

## **Efeito da Adição de Antioxidantes sobre Espermatozoides Equinos mantidos sob Temperatura de Transporte e Inseminação Artificial**

**Aline França Dias Oliveira<sup>1</sup>, Rodrigo Arruda de Oliveira<sup>2</sup>, Rachel Piersanti<sup>1</sup>, Pedro Gambarini Meirinhos<sup>3</sup>, Maria Lúcia Gambarini<sup>1</sup>, Lidia Andreu Guillo<sup>4</sup>**

<sup>1,4</sup>Universidade Federal de Goiás, Núcleo de Estudos e Pesquisas em Biologia Reprodutiva Animal - NEP-BRA, Escola de Veterinária e Zootecnia, Departamento de Produção Animal e Laboratório de Biologia Celular, Instituto de Ciências Biológicas

<sup>2</sup>Universidade de Brasília – Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária

<sup>3</sup>FAMERP-Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto, SP

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

### **RESUMO**

*A resposta de espermatozoides equinos ao desafio da refrigeração a 12°C e incubação a 37°C após a adição de cisteína e glutatona em diferentes concentrações foi avaliada em amostras de seis garanhões, submetidas a refrigeração a 12°C (T1), incubação a 37°C (T2) ou à refrigeração a 12°C/12 horas seguido de incubação a 37°C/12 horas (T3). A viabilidade dos espermatozoides foi avaliada pelas lesões de DNA, a integridade do acrossoma e da viabilidade celular. Houve efeito protetor dos antioxidantes sobre as variáveis avaliadas, com dependência da concentração e do tempo de refrigeração ou incubação. Maiores danos foram causados no T3, sendo que a adição de cisteína e glutatona foi eficiente em manter a integridade de DNA, do acrossoma e a viabilidade celular.*

**Palavras-chave:** cisteína, glutatona, gametas, estresse oxidativo.

### **INTRODUÇÃO**

A preservação do sêmen é um manejo importante na utilização de técnicas reprodutivas em equinos. A membrana do espermatozoide contém grandes quantidades de ácidos graxos insaturados susceptíveis à peroxidação, com perda da integridade da membrana e função celular, além da redução da motilidade espermática. As espécies reativas ao oxigênio (EROS) influenciam a função espermática e o desequilíbrio entre produção e degradação prejudica essa célula<sup>1</sup>. O estresse oxidativo causado pelo peróxido de hidrogênio altera a função mitocondrial levando à apoptose<sup>2</sup>. Por estarem sujeitos a condições aeróbias os espermatozoides sofrem o efeito paradoxo do oxigênio<sup>1</sup> e são susceptíveis às EROS por serem deficientes em enzimas protetoras, já que perderam grande parte do citoplasma durante a espermiogênese. Alguns garanhões de alto valor genético são conhecidos como "poor coolers" porque a qualidade do sêmen refrigerado diminui em comparação com o sêmen fresco<sup>3</sup>. Esse estudo foi desenvolvido com o objetivo de avaliar o efeito da adição de cisteína e glutatona sobre espermatozoides equinos mantidos sob temperatura de refrigeração a 12°C e incubação a 37°C mimetizando, respectivamente, as condições de transporte e do meio ambiente fisiológico dentro do trato reprodutivo da égua durante a inseminação artificial.



### **MATERIAL E MÉTODOS**

O estudo foi realizado nos laboratórios do Setor de Reprodução Animal e de Bioquímica Celular da Universidade Federal de Goiás. Semen de seis garanhões hípidos foi obtido por meio de vagina artificial. As amostras foram diluídas na proporção de uma parte de semen para uma parte de meio contendo leite em pó desnatado, glicose, bicarbonato de sódio e amicacina (BOTUMIX<sup>®</sup>) e fracionadas em sete alíquotas para a adição de 1,0; 1,5 e 2,5mM de cisteína (C) ou glutathiona (G) e sem adição de antioxidantes (Controle). As alíquotas foram fracionadas em tubos de 1,5 mL, fechadas e submetidas a um dos três tratamentos: Refrigeração 12°C por 12 horas (T1); Incubação em banho-maria a 37°C por 12 horas (T2) e Resfrigeração a 12°C/12 horas seguida por incubação a 37°C/12 horas (T3). Avaliações espermáticas foram realizadas a cada seis horas, sendo a Hora Zero imediatamente após a adição dos antioxidantes ou no semen fresco (Controle), determinando-se motilidade e vigor espermáticos<sup>4</sup>; lesões de DNA em esfregaços corados com laranja de acridina<sup>5</sup> e integridade do acrossoma com a sonda fluorescente isotiocionato de fluoresceína conjugada à aglutinina de *Pisum sativum* (FITC-PSA<sup>1</sup>), contando-se 200 células, assim como a viabilidade celular pela redução de sais de tetrázólio (MTT<sup>6</sup>), que depende da habilidade de células metabolicamente ativas em reduzir o sal de tetrázólio em formazan. Foi utilizado com espermatozoides equinos mostrando resultados confiáveis, em virtude da forte correlação com a atividade mitocondrial, viabilidade do sêmen e integridade acrossomal<sup>7</sup> ressaltando-se a alta reprodutibilidade e utilização em análises de rotina. Sua interpretação depende do acúmulo de grânulos de formazan em torno da peça intermediária do espermatozoide<sup>7</sup>. As médias dos resultados obtidos em cada tratamento foram submetidas à análise de variancia utilizando o software GraphPad 5.03. As diferenças foram consideradas significativas quando  $p < 0,05$ .

