

ANÁLISE DOS EFEITOS DO α -TOCOFEROL E DO RESVERATROL NO DESCONGELAMENTO DE SÊMEN SUÍNO

ANA LAURA DA SILVA FEIJÓ¹; ISADORA ANDRÉ ROSA LOPES¹; MORGANA
ALVES BORGES¹; JÚLIA DAMÉ FONSECA PASCHOAL¹; WILLIAM BORGES
DOMINGUES²; TIAGO VEIRAS COLLARES¹

¹ Universidade Federal de Pelotas- Grupo de Pesquisa em Oncologia Celular e Molecular –GPO/
Laboratório de Biotecnologia do Câncer, Centro de Desenvolvimento Tecnológico (CDTec)

²Laboratório de Genômica Estrutural, Centro de Desenvolvimento Tecnológico
(CDTec)sf.analaura@gmail.com; collares.t@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

A criopreservação é uma técnica de armazenamento das células ou tecidos, e é empregada com sucesso em diferentes áreas (KOPEIK, THORNHIL e KHALAF, 2014). Com relação às células espermáticas da espécie suína, este processo apresenta uma baixa eficiência visto que os espermatozoides suínos apresentam alta suscetibilidade a baixas temperaturas, levando a qualidade do sêmen criopreservado ser inferior ao fresco (GROSSFELD et al., 2008). Tal característica é possivelmente relacionada à composição lipídica da membrana, a qual contém uma alta concentração de ácidos graxos poliinsaturados (CEROLINI et al., 2000). Além disso, o processo de criopreservação aumenta consideravelmente os níveis de espécies reativas de oxigênio (EROs) que podem afetar a qualidade espermática (BATHGATE, 2011), levando a danos à integridade das membranas plasmática e acrossomal, ao DNA genômico e às mitocôndrias, comprometendo a motilidade espermática e a sua capacidade de interação com o oócito, prejudicando sua viabilidade e funcionalidade (BANSAL e BILASPURI, 2011).

O α -tocoferol é o composto mais abundante e biodisponível da vitamina E, sendo o mesmo lipossolúvel e com grande atividade antioxidante, capaz de proteger organismos contra danos mediados por EROs (BRIGELIUS-FLOHE e TRABER, 1999). Já foi demonstrado efeito protetor contra citotoxicidade de agentes estressantes (PIGA et al., 2007), proteção celular contra toxicidade de peróxido de hidrogênio (VARGAS et al., 2014) e também uma potente ação anti-inflamatória (SINGH, DEVARAJ e JIALAL, 2005; HERRERA e BARBAS, 2001).

O Resveratrol (3, 5, 4'-trihidroxi-trans-estilbeno) é um composto polifenólico natural encontrado principalmente em uvas e amendoim (SMOLIGA e BAUR, 2011). Esta molécula destaca-se por suas propriedades anti-inflamatória, anti-tumorigênica, e anti-oxidante (BAUR et al., 2006). Além disso, ainda é capaz de induzir a expressão de outros anti-oxidantes, gerando uma redução global do estresse oxidativo (HALLIWELL, 2007).

Dessa forma, o objetivo do presente trabalho foi verificar a ação de diferentes concentrações de α -tocoferol e de resveratrol no descongelamento de sêmen suíno sobre a motilidade e a integridade de membrana espermática.

2. METODOLOGIA

2.1 Dos compostos

As moléculas utilizadas foram adquiridas comercialmente. Foram feitas diluições seriadas em meio DMEM (Dulbecco MEM) para que as soluções de trabalho estivessem nas concentrações de 0,5, 1 e 2 μ M de α -tocoferol e de resveratrol.

2.2 Do preparo do sêmen

Palhetas de sêmen suínos de três machos de linhagem comercial do Grupo de Ensino e Pesquisa em Reprodução Animal – ReproPel, foram descongeladas em banho maria a 36,5°C por 30s. O conteúdo das palhetas foi depositado em 4mL de meio DMEM previamente aquecido a 36°C. As amostras foram centrifugadas duas vezes durante 5 min a 750 rpm, com remoção do sobrenadante após a primeira centrifugação e adição de novo meio. Ao final da segunda centrifugação, o pellet foi coletado e realizada o cálculo de concentração de células com o auxílio de uma câmara de Neubauer. Foi utilizada a concentração de 1×10^6 espermatozoides/ 200 μ L para cada grupo experimental.

