

## INFLUÊNCIA DA ADIÇÃO DE CISTEÍNA AO DILUENTE EM SÊMEN OVINO RESFRIADO

**CARDOSO, Tainã Figueiredo<sup>1,2A</sup>; SILVA, Estela Fernandes<sup>1</sup>; LAZZARI, José Cesar<sup>2A</sup>; PRADIEÉ, Jorgea<sup>1</sup>; LUCIA Jr., Thomaz<sup>1,2B</sup>**

<sup>1</sup>UFPEL – Laboratório de Reprodução Animal (REPROPEL); <sup>2A</sup>EMBRAPA Clima Temperado;

<sup>2B</sup>UFPEL Departamento de Patologia Animal.

e-mail: tainaacardoso@hotmail.com

### 1 INTRODUÇÃO

A preservação de sêmen é uma ferramenta importante para auxiliar da inseminação artificial (IA) e em programas de melhoramento genético (EVANS & MAXWELL, 1987). Atualmente, a maioria das IA realizadas em ovinos utilizam sêmen resfriado, pois o resfriamento diminui a atividade metabólica do espermatozoide, reduzindo o crescimento microbiano e conseqüentemente mantendo a viabilidade do sêmen diluído por um maior período de tempo (KATILA, 1997).

Os espermatozoides ovinos são altamente susceptíveis ao estresse oxidativo devido a grande quantidade de ácidos graxos poliinsaturados na membrana plasmática. Desta forma a geração de espécies reativas de oxigênio (ROS) levam à indução da peroxidação dos lipídeos das membranas celulares, colaborando para redução da motilidade ou morte celular espermática (AISEN et al., 2005).

Contudo, estes radicais livres podem ser neutralizados pelos sistemas antioxidantes (BAUMBER et al., 2000). A cisteína, molécula precursora da biossíntese de glutathiona intracelular e responsável por um aumento nos níveis de glutathiona reduzida (GSH) (BILODEAU et al., 2001). Esta ação da cisteína visa equilibrar o balanço entre a produção de ROS e a quantidade de antioxidantes celular. E devido a isso têm sido adicionada com sucesso ao diluente TRIS na criopreservação de sêmen ovino (BUCAK et al., 2007).

O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito do antioxidante da cisteína nos parâmetros espermáticos em sêmen ovino resfriado a 5°C.

### 2 METODOLOGIA (MATERIAL E MÉTODOS)

Utilizaram-se quatro machos ovinos da raça Crioula, alojados nas dependências da Embrapa Terras Baixas. Os animais foram submetidos a 9 coletas de sêmen, através de vagina artificial. Após a coleta, os ejaculados foram diluídos 1:1 (v/v) em diluente base (EVANS & MAXWELL, 1987) em condições isotérmicas. Posteriormente, através da câmara de Neubauer, determinou-se a concentração espermática de cada macho. Essa concentração foi ajustada para  $100 \times 10^6$  espermatozoides nos diferentes tratamentos (Tris-gema sem cisteína -T1 e Tris-gema com 5 mM de cisteína - T2), para os diferentes machos. Após a formação dos tratamentos, foram retiradas alíquotas para as avaliações a fresco (0h). As avaliações em 0h foram de motilidade através de microscopia óptica, em aumento de 200x, integridade de membrana plasmática pela utilização das sondas fluorescentes Diacetato de Carboxifluoresceína e Iodeto de Propídio (IP), conforme

descrito por Harrison & Vickers (1990), funcionalidade de mitocôndria através das sondas fluorescentes IP e Rhodamine 123 conforme Grasa et al. (2004), sendo as células visualizadas em microscópio de epifluorescência, sob aumento de 400x, tanto para integridade de membrana quanto para funcionalidade de mitocôndria. Ainda, realizou-se a avaliação de integridade de acrossoma pela associação das sondas IP e Fluoresceína Isotil Cianato, com protocolo modificado de Kawamoto et al. (1999), sendo as células visualizadas em microscópio de epifluorescência, sob aumento de 1000x. Finalmente, realizou-se o teste de choque hiposmótico modificado de Vasquez et al., (1997). Uma vez realizadas essas avaliações, o sêmen foi resfriado em geladeira a 5°C.

Para as avaliações pós-resfriamento, em 24h e 48h, o sêmen foi incubado em banho-maria por 10 minutos a 36° C e procederam-se as mesmas avaliações realizadas em 0h. As análises estatísticas ocorreram pelo software Statistix® (2008), sendo efetuadas análises de variância ANOVA para os dados paramétricos e Kruskal-Wallis para os dados não paramétricos.