### **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

Nas Tabelas 1, 2 e 3 estão os resultados de lesões do DNA, integridade do acrossoma e do MTT nos tratamentos. A integridade do DNA espermático é necessária para a transmissão da informação genética e quando mais de 30% dos espermatozoides apresentam lesões no DNA a fertilidade será reduzida<sup>8</sup>. Maior número de DNA lesado foi verificado no T2 com diferença ( $P < 0,05$ ); com maior efeito positivo da glutathiona. A estabilidade do DNA espermático é relacionada com as protaminas P1 e P2<sup>9</sup> e a ocorrência das duas no espermatozoide equino reduz essa estabilidade em comparação às espécies com apenas P1<sup>10</sup>. A manipulação do espermatozoide para refrigeração e congelamento aumenta a fragmentação do DNA e contribui para declínio da qualidade espermática do garanhão e parecem ser consequência do estresse oxidativo<sup>10,11</sup>. No T2 houve declínio no número de células com acrossoma intacto com diferenças ( $p < 0,05$ ) entre os momentos, sem mostrar o efeito dos antioxidantes, o que foi verificado nas amostras refrigeradas (T1 e T3), mostrando a ação dessas substâncias sobre o acrossoma equino armazenado sob refrigeração, procedimento comum para transporte de semen. A reação acrossomal é essencial na fertilização, assim como a liberação de enzimas para a penetração na zona pelúcida e fusão com a membrana do oócito. Os resultados mostraram que a refrigeração ou incubação por seis e 12 horas diminuiu o número de células com acrossoma íntegro. A membrana dos espermatozoides de mamíferos apresenta alta concentração de ácidos graxos poliinsaturados de cadeia longa, tornando-o susceptível à peroxidação lipídica<sup>1</sup>. Os resultados de MTT referem-se a quatro momentos de avaliação. O efeito protetor dos antioxidantes foi proporcional à concentração utilizada ( $P < 0,05$ ), verificando-se diferenças já quando os



antioxidantes foram adicionados (H0), permanecendo até a H6 em refrigeração, sendo que para a cisteína houve dependência também da concentração, pois a adição de 2,5 mM de cisteína ao semen foi capaz de preservar a viabilidade espermática nesse momento de avaliação.

**Tabela 1.** Médias±EPM de espermatozoides com lesões de DNA após resfriamento por seis/12 horas (T1), incubação a 37°C por seis/12 horas (T2) e posterior incubação a 37 °C por seis/12 horas (T3).

