

Efeito da adição do ácido palmítico e da vitamina E ao diluidor Tris-gema na criopreservação de sêmen canino

Effect of Addition of Palmitic Acid and Vitamin E to the Tris-Egg Yolk Diluter in Canine Semen Cryopreservation

Marcos Antônio Celestino de Sousa Filho¹, Luanna Soares de Melo Evangelista², Filipe Nunes Barros¹, Jefferson Hallisson Lustosa da Silva¹, Anna Monallysa Silva de Oliveira¹, Maria Michele Araújo de Sousa Cavalcante¹, Yndyra Nayan Teixeira Carvalho Castelo Branco³, Marlon de Araújo Castelo Branco⁴ & José Adalmir Torres de Souza⁵

ABSTRACT

Background: Canine sperm is a very delicate cell that is quite susceptible to oxidative stress since the cytoplasm is restricted and features little antioxidant reserves. Furthermore, the sperm membrane has some polyunsaturated fatty acids sensitive to lipid peroxidation, which makes it important to addition antioxidant substances to the diluter aiming at decreasing such stress to the sperm cell, particularly during seminal cryopreservation. Several antioxidants have been used in this process in some domestic animal's species, however, the use of palmitic acid has been little reported in works on cryopreservation of semen of the canine species. Hence, this study aimed to assess the effect of addition antioxidants palmitic acid and vitamin E to the Tris-egg yolk diluter on the semen quality of dogs after thawing.

Materials, Methods & Results: Samples were collected from the ejaculates of 4 adult dogs, apparently healthy, of the American Pit Bull Terrier breed of kennels in the city of Teresina, PI, places where the pre-freezing procedures of the dog's semen were performed. The samples were diluted in Tris citric acid fructose (3.28 g Tris-hydroxymethyl-aminomethane, 1.78 g citric acid monohydrate and 1.25 g D-fructose), dissolved in 100 mL distilled water, and added 20% egg yolk and 6% glycerol, at the concentration of 100×10^6 spz/mL. The semen samples were divided into 3 mL aliquots to form 3 experimental groups: G1 - Only Tris-egg yolk (Control group); G2 - Tris-egg yolk + 100 μ M palmitic acid; and G3 - Tris-egg yolk + 116 μ M vitamin E. Semen was collected weekly over a period of little over 2 months. After thawing, thermoresistance test (TTR) was carried out at 0, 30, 60, and 90 min to assess spermatics motility and vigor, in addition to analysis of integrity of plasma membrane, acrosomal membrane and mitochondrial activity of the sperm, using fluorescent probes. These assessments were performed out at the Animal Reproduction Biotechnology Laboratory (LBRA/UFPI). In the TTR, G2 and G3 didn't exhibit significant results for spermatics motility or vigor when compared with the control group. The palmitic acid and vitamin E also had no significant effects on the parameters of acrosomal membrane integrity or mitochondrial activity. However, sperm cryopreserved with the addition of palmitic acid exhibited significant differences for plasma membrane integrity, providing greater protection to the sperm cells in G2.

Discussion: The palmitic acid is one of the most saturated fatty acids in human semen, with reports of great proportions also in the seminal plasma of dogs. Its main role is to protect the plasma membrane from external damage, improving viability and fertility of the sperm after cryopreservation. Data is scarce in the literature on the composition of fatty acids in canine semen and regarding the use of palmitic acid as a seminal antioxidant in that species, which grants further studies aiming to investigate such valuable information for canine reproduction. It is concluded that addition palmitic acid at 100 μ M concentration to the Tris-egg yolk diluter was able to preserve the integrity of the plasma membrane during the process of cryopreservation of canine semen.

Keywords: dog, semen, antioxidants, cryopreservation.

Descritores: cão, sêmen, antioxidantes, criopreservação.

DOI: 10.22456/1679-9216.116285

Received: 28 June 2021

Accepted: 9 October 2021

Published: 15 November 2021

¹Postgraduate in Animal Science; ²Department of Parasitology and Microbiology & ⁵Department of Clinical and Veterinary Surgery, Federal University of Piauí (UFPI), Teresina, PI, Brazil. ³Federal University of Maranhão (UFMA), Campus Chapadinha, MA, Brazil. ⁴DVM, Management of Zoonoses Control (GEZOON) of Teresina. CORRESPONDENCE: L.S.M. Evangelista [luannaufpi@gmail.com]. UFPI - Campus Universitário Ministro Petrônio Portella s/n. CEP 64049-550 Teresina, PI, Brazil.

