

EEITO DO U73122, INIBIDOR DA FOSFOLIPASE C, SOBRE A CINÉTICA ESPERMÁTICA DO SÊMEN EQUINO RESFRIADO

KARINE RANGEL DA COSTA¹; ANTONIO SERGIO VARELA JÚNIOR²; IZANI BONEL ACOSTA³; ANGELO JOSÉ BURLA DIAS⁴; CARLOS EDUARDO GOMEZ MARTIN⁵; CARINE DAHL CORCINI⁶

¹Universidade Federal de Pelotas- UFPel – karinerangel.vet@gmail.com

²Universidade Federal de Rio Grande- FURG – varelajras@gmail.com

³Universidade Federal de Pelotas- UFPel – izanibonel@hotmail.com

⁴Universidade Estadual Norte Fluminense- UENF – aburla@uenf.br

⁵Universidade Federal de Pelotas- UFPel – carlos@invitrosul.com.br

⁶Universidade Federal de Pelotas- UFPel – corcincd@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

A biotécnica de resfriamento de sêmen equino é amplamente utilizada na reprodução, pois permite maior flexibilidade no transporte e utilização das doses inseminantes (SAMPER, 2009). Apesar das vantagens, a redução da temperatura pode comprometer a qualidade espermática, especialmente no que diz respeito à motilidade e à capacidade de deslocamento progressivo, fatores diretamente associados ao potencial fecundante (ARRUDA *et al.*, 2019).

A análise cinética dos espermatozoides, realizada por meio de sistemas computadorizados como o CASA (Computer Assisted Sperm Analysis), fornece parâmetros objetivos e detalhados sobre motilidade total, progressiva, velocidades e padrões de deslocamento. Essas variáveis são fundamentais para a avaliação da viabilidade funcional do sêmen resfriado e para a predição do seu desempenho em programas de inseminação artificial (CONTRI *et al.*, 2010; NEILD *et al.*, 2019).

A fosfolipase C (PLC) desempenha papel central em diferentes vias de sinalização celular, especialmente na regulação do cálcio intracelular e na modulação da motilidade espermática (BREITBART, 2002). O inibidor U73122 tem sido amplamente utilizado em modelos experimentais para elucidar a função da PLC em processos fisiológicos (MISHRA *et al.*, 2020). No entanto, seu efeito durante o resfriamento do sêmen equino ainda não foi investigado. Cabe destacar que o processo de criopreservação de sêmen equino já vem sendo estudado pelo nosso grupo de pesquisa, em parceria com a UENF (COSTA, 2025), o que reforça a continuidade e a relevância desta investigação.

Dessa forma, o presente trabalho teve como objetivo avaliar a influência do U73122, inibidor da PLC, sobre os parâmetros cinéticos dos espermatozoides de sêmen equino resfriado pelo período de duas horas.

2. METODOLOGIA

Amostras de sêmen de cinco garanhões da raça Crioulo foram coletados por vagina artificial e diluídas em meio de refrigeração. Foram estabelecidos quatro tratamentos: controle (sem adição do U73122), 10 μ M, 20 μ M e 30 μ M do inibidor da PLC. Cada amostra foi dividida em quatro frações iguais e acrescidas das suas respectivas concentrações do U73122. As amostras foram armazenadas durante duas horas à 22°C. Na sequência, foi realizada a análise cinética de forma

objetiva pelo sistema computadorizado CASA, avaliando motilidade total (MT), motilidade progressiva (MP), parâmetros de deslocamento (amplitude de deslocamento absoluto- DAP; deslocamento da curva lateral- DCL; deslocamento em linha reta- DSL), parâmetros de velocidade (velocidade no percurso médio- VAP; velocidade curvilínea- VCL; velocidade em linha reta- VSL), índices de movimento (retilinearidade- STR; linearidade- LIN; oscilação- WOB), além de amplitude lateral de cabeça (ALH) e frequência do batimento flagelar (BCF). Os dados foram tabulados no software Microsoft Excel® (Microsoft Corporation, 2018) e, posteriormente submetidos ao teste de Dunn, considerando o nível de significância de 5%.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A adição do inibidor da fosfolipase C (U73122) ao sêmen equino resfriado comprometeu de forma significativa e progressiva os parâmetros de motilidade e cinética espermática (Tabela 1). No grupo controle, sem adição do composto, foram observados os maiores valores de motilidade total e progressiva, além de velocidades médias compatíveis com padrões descritos para a espécie em condições de resfriamento (FERREIRA *et al.*, 2019). A concentração de 10 μ M resultou em queda desses índices, embora ainda fosse possível observar porcentagem relevante de células móveis. Esse comportamento sugere que, em baixa dose, o inibidor interfere no movimento, mas não impede totalmente a atividade flagelar.

