

**Efeito da adição de catalase no diluidor de sêmen de garanhões da raça Pônei Brasileiro**

Gizele Fonseca da Silva<sup>1</sup>, Cláudio Avelino de Oliveira Lucena<sup>1\*</sup>, Técio Marlos Lourenço de Sousa<sup>1</sup>,  
Jonatas Martins Pessoa<sup>1</sup>, Marciane da Silva Maia<sup>2</sup>, José Jussier Aquino Maia<sup>3</sup>, Carlos Eduardo  
Bezerra de Moura<sup>4</sup>.

<sup>1</sup> Estudante de Zootecnia, UFRN, Natal/RN. e-mail: [claudioavelinozoo@gmail.com](mailto:claudioavelinozoo@gmail.com)

<sup>2</sup> EMBRAPA/EMPARN

<sup>3</sup> Médico Veterinário Autônomo

<sup>4</sup> Departamento de Morfologia / UFRN, Natal/RN, e-mail: [mouraeduardufm@gmail.com](mailto:mouraeduardufm@gmail.com)

**Resumo:** O objetivo desse estudo foi avaliar por citometria de fluxo o efeito da catalase sobre a integridade da membrana plasmática (IMP) dos espermatozoides durante resfriamento do sêmen de garanhões da raça pônei brasileiro. Foram realizadas coletas de sêmen, semanalmente, de cinco animais, clinicamente saudáveis e em bom estado nutricional, perfazendo um total de 10 amostras por animal. Após a colheita, o ejaculado foi dividido em duas alíquotas e diluído para uma concentração de 25 milhões de espermatozoides/mL, utilizando o diluidor comercial BotuSÊMEN® (leite desnatado, glicose, conservantes, excipientes e antibióticos segundo o fabricante) aditivado ou não com catalase (200 U/ml). A IMP foi avaliada utilizando-se os fluorocromos iodeto de propídio (IP) e diacetato de carboxifluoresceína (DIC). As subpopulações de espermatozoides foram estabelecidas pela coloração, onde as células coradas com DIC eram os espermatozoides vivos, as coradas com IP os espermatozoides mortos, e as com dupla coloração, os espermatozoides moribundos. A porcentagem de espermatozoides vivos foi significativamente maior quando diluidor foi aditivado com catalase ( $68,56 \pm 10,23$  x  $80,23 \pm 17,38$ ;  $p < 0,05$ ). Conclui-se que a catalase está correlacionada positivamente com a preservação da integridade da membrana plasmática de espermatozoides de garanhões da raça Pônei Brasileiro.

**Palavras-chave:** citometria de fluxo, espermatozoide, cavalo.

**Resumo:** The aim of this study was to evaluate by flow cytometry the effect of catalase on the integrity of the plasma membrane (IMP) during cooling of semen of stallions Pony Brazilian. Semen collections were conducted weekly from five animals, clinically healthy and in good nutritional status. A total of ten semen samples per stallion were analyzed. After harvesting, the ejaculate was split into two aliquots and diluted to a concentration of 25 million sperm/mL BotuSÊMEN® using commercial extender (skim milk, glucose, preservatives, excipients, and antibiotics according to the manufacturer) or not doped with catalase (200 UI/ml). IMP was evaluated using the fluorochromes: propidium iodide (IP) and carboxyfluorescein diacetate (DIC). The percentage of live sperm was significantly greater when extender was added with catalase ( $68.56 \pm 10.23$  x  $80.23 \pm 17.38$ ; extender without vs. with catalase,  $p < 0.05$ ). In conclusion, the catalase is positively correlated with the preservation of plasma membrane integrity of spermatozoa of stallions Brazilian Pony breed.

**Palavras-chave:** flow cytometry, spermatozoa, horse.

### Introdução

O Pônei Brasileiro é um cavalo destinado à iniciação de crianças na equitação podendo ser usado também em tração leve. A raça Pônei Brasileiro, é originalmente brasileira, tendo sua descendência na raça escocesa Shetland e na raça argentina Falabella, além de alguma influência de animais oriundos do Paraguai e Uruguai. A raça surgiu no sul do estado de Minas Gerais, região do campo das vertentes e no Triângulo Mineiro, espalhando-se por Goiás, Bahia e demais estados do Nordeste. Hoje em dia está difundida em todo o país, contando com 70 criadores registrados na Associação Brasileira de Criadores do Cavalo Pônei (ABCCPônei, 2012).