	T1			T2		T3	
	H0	H6	H12	H6	H12	H18	H24
<b>Controle</b>	0,2 ± 0,1	3,6 ± 0,6 <sup>a</sup>	6,2 ± 1,5 <sup>a</sup>	11,6 ± 2,6 <sup>a</sup>	36,6 ± 2,7 <sup>a</sup>	13,8 ± 1,5 <sup>a</sup>	16,6 ± 1,6 <sup>a</sup>
<b>C 1,0</b>	0,3 ± 0,1	1,0 ± 0,25 <sup>b</sup>	2,8 ± 0,8	5,3 ± 1,9	8,1 ± 2,3 <sup>b</sup>	7 ± 1,5 <sup>b</sup>	9,0 ± 1,5 <sup>b</sup>
<b>C 1,5</b>	0,2 ± 0,1	0,3 ± 0,1 <sup>b</sup>	2,6 ± 0,95	6,8 ± 2,6	8,5 ± 2,6 <sup>b</sup>	5,2 ± 1,8 <sup>b</sup>	7,3 ± 1,6 <sup>b</sup>
<b>C 2,5</b>	0,3 ± 0,1	2,8 ± 0,6	2,8 ± 0,7	3,8 ± 1,5	8,3 ± 2,15 <sup>b</sup>	4,6 ± 1,5 <sup>b</sup>	6,8 ± 2,4 <sup>b</sup>
<b>G 1,0</b>	0,2 ± 0,1	3,0 ± 0,6	1,6 ± 0,5 <sup>b</sup>	2,3 ± 1,1 <sup>b</sup>	3,5 ± 1,8 <sup>b</sup>	3,3 ± 1,7 <sup>b</sup>	4,2 ± 1,5 <sup>b</sup>
<b>G 1,5</b>	0,3 ± 0,1	0,8 ± 0,5 <sup>b</sup>	0,3 ± 0,2 <sup>b</sup>	2,5 ± 1,4 <sup>b</sup>	3,16 ± 2,0 <sup>b</sup>	1,6 ± 0,9 <sup>b</sup>	1,5 ± 0,9 <sup>b</sup>
<b>G 2,5</b>	0,3 ± 0,1	0,3 ± 0,1 <sup>b</sup>	0,3 ± 0,3 <sup>b</sup>	1,2 ± 0,9 <sup>b</sup>	3,3 ± 2,1 <sup>b</sup>	0,8 ± 0,3 <sup>b</sup>	1,1 ± 0,8 <sup>b</sup>

a,b letras diferentes na mesma coluna diferem (p<0,05)

**Tabela 2.** Médias±EPM de espermatozoides com acrossoma íntegro após resfriamento por seis/12 horas (T1), incubação a 37°C por seis/12 horas (T2) e posterior incubação a 37 °C por seis/12 horas (T3).

	T1			T2		T3	
	H0	H6	H12	H6	H12	H18	H24
<b>Controle</b>	150,0 ± 11,0	118,7 ± 10,2	98,6 ± 7,3	101,5 ± 6,6	65,5 ± 9,0	34,2 ± 2,2 <sup>a</sup>	3,0 ± 1,7 <sup>a</sup>
<b>C 1,0</b>	151,5 ± 11,5	133,8 ± 11,5	107,3 ± 8,0	109,0 ± 6,0	82,3 ± 5,9	70,8 ± 7,8 <sup>b</sup>	12,5 ± 2,8 <sup>b</sup>
<b>C 1,5</b>	153,2 ± 10,0	134,7 ± 11,4	105,2 ± 7,8	107,0 ± 7,4	80,3 ± 4,6	71,3 ± 7,7 <sup>b</sup>	12,2 ± 1,3 <sup>b</sup>
<b>C 2,5</b>	156,3 ± 11,0	136,5 ± 11,0	103,2 ± 7,7	107,8 ± 6,8	82,5 ± 4,7	70,5 ± 7,4 <sup>b</sup>	12,0 ± 1,3 <sup>b</sup>
<b>G 1,0</b>	153,7 ± 11,0	143,8 ± 10,6	103,3 ± 7,5	109,2 ± 8,4	82,1 ± 4,7	73,0 ± 7,3 <sup>b</sup>	14,1 ± 2,0 <sup>b</sup>
<b>G 1,5</b>	152,2 ± 11,0	140,8 ± 9,5	102,0 ± 8,4	109,2 ± 8,3	80,6 ± 5,5	70,5 ± 7,0 <sup>b</sup>	14,0 ± 1,7 <sup>b</sup>
<b>G 2,5</b>	153,3 ± 11,4	136,7 ± 9,6	102,7 ± 8,6	109,2 ± 8,7	80,0 ± 5,4	74,0 ± 7,1 <sup>b</sup>	13,3 ± 1,3 <sup>b</sup>

a,b letras diferentes na mesma coluna diferem (p<0,05)

**Tabela 3.** Médias ± EPM dos valores de absorvância (570 e 690nm) obtidos no ensaio MTT após resfriamento por seis/12 horas (T1), incubação a 37°C por seis/12 horas (T2) e posterior incubação a 37 °C por seis/12 horas (T3).