INTRODUÇÃO

Com o aumento afetivo entre o homem e o cão e a expansão do mercado pet, tutores e proprietários de canis têm demonstrado interesse em melhorar a eficiência reprodutiva de seus animais, bem como preservar a genética e o fenótipo das raças, havendo uma maior utilização de biotécnicas aplicadas à reprodução canina, como a inseminação artificial [20] e a criopreservação do sêmen [12,25].

A criopreservação seminal permite que o sêmen seja armazenado, transportado e utilizado sempre que necessário. No entanto, esse processo ainda apresenta alguns desafios, pois dependendo de como ele é realizado pode ocasionar danos aos espermatozoides, implicando na redução de sua qualidade [26].

O estresse oxidativo é o resultado do desequilíbrio entre a produção de antioxidantes e espécies reativas de oxigênio (EROs) e isso pode ser maléfico aos espermatozoides de humanos e animais. Vale lembrar que o espermatozoide canino é uma célula sensível ao estresse oxidativo, apresenta pouca reserva antioxidante no citoplasma e sua membrana possui alguns ácidos graxos poli-insaturados susceptíveis à peroxidação lipídica [27], sendo importante a adição de substâncias antioxidantes ao diluidor seminal.

Em cães, o uso de antioxidantes, como a vitamina E, já é empregado na forma oral [7,14,17] e adicionado nas amostras seminais [3,8], com diferentes resultados que dependem da concentração e de como são utilizados. Porém, ainda não existem pesquisas relacionadas a atividade antioxidante do ácido palmítico na criopreservação do sêmen canino.

O objetivo desse estudo foi avaliar o efeito da adição dos antioxidantes ácido palmítico e vitamina E ao diluidor Tris-gema na qualidade seminal de cães após a criopreservação.

MATERIAIS E MÉTODOS

Animais e locais do estudo

Todo o procedimento descrito neste artigo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Piauí (CEUA/UFPI) sob o protocolo de nº 487/18. Foram utilizados 4 cães machos, adultos, aparentemente saudáveis, reprodutores, dentro da faixa etária de 1 a 6 anos, pesando entre 15 a 25 kg, da raça American Pit Bull Terrier.

Antes de iniciar o experimento, os animais foram pesados, vermifugados e submetidos a exame físico e andrológico. Foram incluídos neste trabalho somente os animais que apresentaram bom escore corporal, sorologia negativa para leptospirose e brucelose canina, e exame parasitológico negativo para leishmaniose visceral (LV). Também foram incluídos os cães que possuíam os órgãos do sistema reprodutivo sem alterações detectáveis no exame físico e em condições satisfatórias de ejaculação, com motilidade espermática igual ou superior a 70% e vigor espermático igual ou superior a 3, conforme critérios propostos pelo CBRA [6].

Os animais foram submetidos ao mesmo manejo sanitário e nutricional durante todo o experimento, mantidos em canis individuais tendo acesso a espaços abertos diariamente. Foram alimentados com ração comercial de boa qualidade, oferecida 2 vezes ao dia e água *ad libitum*.

As atividades de coleta de sêmen e a avaliação das características físicas dos ejaculados (volume, aspecto, cor, vigor e motilidade espermática) pré-congelamento do sêmen foram executadas em canis localizados no município de Teresina, PI. As coletas foram realizadas semanalmente no turno da manhã.

A concentração espermática, a criopreservação, a descongelamento do sêmen e as análises seminais (teste de termorresistência e sondas fluorescentes) pós-descongelamento foram realizadas no Laboratório de Biotecnologia da Reprodução Animal (LBRA/UFPI).

Avaliação seminal

O sêmen dos cães foi colhido pelo método de manipulação digital, com auxílio de um funil acoplado a um tubo cônico tipo Falcon graduado em 15 mL. O mesmo foi colhido fracionado, separando a fração prostática da fração rica em espermatozoides. O volume do sêmen foi mensurado em mililitros (mL) no próprio tubo de coleta e em seguida, uma alíquota do sêmen (10 µL) foi colocada entre lâmina e lamínula, pré-aquecidas a 37°C em placa aquecedora, e sob microscopia óptica de luz (obj. 40x), foi avaliada a motilidade total (MOT), expressa em porcentagem (%) e o vigor espermático (VG), na escala de 0 a 5.

A vitamina E foi obtida em farmácia de manipulação, na apresentação em pó, pura, onde foi homogeneizada em água destilada em uma concentração de 100 mg/mL e, posteriormente, foi adicionada na

concentração de 116 μM diretamente a cada amostra seminal diluída em Tris-gema do respectivo tratamento.