2.3 Das análises das amostras

Foram testados sete grupos diferentes, os quais foram incubados por 15 minutos nos seus respectivos tratamentos, sendo estes: α -tocoferol 0,5 μ M, α -tocoferol 1 μ M, α -tocoferol 2 μ M, resveratrol 0,5 μ M, resveratrol 1 μ M, resveratrol 2 μ M e um grupo controle sem tratamento. As células espermáticas foram avaliadas imediatamente após a incubação, para avaliação de motilidade e vigor, sendo todos os grupos classificados por três avaliadores diferentes com o auxílio de um microscópio óptico, e a viabilidade celular através do ensaio de fluorescência LIVE/DEAD® *Sperm Viability Kit (L-7011, Life Technologies, USA)*, analisada em microscopia eletrônica confocal (Leica TCS SP8).

O teste estatístico utilizado foi análise de variância de duas vias (*two-way ANOVA*), seguido de teste de *Tukey*. Os resultados foram descritos com os valores médios para cada grupo de dados $\pm$ erro padrão da média, onde o grau de significância estatística em todas as análises foi definido em nível de probabilidade de $p < 0,05$.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Com base nas análises realizadas observamos que não houve diferença estatística nos parâmetros relacionados à motilidade total, porcentagem de células íntegras e na porcentagem de células lesadas quando comparados os grupos tratados ao grupo controle conforme demonstrado na Figura 1.

Porém, estas moléculas podem apresentar diferentes resultados quando testadas em concentrações distintas das usadas no experimento ou em células espermáticas de outras espécies (NASHTAEI et al. 2018). E apesar de que os tratamentos com as moléculas nas concentrações de 0,5, 1 e 2 μ M não ter apresentado resultados significativos em relação aos critérios analisados, os mesmos podem retratar efeitos positivos quando relacionados à taxa de penetração (LONGOBARDI et al., 2017; BUCCI et al., 2018), proteção do material genético (CABRITA et al., 2011) ou a diminuição dos níveis intracelular de espécies reativas de oxigênio (LONGOBARDI et al., 2017).

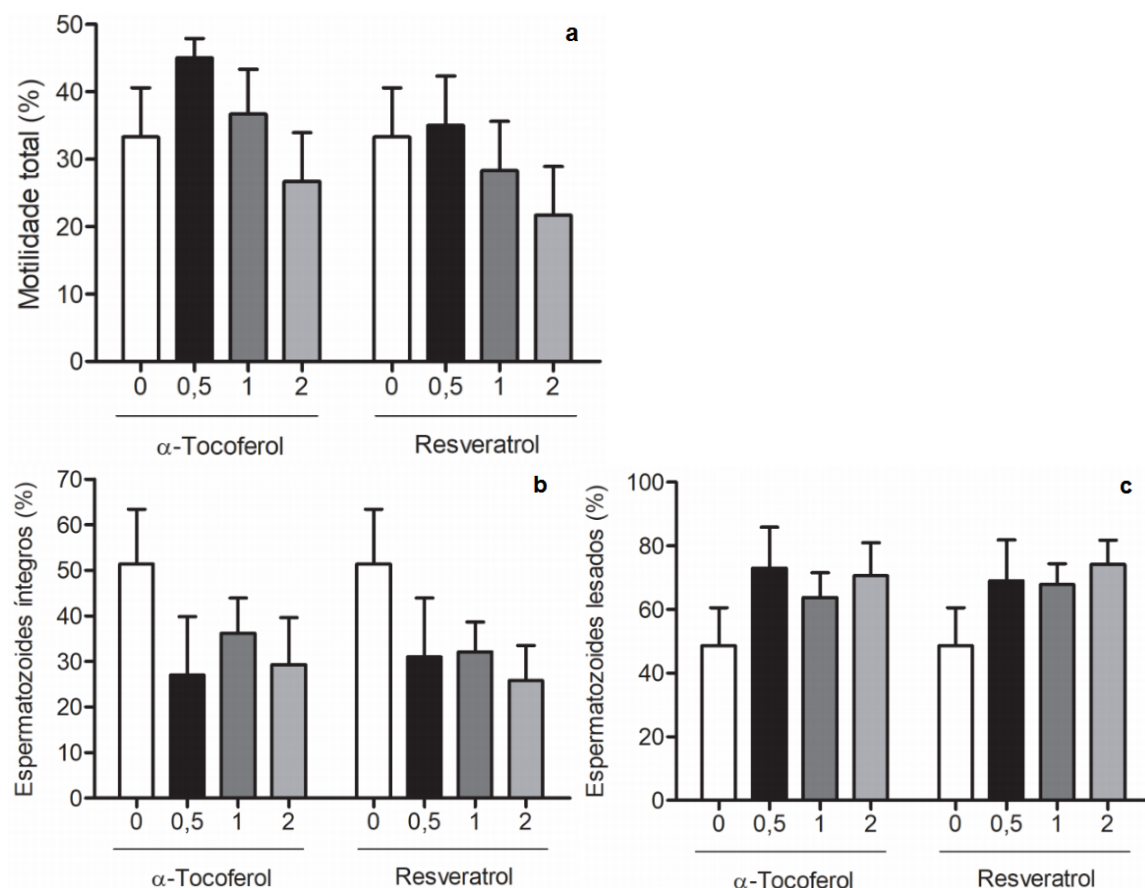


Figura 1: Gráficos representando as análises de células espermáticas suínas após 15min de incubação com três diferentes concentrações (0,5, 1 e 2 μ M) de α -tocoferol e resveratrol. Sendo **a**-porcentagem de motilidade total **b**-porcentagem de células espermáticas integras **c**-porcentagem de células espermáticas lesadas.

