



Associação entre patologia espermática e perda da motilidade do espermatozoide caprino congelado na presença de Catalase¹

Marciane da Silva Maia², Iralice Montenegro de Medeiros³, Joelma Vasconcelos Celestino da Silva⁴

¹ Financiada pelo BNB/ETENE/FUNDECI

² Pesquisadora Embrapa/Emparn, Natal-RN. E-mail: marcianemaia@yahoo.com.br

³ Bolsista EMATER/ EMPARN, Natal-RN. E-mail: iralice@hotmail.com

⁴ Graduanda em Zootecnia, UFRN, Natal-RN. E-mail: joelma.v.c@hotmail.com

Resumo: O objetivo deste estudo foi determinar as relações entre a morfologia espermática no sêmen fresco e motilidade pós-descongelção no sêmen caprino criopreservado em diluente contendo Catalase. Dezesesseis ejaculados foram coletados de três bodes da raça Alpina Americana. Após a avaliação do sêmen, as amostras foram classificadas de acordo com a morfologia espermática em dois grupos: A (total de espermatozoides anormais - TEA $\geq 30\%$, n=6) e B (TEA $\leq 15\%$, n=10). O sêmen foi diluído em diluidor Tris-gema contendo Catalase (1, 5, ou 10 U/ml/400 x 10⁶ espermatozoides) ou sem antioxidante (controle). Nas amostras do grupo A, a motilidade espermática (MT) média no sêmen fresco, foi 71% e o TEA 38%. Já no grupo B, a MT foi 86% e o TEA 14%. Após a descongelção, a MT, TEA, CD/F e CDG foram significativamente maiores (P < 0,05) no grupo A do que no B; enquanto que a TDM foi menor no grupo A. A adição de catalase em 1 e 5U/mL teve um efeito significativo (P < 0,05) na MT e TDM no grupo A enquanto que acima de 5U/mL induziu uma diminuição na motilidade em ambos os grupos. O grupo com alto percentual de patologia espermática, possivelmente estava passando por estresse oxidativo e nesse caso, a adição de catalase foi suficiente para proteger as células contra a perda de motilidade.

Palavras-chave: antioxidante, criopreservação, morfologia espermática, sêmen.

Association between spermatic pathology and loss of motility on goat sperm frozen with Catalase

Abstract: The aim of this study was to determine relationships among sperm morphology on raw semen and post thaw sperm motility in goat semen, after cryopreservation an extender added with catalase. Sixteen ejaculates were collected from three bucks of American Alpine breed. After semen evaluation the samples were classified according to sperm morphology in two groups: A (total of sperm morphologically abnormal - TEA $\geq 30\%$, n=6) e B (TEA $\leq 15\%$, n=10). The semen was diluted in a Tris-egg yolk extender containing catalase (1, 5 or 10 U/ml/400x 10⁶ sperm) and no antioxidant (control). In the samples of A group the average sperm motility (MT) in the fresh semen was 71% and TEA was 38%. In the B group the MT was 86% and TEA 14%. Post thawing, the MT, TEA, CD/F and CDG were significantly higher (P< 0.05) in A compared to the B group, while TDM was lower in A group. The addition of Catalase at 1 and 5U/ml had a significant (P<0.05) effect on MT and TDM in the A group, while concentrations above 5 U/ml induced a decrease in sperm motility in both groups. The group with high percentage of abnormal morphology was possibly undergoing oxidative stress and in this case, the addition of catalase was sufficient to protect the cells against the loose of motility.

Keywords: antioxidants, freezing, semen, sperm morphology,

Introdução

A inseminação artificial (IA) pode desempenhar um importante papel no desenvolvimento da caprinocultura, uma vez que a utilização do sêmen de reprodutores geneticamente superiores pode ter um benefício direto sobre a produção da progênie. No entanto, a baixa fertilidade obtida na IA cervical com sêmen congelado, limita o uso dessa técnica. Uma das razões para a reduzida fertilidade do sêmen congelado são os danos acarretados ao espermatozoide pelo processo de congelação e descongelção. Esses danos se devem, em parte, ao acúmulo de produtos tóxicos produzidos pelo metabolismo espermático, entre eles, os metabólitos reativos do oxigênio (ROS). As principais fontes de ROS no ejaculado são os próprios





espermatozoides. Sendo que os espermatozoides imóveis e morfológicamente anormais geram maiores quantidades de ROS que os normais (Aitken, 1995; Aziz et al., 2004). Por outro lado, a criopreservação reduz significativamente a atividade dos antioxidantes no sêmen (Bilodeau et al., 2000). Sendo assim, o balanço entre a produção de ROS e sua destoxificação é um fator importante na sobrevivência e função espermática durante o processo de criopreservação. A adição de antioxidantes ao sêmen tem um efeito protetor tanto na atividade metabólica, quanto na viabilidade do espermatozoide criopreservado (Bilodeau et al., 2002; Maia et al., 2009). O objetivo deste estudo foi determinar o impacto da morfologia espermática anormal sobre a motilidade espermática, bem como comparar efeito da adição de catalase, ao diluidor sobre a preservação da motilidade do espermatozoide pós-descongelção.

