

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL
CURSO DE MESTRADO

ADIÇÃO DE CARNOSINA COMO ANTIOXIDANTE EM
SÊMEN BOVINO CONGELADO

Mozarth Vieira Junior

Campo Grande – MS

2020

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL
CURSO DE MESTRADO

Adição de carnosina como antioxidante em sêmen bovino congelado

Addition of carnosine as an antioxidant in frozen bovine semen

Mozarth Vieira Junior

Orientador: Prof. Dr. Breno Fernandes Barreto Sampaio

Co-orientadora: Prof^a Dr^a Eliane Vianna da Costa e Silva

Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Mato
Grosso do Sul, como requisito à
obtenção do título de Mestre em
Ciência Animal. Área de
concentração: Produção Animal.

Campo Grande – MS, 2020

AGRADECIMENTOS

Sempre primeiramente à Deus, que nos deu o dom da vida e nos permitiu ter a capacidade de pensarmos e sentir e Nossa Senhora Aparecida que foi meu apego nos momentos de dificuldades e solidão.

Agradeço ao meu estimado orientador e professor Dr. Breno Fernandes Barreto Sampaio pela oportunidade e pelos ensinamentos que me proporcionou durante esta etapa da minha vida.

A minha co-orientadora Prof^a Dr^a Eliane Vianna da Costa e Silva pelo total apoio e paciência de me auxiliar nos momentos de dúvida.

A minha família que mesmo distante, sempre me apoiou a seguir em frente e ir atrás de meus objetivos e me fez acreditar em mim quando já estava não tinha mais ânimo para continuar lutando.

Os amigos da pós-graduação, pelos momentos de felicidade, trabalho intenso e de muita ajuda, principalmente a Willian, Bianca, Raiza, Bruno Milan e Bruno Gomes.

Ao Prof. Dr. Gustavo Guerino Macedo que também forneceu muita ajuda e incentivos na pesquisa.

A CAPES pelo incentivo e pelo suporte ao desenvolvimento da pesquisa.

E por último a Universidade Federal de Mato Grosso do Sul que proporcionou desafios e vivências únicas em todas as etapas do curso.

*“Não é a força do gotejar da água que fura a pedra, mas sim a persistência incansável dessa
ação.”*

Ivan Teorilang

RESUMO

VIEIRA, M. J. Adição de carnosina como antioxidante em sêmen bovino congelado. 2020. 30f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS, 2020.

A criopreservação de sêmen é uma tecnologia de grande importância na área reprodutiva, por possibilitar melhor disseminação genética de touros, consequentemente aumentando a produtividade dos rebanhos comerciais nacionais, por ser a técnica com maior custo-benefício é a mais utilizada, porém ainda se tem algumas dificuldades a qual deve-se solucionar para obter maior produção. A excessiva produção de radicais livres após o descongelamento é uma delas, com o objetivo amenizar os danos causados pelas moléculas dos radicais livres adicionou-se a proteína carnosina que possui propriedades antioxidativas ao diluente de congelamento. Foram utilizados os ejaculados de 5 touros da raça nelore de idade superior a 24 meses com fertilidade comprovada, cada animal foi coletado 3 vezes somando-se 15 ejaculados, posteriormente cada amostra foi subdividida em 4 parcelas: Grupo controle (sem carnosina), CAR1 (100ng/ml), CAR2 (200ng/ml) e CAR3(300ng/ml), as amostras foram envasadas em palhetas de 0,5ml com concentração de 30 milhões de espermatozoides vivos e submetidas ao processo de congelamento lento convencional, onde as palhetas foram acomodadas em uma caixa térmica sob refrigeração de 5°C por 4 horas, passado o tempo de resfriamento as palhetas foram relocadas para uma caixa de isopor com nitrogênio líquido a uma distância de 5cm da superfície do líquido por 20 minutos e posteriormente mergulhadas no nitrogênio líquido a uma temperatura de -196°C e armazenadas em botijão criogênico. Todas as amostras foram submetidas as análises em dois momentos, após o descongelamento a 37°C por 30 segundos (M0) e após o teste de termo regulação rápida (M30) onde uma parcela da amostra é incubada a 46°C por 30 minutos. Em ambos os momentos as amostras passaram por avaliação pelo CASA para análise da cinética espermática e pela avaliação do citômetro de fluxo para averiguar as injúrias estruturais ocasionadas pelos radicais livres. As avaliações estatísticas foram realizadas através do software SAS utilizando a análise de variância entre os grupos. Não houve alterações nos padrões de motilidade gerais, porém as médias do grupo mais concentrado (300ng/ml) foi observado taxas de células vivas melhores no momento de descongelamento (controle = $55,56 \pm 22,37$ e CAR3 = $60,91 \pm 19,38$). A carnosina não demonstrou estatisticamente efetividade na proteção contra os danos causados pelos radicais livres em nenhuma das concentrações utilizadas, porém também não ocasionou danos as células espermáticas.