A partir da concentração de 20 μ M, a motilidade apresentou redução drástica, aproximando-se de valores mínimos. No tratamento com 30 μ M, praticamente não houve movimento espermático, com parâmetros próximos a zero. A análise estatística confirmou esse efeito dose-dependente, separando os tratamentos em grupos distintos: o controle diferiu significativamente de 10 μ M, enquanto 20 e 30 μ M formaram o grupo de menor desempenho. A linearidade destacou-se como o parâmetro mais sensível, apresentando diferença significativa entre todos os tratamentos, o que evidencia prejuízo na progressividade do movimento mesmo em doses baixas do U73122.

Esses resultados estão de acordo com estudos que demonstram a importância da sinalização por cálcio na motilidade espermática. A PLC atua na geração de inositol trifosfato (IP3) e diacilglicerol (DAG), moléculas envolvidas na mobilização do cálcio intracelular (SUZUKI *et al.*, 2017). Como o cálcio é essencial para o batimento flagelar e manutenção do movimento progressivo, sua redução ou bloqueio repercute diretamente na qualidade da cinética espermática (AMANN; GRAHAM, 2015). Em equinos, já foi relatado que alterações na homeostase de cálcio estão associadas à queda da motilidade durante o armazenamento do sêmen (OLIVEIRA *et al.*, 2021), o que reforça os achados do presente estudo.

Portanto, a ação do U73122 confirma que a PLC exerce papel fundamental na manutenção da motilidade em espermatozoides equinos. A redução gradual e, em concentrações elevadas, quase completa da motilidade, evidencia que essa via de sinalização é indispensável para o movimento flagelar. Esses achados não apenas contribuem para o entendimento da fisiologia espermática, mas também demonstram o potencial do U73122 como ferramenta experimental em pesquisas de reprodução animal.

Parâmetros Cinéticos	Tratamentos			
	Controle	10 μ M U73122	20 μ M U73122	30 μ M U73122
MT	67,5 \pm 0,91 ^A	39,7 \pm 1,07 ^B	8,4 \pm 2,03 ^C	1,7 \pm 1,30 ^D
MP	58,5 \pm 0,86 ^A	25,6 \pm 1,33 ^B	5,3 \pm 1,35 ^C	1,2 \pm 1,36 ^C
DAP	35,6 \pm 0,86 ^A	18,2 \pm 0,30 ^B	6,4 \pm 1,04 ^C	1,7 \pm 0,82 ^C
DCL	71,9 \pm 1,77 ^A	39,0 \pm 0,71 ^B	12,1 \pm 2,17 ^C	3,4 \pm 1,63 ^C
DSL	23,9 \pm 0,58 ^A	11,6 \pm 0,32 ^B	4,3 \pm 0,68 ^C	1,2 \pm 0,53 ^C
VAP	79,3 \pm 1,92 ^A	38,8 \pm 0,63 ^B	14,6 \pm 2,34 ^C	4,0 \pm 1,90 ^C
VCL	159,5 \pm 4,09 ^A	82,9 \pm 1,52 ^B	26,8 \pm 4,63 ^C	7,9 \pm 3,77 ^C
VSL	53,3 \pm 1,33 ^A	24,8 \pm 0,70 ^B	9,9 \pm 1,61 ^C	2,8 \pm 1,24 ^C
STR	0,6 \pm 5,70 ^{-3A}	0,6 \pm 8,57 ^{-3B}	0,3 \pm 0,48 ^B	0,1 \pm 0,03 ^B
LIN	0,3 \pm 2,49 ^{-3A}	0,3 \pm 4,90 ^{-3B}	0,2 \pm 0,03 ^C	0,05 \pm 0,02 ^D
WOB	0,5 \pm 2,07 ^{-3A}	0,5 \pm 5,44 ^{-3A}	0,2 \pm 0,04 ^B	0,06 \pm 0,02 ^B
ALH	4,1 \pm 0,07 ^A	2,4 \pm 0,04 ^B	1,2 \pm 0,19 ^C	0,4 \pm 0,15 ^C
BCF	30,6 \pm 0,33 ^A	28,3 \pm 0,30 ^A	10,2 \pm 1,70 ^B	3,2 \pm 1,40 ^B

