

KAEMPFEROL EM CÉLULAS ESPERMÁTICAS EQUINAS SOB REFRIGERAÇÃO A 48 HORAS

JARBAS DIAS XAVIER¹; RAFAEL MIELKE BARBOSA²; FELIPE PIRES HARTWIG³; SILVIA HUBNER⁴; ANTONIO SERGIO VARELA JUNIOR⁵; CARINE DAHL CORCINI⁶

¹Faculdade de Medicina Veterinária-UFPEL – jarbasdx@hotmail.com

²Faculdade de Medicina Veterinária-UFPEL – rafaelmielke@gmail.com

³Hartwig Fertilidade Equina – hartwig.fertilidade.equina@gmail.com

⁴Faculdade de Medicina Veterinária-UFPEL

⁵Instituto de Ciências Biológicas – FURG – VarelaJras@gmail.com

⁶Faculdade de Medicina Veterinária-UFPEL – corcincd@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

Com o advento da criopreservação do sêmen de equinos, permitiu-se o armazenamento e transporte a longo prazo, tornando-se de grande importância para a indústria da equinocultura (LOOMIS; GRAHM, 2008). A grande variação individual na sensibilidade da criopreservação do sêmen de cada garanhão culminou no crescimento nesse campo de pesquisa (SIEME et al., 2008).

Durante a manipulação do sêmen ocorre estresse oxidativo, decorrente de uma maior produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e culminando com a diminuição da capacidade metabólica. Ressalta-se que em condições naturais de acasalamento os danos causados pelas ROS em relação a qualidade seminal são naturalmente minimizados pelo sistema metabólico dos espermatozoides e do plasma seminal (MAIA; BICUDO, 2009). Da mesma forma, em níveis fisiológicos, as espécies reativas de oxigênio intervêm e influenciam os gametas de maneira benéfica, bem como as interações espermatozoides-oócitos (C. GAGNON et al., 1991) (M. ATTARAN et al., 2006).

Para retardar a velocidade da oxidação através da inibição da produção ou dos efeitos deletérios dos radicais livres, utilizam-se substâncias antioxidantes (DUARTE-ALMEIDA et al., 2006). Outrossim, possibilita uma melhora na motilidade e na viabilidade do espermatozoide, segundo documentado por BAUMBER et al, 2002.

Representando um dos grupos fenólicos mais importantes e diversificados entre os produtos de origem natural e vegetal estão os flavonóides (BRUNETON, 1991; FALKENBERG; SANTOS; SIMÕES, 2006). Ainda, dentro deste apresenta-se o kaempferol (3,5,7-tri-hidroxi-2- (4-hidroxifenil) -4H-1-benzopirano-4-ona), que em sistemas biológicos agem como antioxidantes, bem como ações antimicrobianas, antivirais, antiulcerogênicas, antineoplásicas, anti-inflamatórias, anti-hepatotóxicas (MACHADO et al., 2008).

Assim, esse trabalho tem como intuito analisar diferentes concentrações da substância Kaempferol, pertencente aos flavonóides, comparando determinadas concentrações em diluente comercial durante criopreservação por 48 horas, em células espermáticas equinas.

2. METODOLOGIA

Foram utilizados ejaculados de 3 garanhões da raça Crioula, mantidos em uma central de reprodução equina localizada na cidade de Pelotas/RS e a coleta foi realizada pelo método de vagina artificial.

Para os testes, foram adicionados 100µL de cada concentração de Kaempferol (SIGMA – K0133) diluído em diluente comercial BotuSêmen Special (Botupharma, Brasil), todas as análises foram realizadas em triplicata. Foram utilizadas concentrações de 0 (controle), 1, 2, 4% de Kaempferol em 100µl de sêmen de equino diluído em BotuSêmen Special. As análises microscópicas foram feitas após 48 horas de exposição do sêmen ao Kaempferol, sendo refrigeradas a 5°C em caixa térmica específica e incubadas a 37°C durante, 10 minutos antes da análise.

Para as análises, utilizou-se o sistema computadorizado (CASA) para avaliação da cinética espermática. Para tanto, foram colocados 3 µL de sêmen em lâmina própria para a leitura, na qual foram selecionados 6 campos para as análises. A mensuração da cinética espermática foi feita através da avaliação da motilidade total (MT), motilidade progressiva (MP) e linearidade (LIN), em porcentagem, média da distância retilínea (DSL), em micrômetros, e velocidade retilínea (VSL), em micrômetros por segundo. A análise estatística dos dados foi realizada com o programa Statistix 9.0, pela metodologia da análise de variância (ANOVA), comparando as médias de cinética espermática pelo teste de Tukey em relação às concentrações utilizadas. Valores de $P < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A concentração de 2% Kaempferol apresentou superioridade em relação aos demais tratamentos e ao controle, quanto a motilidade total e motilidade progressiva ($P < 0,05$), apresentado na Tabela 1. A 1% não teve diferença estatística comparada ao grupo controle no que se refere a motilidade total, porém, na motilidade progressiva apresentou melhores parâmetros comparados ao grupo controle (Tabela 1). Já na concentração de 4% teve-se uma redução nos parâmetros, tendo-se uma possível redução da ação antioxidante da substância. Importante ressaltar que a motilidade espermática é dependente da ação sincronizada de diferentes ações das proteínas, íons, açúcares, espécies reativas de oxigênio e pequenas moléculas orgânicas. Muitos fatores podem causar efeito tóxico de diminuir a motilidade espermática e desta forma, pode atribuir ao macho fatores de infertilidade. Porém, observamos que a administração direta do Kaempferol aumentou a motilidade espermática em relação ao controle, quando refrigerado a 5°C por 48 horas. Esse aumento pode ser atribuído a uma menor taxa de peroxidação lipídica, que ocorre no processamento do sêmen, e um facilitador no transporte de energia para célula.