Palavras-chave: lipoperoxidação, integridade de membrana, crioprotetor, estresse oxidativo.

ABSTRACT

VIEIRA, M. J. Addition of carnosine as an antioxidant in frozen bovine semen. 2020. 30f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS, 2020.

The cryopreservation of a technology of great importance in the reproductive area, as it allows a better genetic dissemination of bulls, is consequently impaired in the tests of herds of national traders, as it is the most cost-effective technique, it is the most used, but still has some difficulties to qualify problems for greater production. An excessive production of free radicals after thawing is one of them, with the objective of causing damage caused by free radical molecules, applied to a fleshy protein that has antioxidant properties and freezing diluents. Ejaculates from 5 bulls aged over 24 months with proven fertility were used, each animal was collected 3 times with the command 15 ejaculates, afterwards each sample was subdivided into 4 parcels: Control group (without carnosine), CAR1 (100ng / ml), CAR2 (200ng / ml) and CAR3 (300ng / ml), as the samples were packaged in 0.5 ml palettes with a concentration of 30 million live sperm and subjected to a conventional slow freezing process, where the palettes were accommodated in a thermal box under 5°C refrigeration for 4 hours, after the cooling time as reeds were relocated to a Styrofoam box with liquid nitrogen at a distance of 5cm from the liquid surface for 20 minutes and after drying in liquid nitrogen at a temperature of -196°C and stored in a cryogenic cylinder. All samples were subjected to analysis in two moments, after thawing at 37°C for 30 seconds (M0) and after the rapid thermodynamics test (M30) where a portion of the sample is incubated at 46°C for 30 minutes. At both times, the tests were evaluated by CASA for analysis of sperm kinetics and by the evaluation of the flow cytometer for average, according to injuries occasionally shown by free radicals. How the statistics were performed using the SAS software, using an analysis of variation between groups. There were no changes in the general mobility patterns, however the media of the most concentrated group (300ng / ml) were observed better live cell rates at the time of thawing (control = 55.56 ± 22.37 and CAR3 = 60.91 ± 19.38). Carnosine does not demonstrate statistically effectiveness in protecting against damage caused by free radicals in any of the applications used, but it also does not cause damage such as sperm cells.

Keywords: lipoperoxidation, membrane integrity, cryoprotectant, oxidative stress.

SUMÁRIO

1.INTRODUÇÃO.....	1
2.Estrutura e metabolismo dos espermatozoides.....	2
2.1.Criopreservação do espermatozoide.....	3
3.Espécies reativas de oxigênio.....	4
3.1.Estresse oxidativo.....	5
3.2.Antioxidantes.....	5
4.Carnosina.....	6
5.CASA (computer-assisted sperm analysis)	7
6.Citômetro de fluxo.....	8
REFERÊNCIAS.....	9
ARTIGO – ADIÇÃO DE CARNOSINA COMO ANTIOXIDANTE EM SÊMEN	
BOVINO CONGELADO.....	15
Introdução.....	16
Material e métodos.....	16
Resultados e discussão.....	17
Conclusão.....	21
Referências.....	21
ANEXO I.....	23

1. INTRODUÇÃO

A representatividade da pecuária na balança econômica do Brasil possui grande destaque, por possuir altas quantidades de produção e exportação quando comparado com outros países, mas principalmente pelo potencial produtivo que pode atingir por contar com vastas extensões terrestres (MAPA, 2017). Para auxiliar e alavancar a produção, as biotecnologias tem fundamental importância, principalmente as técnicas com foco na reprodução com o intuito de otimizar os índices produtivos das propriedades com os ganhos genéticos dos rebanhos.

