

EFEITOS DA ADIÇÃO DE MELATONINA AO SÊMEN CAPRINO SOBRE O POTENCIAL MITOCONDRIAL ESPERMÁTICO

Domingos Lollobrigida de Souza Netto¹, Ítalo Augusto da Costa Soares², Carlos Thiago Silveira Alvim Mendes de Oliveira³, Andreia Ferreira Machado⁴, Oswaldo de Barros Lollobrigida⁵, Ciro Alexandre Alves Torres⁶

Resumo: Quando a função mitocondrial da célula espermática está comprometida, há uma excessiva produção de radicais livres que afetam a viabilidade celular, diminuindo sua taxa de fertilidade. O sêmen colhido de dois bodes Alpinos e dois bodes Saanen foi diluído e congelado utilizando diferentes concentrações de melatonina, que constituíram os tratamentos: 0µl (controle), 1µl, 1mM, 2mM, 3mM e 4mM, para posterior análise do potencial da membrana mitocondrial espermática ($\Delta\Psi_m$) por citometria de fluxo. Foi encontrada diferença ($P<0.05$) entre raças e tratamentos para alto potencial de atividade mitocondrial, a raça Alpina demonstrou queda em relação ao controle em concentrações acima de 2 mM de melatonina, evidenciando menor taxa metabólica espermática. Houve também interação ($P<0.05$) das raças para baixo potencial de atividade mitocondrial, sendo que a raça Saanen obteve maior valor indicando menor resistência à incubação com a sonda. A maior concentração espermática com baixo potencial entre os tratamentos três e quatro mM indica menor taxa metabólica em elevadas

¹ Mestrando em Medicina Veterinária – Universidade Federal de Viçosa. e-mail: domingoslollobrigida@yahoo.com.br

² Doutorando em Zootecnia – Universidade Federal de Viçosa. e-mail: italomedvet@hotmail.com

³ Doutor em Zootecnia – Universidade Federal de Viçosa. e-mail: ctsamo@gmail.com
Mestranda em Zootecnia – Universidade Federal de Viçosa. e-mail: andreia_fmachado@hotmail.com

⁴ Mestranda em Zootecnia – Universidade Federal de Viçosa. e-mail: andreia_fmachado@hotmail.com

⁵ Graduando em Zootecnia – Universidade Federal de Viçosa. e-mail: o.lollobrigida@gmail.com

⁶ Professor Orientador, Doutor em Endocrinologia e Fisiologia da Reprodução – Universidade de Wisconsin-Madison, Professor Voluntário Contratado do Departamento de Zootecnia – Universidade Federal de Viçosa. e-mail: cirotorres11@gmail.com

concentrações de melatonina e concomitantemente baixa proporção de membrana plasmática íntegra com peróxido de hidrogênio intracelular, os resultados apontam para a alta sensibilidade mitocondrial ao choque osmótico. Conclui-se que a incorporação de melatonina manteve a viabilidade espermática, mas não melhorou a congelabilidade do sêmen caprino.

Palavras-chave: Antioxidante, criopreservação, mitocôndria, viabilidade espermática

Introdução

A síntese de espécies reativas de oxigênio (ROS) em quantidades pequenas desempenha importância fundamental na viabilidade espermática e fecundação, porém quando a sua produção durante o processo de criopreservação espermática ultrapassa a capacidade antioxidante do meio intracelular e extracelular instaura o estresse oxidativo, que resulta em importantes danos ao DNA da célula espermática. No estudo objetivou-se analisar a eficiência da inclusão de melatonina em diferentes concentrações como potente antioxidante na criopreservação de sêmen caprino, via citometria de fluxo.

Material e Métodos

O experimento foi conduzido após aprovação pela Comissão de Ética no Uso de Animais da UFV (CEUA) com o número de registro 81/2014, no setor de Caprinocultura do Departamento de Zootecnia da Universidade Federal de Viçosa. Utilizou-se quatro reprodutores caprinos adultos com histórico reprodutivo comprovado, sendo dois da raça Alpina e dois da raça Saanen, colheu-se sete ejaculados por animal que foram diluídos em meio comercial Botubov® à base de gema de ovo, as diferentes concentrações de melatonina foram distribuídas nos seguintes tratamentos: T1: Controle sem melatonina; T2: 1µM; T3: 1mM; T4: 2 mM; T5: 3 mM; T6: 4 mM. O pré-congelamento foi realizado em vapor de nitrogênio líquido, e

descongelou-se o sêmen em banho-maria a 37° C por 30 segundos. Após o descongelamento foram realizadas as análises de $\Delta\Psi_m$ mediante a utilização da sonda JC-1, emitindo fluorescência verde na mitocôndria despolarizada e laranja na mitocôndria polarizada. Foram analisadas trinta mil células por amostra e divididas em dois grupos: Alto Potencial Mitochondrial (APM) e Baixo Potencial Mitochondrial (BPM), sendo as médias analisadas pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

Resultados e Discussão

No que se refere ao potencial de atividade mitocondrial, houve interação ($P<0.05$) entre raças e tratamento para população espermática com alto potencial mitocondrial. A raça alpina apresentou queda em relação ao controle para células com alto potencial mitocondrial em concentrações acima de 2 mM de melatonina. Houve diferença significativa entre raças para alto potencial mitocondrial de todos os tratamentos, exceto para o tratamento 4mM de melatonina (tabela 1). Reforçando assim, que o alto potencial mitocondrial na raça Alpina, é supostamente devido a menor taxa metabólica espermática.

