

Efeito da cisteína adicionada ao meio diluente sobre a cinética de espermatozóides ovinos após descongelamento

Eduardo Mazzon Corandin¹, Pedro Gambarini Meirinhos², Tayrone Freitas Prado¹, Benedito Dias de Oliveira Filho¹, Pedro Henrique Sabino Pereira¹, Maria Lúcia Gambarini¹

¹Universidade Federal de Goiás, Núcleo de Estudos e Pesquisas em Biologia Reprodutiva NEP-BRA–Escola de Veterinária e Zootecnia

Caixa Postal 131– CEP 74001-970 Goiania– Goiás- E-mail:mlgambarini@pq.cnpq.br

²Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto, SP

RESUMO

Amostras seminais de carneiros sexualmente maduros foram misturadas em forma de pool, diluídas em alíquotas contendo diferentes concentrações de cisteína (0, 2.5 mM; 5.0 mM; 7.5 mM) e submetidas ao protocolo automatizado de congelamento. Após o descongelamento as amostras foram avaliadas quanto à cinética espermática utilizando o sistema Computer Assisted Sperm Analysis (CASA). Os resultados mostraram elevação nas três variáveis diretamente relacionadas à habilidade do espermatozóide em alcançar o local de fertilização - velocidade média da trajetória (VAP), velocidade linear progressiva (VSL) e velocidade curvilínea (VCL) nas amostras contendo concentrações mais elevadas de cisteína (Cys 5.0 e Cys 7,5 mM), evidenciando que, para a espécie ovina, amostras seminais submetidas ao congelamento a concentração do antioxidante deve ser mais elevada para prevenir o efeito deletério da geração de espécies reativas ao oxigênio sobre a motilidade espermática.

Palavras-chave: carneiros, antioxidantes, motilidade, CASA, criopreservação.

INTRODUÇÃO

Dentre as biotecnologias reprodutivas aplicáveis ao gameta masculino, a criopreservação de espermatozóides é aquela que causa mais injúrias tanto em nível celular quanto molecular, as quais resultam em queda na fertilidade em comparação com o uso de semen fresco¹. Estudos *in vitro* mostram que o espermatozóide ovino tem baixa resistência ao congelamento². O espermatozóide é rico em fosfolípidos e portanto sensível à peroxidação lipídica e devido à relação reduzida entre citoplasma e núcleo, sua reserva antioxidante é baixa, parecendo não ser suficiente para resistir ao estresse oxidativo gerado durante o processo de criopreservação^{2,3}. Além disso, o processamento do semen durante a criopreservação expõe o espermatozóide à luz e oxigênio atmosférico, criando o ambiente oxidativo que reduz a concentração natural de antioxidantes e leva aos danos oxidativos⁴. A apoptose espermática parece ser desencadeada pelo estresse oxidativo, que leva à geração de espécies reativas ao oxigênio (EROS) e perda rápida da motilidade espermática. A suplementação com antioxidantes aumenta a tolerância espermática ao congelamento-descongelamento em diferentes espécies^{5,6}. A cisteína é um aminoácido de baixo peso molecular contendo tiol, precursora da biossíntese da glutatona, capaz de agir diretamente em muitas EROS⁷. Além do tipo de antioxidante a concentração

parecer ter ação decisiva sobre a melhoria na qualidade do semen descongelado. Dados de estudos piloto desenvolvidos no âmbito do Núcleo de Estudos e Pesquisas em Biologia Reprodutiva mostraram que baixas concentrações de cisteína (0,5 e 1 mM) influenciam a qualidade do semen resfriado mas não tem efeito positivo sobre o semen congelado de ovinos. O presente estudo foi desenvolvido com base na hipótese de que a adição de cisteína em concentrações mais elevadas ao meio de criopreservação influenciaria positivamente a cinética de espermatozoides ovinos, em especial nas variáveis diretamente relacionadas à capacidade de migração espermática pelo trato reprodutor feminino.

