

## USO DE ATP EXÓGENO INFLUENCIA A CINÉTICA ESPERMÁTICA PÓS DESCONGELAMENTO

ANDREW DOS SANTOS GONZALES<sup>1</sup>; CAROLINA KILLIAN<sup>2</sup>; SARA LORANDI<sup>3</sup>;  
CAMILA RIBEIRO CARVALHO DE BRITO<sup>4</sup>; ANDREIA NOBRE ANCIUTI<sup>5</sup>;  
CARINE DAHL CORCINI<sup>6</sup>

<sup>1</sup>Universidade Federal de Pelotas – adw.gonzalez@gmail.com

<sup>2</sup>Universidade Federal de Pelotas – carolinak1996@gmail.com

<sup>3</sup>Universidade Federal de Pelotas – sara.lorandi@yahoo.com

<sup>4</sup>Universidade Federal de Pelotas – camilarcb@gmail.com

<sup>5</sup>Universidade Federal de Pelotas – vet.andreia@gmail.com

<sup>6</sup>Universidade Federal de Pelotas – corcinicd@gmail.com

### 1. INTRODUÇÃO

A técnica de criopreservação espermática traz diversos benefícios ao produtor, como o armazenamento do sêmen por tempo indeterminado, redução de riscos e custos de aquisição e transporte de reprodutores, além de possibilitar uma rápida difusão de material genético entre locais distantes (CASTELO et al., 2008). O congelamento dos espermatozoides é realizado sob a presença de compostos crioprotetores no momento do congelamento, tais como glicerol, etilenoglicol ou dimetilsulfoxido (FICKEL et al., 2007). Esses criopreservantes são adicionados ao sêmen com o intuito de preservar as células espermáticas, para que, no momento de descongelamento, as células continuem viáveis.

Entretanto, mesmo com a utilização de protetores, a criopreservação de sêmen é um processo que promove grande estresse às células, gerando condições bastante desfavoráveis à manutenção de sua viabilidade (SILVA et al., 2011). Sendo assim, métodos que diminuam a injúria e que permitam uma melhor performance do espermatozóide após o descongelamento são de grande importância.

A qualidade do desempenho dos espermatozoides após o descongelamento depende, também, da energia armazenada na forma de ATP, produzido nas mitocôndrias. Espermatozoides são células que contém muitas mitocôndrias na peça intermediária, o que sugere a grande necessidade de ATP para propulsão do flagelo (CAMARA & GUERRA, 2008). Diversos compostos podem interferir na atividade da ATPase, além de alterar outras vias de sinalização (ZHAO et al., 2016). Assim, a administração exógena de ATP poderia melhorar a atividade metabólica dessas células, melhorando parâmetros cinéticos desempenhados pelos espermatozoides pós descongelamento (KIM et al., 2016).

Deste modo, o objetivo do presente trabalho foi avaliar se sob a adição de diferentes concentrações de ATP exógeno haveria interferência nos parâmetros de cinética espermática, neste caso, os diferentes tipos de velocidade dos espermatozoides, Velocidade Média Progressiva (VAP), Velocidade Curvilínea (VCL) e Velocidade Linear Progressiva (VSL), medidos por um sistema computadorizado de avaliação seminal (CASA), principalmente no que compete à estimativa da proporção de espermatozoides que penetram o muco periovulatório (MORTIMER, 2000).

### 2. METODOLOGIA

Para a análise da influência do ATP sobre parâmetros de cinética dos espermatozoides, foram utilizadas 30 amostras de doses inseminantes comerciais da espécie suína e foram feitos o congelamento dessas amostras em palhetas e, posteriormente, o seu descongelamento, descritos a seguir:

### **2.1. Curva de resfriamento e congelamento**

As doses foram mantidas a 21°C por 10 min e estocadas em conservadora de sêmen a 17°C por 90 min, para estabilização das células junto ao diluente. Posteriormente, as amostras foram fracionadas em tubos tipo Falcon® de 15mL, centrifugadas a 800 g por 10 min, retirada do sobrenadante e ressuspensão do pellet (células espermáticas) em 2/3 do volume final da palheta de diluente de resfriamento (DR) (80% do volume de solução de lactose a 11% e 20% de gema de ovo (v/v)). As amostras foram acondicionadas em microtubos em conservadora de sêmen a 5°C por 90 min. Depois, foram adicionados 1/3 do volume final de diluente de congelamento (DC) (89,5% de DR + 1,5% [Equex-Paste®] e 9% de Glicerol (v/v)), perfazendo um volume total de 0,5mL com concentração final de  $1 \times 10^9$  espermatozoides/mL. Este volume foi transferido para palhetas de 0,5mL, já identificadas e vedadas com álcool polivinílico. As palhetas foram submetidas ao vapor de nitrogênio líquido (N<sub>2</sub>L) a 5 cm acima do nível por 20min e depois submersas em N<sub>2</sub>L e armazenadas em botijão de nitrogênio até o descongelamento.

