

USO DA N-ACETILCISTEINA NA CONSERVAÇÃO DE SÊMEN OVINO A 4°C: RESULTADOS PRELIMINARES

MENEZES, E. S. B.^{1*}; CAVALCANTE, J. M. M.¹; BRASIL, O. O.¹; SOUZA, D. F. R.¹; NETO, E. T. A.¹; SILVA JÚNIOR, J.B.¹; SALGUEIRO, C. C. M.¹; NUNES, J. F.¹

Resumo

Sêmen de três carneiros Santa Inês foram resfriados usando diferentes concentrações do antioxidante N-acetilcisteína (0 mM, 0,5 mM, 1,0 mM, 5,0 mM e 10,0 mM), em diluidor citrato-glicose-gema a 4°C por 2h, 24 e 48h, para avaliar o efeito na motilidade e parâmetros de velocidade de espermatozóides em sistema CASA. Nenhum efeito significativo verificado na qualidade do sêmen pela adição do antioxidante. Novos estudos são necessários com maior número de coletas de sêmen e testes de avaliação seminal e ensaios bioquímicos para medição da geração de ROS.

Abstract

Pooled semen from three Santa Ines rams were cooled using different concentration of antioxidant N-acetyl cysteine (0mM, 0,5mM, 1,0mM, 5,0mM and 10,0mM) in citrate-glucose-egg yolk extender at 4°C by 2h, 24 and 48h, to evaluate the effects on motility and sperm velocity parameters by CASA system. No significant effects were observed on semen quality by addition of N-acetyl cysteine. New studies are necessary with more numbers of semen collection and more tests for semen evaluation and biochemical assays to measure the ROS generation.

Palavras-chave: N-acetilcisteína, antioxidantes, ROS, CASA, ovino, sêmen resfriado.

Introdução

A utilização de sêmen ovino resfriado a 4°C é uma técnica útil na manutenção de sua fertilidade por até 24h. Seu uso por tempos mais prolongados não é recomendado em virtude da diminuição de sua viabilidade.

Dentre os fatores que afetam a qualidade do sêmen é a geração de espécies reativas de oxigênio (ROS). Estas possuem a propriedade de induzir a peroxidação dos lipídeos das membranas celulares de espermatozóides, contribuindo para redução da motilidade ou morte celular espermática. Deste modo, o balanço entre a produção de radicais livres e sua detoxicação pode ser um importante fator para a sobrevivência espermática antes e após o processo de resfriamento.

¹ Laboratório de Tecnologia do Sêmen Caprino e Ovino. Universidade Estadual do Ceará Av. Paranjana, 1700, Campus do Itaperi, CEP: 60.740-000, Fortaleza-CE
e-mail para correspondência: jmmcavalcante@bol.com.br

Visando minimizar os efeitos da geração de ROS, tem sido sugerido o uso de antioxidantes aos diluentes de sêmen, destacando-se o uso da catalase, glutatona reduzida (GSH), glutatona peroxidase e vitamina E (Bucak *et al.*, 2008).

A cisteína, que tem demonstrado capacidade em penetrar pelas membranas celulares, atua como agente antioxidante, seja diretamente ou participando da biossíntese intracelular de GSH, que atua como co-fator para a glutatona peroxidase durante processos catalíticos de redução de hidroperóxidos, protegendo a célula contra o estresse oxidativo.

Vários trabalhos foram realizados com o uso da cisteína em diluentes de sêmen nas mais diversas espécies, com resultados controversos (Michael *et al.*, 2008). Porém, há poucos estudos com uso da cisteína em diluentes para sêmen ovino, particularmente com uso de seu derivado N-acetilcisteína.

Objetivo

Avaliar parâmetros de motilidade espermática em sêmen ovino diluído e conservado a 4°C com diferentes concentrações de N-acetilcisteína com uso de Sistema Automatizado de Análise de Sêmen (CASA).

