

Adição da polpa liofilizada do Noni em diluente para congelação de sêmen sobre a integridade da membrana plasmática de espermatozoides ovinos

V. S. Santos¹; A. D. F. Santos²; D. A. Oliveira³; A. L. C. Nascimento¹; E. M. Santos¹

¹ Programa de Pós Graduação em Zootecnia, Pró-Reitoria de Pós Graduação e Pesquisa, Universidade Federal de Sergipe, CEP. 49100-000, São Cristóvão-SERGIPE, Brasil.

² Professor Adjunto do Departamento de Medicina Veterinária, Centro de Ciências Agrárias Aplicadas, Universidade Federal de Sergipe, CEP. 49100-000, São Cristóvão-SERGIPE, Brasil.

³ Departamento de Medicina Veterinária, Centro de Ciências Agrárias Aplicadas, Universidade Federal de Sergipe, CEP. 49100-000, São Cristóvão-SERGIPE, Brasil.
vanicleide.zootecnia@hotmail.com

(Recebido em 03 de outubro de 2014; aceito em 20 de outubro de 2014)

Objetivou-se verificar o efeito da adição de diferentes concentrações de polpa liofilizada do fruto Noni (*Morinda citrifolia* Linn) a diluente de sêmen, sobre a integridade da membrana plasmática dos espermatozoides ovinos, avaliada por meio do teste hiposmótico (HOST) em cinco ejaculados de carneiros Santa Inês (S.I.). Os tratamentos consistiram de D1 (controle sem adição de polpa liofilizada) D2, D3 e D4 com adição de polpa liofilizada (2,35mg/mL; 4,70mg/mL e 7,05mg/mL respectivamente). As amostras foram congeladas, descongeladas (37 ° C por 30 segundos), incubadas em solução hiposmótica e submetidas a análise da integridade da membrana plasmática por meio do HOST e do TTR imediatamente após congelamento/descongelamento do sêmen e durante o teste de termorresistência lento (TTR). Após descongelamento e fim do TTR, foram encontrados valores médios de 51%, 58%, 52% e 46% e, 31%, 47%, 45% e 44% para os tratamentos D1, D2, D3 e D4 respectivamente. A adição do fruto do noni liofilizado, nas concentrações utilizadas, não promoveu alterações na membrana dos espermatozoides, recomendando estudos com um número maior de repetições para determinar a sua viabilidade.

Palavras-chave: hiposmótico, *Morinda citrifolia* Linn e células espermáticas.

Addition of freeze-dried pulp of Noni in diluent for semen freezing on the integrity of the plasma membrane of sperm ram

This study aimed to verify the effect of the addition of freeze-dried pulp concentrations of Noni fruit (*Morinda citrifolia* Linn) in semen diluent, on the integrity of the plasma membrane of sperm sheep, evaluated by hiposmotic test (HOST) in five ejaculates rams Santa Inês (SI). The treatments consisted of D1 (control without addition of freeze-dried pulp) D2, D3 and D4 with the addition of freeze-dried pulp (2,35mg / mL; 4,70mg / mL and 7,05mg / mL respectively). The samples were frozen, thawed (37 ° C for 30 sec), incubated in hypotonic solution and subjected to analysis in the integrity of the plasma membrane by the HOST and TTR immediately after freezing / thawing the semen and heat resistance during the slow test (TTR). After thawing and end of TTR were found average values of 51%, 58%, 52% and 46% and 31%, 47%, 45% and 44% for treatments D1, D2, D3 and D4 respectively. The addition of the pulp fruit of the lyophilized noni in concentrations used, didn't change the membrane of sperm, recommending studies with a larger number of repetitions to determine its viability.

Keywords: hypotonic, *Morinda citrifolia* Linn and sperm cells

1. INTRODUÇÃO

A criopreservação proporciona o armazenamento do sêmen de animais de alto valor zootécnico por um longo período de tempo, favorecendo a capacidade reprodutiva do macho, mesmo após a morte. Além de permitir a redução de custos com a criação de reprodutores³.

