

Estudo preliminar do efeito de diferentes carboidratos na motilidade de células espermáticas de bovinos da raça Gir

Preliminary study of different effect of carbohydrates on the sperm cells motility from Gir bovine

DOI: 10.34188/bjaerv6n1-029

Recebimento dos originais: 20/12/2022

Aceitação para publicação: 02/01/2023

Laís Paschoal Campoi

Student in Veterinary Medicine from University of Uberaba(UNIUBE)

Instituição: University of Uberaba.

Endereço: Av. Nenê Sabino 1800, Zip Code 38061-500, Uberaba-MG/ Brazil,

E-mail: laiscampoi2102@edu.uniube.br

Júlia Eduarda Caetano de Oliveira

Student in Veterinary Medicine from University of Uberaba(UNIUBE)

Instituição: University of Uberaba.

Endereço: Av. Nenê Sabino 1800, Zip Code 38061-500, Uberaba-MG/ Brazil,

E-mail: juliaeduarda@edu.uniube.br

Nathalia Sthefanie Ricardo da Silva

Graduated in Veterinary Medicine from University of Uberaba(UNIUBE)

Instituição: University of Uberaba.

Endereço: Av. Nenê Sabino 1800, Zip Code 38061-500, Uberaba-MG/ Brazil,

E-mail: nathaliasricardo@gmail.com

Augusto Urzedo Pereira Queiroz

Graduated in Veterinary Medicine from University of Uberaba(UNIUBE)

Instituição: University of Uberaba.

Endereço: Av. Nenê Sabino 1800, Zip Code 38061-500, Uberaba-MG/ Brazil

E-mail: augusto_agso@hotmail.com

Manoel Lucas de Silva Carvalho

Student in Veterinary Medicine from University of Uberaba(UNIUBE)

Instituição: University of Uberaba.

Endereço: Av. Nenê Sabino 1800, Zip Code 38061-500, Uberaba-MG/ Brazil

E-mail: mcs27092002@gmail.com

Júlia Fleury Tannús

Student in Veterinary Medicine from University of Uberaba (UNIUBE)

Instituição: University of Uberaba.

Endereço: Av. Nenê Sabino 1800, Zip Code 38061-500, Uberaba-MG/ Brazil

E-mail: juliafleurytannus@gmail.com

Amanda Pífano Neto Quintal

Ph.D. in from Immunology and applied Parasitology from Federal University of Uberlândia (UFU)

Instituição: Faculdade Associadas de Uberaba (FAZU)

Endereço: Av. do Tutuna, 720 - Tutunas, Zip Code 38061-500, Uberaba –MG/ Brazil

E-mail: apnquintal@yahoo.com

André Belico de Vasconcelos

Ph.D. in Animal Science from Federal University of Minas Gerais (UFMG)
Instituição: University of Uberaba
Endereço: Av. Nenê Sabino 1800, Zip Code 38061-500, Uberaba-MG/ Brazil
E-mail: devasconcelos.a.b@gmail.com

RESUMO

Objetivou-se avaliar a motilidade e o vigor de espermatozoides bovinos (*in natura*) quando submetidos a diferentes tipos de carboidratos. Três amostras de sêmen de cada quatro touros da raça Gir leiteiro foram utilizadas. Estas foram divididas em grupos: glicose (6mM); frutose (6mM); lactose (6mM) e sacarose (6mM), definindo assim quatro grupos e uma alíquota foi mantida sem a presença de carboidratos. Todas as amostras foram acondicionadas em tubos tipo eppendorf e mantidas a 37°C em banho maria e avaliadas quanto a motilidade e vigor em intervalos de 10 min, em microscopia de campo claro x10. Os dados foram expressos em média e desvio padrão. Análise de variância (ANOVA) foi realizada seguida pelo pós-teste de Tukey. $P < 0.05$. Das análises dos carboidratos foi observado que os valores de motilidade e vigor para as amostras que estavam na presença de frutose apresentaram diferença estatística quando comparada os demais grupos com carboidratos. A ação de diferentes carboidratos sobre a motilidade espermática não está diretamente ligada ao tipo de carboidrato e sim a aspectos bioquímicos das células espermáticas caracterizado pela especificidade do carboidrato e concentração utilizada.

