

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS  
ESCOLA DE VETERINÁRIA E ZOOTECNIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL

**AVALIAÇÃO DA CISTEÍNA ADICIONADA AO MEIO DILUENTE  
SOBRE ESPERMATOZOIDES OVINOS MANTIDOS FRESCO,  
REFRIGERADO E CONGELADO**

Eduardo Mazon Corandin  
Orientador: Prof. Dr. Benedito Dias de Oliveira Filho

GOIÂNIA  
2013



**Termo de Ciência e de Autorização para Disponibilizar as Teses e Dissertações Eletrônicas (TE-DE) na Biblioteca Digital da UFG**

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás–UFG a disponibilizar gratuitamente através da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações – BDTD/UFG, sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a Lei nº 9610/98, o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou download, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

**1. Identificação do material bibliográfico:**    ☒ Dissertação    ☐ Tese

**2. Identificação da Tese ou Dissertação**

Autor: **Eduardo Mazon Corandin** E-mail: **eduardo\_mazon@hotmail.com**

Seu e-mail pode ser disponibilizado na página? ☒ Sim    ☐ Não

Vínculo Empregatício do autor:                      Agência de fomento: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico.

País: **Brasil** UF:                      CNPJ:                      Sigla: **CNPQ**

Título: Avaliação da cisteína adicionada ao meio diluente sobre espermatozoides ovinos mantidos fresco, refrigerado e congelado. Palavras-chave: **antioxidante, biotécnica, carneiros, CASA, criopreservação, sêmen, sondas fluorescentes.**

Título em outra língua: **Evaluation of cysteine added to the extender on sperm sheep stored fresh, chilled and frozen.**

Palavras-chave em outra língua: **antioxidant, biotechnology, CASA, cryopreservation, probes fluorescent, ram, semen.**

Área de concentração: **Produção Animal** Data defesa: (dd/mm/aaaa) **30/08/2013**

Programa de Pós-Graduação: **Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal - EVZ - UFG**

Orientador(a): **Prof. Dr. Benedito Dias de Oliveira Filho** E-mail: **bene@vet.ufg.br**

Co-orientador(1): **Profª. Drª. Maria Lúcia Gambarini Meirinhos** E-mail: **mlgambarini@hotmail.com**

Co-orientador(2): **Profª. Drª. Eliane Sayuri Miyagi** E-mail: **eliane\_miyagi@hotmail.com**

**3. Informações de acesso ao documento:**

Liberação para disponibilização?<sup>1</sup>    ☒ total    ☐ parcial

Em caso de disponibilização parcial, assinale as permissões:

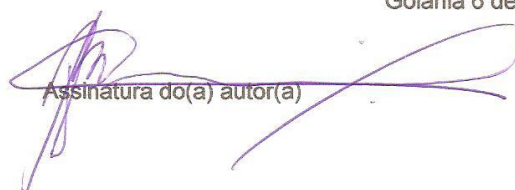
[            ] Capítulos. Especifique:

[            ] Outras restrições:

Havendo concordância com a disponibilização eletrônica, torna-se imprescindível o envio do(s) arquivo(s) em formato digital PDF ou DOC da tese ou dissertação.

O Sistema da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações garante aos autores, que os arquivos contendo eletronicamente as teses e ou dissertações, antes de sua disponibilização, receberão procedimentos de segurança, criptografia (para não permitir cópia e extração de conteúdo, permitindo apenas impressão fraca) usando o padrão do Acrobat.

Goiânia 6 de novembro de 2013

  
Assinatura do(a) autor(a)

<sup>1</sup> Em caso de restrição, esta poderá ser mantida por até um ano a partir da data de defesa. A extensão deste prazo suscita justificativa junto à coordenação do curso. Todo resumo e metadados ficarão sempre disponibilizados.

EDUARDO MAZON CORANDIN

**AVALIAÇÃO DA CISTEÍNA ADICIONADA AO MEIO DILUENTE  
SOBRE ESPERMATOZOÍDES OVINOS MANTIDOS FRESCO,  
REFRIGERADO E CONGELADO**

Dissertação apresentada para obtenção  
do grau de Mestre em Ciência Animal  
junto à Escola de Veterinária e Zootecnia  
da Universidade Federal de Goiás.

**Área de concentração:**  
Produção Animal

**Linha de pesquisa:**  
Biotecnologia e eficiência reprodutiva animal

**Orientador:**

Prof. Dr. Benedito Dias de Oliveira Filho – UFG

**Comitê de Orientação:**

Prof<sup>a</sup>. Dra. Maria Lúcia Gambarini Meirinhos – UFG

Prof<sup>a</sup>. Dra. Eliane Sayuri Miyagi – UFG

GOIÂNIA  
2013

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação na (CIP)  
GPT/BC/UFG**

Corandin, Eduardo Mazon.  
C788a Avaliação da cisteína adicionada ao meio diluente sobre espermatozoides ovinos mantidos fresco, refrigerado e congelado [manuscrito] / Eduardo Mazon Corandin. - 2013.  
85 f. : figs, tabs.

Orientador: Prof. Dr. Benedito Dias de Oliveira Filho; Co-orientadores: Profª. Drª. Maria Lúcia Gambarini Meirinhos, Profª. Drª. Eliane Sayuri Miyagi.  
Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Goiás, Escola de Veterinária e Zootecnia, 2013.  
Bibliografia.  
Inclui lista de figuras, abreviaturas, siglas e tabelas.  
Apêndices.

1. Ovino - Semem – Cisteína – Avaliação. 2. Carneiro - Antioxidantes. I. Título.

CDU: 636.3:678.048

**Eduardo Mazon Corandin**

Dissertação defendida e aprovada em **30/08/2013**, pela Banca Examinadora constituída pelos professores:



---

Prof. Dr. Benedito Dias de Oliveira Filho  
(ORIENTADOR (A))



---

Prof. Dr. Rodrigo Arruda de Oliveira - UnB



---

Prof. Dr. Marco Antônio de Oliveira Viu – UFG/Jataí

Dedico este trabalho aos meus pais  
João e Nádia, exemplos de dedicação,  
humildade e amor, incomparáveis  
diamantes lapidados por Deus...

## AGRADECIMENTOS

À Deus por me conceder a dádiva em andar nos trilhos do bem, me conceber saúde e determinação para seguir em frente, mesmo diante das adversidades. Obrigado pela proteção em minhas viagens e acalento nos momentos difíceis.

Ao meu pai João por seu esforço diário, cada conquista e realização se devem a ti. Noites de plantão, preocupações, riscos, suor e cansaço, transformaram-se facilmente em orgulho, respeito e admiração. Me ensinou, mesmo sem querer, que um homem só tem o direito de olhar um outro de cima para baixo para ajudá-lo a levantar-se.

À minha mãe Nádia, mulher dedicada, sempre deixou claro que os filhos são os entes mais importantes em tua vida. Tenha a certeza que cada sacrifício será sempre lembrado e recompensado, nunca deixou faltar carinho e amor, meus eternos agradecimentos.

Ao meu orientador Prof. Dr. Benedito Dias de Oliveira Filho, pela oportunidade concedida, ensinamentos, orientação e conselhos. Agradeço por me acompanhar, confiar e acreditar em meus esforços.

Agradecimentos especiais à Prof<sup>a</sup>. Maria Lúcia Gambarini Meirinhos, pela dedicação e horas compartilhadas, paciência em seus ensinamentos, carinho e orientação. Empenhou-se desde o princípio na realização deste trabalho, e esteve presente em todas as etapas, levo como aprendizado que “a melhor herança que um educador pode deixar ao discípulo é a firmeza em aspirar triunfos e a capacidade de assimilar derrotas”.

Ao Prof. Dr. Emmanuel Arnhold pela ajuda, ensinamentos e conselhos na análise estatística dos dados e nas tabelas.

À Dra. Margot Alves Nunes Dode e EMBRAPA/Cenargen por ceder cordialmente o aparelho de análise computadorizada e ao José de Oliveira Carvalho Neto pelos ensinamentos e auxílio nas análises.

Ao Dr. Carlos Frederico Martins e EMBRAPA/CTZL por conceder o alojamento e laboratório de fluorescência, e às colegas Eliza, Carol e Heidi pelo auxílio nas análises. Foram fundamentais no enriquecimento desse trabalho.

À minha tia Nédia Mazon, pelo acolhimento e ajuda em Goiânia, mostrou-me que coração de mãe, literalmente, sempre cabe mais um. Aos meus primos Aurélio e Marina, foram verdadeiros irmãos e companheiros, gentilmente cederam espaço sem questionamentos. Obrigado por todos os momentos juntos, a conclusão dessa etapa deve muito a vocês.

À CAVA Cordeiros, por emprestar gentilmente seus animais, equipamentos e instalações. Principalmente ao funcionário Luiz Paulo pela imensurável ajuda nas colheitas e auxílio durante o processamento seminal.

Ao colega Dr. Rodrigo Arruda, pela ajuda e ensinamentos no início do experimento, que foram de imensa valia no sucesso deste trabalho.

Aos amigos que muito me ajudaram durante as colheitas realizadas em Jussara: Tayrone, Hugo (Xiboca) e Lucas Batista. A conclusão deste trabalho seria impraticável sem a ajuda de vocês.

Ao colega Thiago Vilar, que foi companheiro e amigo em todos os momentos, das dificuldades às alegrias. Me ensinou que, seja emocionais ou concretas, a determinação deve sempre superar as perdas.

A todos os colegas e amigos da pós-graduação, Leonardo (Lacraia), Sergio, Kíria, Thiago, Bárbara, Benner e Kelle, José Neto, Marcondes e Reginaldo. Foi graças a vocês que essa caminhada tornou-se tão prazerosa.

Aos estagiários do setor, Pedrinho, Gabriel, Dudu, Raissa e Manuela, pela ajuda durante o manejo dos carneiros, estudos em grupo, reuniões e cursos.

Aos professores que transmitiram de forma solidária e sem cessar seus conhecimentos, sempre focados com a pesquisa.

Aos meus irmãos Rafael e Cínthia que sempre acreditaram em mim, me transmitiram que todos os sonhos e desejos podem tornar realidade, vocês são meus verdadeiros amigos.

À minhas avós Irene e Therezinha, anjos da minha vida. Obrigado pelo amor, carinho, orações e intensões, estas são as maiores ajuda que alguém pode receber. A serenidade transmitida comprova que a direção é mais importante que a velocidade.

À Cláudia Mazon pela ajuda constante, sempre disposta em aconselhar e corrigir.



À eterna amiga Quezia Ferreira Batista por disponibilizar seu escritório, os tempos passados ali foram os mais construtivos.

A todos que participaram ou torceram pelo sucesso de minha caminhada, e que não foram citados nessas singelas linhas, obrigado por cada segundo compartilhado e vibrações positivas transmitidas.

Todos foram fundamentais para a concretização dessa etapa, e levarei sempre dentro do peito. Meu obrigado!

*“Feliz aquele que transfere o que sabe e aprende o que ensina. O saber a gente aprende com os mestres e os livros. A sabedoria, se aprende é com a vida e com os humildes.”*

Cora Coralina

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO .....	01
2 REVISÃO DE LITERATURA .....	03
2.1 Sêmen e os espermatozoides .....	03
2.1.1 Cabeça .....	04
2.1.2 Cauda .....	05
2.1.3 Membrana plasmática .....	06
2.2 Refrigeração seminal .....	07
2.2.1 Diluentes utilizados para refrigeração do sêmen .....	07
2.2.2 Métodos para refrigeração seminal .....	08
2.2.3 Temperatura de armazenamento .....	09
2.3 Criopreservação do sêmen .....	11
2.3.1 Diluentes utilizados para criopreservação seminal .....	11
2.3.2 Métodos para criopreservação seminal .....	12
2.4 Estresse oxidativo .....	14
2.5 Antioxidantes .....	15
2.6 Cisteína .....	16
3 MATERIAIS E MÉTODOS .....	18
3.1 Local e período do experimento .....	18
3.2 Animais .....	18
3.3 Colheita e avaliação do sêmen .....	19
3.4 Tratamentos .....	20
3.4.1 Diluição .....	20
3.4.2 Armazenamento .....	22
3.4.3 Criopreservação .....	22
3.5 Análises do sêmen .....	23
3.5.1 Sêmen fresco e refrigerado .....	23
3.5.1.1 Avaliação subjetiva da cinética espermática .....	23
3.5.1.2 Viabilidade espermática .....	24
3.5.1.3 Atividade mitocondrial .....	24
3.5.2 Sêmen criopreservado .....	25
3.5.2.1 Descongelamento .....	25

3.5.2.2 Avaliação da integridade da membrana plasmática .....	25
3.5.2.3 Integridade do acrossoma .....	26
3.5.2.4 Avaliação da função mitocondrial .....	26
3.5.2.5 Avaliação computadorizada da cinética espermática .....	27
3.6 Análise estatística.....	27
4 RESULTADOS .....	29
4.1 Sêmen fresco .....	29
4.2 Sêmen refrigerado.....	31
4.3 Sêmen congelado.....	34
5 DISCUSSÃO .....	40
5.1 Sêmen fresco .....	40
5.2 Sêmen refrigerado.....	42
5.3 Sêmen congelado.....	46
6 CONCLUSÃO.....	54
REFERÊNCIAS.....	55
ANEXOS .....	66

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – Vagina artificial utilizada para a colheita do sêmen .....	19
FIGURA 2 – Microscópio óptico com contraste de fase (BX41TF, Olympus, Japão), com filmadora ligado em sistema de captura de vídeo e imagem utilizado para análise seminal.....	20
FIGURA 3 – Esquema do fracionamento e diluição do sêmen ovino para formar os grupos experimentais (Controle, Cys2.5, Cys5.0 e Cys7.5), mantidos na forma fresca, refrigerada e congelada.....	21
FIGURA 4 – Máquina de congelação de sêmen (Tetakon <sup>®</sup> - TK 3000) programada para congelamento de sêmen ovino .....	23
FIGURA 5 – Queda da porcentagem média na viabilidade espermática avaliada pelo teste eosina-nigrosina de sêmen ovino diluído com Equimix <sup>®</sup> e armazenado em caixas isotérmicas a 16°C durante quatro e oito horas com diferentes concentrações de cisteína .....	33
FIGURA 6 – Porcentagem (média $\pm$ erro padrão) de espermatozoides com membrana íntegra, lesada ou semi-lesada após congelamento e descongelamento de sêmen ovino diluído com Bovimix <sup>®</sup> e criopreservado com diferentes concentrações de cisteína.....	35
FIGURA 7– Porcentagem (média $\pm$ erro padrão) de espermatozoides vivos com acrossoma íntegro e vivos com acrossoma reagido após congelamento e descongelamento de sêmen ovino diluído com Bovimix <sup>®</sup> e criopreservado com diferentes concentrações de cisteína.....	36
FIGURA 8 – Valor médio da cinética espermática fornecida pelo sistema CASA no pós-descongelamento de sêmen ovino diluído com Bovimix <sup>®</sup> e criopreservado com diferentes concentrações de cisteína.....	38

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – Valor médio da motilidade, vigor e turbilhonamento do sêmen de cada animal imediatamente após a colheita .....	29
TABELA 2 – Porcentagem média (e mediana) da motilidade progressiva, vigor espermático, viabilidade e espermatozoides com alta atividade mitocondrial (DAB) de sêmen ovino diluído com PBS e armazenado em temperatura ambiente durante duas horas com diferentes concentrações de cisteína.....	30
TABELA 3 – Porcentagem média (e mediana) da motilidade progressiva, vigor espermático, viabilidade e espermatozoides com alta atividade mitocondrial (DAB) de sêmen ovino diluído com Equimix <sup>®</sup> , armazenado em caixas isotérmicas a 16°C durante quatro horas com diferentes concentrações de cisteína .....	31
TABELA 4 – Porcentagem média (e mediana) da motilidade progressiva, vigor espermático, viabilidade e espermatozoides com alta atividade mitocondrial (DAB) de sêmen ovino diluído com Equimix <sup>®</sup> , armazenado em caixas isotérmicas a 16°C durante oito horas com diferentes concentrações de cisteína.....	32
TABELA 5 – Integridade de membranas (Íntegra = espermatozoides com membranas plasmática íntegra; Lesada = espermatozoides com membranas plasmática e acrossomal lesadas; Semi-lesada = espermatozoides com membrana plasmática lesada e acrossomal íntegra) no pós-descongelamento de sêmen ovino diluído com Bovimix <sup>®</sup> e criopreservado com diferentes concentrações de cisteína.....	34
TABELA 6 – Avaliação da integridade acrossomal no pós-descongelamento de sêmen ovino diluído com Bovimix <sup>®</sup> , e, criopreservado com diferentes concentrações de cisteína.....	36
TABELA 7 – Valor médio da cinética espermática fornecida pelo sistema CASA e espermatozoides com alto potencial mitocondrial mensurado pela sonda JC-1 no pós-descongelamento de sêmen ovino diluído com	

Bovimix® e criopreservado com diferentes concentrações de cisteína.....	37
--	----

**LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS**

µL	microlitro
ALH	Amplitude lateral de cabeça
ATP	Adenosina trifosfato
BCF	Frequência de batimento
CASA	<i>Computer assisted sperm analysis</i>
CV	Coeficiente de variação
DNA	Ácido desoxirribonucleico
FDA	Diacetato de 6-carboxifluoresceína
IP	Iodeto de propídeo
JC-1	Iodeto de 5,5',6,6' –tetracloro-1,1',3,3' -tetratilbenzimidazolilcarbocianina
LDL	Lipoproteínas de baixa densidade
LIN	Linearidade
MAI	Espermatozoides mortos com acrossoma íntegro
MAR	Espermatozoides mortos com acrossoma reagido
mg	Miligrama
ml	Mililitro
mM	Milimol
MP	Motilidade progressiva
MT	Motilidade total
PNA	Aglutinina de amendoim
ROS	Espécies reativas do metabolismo do oxigênio
STR	Retilinearidade
VAI	Espermatozoides vivos com acrossoma íntegro
VAP	Velocidade de trajeto
VAR	Espermatozoides vivos com acrossoma reagido
VCL	Velocidade curvilínea
VSL	Velocidade retilínea



## RESUMO

O uso de sêmen conservado é uma prática pouco difundida na ovinocultura nacional, e ainda apresenta resultados insatisfatórios de prenhez. Por isso, a adição de antioxidantes aos diluidores para preservar a qualidade seminal após sua manipulação tem sido alvo de muitas pesquisas. Sendo assim, objetivou-se avaliar o efeito *in vitro* da adição de diferentes concentrações do antioxidante cisteína ao meio diluente no sêmen ovino mantido fresco, refrigerado e congelado. Após a colheita e análise individual, o sêmen de seis carneiros formaram um *pool*, iguais alíquotas deste foram diluídas em PBS (sêmen fresco), Equimix<sup>®</sup> (sêmen refrigerado) ou Bovimix<sup>®</sup> (sêmen congelado), e adicionado 0, 2.5, 5.0 e 7.5 mM de cisteína para formar os respectivos grupos experimentais: Controle, Cys2.5, Cys5.0 e Cys7.5. O sêmen fresco foi mantido em temperatura ambiente durante duas horas, o sêmen refrigerado permaneceu durante quatro e oito horas à 16°C e o sêmen congelado foi armazenado em nitrogênio líquido. As variáveis analisadas do sêmen fresco e refrigerado foram motilidade, vigor, viabilidade e potencial mitocondrial dos espermatozoides. Avaliaram-se no sêmen congelado a integridade de membrana plasmática e acrossomal, cinética espermática computadorizada e potencial mitocondrial. O grupo Cys7.5 apresentou os maiores valores de motilidade no sêmen fresco (73,50%), porém não diferiu ( $p>0,05$ ) com o grupo Cys5.0 no sêmen refrigerado após quatro (68,00 vs 66,50%) e oito horas (57,00 vs 55,00%). No sêmen congelado, a adição de 7.5 mM de cisteína promoveu maior porcentagem de espermatozoides com a membrana plasmática íntegra (23,2%), seguido pelo grupo Cys5.0 (20,0%), mas não houve diferença estatística ( $p>0,05$ ) entre os grupos na integridade acrossomal. A adição de cisteína ao diluente de congelação promoveu aumento na capacidade de deslocamento dos espermatozoides. Não houve diferença ( $p>0,05$ ) entre os grupos Cys5.0 e Cys7.5 para as variáveis velocidade de trajeto (VAP), velocidade retilínea (VSL) e velocidade curvilínea (VCL), porém a concentração de 7.5 mM de cisteína foi mais eficiente na proteção da membrana plasmática e promoveu maior frequência de batimento flagelar (BCF).

**Palavras-chave:** Antioxidante, biotécnica, carneiros, CASA, criopreservação, sêmen, sondas fluorescentes.

## ABSTRACT

The use of frozen semen is a practice still little spread among the sheep producers and shows pregnancy results unsatisfactory. Because this the addition of antioxidant in the extenders to improve the sperm quality after your handing is the goal of many researchers. Therefore, the aim of this study was to analyze *in vitro* effects of different concentrations of cysteine anti-oxidant in extenders on the sheep sperm storage fresh, cooled and frozen. After sperm sampling and the individual analysis, the semen of six-sheep were pooled and divided in equal aliquots to be diluted in PBS (fresh semen), Equimix<sup>®</sup> (cooled semen) or Bovimix<sup>®</sup> (frozen semen). For each of these groups were added cysteine in different concentrations 0, 2.5, 5.0 and 7.5 mM, so were made the respective experimental groups Control, Cys2.5, Cys5.0 and Cys7.5. The fresh semen was stored in room temperature during two hours, the cooled semen was stored among four to eight hours in 16°C and the frozen semen was stored into liquid nitrogen. The analyzed variables to the fresh and cooled semen were motility, vigor, viability and mitochondrial potential of the spermatozoids. To the frozen semen, the parameters evaluated were the plasmatic and acrossomal membranes integrity, kinect by the computer system (CASA) and the mitochondrial potential. The group Cys7.5 showed the highest values of motility in the fresh semen (73.50%), however there was not different ( $p>0.05$ ) than the group Cys5.0 in the cooled semen after four (68.00 vs 66.50%) and eight hours (57.00 vs 55.00%). For the frozen semen, the addition of 7.5 mM cysteine promoted the highest percentage of spermatozoids with integrate plasmatic membrane (23.2%), followed by the Cys5.0 group (20.0%), however there was not statistic different ( $p<0.05$ ) among the group in the acrosomal integrity. The addition of cysteine in the frozen extender promoted increased in the capacity of mobility to the spermatozoa. There was not difference ( $p>0.05$ ) among the groups Cys5.0 and Cys7.5 mM for the variables average-path (VAP), straight-line (VSL) and curvilinear velocity (VCL), however the concentration of 7.5 mM cysteine was more efficient in the protection of plasmatic membrane and increased the beat/cross frequency (BCF).

