

INTEGRIDADE DE MEMBRANA, DE ACROSSOMA E DE DNA DE ESPERMATOZÓIDES DE GALOS ALIMENTADOS COM ÓLEO-RESINA DE COPAÍBA

CAROLINA OREQUES DE OLIVEIRA¹; CAMILA TONINI²; STELA MARI
MENEGHELLO GHELLER³, SÉRGIO ÁVILA⁴, MARCOS ANTONIO ANCIUTI⁵,
DENISE CALISTO BONGALHARDO⁶

¹Universidade Federal de Pelotas, Mestranda PPGZ – caroloreques.zootecnia@gmail.com

²Universidade Federal de Santa Maria, Doutoranda PPGMV – camy_tonini@hotmail.com

³Universidade Federal de Pelotas, Doutoranda PPGMV – stelagheller@hotmail.com

⁴Instituto Federal Sul-Rio-Grandense, CAVG – slcavila@hotmail.com

⁵Instituto Federal Sul-Rio-Grandense, CAVG – marcosanciuti@cavg.ifsul.edu.br

⁶Universidade Federal de Pelotas, DFF – denisebonga@hotmail.com

1. INTRODUÇÃO

Em um plantel de aves, os machos representam metade do potencial genético transmitido a progênie. Mesmo representando uma proporção bem inferior ao número de fêmeas, o manejo nutricional e reprodutivo desses animais merece especial atenção da indústria avícola (OLIVEIRA et al., 2013).

Inúmeras pesquisas com adição de diferentes tipos de óleos vegetais têm surgido no Brasil nos últimos anos. Isso porque as gorduras exercem papel fundamental na fisiologia dos animais. Além de fornecer energia para processos metabólicos, a gordura vegetal é uma fonte rica em ácidos graxos insaturados, que possuem papel importante na reprodução das aves (SANTOS et al., 2009).

O óleo de copaíba (*copaifera sp*), vem sendo utilizado pelas indústrias de diferentes setores por suas propriedades anti-inflamatórias, bactericidas, antibióticas e lipídeos. Estes, atuam como componentes celulares das membranas biológicas por serem ricos em fosfolípidios e vitamina E elementos importantes na qualidade espermática (BEZERRA et al., 2015).

Sendo assim, o presente trabalho teve como objetivo incluir na dieta de galos reprodutores o óleo-resina de copaíba e analisar as características de integridade de membrana, de acrossoma e de DNA dos espermatozoides.

2. METODOLOGIA

O experimento foi realizado no biotério central localizado na Universidade Federal de Pelotas (UFPEL) *campus* Capão do Leão, na cidade de Capão do Leão, Rio Grande do Sul, Brasil.

O período experimental compreendeu o intervalo entre o dia 01 de setembro de 2015 até o dia 13 de outubro de 2015, totalizando sete semanas de experimento, compreendendo a fase de reprodução de 40 a 46 semanas de idade das aves.

Os tratamentos utilizados foram divididos em dois grupos: Controle (C), representado pelas aves alimentadas com a dieta padrão, a base de farelo de milho e soja; e outro tratamento representado pelas aves alimentadas com a dieta padrão, acrescida de 3,68 gramas de óleo-resina de copaíba *on top*, homogeneizado em 25 Kg de ração sendo ofertada 25 mg de óleo-resina de copaíba por dia. A água foi disponibilizada por bebedouros tipo *nipple*, permanecendo um bico por boxe. A

ração foi fornecida manualmente em comedouros do tipo calha. As coletas de sêmen foram realizadas duas vezes por semana através de massagem abdominal.

Avaliou-se a integridade de membrana espermática através das sondas SYBR-14 e PI, considerando-se células íntegras aquelas que apresentaram fluorescência verde (SYBR-14) e lesadas aquelas que apresentaram fluorescência vermelha (PI) (SEIGNEURIN & BLESBOIS, 1995). A integridade de DNA foi avaliada pela técnica descrita por Evenson et al. (1999), em microscópio de epifluorescência sob aumento de 1000x; foram consideradas células com DNA normal (bicatenário) aquelas que apresentavam fluorescência verde e quando a célula apresentava coloração vermelha ou amarelada foi considerado DNA desnaturado (monocatenário). A integridade de acrossoma foi realizada segundo o protocolo de KAWAMOTO et al. (1999); as lâminas foram avaliadas sob um aumento de 1000x em microscópio de epifluorescência e as células com acrossoma que não apresentavam rugosidades, vacúolos e emitiam fluorescência verde foram consideradas íntegras, distinto desses padrões, foram classificadas como células com acrossoma danificado.