Materiais e Métodos

O experimento foi realizado no Laboratório de Tecnologia do Sêmen Caprino e Ovino da Universidade Estadual do Ceará, no município de Fortaleza, Ceará, com latitude 03°43' Sul e longitude 38°30' Oeste, com temperatura média anual de 27°C, durante os meses de julho e agosto de 2008. Foram utilizados três carneiros da raça Santa Inês, mantidos em baias individuais, alimentados com feno de tifton (*Cynodon* sp.) e concentrado comercial com 18% PB, além de sal mineral e água à vontade. As coletas de sêmen foram feitas com uso de vagina artificial duas vezes por semana, totalizando quatro coletas por animal. Após cada coleta, os ejaculados foram mantidos em banho-maria a 30 °C para avaliação do volume, concentração, motilidade massal, percentual de espermatozóides móveis e vigor (Chemineau *et al.*, 1991). Posteriormente, os ejaculados foram diluídos em meio diluidor à base de citrato-glicose-gema (citrato de sódio 2,37g, glicose 0,8g, gema de ovo 15mL, água destilada para 100mL; Evens & Maxwell, 1992), com 0 mM (controle), 0,5 mM, 1,0 mM, 5,0 mM e 10,0 mM de N-acetilcisteína, a uma concentração de 1×10^9 espermatozóides/mL. Foi realizado "pool" destes tratamentos com intuito de eliminar as diferenças individuais entre animais. Em seguida, cada tratamento foi resfriado até 4°C em 90 minutos (-0,29°C/min), quando então foram divididos em três alíquotas de 500 µL em microtubos e transferidos para recipiente com água a 4°C e mantidos em geladeira a esta mesma temperatura. Para a avaliação do sêmen, um microtubo de cada tratamento foi incubado por cinco minutos em banho-maria a 37°C (TTR-T0), sendo então tomada uma alíquota de 10µL e diluída em solução de citrato-glicose de modo a manter uma concentração de 20 a 50 milhões de espermatozóides/mL para avaliação em sistema CASA (Sperm Class Analyser[®], Microptic S.L.). As avaliações foram feitas nos tempos de conservação 2h, 24 e 48h após resfriamento. Alíquotas de sêmen foram tomadas após 2h de incubação a 37°C para avaliação do teste de

termorresistência (TTR-T2). Os parâmetros avaliados pelo sistema SCA foram: motilidade total, motilidade progressiva, velocidade curvilinear (VCL), velocidade média do percurso (VAP), retilinearidade (STR), deslocamento lateral de cabeça (ALH) e frequência de batimento cruzado (BCF). A viabilidade espermática foi avaliada em esfregaço de sêmen corado com eosina-nigrosina (Chemineau *et al.*, 1991). Os resultados, expressos em média \pm desvio padrão, foram submetidos a análise de variância a 5% de significância.

Resultados e Discussões

Os parâmetros VCL, VAP, STR, ALH, BCF e percentual de células viáveis não apresentaram diferenças estatísticas entre os tratamentos para um mesmo tempo de conservação a 4°C, mas entre os tempos de conservação (Tab. 1).

Tabela 1: Média dos tratamentos para os parâmetros VCL, VAP, STR, ALH, BCF e espermatozóides viáveis entre os tempos de conservação

	VCL(μ m/s)	VAP(μ m/s)	STR(%)	ALH(μ m)	BCF(Hz)	viáveis(%)
2h	120,2 \pm 6,0 ^a	107,6 \pm 5,6 ^a	84,5 \pm 0,1 ^a	1,9 \pm 2,5 ^a	8,6 \pm 0,2 ^a	72,9 \pm 3,1 ^a
24h	118,9 \pm 4,9 ^a	102,3 \pm 5,0 ^b	83,6 \pm 1,6 ^a	2,9 \pm 0,1 ^b	8,8 \pm 0,2 ^a	73,6 \pm 3,5 ^a
48h	101,7 \pm 4,7 ^b	86,3 \pm 4,9 ^c	87,1 \pm 0,8 ^c	2,8 \pm 0,1 ^b	9,5 \pm 0,3 ^b	72,2 \pm 4,4 ^a

^{a,b,c} Letras minúsculas diferentes em mesma coluna para diferença estatística ($p < 0,05$)

Para os parâmetros motilidade total e motilidade progressiva (Fig. 1), não foram encontradas diferenças estatísticas entre os tratamentos e entre os tempos de conservação. Entretanto, numericamente, observa-se uma tendência de melhora da qualidade seminal com uso da N-acetilcisteína, principalmente nas concentrações de 1,0 e 5,0 mM. Este fato pode ser atribuído ao pequeno número de coletas (n=4), ainda insuficientes para evidenciar algum efeito significativo da N-acetilcisteína, bem como a boa manutenção da qualidade seminal dos tratamentos em diferentes tempos de conservação, não sendo verificado decréscimo de sua qualidade para os parâmetros viabilidade, motilidade total e progressiva, de modo que um possível efeito antioxidante contra os efeitos deletérios da geração de ROS não pode ser verificado.

Conclusões

A adição de antioxidantes, particularmente da N-acetilcisteína, revela-se promissora para a manutenção da qualidade seminal por longos períodos. No entanto, faz-se necessário um maior número de coletas, avaliação em maiores tempos de incubação, bem como o uso de mais técnicas que avaliem outros parâmetros seminais diferentes dos avaliados neste trabalho, como o teste hiposmótico, avaliação da integridade acrossomal e ensaios de mensuração da geração de ROS no sêmen diluído e resfriado em diferentes tempos de conservação.