	T1		T2	T3
	H0	H6 resfriamento	H6 incubação	H24 incubação
<b>Controle</b>	0,751±0,03 <sup>a</sup>	0,658±0,02 <sup>a</sup>	0,510±0,05	0,391±0,02
<b>C 1,0</b>	0,872±0,06 <sup>b</sup>	0,814±0,06 <sup>b</sup>	0,559±0,05	0,434±0,03
<b>C 1,5</b>	0,921±0,09 <sup>b</sup>	0,804±0,08 <sup>b</sup>	0,580±0,06	0,443±0,05
<b>C 2,5</b>	0,922±0,08 <sup>b</sup>	0,962±0,05 <sup>c</sup>	0,589±0,04	0,434±0,04
<b>G 1,0</b>	0,764±0,07 <sup>a</sup>	0,812±0,05 <sup>b</sup>	0,551±0,05	0,367±0,05
<b>G 1,5</b>	0,900±0,02 <sup>b</sup>	0,886±0,07 <sup>b</sup>	0,553±0,04	0,398±0,04
<b>G 2,5</b>	0,969±0,05 <sup>b</sup>	0,827±0,07 <sup>b</sup>	0,591±0,03	0,481±0,05

a,b letras diferentes na mesma coluna diferem (p<0,05)



A habilidade celular em reduzir os sais de tetrazólio está diretamente relacionada à atividade mitocondrial, e sendo o espermatozóide uma célula rica em mitocôndrias, essa redução ocorre mais rapidamente<sup>11</sup>, e os resultados expostos podem refletir a resposta e qualidade dos espermatozoides submetidos aos três tratamentos<sup>12,13</sup>, e evidenciam o efeito protetor dos antioxidantes sobre as células mantidas sob refrigeração para transporte.

### CONCLUSÕES

A adição dos antioxidantes cisteína e glutatona ao sêmen de garranhões foi eficiente em preservar a integridade do DNA, da membrana acrossomal e a viabilidade celular após a refrigeração para transporte e a incubação em temperatura e tempo semelhantes aqueles presentes após a inseminação artificial com sêmen fresco, representado pelas amostras controle na Hora Zero, ou refrigerado.

### REFERÊNCIAS

- (1) BALL, B.A. Oxidative stress, osmotic stress and apoptosis: Impacts on sperm function and preservation in the horse. **Animal Reproduction Science**, v. 107, p. 257-267, 2008.
- (2) LIU, L; KEEFE, D.L. Cytoplasm mediates both development and oxidation-induced apoptotic cell death in mouse zygotes. **Biology of Reproduction**, 62 (6) p.1828-1834, 2000.
- (3) BARRIER-BATTUTA, I.; BONNETA, C.; GIRAUDO, A.; DUBOISA, C.; CAILLAUDA, M.; VIDAMENT, M. Removal of seminal plasma by centrifugation, before cooled storage, enhances membrane stability of stallion spermatozoa. **Animal Reproduction Science**, v. 121S, p. 129-136, 2000.
- (4) CBRA - **Manual para exame andrológico e avaliação de semen animal**. 2ª Ed. Belo Horizonte, 49p., 1998
- (5) TEJADA, R.I.; MITCHELL, J.C.; NORMAN, A.; MARIK, J.J.; FRIEDMAN, S. A test for the practical evaluation of male fertility by acridine orange (AO) fluorescence. **Fertility and Sterility**, v. 42 (1), p. 87-91, 1984.
- (6) MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, p. 55-63, 1983.
- (7) AZIZ, D.M.; AHLWEDE, L.; ENBERGS, E.; Application of MTT reduction assay to evaluate equine sperm viability. **Theriogenology**, v. 64, p. 1350-1356, 2005.
- (8) KADOMA, H.; YAMAGUCHI, R.; FUKUDA, J.; KASAI, H.; TANAKA, T. Increased oxidative deoxyribonucleic acid damage in the spermatozoa of infertile male patients. **Fertility and Sterility**. v.68(3). p. 519-524. 1997.
- (9) CORZET, M.; MAZIMAS, J.; BALHORN, R. Protamine 1: protamine 2 stoichiometry in the sperm of eutherian mammals. **Molecular Reproduction Development**, v. 61, p. 519-527, 2002.
- (10) EVENSON, D. P. & WIXON, R. Clinical aspects of sperm DNA fragmentation detection and male infertility. **Theriogenology**, v. 65, p. 979-991, 2006.
- (11) SHAMSI, M.B.; KUMAR, R.; DADA, R. Evaluation of nuclear DNA damage in human spermatozoa in men opting for assisted reproduction. **Indian Journal of Medical Research**, v. 127, p. 115-123, 2008.
- (12) GACZARZEWICZ, D.; PIASECKA, M.; UDALA, J.; BLASZCZYK, B.; LASZCZYNSKA, M.; KRAM, A. Oxidoreductive capability of boar sperm mitochondria in fresh semen and during their preservation in BTS extender. **Reproduction Biology**, v. 3, p. 161-172, 2003.
- (13) NASER-ESFAHANI, M.H.; ABOUTORABI, R.; ESFANDIARI, E.; MARDANI, M. Sperm MTT viability assay: a new method for evaluation of human sperm viability. **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**, 19 (10).p. 477-482. 2002.