

QUALIDADE SEMINAL APÓS A SUPLEMENTAÇÃO DE REPRODUTORES SUÍNOS COM FONTES DE ÁCIDOS GRAXOS POLI-INSATURADOS

FRANCISCO DE ASSIS ARAÚJO CAMELO JR¹; GEÓRGIA DA CRUZ TAVARES²; EDENARA ANASTÁCIO DA SILVA²; FABIANA MOREIRA²; YARA TAYANA ANDRIOLA²; THOMAZ LÚCIA JR³.

¹Faculdade de Veterinária- Universidade Federal de Pelotas
junior_camelo01@hotmail.com

²Núcleo de Ensino e Pesquisa em Reprodução Animal (ReproPel)- Universidade Federal de Pelotas

³Núcleo de Ensino e Pesquisa em Reprodução Animal (ReproPel)- Universidade Federal de Pelotas
tluciajr@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

O uso de sêmen congelado é atrativo para a indústria, visto que permite uma difusão mais intensa do material genético. Entretanto, o sêmen suíno é expressamente sensível a danos funcionais promovidos pelo processo de congelamento e descongelamento.(PURSE L& JOHNSON, 1975). Além do mais, a avaliação da fertilidade de machos reprodutores não é precisa, pois além da variação entre os indivíduos nas análises convencionais que qualificam o sêmen, como motilidade e morfologia espermática, não se tem até o presente momento uma associação consistente dessas análises com o potencial reprodutivo dos machos.

Na espécie suína, devido as peculiaridades das células espermáticas, se preconiza o uso de sêmen refrigerado na técnica de inseminação artificial (IA). Atualmente, a pesquisa para maximização do uso de machos suínos na IA está direcionada para a conservação da célula espermática e a redução do número de espermatozoides/fêmea/ano (BORTOLOZZO, 2005). A nutrição de reprodutores pode influenciar a quantidade de sêmen (número de espermatozoides e volume do ejaculado), especialmente em animais jovens e sob condições desfavoráveis de ambiente (HUGONIN, 2001). Dessa forma, a manipulação da dieta também tem se mostrado uma importante ferramenta para maximizar a produtividade, melhorando a qualidade do ejaculado.

Os lipídios presentes na ração são importantes constituintes orgânicos, devido aos seus elevados valores energéticos e também pela presença de ácidos graxos essenciais. Alguns trabalhos têm relacionado a adição de ácidos graxos poli-insaturados (PUFAs), principalmente ômega 3 e 6, na alimentação dos reprodutores, podendo exercer uma melhora nas características seminais destes animais. Isto se daria pela composição lipídica da membrana espermática (OLIVEIRA, 2006).

Sabe-se que a redução de PUFAs em relação aos demais lipídios na membrana do espermatozoide reduziu significativamente a qualidade espermática (CEROLINI, 2001). STRZEZEK (2004) observou que a adição de ácido docosahexaenóico (DHA) e de ácido eicosapentaenóico (EPA) na dieta de machos suínos proporcionou melhora na qualidade espermática do sêmen in natura. Assim, a inclusão de PUFAs na ração poderia ocasionar melhorias nas características reprodutivas dos varrões.

Sendo assim, o objetivo deste estudo foi determinar a influência da suplementação com DHA extraído de microalgas heterotróficas sobre a qualidade do sêmen de machos suínos refrigerado por 72 horas.

2. METODOLOGIA

Foram utilizados seis machos suínos de linhagem comercial, com idade entre 16 e 30 meses, alojados em baias individuais em um mesmo galpão provenientes do Núcleo de Ensino e Pesquisa em Reprodução Animal- ReproPel. Os animais se encontravam sob as mesmas condições ambientais e de manejo, recebendo uma dieta isoenergética, duas vezes ao dia totalizando 2,5 Kg/animal/dia (NRC,1998). Três machos compuseram o grupo controle não sendo ofertado suplementação, enquanto os demais machos receberam a mesma ração suplementada com 150 g de farinha de alga contendo ômega-3, totalizando uma suplementação diária de 18% de DHA. O suplemento foi fornecido uma vez ao dia, durante 75 dias.

A coleta dos ejaculados foi realizada pelo método da mão enluvada, utilizando frascos de 300 mL aquecidos a 38° C e cobertos com filtro, a fim de separar a fração gelatinosa do restante do sêmen. Seguindo um regime de duas coletas de sêmen por semana, foram coletados 16 ejaculados de cada macho (n=216). Imediatamente após a coleta, o sêmen era diluído em meio *Beltsville Thawing Solution* (BTS) (PURSEL & JHONSON, 1975) sendo a concentração final de 3×10^9 espermatozoides móveis em 100 mL (CBRA, 2013). As amostras foram armazenadas em refrigerador a 17°C durante 72 horas, realizando-se as análises espermáticas nos períodos de 0, 24, 48 e 72h. As coletas e análises ocorreram a partir da primeira semana de suplementação e foram concluídas dois meses após a finalização da suplementação.

