

## **LOCALIZAÇÃO DA Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase EM ESPERMATOZÓIDES DE OVINOS IN NATURA, CAPACITADOS *in vitro* E PÓS-DESCONGELAÇÃO**

### **Resumo**

Objetivando-se localizar a Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase em espermatozoides ovinos (in natura, pós descongelamento e capacitados *in vitro*), assim como avaliar a influência da adição da ouabaína sobre os parâmetros cinemáticos espermáticos, foram realizados dois experimentos. Exp.1: amostras de sêmen (quatro carneiros, sete repetições) foram colhidas, diluídas (Tris-gema, concentração final de 200 x 10<sup>6</sup> espermatozoides/mL) e congeladas à -196 C°. Exp. 2: amostras seminais de quatro ovinos (cinco repetições) foram diluídas em meio TALPm (50 x10<sup>6</sup> espermatozoides/mL) e alíquotadas em dois grupos: parte destinada a capacitação *in vitro* (adição de 2,5% de soro de ovelha em estro - SOE) ou com adição de ouabaína (10<sup>-4</sup> M), visando o bloqueio da Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase. Alíquotas de sêmen de ambos os experimentos foram avaliadas pelo sistema CASA para análise dos parâmetros de cinemática espermática, e por meio da citometria de fluxo, para a localização da Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase (Bodipy FL Ouabaína), análise da integridade de membrana plasmática (IP) e acrossomal (FITC-PNA), viabilidade e estabilidade de membrana plasmática (YO-PRO e M540). No Exp. 2, além das análises supracitadas realizou-se também a avaliação do potencial de membrana mitocondrial (JC-1). Para o Exp. 2, todas as análises foram efetuadas após 0h e 3h de incubação a 36 °C. Os resultados obtidos foram: 1) a Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase foi localizada na peça intermediária dos espermatozoides independente do status da amostra (in natura, pós descongelamento e capacitados); 2) o processo de congelamento/descongelamento resultou em uma diminuição (P<0,05) nos parâmetros de MT, MP e VAP, um aumento no BCF, além de redução (P<0,05) no percentual de células apresentando marcação com Bodipy FL Ouabaína, com membranas plasmáticas e acrossomal íntegras, e percentagem de células com membrana plasmática estabilizada; 3) A longo do período de incubação, o bloqueio da Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase resultou na redução (P<0,05) da MP, VCL e VSL, enquanto no grupo controle observou-se redução (P <0,05) dos parâmetros MT, VCL e ALH; 4) A adição do SOE ao meio de TALPm resultou em redução (P<0,05) em MP, VCL e ALH, enquanto no grupo controle reduziu (P<0,05) os valores de MT e MP, não havendo diferença entre tratamentos para os parâmetros cinemáticos. Além disso, independentemente dos tratamentos, observou-se ao longo da incubação elevação (P<0,05) no percentual de células apresentando membrana plasmática lesionadas, acrossomal íntegra sem marcação da Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase. Em conclusão, independente do status fisiológico, a Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase não alterou sua localização, permanecendo na peça intermediária dos espermatozoides ovinos, e que, sua inibição não influenciou sobre os parâmetros de motilidade espermática.

Palavras-chave: Ovino, Sêmen, Bomba de sódio

## Abstract

Aiming to localize the Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase in ram sperm (raw, post-thaw and capacitated in vitro), and to evaluate the influence of ouabain addition on kinematic sperm parameters, two experiments were performed. Exp.1: semen samples (four rams, seven replicates) were harvested, diluted (Tris-gema, final concentration 200 x 10<sup>6</sup> sperm/mL) and frozen at -196 °C. Exp. 2: semen samples from four rams (five replicates) were diluted in TALPm (50 x10<sup>6</sup> sperm/mL) and aliquot for two procedures: in vitro capacitation (addition of 2,5% of estrous sheep serum - ESS) or ouabain addition (10<sup>-4</sup> M), in order to block the Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase. Semen aliquots from both experiments were evaluated using CASA system for kinematic parameters and with aid of flow cytometry it was determined localization of Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase (Bodipy FL Ouabaina), evaluated plasmatic (IP) and acrosomal membrane (FITC-PNA) integrity, viability and stability of sperm plasma membrane (YO-PRO e M540). During Exp. 2, it was also evaluated the mitochondrial membrane potential (JC-1). For Exp. 2, all analysis were performed at 0h and 3h of incubation time (36 °C). These are the results: 1) The Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase was localized on middle piece of sperm flagellum, despite sample status (raw, post-thaw and capacitated); 2) the freezing-thawing process reduced (P<0,05) MT, MP and VAP and increased BCF. There was also a reduction (P<0.05) on percentage of sperm stained with Bodipy FL Ouabain, with intact plasmatic and acrosomal membranes, and percentage of sperm with stabilized plasma membrane; 3) Through incubation time, the Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase blocking reduced (P<0.05) MP, VCL and VSL, whereas on control group reduced (P <0.05) MT, VCL and ALH; 4) The addition of ESS to TALPm reduced (P<0.05) MP, VCL and ALH, and on control group reduced (P<0.05) MT and MP, with no difference between treatments for kinematic parameters. Therefore, despite of treatment, there was an increasing (P<0.05) on percentage of sperm with damages plasma membrane, intact acrosome and no stain for Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase. In conclusion, despite of sperm physiological status, Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase remains on middle piece of ram sperm flagellum and its inhibition have no influence on sperm motility parameters.

Site: <http://www.tede2.ufrpe.br:8080/tede2/handle/tede2/8032>