O ácido palmítico¹ foi previamente diluído e pronto para ser adicionado a cada amostra seminal diluída em Tris-gema, na concentração de 100 μM . Essa concentração foi a mesma utilizada por Castelo Branco [5] em sua pesquisa com sêmen bovino, uma vez que não foi encontrado nenhum estudo com o uso desse antioxidante em cães.

Após a coleta de sêmen dos animais, cada amostra foi diluída em Tris ácido cítrico frutose (3,28 g Tris-hidroximetil-aminometano; 1,78 g ácido cítrico monohidratado e 1,25 g de D-frutose - Dinâmica^{®2}), dissolvido em 100 mL de água destilada, adicionado de 20% de gema de ovo e 6% de glicerol, com pH 7,0 e osmolaridade 316 mOsm/L, na concentração de 100×10^6 spz/mL. As amostras seminais foram divididas em alíquotas de 3 mL, formando 3 grupos experimentais: G1 - Somente Tris-gema (Grupo controle); G2 - Tris-gema + 100 μM de ácido palmítico; e G3 - Tris-gema + 116 μM de vitamina E.

Imediatamente após a coleta e processamento, as amostras dos 3 tratamentos foram acondicionadas em recipientes previamente identificados e depositados em isopor de 5 L com placas de gelo recicláveis a 15°C por 40 min (Taxa de refrigeração: -0,40°C/min) e transferidos para um refrigerador por mais 30 min, até alcançar a temperatura de 5°C (Taxa de refrigeração: -0,20°C/min), onde foram aguardados mais 30 min para a estabilização da temperatura. Após esse período, as amostras foram envasadas em palhetas identificadas de 0,25 mL, transferidas para uma caixa de isopor e posicionadas horizontalmente a 5 cm acima do nível do nitrogênio líquido por 5 min, até alcançar uma temperatura média de -70°C. Em seguida, as palhetas foram imersas em nitrogênio líquido e armazenadas em botijão criogênico a -196°C em racks identificadas, conforme metodologia descrita por Silva *et al.* [25].

A descongelação das amostras foi realizada um mês após a congelação por meio da imersão das palhetas em banho-maria a temperatura de 37°C por 1 min [25]. Após esse processo, realizaram-se as avaliações seminais quanto à MOT e o VG utilizando o teste de termorresistência (TTR), nos tempos 0, 30, 60 e 90 min, sob microscopia óptica de luz em objetiva de 40x, além das avaliações da integridade da membrana plasmática (MP), membrana acrossomal (AC) e atividade mitocondrial (AM), por meio de sondas fluorescentes.

Para avaliação da integridade da MP utilizou-se o método de coloração dupla com diacetato de carboxifluoresceína (DCF¹) e iodeto de propídio (IP¹), modificado por Coletto [9], onde alíquotas de 50 μL de sêmen pós descongeladas foram diluídas em 150 μL de Tris, contendo 5 μL de DCF (0,46 mg/mL em DMSO) e 20 μL de IP (0,5 mg/mL em PBS), incubadas por 10 min a 37°C. Um total de 200 espermatozoides foram avaliados em microscópio de epifluorescência (Olympus³) em objetiva de 40x, utilizando-se filtro de emissão DBP 580-630 nm e excitação DBP 485/20 nm. Os espermatozoides foram classificados em membrana intacta quando se apresentavam corados em verde e com membrana danificada quando corados em vermelho.

Para avaliação da integridade do acrossoma utilizou-se o corante isotiocianato de fluoresceína conjugado a Peanut agglutinin (FITC-PNA; Sigma-Aldrich^{®1}), onde uma alíquota de 20 μL da solução estoque de FITC-PNA (1 mg/mL) foi descongelada e adicionada a 480 μL de solução de fosfato tamponada (PBS) para obter a concentração final de 100 $\mu\text{g/mL}$. Alíquotas (20 μL) desta solução foram colocadas sobre esfregaços de lâminas contendo espermatozoides, nas quais foram incubadas por 20 min em câmara úmida a 4°C, na ausência de luz. Após a incubação, as lâminas foram enxaguadas 2 vezes em PBS refrigerado (4°C) e colocadas para secagem na ausência de luz. Imediatamente antes da avaliação, 5 μL do meio de montagem UCD (4,5 mL de glicerol, 0,5 mL de PBS, 5mg de azida sódica e 5 mg de p-fenilenodiamina) foram colocados sobre a lâmina e cobertos com lamínula. Foram avaliados 200 espermatozoides por lâmina, sob microscópio de epifluorescência (Olympus³) em objetiva de 40x, utilizando-se filtro de emissão LP 515 nm e BP 450-490 nm para excitação. Os espermatozoides foram classificados como portadores de acrossomas intactos quando apresentavam a região acrossomal corada com fluorescência verde, ou como acrossoma danificado quando apresentavam uma faixa verde fluorescente apenas na região equatorial da cabeça espermática ou não apresentavam fluorescência verde na cabeça.