**Keywords:** Antioxidant, biotechnology, CASA, cryopreservation, probes fluorescent, ram, semen.

## 1 INTRODUÇÃO

A ovinocultura representa uma importante atividade sócio-econômica em muitos continentes. Em países como Nova Zelândia, Austrália e Uruguai essa atividade significa importante fonte de receita, com valores produtivos expressivos e grande participação nas exportações. No Brasil, o rebanho ovino é mais expressivo nas regiões nordeste e sul, contudo, em levantamento realizado em 2011, o Estado de Goiás participava com 19% do efetivo da região Centro-Oeste com 226.869 cabeças (IBGE, 2011).

Devido a melhoria do poder aquisitivo do brasileiro o consumo de carne ovina vem crescendo, principalmente nos grandes centros urbanos. Ao mesmo tempo os consumidores também se tornaram mais exigentes e, por isso, a qualidade do produto ofertado torna-se primordial para alavancar e consolidar a carne ovina no mercado interno e abrir novas opções de exportação. Para isso é necessário ações tanto na parte de manejo, com o uso de confinamentos na terminação, como na melhoria genética do rebanho nacional, com programas de melhoramento e utilização de biotécnicas reprodutivas. Além da melhoria da qualidade, também é importante a manutenção da continuidade e da regularidade na oferta do produto, e para isso, é necessário a organização de todos os envolvidos nessa cadeia produtiva (SORIO, 2009).

A introdução e utilização de raças mais especializadas e utilização de biotécnicas reprodutivas como avaliação da qualidade seminal, inseminação artificial (IA), transferência de embriões (TE) e fertilização *in vitro* (FIV), devem ser desenvolvidas e implementadas para a melhoria da ovinocultura, através da disseminação genética de indivíduos superiores.

O desempenho reprodutivo dos animais determina a velocidade com que se obtém o produto final e possui influência direta na rentabilidade do sistema e no retorno econômico da atividade, por isso, as biotécnicas reprodutivas não são utilizadas somente para a melhoria do patrimônio genético dos animais, mas também constituem, juntamente com programas de melhoramento genético, importantes ações para o incremento e intensificação da produção. Os programas reprodutivos são bem difundidos e utilizados na bovinocultura nacional, mas no cenário ovino apresentam-se bastante atrasados. O fato de a ovinocultura ainda

apresentar um caráter extrativista ou secundário pode explicar a pouca difusão e utilização de biotécnicas reprodutivas entre os produtores.

É necessária a difusão de programas reprodutivos entre os produtores de ovinos para que se busque o desenvolvimento desse setor através da melhoria genética dos rebanhos nacionais, e, o estudo da conservação do sêmen se torna primordial para a evolução e padronização das técnicas de inseminação artificial e também para determinar a capacidade reprodutiva do macho. Porém pelo caráter extrativista da ovinocultura nacional o uso de sêmen conservado é uma prática pouco difundida, e ainda apresenta resultados insatisfatórios, principalmente quando se utiliza sêmen congelado com a inseminação convencional.

Embora a célula espermática tenha um sistema natural antioxidante, este pode ser insuficiente contra os efeitos deletérios que os espermatozoides sofrem durante seu processamento e armazenamento. Por isso, a adição de antioxidantes aos diluidores com o intuito de minimizar os efeitos danosos causados aos espermatozoides e aumentar a proteção à essas células durante a manipulação seminal tem sido alvo de muitas pesquisas.

A adição de antioxidantes exógenos, como a cisteína, pode ser facilmente adicionada aos diluidores nos protocolos de diluição seminal pois é uma técnica barata, de fácil e rápida execução. Assim, o conhecimento sobre antioxidantes que sejam eficientes na manutenção da qualidade seminal após o processamento e o real efeito da cisteína sobre as células espermáticas são fatores que necessitam de estudos, pois estão diretamente relacionados com a melhoria dos índices produtivos e difusão na utilização de biotécnicas reprodutivas entre os ovinocultores.

Assim objetivou-se com o presente estudo avaliar com testes *in vitro* o efeito da adição de diferentes concentrações de cisteína ao meio diluente, na manutenção da qualidade espermática do sêmen ovino armazenado na forma fresco, refrigerado e congelado.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Sêmen e os espermatozoides

O carneiro apresenta volume do ejaculado relativamente pequeno, variando de 0,5 a 2,0 mililitros (ml) e concentração espermática entre dois e cinco bilhões de espermatozoides por ml de ejaculado (MAIA et al., 2011). Animais saudáveis normalmente apresentam alta motilidade com 80% ou mais de células apresentando movimento retilíneo progressivo (BICUDO et al., 2005).

O sêmen pode ser caracterizado como suspensão celular líquida que contém gametas masculinos altamente especializados (espermatozoides) e também secreções dos órgãos acessórios do aparelho reprodutor masculino (RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ et al., 2005; MAWHINNEY & MARIOTTI, 2013). O plasma seminal é constituído pela porção fluida dessa suspensão, que é liberada na ejaculação (MOURA et al., 2011), e possui relevante importância nos processos relacionados com a capacidade fecundante dos espermatozoides (MOURA et al., 2010).

Os espermatozoides são provenientes dos túbulos seminíferos localizados no interior dos testículos, os quais contêm uma série de complexas células germinativas em desenvolvimento, que dão origem aos espermatozoides, através de uma sequência de eventos denominada espermatogênese (SILVA et al., 2002).

A espermatogênese pode ser caracterizada, citologicamente, como um processo complexo de diferenciação de células germinativas pouco diferenciadas (espermatogônias), em células altamente especializadas (espermatozoides), onde todas as suas estruturas são direcionadas para a fertilização do ovócito (KUDRYAVTSEV et al., 2003).

Esse processo se divide em duas etapas: espermatocitogênese (formação das espermátides a partir de espermatogônias) e espermiogênese (diferenciação das espermátides em espermatozoides), que levam à formação dos espermatozoides através de várias divisões e transformações das células germinativas primordiais (JOHNSTON et al., 2001).

No epidídimo ocorre a maturação dos espermatozoides (TOSHIMORI, 2003) que adquirem motilidade, capacidade de reconhecer e ligar-se à zona pelúcida e fundir-se com o oócito (GATTI et al., 2004). Quando liberados, os espermatozoides dos mamíferos consistem de duas regiões, morfologicamente e funcionalmente distintas: a cabeça, contendo um núcleo haploide altamente condensado, e o flagelo ou cauda, que impulsiona o espermatozoide ao oócito e auxilia na fecundação (ALBERTS et al., 2008a). Essas estruturas são unidas pelo colo e cobertas por uma membrana plasmática (MORTIMER, 1997; EDDY, 2006).

### **2.1.1 Cabeça**

A cabeça do espermatozoide contém, além de uma quantidade muito baixa de citosol, o núcleo e o acrossomo, e pode ser subdividida em quatro regiões: apical, pré-equatorial, equatorial e pós-equatorial (FLESH & GADELLA, 2000).

O núcleo achatado de forma ovalada confere a principal característica da cabeça, que contém o material genético, simplificado em uma cromatina altamente condensada (MARTINS et al., 2008). O ácido desoxirribonucleico (DNA) do núcleo inicia sua condensação por mudanças nas histonas e outras proteínas básicas específicas associadas ao DNA (FLESH & GADELLA, 2000). A cromatina condensada forma um complexo com uma classe especial de proteínas básicas, conhecidas como protaminas espermáticas, que são unidas por ligações sulfídicas e conferem estabilidade ao DNA (HAFEZ & HAFEZ, 2004).

O núcleo corresponde a aproximadamente 35% do peso da célula espermática, sendo os ácidos nucleicos, proteínas e lipídeos os principais componentes químicos do espermatozoide, que ainda é rico em fósforo, nitrogênio e enxofre (HAFEZ & HAFEZ, 2004).

Na região apical da cabeça do espermatozoide situa-se o acrossoma, composto por dupla camada de membranas que envolvem intimamente o núcleo durante os estágios finais da formação do espermatozoide, repleta de enzimas hidrolíticas envolvidas no processo de fertilização, como acrosina e hialuronidase, necessárias para a penetração na matriz extracelular do oócito (FLESH & GADELLA, 2000; HAFEZ & HAFEZ, 2004). Durante a reação acrossomal, a

membrana plasmática se funde com a membrana acrossomal externa, ocasionando a liberação do conteúdo do acrossoma e início do processo de fertilização (PETIT et al., 2013).

A região do colo é também considerada uma região independente e liga a cabeça com a cauda (TOSHIMORI, 2003).

### **2.1.2 Cauda**

A cabeça do espermatozoide contém o núcleo com o material genético, porém é necessário que essas células espermáticas passem pelo sistema reprodutor feminino e cheguem ao local de fecundação, cabendo à cauda dos espermatozoides essa função. Para isso, essas células possuem várias mitocôndrias localizadas em região estratégica da cauda, proporcionando energia para um batimento flagelar mais eficiente (ALBERTS et al., 2008a).

Durante a espermatogênese a cauda é a primeira estrutura a ser desenvolvida, concomitante ao recrutamento de mitocôndrias do citoplasma, que forma um padrão helicoidal em torno da peça intermediária (FLESCHE & GADELLA, 2000).

A cauda ou flagelo pode ser dividida em três regiões: peça intermediária, principal e terminal (TOSHIMORI, 2003). A peça intermediária contém as mitocôndrias e está envolvida na produção de energia, enquanto o resto do flagelo se envolve com a motilidade espermática (FLESCHE & GADELLA, 2000; EDDY, 2006).

A parte central da peça intermediária, junto com o comprimento total da cauda, forma o axonema (HAFEZ & HAFEZ, 2004). O axonema está presente na maior parte da cauda sendo composto por nove pares de microtúbulos dispostos radialmente ao redor de dois filamentos centrais (MORTIMER, 1997, EDDY et al., 2003). Existem ainda as fibrilas densas externas que circundam essa estrutura (RICARTE & SILVA, 2010). Por fim, uma bainha mitocondrial, disposta em forma de hélice, reveste a peça intermediária, fornecendo energia para a motilidade espermática (EDDY et al., 2003).

Enquanto a peça principal é composta centralmente pelo axonema e suas associações de fibras grosseiras, a peça terminal contém apenas o

axonema central simples revestido pela membrana plasmática (HAFEZ & HAFEZ, 2004).

### **2.1.3 Membrana Plasmática**

A membrana celular é crucial para a sobrevivência das células, uma vez que a envolve e protege definindo seus limites e manutenção das diferenças essenciais entre o ambiente intra e extracelular. Apesar de suas diferentes funções, todas as membranas biológicas apresentam uma estrutura fluida e dinâmica comum, composta por uma bicamada de lipídeos (fosfolipídios, colesterol e glicolipídeos) e moléculas de proteínas, unidas por ligações não covalentes, sendo que esta bicamada lipídica fornece a estrutura básica da membrana fluida e serve como uma barreira relativamente impermeável à passagem da maioria das moléculas hidrossolúveis (ALBERTS et al., 2008b).

Embora a bicamada lipídica forneça a estrutura básica das membranas biológicas, as proteínas da membrana são quem executam a maior parte das tarefas específicas, assim são responsáveis pelas propriedades funcionais características de cada célula, sendo o colesterol o modulador das propriedades da bicamada lipídica (ALBERTS et al., 2008b).

A célula espermática é totalmente revestida pela membrana plasmática, componente externo que embora seja contínuo sobre a superfície dos espermatozoides, pode ser dividida em vários domínios que diferem regionalmente (FLESH & GADELLA, 2000; TOSHIMORI, 2003; ALBERTS et al., 2008b).

A membrana plasmática possui dois domínios maiores na cabeça do espermatozoide, região acrossomal e região pós-acrossomal. Na região acrossomal, a membrana pode ainda ser dividida em segmentos: marginal (apical), principal (acrossomal) e equatorial. A junção dos segmentos marginal e equatorial formam a capa acrossomal. Na cauda, a bainha mitocondrial é coberta pelo domínio da peça intermediária, enquanto o domínio da cauda posterior cobre as peças principal e terminal (EDDY, 2006).

A membrana plasmática da cabeça do espermatozoide é separada da membrana plasmática da peça intermediária pelo anel posterior, e este último



domínio é separado da membrana plasmática da cauda pelo anel anular, sendo que cada domínio contém diferentes concentrações e distribuição variada de partículas intra-membranasas (FLESH & GADELLA, 2000).

## **2.2 Refrigeração seminal**

### **2.2.1 Diluentes utilizados para refrigeração do sêmen**

Em ovinos, devido ao pequeno volume (0,5 a 2,0 ml) e alta concentração espermática ( $2$  a  $5 \times 10^9$  espermatozoide/ml) utiliza-se diluente para aumentar o volume total do ejaculado e assim obter maior proporção de doses inseminantes. Os diluidores visam primeiramente o aumento de volume, mas devem também favorecer a sobrevivência dos gametas masculinos e serem livres de materiais tóxicos (GONÇALVES et al., 2001).

De acordo com HAFEZ & HAFEZ (2004), um diluente deve fornecer para os espermatozoides nutrientes e energia, como glicose, proteger as células do choque térmico, proporcionar meio tampão e pressão osmótica adequada, inibir a proliferação bacteriana e aumentar o volume do ejaculado. Para melhores resultados deve-se adicionar o diluente ao sêmen e, após a mistura cuidadosa, promover a avaliação do sêmen diluído para confirmar a sua viabilidade espermática. Normalmente os diluentes utilizados para preservação de sêmen de carneiro apresentam pH, capacidade de tamponamento e osmolaridade adequados, e promovem proteção aos espermatozoides ovinos de lesões criogênicas (SALAMON & MAXWELL, 2000).

Os diluidores mais utilizados são a base de Tris (hidroximetil aminometano) (MAIA et al., 2008) e leite desnatado (HAFEZ & HAFEZ, 2004). A gema de ovo é comumente adicionada aos diluidores, devido a sua fração lipoproteica de baixa densidade e alto peso molecular, promove proteção aos espermatozoides contra o choque térmico, reduz a perda de enzimas acrossomais e previne alterações de membrana durante o armazenamento (SALAMON & MAXWELL, 2000). Nos diluidores à base de leite desnatado esse mecanismo de proteção deve-se também à sua fração proteica (MEDEIROS et al., 2002).

MACHADO et al. (2006) avaliaram o diluidor à base de água de coco em pó (ACP-102<sup>®</sup>) para inseminação artificial em ovinos da raça Santa Inês com sêmen refrigerado a 4°C, e obtiveram taxa de fertilidade de 48% na inseminação cervical e 70,3% quando utilizaram laparoscopia. Segundo ANEL et al. (2006), a evolução da tecnologia nos diluidores seminais tem mostrado que a sobrevivência dos espermatozoides por períodos prolongados é inversamente proporcional à sua atividade metabólica.

Várias substâncias orgânicas e sintéticas (SALAMON & MAXWUEL, 2000) são utilizadas e lançadas pela indústria para promover proteção aos espermatozoides durante a diluição, porém, o balanço entre concentração e interação desses agentes com o meio celular deve ser sempre mensurado.

### **2.2.2 Métodos para refrigeração seminal**

A refrigeração do sêmen ovino diluído é utilizada como principal método de armazenamento. É caracterizada pela redução da temperatura, que originalmente encontra-se em torno de 37°C, para temperaturas próximas a zero grau Celsius. Nesse período o espermatozoide sofre inibição reversível de seu metabolismo (CÂMARA & GUERRA, 2011).

Para promover essa queda na temperatura, pode-se utilizar equipamentos convencionais (refrigerador, garrafas térmicas ou caixas isotérmicas com gelo), ou ainda equipamentos automatizados. Quando se utiliza refrigerador (geladeira), as palhetas devem ser colocadas primeiramente em frascos com água a 30°C, e posteriormente levadas ao refrigerador e mantidas até a estabilização da temperatura. No uso de caixas isotérmicas com gelo ou água gelada, as palhetas devem ser protegidas com algodão hidrofóbico para evitar o choque térmico devido ao contato direto com o gelo (RODELLO, 2006).

A refrigeração do sêmen de 30°C a 0°C realizada de forma abrupta, pode ocasionar um estresse letal a algumas células, caracterizado como choque térmico (WATSON, 2000). O dano às células causado pela queda da temperatura está relacionado com alterações no arranjo dos constituintes da membrana devido a mudanças na viscosidade do meio (MEDEIROS et al., 2002).

A queda lenta de temperatura também promove agressões na membrana celular (WATSON, 2000), por isso a curva de refrigeração deve ser monitorada e padronizada. Bolsas plásticas contendo água são utilizadas com eficiência para controlar a queda de temperatura quando se utiliza refrigeradores convencionais (RODELLO, 2006) ou balcão (LIMA et al., 2010).

RODELLO (2006) comparou a queda de temperatura no resfriamento do sêmen ovino utilizando equipamento automatizado de refrigeração e congelamento de sêmen e geladeira convencional. No método manual as palhetas do sêmen foram colocadas na geladeira entre bolsas plásticas contendo água, a fim de proporcionar resfriamento gradativo até estabilização em 5°C. Para a refrigeração automatizada utilizou-se o equipamento de fabricação nacional TK 3000<sup>®</sup> programado para executar queda de temperatura de -0,5°C/minuto. Ao comparar os dois sistemas, ambos apresentaram uma queda de -0,5°C/minuto e um tempo de 90 minutos para reduzir a temperatura de 32 para 5°C não mostrando diferença estatística nos critérios de qualidade seminal.

O importante é que a curva de queda da temperatura deve ser promovida de maneira constante e homogênea, evitando variações bruscas que culminam em choque térmico e redução da viabilidade espermática. Vários métodos podem ser utilizados para promover essa queda de temperatura, sejam eles automáticos ou manuais (WATSON, 2000; MEDEIROS et al., 2002).

### **2.2.3 Temperatura de armazenamento**

A redução da temperatura a níveis baixos é utilizada para reduzir o metabolismo dos espermatozoides e prolongar a sua vida fértil (ANEL et al., 2006), possibilitando o seu armazenamento e utilização por maior período de tempo. O armazenamento do sêmen na forma líquida apresenta facilidade no seu processamento, mas possui tempo hábil limitado (YÁNIZ et al., 2005).

Utilizam-se várias temperaturas no armazenamento do sêmen refrigerado, entretanto as temperatura de 15°C (YÁNIZ et al., 2005; DRUART et al., 2009), 5°C (BUCAK & TEKIN, 2007; ROJERO et al., 2009; LIMA et al., 2010) e 4°C (SOUSA et al., 2010) são as comumente utilizadas.

Quando se utiliza o sêmen fresco, esse deve ser mantido à temperatura em torno de 30°C e utilizado no menor tempo possível, pois nessa condição a motilidade e viabilidade seminal reduzem rapidamente. Quando se refrigera o sêmen, este pode ser armazenado e utilizado até 48 horas após a colheita (ROJERO et al., 2009), porém ocorre queda acentuada na fertilização após 24 horas, usando inseminação artificial cervical (ANEL et al., 2006; O'HARA et al., 2010).

O sêmen mantido a temperatura de 15°C possui tempo útil bastante inferior àqueles acondicionados a 4-5°C, e para que se obtenha índices satisfatórios recomenda seu uso até oito horas após o processamento (ANEL et al., 2006). Por isso, os diluentes são empregados no intuito de aumentar o tempo de armazenamento seminal.

SOUSA et al. (2010) compararam dois diluentes comerciais ao tradicionalmente utilizado como padrão no congelamento de sêmen ovino, Tris-Gema, sobre a viabilidade *in vitro* de células espermáticas de ovinos da raça Dorper, submetidos ao processo de refrigeração a 4°C e armazenados pelo período de até 48 horas. Os valores de motilidade individual progressiva mostraram diferença entre os tratamentos, sendo que os tratamentos Tris-Gema e Equimix-Gema proporcionaram proteção às células até 24 horas de armazenamento. Considerando que a diferença de composição entre os tratamentos Equimix e Equimix-Gema refere-se à presença de gema de ovo, também componente integrante do Tris-Gema, os autores atribuíram a maior proteção à célula espermática à adição de 20% de gema de ovo.

O'HARA et al. (2010) avaliaram a viabilidade espermática de sêmen ovino refrigerado nas temperaturas 5°C e 15°C, com armazenamento até 72 horas após a colheita, e observaram que a viabilidade permaneceu relativamente constante entre 24 e 72 horas para o sêmen refrigerado a 5°C, enquanto que no armazenamento do sêmen a 15°C a viabilidade declinou linearmente.

## **2.3 Criopreservação do sêmen**

### **2.3.1 Diluentes utilizados para criopreservação seminal**

O glicerol é o crioprotetor mais utilizado para o congelamento de sêmen ovino (SALAMON & MAXWELL, 2000). Possui a capacidade de penetrar a membrana celular e diminuir o estresse osmótico intracelular causado pela desidratação, entretanto, dependendo da concentração utilizada, sua toxicidade pode ocasionar danos na membrana e consequente redução da motilidade espermática (MEDEIROS et al., 2002).