Um grande desafio para a maioria dos criadores de pôneis nordestinos é buscar melhorar geneticamente os rebanhos, no entanto, ainda não existem trabalhos avaliando a integridade da membrana plasmática de espermatozoide de garanhões da raça Pônei Brasileira criados nas condições do semiárido nordestino. Essas pesquisas poderiam servir de base para realização de programas de

melhoramento genético e aplicações de biotécnicas reprodutivas, como inseminação artificial (IA) e de transferências de embriões.

Segundo Aitken, (1995) o espermatozoide possui um sistema intracelular de defesa antioxidante contra as espécies oxigênio reativas, que consiste principalmente, de enzimas como: superóxido dismutase, catalase, glutathione peroxidase e redutase, bem como, antioxidantes não enzimáticos como: ácido ascórbico e a-tocoferol. A capacidade biosintética do espermatozoide é limitada, tornando difícil para ele substituir qualquer molécula que tenha sido danificada. Além disso, as enzimas antioxidantes podem estar concentradas na peça intermediária, deixando grande parte da membrana que cobre a cabeça e a cauda menos protegida. Baumer et al., (2002) observaram um efeito benéfico da adição de catalase ao diluidor, no sêmen de equinos. A catalase reduziu significativamente, ( $P < 0,05$ ) a geração de  $H_2O_2$  pelos neutrófilos ativados e prevenindo o declínio no total de espermatozoides móveis.

O objetivo desse estudo foi avaliar por citometria de fluxo o efeito da catalase sobre a integridade da membrana plasmática de espermatozoides do sêmen de garanhões da raça pônei brasileiro criados no Município de Santa Maria, Rio Grande do Norte.

#### **Material e Métodos**

O experimento foi realizado no Haras Orlando Monteiro, localizado no município de Santa Maria – RN, situado na Mesorregião Agreste Potiguar. Foram utilizados cinco garanhões da raça Pônei Brasileiro, com idades entre 5 e 18 anos, clinicamente sadios e em bom estado nutricional. Todos os animais foram mantidos sob as mesmas condições usuais de manejo. Foi realizada uma coleta de sêmen por semana de cada garanhão, durante dez semanas, perfazendo um total de 10 amostras por animal.

O ejaculado, após a colheita, foi dividido em duas alíquotas e diluído para uma concentração de 25 milhões de espermatozoides/mL, utilizando o diluidor comercial BotuSÊMEN® (contendo leite desnatado, glicose, conservantes, excipientes e antibióticos segundo o fabricante) aditivado ou não com catalase (200 U/ml). Após a diluição o sêmen foi colocado em microtubos de 1,5 ml e levado a um contêiner apropriado (BotuBox®, Botucatu, São Paulo) onde foi refrigerado a 5°C por 48 horas. As amostras foram analisadas a fresco, logo após a diluição (0 hora) e após 24 e 48 horas de resfriamento. Em seguida, foi avaliada a integridade de membrana plasmática por meio de citometria de fluxo utilizando-se os fluorocromos iodeto de propídio (IP) e diacetato de carboxifluoresceína (DIC). Conforme metodologia descrita a seguir: Inicialmente, preparou-se uma solução de trabalho contendo os dois fluorocromos (DIC, IP) a qual foi utilizada para a marcação das amostras.

Marcação das amostras - Inicialmente, preparava-se uma suspensão de espermatozoides, diluindo-se 50  $\mu$ L de sêmen em 1 ml de PBS) (diluição 1:20) a qual era mantida a 37°C. Em um ependorf envolvido com papel alumínio, adicionava-se 200  $\mu$ L da suspensão de sêmen e 500  $\mu$ L da solução de trabalho (sondas), a mistura era incubada a 37°C por 10 minutos e em seguida adicionava-se 500  $\mu$ L de formol salino a 0,5%. Essas amostras eram então armazenadas em geladeira protegidas da luz até a leitura em citometro de fluxo (BDFACS Canto II).