Apesar dos avanços com a inseminação cervical, os resultados inerentes a congelação de sêmen são insatisfatórios em ovinos². Cerca de 40 a 50% dos espermatozoides não sobrevivem à criopreservação²¹. A congelação consiste em submeter o sêmen a temperaturas reduzidas, inibindo de forma reversível o metabolismo celular¹³. Contudo, a criopreservação afeta a composição lipídica e organizacional da membrana plasmática de espermatozoides ovinos,

resultando em danos estruturais e predispondo os espermatozoides a defeitos morfológicos¹¹. A manipulação dos espermatozoides com o intuito de preservá-los e utilizá-los por longos períodos, ocasiona danos à estrutura espermática, comprometendo suas funções biológicas como a diminuição da capacidade respiratória, motilidade e integridade dos componentes estruturais^{17,16}. E os danos à membrana causados pela criopreservação, afetam a capacitação e hiperativação espermática, assim como o processo de fertilização, o que pode ser observado quando o mesmo número de espermatozoides é inseminado, a fertilidade do sêmen fresco é superior ao criopreservado²⁰.

Estes eventos são provavelmente estimulados pelo acúmulo de produtos do metabolismo, que diminuem o transporte e a sobrevivência dos espermatozoides no trato genital feminino^{13,1}, como as espécies reativas ao oxigênio (ROS), que levam ao estresse oxidativo, influenciando a qualidade espermática.

Devido à presença de determinados compostos com função antioxidante em várias partes da planta, o Noni (*Morinda citrifolia* Linn) tem sido estudado como um provável ingrediente capaz de equilibrar ou reduzir a produção de ROS intensificados durante o processo de congelamento/descongelamento. Com destaque para o fruto que contém os componentes proxeronina, precursora do alcalóide xeronina que ativa as enzimas catalisadoras do metabolismo celular¹⁸, altos teores de vitamina C e carotenóides⁷.

O teste hiposmótico (HOST) avalia a integridade funcional da membrana plasmática através da observação de um espermatozoide, com uma membrana íntegra, se colocado em solução hiposmótica permite a passagem da água pela membrana celular até ocorrer o restabelecimento do equilíbrio entre os fluidos extra e intracelulares¹⁴.

Em virtude da necessidade da diminuição de danos causados as células espermáticas durante os processos de congelamento/descongelamento, objetivou-se avaliar a adição da polpa liofilizada do fruto do Noni, em diferentes concentrações a diluente para congelamento de sêmen ovino sobre a integridade de membrana plasmática, a partir do teste hiposmótico.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

Foram realizadas cinco coletas de sêmen com dois reprodutores da raça Santa Inês (S.I.) com idade entre um e dois anos, usando como manequim para coleta, uma fêmea (S.I.) em estro pela técnica da vagina artificial, com água aquecida entre 47 e 50°C.

Imediatamente após a coleta, o sêmen foi encaminhado ao laboratório, avaliado quanto ao volume no próprio tubo de coleta e mantido em Banho-Maria a 30-32°C até o momento da diluição. Retirou-se uma gota de sêmen para avaliação do turbilhonamento (0 a 5), motilidade subjetiva (0 a 100%) e vigor (0 a 5), sobre lâmina e lamínula aquecidas a 37°C, por microscopia óptica sob magnitude de 100x. Como critério para congelamento, foram utilizados apenas ejaculados com motilidade progressiva $\geq 70\%$, vigor ≥ 3 , conforme recomendações do Colégio Brasileiro de Reprodução Animal⁶.

Após determinação da concentração em câmara de Neubauer por microscopia ótica com magnitude de 400x, o sêmen foi diluído nos meios a base Tris-Gema-Glicerol a partir solução padrão do fabricante Multiplique® adicionando a polpa liofilizada em diferentes concentrações, sendo o tratamento D1 o grupo controle, sem adição da polpa e D2, D3 e D4 contendo 2,35mg/mL, 4,70mg/mL e 7,05mg/mL de polpa liofilizada do Noni respectivamente. Armazenou-se em palhetas de 0,25mL, refrigerado e congelado em máquina TK-4000 (resfriamento de 0,25°C/min até 5°C com uma hora de estabilização e 20°C/min até atingir -140°C). Em seguida as palhetas foram armazenadas em raques, em botijão criogênico, com nitrogênio líquido a -196°C.