MATERIAL E MÉTODOS

Dez amostras seminais de seis carneiros (Dorper e White Dorper) sexualmente maduros e hípidos foram obtidas por meio de vagina artificial, por cinco semanas seguidas. Após cada colheita os ejaculados eram avaliados quanto ao volume, aspecto, turbilhonamento, motilidade total e progressiva, vigor, concentração e morfologia espermática⁸ e mantidos em caixas isotérmicas até a obtenção de todas as amostras, formando-se um *pool*, para retirar o fator de variação individual. Para cada mL do *pool* eram acrescentados 3 mL de solução salina fosfatada tamponada para formar a solução estoque de semen, da qual 3 mL eram diluídos em 9 mL de meio para criopreservação Tris-gema com glicerol. Essa solução final era alíquotada para formação dos seguintes grupos experimentais para adição de cisteína: Controle: sem antioxidante; CYS2.5 mM; CYS5.0 mM; CYS7.5 mM. As alíquotas eram envasadas em palhetas de 0,5 mL e transferidas imediatamente para a máquina de congelação de sêmen e submetidas à curva de refrigeração, iniciada em temperatura ambiente até 5 °C (taxa de 0,25 °C/min), seguida da curva de congelamento em nitrogênio líquido, em duas fases, sendo a primeira uma curva negativa de 15 °C/min e a segunda a 10 °C/min até atingir -120 °C, quando as palhetas eram mergulhadas em nitrogênio líquido e armazenadas em botijão criogênico a -196°C, sendo que todo o processo dura aproximadamente 75 minutos. Para garantir que todos os *pools* estudados tinham variáveis qualitativas dentro daquelas consideradas adequadas para a espécie, 1,5mL da solução estoque de semen era mantida em tubo plástico com a mesma capacidade, hermeticamente fechado, à temperatura ambiente, por duas horas, avaliando-se a motilidade total e progressiva, vigor, potencial mitocondrial e viabilidade. Sessenta dias após as palhetas foram descongeladas em banho maria a 37 °C 30" e o sêmen mantido em tubos de 1,5 mL previamente aquecidos para análise. Utilizou o analisador de sêmen *Computer Assisted Sperm Analysis* (CASA) modelo Ivos-Ultimate 12, Hamilton Thorn Bioscience, para avaliar a cinética espermática, configurado para análise de sêmen ovino, utilizando-se a concentração espermática de 48×10^6 spz/mL. A avaliação foi realizada contando-se espermatozoides em três campos selecionados automaticamente a partir de um mesmo ponto central da câmara e as variáveis de cinética espermática mensuradas foram: motilidade total (MT; %), motilidade progressiva (MP; %), velocidade de trajeto (VAP; $\mu\text{m/s}$), velocidade retilínea (VSL; $\mu\text{m/s}$), velocidade curvilínea (VCL; $\mu\text{m/s}$), amplitude lateral de cabeça (ALH; μm), frequência de batimentos (BCF; Hz), retilinearidade (STR; %) e linearidade (LIN; %). O delineamento foi em bloco ao acaso, onde a semana representa o bloco e o *pool* do sêmen a unidade experimental, com cinco repetições. Os dados foram analisados pela Análise de Variância e a comparação entre médias foi realizada pelo método de Tukey.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Todos os *pools* estudados por cinco semanas mantiveram a qualidade após duas horas de permanência à temperatura ambiente e foram considerados adequados para o processo de criopreservação. Os resultados indicam que houve efeito positivo na adição de cisteína ao meio de criopreservação de semen ovino, na dependência da concentração utilizada, como mostrado na Tabela 1. As tres variáveis diretamente relacionadas à habilidade do espermatozóide em alcançar o local de fertilização - velocidade média da trajetória (VAP), velocidade linear progressiva (VSL) e velocidade curvilínea (VCL) nas amostras contendo concentrações mais elevadas de cisteína (Cys 5.0 e Cys 7,5 mM) diferiram das amostras controle. Valores elevados dessas tres variáveis foram significativamente maiores em amostras que produziram mais de 50% de ovócitos fertilizados⁹. A resistência das secreções presentes no trato reprodutivo feminino e a hidrodinâmica proporcionada pela curvatura flagelar influenciam a migração do espermatozóide e a penetração no ovócito, fatores que são influenciados pela força de propulsão, definida pelas propriedades cinemáticas¹⁰. Embora apontada como característica associada à habilidade fertilizante, a mensuração microscópica subjetiva da motilidade espermática não apresenta boa correlação com o percentual de fertilização *in vivo* ou *in vitro* pela limitação em avaliar com detalhes as características do movimento espermático¹⁰. Dentre as variáveis cinemáticas possíveis de mensurar pelos sistemas computadorizados (CASA), a VCL e a ALH (amplitude de deslocamento lateral de cabeça) têm correlação elevada com taxa de fertilização. Já a frequência de batimento flagelar cruzado e a linearidade (BCF e LIN) mostram correlação positiva com a taxa de prenhez em alguns estudos, mas negativa em outros⁸.