Palavras-chave: Metabolismo, Espermatozoide, Viabilidade

ABSTRACT

The objective was to evaluate bovine spermatozoa (*in natura*) motility and vigor when submitted to different types of carbohydrates. Three semen samples from every four Gir dairy bulls were used. These were divided groups: glucose (6mM); fructose (6mM); lactose (6mM) and sucrose (6mM); thus defining four groups and an aliquot was maintained without the presence of carbohydrates. All samples were placed in tubes and kept at 37°C in a water bath and evaluated for motility and vigor at 10 min intervals, in x10 bright field microscopy. Data were expressed as mean and standard deviation. Variance analysis (ANOVA) was performed followed by Tukey's post-test. $P < 0.05$. From the analyzes of the carbohydrates, it was observed that the motility and vigor values for the samples that were in the presence of fructose showed statistical difference when compared to the other groups with carbohydrates. The different carbohydrates action on sperm motility is not directly linked to the carbohydrate type, but to biochemical aspects of sperm cells characterized by the carbohydrate specificity and the concentration used.

Keywords: Metabolism, Sperm, Viability

1 INTRODUÇÃO

A avaliação da viabilidade do sêmen é uma ferramenta que apresenta grandes vantagens para o programa de reprodução de bovinos. Estudos dos aspectos microscópicos do sêmen como a motilidade e o vigor são de grande relevância para a seleção de doadores de sêmen uma vez que a relação entre a taxa de fertilidade é relevante. (RONDA et al., 2019).

Contudo para a obtenção de resultados positivos nos processos de reprodução é necessário observar que fatores externos podem influenciar a resposta das células da linhagem reprodutiva, pois tornam-se essenciais os mecanismos bioquímicos e fisiológicos que acometem estas células,

uma vez que estas utilizam uma grande quantidade de ATP e conseqüentemente necessitam de alta produção de energia (VASCONCELOS et al., 2009).

Dois processos metabólicos denominados glicólise e respiração, mantêm um adequado balanço energético à célula espermática, sendo suas taxas largamente dependentes da concentração de substrato e oxigênio no sêmen (MANN, 1975). Em presença de oxigênio, os espermatozoides utilizam uma variedade de substratos incluindo ácidos graxos, ácido láctico, glicerol, certos aminoácidos e sorbitol (HAMMERSTEDT, 1975; MANN;LUTWAK-MANN, 1981).

O metabolismo oxidativo dos espermatozoides bovinos tem relação com a taxa de consumo de oxigênio dos espermatozoides, como relatado por Yanagimachi (1974), que observou resultados significativos na relação da maior motilidade, com o maior o consumo de oxigênio. Posteriormente, Chow e colaboradores (1986) descreveram que a capacidade de fosforilação do sêmen bovino favorece mudanças bioquímicas nas células espermáticas durante a capacitação *in vitro*.

Para tal enzimas hexoquinase, lactato desidrogenase entre outras são necessárias para metabolizar frutose e outras hexoses, e que estão relacionadas a aspectos fisiológicos das células espermáticas como a própria motilidade espermática (SCHALLER; GLANDER, 2000).

Assim, o objetivo do trabalho foi avaliar a motilidade e o vigor de espermatozoides bovinos (in natura) quando submetidos a diferentes tipos de carboidratos.

2 METODOLOGIA

O projeto foi aprovado pelo comitê de ética em experimentação Animal da Universidade de Uberaba, protocolo nº 013/2018

Coleta de sêmen e Animais

Foram utilizadas três amostras de sêmen de cada quatro touros da raça Gir leiteiro (*Bos taurus indicus*) (n=12), com 48 a 60 meses de idade. Para a coleta do sêmen foi utilizado o método de eletroejaculação (EE), empregando-se o aparelho eletroejaculador modelo (TK5000CS3). Os ejaculados foram coletados em tubos coletores graduados, acoplados a funis previamente aquecidos a 37 °C.

Os parâmetros mínimos das amostras de sêmen para o presente estudo foram: motilidade total ($\leq 50\%$), vigor espermático (≤ 3), e concentração espermática ($\leq 6 \times 10^8$ /ml); para avaliação da motilidade e vigor, como também concentração espermática seguiram conforme ao relatado por Oliveira et al 2018. As análises morfológicas foram realizadas por meio de preparação úmida, com auxílio de microscopia de contraste de fase em aumento de 1000x. Foram

avaliadas 1000 células por ejaculado, quanto a defeitos espermáticos maiores, menores e totais, conforme relatado por Ronda et al 2019.