Material e Métodos

O experimento foi realizado no Laboratório de Tecnologia de Sêmen (LATES) da EMPARN, localizado na Estação Experimental Rommel Mesquita de Faria, no Município de Parnamirin, RN. Foram utilizados três reprodutores caprinos da raça Alpina Americana, com cerca de três anos de idade, dos quais foram colhidos por meio de vagina artificial, 16 ejaculados. Após a colheita, os ejaculados foram avaliados quanto ao volume, aspecto, motilidade, vigor, concentração, viabilidade e morfologia espermática. De acordo com o total de espermatozoides anormais (TEA), os ejaculados foram classificados em dois grupos: A; TEA \geq 30% (n=6) e B; TEA \leq 15% (n=10). Os ejaculados foram submetidos a duas centrifugações (600 x g) para a retirada do plasma seminal e em seguida divididos em quatro alíquotas de volume igual e submetidos à diluição. Foi utilizado o diluidor Tris-glicose-gema (Tris-hidroximetil-aminometano 4,5375 g; ácido cítrico monohidratado 2,6057g; glicose anidra 0,7495 g; gentamicina 13,4 mg; gema de ovo 10% (v/v), Orvus es paste 0,5% (v/v); água destilada para 100 ml e glicerol 10 % (v/v) no meio II, pH 6,8) aditivado ou não com Catalase (SIGMA – C1345), conforme os seguintes tratamentos: Controle (Tris, sem antioxidante); CAT 1U (Tris + catalase 1U/400 milhões spz/ml); CAT 5U (Tris + catalase 5U/400 milhões spz/ml) e CAT 10U (Tris + catalase 10 U/400 milhões spz/ml). A diluição foi feita à temperatura ambiente em duas etapas, para uma concentração de 400×10^6 espermatozoides/mL e a Catalase foi adicionada após a segunda diluição. A congelação foi realizada em sistema automatizado, modelo Tetakon® -TK 3000 (TK Tecnologia em congelação Ltda), na curva P4S1. As palhetas foram armazenadas em botijão criobiológico e antes das avaliações foram descongeladas em banho-maria à 37°C por 30 segundos. Os dados foram submetidos à ANOVA com comparação de médias pelo teste de Tukey a $P < 0,05$.

Resultados e Discussão

No sêmen fresco, o grupo A teve significativamente ($P < 0,05$) mais alto percentual de espermatozoides anormais (TEA), cauda dobrada ou fortemente dobrada (CD/F) e caudas dobradas com gota (CDG) que o grupo B, enquanto que a motilidade espermática foi significativamente menor no grupo A que no B. Após a descongelção, as patologias espermáticas (TEA, CD/F e CDG) continuaram significativamente maiores ($P < 0,05$) no grupo A comparado ao B. No entanto, nesse grupo houve uma melhor preservação da motilidade espermática durante o processo congelação e descongelção. A MT foi maior e a taxa de degradação da motilidade (TDM) foi menor no grupo A que no B (Tabela 1). Observou-se ainda uma correlação positiva significativa entre a motilidade espermática pós-descongelção e o percentual de CD/F ($r = 0,39$; $P = 0,0001$) e com CDG ($r = 0,30$; $P = 0,001$) e uma correlação negativa entre a TDM e o CD/F ($r = -0,44$; $P = 0,0000$) e CDG ($r = -0,29$; $P = 0,001$). A associação entre motilidade pós-descongelção e as patologias de cauda (CD/F e CDG) pode ser atribuída ao aumento da retenção de citoplasma residual, uma vez que segundo Nichi et al. (2007) as gotas citoplasmáticas podem proteger o espermatozoide contra o efeito dos ROS devido a um maior conteúdo de antioxidantes enzimáticos que podem estar presentes no citoplasma residual. A adição de Catalase (1U e 5U/ml) teve um efeito benéfico na preservação da motilidade espermática apenas nas amostras de sêmen com alto percentual de patologias espermática (Grupo A). Porém, no Grupo B, observou-se que a adição de catalase (5U/ml) também melhorou esses parâmetros. Bilodeau et al. (2002) relataram que o H_2O_2 é a ROS responsável pela perda da motilidade do espermatozoide bovino, e que a adição de Catalase (1-5 U/mL) era suficiente para neutralizar





completamente o efeito negativo do H₂O₂ sobre a motilidade espermática, confirmando os resultados observados em nosso estudo.

Tabela 1- Parâmetros espermáticos (média ± ep) no sêmen caprino fresco (SF) e após a descongelção, de acordo com o tratamento e com a qualidade do ejaculado.