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nesse estudo, a suplementação com 5 mM cisteína (T2), não gerou incremento nos parâmetros de qualidade espermática ( $P>0,05$ ) (Tab. 1) quando comparado ao grupo controle (T1), corroborando com os resultados encontrados em suínos (SEVERO et al,2011). Contudo, Bucak (2008) encontrou que a adição de 5 mM de cisteína ao diluente para congelamento de sêmen ovino melhorou a motilidade pós descongelação. Poderia ser interessante testar outras concentrações de cisteína num próximo estudo, pois segundo Atessahin (2008), a concentração de 15 mM, obteve, numericamente, uma maior taxa de motilidade em relação ao controle para sêmen caprino criopreservado.

Tabela 1. Média e desvio-padrão de cada macho, para T1 (controle) e T2 (5 mM cisteína) nos parâmetros de motilidade (MOT), integridade de membrana (IMP), integridade de acrossoma (IAC), funcionalidade de mitocôndria (IMI) e choque hiposmótico (CHIPO).

MACHO	TRAT	MOT	IMP	IAC	IMI	CHIPO
1	1	76,8±6,0	80,9±11,8	41,1±20,0	69,5±26,7	69,6±18,1
	2	78,1±4,0	76,0±13,4	49,7±15,5	71,8±21,0	70,1±18,8
2	1	75,6 ±8,1	71,2±15,0	41,2±21,8	76,1±16,3	67,0±15,4
	2	76,8 ±6,0	73,5±11,1	37,8±22,1	77,5±19,0	63,7±14,8
3	1	77,5 ±4,4	77,2±14,0	37,6±19,1	75,4±21,8	65,0±14,8
	2	78,7± 3,4	78,6±13,5	44,8±21,3	74,4±21,1	68,5±16,8
4	1	75,5± 8,8	72,7±19,6	48,1±16,1	72,7±14,2	72,9± 9,7
	2	77,8± 4,4	67,9±17,5	42,4±10,5	76,0±22,3	62,4± 5,3

Quanto ao resfriamento, nesta pesquisa, não foram encontradas diferenças estatísticas ( $P>0,05$ ) com relação aos parâmetros espermáticos integridade de membrana, integridade de acrossoma e choque hiposmótico entre os tempos de 0, 24 e 48 horas. Entretanto, para os parâmetros de motilidade espermática e funcionalidade de mitocôndria foi observada uma redução significativa ( $P<0,05$ ) com o tempo (Tab. 2).

Tabela 2. Média e desvio-padrão parâmetros de motilidade (MOT), integridade de membrana (IMP), integridade de acrossoma (IAC), funcionalidade de mitocôndria (IMI) e choque hipoosmótico (CHIPO) em diferentes tempos de resfriamento.

TEMPO	MOT	IMP	IAC	IMI	CHIPO
0h	80 ± 0,0 <sup>A</sup>	77,4 ± 11,5 <sup>A</sup>	45,5 ± 18,8 <sup>A</sup>	79,3 ± 14,9 <sup>A</sup>	69,4 ± 12,8 <sup>A</sup>
24h	73 ± 7,3 <sup>B</sup>	75 ± 14,3 <sup>A</sup>	38,9 ± 20,8 <sup>A</sup>	71,9 ± 21,2 <sup>AB</sup>	62,4 ± 22,1 <sup>A</sup>
48h	71 ± 7,1 <sup>B</sup>	68 ± 20,3 <sup>A</sup>	35,3 ± 16,9 <sup>A</sup>	57,4 ± 27,6 <sup>B</sup>	61,5 ± 13,2 <sup>A</sup>

Letras diferentes na coluna diferem entre si (P<0,05).

Essa queda na qualidade seminal, em função do tempo, era esperada e corrobora com resultados da literatura, os quais apontam para uma redução da qualidade espermática à medida que aumenta o tempo de resfriamento, diminuindo-se, principalmente, a motilidade e a integridade morfológica, estimuladas pelo acúmulo de produtos do metabolismo, especialmente ROS (SALAMON E MAXWELL, 2000; AISEN et al., 2005). Todavia, acredita-se que a queda na qualidade ao longo do tempo também possa ser devido a características individuais dos machos, as quais poderiam influenciar na resistência ao resfriamento.

Kasimanickam et al., (2006) ao classificar cordeiros como satisfatórios, questionáveis ou insatisfatórios para a reprodução, notou que esses apresentaram diferentes características antioxidantes seminais, além de haver variação das características antioxidantes por ejaculado de um mesmo macho (CÂMARA et al., 2011). Desse modo, sugere-se que os resultados do presente estudo tenham sido influenciados por características antioxidantes intrínsecas dos reprodutores.