A adição de gema de ovo pode ser utilizada para reduzir a concentração do glicerol e minimizar seu efeito tóxico (SALAMON & MAXWELL, 2000). Segundo ANEL et al. (2006), adição de glicerol em duas etapas com diferentes temperaturas representa o melhor balanço entre citotoxicidade e criopreservação.

Por apresentarem características crioprotetoras, a gema de ovo é comumente utilizada nos diluidores de sêmen para minimizar os efeitos deletérios do choque térmico (SALAMON & MAXWELL, 2000). Segundo MAIA et al. (2008), a adição de surfactantes à base de gema de ovo ao diluidor melhora significativamente a qualidade seminal e fertilidade após o processo de criopreservação, devido à manutenção da motilidade e integridade das membranas.

A gema de ovo atua no meio extracelular protegendo a membrana plasmática das crioinjúrias (SALAMON & MAXWELL, 2000). O efeito da interação entre as lipoproteínas de baixa densidade (LDL) da gema de ovo com a membrana celular promove diminuição na perda de fosfolipídios da membrana e aumenta sua tolerância ao processo de criopreservação (ANEL et al., 2006).

Outras substâncias como dimetilsulfóxido (DMSO), etilenoglicol, albumina, açúcares, surfactantes e proteínas de peixe têm sido avaliadas como agentes crioprotetores, entretanto nota-se efeito inferior ao glicerol (SALAMON & MAXWELL, 2000).

Em trabalho realizado por MAIA et al. (2008), os autores estudaram o efeito da adição do detergente lauril sulfato de sódio (OEP) ao diluente Tris

contendo 20% de gema de ovo, sob a viabilidade seminal após o congelamento e descongelamento do sêmen de carneiros da raça Santa Inês. Foram utilizados três diluidores, o diluidor controle (Tris) sem adição de OEP e dois diluidores a base de Tris adicionado OEP nas concentrações de 0,5 e 1,0% (TRIS 0,5 e TRIS 1). O processo de criopreservação causou efeito deletério à integridade da membrana plasmática e acrossomal do espermatozoide, diminuindo a qualidade seminal em relação ao sêmen fresco. A adição de OEP nos níveis de 0,5 e 1,0% promoveu melhora significativa na motilidade espermática, motilidade progressiva e integridade de membrana em relação ao diluidor sem adição de OEP.

A queda da motilidade do espermatozoide é uma característica encontrada frequentemente em sêmen congelado, isso se deve principalmente ao estresse da criopreservação que a célula é submetida, por isso recorre-se à utilização de crioprotetores como a gema de ovo e glicerol.

### **2.3.2 Métodos para criopreservação seminal**

A criopreservação é um processo que envolve as fases de redução de temperatura, desidratação celular, congelamento e descongelamento do sêmen (MEDEIROS et al., 2002). A criopreservação pode ser realizada de várias maneiras, contudo, para o sucesso do processo todas as etapas devem ser realizadas de forma harmoniosa (LEBOEUF et al., 2000).

Para a criopreservação pode-se utilizar caixas isotérmicas com nitrogênio líquido ( $N_2$ ), porém, mesmo que viável esse método necessita de rigoroso controle e monitoramento. Por isso, a indústria especializada investe em pesquisas a fim de lançar aparelhos automatizados que apresentem uma curva homogênea e padronizada, tornando o processo fácil e preciso (RODELLO, 2006).

Atualmente existem dois métodos para a criopreservação de gametas: congelamento lento e a vitrificação. Segundo ARAV et al. (2002) o congelamento lento possui a vantagem de utilizar baixa concentração de crioprotetores em relação a vitrificação, porém por ser um método rápido e simples, a vitrificação reduz o choque térmico sofrido pela diminuição gradual da temperatura.

A primeira parte da amostra a congelar é a água intracelular, por isso a taxa de queda de temperatura no congelamento lento é o principal fator que determina a sobrevivência dos espermatozoides. No caso da vitrificação, utilizava-se a imersão direta no  $N_2$  ( $-196^\circ\text{C}$ ), hoje com o avanço tecnológico o nitrogênio pode chegar a temperaturas de  $-210^\circ\text{C}$ , aumentando a taxa de congelamento, porém essa queda drástica de temperatura pode ocasionar fraturas na membrana com redução no potencial de fertilização dos espermatozoides (ARAV et al., 2002).

A temperatura entre  $-5^\circ\text{C}$  e  $-50^\circ\text{C}$  é definida como um ponto crítico, pois nessa temperatura a taxa de congelamento determina se a célula permanece em equilíbrio com seu meio extracelular ou torna progressivamente super congelada, elevando a possibilidade de desidratação e formação de gelo intracelular (KUMAR et al., 2003).

Também utiliza-se suspensão no vapor de nitrogênio líquido, com posterior imersão no líquido para o congelamento do sêmen. Nesse caso, o que determina a velocidade da queda da temperatura é a distância com o nitrogênio líquido e o tamanho das palhetas (LEBOEUF et al., 2000). Segundo SALAMON & MAXWELL (2000), a curva de queda de temperatura ideal para o congelamento é uma parábola, conseguida com uma distância de 4-6 centímetros entre as palhetas e o nitrogênio líquido.

RODELLO (2006) obteve bons resultados ao comparar um sistema automatizado (TK 3000®) para congelamento de sêmen com um sistema manual utilizando geladeira/vapor de nitrogênio líquido. Para o congelamento em vapor de nitrogênio líquido as palhetas com o sêmen, após atingirem a temperatura de  $5^\circ\text{C}$ , eram transferidas para um caixa de polietileno (isopor) contendo 5,5 litros de nitrogênio líquido. As palhetas eram expostas na posição horizontal a três centímetros do vapor de nitrogênio, por 20 minutos, e posteriormente submersas no nitrogênio líquido e armazenadas em raques em botijão criogênico. Para análise da qualidade seminal os seguintes tratamentos foram avaliados: refrigeração em geladeira e congelamento em vapor de nitrogênio líquido, refrigeração em geladeira e congelamento automatizado, refrigeração automatizada e congelamento em vapor de nitrogênio líquido, refrigeração e congelamento automatizado. Ao analisar o sêmen *in vitro* após o

descongelamento, não foi possível detectar diferenças nos parâmetros de qualidade seminal utilizando os sistemas de congelamento manual ou automatizado.

KUMAR et al. (2003) utilizaram taxa de criopreservação lenta ( $-1^{\circ}\text{C}/\text{min}$ ) e duas rápidas ( $-30^{\circ}\text{C}/\text{min}$  e  $-50^{\circ}\text{C}/\text{min}$ ) para avaliar o efeito da criopreservação sob os parâmetros qualitativos do sêmen de bovinos, ovinos e caprinos. Segundo os autores, a peça intermediária e cauda dos espermatozoides ovinos (envolvidos na geração e propagação do movimento) podem ser vulneráveis a taxas de congelamento lento, enquanto os espermatozoides caprinos possuem a motilidade espermática prejudicada pela criopreservação rápida. Contudo, independente da espécie, a taxa de  $-30^{\circ}\text{C}/\text{minuto}$  foi mais eficiente contra a crioinjúria, sendo recomendada entre as temperaturas de  $-5^{\circ}\text{C}$  e  $-50^{\circ}\text{C}$ .

## **2.4 Estresse oxidativo**

Os espermatozoides contêm altas concentrações de ácidos graxos poli-insaturados, que são altamente susceptíveis a peroxidação lipídica induzida pelas espécies reativas do metabolismo do oxigênio (ROS), além de possuírem limitado poder antioxidante, por isso o estresse oxidativo prejudica significativamente as funções dessas células espermáticas (SARIÖZKAN et al., 2009).

A perda de motilidade após o processamento do sêmen é decorrente principalmente do estresse oxidativo, o qual leva a formação de radicais livres, oxidantes e espécies reativas do metabolismo do oxigênio, e a diluição do sêmen causa diminuição da concentração natural de antioxidantes, promovendo menor resistência das células a essas substâncias (MAIA & BICUDO, 2009).

O manejo reprodutivo adotado na propriedade converge diretamente na capacidade produtiva dos animais, pois a permanência dos animais em condições de estresse e nutrição desbalanceada resulta em aumento da produção de ROS e/ou redução da disponibilidade de antioxidantes naturais do sêmen, levando à redução nos índices reprodutivos (ANDRADE et al., 2010).



Todos os sistemas biológicos formam os ROS. Quando na mitocôndria o oxigênio sofre redução tetravalente para a formação de  $H_2O$ , formando os intermediários reativos como: superóxido ( $O_2^-$ ), hidroxiperoxila ( $HO_2^+$ ), hidroxila ( $OH^+$ ), peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e óxido nitroso ( $NO^-$ ). Os organismos aeróbios formam e degradam as ROS, pois pequenas quantidades são necessárias para o funcionamento das células e processo de fertilização, porém, quando produzidos em excesso sobrecarregam as defesas antioxidantes dos espermatozoides, prejudicando o funcionamento fisiológico das células devido ao estresse oxidativo (NORDBERG & ARNÉR, 2001).

A produção de ROS ocorre normalmente nos indivíduos, por isso a manipulação do sêmen deve ser criteriosa para minimizar a produção de radicais oxidativos e proporcionar também proteção celular contra essas substâncias. A redução do estresse oxidativo e controle dos danos causados pela queda de temperatura devem ser elucidados para o aumento do potencial reprodutivo na espécie ovina.

## 2.5 Antioxidantes

O plasma seminal ovino é um dos responsáveis pela manutenção da qualidade, pois possui substâncias como proteínas (MOURA et al., 2010) e antioxidantes que protegem os espermatozoides de danos na membrana (HAFEZ & HAFEZ, 2004) como ácido ascórbico, ácido úrico, albumina, catalase, glutathiona, taurina, hipotaurina e vitamina E (MAIA & BICUDO, 2009). Porém a diluição realizada durante o processamento do sêmen reduz a capacidade protetora do plasma, assim, a adição de antioxidantes sempre é válida e necessária para manter e preservar a qualidade seminal (MAIA & BICUDO, 2009).

A célula possui dois sistemas de defesa antioxidante para se proteger dos efeitos deletérios da formação de ROS, um sistema enzimático e outro não enzimático. O complexo enzimático é formado pelas enzimas: a) superóxido dismutase (SOD), b) catalase (CAT), c) peroxiredoxinas (Prx), d) glutathiona (GSH), e) glutathiona redutase (GR) e f) glutathiona peroxidase (GPx). O sistema não enzimático é conhecido por substâncias sintéticas e que são suplementados através da dieta, formados por compostos de baixo peso molecular, como

vitaminas C e E, selênio, ubiquinonas, ácido úrico e ácido lipóico (NORDBERG & ARNÉR, 2001).

Os antioxidantes endógenos podem ser insuficientes contra os efeitos nocivos de ROS durante o armazenamento prolongado do sêmen, então, a adição de antioxidantes tem sido utilizada para melhorar a motilidade espermática e a integridade da membrana em sêmen manipulado (BUCAK & TEKIN, 2007).

Em estudo realizado com caprinos por BUCAK et al. (2009), os autores observaram que a adição dos antioxidantes glutamina e ácido hialurônico melhoraram a motilidade espermática e integridade da membrana plasmática após o congelamento e descongelamento do sêmen.

RUIZ et al. (2007) também avaliaram o efeito de dois antioxidantes para a criopreservação de sêmen de ovinos. Foi utilizado um diluidor à base de Tris, acrescido dos antioxidantes 2,2,6,6 tetrametil-1-piperidiniloxil (TEMPO) e 4-hidroxi 2,2,6,6 tetrametil-1-piperidiniloxil (TEMPOL) nas concentrações 0,5; 1,0 e 2,5 mM. A adição de 0,5 mM do antioxidante 2,2,6,6 tetrametil-1-piperidiniloxil reduziu a perda de motilidade progressiva ( $78,9 \pm 4,7$ ) e integridade de acrossoma ( $69,9 \pm 6,4$ ) em relação ao grupo controle ( $66,9 \pm 4,8$  e  $58,4 \pm 5,6$ ), contudo esse efeito não pôde ser observado no grupo experimental do outro antioxidante, que inclusive ocasionou redução na qualidade seminal.

É importante salientar que o uso de antioxidantes se faz necessário devido aos procedimentos realizados durante a criopreservação, como a diluição que reduz a proteção dos antioxidantes naturais. Porém o uso indevido pode levar a redução do potencial de fertilização dos espermatozoides e consequente queda dos índices reprodutivos (CÂMARA & GUERRA, 2011).

## **2.6 Cisteína**

Os antioxidantes exógenos, como a cisteína, são adicionados ao sêmen na tentativa de aumentar o poder antioxidante no sêmen e prevenir as células espermáticas dos efeitos deletérios das ROS. Segundo MAIA & BICUDO (2009), existe uma relação entre a lipoperoxidação no sêmen e a motilidade e morfologia espermática, por isso a peroxidação lipídica é considerada uma causa

importante de disfunção espermática, sendo que pode ser controlada ou revertida pela adição de antioxidantes ao meio diluidor.

A cisteína é um aminoácido de baixo peso molecular, pertencente ao grupo de antioxidantes da classe Tiol, que inclui a cisteína, N-acetil-cisteína e glutathione (MICHAEL et al., 2008). Esse aminoácido penetra facilmente a membrana celular e atua na eliminação das ROS através da manutenção dos níveis de glutathione intracelular, por isso possui boa capacidade antioxidante (TUNCER et al., 2010).

A cisteína e N-acetil-cisteína são precursores da biossíntese de glutathione intracelular ocasionando em aumento da glutathione reduzida, como esse composto é um co-fator da glutathione peroxidase, essa também é aumentada indiretamente (BILODEAU et al., 2001). A glutathione (GSH), glutathione redutase (GR) e glutathione peroxidase (GPx) são conhecidos como antioxidantes naturais, pertencem ao sistema de defesa antioxidante enzimático e são responsáveis em neutralizar as ROS excessivas e prevenir os danos na estrutura celular espermática (ANDRADE et al., 2010).

### **3 MATERIAIS E MÉTODOS**

#### **3.1 Local e período do experimento**

O experimento foi realizado no setor de Reprodução Animal da Escola de Veterinária e Zootecnia (EVZ) da Universidade Federal de Goiás (UFG) (latitude 16°36`S, longitude 49°16`O), na CAVA Cordeiro, localizada no município de Jussara, Estado de Goiás (latitude 15°52`S, longitude 50°50`O), no Centro de Transferência de Tecnologias de Raças Zebuínas com Aptidão Leiteira (CTZL), localizado no Núcleo Rural Ponte Alta, Gama, Distrito Federal (latitude 15°57`S, longitude 48°08`O) e no Recursos Genéticos e Biotecnologia (CENARGEN), da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa), localizado em Brasília, Distrito Federal (latitude 15°43`S, longitude 47°54`O). As atividades referentes às colheitas, processamento e análise do sêmen foram realizadas entre os meses de novembro e dezembro de 2011, enquanto o descongelamento e respectivas análises do sêmen congelado foram realizadas em julho de 2012.

#### **3.2 Animais**

Foram utilizados para colheita de sêmen seis carneiros adultos, sendo quatro da raça Dorper e dois da raça White Dorper, com idade entre dois e cinco anos. Todos os animais permaneciam no mesmo regime alimentar, estavam clinicamente sadios e com boa condição corporal (escore  $\geq 3,5$  em escala de 1 a 5). Antes do início do experimento os animais foram submetidos a avaliação andrológica e realizou-se um experimento piloto para constatar as condições dos animais, que apresentaram características espermáticas acima dos padrões mínimos preconizados pelo Colégio Brasileiro de Reprodução Animal – CBRA (1998) que são: volume de 1,0 ml; movimento de massa presente; 3 bilhões de espermatozoides por ejaculado; vigor 3; 75% de motilidade espermática e 90% de espermatozoides normais.

### 3.3 Colheita e avaliação do sêmen

As colheitas eram realizadas duas vezes por semana, em dias fixos, em um total de cinco semanas, perfazendo dez colheitas de cada animal. Utilizou-se vagina artificial própria para ovinos (Figura 1), com água aquecida a 42°C, e uma fêmea contida como manequim. Todos os animais já eram adaptados a esse sistema de colheita.



FIGURA 1 – Vagina artificial utilizada para a colheita do sêmen.

Imediatamente após a colheita do sêmen, os ejaculados eram analisados individualmente considerando as seguintes características: volume, aspecto, turbilhonamento, motilidade, vigor, concentração e morfologia espermática, seguindo os padrões mínimos estabelecidos para a espécie segundo o CBRA (1998) de volume de 1,0 ml; movimento de massa presente; 3 bilhões de espermatozoides por ejaculado; vigor 3; 75% de motilidade espermática e 90% de espermatozoides normais. Utilizou-se microscópio óptico com contraste de fase (BX41TF, Olympus, Japão), com filmadora em sistema de captura de vídeo e imagem (TV Box USB 2.0 Leadership®) ligado a um computador (Figura 2) para a análise seminal.

Todas as análises eram gravadas e avaliadas posteriormente, para reduzir o tempo que o sêmen ficava exposto ao ambiente e minimizar seu efeito deletério sobre as células espermáticas, agilizando o processo de colheita e diluição.



FIGURA 2 – Microscópio óptico com contraste de fase (BX41TF, Olympus, Japão), com filmadora ligado em sistema de captura de vídeo e imagem utilizado para análise seminal.

### 3.4 Tratamentos

#### 3.4.1 Diluição

Antes da colheita do sêmen era realizada o preparo de uma solução estoque a 10 milimolar (mM) de cisteína. Para o preparo dessa solução, era adicionado 12,1 miligramas (mg) de cisteína em 10 mililitros (ml) de cada um dos diluentes (PBS (solução fosfatada tamponizada), Equimix<sup>®</sup> (Nutricell – Nutrientes Celulares Ltda., Campinas, Brasil) e Bovimix<sup>®</sup> (Nutricell – Nutrientes Celulares Ltda., Campinas, Brasil). Os diluentes PBS, Equimix<sup>®</sup> e Bovimix<sup>®</sup> foram utilizados, respectivamente, para o armazenamento do sêmen na forma fresca, refrigerado e congelado.

Após a colheita realizava-se as avaliações iniciais da viabilidade espermática de cada animal, posteriormente, os ejaculados eram misturados formando um *pool* dos seis animais, objetivando minimizar a variação individual (Figura 3). A seguir, esse *pool* era dividido para formar a solução estoque de sêmen. Para o preparo dessa solução estoque, 1 ml do *pool* era colocado em 3 ml

de PBS, 2 ml do *pool* diluído em 12 ml de Equimix® e 3 ml do *pool* em 9 ml de Bovimix®.

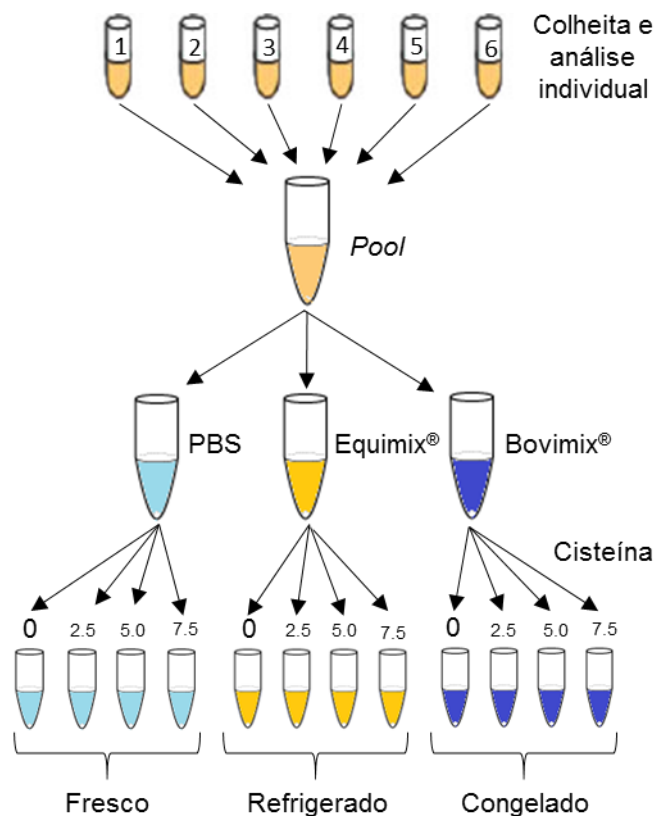


FIGURA 3 – Esquema do fracionamento e diluição do sêmen ovino para formar os grupos experimentais (Controle, Cys2.5, Cys5.0 e Cys7.5), mantidos na forma fresca, refrigerada e congelada.

Após o preparo, a solução estoque de sêmen era dividida, proporcionalmente, em quatro alíquotas. A solução estoque de cisteína era então adicionada, proporcionalmente, em cada alíquota para formar os grupos experimentais (Controle, Cys2.5, Cys5.0 e Cys7.5). Todos os grupos continham o mesmo volume de sêmen diluído, porém acrescido com as seguintes concentrações de cisteína:

- Controle: sêmen diluído sem adição de cisteína.
- CYS2.5: sêmen diluído com adição de 2.5 mM de cisteína.
- CYS5.0: sêmen diluído com adição de 5.0 mM de cisteína.
- CYS7.5: sêmen diluído com adição de 7.5 mM de cisteína.

O sêmen, diluentes e soluções estoques eram mantidos no mesmo banho-maria a 37°C, durante todas as etapas.

### **3.4.2 Armazenamento**

O sêmen do tratamento fresco era mantido em tubos microcentrífuga de 0,5 ml de capacidade, em temperatura ambiente e protegidos da luz por um período de duas horas, quando eram submetidos à análise.