Todos os animais receberam o mesmo manejo alimentar e estavam alocados em piquetes individuais na fazenda experimental Getúlio Vargas/EPAMIG, localizada em Uberaba-MG, com mesma dimensão e predominância de capim do gênero *Panicum sp*, e fornecimento de água e mistura mineral *ad libitum*, em área de lazer com sombreamento artificial de 4m²/animal.

Delineamento Experimental

Cinco grupos de estudo foram comparados com o intuito de avaliar a resposta de motilidade e vigor do espermatozoide bovino, na presença de diferentes carboidratos. Para tal o sêmen fresco foi fracionado e diluído (objetivando alcançar a concentração espermática de 6×10^7 spz/ml), nos carboidratos glicose (6mM); frutose (6mM); lactose (6mM) e sacarose (6mM), definindo assim quatro grupos e uma alíquota foi mantida sem a presença de carboidratos (diluída em solução PBS). Todas as amostras foram acondicionadas em tubos tipo eppendorf e mantidas a 37C em banho maria e avaliadas quanto a motilidade e vigor em intervalos de 10 mim, em microscopia de campo claro x10.

Estatística

Para análise estatística foi utilizado o programa Graphpad prism 6.0 (Graphpad software Inc., San Diego, USA). Os dados foram expressos em média e desvio padrão. Análise de variância (ANOVA) foi realizada seguida pelo pós-teste de Tukey. $P < 0.05$.

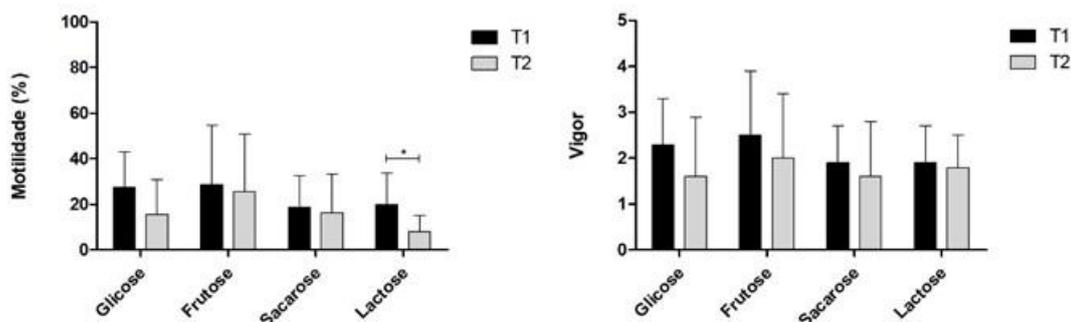
3 RESULTADO E DISCUSSÃO

Das avaliações do sêmen *in natura* observou-se valores médios da motilidade total (65,3%), vigor espermático (3,5) e patologia normal. Os valores referentes encontram-se dentro do padrão recomendado pelo Manual do Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (2013).

Na análise do sêmen *in natura* durante o período de 10 e 20 minutos de incubação a 37C foi observado valores médios de 49,4% e 28,1% respectivamente. Esta diminuição pode estar relacionada a uma queda do extrato energético disponível para as células espermáticas, conforme relatado por Vasconcelos e colaboradores (2009) que ao estudar espermatozoides de equinos observaram diminuição na motilidade espermática, com variação da presença de catabólitos provenientes do metabolismo aeróbio.

Das análises dos carboidratos foram observados que os valores de motilidade e vigor para as amostras que estavam na presença de frutose, tempo 10 minutos, apresentaram significância ($p < 0.05$), quando comparadas aos demais carboidratos, para o mesmo período (Figura 1).

Figura 1. Análise da motilidade espermática e vigor dos espermatozoides bovinos na presença de diferentes carboidratos, (T1) 10 min e (T2) 20 minutos de incubação.



Nos mesmos resultados (Figura 1) também foi observado que não há significância ($p > 0.05$) para os valores de motilidade dos espermatozoides na presença de frutose para os tempos 10 min e 20 min de incubação.