Para a avaliação das estruturas espermáticas foi utilizada a citometria de fluxo (Attune®). A integridade da membrana espermática foi avaliada através da associação entre as sondas diacetato de carboxifluoresceína e iodeto de propídio (Harrison, 1990), com a classificação dos espermatozoides em não lesionados ou lesionados. A integridade do acrossoma foi avaliada com o uso do conjugado *Arachis hypogaea* - FITC (Tabuchi, 2008) e a fluidez da membrana plasmática com o uso das sondas Merocianina 540 e Hoechst 33342. As células foram classificadas como apresentando alta fluorescência (alta fluidez) ou baixa fluorescência (baixa fluidez) (FERNÁNDEZ-GAGO, 2013). A avaliação de funcionalidade de mitocôndria foi realizada utilizando a sonda fluorescente Rodamina 123. Os espermatozoides foram classificados como apresentando elevada (alta fluorescência, maior acúmulo de Rodamina) ou baixa funcionalidade de mitocôndrias (baixa fluorescência, menor acúmulo de Rodamina) (GILLAN et al., 2005).

Os resultados destas avaliações espermáticas foram analisados pelo software Statistix® (2009).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O percentual de espermatozoides com alta fluidez de membrana foi maior no grupo tratado com DHA ($P < 0,01$) comparado ao grupo controle. Entretanto, o percentual de função mitocondrial foi menor ($P < 0,01$) no mesmo grupo. Nos demais parâmetros não foram observados efeitos ($P > 0,05$) da suplementação, como pode-se observar na Tabela 1.

Tabela 1: Parâmetros de estrutura espermática do sêmen suíno no grupo controle e no grupo suplementado com DHA.

Variável	Controle	DHA
Integridade do acrossoma (%)	37,5 ± 1,6	36,6 ± 1,7
Integridade da membrana (%)	81,4 ± 1,8	77,9 ± 1,8

Fluidez da membrana (%)	42,1 ± 1,8 ^A	47,9 ± 1,9 ^B
Função mitocondrial (%)	52,2 ± 1,8 ^A	42,3 ± 1,7 ^B

^{A,B}Diferenças estatísticas nas linhas (P<0,05)

O presente trabalho demonstrou que a fluidez de membrana foi maior no grupo suplementado em relação ao grupo controle. Pode-se inferir que houve incorporação de fosfolipídios na membrana espermática, aumentando sua concentração na mesma e alterando sua relação com o colesterol. O aumento da fluidez na membrana pode explicar porque o grupo suplementado apresentou também uma maior queda na funcionalidade da mitocôndria, uma vez que a célula aumenta seu metabolismo utilizando mais energia, afetando diretamente a mitocôndria que é a geradora de ATP no espermatozoide (YANAGIMACHI, 1994). Diferentemente, STRZEZEK (2004) após suplementar suínos da raça Large White com ômega-3, obteve incremento de células com membranas e acrossoma íntegros, e com maior resistência osmótica.

Há diferenças na composição de fosfolipídios encontrados na membrana dos espermatozoides. Dessa forma, sugere-se que essa desigualdade seja um fator para os resultados das análises dos parâmetros de fluidez e integridade da membrana, sendo ambos fatores cruciais para a fertilidade do ejaculado (YANAGIMACHI, 1994). AITKEN (1993) observou que espermatozoides humanos expostos ao DHA apresentaram maiores danos no DNA e um maior nível de peroxidação lipídica, enfatizando assim uma possível relação entre altos níveis de PUFA e maior geração de espécies reativas ao oxigênio (ROS).

A incorporação de ômega-3 nas dietas de humanos e animais tem atraído um crescente interesse em relação a efeitos sobre a fertilidade (WATHES et al., 2007). Uma possível explicação para os resultados não terem sido favoráveis seria esta diferença de fonte de PUFA, a forma de administração, a quantidade necessária do produto e as diferenças genéticas de cada animal. Contudo, cabe salientar que são necessários mais estudos sobre o uso desses compostos, pois faltam dados que definam qual o nível ótimo de PUFA na dieta dos suínos.