A atividade mitocondrial foi determinada pela utilização de um fluorocromo catiônico lipofílico JC-1 [13]. Para isto, alíquotas de 50 μL de sêmen pós-descongelado foram diluídas em 150 μL de Tris, contendo 5 μL de JC-1 (0,15 mM em DMSO) e incubadas por 10 min a 37°C. Um total de 200 espermatozoides

foram avaliados sob microscópio de epifluorescência (Olympus³) em objetiva de 40x, utilizando-se filtro de emissão LP 515nm e BP 450-490nm para excitação. As células espermáticas que apresentavam a região da peça intermediária fortemente coradas em laranja foram classificadas com alto potencial mitocondrial, enquanto aquelas que apresentavam a região da peça intermediária não coradas ou fracamente coradas em laranja foram classificadas com baixo potencial mitocondrial.

Análise estatística

Para análise estatística dos dados foram obtidas as médias e desvio-padrão, utilizando-se análise de variância - experimento fatorial de blocos ao acaso. Foram utilizados quatro cães da mesma raça e quatro coletas de sêmen para cada um deles. Para a comparação das médias de MOT, VG, MP, AC e AM foi aplicado o teste de Duncan, de acordo com o coeficiente de variação, considerando um nível de significância de 5% ($P > 0,05$). Foi utilizado o PROC GLM (General Linear Models) do Software SAS (Statistical Analysis)⁴.

RESULTADOS

Os resultados apresentados na Tabela 1 mostram que a adição de ácido palmítico e vitamina E ao diluidor seminal não interferiu significativamente na MOT de espermatozoides caninos durante a avaliação do TTR, apenas na média desse parâmetro ao longo do tempo.

É possível observar na Tabela 2 que a adição de ácido palmítico e vitamina E ao diluidor seminal também não influenciou no VG de espermatozoides de cães pós-descongelamento quando avaliados pelo TTR, apenas na média dos grupos G2 e G3 e ao longo do período de incubação.

A adição dos antioxidantes ao diluidor seminal também não respondeu significativamente na porcentagem de células espermáticas com membranas acrossomais intactas e com melhor potencial mitocondrial, porém ao se comparar a porcentagem de espermatozoides com membrana plasmática íntegra, observou-se que o G2 se sobressaiu estatisticamente dos demais grupo avaliados e o G3 foi melhor que o controle, como mostra a Tabela 3.

Tabela 1. Motilidade total de espermatozoides caninos criopreservados em diluidor Tris-gema suplementado com ácido palmítico e vitamina E, avaliados pelo TTR.

Parâmetro	Tempo (min)	G1 (Controle)	G2 (ácido palmítico)	G3 (vit. E)	Tempo (Média)
MOT (%)	0	22,50 ± 11,18	29,00 ± 13,33	23,40 ± 11,90	24,96 ^A
MOT (%)	30	7,05 ± 7,27	9,30 ± 9,44	7,05 ± 9,19	7,80 ^B
MOT (%)	60	2,75 ± 5,95	3,00 ± 4,70	1,00 ± 3,07	2,25 ^C
MOT (%)	90	0,50 ± 2,23	1,00 ± 3,07	0,00 ± 0,00	0,50 ^C
MOT (%)	Média	8,20 ^a	10,57 ^a	7,86 ^a	—

^{a,b}Letras minúsculas iguais na mesma linha não diferem entre si, teste de Duncan 5% ($P > 0,05$). ^{A,B,C}Letras maiúsculas diferentes na mesma coluna indicam diferenças significativas entre os valores obtidos nos parâmetros avaliados, teste de Duncan 5% ($P > 0,05$).

Tabela 2. Vigor de espermatozoides caninos criopreservados em diluidor Tris-gema suplementado com ácido palmítico e vitamina E, avaliados pelo TTR.

Parâmetro	Tempo (min)	G1 (Controle)	G2 (ácido palmítico)	G3 (vit. E)	Tempo (média)
VG (1-5)	0	2,82 ± 0,37	2,85 ± 0,72	2,85 ± 0,36	2,84 ^A
VG (1-5)	30	1,60 ± 1,39	1,72 ± 1,35	1,20 ± 1,28	1,50 ^B
VG (1-5)	60	0,45 ± 0,99	0,70 ± 1,17	0,15 ± 0,48	0,43 ^C
VG (1-5)	90	0,15 ± 0,67	0,30 ± 0,92	0,00 ± 0,00	0,15 ^C
VG (1-5)	Média	1,25 ^{ab}	1,39 ^a	1,05 ^b	—

^{a,b}Letras minúsculas diferentes na mesma linha diferem entre si, teste de Duncan 5% ($P > 0,05$). ^{A,B,C}Letras maiúsculas diferentes na mesma coluna indicam diferenças significativas entre os valores obtidos nos parâmetros avaliados, teste de Duncan 5% ($P > 0,05$).