A biotecnologia reprodutiva mais utilizada e com maior viabilidade econômica é a inseminação artificial e a utilização de sêmen congelado possui destaque por possibilitar o avanço genético dos rebanhos e conservação dos espermatozoides de animais superiores por longos períodos. O comércio de sêmen tem crescimento acentuado conforme há uma busca por aumento de produção, segundo a ASBIA (2020) no ano de 2018 a produção foi de 9.630.303 de dose e em 2019 foram 10.940.746 doses, um crescimento de cerca de 14%. Os números de exportações também aumentaram em cerca de 16%, esse crescimento de produção e exportação foram encabeçados principalmente de raças destinadas a corte, principalmente a raça Nelore.

Um desafio a ser enfrentado para a otimização da qualidade e viabilidade do sêmen após o processo de descongelamento é a neutralização das moléculas pró-oxidantes, produzidas pelo espermatozoide por seu metabolismo aeróbico. Durante o processo de congelamento e descongelamento, há uma elevação na produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) através de processo de respiração celular, com o aumento da concentração dessas moléculas oxidativas há também o comprometimento das membranas plasmática e acrossomal concomitante com a elevação da permeabilidade e peroxidação lipídica (BORGES et al., 2011). Para diminuir as lesões e consequentemente obter uma qualidade espermática maior, a adição de produtos com função antioxidante são constantemente testados para verificar sua efetividade. A carnosina dentre os diversos efeitos como relata Rocha et al. (2018), também apresenta a função de neutralização de espécies reativas de oxigênio.

A carnosina (β -alanil-L-histidina) sendo um dipeptídeo naturalmente encontrado no organismo de mamíferos, age eliminando os produtos responsáveis pela peroxidação lipídica, com maior influência sobre a molécula de malondialdeído (MDA) como apontado por Drozak et al. (2010), sendo uma proteína nativa do organismo e hidrossolúvel, facilita a diluição e possibilita a incorporação ao diluidor sem causar impacto a composição. O objetivo do estudo

foi adicionar a carnosina ao diluidor de congelamento e verificar a efetividade na diminuição das lesões ocasionadas por ação das espécies reativas de oxigênio.

2. Estrutura e metabolismo dos espermatozoides

Geralmente os espermatozoides são as menores células do organismo animal e se dividem e duas regiões distintas, tanto morfológica quanto funcionalmente (cabeça e cauda) que são revestidas por apenas uma camada de membrana plasmática. São dotados de flagelos fortes que os permitem movimentar-se em meio aquoso. Não possuem organelas no citoplasma, que são desnecessárias para transferir o DNA para o óvulo. Mas contém várias mitocôndrias para a produção de energia ao flagelo (ALBERTS, 1997).

A cabeça do espermatozoide conta com um núcleo haploide, onde se localiza o DNA compactado para diminuir o volume no transporte. No topo da cabeça do espermatozoide se encontra a vesícula acrossomal ou acrossoma, esta tem a função de auxiliar a penetração do espermatozoide no invólucro externo do ovócito por meio da liberação de enzimas hidrolíticas (ALBERTS, 1997).

O flagelo tem a função de impulsionar o espermatozoide e auxiliar na penetração pelo invólucro do ovócito. Se divide em, peça intermediária: onde se encontram as mitocôndrias que envolvem o início do flagelo, e a peça principal (ALBERTS, 1997). As mitocôndrias tem fundamental importância na peça intermediária e está relacionada diretamente com as duas principais vias metabólicas, a fosforilação oxidativa e glicólise, na produção de ATP nos espermatozoides, necessário para manter as estruturas celulares, composição iônica intracelular e principalmente motilidade (CELEGHINI, 2005).

