalhos de reprodução assistida. Outras vantagens são: a otimização do uso de garanhões com sêmen, mesmo fora da estação de monta e a quebra das barreiras geográficas, que torna possível a remessa de sêmen para qualquer parte do mundo (BARRETO et al., 2008).

Apesar da eficiência comprovada do efeito do diluidor à base de gema de ovo sobre a qualidade espermática e da possibilidade de pasteurização desse produto, sua substituição por um produto que não seja de origem animal seria o mais indicado (VAN WAGTENDONK-DE LEEUW et al., 2000). Recentes estudos sugerem que dentre os componentes da gema de ovo aqueles que possuem ação crioprotetora são a fosfatidilcolina (lecitina), os fosfolipídios e as lipoproteínas (ZAFFALON, 2009). Existe um consenso entre estes estudos de que a lecitina forneça uma proteção ao espermatozoide durante o choque frio e a congelação.

A lecitina é uma fosfatidilcolina poli-insaturada, que contém componentes básicos para as funções energéticas e estruturais de todas as membranas biológicas. São indispensáveis para os mecanismos de diferenciação, proliferação e regeneração celular. A lecitina pode ser extraída dos grãos de soja, sendo uma mistura complexa de fosfolipídeos, triglicerídeos e outras substâncias derivadas dos processos de refinamento do óleo (SEIDMAN et al., 2002).

O objetivo deste trabalho é de que compostos de fosfatidilcolina de soja, em diferentes concentrações, podem agir como crioprotetores estabilizadores de membrana plasmática e antioxidantes durante o resfriamento à 5 °C do sêmen equino, resultando em maior eficiência na manutenção da qualidade espermática.

2. METODOLOGIA

Produção dos lipossomas

Para produção dos LIPO foram utilizadas lecitinas de soja desengorduradas com diferentes teores de fosfatidilcolina, comercialmente denominadas Lipoid S75 (>75% m/m fosfatidilcolina, 10–18% m/m fosfatidiletanolamina, <4% m/m lisofosfatidilcolina e <3% w/w triacilgliceróis).

A produção de lipossomas foi realizada pelo método de injeção de etanol, conforme metodologia proposta por MICHELON; MANTOVANI; SINIGAGLIA-COIMBRA; DE LA TORRE et al. (2016). Para realização desse processo 5 mL de uma dispersão etanólica contendo os fosfolipídios (156 mg/mL) foi injetada em 45 mL de água Milli-Q (1:10 v/v) através de bomba peristáltica a uma vazão de alimentação de 10 mL/min, com agitação mecânica e temperatura mantidas constantes em 500 rpm e 40°C, respectivamente. Após a alimentação completa da dispersão etanólica contendo os fosfolipídios, a dispersão aquosa final contendo os lipossomas formados (15,6mg/mL) foi refrigerada a 8°C para consolidação das estruturas formadas e sua posterior caracterização.

O sêmen era coletado e diluído com diluente BotuFlex na Hartwig Fertilidade Equina e enviado ao Laboratório de Andrologia da Faculdade de Veterinária. Na chegada das amostras elas eram quantificadas e identificadas, após isso era adicionados os lipossomas nas concentração de 4uL e volumes de 10mm, 20mm e 150mm, a estabilização da temperatura em 20°C, e após à curva de resfriamento (0,5C/min), sendo posteriormente mantidas em refrigeração a 5°C.

As avaliações com o grupo controle foram realizadas assim que terminamos de organizar os tratamentos, após a diluição do lipossomas as amostras foram acondicionadas na caixa térmica MiniTube e foram analisadas após 48h e 96h. Uma alíquota de 5µL de cada amostra foi alocada em um microtubo e adicionadas as sondas para análise de citometria de fluxo.

Citometria de Fluxo

As análises de citometria de fluxo foram realizadas no aparelho AcousticFocusingCytometer (Attune®, Califórnia, EUA), equipado de laser azul (Argon 488 nm) e violeta (UV 450 nm). As sondas fluorescentes utilizadas neste estudo foram obtidas da Invitrogen (Carlsbad, CA, EUA). As fluorescências verde, laranja e vermelha foram lidas com fotomultiplicador (PMT) BL1 (filtro 530/30), BL2 (filtro 575/24) e BL3 (filtro > 640), respectivamente. A estabilidade de fluorescência do citômetro foi testada diariamente utilizando solução padrão (Invitrogen, CA, EUA).