Tabela 3. Integridade membrana acrossomal (AC), atividade mitocondrial (AM) e integridade da membrana plasmática (MP) de espermatozoides de cães criopreservados em diluidor Tris-gema suplementado com ácido palmítico e vitamina E.

Parâmetro	G1 (Controle) %	G2 (ácido palmítico) %	G3 (vit. E) %
AC	41,00 ± 22,14	42,80 ± 22,52	42,05 ± 23,50
AM	26,30 ± 16,52	30,70 ± 17,70	27,10 ± 19,29
MP	28,40 ± 8,87 ^{bc}	45,60 ± 11,13 ^a	39,80 ± 14,00 ^b

^{a,b,c}Letras minúsculas diferentes na mesma linha indicam diferenças significativas entre os valores obtidos nos parâmetros avaliados, teste de Duncan 5% ($P > 0,05$).

DISCUSSÃO

Os resultados da Tabela 1 mostraram que independente do antioxidante utilizado no diluidor seminal a MOT foi baixa e não apresentou diferenças significativas entre os grupos experimentais. Vale lembrar que o CBRA [6] informa que a MOT de espermatozoides criopreservados deve ser superior a 30% para ser considerada viável e apenas o G2 (29%) se aproximou dessa porcentagem no tempo 0 do TTR.

É importante destacar que o metabolismo de espermatozoides criopreservados produz EROs que podem causar danos às células espermáticas e com isso a MOT pode ficar prejudicada [24,26]. O uso de antioxidantes no diluidor tende a melhorar a qualidade seminal, porém, neste trabalho, o G2 e o G3 não somaram neste parâmetro avaliado.

Nossos resultados corroboram com os dados obtidos em outro trabalho [16], que não observou influência na MOT espermática em cães férteis (26%) e subférteis (11%), após a adição de antioxidantes, incluindo a vitamina E, na criopreservação seminal. Outras pesquisas também utilizaram a vitamina E em meio Tris-gema, na criopreservação do sêmen canino, sem diferença significativa na MOT (21,42%) [3] e (27,39%) [8].

O TTR nos tempos de 0, 60 e 120 min também foi observado para avaliar a MOT e o VG espermáticos, sendo que esses parâmetros também não apresentaram diferença estatística após a adição de ácido palmítico (50 μ M e 100 μ M) ao diluidor Tris-gema na criopreservação de sêmen bovino ($P > 0,05$) [5]. Em contrapartida, o ácido palmítico, nas mesmas concentrações supracitadas, quando adicionado ao diluidor citrato sódico-gema aumentou a MOT, a motilidade progressiva e a viabilidade de espermatozoides refrigerados de bovinos [15].

É possível observar na Tabela 2 que a adição do ácido palmítico e da vitamina E também não influenciou o VG espermático. A média do VG no tempo zero (0) para todos os tratamentos foi de 2,84, resultado semelhante foi observado em outra pesquisa (2,67) que

utilizou em seu experimento dois antioxidantes com concentrações diferentes, dentre eles 200 μ M do análogo da vitamina E (Trolox), adicionados ao diluidor Tris-gema [9]. A autora confirmou que este parâmetro espermático não apresentou diferenças significativas entre os grupos testados. Valores inferiores de VG foram verificados em espermatozoides caninos criopreservados nos diluidores Tris-gema (1,65) e ACP106® (1,82) quando adicionados de vitamina E [8]. Vale destacar que os espermatozoides dos cães do nosso trabalho tinham mais dificuldade de movimentação nas amostras seminais suplementadas com a vitamina E do que com o ácido palmítico, cuja a primeira substância se apresentou mais viscosa que a última.

Outro estudo [23] revelou que o diluidor Tris-gema acrescido de Trolox foi um meio eficiente para manter os valores de VG espermáticos criopreservados superiores a 2,5, porém também sem diferença significativa entre as diferentes concentrações do antioxidante (100 e 200 μ M). Além disso, os autores mostraram que houve redução significativa na longevidade das células espermáticas em função do tempo no teste TTR, corroborando com nossos resultados.