Ao que se refere a distância retilínea (DSL), pode-se observar que em todas as amostras com tratamento com kaempferol foram superiores ao grupo controle, com destaque a concentração de 1%. Sabendo-se que a distância retilínea refere-se ao trajeto mais preciso do espermatozóide rumo ao ovócito. Com esse aumento no trajeto percorrido podemos também diminuir a concentração espermática das doses inseminantes, pois um maior número de espermatozoides estarão capacitados a fertilizar um ovócito.

Ao que se refere a velocidade retilínea (VSL), pode-se observar que em todas as amostras com tratamento com kaempferol foram superiores ao grupo controle, com destaque a concentração de 1%. Sabendo-se que a velocidade retilínea refere-se ao espermatozóide percorrer o trajeto em menor tempo rumo ao ovócito. Com esse aumento na velocidade percorrida podemos também indagar que em menor tempo o espermatozóide fecundaria o ovócito.

Referente a linearidade (LIN) podemos observar que todos os grupos com presença da substância Kaempferol foram superiores ao grupo controle, não diferindo-se estaticamente entre si. Sabendo-se que a Linearidade é a relação percentual entre VSL e VCL. Esta substância pode auxiliar na hipermotilidade que pode ser visualizada pelo aumento da velocidade.

Tabela 1 – Média (\pm erro padrão) dos parâmetros de cinética espermática, motilidade total (MT) e motilidade progressiva (MP), Distância Retilínea (DSL), média da distância percorrida (DAP) e Velocidade Retilínea (VSL), das amostras expostas imediatamente ao Kaempferol. (n=5)

Kaempferol	MT (%)	MP (%)	DSL (μ m)	VSL (μ m/s)	LIN (%)
Controle	68,58 ^B	35,83 ^B	25,69 ^C	55,00 ^C	0,378 ^B
1%	67,31 ^B	52,08 ^A	32,04 ^A	70,70 ^A	0,423 ^A
2%	79,60 ^A	54,32 ^A	27,54 ^B	59,07 ^B	0,435 ^A
4%	65,49 ^B	40,88 ^B	25,69 ^B	62,16 ^B	0,430 ^A

A, B, C Letras diferentes na linha representam diferença estatística (P<0,05).

4. CONCLUSÕES

Pode-se concluir que a substância Kaempferol, analisado nesse trabalho, demonstra uma possível ação antioxidante às células espermáticas equinas na concentração de 1%. Ademais, a utilização do Kaempferol na concentração de 1% obteve melhora em parâmetros de análises espermáticas quando comparadas ao grupo controle.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Baumber J, Vo A, Sabeur K, Ball BA. Generation of reactive oxygen species by equine neutrophils and their effect on motility of equine spermatozoa. *Theriogenology*, v.57, p.1025-1033, 2002.

BRUNETON, J. **Elementos de fitoquímica e farmacognosia**. Zaragoza, Espanha: Ed. Acribia, p.107-353, 1991.

C. Gagnon, A. Iwasaki, E. De Lamirande, and N. Kovalski, "Reactive oxygen species and human spermatozoa," *Annals of the New York Academy of Sciences*, vol. 637, pp. 436–444, 1991.

DUARTE- ALMEIDA, J.M.; SANTOS, R.J.; GENOVESE, M.I.; LAJOLO, F.M. Avaliação da atividade antioxidante utilizando sistema -caroteno/ácido linoléico e método de seqüestro de radicais DPPH. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**.v.26, p.446-452, 2006.

FALKENBERG, M. B.; SANTOS, R. I; SIMOES, C. M. O. Introdução a análise fitoquímica. In: SIMÕES, C. M. O. et al. (Org.). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6. ed. Porto Alegre: Editora da UFRGS; Florianópolis: Editora da UFSC. p. 229-245, 2006

Loomis, P.R., Graham, J.K., 2008. Commercial semen freezing: individual male variation in cryosurvival and the response of stallion sperm to customized freezing protocols. **Anim. Reprod. Sci.** 105, 119–128.

M. Attaran, E. Pasqualotto, T. Falcone et al., “The effect of follicular fluid reactive oxygen species on the outcome of *in vitro* fertilization,” **International Journal of Fertility and Women’s Medicine**, vol. 45, no. 5, pp. 314–320, 2000.

Maia, M.S.; Bicudo, S.D. Radicais livres, antioxidantes e função espermática em mamíferos: uma revisão. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v.33, n.4, p.183-193, Oct./Dez. 2009.

MACHADO, H.; NAGEM, T. J.; PETERS, V. M.; FONSECA, C. S.; OLIVEIRA, T. T. Flavonoides e seu potencial terapêutico. **Boletim do Centro de Biologia da Reprodução**, Juiz de Fora, v. 27, n. 1/2, p. 33-39, 2008.

Sieme, H., Harrison, R.A.P., Petrunkina, A.M., 2008. Cryobiological determinants of frozen semen quality, with special reference to stallion. **Anim. Reprod. Sci.** 107, 276–292.