Os valores de motilidade e vigor para os demais carboidratos do estudo não apresentaram significância ($p > 0.05$) entre os tempos de avaliação. Contudo observa-se significância ($p < 0.05$) para as amostras que foram mantidas na presença de lactose, com valores médios de motilidade inferiores aos observados aos demais grupos do estudo, após 20 minutos (Figura 1).

Os espermatozoides bovinos têm como extrato energético principal a frutose, que de certa forma estabelece uma diferença primordial nas vias metabólicas, uma vez que estas células não conseguem produzir ATP a partir da glicose posto que a quantidade de enzimas é menor, o que inviabiliza a formação de frutose a partir de glicose (ISKEEP; HAMMERSTEDT, 1983).

Afirmativa que pode ser observada nos resultados de motilidade uma vez que após 20 minutos de incubação os valores de motilidade para glicose (15,6%) são menores quando comparado aos de frutose (25,6%).

A literatura descreve que os espermatozoides apresentam como via metabólica básica a rota aeróbica, uma vez que é dependente da presença de oxigênio. Por conseguinte, verifica-se que esta apresenta três pontos de controle estabelecidos por enzimas: hexoquinase, fosfrutoquinase e pirovatoquinase (HAMMERSTEDT, 1975).

Pela necessidade de utilização de oxigênio, os espermatozoides utilizam a via Embden Meyerhof onde o ATP é consumido durante o metabolismo da frutose e reconvertido durante o metabolismo das trioses. Entende-se que para tal há uma razão entre carboidratos, oxigênio e

enzimas e que este processo está ligado a propriedades cinéticas que são controladas por fatores como concentração inicial de substrato e concentração de produto formado (VASCONCELOS, 2009).

Os resultados baixos de motilidade observados no presente trabalho podem estar relacionados aos pontos de controle metabólico, uma vez que não foi aumentado a taxa de oxigenação e de enzimas no meio, e talvez estes pontos de controle, como a presença de NADH^+ possam ter atuado nas vias cinéticas de controle levando uma baixa porcentagem média de motilidade dos espermatozoides, mesmo na presença de diversos carboidratos (VASCONCELOS et al., 2010).

Por conseguinte, também há a relação das concentrações de carboidratos utilizados no presente trabalho, pois como descrito por Hipakka e Hammerstedt, (1978) quando a concentração de substrato é muito superior a concentração de Oxigênio, presente no meio, ocorre o “Efeito Glicose” o que promove a mudança da rota metabólica e diminuição na viabilidade espermática, como observado no presente trabalho e reportado por Iskeep e Hammerstedt (1983) e Vasconcelos e colaboradores (2009)

Contudo, dá resposta metabólica dos espermatozoides e produção de energia para a motilidade na presença dos demais carboidratos, podemos hipotetizar que a reserva endógena é maior que a exógena para o modelo de estudo, talvez pela grande presença de extrato enérgico provenientes no plasma seminal, como eletrólitos, carboidratos, e aminoácidos (MANN, 1975; RODGER, 1975).

Em concomitância a este ponto, a presença de enzimas e cofatores de controle metabólico que atuam nas células espermáticas irão inviabilizar rotas metabólicas como as via das pentoses e do próprio metabolismo da gliconeogênese. Desta forma a captação de substrato acontecerá por via exógena, principalmente pelos receptores membrana denominados de GLUT que são distribuídos por toda membrana espermática (MANN, 1975; ISKEEP;HAMMERSTEDT, 1985; VASCONCELOS, 2009).

Estes receptores têm ação específica para poli-hidroxialdeído e poli-hidroxiketona, caracterizados por monossacarídeos (ÂNGULO et al., 1998). Apresentando especificidade para determinados carboidratos, o que talvez explique a menor porcentagem de motilidade dos espermatozoides para os demais carboidratos após 20 minutos de incubação.

Assim os resultados do presente estudo corroboram com trabalhos Yanagimachi (1974); Mann (1975) e Vasconcelos et al (2010) no aspecto teórico, pois caracteriza a fase e rota metabólica do espermatozoide de mamíferos na via aeróbia, com todas as particularidades já descritas na literatura.