Como é observado nas Tabelas 1 e 2, a MOT e o VG espermáticos variaram de acordo com os tempos avaliados no TTR, ou seja, durante a análise do teste ocorreu uma redução nos valores destes parâmetros. Isso pode acontecer devido a um maior consumo das reservas nutritivas das células espermáticas no decorrer desse período de tempo, além das perdas de componentes intracelulares ou de possíveis lesões estruturais, diminuindo, assim, sua viabilidade em função da redução do ATP produzido durante as primeiras horas de incubação [4,25].

Um resultado recente revelou que os espermatozoides de javali podem utilizar o ácido palmítico e o ácido oleico, adicionados em diluidor citrato trissódico, como substratos de energia para a produção de ATP ao longo de um período de tempo de até 3 h a 37°C [29].

Não se tem conhecimento se o acréscimo de ácido palmítico a esse diluidor seminal em cães terá essa mesma resposta ao longo do tempo de incubação, o que estimula mais pesquisas no futuro.

Já se tem dados na literatura sobre o uso do ácido palmítico como antioxidante no processo de refrigeração e criopreservação de sêmen de touros [5,15], porém ainda não tinha sido encontrado resultados em cães até este trabalho.

A Tabela 3 aponta que as membranas acrosomais espermáticas não sofreram interferência dos antioxidantes empregados, inclusive as porcentagens de AC íntegros se mostraram semelhantes entre os grupos ($\geq 41\%$).

A reação acrossômica é uma etapa fundamental no sucesso da fertilização, porém a fusão espermatozoide-óocito está relacionada com os ácidos graxos presentes na membrana acrossomal e membrana plasmática [11]. Em humanos, o ácido graxo poli-insaturado - ácido docosahexaenóico - representa 50% do conteúdo total desses ácidos nos espermatozoides [21], sendo mais predominante na cabeça [11], onde fica o acrossoma; já em cães esse ácido é mais encontrado no fluido do corpo do epidídimo [2], local de maturação dos espermatozoides. A presença desse ácido relaciona-se diretamente com a MOT espermática, o VG e a reação acrossômica no homem e essas informações podem explicar uma maior capacidade de sobrevivência das células espermáticas humanas na criopreservação [18,19,21], possivelmente a presença e o local de encontro desse ácido poli-insaturado seja uma das justificativas da sensibilidade dos espermatozoides de cães quando comparado com o de humanos durante esse processo, e, mais uma vez, ressalta-se o uso de antioxidantes no diluidor seminal de cães como uma alternativa de diminuição de danos às células espermáticas.

Também foi observado na Tabela 3 que a atividade das mitocôndrias não evidenciou melhora com a adição dos antioxidantes, sendo que somente o G2 apresentou porcentagem acima de 30% de potencial mitocondrial. Esse parâmetro está associado à produção de energia dos espermatozoides, essencial para a MOT e VG espermáticos [1]. Assim, observou-se nos grupos testados neste trabalho, uma relação entre a baixa atividade mitocondrial e os menores valores de movimento e viabilidade espermáticas (MOT e VG).

Notou-se, ainda na Tabela 3, que o grupo do ácido palmítico (G2) apresentou a melhor porcentagem de espermatozoides com MP íntegra (45,60%) se

sobressaindo do G3 (39,80%), que também foi melhor que o controle (28,4%). A composição lipídica da membrana plasmática dos espermatozoides está diretamente relacionada à MOT e à fluidez dessa membrana [22].

Apesar de a composição exata da membrana plasmática espermática de cães ainda ser um pouco desconhecida, ela pode ser definida pela presença de fosfolipídeos, glicerofosfolipídeos e colesterol [18]. Uma pesquisa revelou a presença de alguns fosfolipídeos em grande quantidade na membrana plasmática espermática de cães: fosfatidilcolina (ácidos graxos esteárico, araquidônico e oleico) fosfatidiletalona (mirístico e araquidônico), além de ácidos glicerofosfatídicos (ácido palmítico) [18]. É importante frisar que quanto mais a membrana plasmática se mantém intacta durante o processo de criopreservação, mais ela consegue sustentar o equilíbrio osmótico celular e formar uma barreira de proteção entre o meio intra e extracelular.

O ácido palmítico é um dos ácidos graxos saturados de maior abundância na membrana plasmática de espermatozoides de humanos [11], de cães [18] e de outros animais como o javali [28]. É um ácido graxo também muito presente no plasma seminal canino [10]. Esses autores revelaram que os lipídios totais no plasma seminal foram de 2,5%, correspondendo a 85% de ácidos graxos saturados e 15% de ácidos graxos insaturados. As maiores proporções de ácidos graxos saturados foram o ácido palmítico (30,4%), ácido esteárico (23,4%) e ácido mirístico (5,3%), além do ácido graxo insaturado - ácido oleico (9,0%).