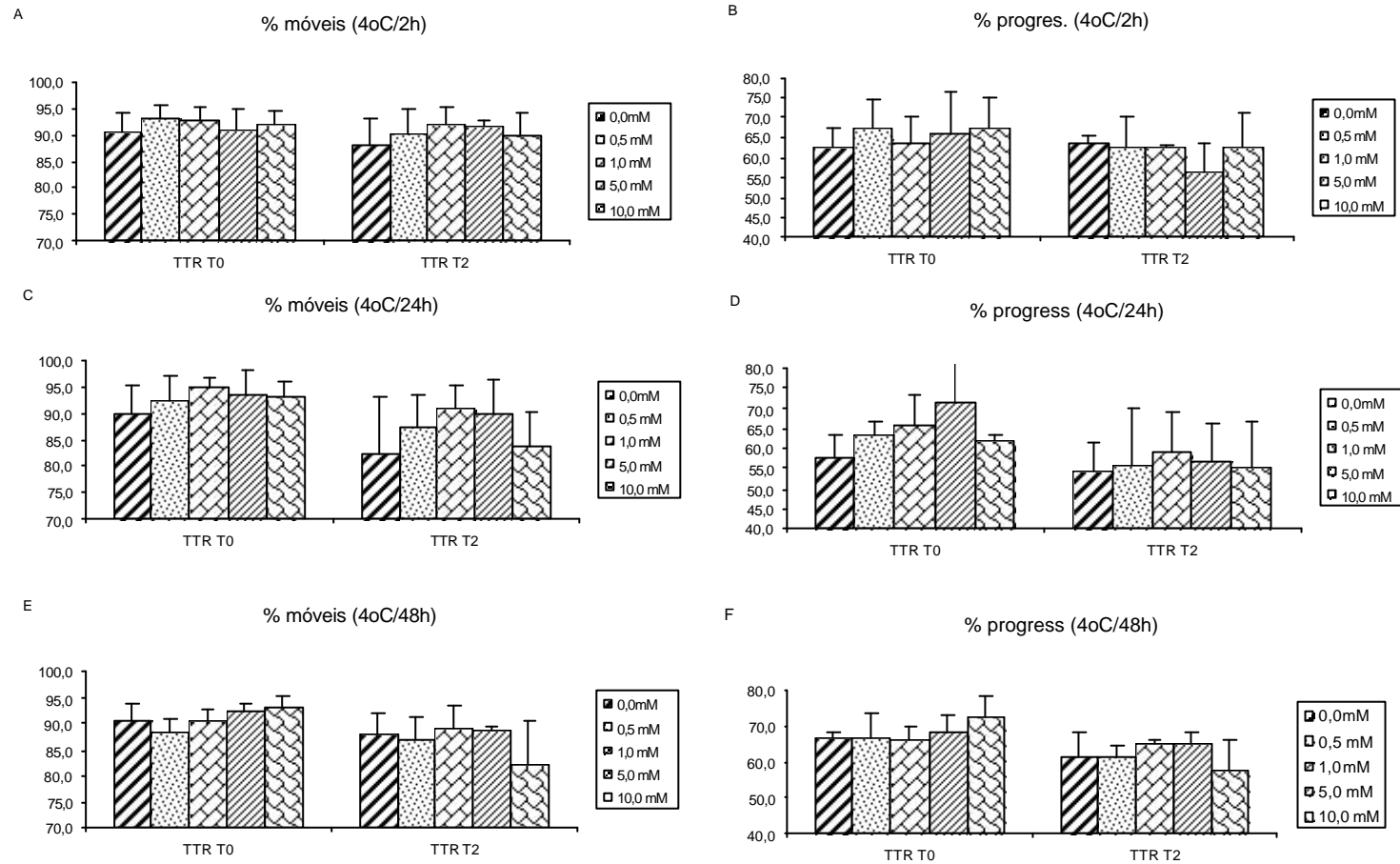


Figura 1 (A-F): Motilidade total (A,C,E) e Motilidade progressiva (B,D,F) de sêmen ovino conservado por 2h, 24h e 48h após 5 minutos (TTR T0), e duas horas (TTR T2), de incubação a 37°C, em diluidor citrato-glicose-gema com 0mM, 0,5mM, 1,0mM, 5,0mM e 10,0mM de N-acetilcisteína.

Bibliografía

- BUCAK, M.N, ATESSAHIN, A., YÜCE, A. Effect of anti-oxidants and oxidative stress parameters on ram semen after the freeze-thawing process. *Small Ruminant Research*, v.75, p.128-134, 2008.
- CHEMINEAU, P., CAGNIE, Y., GUERIN, Y., *et al.* Training Manual on Artificial Insemination in Sheep and Goats. *FAO Reproduction and Health Paper*. Food and Agriculture Organization of the United Nations, 222p. 1991.
- EVANS, G., MAXWELL, W.M.C. Inseminación artificial de ovejas y cabras. Editora Acribia, S.A. Zaragoza, 1990, 192p.
- MICHAEL, A.J., ALEXOPOULUS C., PONTIKI, E.A., HADJIPAVLOU-LITINA, D.J., SARATSI, P., VERVERIDIS, H.N., BOSCO, C.M. Effect of antioxidant supplementation in semen extenders on semen quality and reactive oxygen species of chilled canine spermatozoa. *Theriogenology*, v. 68 (2), p. 204-212, 2007.