Foram selecionados 20,000 eventos espermáticos por amostra, com uma taxa de fluxo de 200 células/s. De forma a determinar a população espermática, debris celulares e outros eventos não espermáticos foram eliminados com base nos gráficos de dispersão FSC x SSC (PERRY; CORCINI; ANCIUTI; OTTE et al., 2019), através da exposição ao Hoescht 33342 (2 mM), sendo o fluorocromo detectado com PMT VL1 (filtro 450/40). Os resultados foram obtidos com AttuneCytometric Software V 2.1.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na tabela 1 temos os dados referente a análise das amostras após 48 horas de refrigeração a 5°C com os tratamentos em diferentes volumes de lipossomas S75 nas concentrações de 4uL.

Tabela1 – Análise das amostras após 48 horas de refrigeração.

Trat	ACRO	ROS	LPO	RUP	FUNC
1	26,61± 1,12 ^C	134,85±24,93 ^A	88,32±1,60 ^C	30,48±0,99 ^{AB}	38,66±1,90 ^B
2	33,23±2,40 ^{AB}	140,02±24,49 ^A	90,06±0,93 ^{ABC}	28,75±1,22 ^{AB}	35,84±1,30 ^B
3	32,46±2,89 ^{ABC}	151,48±27,39 ^A	91,76±0,33 ^A	30,11±1,75 ^{AB}	41,05±3,51 ^B
4	33,74±2,45 ^{AB}	152,14±24,49 ^A	90,97±0,48 ^{AB}	28,08±1,42 ^{AB}	39,33±3,47 ^B

Letras maiúsculas distintas (A-B-C) na coluna indicam diferença estatística entre os tratamentos. Siglas: Acro: reação acrossomal; LPO: níveis de peroxidação lipídica; ROS: produção intracelular de espécies reativas de oxigênio; RUP: ruptura celular e FUNC: Funcionalidade da membrana. Tratamentos: O primeiro tratamento (T1) é o controle, onde é o sêmen com o diluente; T2: 4uL de S75 de 10mm; T3: 4uL de S75 de 20mm; T4: 4uL de S75 de 150mm.

No que se refere ao acrossoma, foi observada uma diferença significativa no tratamento 1 difere dos tratamentos 2 e 4, indicando uma maior incidência de lesões na integridade acrossomal. A peroxidação lipídica (LPO) mostrou-se proporcional ao nível de dano na membrana espermática, destacando-se que o tratamento 1 diferiu dos tratamentos 3 e 4. Em relação à ruptura da membrana (RUP) e funcionalidade da membrana (FUNC) não apresentaram diferença significativa.

Na tabela 2 temos os dados referentes a análise das amostras após 96 horas de refrigeração a 5°C com os tratamentos em diferentes volumes de lipossomas S75 nas concentrações de 4uL.

Tabela 2- Análise das amostras após 96 horas de refrigeração.

Trat	ACRO	ROS	LPO	RUP	FUNC
1	31,79±3,52 ^B	164,67±35,44 ^A	83,95±2,69 ^{BC}	25,76±1,46 ^C	42,18±5,30 ^{AB}
2	38,94±3,22 ^{AB}	133,59±23,26 ^A	90,52±1,48 ^A	28,88±2,82 ^{ABC}	48,99±5,39 ^{AB}
3	40,40±4,22 ^{AB}	133,93±25,72 ^A	90,95±0,79 ^A	35,86±4,22 ^A	46,62±4,73 ^{AB}
4	36,41±3,04 ^{AB}	155,01±28,32 ^A	88,73±1,51 ^{AB}	28,86±1,73 ^{ABC}	39,89±3,92 ^B

Letras maiúsculas distintas (A-B-C) na coluna indicam diferença estatística entre os tratamentos. Siglas: Acro: reação acrossomal; LPO: níveis de peroxidação lipídica; ROS: produção intracelular de espécies reativas de oxigênio; RUP: ruptura celular e FUNC: Funcionalidade da membrana. Tratamentos: O primeiro tratamento (T1) é o controle, onde é o sêmen com o diluente; T2: 4uL de S75 de 10mm; T3: 4uL de S75 de 20mm; T4: 4uL de S75 de 150mm.