O sêmen do tratamento refrigerado era também mantido em tubos microcentrífuga de 1,5 ml de capacidade. Os tubos eram acondicionados em um sistema comercial constituído por duas caixas de isopor, com fonte de gelo reciclável, a uma temperatura média de 16°C (Max-Sêmen®, Campinas, SP). Os frascos dos respectivos tratamentos eram retirados após quatro e oito horas para análise.

### **3.4.3 Criopreservação**

Após as amostras serem envasadas em palhetas de 0,5 ml, eram transferidas imediatamente para a máquina de congelação de sêmen (modelo Tetakon® - TK 3000, Tecnologia em Congelação Ltda.) (Figura 4), onde foram submetidas ao processo de refrigeração e congelação do sêmen seguindo a recomendação do fabricante para congelamento de sêmen ovino. Na refrigeração, as palhetas iniciavam à temperatura ambiente e atingiam 5°C, a uma taxa de 0,25°C/min. Após atingirem 5°C, o aparelho ficava estabilizando a temperatura durante uma hora, quando a parte central do porta-palhetas era colocado em caixa própria, contendo nitrogênio líquido para iniciar o processo de congelação. Esse processo era realizado em duas fases: a primeira a uma curva negativa de 15°C/min e a segunda a 10°C/min até atingir -120°C. Após o processo de congelação, as palhetas eram mergulhadas em nitrogênio líquido e armazenadas em botijão criogênico à temperatura de -196°C. Todo o processo durava aproximadamente duas horas e meia.





FIGURA 4 – Máquina de congelação de sêmen (Tetakon<sup>®</sup> - TK 3000) programada para congelamento de sêmen ovino.

### 3.5 Análises do sêmen

#### 3.5.1 Sêmen fresco e refrigerado

##### 3.5.1.1 Avaliação subjetiva da cinética espermática

Alíquotas de 10 microlitros ( $\mu\text{L}$ ) eram colocadas entre lâmina e lamínula, previamente aquecidas a  $37^{\circ}\text{C}$  e avaliadas sob microscopia plana (BX41TF, Olympus, Japão) com filmadora ligado a um computador em sistema de captura de vídeo e imagem (TV Box USB 2.0 Leadership<sup>®</sup>) (Figura 2), com aumento de 400x. A cinética espermática foi mensurada subjetivamente quanto à motilidade e vigor espermático.

A motilidade foi estimada baseando-se na porcentagem de espermatozoides móveis, atribuindo uma escala de 0% (ausência de espermatozoides com movimento) a 100% (todos os espermatozoides com movimento retilíneo progressivo). O vigor espermático, referente à velocidade progressiva uniforme das células em movimento, foi classificado em escores de 0 a 5, sendo o escore 1 o mais lento e aumentando gradativamente até o escore 5, correspondendo ao mais rápido movimento progressivo uniforme.

### **3.5.1.2 Viabilidade espermática**

Utilizou-se a coloração supravital com o corante eosina-nigrosina para avaliar a viabilidade espermática através da integridade estrutural da membrana plasmática. Volumes iguais de sêmen e corante foram colocados sobre lâmina de vidro previamente identificada e aquecida a 37°C, realizando o esfregaço após a homogeneização. Após serem secas ao ar, a leitura era realizada sob microscopia plana (BX41TF, Olympus, Japão) com filmadora ligado a um computador em sistema de captura de vídeo e imagem (TV Box USB 2.0 Leadership®) (Figura 2), com aumento de 400x.

Capturava-se sete imagens de toda a extensão da lâmina, sendo a contagem celular realizada posteriormente através do computador. Após a análise de pelo menos 300 células espermáticas, estas eram classificadas em espermatozoides vivos (membrana íntegra) quando os mesmos não eram corados, e espermatozoides mortos (membrana lesada) quando eram corados de rosa (DOTT & FOSTER, 1972).

### **3.5.1.3 Atividade mitocondrial**

A atividade citoquímica das mitocôndrias foi avaliada pelo método descrito por HRUDKA (1987). As amostras foram incubadas em meio contendo diaminobenzidina (DAB) em fosfato de sódio 0,15 M, pH 7,2, a uma concentração de 1 mg/ml e manuseado na ausência de luz. Uma alíquota de 20 µL de sêmen foi adicionada a 100 µL do meio de incubação, homogeneizado e mantido em um microtubo aberto em banho-maria a 37°C, durante 60 minutos na ausência de luminosidade. O controle negativo era obtido a cada ensaio realizado, pela incubação de uma amostra de sêmen aquecida a 100°C por cinco minutos e adicionada ao meio de incubação, da mesma maneira que amostra teste. Após a incubação, preparava-se esfregaço das amostras, fixados em formaldeído 10%, durante 10 minutos na ausência de luz. Após secas, as lâminas foram avaliadas em microscopia plana (BX41TF, Olympus, Japão), em aumento de 400x. Foram contadas 200 células e classificadas em duas categorias:

- Alto potencial mitocondrial: quase todas as mitocôndrias ativas, ou seja, contém um produto de reação enegrecida dando à bainha mitocondrial da peça intermediária a aparência de um cilindro compacto e proeminente de coloração escura.
- Baixo potencial mitocondrial: espermatozoides com poucas mitocôndrias ativas e dispersas ou completamente inativas, ocasionando em ausência de coloração escura ou difusos pontos enegrecidos na peça intermediária.

### **3.5.2 Sêmen criopreservado**

#### **3.5.2.1 Descongelamento**

As palhetas foram descongeladas em banho-maria a 37°C por 30 segundos, sendo o sêmen transferido para microtubos de 1,5 ml previamente aquecidos e mantidos no mesmo banho-maria a 37°C, dos quais se removiam amostras para as avaliações.

#### **3.5.2.2 Avaliação da integridade da membrana plasmática**

A integridade da membrana plasmática foi avaliada utilizando o diacetato de 6-carboxifluoresceína (C-FDA) e iodeto de propídeo (IP) (Molecular Probe®, Eugene, Oregon, EUA), descrito por HARRISON & VICKERS (1990). Uma amostra de 5 µL foi adicionada à solução de corante (30 µL) (Anexo IV) e incubada em banho-maria a 37°C durante oito minutos em microtubo protegido da luz. Uma alíquota de solução corante com sêmen foi colocada em lâmina e lamínula e observada em microscópio de epifluorescência (Axiophot Zeiss: filtro de comprimento de onda 395/420 nm excitação/emissão), com aumento de 1000x.

Foram examinados 200 espermatozoides em duas gotas, sendo classificados de acordo com a membrana espermática em:

- Membrana íntegra: coloração verde na cabeça.
- Membrana semi-lesada: coloração verde e vermelha na cabeça.

- Membrana lesada: coloração vermelha na cabeça.

### 3.5.2.3 Integridade do acrossoma

Uma conjugação da sonda fluorescente isoticianato de fluoresceína – FITC com lecitina de amendoim (*peanut agglutinin* – PNA) e iodeto de propídeo (IP), descrito por KLINC & RATH (2007), foi utilizada para avaliar a integridade do acrossoma.

Uma mostra de sêmen (5 µL) foi diluída em uma solução de corante (30 ml) (Anexo V) e incubada por oito minutos em banho-maria a 37°C, na ausência de luz. Uma alíquota desta solução foi colocada sobre lâmina e lamínula. O total de 200 espermatozoides, em duas gotas, foi examinado em microscópio de epifluorescência (Axiophot Zeiss: Filtro de comprimento de onda 495/517 excitação/emissão, com aumento de 1000x. As células espermáticas foram classificadas em quatro categorias:

- Vivo com acrossoma íntegro: ausência de coloração na cabeça e acrossoma.
- Vivo com acrossoma reagido: ausência de coloração na cabeça e presença de coloração verde no acrossoma.
- Morto com acrossoma íntegro: coloração vermelha na cabeça e ausência de coloração no acrossoma.
- Morto com acrossoma reagido: presença de coloração vermelha na cabeça e verde no acrossoma.

### 3.5.2.4 Avaliação da função mitocondrial

A função mitocondrial foi determinada pela utilização do iodeto de 5,5',6,6' –tetracloro-1,1',3,3' –tetratilbenzimidazolilcarbocianina (JC-1) (CELEGHINI et al., 2010). Alíquotas de 10 µL de sêmen foram diluídas em 50 µL de TALP, contendo 10 µL de JC-1 (0,15 mM em DMSO), incubadas por oito minutos a 37°C. Após a incubação, foram adicionados 900 µL de TALP, e centrifugada a 600 g durante um minuto, quando o sobrenadante (900 µL) era retirado e ressuspensionado com 200 µL de TALP (Anexo VI). Um total de 200

espermatozoides foi avaliado em microscópio de epifluorescência (Axiophot Zeiss: Filtro de comprimento de onda 495/517 excitação/emissão), com aumento de 1000x. As células coradas em laranja foram classificadas com alto potencial de membrana mitocondrial, enquanto aquelas coradas em verde foram classificadas com baixo potencial de membrana.

### 3.5.2.5 Avaliação computadorizada da cinética espermática

Utilizou o analisador de sêmen *Computer Assisted Sperm Analysis* (CASA) modelo Ivos-Ultimate 12 da Hamilton Thorn Bioscience, para avaliar a cinética espermática do sêmen criopreservado. O aparelho foi previamente configurado com *setup* para análise de sêmen de ovinos (Anexo II), seguindo as recomendações do fabricante. Primeiramente, a concentração espermática das amostras era determinada utilizando câmara hematimétrica (Neubauer) e posteriormente diluídas com X-Cell® (IMV, L'Aigle, França) (Anexo I) a fim de fixar a concentração final da diluição em aproximadamente  $48 \times 10^6$  spz/ml. Após a diluição, amostras de 10 µL do sêmen diluído foram transferidos para a câmara de MAKLER (*Makler Counting Chamber*), previamente aquecida a 37°C e levadas para a leitura. A avaliação foi realizada contando-se as células espermáticas de três campos selecionados automaticamente sempre a partir de um mesmo ponto central da câmara. Os campos eram selecionados, excluindo aqueles que continham bolhas, partículas ou outros elementos que pudessem prejudicar a análise. Os parâmetros de cinética espermática mensurados foram: motilidade total (MT; %), motilidade progressiva (MP; %), velocidade de trajeto (VAP; µm/s), velocidade retilínea (VSL; µm/s), velocidade curvilínea (VCL; µm/s), amplitude lateral de cabeça (ALH; µm), frequência de batimentos (BCF; Hz), retilinearidade (STR; %) e linearidade (LIN; %).

## 3.6 Análise estatística

O delineamento foi em blocos ao acaso, onde a semana representa o bloco (totalizando cinco semanas de colheita) e o *pool* do sêmen a unidade experimental. Para a variável vigor espermático foi utilizado o teste não

paramétrico de Friedman (Teste de Friedman). Para todas as outras variáveis utilizou-se a Análise de Variância (ANOVA). A comparação das médias foi realizada pelo método de *Tukey* sendo utilizado o nível de significância de 5%. As análises dos dados foram realizadas através do programa computacional R (R Core Team) versão 3.0.0.

## 4 RESULTADOS

Os valores da motilidade, vigor e turbilhonamento do sêmen de cada animal, avaliados imediatamente após a colheita para formar o *pool*, estão descritos na Tabela 1. Observa-se que todos os carneiros exibiram os valores espermáticos superiores aos recomendados pelo CBRA (1998) para a espécie ovina. Em todas as análises os animais apresentaram a concentração mínima de 3 bilhões de espermatozoides, com mínimo de 90% de células vivas e menos de 5% de defeitos, sendo considerados aptos para o processamento seminal.

TABELA 1 – Valor médio da motilidade, vigor e turbilhonamento do sêmen de cada animal imediatamente após a colheita.

Animal	Motilidade (%)	Vigor (1-5)	Turbilhonamento (1-5)
Carneiro 1	82,8	5,0	4,3
Carneiro 2	84,4	5,0	5,0
Carneiro 3	79,4	5,0	4,1
Carneiro 4	78,3	5,0	4,0
Carneiro 5	83,1	5,0	4,8
Carneiro 6	82,2	5,0	4,7

### 4.1 Sêmen fresco

A adição de cisteína no sêmen ovino diluído com PBS e mantido durante duas horas em temperatura ambiente, acarretou em diferença estatística ( $p < 0,05$ ) para as variáveis motilidade, vigor e potencial mitocondrial avaliado pelo DAB, conforme Tabela 2. Observa-se que o grupo que teve a adição de 7.5 mM de cisteína (Cys7.5) apresentou os maiores valores para essas variáveis.

No sêmen fresco após duas horas, o grupo Cys7.5 apresentou o maior valor para motilidade progressiva (73,5%) em relação ao grupo Controle, Cys2.5 e Cys5.0 (49,0; 60,5 e 66,5%; respectivamente). Porém, em relação ao vigor espermático, somente o grupo Controle diferiu estatisticamente ( $p < 0,05$ ), com valor de 3,5 frente a 3,9; 4,0 e 4,0 dos grupos Cys2.5, Cys5.0 e Cys7.5.

Assim como na motilidade e vigor das células espermáticas, a cisteína também promoveu melhora no potencial mitocondrial dos espermatozoides do

sêmen armazenados por duas horas em temperatura ambiente. Nota-se que houve diferença estatística ( $p < 0,05$ ) no potencial mitocondrial (DAB) com a adição de cisteína. Embora o grupo Controle apresentou o menor valor, não diferiu estatisticamente ( $p > 0,05$ ) do grupo que teve adição de 2.5 mM de cisteína (Cys2.5), que por sua vez foi semelhante aos grupos Cys5.0 e Cys7.5. A porcentagem de espermatozoides com alto potencial mitocondrial foi de 52,00; 55,40; 58,30 e 59,30% para os grupos Controle, Cys2.5, Cys5.0 e Cys7.5, respectivamente.

Os valores encontrados para viabilidade espermática, mensurada através da porcentagem de espermatozoides vivos e mortos pelo teste de eosina-nigrosina foram 71,10; 70,52; 70,64 e 69,50%; para os grupos Controle, Cys2.5, Cys5.0 e Cys7.5, respectivamente. Embora o grupo que não teve adição de cisteína (Controle) apresentou o maior valor de espermatozoides vivos (71,10%), seguido dos grupos Cys2.5 e Cys5.0 (70,52 e 70,64%, respectivamente), com valores próximos, e Cys7.5 com menor valor (69,50%), não houve diferença estatística ( $p > 0,05$ ) entre os grupos experimentais.

TABELA 2 – Porcentagem média (e moda) da motilidade progressiva, vigor espermático, viabilidade e espermatozoides com alta atividade mitocondrial (DAB) de sêmen ovino diluído com PBS e armazenado em temperatura ambiente durante duas horas com diferentes concentrações de cisteína.

Variáveis	Tratamentos				P	CV (%)
	Controle	Cys2.5	Cys5.0	Cys7.5		
Motilidade (%)	49,00 <sup>d</sup>	60,50 <sup>c</sup>	66,50 <sup>b</sup>	73,50 <sup>a</sup>	<0,001	4,51
Vigor (1-5)	3,5 (3,0) <sup>b</sup>	3,9 (4,0) <sup>a</sup>	4,0 (4,0) <sup>a</sup>	4,0 (4,0) <sup>a</sup>	0,043	-
Viabilidade (%)	71,10	70,52	70,64	69,50	0,848	3,77
DAB (%)	52,00 <sup>b</sup>	55,40 <sup>ab</sup>	58,30 <sup>a</sup>	59,30 <sup>a</sup>	0,012	5,48

Letras minúsculas na mesma linha diferem entre si ( $p < 0,05$ ).

CV = coeficiente de variação.



## 4.2 Sêmen refrigerado

Na Tabela 3 encontram-se a porcentagem média da motilidade progressiva, vigor espermático, espermatozoides vivos (viabilidade) e aqueles com alto potencial mitocondrial analisado pelo DAB, do sêmen ovino diluído com Equimix<sup>®</sup> adicionado com diferentes concentrações de cisteína, e armazenado em caixas isotérmicas a 16°C durante quatro horas. Observa-se que a motilidade e o vigor das células espermáticas diferiram estatisticamente ( $p < 0,05$ ) entre os grupos experimentais.

A motilidade aumentou conforme o aumento da concentração de cisteína adicionada ao sêmen, assim o grupo Controle apresentou os menores valores frente aos grupos Cys2.5, Cys5.0 e Cys7.5 (45,00; 56,00; 66,50 e 68,00%, respectivamente). Contudo, embora o grupo com maior adição de cisteína (Cys7.5) tenha apresentado o maior valor de motilidade, este não mostrou diferença estatística ( $p > 0,05$ ) do grupo com adição de 5.0 mM.

Assim como a motilidade, o vigor espermático não diferiu estatisticamente ( $p > 0,05$ ) entre os grupos Cys5.0 e Cys7.5, que apresentaram o mesmo valor (3,9). O grupo Controle e Cys2.5 também não diferiram estatisticamente ( $p > 0,05$ ) entre si, porém diferiram ( $p < 0,05$ ) dos demais grupos. Os valores para vigor espermático foram 3,1; 3,4; 3,9 e 3,9 para os grupos Controle, Cys2.5, Cys5.0 e Cys7.5, respectivamente.

TABELA 3 – Porcentagem média (e moda) da motilidade progressiva, vigor espermático, viabilidade e espermatozoides com alta atividade mitocondrial (DAB) de sêmen ovino diluído com Equimix<sup>®</sup>, armazenado em caixas isotérmicas a 16°C durante quatro horas com diferentes concentrações de cisteína.

Variáveis	Tratamentos				P	CV (%)
	Controle	Cys2.5	Cys5.0	Cys7.5		
Motilidade (%)	45,00 <sup>c</sup>	56,00 <sup>b</sup>	66,50 <sup>a</sup>	68,00 <sup>a</sup>	<0,001	6,88
Vigor (1-5)	3,1 (3,0) <sup>b</sup>	3,4 (3,5) <sup>b</sup>	3,9 (4,0) <sup>a</sup>	3,9 (4,0) <sup>a</sup>	0,016	-
Viabilidade (%)	71,13	70,38	70,00	69,75	0,914	4,14
DAB (%)	31,00	27,90	30,80	30,20	0,131	7,03

Letras minúsculas na mesma linha diferem entre si ( $p < 0,05$ ).

CV = coeficiente de variação.

Apesar da viabilidade do sêmen, mensurada através da porcentagem de espermatozoides vivos, tenha reduzido com o aumento da concentração de cisteína adicionada ao sêmen, não houve diferença estatística ( $p>0,05$ ) entre os grupos Controle, Cys2.5, Cys5.0 e Cys7.5 (71,13; 70,38; 70,00 e 69,75; respectivamente). Os valores de espermatozoides com alto potencial mitocondrial mostrou valores próximos entre os grupos Controle, Cys5.0 e Cys7.5 (31,00; 30,80 e 30,20%, respectivamente) e menor valor para o grupo Cys2.5 (27,90%), porém sem diferença estatística ( $p>0,05$ ) entre eles.

Os resultados das variáveis motilidade, vigor, viabilidade e espermatozoides com alto potencial mitocondrial do sêmen ovino refrigerado a 16°C durante oito horas em meio contendo diferentes concentrações de cisteína, estão expressos na Tabela 4. Embora a motilidade tenha reduzido com o passar do tempo, observa-se que os grupos apresentaram o mesmo padrão do sêmen armazenado durante quatro horas (Tabela 3), ou seja, a motilidade do sêmen aumentou conforme o aumento da concentração de cisteína.

TABELA 4 – Porcentagem média (e moda) da motilidade progressiva, vigor espermático, viabilidade e espermatozoides com alta atividade mitocondrial (DAB) de sêmen ovino diluído com Equimix®, armazenado em caixas isotérmicas a 16°C durante oito horas com diferentes concentrações de cisteína.

Variáveis	Tratamentos				P	CV (%)
	Controle	Cys2.5	Cys5.0	Cys7.5		
Motilidade (%)	37,00 <sup>c</sup>	46,00 <sup>b</sup>	55,00 <sup>a</sup>	57,00 <sup>a</sup>	<0,001	9,63
Vigor (1-5)	2,2 (2,0) <sup>b</sup>	3,1 (3,0) <sup>a</sup>	3,3 (3,5) <sup>a</sup>	3,4 (3,5) <sup>a</sup>	0,016	-
Viabilidade (%)	58,50	59,00	60,25	60,13	0,739	4,41
DAB (%)	22,38	22,75	20,88	23,25	0,368	8,41

Letras minúsculas na mesma linha diferem entre si ( $p<0,05$ ).

CV = coeficiente de variação.

A adição de 7.5 mM de cisteína promoveu o maior valor de motilidade, porém sem diferença estatística ( $p>0,05$ ) com o Cys5.0, mas houve diferença ( $p<0,05$ ) destes grupos com os demais. A porcentagem média de motilidade progressiva encontrada foi 37,00; 46,00; 55,00 e 57,00% para os grupos Controle, Cys2.5, Cys5.0 e Cys7.5, respectivamente. O grupo Cys7.5 também apresentou o

maior valor médio de vigor espermático, contudo não houve diferença ( $p>0,05$ ) entre os grupos que tiveram adição de cisteína, diferindo somente o grupo Controle ( $p<0,05$ ). Os valores de vigor espermático dos grupos Controle, Cys2.5, Cys5.0 e Cys7.5 foram 2,2; 3,1; 3,3 e 3,4; respectivamente.

A porcentagem média de espermatozoides vivos, mensurada pelo teste de eosina-nigrosina (viabilidade) e a quantidade de células espermáticas com alto potencial mitocondrial não diferiram ( $p>0,05$ ) entre os grupos. A adição de cisteína não promoveu melhora na viabilidade espermática, porém, minimizou a morte celular entre quatro e oito horas (Tabela 3 e 4), que apresentou queda de 12,63; 11,38; 9,75 e 9,62% (Controle, Cys2.5, Cys5.0 e Cys7.5, respectivamente). Com isso, observa-se que o grupo Controle apresentou queda mais acentuada no número de espermatozoides vivos entre quatro e oito, principalmente em relação aos grupos Cys5.0 e Cys7.5, que devido à redução semelhante na porcentagem de espermatozoides vivos, apresentou queda mais retilínea que os demais grupos (Figura 5).