4. CONCLUSÕES

As moléculas testadas não afetaram as células espermáticas suínas com relação à porcentagem de motilidade, espermatozoides íntegros e espermatozoides lesados nas concentrações de 0,5 μ m, 1 μ M e 2 μ m e também as mesmas não apresentaram toxicidade. Assim, se faz necessário à realização de mais estudos sobre diferentes padrões de qualidade e viabilidade espermática, bem como diferentes concentrações das moléculas.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

KOPEIKA, Julia; THORNHILL, Alan; KHALAF, Yacoub. The effect of cryopreservation on the genome of gametes and embryos: principles of cryobiology and critical appraisal of the evidence. **Human reproduction update**, v. 21, n. 2, p. 209-227, 2014.

GROSSFELD, R. et al. New aspects of boar semen freezing strategies. **Theriogenology**, v. 70, n. 8, p. 1225-1233, 2008.

CEROLINI, S. et al. Viability, susceptibility to peroxidation and fatty acid composition of boar semen during liquid storage¹. **Animal Reproduction Science**, v. 58, n. 1-2, p. 99-111, 2000.

BATHGATE, R. Antioxidant mechanisms and their benefit on post-thaw boar sperm quality. **Reproduction in domestic animals**, v. 46, p. 23-25, 2011.

BANSAL, Amrit Kaur; BILASPURI, G. S. Impacts of oxidative stress and antioxidants on semen functions. **Veterinary Medicine International**, v. 2011.

BRIGELIUS-FLOHE, Regina; TRABER, Maret G. Vitamin E: function and metabolism. **The FASEB Journal**, v. 13, n. 10, p. 1145-1155, 1999.

PIGA, Rosaria et al. Cytotoxic effects of various stressors on PC12 cells: involvement of oxidative stress and effect of antioxidants. **Neurotoxicology**, v. 28, n. 1, p. 67-75, 2007.

VARGAS, Fernanda da Silveira et al. Dose-response and time-course of a-tocopherol mediating the cytoprotection of dental pulp cells against hydrogen peroxide. **Brazilian dental journal**, v. 25, n. 5, p. 367-371, 2014.

SINGH, U.; DEVARAJ, S.; JIALAL, I. Vitamin E, oxidative stress, and inflammation. **Annu. Rev. Nutr.**, v. 25, p. 151-174, 2005.

HERRERA, E.; BARBAS, C. Vitamin E: action, metabolism and perspectives. **Journal of physiology and biochemistry**, v. 57, n. 1, p. 43-56, 2001.

SMOLIGA, James M.; BAUR, Joseph A.; HAUSENBLAS, Heather A. Resveratrol and health—a comprehensive review of human clinical trials. **Molecular nutrition & food research**, v. 55, n. 8, p. 1129-1141, 2011.

JANG, Meishiang et al. Cancer chemopreventive activity of resveratrol, a natural product derived from grapes. **Science**, v. 275, n. 5297, p. 218-220, 1997.

BAUR, Joseph A. et al. Resveratrol improves health and survival of mice on a high-calorie diet. **Nature**, v. 444, n. 7117, p. 337, 2006.

HALLIWELL, Barry. Dietary polyphenols: good, bad, or indifferent for your health?. **Cardiovascular research**, v. 73, n. 2, p. 341-347, 2007.

NASHTAEI, Maryam Shabani et al. Cryoprotective effect of resveratrol on DNA damage and crucial human sperm messenger RNAs, possibly through 5' AMP-activated protein kinase activation. **Cell and tissue banking**, v. 19, n. 1, p. 87-95, 2018.

LONGOBARDI, Valentina et al. Resveratrol prevents capacitation-like changes and improves in vitro fertilizing capability of buffalo frozen-thawed sperm. **Theriogenology**, v. 88, p. 1-8, 2017

BUCCI, Diego et al. Combined effects of resveratrol and epigallocatechin-3-gallate on post thaw boar sperm and IVF parameters. **Theriogenology**, v. 117, p. 16-25, 2018.

CABRITA, Elsa et al. The influence of certain aminoacids and vitamins on post-thaw fish sperm motility, viability and DNA fragmentation. **Animal reproduction science**, v. 125, n. 1-4, p. 189-195, 2011.