Na integridade acrosomal e na produção intracelular de espécies reativas de oxigênio apresentadas na tabela 2, não apresentaram diferença significativa. A peroxidação lipídica (LPO) está correlacionada com o nível de dano à membrana espermática; portanto não foram detectados danos significativos. Em relação à ruptura da membrana, o tratamento 1 diferiu do tratamento 3 enquanto a funcionalidade da membrana foi distinta apenas no tratamento 4. Estes resultados indicam que os lipossomas testados apresentam uma ação crioprotetora, conforme observado por esses parâmetros.

Em ambas as tabelas, não houve diferença significativa no ROS em nenhum dos tratamentos avaliados neste estudo. Nos espermatozoides criopreservados, a geração de espécies reativas de oxigênio (ROS) ocorre devido ao choque térmico e à exposição à oxigenação atmosférica, o aumento dos níveis de ROS resulta em um desequilíbrio entre os radicais livres e os antioxidantes presentes no fluido seminal (MEDEIROS, et al. 2002). Elevadas concentrações de ROS aumentam a

lipoperoxidação das membranas lipídicas, inviabilizando as enzimas glicolíticas e podem levar os espermatozoides à capacitação, resultando em níveis extremos de deterioração espermática (ALVAREZ, et al., 1993; LECLERC, et al., 1997).

4. CONCLUSÕES

Podemos concluir que uso de lipossomas de fosfatidilcolina de soja, não obteve a produção de espécies reativas de oxigênio intracelular no sêmen equino resfriado. Contudo, o uso do lipossoma S75 mostrou-se com menor potencial crioprotetor. Evidenciando a necessidade de mais pesquisas para buscar outras concentrações que mostrem-se viáveis para utilização de lipossomas na criopreservação de sêmen equino.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVAREZ, J. G.; STOREY, B. T. Evidence that membrane stress contributes more than lipid peroxidation to sublethal cryodamage in cryopreserved human sperm: glycerol and other polyols as sole cryoprotectant. **J Androl.** V. 14, n. 3. p. 199-209. 1993.

BARRETO, M. A. P.; SILVA, J. F. S.; FAGUNDES, B.; CAIADO, J. R. C.; SOUZA, G. V.; SHIMOYA, A. Efeito de proteínas do plasma seminal equino com massa superior a 10 kDa concentradas 10 vezes sobre a congelabilidade do sêmen. **Revista Brasileira de Zootecnia.** v. 37, n. 12, pg 2115 – 2119, 2008.

CANISSO, I. F. Inseminação artificial em equinos: sêmen fresco, diluído, resfriado e transportado. **Rev. Acad., Ciênc. Agrár. Ambient.,** Curitiba, v 6, n 3, pg 389 – 398, 2008.

BRANDÃO, A. C. 2008. **Efeito do laser diodo sobre as características de motilidade, de integridade das membranas plasmáticas e acrossomal e de potencial de membrana mitocondrial de espermatozoide criopreservados de equinos.** Dissertação (Doutorado) Programa de Pós-Graduação em reprodução animal – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo.

LOOMIS, P. R. Advanced methods for handling and preparation of stallion Semen. **Veterinary Clinics North American Equine Practice,** v. 22, n. 3, pg 663 – 676, 2006.

MEDEIROS, C. M.; FORELL, F.; OLIVEIRA, A. T.; RODRIGUES, J. L. Current status of sperm cryopreservation: why isn't it better? **Theriogenology.** V.57. n. 1. p. 327-344. 2002.

MICHELON, M.; MANTOVANI, R. A.; SINIGAGLIA-COIMBRA, R.; DE LA TORRE, L. G.; CUNHA, R. L. Structural characterization of β -carotene-incorporated nanovesicles produced with non-purified phospholipids. **Theriogenology.** V.79. p. 95 - 105. 2016.