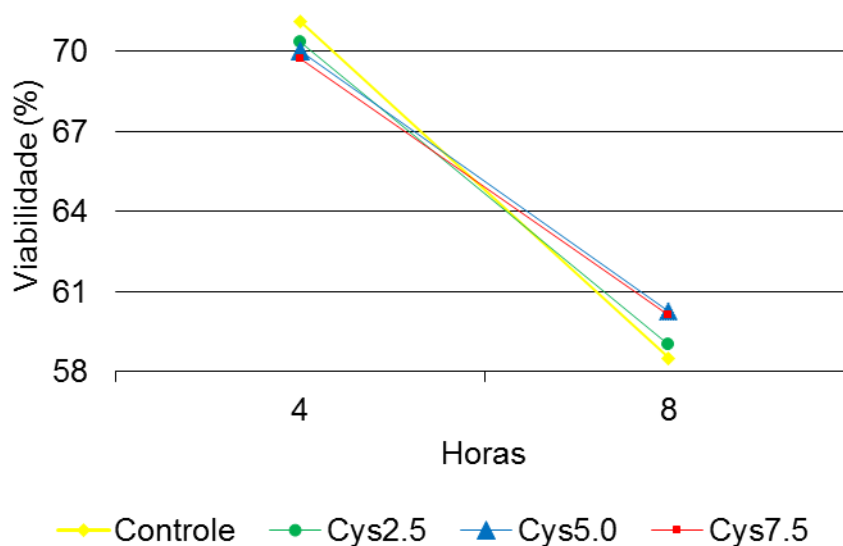


FIGURA 5 – Queda da porcentagem média na viabilidade espermática avaliada pelo teste eosina-nigrosina de sêmen ovino diluído com Equimix® e armazenado em caixas isotérmicas a 16°C durante quatro e oito horas com diferentes concentrações de cisteína.

### 4.3 Sêmen congelado

Na Tabela 5 são expostos os valores da integridade de membranas plasmática e acrossomal dos espermatozoides após o congelamento e descongelamento do sêmen. A porcentagem de células com membranas íntegras apresentou diferença estatística ( $p < 0,05$ ) entre os grupos experimentais. Os valores do grupo Controle, Cys2.5, Cys5.0 e Cys7.5 foram: 16,4; 17,4; 20,0 e 23,2%; respectivamente. Essa tendência pode também ser notada na porcentagem de células com a membrana lesada e semi-lesada, porém sem diferença estatística entre os grupos ( $p > 0,05$ ). Os valores de espermatozoides com membrana lesada foram: 69,5; 69,6; 67,3 e 66,5%; e, espermatozoides com membrana plasmática lesada e acrossomal íntegra (semi-lesados) foram: 14,3; 13,3; 12,7 e 10,6% (Controle, Cys2.5, Cys5.0 e Cys7.5, respectivamente).

TABELA 5 – Integridade de membranas (Íntegra = espermatozoides com membranas plasmática íntegra; Lesada = espermatozoides com membranas plasmática e acrossomal lesadas; Semi-lesada = espermatozoides com membrana plasmática lesada e acrossomal íntegra) no pós-descongelamento de sêmen ovino diluído com Bovimix® e criopreservado com diferentes concentrações de cisteína.

Integridade da membrana (%)	Tratamentos				P	CV (%)
	Controle	Cys2.5	Cys5.0	Cys7.5		
Íntegra	16,4 <sup>c</sup>	17,4 <sup>c</sup>	20,0 <sup>b</sup>	23,2 <sup>a</sup>	<0,001	4,88
Lesada	69,5	69,6	67,3	66,5	0,6304	6,65
Semi-lesada	14,3	13,3	12,7	10,6	0,5149	30,61

Letras minúsculas na mesma linha diferem entre si ( $p < 0,05$ ).

CV = coeficiente de variação.

Na Figura 6, observa-se que o grupo com adição de 7.5 mM de cisteína (Cys7.5) apresentou o maior valor de espermatozoides com membrana íntegra (23,2%), diferindo estatisticamente dos demais ( $p < 0,05$ ), e os menores valores de células com membrana lesada (66,5%) e semi-lesada (10,6%), porém sem diferença estatística ( $p > 0,05$ ) entre os grupos.

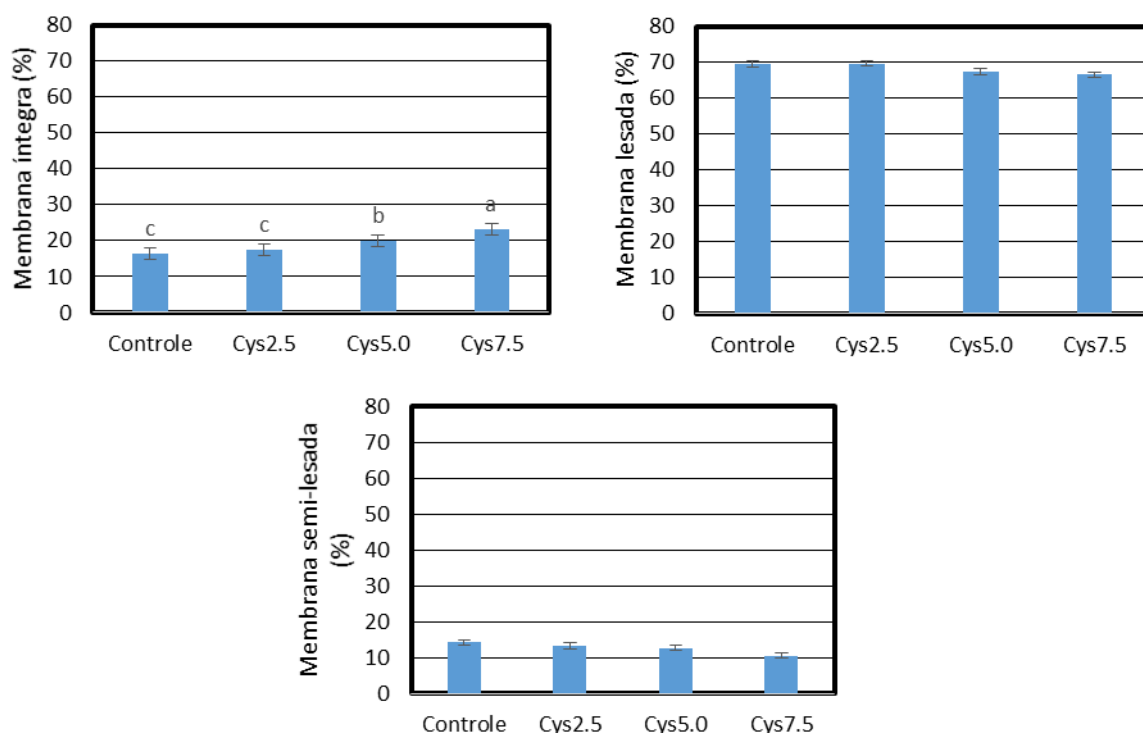


FIGURA 6 – Porcentagem (média  $\pm$  erro padrão) de espermatozoides com membrana íntegra, lesada ou semi-lesada após congelamento e descongelamento de sêmen ovino diluído com Bovimix<sup>®</sup> e criopreservado com diferentes concentrações de cisteína.

Letras diferentes na coluna indicam diferença significativa ( $p < 0,05$ ).

Além de influenciar a integridade da membrana plasmática, observa-se que a cisteína também promoveu influência sob a integridade da membrana acrossomal (Figura 7). O grupo Cys7.5 apresentou a maior porcentagem de espermatozoides vivos com acrossoma íntegro e menor proporção de células espermáticas vivas com acrossoma reagido, porém não houve diferença estatística entre os grupos experimentais ( $p > 0,05$ ).

Os valores percentuais de espermatozoides vivos com acrossoma íntegro foram: 13,0; 14,4; 14,3 e 15,6% para os grupos Controle, Cys2.5, Cys5.0 e Cys7.5, respectivamente. Seguindo a mesma ordem, encontrou-se a proporção de 4,0; 3,8; 3,3 e 1,8% de espermatozoides vivos com acrossoma reagido (Tabela 6). Porém o percentual de integridade do acrossoma não se repetiu nas células que sofreram morte celular, sendo que o grupo Controle (sem adição de antioxidante) mostrou os maiores valores de espermatozoides mortos com

acrossoma íntegro (46,6; 42,2; 40,2 e 38,8%), e menor proporção de células mortas com acrossoma reagido (37,2; 40,4; 42,9; 44,6%) (Controle, Cys2.5, Cys5.0 e Cys7.5, respectivamente).

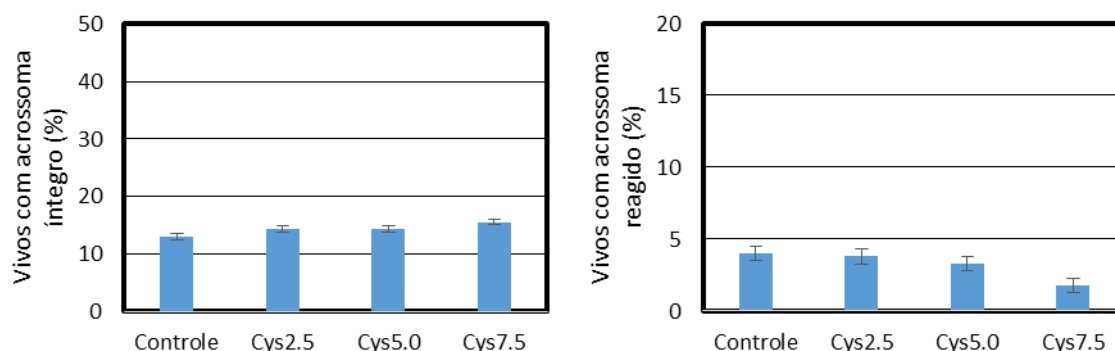


FIGURA 7 – Porcentagem (média  $\pm$  erro padrão) de espermatozoides vivos com acrossoma íntegro e vivos com acrossoma reagido após congelamento e descongelamento de sêmen ovino diluído com Bovimix<sup>®</sup> e criopreservado com diferentes concentrações de cisteína.

TABELA 6 – Avaliação da integridade acrossomal no pós-descongelamento de sêmen ovino diluído com Bovimix<sup>®</sup> e criopreservado com diferentes concentrações de cisteína.

Espermatozoides (%)	Tratamentos				P	CV (%)
	Controle	Cys2.5	Cys5.0	Cys7.5		
VAI	13,0	14,4	14,3	15,6	0,0979	10,23
VAR	4,0	3,8	3,3	1,8	0,0733	39,88
MAI	46,6	42,2	40,2	38,8	0,0998	11,22
MAR	37,2	40,4	42,9	44,6	0,1238	11,37

VAI = vivos com acrossoma íntegro; VAR = vivos com acrossoma reagido; MAI = mortos com acrossoma íntegro e MAR = mortos com acrossoma reagido.  
CV = coeficiente de variação.

Os parâmetros de movimento espermáticos fornecido pelo sistema CASA e o potencial mitocondrial dos espermatozoides mensurado através da sonda iodeto de 5,5',6,6' -tetracloro-1,1',3,3' -tetratilbenzimidazolilcarbocianina (JC-1) são apresentados na Tabela 7. Não houve diferença nos valores de motilidade total entre os grupos Controle, Cys2.5, Cys5.0 e Cys7.5 (62,00; 58,00; 58,63 e 54,88; respectivamente). Na mesma ordem, a proporção de

espermatozoides com motilidade progressiva apresentou valores próximos à porcentagem de espermatozoides com alto potencial mitocondrial: 30,00 e 33,20; 30,38 e 33,00; 33,88 e 31,80; 31,00 e 32,80, respectivamente para os grupos Controle, Cys2,5; Cys5,0 e Cys7.5.

TABELA 7 – Valor médio da cinética espermática fornecida pelo sistema CASA e espermatozoides com alto potencial mitocondrial mensurado pela sonda JC-1 no pós-descongelamento de sêmen ovino diluído com Bovimix<sup>®</sup> e criopreservado com diferentes concentrações de cisteína.

Variável	Tratamentos				P	CV (%)
	Controle	Cys2.5	Cys5.0	Cys7.5		
Motilidade (%)	62,00	58,00	58,63	54,88	0,4179	9,78
Progressiva (%)	30,00	30,38	33,88	31,00	0,6572	15,06
VAP (µm/s)	102,33 <sup>b</sup>	109,53 <sup>ab</sup>	114,64 <sup>a</sup>	114,48 <sup>a</sup>	0,0088	4,72
VSL (µm/s)	82,36 <sup>b</sup>	91,36 <sup>ab</sup>	95,07 <sup>a</sup>	97,29 <sup>a</sup>	0,0178	7,19
VCL (µm/s)	176,93 <sup>b</sup>	185,18 <sup>ab</sup>	196,81 <sup>a</sup>	198,15 <sup>a</sup>	0,0019	3,90
ALH (µm)	6,93	7,02	7,47	7,21	0,2210	5,73
BCF (Hz)	40,88 <sup>b</sup>	41,28 <sup>b</sup>	41,19 <sup>b</sup>	43,17 <sup>a</sup>	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
JC-1 (%)	33,20	33,00	31,80	32,80	0,8904	9,37

Motilidade = motilidade total; Progressiva = motilidade progressiva; JC-1 = alto potencial mitocondrial; VAP = velocidade de trajeto; VSL = velocidade retilínea; VCL = velocidade curvilínea; ALH = amplitude lateral de cabeça; BCF = frequência de batimentos; STR = retilinearidade; LIN = linearidade.

Letras minúsculas na mesma linha diferem entre si ( $p < 0,05$ ).

CV = coeficiente de variação.

Apesar da motilidade e potencial mitocondrial não apresentar diferença ( $p > 0,05$ ) entre os grupos experimentais, a frequência de batimentos (BCF) do grupo Cys7.5 diferiu dos demais ( $p < 0,05$ ). O grupo Controle, Cys2.5 e Cys5.0 apresentaram valores semelhantes (40,88; 41,28 e 41,19; respectivamente), sendo o maior valor do grupo Cys7.5 (43,17).

O grupo Controle apresentou os menores valores para as variáveis amplitude lateral de cabeça (ALH), retilinearidade (STR) e linearidade (LIN), porém, os grupos experimentais não diferiram entre si ( $p > 0,05$ ). Os valores dessas variáveis apresentadas pelos grupos Controle, Cys2.5, Cys5.0 e Cys7.5

foram, respectivamente: 6,93; 7,02; 7,47 e 7,21 (ALH); 74,50; 76,90; 76,50; 78,20% (STR) e 44,50; 47,00; 45,90; 46,90% (LIN).

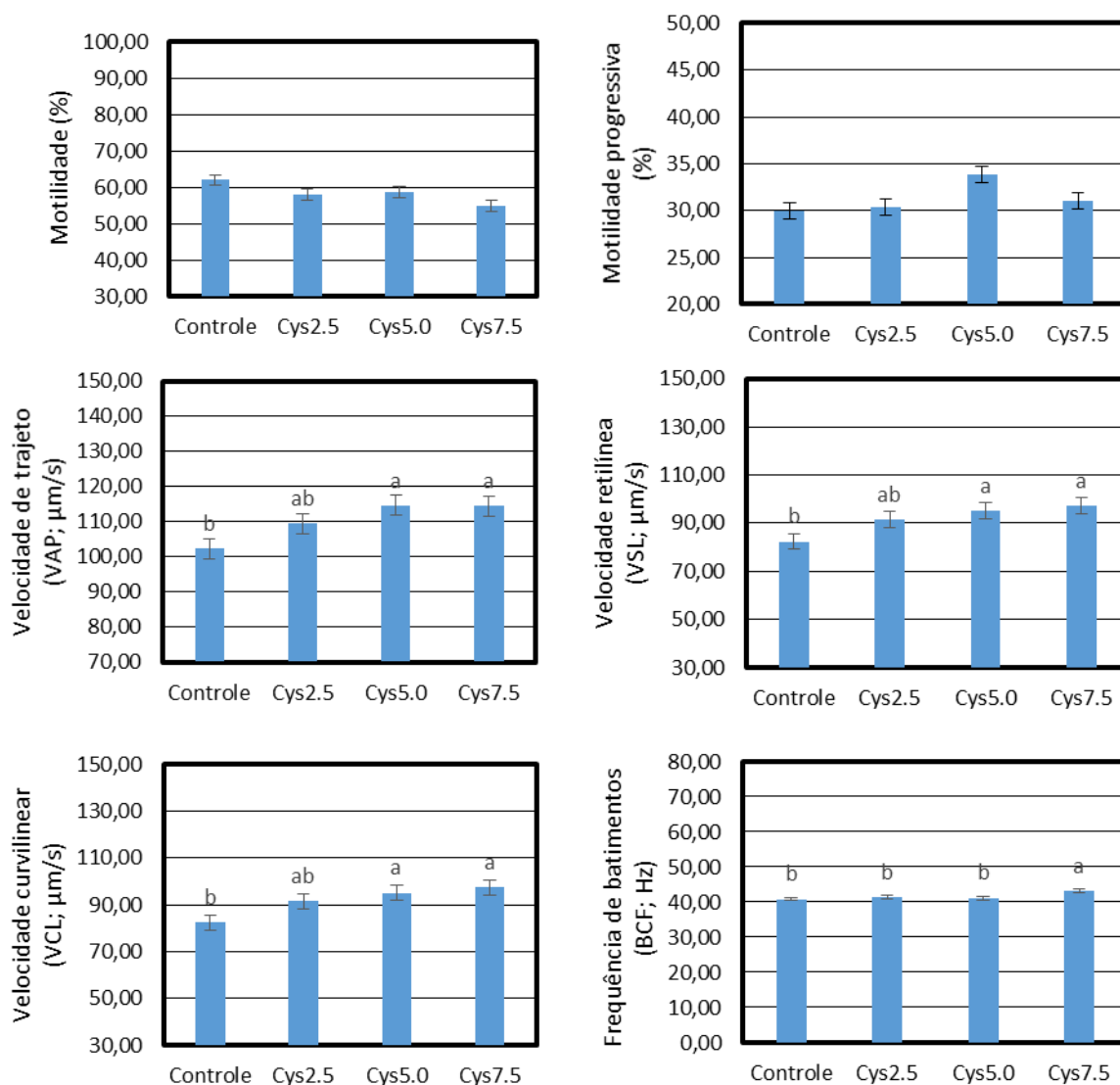


FIGURA 8 – Valor médio da cinética espermática fornecida pelo sistema CASA no pós-descongelamento de sêmen ovino diluído com Bovimix® e criopreservado com diferentes concentrações de cisteína.

Letras diferentes na coluna indicam diferença significativa ( $p < 0,05$ ).

Observa-se na Tabela 7 e na Figura 8 que a velocidade de trajeto (VAP), velocidade retilínea (VSL) e velocidade curvilínea (VCL) foram estatisticamente diferentes entre os grupos experimentais ( $p < 0,05$ ), sendo os maiores valores dessas variáveis apresentados pelos grupos Cys7.5 e Cys5.0, acompanhados pelo grupo Cys2.5 e Controle. Pode-se notar que não houve



diferença estatística ( $p < 0,05$ ) entre os grupos que tiveram adição de cisteína, porém, embora o grupo Cys2.5 apresentou valores superiores ao grupo Controle, estes grupos não diferiram entre si ( $p > 0,05$ ). Os valores encontrados para as variáveis de velocidade dos grupos Controle, Cys2.5, Cys5.0 e Cys7.5 foram, respectivamente: 102,33; 109,53; 114,64; 114,48 (velocidade de trajeto); 82,36; 91,36; 95,07; 97,29 (velocidade retilínea); e 176,93; 185,18; 196,81; 198,15 (velocidade curvilínea).

## 5 DISCUSSÃO

### 5.1 Sêmen fresco

Os valores da motilidade progressiva e vigor espermático do sêmen fresco mostraram diferenças estatística ( $p < 0,05$ ) entre os tratamentos. Observa-se que a adição de cisteína promoveu a melhora na motilidade e vigor das células espermáticas, proporcional à concentração de antioxidante adicionado, dessa forma os maiores valores foram apresentados pelo grupo com adição de 7.5mM de cisteína.

A adição de cisteína promoveu melhora na motilidade progressiva e potencial mitocondrial. A utilização desse antioxidante pode estar associado à uma possível proteção a membrana mitocondrial, que resulta em maior taxa da fosforilação oxidativa e maior atividade metabólica. Isso promove efeitos diretos sobre a motilidade celular, pois as mitocôndrias são responsáveis em transformar e disponibilizar energia para o movimento celular.

Segundo SUAREZ & PACEY, 2006, a motilidade espermática é considerada um importante parâmetro, principalmente por relacionar com a capacidade dos espermatozoides em migrar através do trato genital feminino, de forma a atingir, interagir e fertilizar o óvulo, podendo ser correlacionada com a fertilidade (GILLAN et al., 2008). A cisteína penetra facilmente a membrana celular dos espermatozoides dos mamíferos e promove o aumento da biossíntese de glutathione intracelular, que reduz a perda de motilidade e aumenta a viabilidade espermática durante o armazenamento, seja na forma líquida ou congelada (BUCAK et al., 2008; SARIÖZKAN et al., 2009).

Porém, esse efeito não pôde ser notado no vigor espermático, onde somente o grupo Controle diferiu estatisticamente ( $p < 0,05$ ) dos demais. Ao contrário da motilidade, todos os grupos que tiveram adição de cisteína apresentaram valores semelhantes, e superiores ao grupo Controle, de vigor espermático. Sendo assim, esses resultados mostram que a adição de cisteína, nas concentrações utilizadas nesse estudo, promoveu melhora no vigor da célula espermática.