As subpopulações de espermatozoides foram estabelecidas usando uma simples coloração, onde as células positivas para a coloração DIC (diacetato de carboxifluoresceína) foram consideradas espermatozoides vivos, as células coradas com IP (iodeto de propídeo) correspondem aos espermatozoides mortos, não sendo incluídas na parcela das células viáveis a reprodução e as células onde foram encontradas as duas colorações ao mesmo tempo no momento das análises, foram classificadas como espermatozoides moribundos, que são aqueles onde a integridade de sua membrana plasmática foi parcialmente lesada. Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) a 5% de significância e pelo teste “t” de Tukey-Kramer para comparar as médias.

### Resultados e Discussão

Ainda não existe um consenso formado entre os pesquisadores sobre os benefícios da adição de catalase na diluição do sêmen de equinos. No presente trabalho, observou-se uma diferença significativa entre os percentuais médios de espermatozoides vivos, moribundos e mortos utilizando o diluidor comercial BotuSÊMEN® com adição de catalase e sem adição de catalase (Tabela 1). A adição de catalase promoveu um aumento na porcentagem de espermatozoides vivos e diminuição dos mortos em função do efeito preventivo da catalase, que está relacionado com a sua capacidade de neutralizar o peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), radical livre oriundo do metabolismo do oxigênio, e que podem causar danos funcionais ao espermatozoide (MAIA e BICUDO 2009).

No entanto, os pesquisadores Merkies et al., (2000) não encontraram efeito significativo da catalase sobre a integridade da membrana plasmática do espermatozoide de cavalos, no entanto esses autores utilizaram na avaliação o método de imunofluorescência, examinando um total de 200 células por amostra. No presente estudo verificou-se que o uso da catalase na diluição do sêmen de pôneis foi bastante significativo, esse fato pode estar relacionado com o método utilizado, a citometria de fluxo, que permitiu avaliar 20000 espermatozoides por amostra, além disso, não há interferência do erro humano, pois análise feita por uma máquina já comprovada de sua eficiência e com um número bem maior de eventos possibilita um índice maior de confiabilidade a informação.

Tabela 1 - Percentuais médios de espermatozoides vivos, moribundos e mortos utilizando o diluidor comercial BotuSÊMEN® com adição de catalase e sem adição de catalase.

Parâmetros (%)	Catalase (UI/ml)	
	0	200
Vivos (%)	68,56 ± 10,	80,23 ± 17,38
Moribundos (%)	62,77 ± 34,22	48,45 ± 28,57
Mortos (%)	20,09 ± 23,62	11,95 ± 9,67

### Conclusões

A adição de catalase ao diluidor teve efeito benéfico na preservação da integridade da membrana plasmática de espermatozoides de garanhões da raça Pônei Brasileiro.

### Literatura citada

- AITKEN, R.J. Free radicals, lipid peroxidation and sperm function. **Reprod. Fertil. Devel.**, v. 7, p. 659-668, 1995.
- BAUMBER, J.; VO, A.; SABEUR, K; BALL, B.A. Generation of reactive oxygen species by equine neutrophils and their effect on motility of equine spermatozoa. **Theriogenology**, v. 57, p.1025-1033, 2002.
- CRISPILHO, A. M.; PAPA, F. O.; ALBERTI K.; FILHO E. R. S.; JÚNIOR A. M.; NOVAES J. L. C.; DELL'AQUA J. A. Eficiência comparativa entre dois diluidores para a congelamento de sêmen bovino sobre os padrões de motilidade e integridade de membrana plasmática. **Arquivos de Veterinária**. v. 22, p. 229-235, 2006.
- MAIA, M.S.; BICUDO S.D. Radicais livres, antioxidantes e função espermática em mamíferos: uma revisão. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.33, p.183-193, 2009.
- MERKIES, K.; CHENIER, T.; PLANTE C.; BUHRRB M.M. Assessment of stallion spermatozoa viability by flow cytometry and light microscope analysis. **Theriogenology**, v. 54, p 1215-1 224, 2000.
- MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO (MAPA). Equídeos. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/animal/especies/equídeos>>. Acesso em: 4 set. 2012.