O delineamento utilizado foi o de medidas repetidas no tempo; os galos foram distribuídos ao acaso nos boxes. Cada galo representou uma unidade experimental e cada semana uma repetição. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA), usando o programa estatístico SAS, utilizando a probabilidade $p < 0,05$. O modelo estatístico utilizado foi: $y_{ijk} = \mu + \alpha_i + \rho_{k(i)} + \beta_j + \alpha\beta_{ij} + e_{ij}$. Os dados não apresentaram distribuição normal de acordo com o teste de Shapiro-Wilk, sendo necessário fazer transformação utilizando a fórmula arco seno.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Como pode ser observado na Tabela 1, não houve diferença significativa ($p < 0,05$) entre os tratamentos com relação à integridade da membrana espermática.

Tabela 1. Integridade de membrana espermática (média \pm erro padrão %) de galos no período de 41 a 46 semanas, alimentados com dieta controle (T1) e dieta com óleo-resina de copaíba *on top* (T2)

Idade (semanas)	Tratamento 1	Tratamento 2	Efeito*
41	60,23 \pm 5,73	70,75 \pm 4,17	NS
42	81,11 \pm 0,65	88,00 \pm 0,98	NS
43	86,72 \pm 2,57	85,60 \pm 2,70	NS
44	76,57 \pm 2,99	70,40 \pm 3,35	NS
45	93,50 \pm 0,77	94,05 \pm 0,65	NS
46	64,52 \pm 3,27	72,21 \pm 2,23	NS

*NS = não significativo ($P < 0,05$).

A célula espermática, quando depositada no trato reprodutor feminino, adquire movimento, sem que isto ateste a condição de viabilidade, podendo apresentar lesões em diferentes compartimentos, como na membrana plasmática, em detrimento da cinética apresentada (SILVA et al., 2011). Por ter precursores

antioxidantes em sua constituição, o óleo-resina possui características que poderiam estar envolvidas na proteção direta das células espermáticas contra a peroxidação lipídica. Porém, não foi observado neste trabalho, alterações protetoras na membrana dos espermatozoides com a adição do óleo-resina na dieta.

Na Tabela 2 podemos observar os resultados encontrados quanto à integridade do acrossoma. O acrossoma é a estrutura celular que confere a capacidade dos espermatozoides em se ligar e de penetrar o óvulo. As células devem manter um acrossoma íntegro para garantir que a reação acrossomal possa ocorrer no momento adequado, possibilitando a fertilização. O óleo-resina de copaíba poderia atuar evitando a ação de radicais livres na superfície acrossomal e mantendo sua integridade, porém, não foi observada tal atuação com a adição do óleo-resina na dieta.

Tabela 2. Integridade de acrossoma (média \pm erro padrão %) de galos no período de 43 a 46 semanas, alimentados com dieta controle (T1) e dieta com óleo-resina de copaíba *on top* (T2)

Idade (semanas)	Tratamento 1	Tratamento 2	Efeito*
43	85,8 \pm 2,63	83,6 \pm 1,93	NS
44	76,36 \pm 2,15	79,0 \pm 1,69	NS
45	86,61 \pm 1,31	87,74 \pm 0,92	NS
46	67,88 \pm 3,57	75,0 \pm 2,58	NS

*NS = não significativo ($P < 0,05$).

Os resultados de integridade do DNA, assim como os resultados de integridade de membrana e acrossoma, também não apresentaram diferença estatística ($p < 0,05$) entre os tratamentos (Tabela 3).

Tabela 3. Integridade de DNA (média \pm erro padrão %) de galos no período de 43 a 46 semanas, alimentados com dieta controle (T1) e dieta com óleo-resina de copaíba *on top* (T2)

Idade (semanas)	Tratamento 1	Tratamento 2	Efeito*
43	96,94 \pm 0,90	97,45 \pm 0,85	NS
44	100,00 \pm 0,0	100,00 \pm 0,0	NS
45	99,88 \pm 0,07	99,21 \pm 0,63	NS
46	95,94 \pm 2,25	91,79 \pm 2,87	NS

*NS = não significativo ($P < 0,05$).