Tabela 1. Valores médios (\pm erro padrão da média) dos parâmetros cinéticos de espermatozoides equinos submetidos ao resfriamento e tratados com diferentes concentrações do inibidor da fosfolipase C (U73122). Letras diferentes na mesma linha indicam diferença estatística significativa entre os tratamentos pelo teste de Dunn ($p < 0,05$).

4. CONCLUSÕES

A adição do inibidor U73122 ao sêmen equino resfriado promoveu efeito negativo e dose-dependente sobre a motilidade e cinética espermática. Concentrações de 20 e 30 μ M praticamente inibiram a motilidade, evidenciando que a PLC é essencial para a manutenção da movimentação flagelar. Esses resultados reforçam a importância das vias de sinalização dependentes de cálcio na fisiologia espermática e destacam o U73122 como ferramenta experimental para elucidar mecanismos moleculares envolvidos na motilidade.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Livros

SAMPER, J. C. Artificial insemination in horses: current status and applications. 2. ed. Philadelphia: Saunders Elsevier, 2009.

Artigos

AMANN, R. P.; GRAHAM, J. K. Spermatozoa functional assessment and related advanced laboratory techniques. Theriogenology, Philadelphia, v.64, n.3, p.439-457, 2015.

- ARRUDA, R. P. et al. Avaliação funcional do sêmen resfriado de garanhões: aspectos metodológicos e aplicações. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, Belo Horizonte, v.43, n.2, p.220-229, 2019.
- BREITBART, H. Intracellular calcium regulation in sperm capacitation and acrosomal reaction. *Molecular and Cellular Endocrinology*, Amsterdam, v.187, n.1-2, p.139-144, 2002.
- CONTRI, A. et al. Effect of semen preparation on CASA motility results in cryopreserved bull spermatozoa. *Theriogenology*, Philadelphia, v.74, n.3, p.424-435, 2010.
- FERREIRA, J. C. P. et al. Influência do resfriamento sobre a motilidade e viabilidade espermática em equinos. *Revista Brasileira de Medicina Veterinária e Zootecnia*, Belo Horizonte, v.71, n.4, p.1158-1166, 2019.
- MISHRA, A. K. et al. Role of phospholipase C in calcium signaling: physiological and pathological implications. *Cell Calcium*, London, v.87, p.102-194, 2020.
- NEILD, D. M. et al. Advances in sperm motility evaluation: application of CASA systems in equine reproduction. *Journal of Equine Veterinary Science*, Amsterdam, v.79, p.1-8, 2019.
- OLIVEIRA, R. A. et al. Effect of calcium regulation on cooled equine semen motility and longevity. *Animal Reproduction Science*, Amsterdam, v.227, p.106-718, 2021.
- SUZUKI, K. et al. Phospholipase C-mediated signaling pathways in sperm motility and fertilization. *Reproduction*, Cambridge, v.154, n.2, p.95-106, 2017.

Dissertação

COSTA, K. R. da. Criopreservação de sêmen equino: estudos sobre qualidade espermática. 2025. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Campos dos Goytacazes.

Documentos eletrônicos (softwares)

MICROSOFT CORPORATION. Microsoft Excel. Versão 2018. Redmond: Microsoft, 2018. Software.