### **2.2. Descongelamento**

As palhetas foram descongeladas em banho-maria a 37°C/20 seg. Uma alíquota de 100 µL foi diluída em 0,9 mL de BTS, BSA e ATP em diferentes concentrações (0; 0,025; 0,25; 2,5; e 25 µM) previamente aquecidos (3 mg de BSA/mL de BTS). Após diluída, uma alíquota de 0,8 mL da amostra foi incubada em placa aquecida a 37°C/10min e posteriormente foi feita a avaliação dos parâmetros de cinética espermática.

### **2.3. Análises da cinética espermática**

Os parâmetros de cinética foram medidos pelo sistema computadorizado de avaliação seminal (CASA – Computer-Assisted Sperm Analysis) SpermVision 3.5, Minitub®. Os parâmetros reportados pelo CASA foram: velocidade curvilínea (VCL (µm/s)), velocidade média do percurso (VAP (µm/s)) e velocidade linear progressiva (VSL (µm/s)). Para estas análises, uma alíquota (3µL) do sêmen já diluído e incubado foi retirada e colocada em câmara, indicada pelo fabricante, pré-aquecida, com captura de 6 campos de leitura com no mínimo 1000 células. As análises foram avaliadas em três tempos após o descongelamento: após 10, 60 e 120 minutos de incubação na presença de ATP, em placa aquecida.

### **2.4. Análise estatística**

As variáveis foram submetidas a verificação de normalidade através do teste de Shapiro-wilk e normalizadas quando necessário. As respostas foram comparadas entre os tratamentos dentro dos respectivos tempos através do Teste de Kruskal-Wallis. A comparação entre as médias foi feita através do Teste de Dunn.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados mostraram, de um modo geral, que a adição de ATP após 10 minutos de incubação aumenta a velocidade dos espermatozoides, quando avaliados os parâmetros VCL, VAP e VSL, exceto no grupo em que foi adicionada a maior concentração de ATP (25  $\mu$ M). Após 1h de incubação, os grupos adicionados de ATP não apresentaram diferença estatística significativa em relação ao controle. Entretanto, conforme o tempo de incubação chega a 2h, nos grupos em que foram adicionados o ATP, houve prejuízo nas velocidades espermáticas quando comparadas ao grupo controle (Figura 1).

Os resultados ainda mostraram que a adição de 25  $\mu$ M reduziu significativamente os parâmetros VAP e VSL em todos os tempos analisados. Para o parâmetro VCL, a adição da maior concentração de ATP reduziu significativamente a velocidade no tempo 0h, entretanto sendo igual ao controle pós 2h de incubação.