A cisteína promoveu, assim como na motilidade e vigor, melhora no potencial mitocondrial dos espermatozoides do sêmen fresco. Os tratamentos que tiveram adição do antioxidante apresentaram os maiores valores de células com alto potencial mitocondrial. Contudo, somente os grupos Cys5.0 e Cys7.5 diferiram estatisticamente ( $p < 0,05$ ) do grupo sem adição de cisteína. O grupo que teve adição de 7.5 mM de cisteína apresentou a maior porcentagem de espermatozoides com mitocôndrias ativas. Embora a adição de cisteína tenha melhorado o potencial mitocondrial dos espermatozoides, a concentração de 2.5 mM não foi suficiente para mostrar diferença estatística ( $p < 0,05$ ) em relação ao grupo Controle.

Essa diferença no potencial mitocondrial entre os grupos poderia explicar a diferença também na motilidade, uma vez que o axonema e as fibras densas da peça intermediária são cobertas por mitocôndrias que produzem ATP, utilizadas pelos espermatozoides como principal fonte de energia metabólica para o movimento espermático (MANELLA, 2000).

A mitocôndria é uma organela citoplasmática encontrada em todas as células dos mamíferos, sua função é transformar energia química em energia facilmente acessível à célula, acumulada principalmente em componentes como o trifosfato de adenosina (ATP) (CARVALHO & RIBEIRO, 2002). Assim, a atividade mitocondrial dos espermatozoides correlaciona-se direta e positivamente com a motilidade espermática (RUIZ-PESINI et al., 1998).

Sabe-se que a fosforilação oxidativa mitocondrial (produção de ATP) é dependente da integridade da membrana mitocondrial (ARMSTRONG et al., 1999). Assim, confirmando SARIÖZKAN et al. (2009), a cisteína pode ter influenciado a integridade funcional do axonema e mitocôndrias do sêmen fresco após duas horas de armazenamento na temperatura ambiente, mostrado pela maior proporção de espermatozoides com alto potencial mitocondrial e motilidade.

A adição de cisteína ao diluente do sêmen fresco não promoveu melhora nos valores para viabilidade espermática, mensurada através da porcentagem de espermatozoides vivos e mortos pelo teste de eosina-nigrosina. A célula espermática dos mamíferos contém uma alta proporção de ácidos graxos poli-insaturados. Essa composição lipídica da membrana espermática é um dos principais fatores que determina a viabilidade dos espermatozoides, que são

altamente susceptíveis aos danos causados pela peroxidação lipídica (BUCAK et al., 2008). Porém, sabendo que as células dos mamíferos podem utilizar a cisteína para aumentar a biossíntese de glutathione intracelular, protegendo os lipídios e proteínas da membrana celular, era de esperar que os grupos que tiveram adição de cisteína apresentassem maior quantidade de células vivas.

O armazenamento do sêmen resulta em queda da viabilidade, sendo que na temperatura de 15°C ocorre um declínio linear com o passar do tempo (O'HARA et al., 2010). PAULENZ et al. (2002), ao compararem as temperaturas de 5°C e 20°C para manutenção da viabilidade do sêmen ovino, também não encontraram diferenças quanto a integridade de membrana e acrossoma no teste hiposmótico com diferentes diluidores. Contudo, todos os parâmetros apresentaram redução ao longo do período de armazenamento.

Segundo ANEL et al. (2006), o sêmen mantido a temperatura de 15°C possui um tempo útil inferior, e para que tenha índices satisfatórios de prenhez, recomenda seu uso até oito horas após o processamento. De acordo com DECUADRO-HANSEN (2004), a temperatura de 4°C promove redução no metabolismo dos espermatozoides e economia das reservas energéticas, enquanto que a preservação do sêmen a 15°C mantém a atividade celular, tornando os espermatozoides mais sensíveis aos metabólicos tóxicos.

## **5.2 Sêmen refrigerado**

Para o sêmen refrigerado, não houve diferença ( $p>0,05$ ) entre o tratamento Cys5.0 e Cys7.5 para motilidade progressiva e vigor espermático, tanto no período de quatro como em oito horas de armazenamento, demonstrando que a concentração de 5.0 mM de cisteína é suficiente para minimizar a queda na motilidade progressiva no sêmen ovino diluído com Equimix® e refrigerado a 16°C. Em trabalhos realizados com sêmen congelado, a cisteína preveniu a queda da motilidade espermática em touros (BILODEAU et al., 2001; SARIÖZKAN et al., 2009), carneiros (UYSAL & BUCAK, 2007), bodes (BUCAK & UYSAL, 2008), javalis (KAEOKET et al., 2010) e cães (MICHAEL et al., 2007).

A motilidade progressiva do sêmen refrigerado a 16°C apresentou queda de 8 a 11,5% entre os tratamentos no armazenamento durante quatro e oito horas, corroborando os achados de PAULENZ et al. (2002), que encontraram queda de aproximadamente 15% na motilidade de sêmen ovino refrigerado a 20°C, ao longo de 30 horas utilizando um diluente a base de leite.

De acordo com PAULENZ et al. (2002), o sêmen ovino refrigerado sofre diminuição da motilidade em comparação ao sêmen fresco. Contudo, nesse trabalho verificou-se que o sêmen refrigerado, armazenado por quatro horas, apresentou resultados semelhantes com o sêmen fresco por duas horas, principalmente para o tratamento com adição de 5.0 mM de cisteína (Cys5.0), onde ambos tratamentos mostraram resultados iguais para motilidade progressiva e vigor espermático.

O diluente Equimix® (à base de leite desnatado e glicose) pode ter contribuído para minimizar a perda de motilidade e vigor do sêmen refrigerado. Segundo CARVALHO et al. (2008), o leite é um meio isotônico, contendo muitos componentes favoráveis à manutenção da viabilidade das células espermáticas. YÁNIZ et al. (2005) utilizando um diluente à base de leite, encontraram 73,94% de motilidade após duas horas de armazenamento à temperatura de 15°C, valor próximo ao grupo Cys7.5 (68,0%) após o dobro do tempo na mesma temperatura.

De acordo com os dados desse estudo, tanto o sêmen fresco mantido em temperatura ambiente, quanto o sêmen refrigerado a 16°C mostrou melhora significativa na motilidade com a adição de cisteína. No sêmen fresco a motilidade progressiva apresentou de 49,0% no grupo Controle a 73,5% no grupo Cys7.5, enquanto no sêmen refrigerado os valores do grupo Controle e Cys7.5 foram, respectivamente, 45,0 e 68,0% após quatro horas e 37,0 e 57,0% após oito horas de armazenamento.

Um minuto de contato entre os espermatozoides e espécies reativas ao oxigênio (ROS) é suficiente para induzir diminuição do vigor e motilidade espermática, sendo que longos tempos de exposição tornam os efeitos deletérios do ROS sobre a motilidade bastantes pronunciados e menos reversíveis, pois os ROS afetam o axonema e as fibras densas dos espermatozoides (LAMIRANDE & GAGNON, 1992). De acordo com SARIÖZKAN et al. (2009), a cisteína promove influência na integridade funcional do axonema e mitocôndrias, melhorando a

motilidade espermática, contudo a adição de cisteína não promoveu melhora no potencial mitocondrial no sêmen mantido a 16°C por quatro e oito horas, como ocorreu com o sêmen fresco.

Como o diluente utilizado no sêmen refrigerado contém glicose, essa pode ter sido utilizada pela célula espermática na produção de energia. Segundo (PUGLIESI, 2009) a adição de um constituinte energético, como glicose, pode ser uma opção para disponibilizar mais energia na forma de ATP e, assim, evitar a morte metabólica do espermatozoide, visto que essa é uma célula altamente catabólica após a ejaculação.

MUKAI & OKUNO (2004) avaliaram o papel da glicólise na produção de ATP em espermatozoides de camundongos. Segundo os pesquisadores, a glicólise ocorre ao longo de todo o comprimento da peça principal da cauda, sendo capaz de sintetizar ATP, contudo a sua eficiência de produção é bem inferior às mitocôndrias localizadas na peça intermediária. Foi demonstrado que na presença de glicose, o espermatozoide apresentou alta frequência de batimento flagelar com grande produção de ATP, mantendo sua motilidade por um longo tempo. De acordo com aqueles autores, a glicólise mostrou possuir um importante papel na manutenção da motilidade espermática em camundongos.

Os grupos que tiveram adição de cisteína também não diferiram do grupo sem adição de antioxidante (Controle) para os valores de viabilidade espermática, mensurada através da porcentagem de espermatozoides vivos e mortos. Os resultados mostram que o sêmen armazenado por quatro horas a 16°C apresentou valores bem semelhantes ao sêmen mantido em temperatura ambiente durante duas horas.

BUCAK & TEKIN (2007) também não encontraram diferença na viabilidade espermática de sêmen ovino adicionados com duas concentrações de taurina, glutatona e trealose, e armazenado durante seis horas a 5°C. Os valores variaram de 62,6 a 70,7%. Porém, o grupo que recebeu adição de 50 mM de trealose teve a menor queda na viabilidade durante 30 horas de armazenamento. Com isso, os autores concluíram que um agente estabilizante de membrana, como a trealose, é mais eficaz na proteção da membrana celular que agentes antioxidantes.

KASIMANICKAM et al. (2011) avaliaram o efeito de diluidores à base de gema de ovo, leite desnatado e extrato de soja sobre os parâmetros espermáticos de sêmen ovino armazenado a 4°C durante oito dias. Apesar dos diluidores à base de gema de ovo e extrato de soja terem promovido melhor proteção aos espermatozoides, todos ofereceram a mesma capacidade de preservar a qualidade espermática ao longo do tempo.

Em trabalho de MARTÍ et al. (2003), com sêmen ovino diluído com leite e gema de ovo, a atividade das enzimas antioxidantes glutathione redutase e superóxido dismutase manteve-se constante ou mesmo aumentada durante o armazenamento por seis horas a 15°C, demonstrando preservação dos sistemas naturais de defesa antioxidante.

Apesar de não mostrar diferença estatística ( $p>0,05$ ) na viabilidade entre os grupos do sêmen refrigerado a 16°C durante oito horas de armazenamento, o grupo Controle apresentou a menor porcentagem de células vivas frente aos grupos que tiveram adição de cisteína ao meio. Com o passar do tempo há queda na qualidade espermática devido aos efeitos deletérios das espécies reativas ao oxigênio (ROS), entretanto comparando-se o sêmen refrigerado a 16°C por oito horas ao sêmen armazenado na mesma temperatura por quatro horas, observou-se no grupo Controle maior redução na quantidade de espermatozoides vivos em relação aos grupos que tiveram adição do antioxidante.

Com isso, a adição de cisteína não promoveu a melhora na viabilidade espermática entre os tratamentos, porém, minimizou a morte celular ao longo do armazenamento do sêmen refrigerado a 16°C. Como o grupo Controle apresentou queda mais acentuada no número de espermatozoides vivos, principalmente em relação aos grupos Cys5.0 e Cys7.5, foi demonstrado que a cisteína embora não tenha melhorado a viabilidade, reduziu os danos a membrana celular ao longo do tempo, reduzindo a taxa de queda na morte celular entre quatro e oito horas.

O sistema antioxidante presente no plasma seminal desenvolve papel crucial na proteção espermática, uma vez que comparado com outros líquidos biológicos, contém significantes concentrações de antioxidantes (TAYLOR, 2001). Em ovinos já foram detectadas enzimas antioxidantes tanto no espermatozoide como no plasma seminal, como superóxido dismutase, catalase, glutathione

redutase e glutathione peroxidase (KASIMANICKAM et al., 2006; BUCAK et al., 2008; MARTÍ et al., 2008), além de componentes não enzimáticos como as vitaminas C e E, albumina, taurina e hipotaurina (SICHERLE et al., 2011).

Apesar desses antioxidantes presentes no plasma seminal protegerem o espermatozoide contra os danos oxidativos (AITKEN, 1995), a diluição do sêmen reduz a concentração desses antioxidantes naturais, por isso, adição de antioxidantes, mesmo que em pequenas concentrações, pode melhorar a função das células espermáticas durante a manipulação e armazenamento do sêmen (MAIA & BICUDO, 2009).

Assim, como o plasma seminal não foi retirado, esse pode ter promovido um efeito protetor sobre a viabilidade dos espermatozoides. O diluente Equimix<sup>®</sup> utilizado no sêmen refrigerado também pode ter promovido certo grau de proteção à membrana das células espermáticas, não mostrando diferença estatística entre os grupos experimentais ( $p>0,05$ ).

Embora a motilidade e vigor do espermatozoide seja utilizado como uns dos parâmetros de qualidade seminal (VALCÁRCEL et al., 1994), a capacidade de fertilização depende desses e de vários outros fatores, pois, para fecundar o ovócito a célula espermática deve apresentar além de motilidade progressiva, integridade das membranas plasmática e acrossomal (CARVALHO et al., 2002). De acordo com FLESH & GADELLA (2000), a manutenção da integridade da membrana plasmática é fundamental para a manutenção da viabilidade do espermatozoide no trato reprodutivo da fêmea e de sua capacidade de atingir o sítio de fertilização.

### **5.3 Sêmen congelado**

O sêmen congelado apresenta uma acentuada redução da fertilidade quando comparado ao sêmen fresco, uma vez que o processo de congelamento do sêmen leva a uma série de alterações celulares. A membrana do espermatozoide é uma das estruturas mais afetadas durante esse processo, especialmente a do carneiro que apresenta peculiaridades em sua composição, como alta taxa de ácidos graxos poli-insaturados e saturados e menor proporção



de colesterol e fosfolipídios que em outras espécies (EVANS & MAXWELL, 1987; BICUDO et al., 2007; ÇOYAN et al., 2011).

Segundo TONieto (2008), o principal efeito do congelamento provavelmente seja a alteração na permeabilidade da membrana plasmática, devido principalmente às alterações no estado físico dos lipídeos, que se associa com danos sub-letais na estrutura espermática. Sendo assim, a integridade da membrana plasmática é de suma importância para a manutenção do equilíbrio osmótico celular, pois atua como uma barreira entre os meios intra e extracelulares, protegendo o espermatozoide dos efeitos nocivos do meio. Qualquer alteração nessas membrana pode resultar em queda da homeostase, que resulta na perda das funções ou até mesmo na morte celular.

Essa porcentagem de células íntegras do grupo Controle corrobora com os achados de VALCÁRCEL et al. (1994), que encontraram 16,8% de espermatozoides com membrana intacta após o processo de congelação e descongelação de sêmen ovino diluído em meio à base de Tris, contendo gema de ovo e glicerol como crioprotetores. O Bovimix<sup>®</sup> utilizado nesse estudo para o congelamento do sêmen, também é um diluente à base de Tris, contendo glicerol e gema de ovo, por isso, o valor para espermatozoides íntegros do grupo Controle foi semelhante ao valor encontrado por VALCÁRCEL et al. (1994).

O grupo de espermatozoides com a membrana plasmática lesada e acrossomal íntegra (semi-lesados) apresentou os menores valores em relação aos espermatozoides com membranas íntegras e lesadas. Esse fato já foi citado por MAIA (2006), que demonstrou que a membrana acrossomal externa do espermatozoide ovino é mais resistente, ou menos susceptível, à crioinjúria do que a membrana plasmática.

TONieto (2008), comparou a gema de ovo, glicerol, LDL e trealose como crioprotetores para a congelação do sêmen ovino. Todos os grupos tinham um diluidor a base de Tris, sendo o T1 acrescido de 20% de gema de ovo e 110 mM de trealose, o T2 acrescido de 8% de LDL e 5% de glicerol e o T3 também com 8% de LDL e 110 mM de trealose. Os valores encontrados para espermatozoides com a membrana íntegra foram: 14,9; 22,9 e 24,9% (T1, T2 e T3, respectivamente). O autor associou o efeito crioprotetor da trealose com sua habilidade na preservação da integridade da membrana plasmática e a sua

potente ação antioxidativa, melhorando as condições do sêmen após o descongelamento.

Nesse estudo, o aumento de espermatozoides com membranas íntegras e redução de lesados e semi-lesados foi proporcional à adição de cisteína, ou seja, à medida que aumentou a concentração de cisteína no sêmen, ocorreu também o aumento da porcentagem de espermatozoides com membrana íntegra, e consequente redução de células espermáticas com membrana lesada e semi-lesada, mostrando que a cisteína promoveu uma melhora significativa na integridade das membranas, plasmática e acrossomal, confirmando seu efeito protetor sobre a membrana.

Um dos principais problemas na conservação de sêmen é o elevado conteúdo de ácido graxo insaturado da membrana dos espermatozoides, que tendem a ligar ao oxigênio, resultando na formação de numerosas ligações de peróxidos. A peroxidação lipídica induzida pela ROS prejudica diretamente os fosfolipídios das membranas celulares, podendo ocasionar a ruptura da membrana espermática e, consequente redução da capacidade de fertilização do sêmen (AURICH et al., 1997; SARLÓS et al., 2002).

Os antioxidantes podem inibir a peroxidação lipídica e essa proteção pode ser aumentada mediante o aumento da concentração dos antioxidantes adicionados ao sêmen (SARLÓS et al., 2002). Embora, nesse estudo a cisteína promoveu aumento na proporção de células com membrana íntegra, não se pode concluir que houve efeito sobre a integridade da membrana através da redução na produção de ROS, uma vez que essa variável não foi mensurada.

O processo de criopreservação acarreta estresse oxidativo à célula espermática, assim adiciona-se antioxidante para proteger o espermatozoide contra o dano induzido pelos radicais livres sobre a sua integridade estrutural e funcional, e interromper a reação em cadeia da peroxidação dos lipídios das membranas espermáticas (MAIA & BICUDO, 2009).

Além de influenciar a integridade da membrana plasmática, a adição de cisteína também promoveu influência sob a integridade da membrana acrossomal. Apesar de não haver diferença estatística entre os grupos experimentais, a adição de 7.5 mM de cisteína promoveu a maior porcentagem de

espermatozoides vivos com acrossoma íntegro e menor proporção de células espermáticas vivas com acrossoma reagido.

A membrana plasmática intacta e funcional é impermeável ao FITC-PNA, e nenhum sinal de fluorescência é observado. Quando o espermatozoide sofre reação acrossomal ocorrem pontos de fusão entre a membrana plasmática e a membrana acrossomal externa, resultando na formação de poros, que dão acesso ao fluorocromo às membranas acrossomais e a seu conteúdo. Pode-se considerar que o grupo de espermatozoides mortos com acrossoma reagido sofreram reação acrossomal falsa, pois, durante a morte celular podem ter sofrido alguma alteração na membrana, com perda de conteúdo acrossomal (ARRUDA et al., 2010).

A criopreservação pode antecipar a maturação das membranas espermáticas, aumentando a proporção de espermatozoides capacitados ou com reação acrossômica em comparação com o sêmen *in natura* (MAXWELL & WATSON, 1996), comprometendo, assim, a sobrevivência dos espermatozoides no trato reprodutivo feminino e limitando o tempo de vida dos gametas.

A capacitação espermática seguida da reação acrossomal são requisitos fundamentais no processo de fecundação (SILVA & GUERRA, 2012). Por isso, a integridade do acrossoma é fundamental para que ocorra a penetração do gameta masculino no interior da zona pelúcida e a fusão da membrana espermática com a membrana do oócito (FLESH & GADELLA, 2000). Vários estudos relatam correlação positiva entre a porcentagem de acrossomas intactos e a fertilidade (CORREA et al., 1997; SAMARDZIJA et al., 2006).

Enquanto o grupo Controle, Cys2.5 e Cys5.0 apresentou valores próximos de espermatozoides vivos com acrossoma reagido (4,0; 3,8 e 3,3%, respectivamente), o grupo Cys7.5 apresentou somente 1,8% de células com reação acrossomal. Deve-se considerar que se a reação acrossomal ocorrer prematuramente, ou seja, antes da ligação do espermatozoide à zona pelúcida, este perde suas enzimas acrossomais, perdendo assim sua capacidade de fertilização. Por isso, quanto maior a porcentagem de células com acrossoma íntegros melhor será a qualidade do sêmen, pois, maior será a quantidade de espermatozoides aptos a fertilizar (GADELLA et al., 2001).

Os resultados desse estudo mostraram que a cisteína quando adicionada na concentração de 7.5 mM ao meio de congelação Bovimix<sup>®</sup> resultou em melhora na qualidade do sêmen, pois esse antioxidante promoveu maior número de espermatozoides com a membrana íntegra e preveniu a capacitação acrossomal prematura.

Segundo MARTINEZ-PASTOR et al. (2004), a coloração JC-1 apresenta boa relação com a motilidade espermática, porém com baixa correlação, pois a motilidade dos espermatozoides não dependem somente do potencial mitocondrial, por isso, deve-se submeter a amostra a uma análise mais profunda, a fim de estabelecer a sua real relação com a qualidade do sêmen. Assim, o CASA tem sido um dos métodos mais utilizados para avaliação objetiva, principalmente por fornecer informações precisas e significativas da cinética espermática (MORTIMER, 1997).

Os resultados de motilidade desse estudo, mensuradas pelo CASA, corroboram com aqueles encontrados por SALAMON & MAXWELL (1995), que relataram queda de 40 a 60% na motilidade dos espermatozoides ovinos pós-descongelação, sendo que somente 20 a 30% deles permaneceram biologicamente inalterados. VALCÁRCEL et al. (1994) avaliando a integridade da membrana plasmática de espermatozoides de carneiros através das sondas CFDA e PI, verificaram que 40 a 50% dos espermatozoides eram móveis, mas, somente 17% apresentaram membrana plasmática intacta imediatamente após a descongelação.