Para as análises de integridade da membrana plasmática das células espermáticas, realizou-se o HOST do sêmen diluído⁸, antes da congelamento, imediatamente após descongelamento e durante o TTR, seguindo a técnica recomendada pelo Colégio Brasileiro de Reprodução animal⁶. Para tanto, cinco palhetas de cada tratamento foram descongeladas (37°C por 30 segundos), mantidas em microtubos em Banho-Maria a 37°C, durante um período de quatro horas. Imediatamente após descongelamento, uma alíquota de 20µL de sêmen foi disposta em um microtubo contendo 1mL de solução hiposmótica frutose citrato a 125mOsm/L, onde permaneceu incubada em

Banho-Maria a 37°C por uma hora. O mesmo foi realizado para os momentos 1, 2, 3 e 4 horas após descongelação. Decorrido o tempo de incubação, prosseguiu-se a análise da integridade da membrana plasmática, depositou-se 10 µL da solução contendo o sêmen entre lâmina e lamínula e foram contadas 200 células espermáticas em microscopia de contraste de fases no aumento de 1000X e obtido o valor expresso em porcentagem de espermatozoides com cauda dobrada, subtraindo-se os defeitos morfológicos de cauda dobrada relacionada à patologia, analisados pré-congelamento. Adotou-se o padrão de dobradura de cauda (Figura 1).

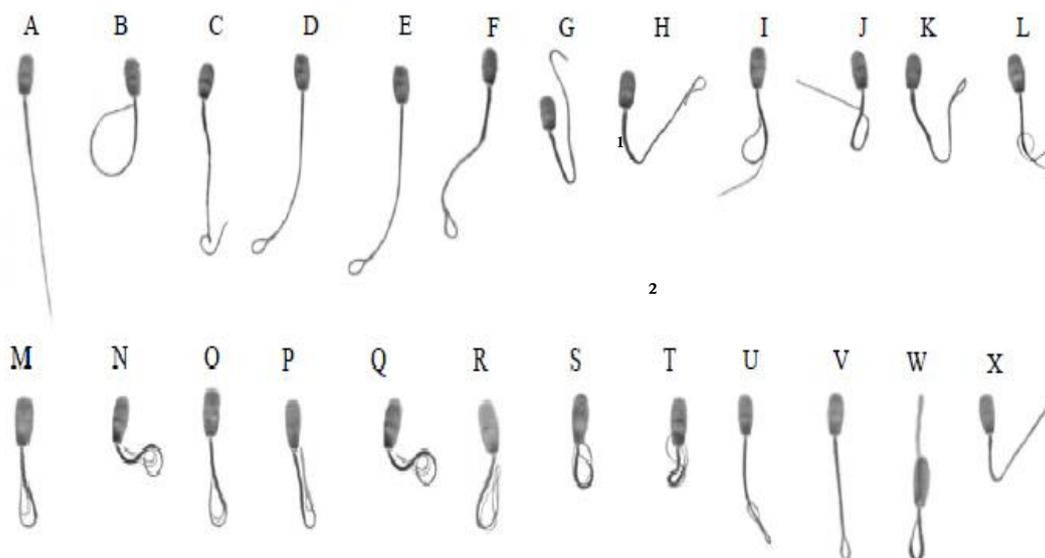


Figura 1: Diferentes graus de enrolamento de cauda de espermatozoides submetidos ao teste hiposmótico. A espermatozoide com membrana lesada e B-Z espermatozoides com membrana íntegra⁸.

Verificou-se a normalidade dos dados através do teste Shapiro-wilk, utilizando o programa estatístico SAS 9.3 (Statistical Analysis System, 2010)¹⁵. Após confirmação da normalidade, foram submetidas à análise de variância (ANOVA) e as médias avaliadas pelo teste de comparação múltipla Student – Newman – Keuls, onde adotou-se diferença significativa entre os dados quando $p < 0,05$, utilizando-se o programa estatístico GraphPadPrism versão 5.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, E.U.A.).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A adição da polpa liofilizada do fruto do Noni não promoveu alterações ($P > 0,05$) relacionadas à funcionalidade da membrana plasmática, determinada pelo teste hiposmótico do sêmen diluído e durante o teste de termoresistência (TTR) (Tabela 1). Porém, quando adicionado até 4,70mg/mL (D3) da polpa, observou-se uma resposta positiva do sêmen durante o TTR ao teste hiposmótico, com valores superiores a 50%.