CONCLUSÃO

Conclui-se que a adição do ácido palmítico na concentração de 100 μ M ao diluidor Tris-gema foi capaz de preservar a integridade da membrana plasmática durante o processo de criopreservação do sêmen de cães.

MANUFACTURERS

¹Sigma-Aldrich®. St. Louis, MO, USA.

²Dinâmica®. Química Contemporânea Ltda. Indaiatuba, SP, Brazil.

³Olympus Corporation. Shinjuku-ku, Tokyo, Japan.

⁴SAS Institute Inc. Cary, NC, USA.

Ethical approval. The study was approved by the Committee of Ethics in Animal Use of the Federal University of Piauí (CEUA/UFPI), PI, Brazil, under protocol number 487/18.

Declaration of interest. The authors report no conflicts of interest. The authors alone are responsible for the content and writing of paper.

REFERENCES

- 1 Amaral A., Lourenço B., Marques M. & Ramalho-Santos J. 2013. Mitochondria functionality and sperm quality. *Reproduction*. 146(5): 163-174.
- 2 Angrimani D.S.R., Nichi M., Losano J.D.A., Lucio C.F., Veiga G.A.L., Franco M.V.M.J. & Vannucchi C. 2017. Fatty acid content in epididymal fluid and spermatozoa during sperm maturation in dogs. *Journal of Animal Science and Biotechnology*. 8(18): 1-8.
- 3 Baptista Sobrinho C.A. 2009. Efeito do tratamento com antioxidantes na qualidade de espermatozoides criopreservados de cães. 99f. São Paulo, SP. Tese (Doutorado em Reprodução Animal) - Programa de Pós-Graduação em Reprodução Animal, Universidade de São Paulo.
- 4 Barros M.H.C., Shiomi H.H., Amorim L.S., Siqueira J.B., Pinho R.O., Lima D.M.A., Lopes P.S., Guimarães S.E.F. & Guimarães J.D. 2013. Viabilidade espermática do sêmen congelado de suínos da raça piau avaliada pelo teste de termorresistência. *Acta Veterinaria Brasilica*. 7(2): 164-170.
- 5 Castelo Branco Y.N.T.C. 2018. Efeito da suplementação dos ácidos oléico e palmítico e do eugenol na criopreservação de sêmen bovino. 110f. Teresina, PI. Tese (Doutorado em Ciência Animal) - Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Universidade Federal do Piauí.
- 6 CBRA - Colégio Brasileiro de Reprodução Animal. 2013. *Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal*. 3.ed. Belo Horizonte: CBRA, pp.52-53.
- 7 Chacur M.G.M., Souza M.G.R., Souza C.D. & Cremasco C.P. 2017. Efeito da administração via oral de selênio e vitamina E na qualidade do sêmen fresco, refrigerado e congelado em cães da raça Bulldog Francês. *Acta Scientiae Veterinariae*. 45: 1442. 7p.
- 8 Chacur M.G.M., Souza M.G.R., Souza C.D. & Cremasco C.P. 2017. Influência da adição de vitamina E em meios diluentes a qualidade do sêmen fresco diluído, refrigerado e congelado em cães da raça Bulldog Francês. *Acta Scientiae Veterinariae*. 45: 1428. 6p.
- 9 Coleto Z.F. 2006. Congelamento do sêmen da espécie canina adicionado antioxidantes. 103f. Recife, PE. Tese (Doutorado em Ciência Veterinária) - Programa de Pós-Graduação em Ciência Veterinária, Universidade Federal Rural de Pernambuco.
- 10 Díaz R., Inostroza K., Risopatron J., Sanchez R. & Sepulveda N. 2014. Identification of fatty acids in canine seminal plasma. *Andrologia*. 46: 194-197.
- 11 Esmaeili V., Shahverdi A.H., Moghadasian M.H. & Alizadeh A.R. 2015. Dietary fatty acids affect semen quality: a review. *Andrology*. 3: 450-461.
- 12 Futino D.O., Mendes M.C.B., Matos W.N.L., Mondadori R.G. & Lucci C.M. 2010. Glycerol, methyl-formamide and dimethyl-formamide in canine semen cryopreservation. *Reproduction in Domestic Animals*. 45(2): 214-220.
- 13 Guthrie H.D. & Welch G.R. 2006. Determination of intracellular reactive oxygen species and high mitochondrial membrane potential in Percoll-treated viable boar sperm using fluorescence-activated flow cytometry. *Journal of Animal Science*. 84(8): 2089-2100.
- 14 Hatamoto L.K., Baptista Sobrinho C.A., Nichi M., Barnabé V.H., Barnabé R.C. & Cortada C.N.M. 2006. Effects of dexamethasone treatment (to mimic stress) and vitamin E oral supplementation on the spermogram and on seminal plasma spontaneous lipid peroxidation and antioxidant enzyme activities in dogs. *Theriogenology*. 66(6-7): 1610-1614.
- 15 Kiernan M., Fahey A.G. & Fair S. 2013. The effect of the in vitro supplementation of exogenous long-chain fatty acids on bovine sperm cell function. *Reproduction Fertility and Development*. 25(6): 947-954.
- 16 Lopes B.V. 2010. Efeito da adição e/ou suplementação de antioxidante no processo de congelamento/descongelamento de sêmen de cães férteis e subférteis. 102f. Botucatu, SP. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) - Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Universidade Estadual Paulista.
- 17 Lopes-Santiago B.V., Monteiro G.A., Bittencourt R., Arduino F., Ovidio P.P., Jordão-Júnior A.A., Araújo Jr. J.P. & Lopes M.D. 2012. Evaluation of sperm DNA peroxidation in fertile and subfertile dogs. *Reproduction in Domestic Animals*. 47(Suppl 6): 208-209.
- 18 Lucio C.F., Brito M.M., Angrimani D.S.R., Belaz K.R.A., Morais D., Zampieri D., Losano J.D.A., Assumpção M.E.O.A., Nichi M., Eberlin M.N. & Vannucchi C. 2017. Lipid composition of the canine sperm plasma membrane as markers of sperm motility. *Reproduction in Domestic Animals*. 52(2): 208-213.