Alterações na integridade mitocondrial representam uma das principais alterações sofridas pelos espermatozoides durante o processo de criopreservação, levando a perda de partes da sua estrutura e redução da produção energética, proporcionando queda da motilidade espermática no sêmen pós-descongelamento (WIDSOR, 1997; SCHOBBER et al., 2007). De acordo com NATH (1972), cerca de 40 a 50% dos espermatozoides apresentam danos mitocondriais após o processo de congelação e descongelação do sêmen.

O grupo Controle apresentou os menores valores para as variáveis amplitude lateral de cabeça (ALH), retilinearidade (STR) e linearidade (LIN), porém, os grupos experimentais não diferiram entre si ( $p>0,05$ ). Portanto, todos os grupos apresentaram o mesmo padrão de movimento. O ALH foi relatado

como um importante parâmetro na fertilização *in vitro* e na capacidade dos espermatozoides humanos em penetrar o muco cervical e se fundir com o oócito (VERSTEGEN et al., 2002). Segundo CELEGHINI (2005), entretanto, essa variável não é desejada, pois pode interferir na progressão dos espermatozoides.

Apesar da motilidade e potencial mitocondrial não apresentar diferença entre os grupos experimentais, a adição de 7.5 mM de cisteína proporcionou aumento na frequência de batimentos flagelar (BCF) dos espermatozoides. Essa diferença estatística observada no BCF pode ser atribuída à maior precisão do sistema computadorizado, que ocasionou em um baixo coeficiente de variação (2,17%) entre os grupos experimentais.

Os parâmetros cinéticos relatados pelo CASA ainda incluem a velocidade curvilínea (VCL), que é a velocidade média mensurada de ponto a ponto ao longo de toda a trajetória do espermatozoide, a velocidade de trajeto (VAP), que corresponde à velocidade média da trajetória resumida da célula, e a velocidade retilínea (VSL), representada pela velocidade média medida através de uma linha reta entre o ponto inicial e o final da trajetória do espermatozoide (VERSTEGEN et al., 2002).

ÇOYAN et al. (2011) avaliaram a adição de cisteína e ergotioneína sobre os parâmetros cinéticos de sêmen de carneiros congelado com diluidor a base de Tris, gema de ovo e glicerol. O grupo que recebeu adição de 1 mM de ergotioneína apresentou valores superiores de velocidade de trajeto (VAP), velocidade retilínea (VSL) e velocidade curvilínea (VCL), em relação ao grupo controle (117,0 vs 109,7; 103,7 vs 97,6 e 200,8 vs 183,1; respectivamente). Apesar da ergotioneína ter promovido melhora nesses parâmetros, esse efeito não pôde ser visto nos grupos que receberam adição de 1, 2 e 4 mM de cisteína, melhorando somente a amplitude lateral de cabeça (ALH) em relação ao grupo sem adição de antioxidante (Controle).

Nesse estudo o aumento na velocidade de trajeto, velocidade retilínea, velocidade curvilínea e frequência de batimentos foi proporcional ao aumento na concentração de antioxidante adicionado ao sêmen antes do processo de criopreservação. A cisteína não mostrou diferença na motilidade total e progressiva, porém, promoveu aumento na velocidade de deslocamento dos espermatozoides.

Conforme KATHIRAVAN et al. (2008), a velocidade de trajeto (VAP) e velocidade retilínea (VSL) podem ser utilizadas como parâmetros para estimar a fertilidade de amostras seminais pois apresentam forte correlação positiva com a fertilidade. Assim, embora algumas características do movimento espermático sejam importantes para os espermatozoides serem capazes de fertilizar o oócito, ainda não está totalmente claro quais características desse movimento avaliadas pelo CASA são de valor clínico para prever as taxas de fertilidade e fertilização (VERSTEGEN et al., 2002).

A própria cérvix representa um fator limitante na migração dos espermatozoides da vagina até o útero, e, por conter o muco cervical, constitui a primeira barreira no trânsito espermático (DRUART et al., 2009). Vários parâmetros são mensurados visando encontrar aqueles que melhor representam a real capacidade do espermatozoide em migrar através do trato reprodutivo feminino até o local de fertilização.

ROBAYO et al. (2008) avaliaram a correlação da cinética espermática computadorizada sob a migração de espermatozoides de carneiros através do muco cervical de ovelhas, cabras e vacas. Esses autores identificaram que as células espermáticas ovinas que apresentaram maiores valores de VCL, VAP, VSL, ALH e LIN foram mais eficientes na migração pelo muco cervical, observando uma correlação positiva entre VCL e VAP na migração dos espermatozoides através do muco cervical de ovelhas em estro. A velocidade retilínea (VSL) foi apontada por GILLAN et al. (2008), como importante fator na capacidade dos espermatozoides bovinos em se mover através do trato reprodutivo feminino, avaliada por meio de ensaio de penetração em muco cervical.

Em estudo de VERSTEGEN et al. (2002), amostras que tiveram mais de 50% dos oócitos fertilizados resultaram de sêmen com valores significativamente maiores de VAP, VSL e VCL em relação aquelas amostras que apresentaram menos de 50% dos oócitos fertilizados, observando correlação positiva entre motilidade progressiva, velocidade curvilínea e fecundidade, embora, segundo os autores a velocidade curvilínea já seja um bom parâmetro para prever a fertilidade. Altos valores de motilidade e velocidade espermática sugerem integridade estrutural das mitocôndrias e cauda dos espermatozoides,

mantendo a atividade metabólica da célula. A relação entre a fertilização e porcentagem destes parâmetros mostra que os espermatozoides ativos metabolicamente possuem maior potencial de penetração no oócito (KATHIRAVAN et al., 2008).

Nos espermatozoides a fosforilação oxidativa é um meio mais eficiente de geração de energia que a glicólise, no entanto estudos recentes sugerem que a glicólise é uma via importante para gerar ATP nas células espermáticas, uma vez que não está totalmente claro que o ATP pode difundir suficientemente para os segmentos distais da cauda a partir da peça intermediária (NASCIMENTO et al., 2008). Como a adição de cisteína no meio de congelamento promoveu maior proteção à membrana plasmática, isso pode ter ocasionado em maior integridade metabólica à célula espermática, resultando em maior velocidade de deslocamento destas células devido à maior eficiência de utilização da energia produzida.

Embora a adição de 7.5 mM de cisteína tenha promovido aumento nos parâmetros de velocidade, seria necessário testes *in vitro* e *in vivo* para concluir com clareza que o antioxidante proporciona maior deslocamento dos espermatozoides no sistema reprodutor feminino e aumento na capacidade de fertilização. Na ovinocultura, a inseminação artificial cervical com sêmen congelado é marcada por apresentar baixas taxas de prenhez, apresentando resultados satisfatórios de fertilização somente quando o sêmen é depositado diretamente no útero através de laparoscopia (LIMA et al., 2010).

O aumento na capacidade de deslocamento dos espermatozoides com maior proteção à membrana plasmática pode ser um fator primordial na melhora dos índices reprodutivos frente as barreiras enfrentadas pelos espermatozoides.

## 6 CONCLUSÃO

A adição de 7.5 mM de cisteína ao meio de diluição acarretou em melhora na motilidade espermática e proporção de espermatozoides com alto potencial mitocondrial no sêmen ovino mantido em temperatura ambiente durante duas horas. Entretanto, no sêmen ovino armazenado até oito horas à 16°C, 5.0 mM de cisteína foi suficiente para manter a motilidade e o vigor espermático.

A concentração de 7.5 mM de cisteína adicionada ao meio de congelamento promoveu aumento na porcentagem de espermatozoides com membrana plasmática íntegra após o processo de congelação e descongelação, comprovando o efeito protetor da cisteína sobre a membrana espermática.

Embora a adição de cisteína ao meio tenha melhorado os parâmetros de velocidade de deslocamento dos espermatozoides, recomenda-se a realização de estudos complementares *in vivo* para avaliar o real benefício desse antioxidante sobre os índices reprodutivos em programas de inseminação artificial com sêmen fresco, refrigerado e congelado.



## REFERÊNCIAS

1. AITKEN, R. J. Free radicals, lipid peroxidation and sperm function. **Reproduction, Fertility and Development**, Melbourne, v. 7, p. 659-668, 1995.
2. ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. Membrane structure. In: ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. **Molecular Biology of The Cell**, Nova York: Garland Science, Taylor & Francis Group, 2008a. p. 617-650.
3. ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. Sexual reproduction: meiosis, germ cells, and fertilization. In: ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. **Molecular Biology of The Cell**, Nova York: Garland Science, Taylor & Francis Group, 2008b. p. 1269-1304.
4. ANDRADE, E. R.; MELO-STERZA, F. A.; SENEDA, M. M.; ALFIERI, A. A. Consequências da produção das espécies reativas de oxigênio na reprodução e principais mecanismos antioxidantes. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 34, n. 2, p. 79-85, 2010.
5. ANEL, L.; ALVAREZ, M.; MARTINEZ-PASTOR, F.; GARCIA-MACIAS, V.; ANEL, E.; PAZ, P. Improvement strategies in ovine artificial insemination. **Reproduction in Domestic Animals**, Berlin, v. 41, supl. 2, p. 30-42, 2006.
6. ARAV, A.; YAVIN, S.; ZERON, Y.; NATAN, D.; DEKEL, I.; GACITUA, H. New trends in gamete's cryopreservation. **Molecular and Cellular Endocrinology**, Limerick, v. 187, p. 77-81, 2002.
7. ARMSTRONG, J. S.; RAJASEKARAN, M.; CHAMULITRAT, W.; GATTI, P.; HELLSTROM, W. J.; SIKKA, S. C. Characterization of reactive oxygen species induced effects on human spermatozoa movement and energy metabolism. **Free Radical Biology and Medicine**, New York, v. 26, n.7-8, p. 869-880, 1999.
8. ARRUDA, R. L.; ORRO, I. R.; PASSOS, T. S.; COSTA E SILVA, E. V.; ZÚCCARI, C. E. S. N. Técnicas para avaliação laboratorial da integridade estrutural e funcional do sêmen congelado de touros. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 34, n. 3, p. 168-184, 2010.
9. AURICH, J. E.; SCHÖNHERR, U.; HOPPE, H.; AURICH, C. Effects of antioxidants on motility and membrane integrity of chilled-stored stallion semen. **Theriogenology**, Stoneham, v. 48, p. 185-192, 1997.
10. BICUDO, S. D.; AZEVEDO, H. C.; SILVA MAIA, M. S.; SOUSA, D. B.; RODELLO, L. Aspectos peculiares da inseminação artificial em ovinos. **Acta Scientiae Veterinariae**, Porto Alegre, v. 33, supl. 1, p. 127-130, 2005.

11. BICUDO, S. D.; AZEVEDO, H. C.; MAIA, S. M.; GREEN, R. E.; RODELLO, L.; MEIRA, C. Avanços na criopreservação do sêmen ovino visando sua aplicação em programas de inseminação artificial e em biotecnologias com embriões. **Acta Scientiae Veterinariae**, Porto Alegre, v. 35, sup. 3, p. 787-798, 2007.
12. BILODEAU, J. F.; BLANCHETTE, S.; GAGNON, I. C.; SIRARD, M. A. Thiols prevent H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-mediated loss of sperm motility in cryopreserved bull semen. **Theriogenology**, Stoneham, v. 56, p. 275-286, 2001.
13. BUCAK, M. N.; TEKIN, N. Protective effect of taurine, glutathione and trehalose on the liquid storage of ram semen. **Small Ruminant Research**, Amsterdam, v. 37, p. 103-108, 2007.
14. BUCAK, M. N.; ATEŞŞAHIN, A.; YÜCE, A. Effect of anti-oxidants and oxidative stress parameters on ram semen after the freeze-thawing process. **Small Ruminant Research**, Amsterdam, v. 75, p. 128-134, 2008.
15. BUCAK, M. N.; UYSAL, O. The role of antioxidants in freezing of saanen goat semen. **Indian Veterinary Journal**, Madras, v. 85, p. 148-150, 2008.
16. BUCAK, M. N.; SARIÖZKAN, S. TUNCER, P. B.; ULUTAS, P. A.; AKÇADAG, H. I. Effect of antioxidants on microscopic semen parameters, lipid peroxidation and antioxidant activities in Angora goat semen following cryopreservation. **Small Ruminant Research**, Amsterdam, v. 81, p. 90-95, 2009.
17. 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. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 35, n. 1, p. 33-40, 2011.
18. CARVALHO, O. F.; FERREIRA, J. D. J.; SILVEIRA, N. A.; FRENEAU, G. E. Efeito oxidativo do óxido nítrico e infertilidade no macho. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, Rio de Janeiro, v. 38, n. 1, 2002.
19. CARVALHO, M. F. P.; RIBEIRO, F. A. Q. As deficiências auditivas relacionadas às alterações do DNA mitocondrial. **Revista Brasileira de Otorrinolaringologia**, Rio de Janeiro, v. 68, n. 2, p. 268-275, 2002.
20. CARVALHO, F. P.; SILVA, J. F. S.; SOUZA, G. V.; QUIRINO, C. R.; CARVALHO, C. S. P. Diferentes diluentes sobre a motilidade e integridade de membrana plasmática após o congelamento e descongelamento. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, Salvador, v. 9, n. 3, p. 612-620, 2008.

21. CELEGHINI, E. C. C. **Efeitos da criopreservação do sêmen bovino sobre as membranas plasmática, acrossomal e mitocondrial e estrutura da cromatina dos espermatozoides utilizando sondas fluorescentes.** 2005. 186 p. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária). Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – Universidade de São Paulo, São Paulo.
22. CELEGHINI, E. C. C.; NASCIMENTO, J.; RAPHAEL, C. F.; ANDRADE, A. F. C.; ARRUDA, R. P. Simultaneous assessment of plasmatic, acrosomal, and mitochondrial membranes in ram sperm by fluorescent probes. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 62, n. 3, p. 536-543, 2010.
23. COLÉGIO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL – CBRA. **Manual de exame andrológico e avaliação de sêmen animal.** 2 ed., Belo Horizonte: CBRA, 1998. 49p.
24. CORREA, J. R.; PACE, M. M.; ZAVOS, P. M. Relationships among frozen-thawed sperm characteristics assessed via the routine semen analysis, sperm functional tests and fertility of bulls in an artificial insemination program. **Theriogenology**, Stoneham, v. 48, p. 721-731, 1997.
25. ÇOYAN, K.; BAŞPINAR, N.; BUCAK, M. N.; AKALIN, P. P. Effects of cysteine and ergothioneine on post-thawed Merino ram sperm and biochemical parameters. **Cryobiology**, San Diego, v. 63, p. 1-6, 2011.
26. DECUADRO-HANSEN, G. La réfrigération et La congélation du sperme: expérience chez l'animal chilled and frozen semen: the animal experience. **Gynécologie, Obstétrique & Fertilité**, Paris, v. 32, p. 887-893, 2004.
27. DOTT, H. M.; FOSTER, G. C. A technique for studying the morphology of mammalian spermatozoa which are eosinophilic in a differential "live/dead" stain. **Journal of Reproduction and Fertility**, Cambridge, v. 29, p. 443-445, 1972.
28. DRUART, X. COGNIÉ, J. BARIL, G. CLÉMENT, F. DACHEUX, J. GATTI J. *In vivo* imaging of *in situ* motility of fresh and liquid stored ram spermatozoa in the ewe genital tract. **Reproduction**, Cambridge, v. 138, p. 45-53, 2009.
29. EDDY, E. M.; TOSHIMORI, K.; O'BRIEN, D. A. Fibrous sheath of mammalian spermatozoa. **Microscopy Research and Technique**, New York, v. 61, p. 103-115, 2003.
30. EDDY, E. M. The spermatozoa. In: **Knobil and Neill's: The Physiology of Reproduction.** 3rd edition, San Diego: Elsevier, Inc. 2006. p. 3-5.

31. EVANS, G.; MAXWELL, W. M. C. **Salamon's artificial insemination of sheep and goats**, Butterworths & Co. Ltd., Londres, 1987, 194 p.
32. FLESH, F. D.; GADELLA, B. M. Dynamics of the mammalian sperm plasma membrane in the process of fertilization. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 1469, p. 197-235, 2000.
33. GADELLA, B.; RATHI, R.; BROUWES, J. F.; STOUT, T. A.; COLENBRANDER, B. Capacitation and the acrosome reaction in equine sperm. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 68, p. 249-265, 2001.
34. GATTI, J. L.; CASTELLA, S.; DACHEUX, F. ECROYD, H.; MÉTAYER, S.; THIMON, V.; DACHEUX, J. L. Post-testicular sperm environment and fertility. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 82-83, p. 321-339, 2004.
35. GILLAN, L.; KROETSCH, T.; CHIS MAXWELL, W. M.; EVANS, G. Assessment of *in vitro* sperm characteristics in relation to fertility in dairy bulls. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 103, p. 201-214, 2008.
36. GONÇALVES, P. B. D.; FIGUEIREDO, J. R.; FREITAS, V. J. F. **Biotécnicas aplicadas à reprodução animal**. São Paulo: Livraria Varela, 2001. 340 p.
37. HAFEZ, B.; HAFEZ, E. S. E. **Reprodução Animal**. 7. ed., Barueri-SP: Manole, 513p, 2004.
38. HARRISON, R. A. P.; VICKERS, S. E. Use of fluorescent probes to assess membrane integrity in mammalian spermatozoa. **Journal of Reproduction and Fertility**, Cambridge, v. 88, p. 343-352, 1990.
39. HRUDKA, F. Cytochemical and ultracytochemival demonstration of cytochrome c oxidase in spermatozoa and dynamics of its changes accompanying ageing or induced by stress. **International Journal of Andrology**, Lawrence, v. 10, n. 6, p. 809-828, 1987.
40. IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Pecuária 2011**. Disponível em <<http://www.ibge.gov.br/estadosat/index.php>> Acesso em: julho de 2013.
41. JOHNSTON, S. D.; KUSTRITZ, M. V. R.; OLSON, P. N. S. Sexual differentiation and normal anatomy of the dog. In: JOHNSTON, S. D.; KUSTRITZ, M. V. R.; OLSON, P. N. S. **Canine and feline theriogenology**. Philadelphia: W. B. Saunders Company, 2001. v. 1, p. 275-286.
42. KAEOKET, K.; CHANAPIWAT, P.; TUMMARUK, P.; TECHAKUMPHU, M. Supplemental effect of varying L-cysteine concentrations on the quality of cryopreserved boar semen. **Asian Journal of Andrology**, Beijing, v. 12, p. 760-765, 2010.

43. KASIMANICKAM, R.; PELZER, K. D.; KASIMANICKAM, V.; SWECKER, W. S.; THATCHER, C. D. Association of classical semen parameters, sperm DNA fragmentation index, lipid peroxidation and antioxidant enzymatic activity of semen in ram-lambs. **Theriogenology**, Stoneham, v. 65, p. 1407-1421, 2006.
44. KASIMANICKAM, R.; KASIMANICKAM, V.; TIBARY, A.; PELZER, K. Effect of semen extenders on sperm parameters of ram semen during liquid storage at 4°C. **Small Ruminant Research**, Amsterdam, v. 99, p. 208-213, 2011.
45. KATHIRAVAN, P.; KALATHARAN, J.; EDWIN, M. J.; VEERAPADIAN, C. Computer automated motion analysis of crossbred bull spermatozoa and its relationship with in vitro fertility in zona-free hamster oocytes. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 104, p. 9-17, 2008.
46. KLINC, P.; RATH, D. Reduction of oxidative stress in bovine spermatozoa during flow cytometric sorting. **Reproduction in Domestic Animals**, Berlin, v. 42, p. 63-67, 2007.
47. KUDRYAVTSEV, I. V.; SAFRONOVA, L. D.; KUDRYAVTSEV, P. I. Genetic control of spermatogenesis and sex determination in mammals. **Russian Journal of Developmental Biology**, v. 34, n. 6, p. 337-346, 2003.
48. KUMAR, S.; MILLAR, J. D.; WATSON, P. F. The effect of cooling rate on the survival of cryopreserved bull, ram, and boar spermatozoa: a comparison of two controlled-rate cooling machines. **Cryobiology**, San Diego, v. 46, p. 246-253, 2003.
49. LAMIRANDE, E.; GAGNON, C. Reactive oxygen species and human spermatozoa I. Effects on the motility of intact spermatozoa and on sperm axonemes. **Journal of Andrology**, Lawrence, v. 13, n. 5, p. 368-378, 1992.
50. LEBOEUF, B.; RESTALL, B.; SALAMON, S. Production and storage of goat semen for artificial insemination. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 62, p. 113-141, 2000.
51. LIMA, L. F.; MOURA, P.; PASSOS, P. I. B.; LEAL, D. R.; RUMPF, R.; NEVES, J. P. Influência de sistemas de refrigeração sobre a qualidade do sêmen ovino criopreservado em palhetas. **Ciência Animal Brasileira**, Goiânia, v. 11, n. 4, p. 835-844, 2010.
52. MACHADO, V. P.; NUNES, J. F.; ARAÚJO, A. A.; FERNANDES, D. R. P.; CORDEIRO, M. A.; MEDEIROS, C. H. N.; MEDEIROS, A. L. N.; MONTEIRO, A. W. U. Fertilidade após a inseminação artificial intra-uterina de ovelhas utilizando diluidores à base de água de coco. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, São Paulo, v. 43, supl 1, p. 43-49, 2006.
53. MAIA, M. S. **Viabilidade espermática e geração de metabólitos reativos do oxigênio (ROS) no sêmen ovino criopreservado em diluidor aditivado**

- de lauril sulfato de sódio (OEP), trolox-C e catalase.** 2006. 165 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária). Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – Universidade Estadual Paulista, Botucatu.
54. MAIA, M. S.; BICUDO, S. D.; AZEVEDO, H. C. A.; SOUSA, D. B.; RODELLO, L.; MEIRA, C. Efeito da adição de lauril sulfato de sódio (OEP) ao diluidor na viabilidade do sêmen congelado de ovinos Santa Inês. **Veterinária e Zootecnia**. Botucatu, v. 15, n. 3, p. 521-530, 2008.
  55. MAIA, M. S.; BICUDO, S. D. Radicais livres, antioxidantes e função espermática em mamíferos: uma revisão. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 33, n. 4, p. 183-193, 2009.
  56. MAIA, M. S.; MEDEIROS, I. M.; LIMA, C. A. C. Características reprodutivas de carneiros no Nordeste do Brasil: parâmetros seminais. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 35, n. 2, p. 175-179, 2011.
  57. MANELLA, C. A. Introduction: our changing views of mitochondria. **Journal of Bionergetics and Biomembranes**, New York, v. 32, p. 1-4, 2000.
  58. MARTÍ, J. I.; MARTÍ, E.; CEBRIÁN-PÉREZ, J. A.; MUIÑO-BLANCO, T. Survival rate and antioxidant enzyme activity of ram spermatozoa after dilution with different extenders or selection by a dextran swim-up procedure. **Theriogenology**, Stoneham, v. 60, p. 1025-1037, 2003.
  59. MARTÍ, E.; MARTI, J. I.; MUIÑO-BLANCO, T.; CEBRIÁN-PÉREZ, J. A. Effect of the cryopresrvation process on the activity and immunolocalization of antioxidant enzymes in ram spermatozoa. **Journal of Andrology**, Lawrence, v. 29, p. 459-467, 2008.
  60. MARTINEZ-PASTOR, F.; JOHANNISSON, A.; GIL, J.; KAABI, M.; ANEL, L.; PAZ, P.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Use of chromatin stability assay, mitochondrial stain JC-1, and fluorometric assessment of plasma membrane to evaluate frozen-thawed ram semen. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 84, p. 121-133, 2004.
  61. MARTINS, C. F.; DODE, M. N.; GUIMARÃES JÚNIOR, R.; BÁO, S. N.; SERENO, J. R. B.; RUMPF, R. Conservação de espermatozóides bovinos por liofilização (frezze-drying). Brasília, Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária: Embrapa Cerrados, 2008. 30 p. **Documentos**, 216.
  62. MAWHINNEY, M.; MARIOTTI, A. Physiology, pathology and pharmacology of the male reproductive system. **Periodontology** 2000, Copenhagen, v. 61, p. 232-251, 2013.
  63. MAXWELL, W. M. C.; WATSON, P. F. Recent progress in the preservation of ram semen. **Animal reproduction science**, Amsterdam, v. 42, p. 55-65, 1996.