Tabela 1: Percentual de espermatozoides reativos ao teste hiposmótico (HOST) em sêmen diluído e durante o TTR em meio diluidor contendo polpa do Noni liofilizada.

Variáveis	Tratamento				P
	D1	D2	D3	D4	
% HOST diluído	68,3±9,8	77,1±1,5	76,5±3,2	72,1±4,1	0,2839
% HOST TTR 0	51,9±8,8	58,3±7,8	52,5±12,0	46,3±9,9	0,6398
% HOST TTR 1h	51,3±7,8	50,7±17,8	45,7±13,0	44,7±9,8	0,8899
% HOST TTR 2h	49,9±6,7	45,7±16,6	50,4±7,7	49,1±8,9	0,9496
% HOST TTR 3h	39,5±11,6	48,1±11,4	45,9±14,4	43,4±14,6	0,8806
% HOST TTR 4h	31,8±9,9	47,8±18,3	45,8±8,3	44,3±17,8	0,7691

TTR – Teste de Termorresistência; D1- grupo controle, sem adição da polpa liofilizada; D2- diluidor contendo 2,35mg/mL; D3- 4,70mg/mL e D4 - 7,05mg/mL.

Imediatamente após o descongelamento encontrou-se os valores médios de 51%, 58%, 52% e 46% para os tratamentos D1, D2, D3 e D4 respectivamente. Ao fim do TTR, os valores encontrados foram de 31%, 47%, 45% e 44% para os tratamentos D1, D2, D3 e D4 respectivamente. Podendo-se observar que o D2 apresentou os melhores valores, porém a ausência de efeito significativo pode ter sido influenciada pelo reduzido número de repetições (n=5). Mostrando que a polpa pode-se apresentar como um protetor de membrana plasmática, entretanto, necessitando de um maior número de repetições, para que isso se comprove.

Os valores de espermatozoides reativos ao teste hiposmótico encontrados no presente trabalho, imediatamente após a descongelação apresentaram-se superiores ao encontrado na literatura⁹, onde os autores encontraram valores de 41,5% de espermatozoides ovinos reativos ao teste hiposmótico, em solução frutose citrato. A solução de frutose citrato é capaz de identificar de forma mais homogênea o percentual de espermatozoides reativos¹². Sendo o teste hiposmótico uma ferramenta excelente e confiável na predição da manutenção da viabilidade de determinada amostra de sêmen após o teste de termorresistência⁴.

A manutenção da integridade da membrana pode ter sido influenciada pelos compostos fenólicos existentes na polpa liofilizada ou por outros componentes antioxidantes com capacidade de reduzir a peroxidação lipídica da membrana plasmática como, por exemplo, a vitamina C, antraquinonas¹⁹, escopoletina, óxido nítrico, e esteróis⁵. A redução do percentual de espermatozoides reativos ao teste hiposmótico pode ser justificada devido à alta concentração utilizada desses compostos. Pois o fruto do noni constitui uma fonte rica de vitamina C, onde apesar da sua eficiência antioxidante, a vitamina também age paradoxalmente como pró-oxidante¹⁰, levando ao estresse oxidativo e comprometendo a integridade das membranas pela ação de prováveis espécies reativas ao oxigênio.

4. CONCLUSÃO

A adição da polpa liofilizada do fruto do Noni nas concentrações utilizadas, não promovem alterações na membrana dos espermatozoides, recomendando-se estudos com um maior número de repetições para determinar sua viabilidade.