4. CONCLUSÕES

Sendo assim, pode-se concluir que a suplementação de machos suínos através de dietas contendo DHA, extraído de microalgas heterotróficas, não demonstrou ter efeito sobre a melhoria da qualidade espermática.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AITKEN, R.J.; HARKISS, D.; BUCKINGHAM, D.W. Analysis of lipid peroxidation mechanisms in human spermatozoa. **Molecular Reproduction Development**, 35:302–15, 1993.
- BENCHARIF D, AMIRAT-BRIAND L, GARAND A, ANTON M, SCHMITT E, DESHERCES S, DELHOMME G, LANGLOIS ML, BARRIÈRE P, DESTRUMELLE S, VERA-MUNOZ V, TAINURIER D. The advantages of using a combination of LDL and glutamine in comparison with TRIS egg yolk and Equex® STAMP extenders in the cryopreservation of canine semen. **Res Vet Sci**, v.93, p.440-447, 2012.
- BLESBOIS, E.; LESSIRE, M.; GRASSEAU, I.; HALLOUIS, J.M.; HERMIER, D. Effects of dietary fat on the fatty acid composition and fertilizing ability of fowl semen. **Biology of Reproduction**, 56:1216–20, 1997.

BORTOLOZZO, F.P.; Wentz, I.; DALLANORA, D. Situação atual da inseminação artificial em suínos. **Acta scientiae veterinariae**. Porto Alegre, RS. Vol. 33, n. 1, p. 17-32, 2005.

CEROLINI, S.; MALDJIAN, A.; PIZZI, F.; GLIOZZI, T.M. Changes in sperm quality and lipid composition during cryopreservation of boar semen. **Reproduction**, [S.I.], v. 121, p. 395-401, 2001.

FERNÁNDEZ-GAGO, R.; DOMÍNGUEZ, J.C.; MARTÍNEZ-PASTOR, F. Seminal plasma applied post-thawing affects boar sperm physiology: A flow cytometry study. **Theriogenology**, 80, 400–410, 2013.

GILLAN, L.; EVANS, G.; MAXWELL, W.M.C. Flow cytometric evaluation of sperm parameters in relation to fertility potential. **Theriogenology**, 63, 445–457, 2005.

HARRISON, R.A.P., VICKERS, S.E. Use of fluorescent probes to assess membrane integrity in mammalian spermatozoa. **Journal Reproduction and Fertility**, v.88, p.343-352, 1990

NRC. National Research Council. Nutrient Requeriments of Swine. **National Academy Press**, Washington, DC, 10.ed., 189p, 1998.

OLIVEIRA, S.L. de; FIALHO, E.T.; MURGAS, L.D.S.; FREITAS, J.A.; FREITAS, R.T.F. de; ZANGERONIMO, M.G. Effect of the inclusion of different types of oil in the diet of boars on the quality of semen in natura. **Ciência Agrotécnica**, Lavras, v. 30, n. 6, p. 1205-1210, nov./dez., 2006.

PURSEL, V.G.; JOHNSON, L.A. Freezing of boar spermatozoa: Freezing capacity with concentrated semen and a new thawing procedure. **Journal of Animal Science**, 40, 99-102, 1975.

ROUDEBUSH, W.E.; DIEHL, J.R. Platelet-activating factor content in boar spermatozoa correlates with fertility. **Theriogenology**, 55:1633–8, 2001.

STRZEZEK, J.; FRASER, L.; KUKLINSKA, M.; DZIEKONSKA, A.; LECEWICZ, M. Effects of dietary supplementation with polyunsaturated fatty acids and antioxidants on biochemical characteristics of boar semen. **Reproductive Biology**, 4:271– 87, 2004.

STUBBS, C.D.; SMITH, A.D. The modification of the mammalian membrane of polyunsaturated fatty acid composition in relation to membrane fluidity and function. **Biochimica et BiophysicaActa**, 779:89–137, 1984.

TABUCHI, T., SHIDARO, O., HARAYAMA, H. A 32 kDA tyrosine phosphorylated protein shows a protease dependent increase in dead boar spermatozoa. **Journal of Reproduction and Development**, v.54, p.502-507, 2008.

HUGONIN, L. Avanços tecnológicos na nutrição de machos reprodutores suínos. In: Seminário Nacional de Desenvolvimento da Suinocultura, 9. 2001, Gramado, RS. **Anais...** Concórdia: EMBRAPA Suínos e Aves, 2001, p. 98. Disponível em:. Acesso em: 21 out. 2009.

WATHES, D.C.; ABAYASEKARA, D.R.E.; AITKEN, R.J. Polyunsaturated fatty acids in male and female reproduction. **Biology of Reproduction**, 77:190–201, 2007.

YANAGIMACHI, R. Mammalian fertilization. **The Physiology of Reproduction**. Raven Press: New York, p. 189-317, 1994.