#### 4 CONCLUSÃO

A suplementação do diluente seminal com cisteína não gerou um incremento na viabilidade espermática em sêmen ovino resfriado a 5°C, na concentração de 5 mM. Contudo, os tempos de refrigeração de 24 e 48h são capazes de reduzir a qualidade espermática.

#### 5 REFERÊNCIAS

- AISEN, E.; QUINTANA, M.; MEDINA, V.; MORELLO, H.; VENTURIN, A. Ultramicroscopic and biochemical changes in ram spermatozoa cryopreserved with threulose-based hypertonic extenders. **Cryobiology**, v.50, p.239-249, 2005.
- ATESSAHIN, A.; BUCAK, M. N.; TUNCER, P. B. ; MELTEM, K. Effects of antioxidant additives on microscopic and oxidative parameters of Angora goat semen following the freeze–thawing process **Small Ruminant Research**. v.77, p. 38–44, 2008.
- BAUMBER, J.; BALL, B.A.; GRAVANCE, C.G.; MEDINA, V.; DAVIES-MOREL, M.C. The effect of reactive oxygen species on equine sperm motility, viability, acrossomal integrity, mitochondrial membrane potential and membrane lipid peroxidation. **Journal of Andrology**, v.21, p.895-902, 2000.
- BILODEAU, J.F.; BLANCHETTE, S.; GAGNON, C.; SIRARD, M.A. Thiols prevent H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> – mediated loss of sperm motility in cryopreserved bull semen. **Theriogenology**, v.56, p.275-288, 2001.

- BUCAK, M. N.; ATESSAHIN, A.; YUCE, A. Effect of anti-oxidants and oxidative stress parameters on ram semen after the freeze–thawing process. **Small Ruminant Research**, v.75, p.128–134, 2008.
- CÂMARA,D.R.; GUERRA,M.M.P.; Refrigeração e criopreservação do sêmen ovino: danos inerentes à técnica e influência da suplementação do meio com antioxidantes sobre a qualidade espermática **Rev. Bras. Reprod. Anim.**v.35, p.33-40, 2011.
- EVANS, G.; MAXWELL, W.M.C. **Salamon's Artificial Insemination of Sheep and Goats**. Australia: Star Printery Pty Ltd,p.194,1987.BB
- GRASA, P.; PÉREZ-PÉ, R.; BÁGUENA, O.; FORCADA, F.; ABECIA, A.; CEBRIÁN-PÉREZ, J.A.; MUIÑO-BLANCO, T. Ram Sperm Selection by a Dextran/Swim-Up Procedure Increases Fertilization Rates Following Intrauterine Insemination in Superovulated Ewes. **Journal of Andrology**, v.25,p. 982-990, 2004.
- HARRISON, R.A.P.; VICKERS, S.E. Use of fluorescent probes to assess membrane integrity in mammalian spermatozoa. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 88, p. 343-352, 1990.
- KASIMANICKAM, R.; PELZER,K.D.; KASIMANICKAM, V.; SWECKER, W.S.; THATCHER, C.D. Association of classical seminal parameters, sperm DNA fragmentation index, lipid peroxidation and antioxidant enzymatic activity of semen in ram-lambs. **Theriogenology**, v.65, p.1407-1421, 2006.
- KATILA, T. Procedures for handling fresh stallion semen. **Theriogenology**, Amsterdam, v. 48, p. 1217-1227, 1997.
- KAWAMOTO, A.M.D.; OHASHI, K.M.D.; KISHIKAWA, H.M.D.; ZHU, L.M.D.; AZUMA, C. M.D.; MURATA, Y.M.D. Two-color fluorescence staining of lectin and anti-CD46 antibody to assess acrosomal status. **Fertility and Sterility** v. 71, p.497-501, 1999.
- SALAMON,S.; MAXWELL, W.M.C. Storage of ram semen. **Anim Reprod Sci**, v.62, p.77-111, 2000.
- SEVERO, C.K.; PEREIRA, G.R.; PEREIRA, A.M.; ILHA, G.F.; OLIVEIRA, J.F.C.; SOARES,M.; ARRUDA, R.P.; GONÇALVES, P.B.D. Cysteine addition on short-term cooled boar semen preservation and its relationship with swine field fertility. **Pesq. Vet. Bras. [online]**. vol.31, p. 25-32, 2011,.
- STATISTIX® 9. **Analytical Software. User's manual**. 396 p. Tallahassee. FL. 2008.