- 19 Macías García B., González Fernández L., Ortega Ferrusola C., Morillo Rodríguez A., Gallardo Bolaños J.M., Rodríguez Martínez H., Tapia J.A., Morcuende D. & Peña F.J. 2011. Fatty acids and plasmalogens of the phospholipids of the sperm membranes and their relation with the post-thaw quality of stallion spermatozoa. *Theriogenology*. 75(5): 811-818.
- 20 Makloski C.L. 2012. Clinical techniques of artificial insemination in dogs. *Veterinary Clinics: Small Animal Practice*. 42(3): 439-444.
- 21 Martínez-Soto J.C., Landeras J. & Gadea J. 2013. Spermatozoa and seminal plasma fatty acids as predictors of cryopreservation success. *Andrology*. 1: 365-375.
- 22 Ortega-Morales L.D., Alcantar-Rodriguez A., Espejel M.C. & Medrano A. 2019. The effect of non-traditional cooling on dog sperm cryosurvival and ability to perform the acrosome reaction. *Austral Journal of Veterinary Sciences*. 51: 73-82.
- 23 Peixoto P.C.V.A., Coletto Z.F., Moura C.S., Almeida F.C., Soares P.C., Silva S.V. & Guerra M.M.P. 2013. Efeito da adição de trolox e glutatona reduzida na viabilidade in vitro de espermatozoides de cães. *Ciência Animal Brasileira*. 14(4): 436-447.
- 24 Santos J.F.P., Gomes E.T., Siqueira A.K.M. & Cardoso R.C.S. 2016. Andrologia e criopreservação de sêmen em cães. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*. 40(4): 167-179.
- 25 Silva A.R., Cardoso R.C.S. & Silva L.D.M. 2006. Influence of temperature during glycerol addition and post-thaw dilution on the quality of canine frozen semen. *Reproduction in Domestic Animals*. 41: 74-78.
- 26 Silva A.R., Fontenele-Neto J.D., Cardoso R.C.S., Silva L.D.M., Chirinéa V.H. & Lopes M.D. 2009. Description of ultrastructural damages in frozen-thawed canine spermatozoa. *Ciência Animal Brasileira*. 10(2): 595-601.
- 27 Vieira N.M.G. 2018. Estresse oxidativo seminal em cães: estudo da susceptibilidade dos espermatozoides e possíveis terapias durante a criopreservação. 111f. São Paulo, SP. Tese (Doutorado em Reprodução Animal) - Programa de Pós-Graduação em Reprodução Animal, Universidade de São Paulo.
- 28 Waterhouse K.E., Hofmo P.O., Tverdale A. & Miller Jr. R.R. 2006. Within and between breed differences in freezing tolerance and plasm membrane fatty acid composition of boar sperm. *Reproduction*. 131: 887-894.
- 29 Zhu Z., Li R., Feng C., Liu R., Zheng Y., Hoque S.A.M., Wu D., Lu H., Zhang T. & Zeng W. 2020. Exogenous oleic acid and palmitic acid improve boar sperm motility via enhancing mitochondrial β -oxidation for ATP generation. *Animals*. 10(591): 1-15.