4 CONCLUSÃO

O caráter científico do trabalho está relacionado ao um estudo biotecnológico que visa não melhoramento animal, mas sim a potencialização das condições de viabilidade das células germinativas masculinas.

Desta forma a utilização de carboidratos de caráter redutor como frutose e glicose tornam-se de grande interesse para futuros estudos de meios de manutenção e preservação dos espermatozoides, por atuarem diretamente sobre as células.

AGRADECIMENTO

Agradecemos ao Professor André Penido Oliveira†(*in memoriam*); Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG); a empresa TK Equipamentos para Reprodução; a Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais (EPAMIG).

REFERÊNCIAS

- ANGULO C, et al. Hexose transporter expression and function in mammalian spermatozoa: cellular localization and transport of hexoses and vitamin C. *J Cell Biochem*, v.71, p.189-203, 1998.
- CHOW, P. Y. W.; WHITE, I. G.; PICKETT, B. W. Stallion sperm and seminal plasma phospholipids and glycerylphosphorylcholine. *Animal Reproduction Science*, v. 11, p. 207-213, 1986.
- HAMMERSTEDT, R.H. Tritium release from [2-³H] D-glucose as a monitor of glucose consumption by bovine sperm. *Biol Reprod*, v.12, p.545-551, 1975.
- HIIPAKKA, R.A; HAMMERSTEDT, R.H. 2-Deoxyglucose transport and phosphorylation by bovine sperm. *Biol Reprod*, v.19, p.368-379, 1978
- INSKEEP, P.B; HAMMERSTEDT, R.H. A colorimetric method to assess endogenous metabolism and its application to the study of bovine sperm. *J Biochem Biophys Methods*, v.7, p.199-210, 1983.
- INSKEEP, P.B; HAMMERSTEDT, R.H. Endogenous metabolism by Sperm in response to altered cellular ATP requirements. *J Cell Physiol*, v.123, p.180-190, 1985.
- MANN T. Biochemistry of stallion semen. *J Reprod Fertil*, v.23, p.47-52, 1975.
- MANN, T; LUTWAK-MANN, C. *Male reproductive function and semen general features of the seminal plasma*. 2. ed. New York: Springer-Verlag, 1981. p.28-34.
- Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal/Colégio Brasileiro de Reprodução Animal, 3,ed, - Belo Horizonte: CBRA 2013. Disponível em: www.cbra.org.br
- OLIVEIRA, M. et al. Comparison of commercial diluents on motility, functionality and integrity of plasma membrane of bovine spermatozoa. *Revista Brasileira. Clínica. Veterinária.*, v. 25, n. 2, p. 67-71, 2018 . 10.4322/rbcv.2018.013
- RONDA, J. et al. Classificação andrológica por pontos e características andrológicas na avaliação reprodutiva de touros da raça gir candidatos ao teste de progênie. *Cienc. anim. bras.*, Goiânia, v.20, 1-8, e-44670, 2019. <https://doi.org/10.1590/1809-6891v20e-44670>
- RODGER, J.C. Seminal plasma an unnecessary evil. *Theriogenology*, v.3, p.237-246, 1975.
- SCHALLER, J; GLANDER, H.J. Flow cytometric analysis of enzymes in live spermatozoa before and after cryostorage. *Andrologia*, v. 32, n. 6, p. 357-364, 2000.
- VASCONCELOS, A.B. et al. Determination of Optimal Glucose Concentration for Microcalorimetric Metabolic Evaluation of Equine Spermatozoa. *Brazilian Archives of Biology and Technology*. v.52 n.5: pp. 1131-1136, 2009 <https://doi.org/10.1590/S1516-89132009000500010>
- VASCONCELOS, A.B. Bioquímica do sêmen. Congresso Brasileiro de Reprodução Animal, 18, 2009, Belo Horizonte, MG. *Anais ...* Belo Horizonte: CBRA, 2009 10.13140/RG.2.2.25971.35365
- VASCONCELOS, A.B. et al. Metabolic evaluation of cooled equine spermatozoa. *Andrologia* 42(2):106-11, 2010 doi: 10.1111/j.1439-0272.2009.00963.x.
- YANAGIMACHI, R. Mammalian Fertilization. In: Knobil, E and Neil, J.D. (Eds) *The Physiology of Reproduction*. Raven Press, Ltd., New York. pp.189-281, 1974.