64. MEDEIROS, C. M. O.; FORELL, F.; OLIVEIRA, A. T. D.; RODRIGUES, J. L. Current status of sperm cryopreservation: why isn't it better?. **Theriogenology**, Stoneham, v. 57, p. 327-344, 2002.
65. MICHAEL, A.; ALEXOPOULOS, C.; PONTIKI, E.; HADJIPAVLOU-LITINA, D.; SARATSIS, P.; BOSCO, C. Effect of antioxidante supplementation on sêmen quality and reactive oxygen species of frozen-thawed canine spermatozoa. **Theriogenology**, Stoneham, v. 68, p. 204-212, 2007.
66. MICHAEL, A. J.; ALEXOPOULOS, C.; PONTIKI, E. A.; HADJIPAVLOU-LITINA, D. J.; SARATSIS, P.; VERVERIDIS, H. N.; BOSCO, C. M. Effect of N-acetyl-L-cysteine supplementation in semen extenders on semen quality and reactive oxygen species of chilled canine spermatozoa. **Reproduction in Domestic Animals**, Berlin, v. 45, p. 201-207, 2010.
67. MORTIMER, S. T. A critical review of the physiological importance and analysis of sperm movement in mammals. **Human Reproduction Update**, Oxford, v. 3, n. 5, p. 403-439, 1997.
68. MOURA, A. A.; ANDRADE, C. R.; SOUZA, C. E. A.; RÊGO, J. P. A.; MARTINS, J. A. M.; OLIVEIRA, R. V.; MENEZES, E. B. S. Proteínas do plasma seminal, funções espermáticas e marcadores moleculares da fertilidade. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 35, n. 2, p. 139-144, 2011.
69. MOURA, P. P.; FRANCO, M. M.; SILVA, T. A. S. N.; ROCHA, T. L. R.; LEAL, D. R.; PASSOS, P. I. B.; NEVES, J. P. Caracterização de proteínas do plasma seminal e sua relação com parâmetros de qualidade do sêmen criopreservado em ovinos. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 40, n. 5, p. 1154-1159, 2010.
70. MUKAI, C.; OKUNO, M. Glycolysis plays a major role for adenosine triphosphate supplementation in mouse sperm flagellar movement. **Biology of Reproduction**, Champaign, v. 71, p. 540-547, 2004.
71. NASCIMENTO, J. M.; SHI, L. Z.; TAM, J.; CHANDSAWANGBHUWANA, C.; DURRANT, B.; BOTVINICK, E. L.; BERNS, M. W. Comparison of Glycolysis and oxidative phosphorylation as energy sources for mammalian sperm motility, using the combination of fluorescence imaging, laser tweezers, and real-time automated tracking and trapping. **Journal Cellular Physiology**, Philadelphia, v. 217, p. 745-751, 2008.
72. NATH, J. Correlative biochemical and ultrastructural studies on the mechanism of freezing damage to ram semen. **Cryobiology**, San Diego, v. 9, p. 240-246, 1972.

73. NORDBERG, J.; ARNÉR, E. S. J. Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. **Free Radical Biology & Medicine**, New York, v. 31, n. 11, p. 1287-1312, 2001.
74. O'HARA, L.; HANRAHAN, J. P.; RICHARDSON, L.; DONOVAN, A.; FAIR, S.; EVANS, A. C. O.; LONERGAN, P. Effect of storage duration, storage temperature, and diluent on the viability and fertility of fresh ram sperm. **Theriogenology**, Stoneham, v. 73, p. 541-549, 2010.
75. PAULENZ, H.; SÖDERQUIST, L.; PÉREZ-PÉ, R.; BERG, K. A. Effect of different extenders and storage temperatures on sperm viability of liquid ram semen. **Theriogenology**, Stoneham, v. 57, p. 823-836, 2002.
76. PETIT, F. M.; SERRES, C.; BOURGEON F.; PINEAU, C.; AUER, J. Identification of sperm head proteins involved in zona pellucida binding. **Human Reproduction**, Oxford, v. 0, n. 0, p. 1-14, 2013.
77. PUGLIESI, G. **Viabilidade e fertilidade do sêmen equino resfriado a 5°C por 24 horas com dois diluidores**. 2009. 103 f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.
78. R Core Team (2013). R: A language and environment for statistical computing. **R Foundation for Statistical Computing**, Viena, Austria.
79. RICARTE, A. R. F.; SILVA, A. R. Morfofisiologia da reprodução de caprinos: revisão. **Acta Veterinaria Brasilica**, Mossoró, v. 4, supl. 1, p. 8-13, 2010.
80. ROBAYO, I.; MONTENEGRO, V.; VALDÉS, C.; COX, J. F. CASA assessment of kinematic parameters of ram spermatozoa and their relationship to migration efficiency in ruminant cervical mucus. **Reproduction in Domestic Animals**, Berlin, v. 43, p. 393-399, 2008.
81. RODELLO, L. **Validação de sistema automatizado de refrigeração e congelação de sêmen ovino**. 2006. 70 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.
82. RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, H.; SARAVIA, F.; WALLGREN, M.; TIENTHAI, P.; JOHANNISSON, A.; VÁZQUEZ, J. M.; MARTÍNEZ, E.; ROCA, J.; SANZ, L.; CALVETE, J. J. Boar spermatozoa in the oviduct. **Theriogenology**, Stoneham, v. 63, p. 514-535, 2005.
83. ROJERO, R. D. M.; REYNA-SANTAMARIA, L.; MICHEL-ACEVES, A. C.; MASTACHE-LAGUNAS, A. A.; HERNANDEZ-IGNACIO, J.; ROJAS-MAYA, S. Cervical or intrauterine artificial insemination in pelibuey ewes, with chilled semen. **Journal of Animal and Veterinary Advances**, Faisalabad, v. 8, n. 12, p. 2621-2625, 2009.



84. RUIZ, L. G.; SANTIANI, A. A.; SANDOVAL, R. M.; HUANCA, W. L.; DELGADO, A. C.; CORONADO, L. S.; ALZAMORA, C. P. Efecto de dos antioxidantes (tempo y tempol) en La criopreservación de semen ovino empleando un dilutor en base a tris. **Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú**, Lima, v. 18, n. 2, p. 99-106, 2007.
85. RUIZ-PESINI, E.; DIEZ, C.; LAPEÑA, A. C.; PÉREZ-MARTOS, A.; MONTOYA, J.; ALVAREZ, E.; ARENAS, J.; LÓPEZ-PÉREZ, M. J. Correlation of sperm motility with mitochondrial enzymatic activities. **Clinical Chemistry**, Baltimore, v. 44, n. 8, p. 1616-1620, 1998.
86. SALAMON, S.; MAXWELL, W. M. C. Frozen storage of ram semen II. Causes of low fertility after cervical insemination and methods of improvement. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 38, p. 1-36, 1995.
87. SALAMON, S.; MAXWELL, W. M. Storage of ram semen. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 62, p. 77-111, 2000.
88. SAMARDZIJA, M.; KARADJOLE, M.; MATKOVIC, M.; CERGOLJ, M.; GETZ, I.; DOBRANIC, T.; TOMASKOVIC, A.; PETRIC, J.; SURINA, J.; GRIZELJ, J.; KARADJOLE, T. A comparison of BoviPure<sup>®</sup> and Percoll<sup>®</sup> on bull sperm separation protocols for IVF. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 91, n. 3-4, p. 237-247, 2006.
89. SARIÖZKAN, S.; BUCAK, M. N.; TUNCER, P. B.; ULUTAŞ, P. A.; BILGEN, A. The influence of cysteine and taurine on microscopic-oxidative stress parameters and fertilizing ability of bull semen following cryopreservation. **Cryobiology**, San Diego, v. 58, p. 134-138, 2009.
90. SARLÓS, P.; MOLNÁR, A.; MÓKAI, M.; GÁBOR, G. Y.; RÁTKY, J. Comparative evaluation of the effect of antioxidants in the conservation of ram semen. **Acta Veterinaria Hungarica**, Budapest, v. 50, n. 2, p. 235-245, 2002.
91. SCHOBER, D.; AURICH, C.; NOHL, H.; GILLE, L. Influence of cryopreservation on mitochondrial functions in equine spermatozoa. **Theriogenology**, Stoneham, v. 68, p. 745-754, 2007.
92. SICHERLE, C. C.; MAIA, M. S.; BICUDO, S. D.; RODELLO, L.; AZEVEDO, H. C. Lipid peroxidation and generation of hydrogen peroxide in frozen-thawed ram semen supplemented with catalase or Trolox. **Small Ruminant Research**, Amsterdam, v. 95, p. 144-149, 2011.
93. SILVA, E. C. B.; GUERRA, M. M. P. Sondas fluorescentes: um avanço na avaliação da integridade estrutural e funcional de espermatozoides. **Revista de Ciências Agroveterinárias**, Lages, v. 11, n. 2, p. 162-169, 2012.

94. SILVA, L. D. M.; SILVA, A. R.; CARDOSO, R. C. S. Inseminação artificial em cães. In: GONÇALVES, P. B. D.; FIGUEIREDO, J. R.; FREITAS, U. J. F. **Biotécnicas aplicadas à reprodução animal**. São Paulo: Livraria Varela, 2002, p. 69-95.
95. SORIO, A. **Sistema agroindustrial da carne ovina**: o exemplo de Mato Grosso do Sul. Ed. Méritos, Passo Fundo, 2009. 109 p.
96. SOUSA, B. P. A.; ANDRADE, J. C. O.; WISCHRAL, A.; GUERRA, M. M. P. Viabilidade *in vitro* de células espermáticas ovinas submetidas a diferentes diluentes e a refrigeração. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 62, n. 3, p. 528-535, 2010.
97. SUAREZ, S. S.; PACEY, A. A. Sperm transport in the female reproductive tract. **Human Reproduction Update**, Oxford, v. 12, p. 23-37, 2006.
98. TAYLOR, C. T. Antioxidants and reactive oxygen species in human fertility. **Environmental Toxicology Pharmacology**, Amsterdam, v. 10, p. 189-198, 2001.
99. TONIETO, R. A. **Uso de diferentes crioprotetores em diluentes para sêmen ovino congelado**. 2008. 53 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.
100. TOSHIMORI, K. Biology of spermatozoa maturation: an overview with an introduction to this issue. **Microscopy Research and Technique**, New York, v. 61, p. 1-6, 2003.
101. TUNCER, P. B.; BUCAK, M. N.; BÜYÜKLEBLEBICI, S.; SARIÖZKAN, S.; YENİ, D.; EKEN, A.; AKALIN, P. P.; KINET, H.; AVDATEK, F.; FIDAN, A. F.; GÜNDOĞAN, M. The effect of cysteine and glutathione on sperm and oxidative stress parameters of post-thawed bull semen. **Cryobiology**, San Diego, v. 61, p. 303-307, 2010.
102. UYSAL, O.; BUCAK, M. N. Effect of oxidized glutathione, bovine serum albumin, cysteine and lycopene on the quality of frozen thawed ram semen. **Acta Veterinaria**, Brno, v. 76, p. 383–390, 2007.
103. VALCÁRCEL, A.; HERAS, M. A.; PÉREZ, L.; MOSES, D. F.; BALDASSARRE, H. Fluorescent staining as a method of assessing membrane damage and post-thaw survival of ram spermatozoa. **Theriogenology**, Stoneham, v. 41, p. 483-489, 1994.
104. VERSTEGEN, J.; IGUER-OUADA, M.; ONCLIN, K. Computer assisted semen analyzers in andrology research and veterinary practice. **Theriogenology**, Stoneham, v. 57, p. 149-179, 2002.

105. WATSON, P. F. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 60-61, p. 481-492, 2000.
106. WINDSOR, D. P. Mitochondrial function and ram sperm fertility. **Reproduction, Fertility and Development**, Melbourne, v. 9, p. 279-284, 1997.
107. YÁÑIZ, J.; MARTÍ, J. I.; SILVESTRE, M. A.; FOLCH, J.; SANTOLARIA, P.; ALABART, J. L.; LÓPEZ-GATIUS, F. Effects of solid storage of sheep spermatozoa at 15°C on their survival and penetrating capacity. **Theriogenology**, Stoneham, v. 64, p. 1844-1851, 2005.

## ANEXO I

## Solução de X-Cell®

## FÓRMULA DO X-CELL

- Glucose Anidra ..... 76,6 g
- Citrato de Sódio Bi-hidratado ..... 14,3 g
- Bicarbonato de Sódio ..... 2,6 g
- EDTA ..... 8,6 g
- Cloreto de Potássio ..... 2,5 g
- Sulfato de Gentamicina ..... 0,4 g

## SOLUÇÃO DE X-CELL

- X-Cell<sup>22</sup> ..... 43,4 g
- Água Mili Q (qsp) ..... 1000,0 mL

*Obs.: - ph e osmolaridade em torno de 6,89 e 274 mOsm/Kg respectivamente;  
- armazenar a 5°C.*

---

<sup>22</sup>IMV Technologies (IMV), França

## ANEXO II

Set-Up do Hamilton Thorne Biosciences<sup>23</sup>

## ANALYSIS SET-UP

- *IMAGE CAPTURE*
  - *Frames Per Sec* ..... 60 Hz
  - *Number of Frames* ..... 30
- *CELL DETECTION*
  - *Minimum Contrast* ..... 60
  - *Minimum Cell Size* ..... 5 pix
- *PROGRESSIVE CELLS*
  - *Path Velocity (VAP)* ..... 75.0  $\mu$ /s
  - *Straightness (STR)* ..... 80%
- *DEFAULTS (If < 5 Motili Cells)*
  - *Cell Size* ..... 5 pix
  - *Cell Intensity* ..... 55
- *SLOW CELLS (Static)*
  - *VAP Cutoff* ..... 21.9  $\mu$ /s
  - *VSL Cutoff* ..... 6.0  $\mu$ /s

## OPTICS SET-UP

- *ILUMINATION*
  - *Intensity* ..... 2.200
  - *Photometer* ..... 102
- *MAGNIFICATION* ..... 1.89
- *VIDEO SOURCE* ..... 60 Hz
  - *Field* ..... Dark

## STAGE SET-UP

- ANALYSIS CHAMBER
  - Chamber Type ..... Makler
  - Chamber Depth ..... 10.0  $\mu\text{m}$
  - Stage Position ..... C-19.7
- SET STAGE TEMPERATURE ..... 37°C
- FIELD SELECTION ..... Automatic

---

<sup>23</sup>IVOS-12 – Animal Version 12.3D Build 002 – Software e Design: Pyramid Technical Consultants, Inc. Waltham, MA.

## ANEXO III

Solução de PBS: Barth & Oko (1989)

SOLUÇÃO ESTOQUE DE  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$

- $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  (Sigma-S5011) ..... 6,1256 g
- ÁGUA MILI Q ..... 30 ml

SOLUÇÃO ESTOQUE DE  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$

- $\text{Na}_2\text{HPO}_4^{24}$  ..... 0,662 g
- Água Mili Q ..... 70,0 ml

SOLUÇÃO FINAL DE PBS

- Solução Estoque de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  ..... 30,0 ml
- Solução Estoque de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  ..... 70,0 ml
- NaCl (JT-Baker-3624-19) ..... 0,45 g

*Obs.: - pH e osmolaridade próximos a 7,2 e 280 mOsm/kg respectivamente;*

*- armazenar a 5°C.*

## ANEXO IV

### **Avaliação de integridade de membrana plasmática com FDA (IMP)**

#### **Preparação da solução estoque**

I – Solução estoque de diacetato de 6-carboxifluoreceína (FDA) – manter em -20°C

- 9,2 mg FDA
- 20 mL DMSO

II – Solução estoque de iodeto de propídeo (IP) – manter em -20°C

- 10 mg IP
- 20 mL solução fisiológica

III – Solução estoque de formoldeído – manter em 4°C

- Formalina 40%
- Solução fisiológica
- Fazer diluição 1:80

IV – Solução estoque de citrato de sódio 3% - manter em 4°C

- 3 g citrato de sódio
- 100 mL solução fisiológica

#### **Solução de trabalho – preparar no dia de uso e manter refrigerada**

Solução I – 20 µL

Solução II – 10 µL

Solução III – 10 µL

Solução IV – 960 µL

#### **Preparação da amostra**

5 µL sêmen

30 µL solução de trabalho

Incubar 8 minutos no banho-maria (37°C)

Colocar uma gotícula na lâmina, cobrir com lamínula e fazer leitura

- Espermatozoides vermelhos – membrana lesada
- Espermatozoides verdes – membrana íntegra
- Espermatozoides vermelhos e verdes – membrana semi-lesada



## ANEXO V

### **Avaliação de integridade acrossomal (PNA)**

#### **Preparação da solução estoque**

I – Solução estoque de FITC-PNA – manter em -20°C

- 1 mg PNA
- 1 mL PBS

II – Solução estoque de iodeto de propídeo (IP) – manter em -20°C

- 10 mg IP
- 20 mL solução fisiológica

III – Solução estoque de formoldeído – manter em 4°C

- Formalina 40%
- Solução fisiológica
- Fazer diluição 1:80

IV – Solução estoque de citrato de sódio 3% - manter em 4°C

- 3 g citrato de sódio
- 100 mL solução fisiológica

#### **Solução de trabalho – preparar no dia de uso e manter refrigerada**

Solução I – 20 µL

Solução II – 10 µL

Solução III – 10 µL

Solução IV – 960 µL

#### **Preparação da amostra**

5 µL sêmen

30 µL solução de trabalho

Incubar 8 minutos no banho-maria (37°C)

Colocar uma gotícula na lâmina, cobrir com lamínula e fazer leitura.

- Espermatozoides vivos intactos – não são observados na fluoresceína, apenas em campo claro
- Espermatozoides vivos com acrossoma reagido – contorno verde na região do acrossoma
- Espermatozoides mortos intactos – corados de vermelho
- Espermatozoides mortos com acrossoma reagido – vermelho com acrossoma corado de verde

## ANEXO VI

**Avaliação fluorescente de potencial de membrana – JC1****Leitura imediata após descongelar**

1. Aliquotar 10 µL de sêmen
2. 10 µL de JC1 corante pronto
3. 50 µL de TALP
4. Incubar 8 minutos a 37°C
5. Acrescentar 900 µL de TALP
6. Centrifugar por 1 minuto
7. Retirar 900 µL do sobrenadante
8. Ressuspender com 70 µL de TALP
9. Colocar uma gotícula na lâmina, cobrir com lamínula e fazer leitura

- Alto potencial mitocondrial – peça intermediária laranja
- Baixo potencial mitocondrial – peça intermediária verde

**TALP - SP**

	mM	g/50mL
Água para cultura		50 ml
NaCl	100,00	0,2920 g
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,29	0,00175 g
KCl	3,10	0,0115 g
Ácido láctico syruposo 60%		0,1550 µL
Hepes	25,00	0,1190 g
NaHCO <sub>3</sub>	2,50	0,1050 g
Phenol red		0,0005 g
CaCl <sub>2</sub> 2H <sub>2</sub> O	2,10	0,0155 g
MgCl <sub>2</sub> 6H <sub>2</sub> O	0,40	0,0040 g
Pyruvato	0,50	0,0055 g
Penicilina/streptomicina		50 µL

- **PH: 7,4**
- **Filtrar**
- **Armazenar na geladeira**