As avaliações de qualidade de sêmen convencionais não fornecem informações sobre o estado de DNA, embora a integridade do DNA seja importante para evitar danos em nível de fertilização, de desenvolvimento embrionário, e de resultados reprodutivos (PARTYKA et al., 2010). As reações ao oxigênio gerados durante o estresse oxidativo da célula espermática são capazes de induzir danos ao DNA. Desta forma, o óleo-resina de copaíba poderia atuar inibindo a ação oxidativa sobre o DNA, oferecendo um efeito protetor à célula espermática.

Com as condições descritas neste experimento, embora as características seminais não tenham sido influenciadas pela dosagem oferecida *on top* do óleo-resina de copaíba, os valores encontrados estão de acordo com os de referência em termos de desempenho reprodutivo de galos reprodutores. No entanto, novos experimentos devem ser conduzidos, utilizando novas doses de óleo-resina de copaíba que poderão produzir diferentes resultados sobre as características seminais.

4. CONCLUSÕES

As características seminais integridade de membrana, integridade de acrossoma e integridade de DNA não foram influenciadas pela dosagem oferecida *on top* do óleo-resina de copaíba.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BEZERRA, N.S.; CRUZ, F.G.G.; COSTA, A.P.G.C.; RUFINO, J.P.F.; MELO, R.D.; FEIJÓ, J.C.; MELO, L.D.; HOLLER VERGER, S.V.S. Óleo de copaíba (*Copaifera* sp.) na alimentação de galos reprodutores semipesados. **Rev. Cient. Avic. Suin.**, v.1, n. 1, p. 001-013, 2015.

EVENSON, D.P.; JOST, L.K.; MARSHALL, D.; ZINAMAN, M.J.; CLEGG, E.; PURVIS, K.; ANGELIS, P.; CLAUSSEN, O. P. Utility of the sperm chromatin structure as a diagnostic and prognostic tool in the human fertility clinic. **Human Reproduction**, v. 14, n. 4, p. 1039-1049, 1999.

KAWAMOTO, A.; KAZUTOMO, O.; KISHIKAWA, H.; ZHU, L.; AZUMA, C.; MURATA, Y. Two-color fluorescence staining of lectin and anti-CD46 antibody to assess acrossosomal status. **Fertility and Sterility**, v.71, p.497-501, 1999.

OLIVEIRA, C.O.de; FARINA, G.; SANTOS, V.L.; LANGE, C.C.; GONÇALVES, F.M.; RUTZ, F.; ANCIUTI, M.A.; SOUZA, D.M. Desempenho reprodutivo de galos pesados suplementados com extrato de algas em idade reprodutiva avançada. In: XXIII Congresso Brasileiro de zootecnia, 23, 2013, Foz do Iguaçu. *Anais...Foz do Iguaçu*, 2013.

PARTYKA, A.; NIZANSKI, W.; LUKASZEWICZ, E. Evaluation of fresh and frozen-thawed fowl semen by flow cytometry. **Theriogenology**, v.74, p.1019-1027, 2010.

SANTOS, M. S. V.; ESPÍNDOLA, G.B.; LÔBO, R.N.B.; FUENTES, M.F.F.; CARVALHO, L.E. de; SANTOS, A.B.E. Desempenho e qualidade dos ovos de poedeiras comerciais submetidas às dietas com diferentes óleos vegetais. **Revista Brasileira Saúde e Produção Animal**, v. 10, n. 3, p 654-667, 2009

SEIGNEURIN, F.; BLESBOIS, E. Effects of the freezing rate on viability and fertility of frozen-thawed fowl spermatozoa. **Theriogenology**, v.43, p.1351-1358, 1995.

SILVA, S.V.; SOARES, A.T.; BATISTA, A. M.; ALMEIDA, F.C.; GUERRA, M.M.P. Interferência da condição climática na integridade de espermatozoides ovinos submetidos à criopreservação. **Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.63, n.6, p.1309-1314, 2011.