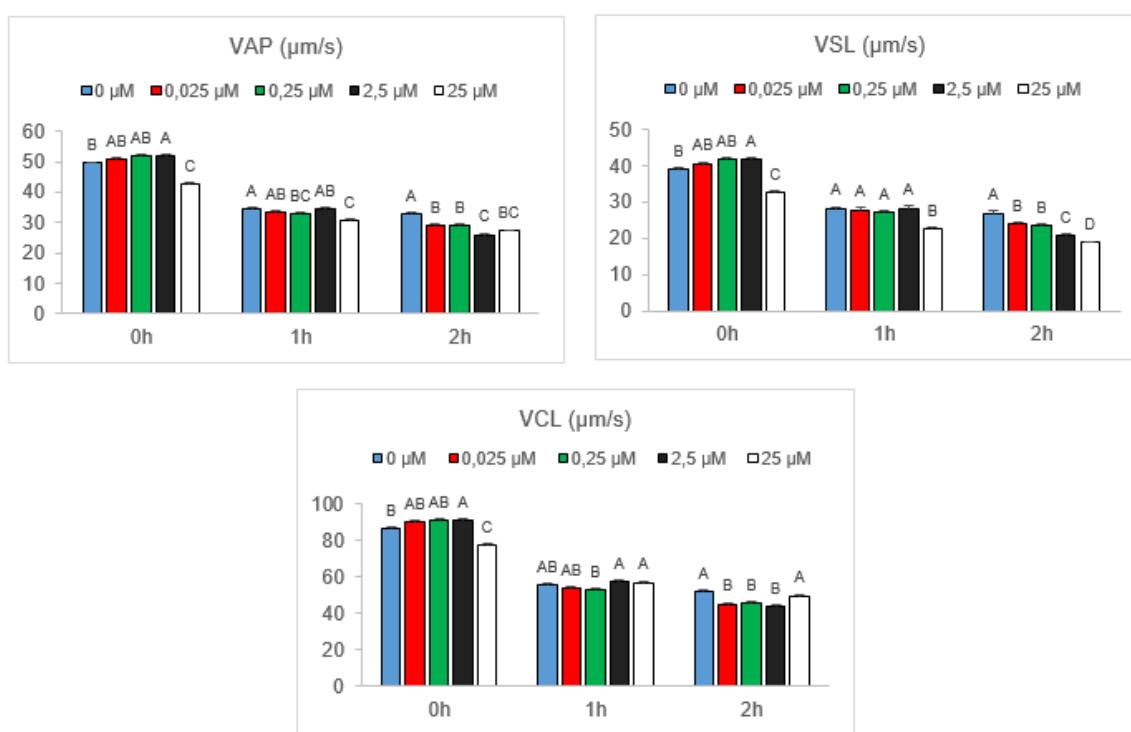


Figura 1: Gráficos de VAP (velocidade média do percurso), VSL (velocidade linear progressiva) e VCL (velocidade curvilínea), de espermatozoides de suínos expostos a diferentes concentrações de ATP pós-descongelamento, analisados nos tempos 0h, 1h e 2h. Letras diferentes correspondem às diferenças estatísticas. Valores expressos em Média (barra erro padrão [+]).

A suplementação energética é importante para permitir a motilidade de espermatozoides, após o descongelamento (CAMARA & GUERRA, 2008). O ATP extracelular produz efeitos reguladores que aumentam a motilidade espermática aumentando os níveis de cálcio ou ativando novas vias sinalizadoras (YAMASHIRO et al., 2010). Assim, o ATP pode ser uma boa alternativa na suplementação pós-descongelamento. Entretanto, essa resposta positiva foi

observada no primeiro tempo de análise, e não se manteve com o aumento no tempo de incubação. KIM et al (2016) observaram que a exposição ao ATP aumentou a motilidade total dos espermatozoides de ratos após três horas de descongelamento. Embora se tratem de condições experimentais e espécies distintas, já se sabe que o ATP desempenha um importante papel no aumento da motilidade espermática pós-descongelamento.

Estudos posteriores serão realizados no grupo de pesquisa, avaliando diferentes métodos de fornecimento de ATP para as células espermáticas, no intuito de aumentar o tempo de motilidade, e desse modo, aumentar o potencial de fertilidade.

#### 4. CONCLUSÕES

Pode-se concluir que, na concentração de 2,5  $\mu$ M, o ATP exógeno adicionado no meio de descongelamento seminal, aumentou os parâmetros de velocidade curvilínea, velocidade média do percurso e velocidade linear progressiva, em espermatozoides de suínos, no primeiro tempo de análise.

#### 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

CAMARA, D.R.; GUERRA, M.M.P. Mitocôndria espermática: além da síntese de adenosina trifosfato (ATP). **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.32, n.2, p.93-99, 2008.

CASTELO, T.S.; FROTA, T.R.; SILVA, A.R. Considerations on goat semen cryopreservation. **Acta Veterinaria Brasilica**. v.2, n.3, p.67-75, 2008.

FICKEL, J.; WAGENER, A.; LUDWIG, A. Semen cryopreservation and the conservation of endangered species. **European Journal of Wildlife Research**, v.53, p.81-89, 2007.

KIM, S.; HOOPER, S.; AGCA, C.; AGCA, Y. POST-THAW ATP supplementation enhances cryoprotective effect of iodixanol in rat spermatozoa. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 14, n.5, p. 1-8, 2016.

MORTIMER, S. T. CASA—practical aspects. **Journal of Andrology**, v. 21, n. 4, p. 515-524, 2000.

SILVA, S.V.; GUERRA, M..M.P.; Efeitos da criopreservação sobre as células espermáticas e alternativas para redução das crioinjúrias. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**. Belo Horizonte, v.35, n.4, p.370-384, 2011.

YAMASHIRO, H.; TOYOMIZU, M.; KIKUSATO, M.; TOYAMA, N.; SUGIMURA, S.; HOSHINO, Y.; ABE, H.; MOISYADI, S.; SATO, E. Lactate and adenosine triphosphate in the extender enhance the cryosurvival of rat epididymal sperm. **Journal of the American Association for Laboratory Animal Science**. v. 49, n. 2, p. 160–166, 2010.

ZHAO, Y.; DONGZHANG, W.; LIU, W.Q.; FEIZHANG, P.; HAO, Y.N.; LI, L.; CHEN, L.; SHEN, W.; FANGTANG, X.; MIN, L.J.; MENG, Q.S.; KUNWANG, S.; YI, B.; FUZHANG, H. Hydrogen Sulfide and/or Ammonia Reduces Spermatozoa

Motility through AMPK/AKT Related Pathways. **Scientific Reports**, n. 6; p. 1-11, 2016.