PARAMETRO	GRUPO	SF	TRATAMENTO				TOTAL
			Controle	CAT 1U	CAT 5U	CAT 10U	
MT (%)	B	86,5±1,6 ^A	37,2±3,0 ^B	36,7±3,0 ^B	41,8±3,0 ^B	33,6±3,0	37,3±1,5 ^B
	A	71,7±2,1 ^B	45,0±3,7 ^{aA}	43,3±3,7 ^{aA}	48,3±3,7 ^{aA}	35,0±3,7 ^b	42,9±1,8 ^A
TEA (%)	B	14,6±0,9 ^B	42,2±2,7 ^B	45,1±2,7 ^B	45,1±2,7 ^B	48,4±2,7 ^B	45,2±1,4 ^B
	A	38,7±1,2 ^A	64,3±3,3 ^A	59,3±3,3 ^A	61,3±3,3 ^A	66,0±3,3 ^A	62,7±1,6 ^A
CD/F (%)	B	6,0 ± 1,2 ^B	5,6 ± 0,9	6,8 ± 0,9	6,2 ± 0,9	8,3±0,9	6,7±0,43 ^B
	A	16,7±1,6 ^A	11,7± 1,1	13,0± 1,1	11,3 ± 1,1	10,7±1,1	11,7±0,5 ^A
CDG (%)	B	0,4 ± 0,5 ^B	0,3 ± 0,5	0,2±0,5	0,2 ± 0,5	0,3±0,5	0,3±0,3 ^B
	A	8,0 ± 0,7 ^A	8,7 ± 0,7	8,3±0,7	6,7 ± 0,7	8,0±0,7	7,9±0,3 ^A
TDM (%)	B		57,2±3,6 ^A	58,1±3,6 ^A	51,9±3,6 ^A	61,8±3,6	57,2±1,7 ^A
	A		36,9±4,4 ^{bB}	39,6±4,4 ^{bB}	32,3±4,4 ^{bB}	49,9±4,4 ^a	39,7±2,2 ^B

Valores seguidos de letras diferentes, maiúsculas na coluna e minúsculas na linha, para cada parâmetro, diferem entre si a P < 0,05 pelo teste de Tukey. Grupo A; alta % TDE, grupo B; baixo % TDE.

A maior susceptibilidade dos espermatozoides do grupo A ao efeito do antioxidante pode ser atribuída a uma ação sinérgica entre a Catalase exógena e os antioxidantes presentes no sêmen. Diversos estudos mostram correlação positiva entre produção de ROS e a percentagem de espermatozoides anormais no sêmen (Aitken, 1995; Aziz et al., 2004) bem como o efeito deletério dos ROS sobre a motilidade espermática (Bilodeau et al., 2002; Aitken, 1995). No entanto, considerando o maior conteúdo de antioxidantes presente nas gotas citoplasmáticas (Nichi et al., 2007) a Catalase adicionada ao diluidor potencializou a capacidade antioxidante do sêmen e foi suficiente para reverter o efeito negativo dos ROS sobre a motilidade espermática.

Conclusões

A adição de catalase preservou a motilidade espermática nas amostras com alto percentual de espermatozoides anormais.

Literatura citada

- 1- Aitken, RJ. Free radicals, lipid peroxidation and sperm function. **Reprod Fertil Dev**, v.7, p.659-668, 1995.
- 2- Aziz N.; Saleh, AR.; Sharma, R.K.; Lewis-Jones, I.; Esfandiari, N.; Thomas Jr., A.J.; Agarwal, A. Novel association between sperm reactive oxygen species production, sperm morphological defects, and the sperm deformity index. **Fertility and Sterility**, v.2, n.81, p.349-354, 2004.
- 3- Bilodeau JF, Chatterjee S, Sirard MA, Gagnon C. Levels of antioxidant defenses are decreased in bovine spermatozoa after a cycle of freezing and thawing. **Mol Reprod Dev**, v.55, p.282-288, 2000.
- 4- Bilodeau JF, Blanchette S, Cormier N, Sirad, M-A. Reactive oxygen species-mediated loss of bovine sperm motility in egg yolk Tris extender: protection by pyruvate, metal chelators and bovine liver or oviductal fluid catalase. **Theriogenology**, v.57, p.1105-1122, 2002.
- 5- Maia MS, Bicudo SD, Azevedo HC, Sicherle CC, Sousa DB, Rodello L. Motility and viability of ram sperm cryopreserved in a Tris-egg yolk extender supplemented with anti-oxidants. **Small Rumin Res**, v.85, p.85-90, 2009.
- 6- Nichi, M.; Goovaerts, I.G.F.; Cortada, C.N.M.; Barnabe, V.H.; De Clercq, J.B.P.; Bols, P.E.J. Roles of lipid peroxidation and cytoplasmic droplets on in vitro fertilization capacity of sperm collected from bovine epididymides stored at 4 and 34 °C. **Theriogenology**, v. 67, p. 334-340, 2007.