1. Aisen E, Quintana M, Medina V, Morello H, Venturino A. Ultramicroscopic and biochemical changes in ram spermatozoa cryopreserved with trehalose-based hypertonic extenders. *Cryobiology*. 2005; 50(3): 239-249.
2. Câmara DR, Guerra MMP. Refrigeração e criopreservação do sêmen ovino: danos inerentes à técnica e influência da suplementação do meio com antioxidantes sobre a qualidade espermática. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*. 2011; 35(1): 33-40.
3. Castelo TS, Frota TR, Silva AR. Considerações sobre a criopreservação do sêmen de caprinos. *Acta Veterinária Brasília*. 2008; 2(3): 67-75.
4. Castilho EFC, Guimarães JD, Martins LF, Pinho RO, Guimarães SEF, Espescht CJB. Uso de própolis e ácido ascórbico na criopreservação do sêmen caprino. *Revista Brasileira de Zootecnia*. 2009; 38(12).
5. Chan-Blanco Y, Vaillant F, Perez AM, Reynes M, Brillouet JM, Brat P. The noni fruit (*Morindacitrifolia* L.): a review of agricultural research, nutritional and therapeutic properties. *Journal of Food Composition and Analysis*. 2006; 19: 645–654.
6. Colégio Brasileiro de Reprodução Animal - CBRA. Manual para Exame Andrológico e Avaliação de Sêmen Animal, (2 ed), Belo Horizonte, CBRA, 1998. 49p.
7. Costa AB, Oliveira AMC, Silva AMO, Mancini-Filho J, Lima A. Atividade antioxidante da polpa, casca e sementes do noni (*Morindacitrifolia* Linn). *Revista Brasileira de Fruticultura*. 2013; 35(2): 345-354.
8. Fonseca JF, Torres CAA, Maffili VV, Borges AM, Santos ADF, Rodrigues MT, Oliveira RFM. The hypoosmotic swelling test in fresh goat spermatozoa. *Animal Reproduction*. 2005; 2:139-144.
9. Fukui Y, Togawa M, Abe N, Takano Y, Asada M, Okada A, Iida K, Ishikawa H, Ohsumi S. Validation of the Sperm Quality Analyzer and the Hypoosmotic Swelling Test for Frozen-thawer Ram and Minke Whale (*Balaenoptera borealis*) Spermatozoa. *Journal of Reproduction and Development*. 2004; 50(1): 147-154.

-
10. Halliwell B, Gutteridge, JMC. Free radicals in biology and medicine. 3^o ed. 7 Oxford University Press, Oxford. 2000. 936 p.
 11. Hinkovska-Galcheva V, Petkova D, Koumanov K. Changes in the phospholipid composition and phospholipid asymmetry of ram sperm plasma membranes after cryopreservation. *Cryobiology*. 1989; 26:70-75.
 12. Moura LCO, Silva MC, Snoeck PPN. Diferentes soluções de teste hiposmótico para sêmen ovino. *Revista Brasileira de Medicina Veterinária*. 2010; 32(1):146-150.
 13. Salamon S, Maxwell WMC. Storage of ram semen. *Animal Reproduction Science*. 2000; 62(1): 77-111.
 14. Santos ADF, Torres CAA, Fonseca JF, Borges AM, Rovay H, Goretti RG, Guimarães JD, Costa EP, Barbosa LP, Maffili VV, Fraga DBM. Uso do teste hiposmótico (HOST) para avaliar a congelabilidade do sêmen de caprinos das raças Alpina e Saanen, jovens e adultos, submetidos ao manejo com luz artificial. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*. 2001; 25(3).
 15. Sas Institute (CARY NC), SAS User's guide: Statistical Analysis System, release 9.3 - 2010.
 16. Silva SV, Guerra MMP. Efeitos da criopreservação sobre as células espermáticas e alternativas para redução das crioinjúrias. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*. 2011; 35(4): 370-384.
 17. Soares AT, Guerra MMP. Efeitos da criopreservação sobre a viabilidade espermática. *Tecnologia e Ciência Agropecuária*. 2009; 3(2): 53-63.
 18. Tombolato FCA, Barbosa W, Hiroce R. et al. Noni: frutífera medicinal em introdução e aclimação no Brasil. *Informações técnicas: O agrônomo*, Campinas. 2005; 57(1):21p.
 19. Wang MY, West BJ, Jensen CJ, Nowicki D, Su C, Palu A, Anderson G. *Morinda citrifolia* (Noni): a literature review and recent advances in Noni research. *Acta Pharmacol Sinica*. 2002; 23:1127-1141.
 20. Watson PF. Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function. *Reproduction Fertility and Development*. 1995; 7:871-891.
 21. Watson PF. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Anim Reprod Sci*, 2000; 60/61: 481-492.