Tabela 1- Cinética espermática pós descongelação de semen ovino criopreservado em meio contendo diferentes concentrações de cisteína

Variável	Tratamentos				P	CV%
	Controle	Cys2.5mM	Cys5.0mM	Cys7.5mM		
Motilidade Total	62,00	58,00	58,63	54,88	0,4179	9,78
Motilidade Progressiva	30,00	30,38	33,88	31,00	0,6572	15,06
VAP ($\mu\text{m/s}$)	102,33 ^b	109,53 ^{ab}	114,64 ^a	114,48 ^a	0,0088*	4,72
VSL ($\mu\text{m/s}$)	82,36 ^b	91,36 ^{ab}	95,07 ^a	97,29 ^a	0,0178*	7,19
VCL ($\mu\text{m/s}$)	176,93 ^b	185,18 ^{ab}	196,81 ^a	198,15 ^a	0,0019*	3,90
ALH (μm)	6,93	7,02	7,47	7,21	0,2210	5,73
BCF (Hz)	40,88 ^b	41,28 ^b	41,19 ^b	43,17 ^a	0,0069*	2,17
STR (%)	74,50	76,90	76,50	78,20	0,3327	3,99
LIN (%)	44,50	47,00	45,90	46,90	0,5839	6,86

VAP- Velocidade media da trajetória; VSL- Velocidade linear progressiva; VCL - Velocidade curvilínea; ALH- Amplitude deslocamento lateral de cabeça; BCF- Frequencia de batimento flagelar cruzado; STR- Retilinearidade; LIN- Linearidade.

CONCLUSÕES

Em conclusão, os dados mostram que a adição de cisteína ao meio diluente utilizado para o congelamento de semen ovino a base de tris e gema de ovo reduz o efeito do estresse causado pelo processo de congelação/descongelação sobre as variáveis de cinética espermática

que maior correlação apresentam com o potencial de migração do gameta masculino através do trato reprodutivo feminino.

REFERÊNCIAS

- (1) BERNARDINI, A.; HOZBOR, F.; SANCHEZ, E.; FORNÉS, M.W. ; ALBERIO, R.H.; CESARI, A. Conserved ram seminal plasma proteins bind to the sperm membrane and repair cryopreservation damage. **Theriogenology**, 76, p. 436–447, 2011.
- (2) MOCE, E.; BLANCH, E.; TOMAS, C.; GRAHAM, J.K. Use of Cholesterol in Sperm Cryopreservation: present moment and perspectives to future. **Reproduction in Domestic Animals**, 45, p. 57–66, 2010.
- (3) BUCAK, M.N. ; ATEŞSAHIN, A.; VARIŞLI, Ö.; YÜCE, A.; TEKIN, O.; AKÇAY, A. The influence of trehalose, taurine, cysteamine and hyaluronan on ram semen: microscopic and oxidative stress parameters after freeze–thawing process. **Theriogenology**, 67, p. 1060–1067, 2007.
- (4) AITKEN, R.J.; BAKER, M.A. Causes and consequences of apoptosis in spermatozoa; contributions to infertility and impacts on development. **International Journal of Developmental Biology**, 57, (2-3-4):265-272, 2013.
- (5) CÂMARA, D.R.; SILVA, S.V.; ALMEIDA, F.C.; NUNES, J.F.; GUERRA, M.M. Effects of antioxidants and duration of pre-freezing equilibration on frozen-thawed ram semen. **Theriogenology**, 76, p. 342–350, 2011.
- (6) BILODEAU, J.F.; BLANCHETTE, S.; GAGNON, C.; SIRARD, M.A. Thiols prevent H₂O₂ – mediated loss of sperm motility in cryopreserved bull semen. **Theriogenology**, 56, p.275-288, 2001.
- (7) CBRA - Manual para exame andrológico e avaliação de semen animal. 2ª Ed. Belo Horizonte, 49p., 1998.
- (8) VERSTEGEN, J.; IGUER-OUADA, M.; ONCLIN, K. Computer assisted semen analyzers in andrology research and veterinary practice. **Theriogenology**, 57, p.149-179, 2002.
- (9) COX, J.F.; ALFARO, V.; MONTENEGRO, V.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H.. Computer-assisted analysis of sperm motion in goats and its relationship with sperm migration in cervical mucus. **Theriogenology**, 66, p. 860-867, 2006.
- (10) LIU, D.Y; CLARKE G.N.; BAKER, W.G. Relationship between sperm motility assessed with the Hamilton-Thorn motility analyzer and fertilization rates *in vitro*. **Journal of Andrology**, 12, p.231-239, 1991.