

EFEITO DA INCLUSÃO DE COLESTEROL NO ESTRESSE OXIDATIVO DE ESPERMATOZOIDES CRIOPRESERVADOS DE JUMENTOS DA RAÇA PÊGA

Flávia Vieira de Freitas¹; Maria Eduarda Borges Figueira; Thiago Augusto Teles de Souza; Cristian da Silva Teixeira; Simone Maria Massami Kitamura Martins; Marina da Silva Passarelli, Mariana Andrade Torres, André Furugen Cesar de Andrade, Giovanni Ribeiro de Carvalho

*Estudante de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Nutrição e Produção Animal – VNP - Universidade de São Paulo

¹*flaviavieira@usp.br*

A adição de colesterol ao sêmen de jumentos é reconhecidamente benéfica para a preservação de características seminais desejáveis ao longo da congelação, pois protege a membrana plasmática do espermatozoide e as estruturas circundadas por ela. Por este motivo, a manutenção da integridade das mitocôndrias espermáticas da peça intermediária poderia resultar em maior metabolismo espermático pós-descongelação. No entanto, este metabolismo poderia promover maiores concentrações de espécies reativas de oxigênio citoplasmáticas e consequentemente, estresse oxidativo. Este estudo objetivou avaliar os efeitos da inclusão de colesterol ao sêmen de jumentos da raça Pêgano estresse oxidativo citoplasmático. Para isto, foram utilizadas 5 colheitas de sêmen de 5 jumentos da raça Pêga, com idade entre 3 e 10 anos e peso médio de 300 Kg. Após as avaliações do sêmen *in natura*, este foi dividido em duas alíquotas, destinadas ao grupo controle (GC) e o grupo tratado (GT). O sêmen do GC foi diluído em meio à base de leite em pó (Botu-Sêmen[®] – Botupharma Botucatu, SP, Brasil) em proporção 1:1, centrifugado a 600 g durante 15 minutos, ressuspendido com meio à base de gema de ovo (Botu-Crio[®] – Botupharma Botucatu, SP, Brasil) para obtenção de concentração de 200×10^6 espermatozoides/mL, envasado em palhetas francesas de 0,5 mL, refrigerado à 5 °C durante 20 minutos, mantido a 4 cm do vapor de nitrogênio durante 15 minutos e mergulhado em nitrogênio líquido para congelamento do sêmen. O sêmen do GT foi previamente incubado com 1,5 mg de ciclodextrina (C4555 – Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, EUA) carregada com colesterol (C3045 – Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, EUA) a cada 120×10^6 espermatozoides/mL durante 15 minutos à temperatura ambiente e protegido da luz. Após este tempo, o sêmen do GT foi diluído em meio à base de leite em pó (Botu-Sêmen[®] – Botupharma Botucatu, SP, Brasil) em proporção 1:1 e procedeu-se com as mesmas etapas de criopreservação do GC. Para avaliação do estresse oxidativo citoplasmático, as palhetas foram descongeladas em banho-Maria à 37 °C durante 30 segundos, e seu conteúdo incubado com 1 µL de cada uma das sondas fluorescentes, sendo elas DHE (Molecular Probes Inc., Eugene, Oregon, EUA), Yo-Pro (Molecular Probes Inc., Eugene, Oregon, EUA) e Syto-59 (Molecular Probes Inc., Eugene, Oregon, EUA). As análises foram realizadas em aparelho de citometria de fluxo modelo BD Accuri C6 (Beckton-Dickeson, San Jose, USA). Os dados foram analisados pelo programa SAS (SAS Institute Inc., 2010). A incorporação de colesterol resultou em maior ($p < 0,05$) produção de espécies reativas de oxigênio citoplasmático (%) no GT ($3,73 \pm 1,64$) em relação ao GC ($2,10 \pm 1,20$). Diante do exposto, conclui-se que a adição de colesterol ao sêmen de jumentos preserva o metabolismo espermático, evidenciado através da maior produção de espécies reativas de oxigênio, após a descongelação, sendo recomendado para tal finalidade.

Palavras-chave: congelação, sondas fluorescentes, ROS.