Tabela 1. Médias $\pm$ erros padrão das porcentagens de populações espermáticas em relação à alta atividade mitocondrial avaliadas em espermatozoides criopreservados de caprinos das raças Alpina e Saanen, avaliados por citometria de fluxo.

Tratamento	Potencial de atividade mitocondrial alto (JC-1 alto*) ALPINA	Potencial de atividade mitocondrial alto (JC-1 alto*) SAANEN
0	30.64 $\pm$ 4.42 ^{a1}	10.84 $\pm$ 3.67 ^{a2}
1 μ M	29.25 $\pm$ 4.88 ^{ab1}	13.91 $\pm$ 4.71 ^{a2}
1mM	27.74 $\pm$ 3.42 ^{ab1}	12.00 $\pm$ 4.43 ^{a2}
2mM	22.10 $\pm$ 3.85 ^{abc1}	11.38 $\pm$ 2.98 ^{a2}
3mM	20.34 $\pm$ 4.01 ^{bc1}	8.77 $\pm$ 3.35 ^{a2}
4mM	12.91 $\pm$ 2.83 ^{c1}	6.83 $\pm$ 1.67 ^{a1}

^{a, b, c} Letras diferentes nas médias dentro da mesma coluna indicam diferença ($P<0,05$).

^{1,2} Números diferentes nas médias nas linhas indicam diferença ($P<0,05$).

*JC1 alto, espermatozoides com alto potencial mitocondrial.

A hiperosmolaridade pode ter afetado o potencial de atividade mitocondrial, mantendo-o baixo em todos os tratamentos (tabela 2). A grande quantidade de espermatozoides apresentando baixo potencial mitocondrial entre os tratamentos três mM e quatro mM é indicativo da menor taxa metabólica dos espermatozoides congelados com elevadas concentrações de melatonina, refletindo na baixa proporção de células com membrana plasmática íntegra e com peróxido de hidrogênio intracelular (Alpina 20.59 – 15.17 % e Saanen 16.28 – 14.57 % respectivamente). Isso se deve à alta sensibilidade mitocondrial ao choque osmótico, conforme demonstrado (POMMER *et al.*, 2002; RUTLLANT *et al.*, 2003; CORREA *et al.*, 2007; MACIAS *et al.*, 2011).

Tabela 2. Médias $\pm$ erros padrão das porcentagens de populações espermáticas em relação à média atividade mitocondrial avaliadas em espermatozoides criopreservados de caprinos por citometria de fluxo.

Tratamento	Potencial de atividade mitocondrial médio (JC-1 baixo*)
0	75.55 $\pm$ 2.85 ^c
1 μ M	75.49 $\pm$ 3.15 ^c
1mM	76.81 $\pm$ 2.85 ^c
2mM	80.58 $\pm$ 2.36 ^{bc}
3mM	83.07 $\pm$ 2.48 ^{ab}
4mM	87.79 $\pm$ 1.53 ^a

^{a,b,c} Letras diferentes na coluna indicam diferença (P<0,05).

*JC1 médio, espermatozoides com médio potencial mitocondrial.

Encontrou-se diferença (P<0.05) entre as raças para baixo potencial de atividade mitocondrial, a raça Saanen obteve maior valor comparado à raça Alpina (tabela 3), sugerindo menor resistência durante a incubação com a sonda JC-1.

Tabela 3. Médias $\pm$ erros padrão das porcentagens de populações espermáticas em relação à baixa atividade mitocondrial avaliadas em espermatozoides criopreservados de caprinos das raças Alpina e Saanen, avaliadas por citometria de fluxo.

Raça	Potencial de atividade mitocondrial baixo (JC-1 baixo*)
Alpina	73.93 $\pm$ 1.54 ^b
Saanen	85.84 $\pm$ 1.28 ^a

^{a,b} Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença ($P < 0,05$).

*JC1 baixo, espermatozoides com baixo potencial mitocondrial.

Conclusões

Conclui-se que a adição de melatonina proporcionou condições para manutenção da viabilidade espermática in vitro, apesar de não apresentar resultados superiores ao controle. Não foi observado efeito antioxidante da melatonina na criopreservação do sêmen de caprinos.

Agradecimentos

Os pesquisadores agradecem o apoio financeiro do CNPq (Conselho Nacional de Pesquisa, Brasil) e a BOTUPHARMA (São Paulo, Brasil) pela doação dos diluentes utilizados na criopreservação do sêmen.

Referências Bibliográficas

POMMER, A. C.; RUTLLANT, J.; MEYERS, S. A. The role of osmotic resistance on equine spermatozoal function. **Theriogenology**, v. 58, p. 1373-1384. 2002.

RUTLLANT, J.; POMMER, A. C.; MEYERS, S. A. Osmotic tolerance limits and properties of rhesus monkey (Macaca mulatta) spermatozoa. **Journal of Andrology**, v. 24, p. 534-541. 2003.

MACIAS, G. B.; MIRO, M. A.; GONZALEZ, F. L.; ORTEGA, F. C.; MORILLO, R. A.; GALLARDO BOLANOS, J. M.; BALAO DA SILVA, C. M.; RODRIGUEZ, M. H.; TAPIA, J. A.; PEÑA, F. J. The mitochondria of stallion spermatozoa are more sensitive than the plasmalemma to osmotic induced stress: role of c-Jun Nterminal kinase (JNKs) pathway. **Journal of Andrology**, v. 33, p. 105-113. 2011.

CORREA, L. M.; THOMAS, A.; MEYERS, S. A. The macaque sperm actin cytoskeleton reorganizes in response to osmotic stress and contributes to morphological defects and decreased motility. **Biology of Reproduction**, v. 77, p. 942-953. 2007.