A membrana plasmática é responsável por envolver completamente a célula e é a peça mais externa. A composição da membrana é formada por camadas lipídicas compostas por fosfolípidos, glicolípidos e colesterol, somados a algumas proteínas. A membrana possui a função de manter o equilíbrio osmótico e proteção do meio intracelular e extracelular. As lesões que acometem a membrana plasmática levam a desregulação da homeostase celular e consequentemente a morte da célula (ALBERTS, 1997).

Dos componentes lipídicos da membrana plasmática, os fosfolípidos se encontram com maior abundância, o colesterol é o esteroide com mais presença na membrana plasmática dos mamíferos, com a função de estabilizar a fluidez da bicamada lipídica pela sua interação estérica junto aos fosfolípidos presentes (PARKS, 1997).

A célula espermática pode utilizar o metabolismo aeróbico, quanto o anaeróbico para suprir suas necessidades energéticas da motilidade. Em condições normais, o espermatozoide tem

quatro substâncias que podem ser utilizados como fonte energética: sorbitol, frutose e glicerilfosforilcolina, que estão presentes no sêmen, e no espermatozoide temos o plasmogênio (TURNER, 2003).

2.1 Criopreservação do espermatozoide

Para que o espermatozoide seja capaz de fertilizar o oócito, deve-se preservar quatro principais atributos após os processos de congelamento e descongelamento: metabolismo para a produção de energia; motilidade progressiva; enzimas no acrossoma e proteínas da membrana plasmática, que são de fundamental importância para o espermatozoide sobreviver no trato reprodutivo da fêmea e para ocorrer a ligação com a membrana plasmática do oócito para a fertilização. A desfragmentação dos componentes da células espermática correlacionada a estas funções, reduzirá a fertilidade (AMANN & PICKETT, 1987).

Os diluidores possuem em sua constituição substâncias que promovem a preservação da integridade da membrana plasmática, manter a motilidade e pH, anular moléculas tóxicas formadas pelos espermatozoides, promover a proteção contra possíveis choques térmicos, manter o equilíbrio osmótico viável à célula, fornecer energia e inibir o crescimento de agentes patológicos (AMANN & PICKETT, 1993). O período de resfriamento (20°C à 5°C) é o momento no qual ocorrem as maiores problemas com irreversibilidade à membrana plasmática da células espermática, principalmente devido a ruptura e à perda de seus arranjos celulares (WATSON, 1995). Esta fase tem como característica a transição da membrana plasmática do estado líquido para o cristalino, demonstrando a principal dificuldade no sucesso da congelção. Com o decaimento da produção de energia a elevação da permeabilidade da membrana estão ligados diretamente a essas alterações (WATSON, 1995).

A sensibilidade ao choque sofre uma variação conforme o grau de maturação dos espermatozoides, espécie a ser tratada, aspectos quantitativos e qualitativos do plasma seminal, onde o grau de colesterol e ácidos graxos são determinantes (WATSON, 1981).

A curva de congelção possui especial importância para manter a integridade da célula, se houver um decréscimo muito acentuado, não haverá tempo suficiente para a desidratação da célula espermática, conduzindo a ocorrência de formação de gelo no meio intracelular, levando ao rompimento da célula. Em caso de curva com intensidade baixa, ocorrerá a desidratação do espermatozoide que não formará gelo intracelular, mas a alta concentração dos solutos também acarretará a danificação da célula (WATSON, 1995).

Durante o processo de criopreservação os níveis de cálcio no meio intracelular diminuem, levando a suspensão do metabolismo espermático e mantendo suas características por muito

tempo, em consequência a reação acrossomal das células advindas do processo de congelamento e descongelamento pode ocorrer em tempo inferior para a indução *in natura* nos órgãos genitais da fêmea (O'FLAHERTY et al., 1999). O sêmen congelado possui uma menor capacidade de fertilizar em comparação com o sêmen fresco, isso é ocasionado devido ao processo de criopreservação, que passa por diversas fases até seu armazenamento e durante o descongelamento, onde o espermatozoide sofre diversos estresses (térmico, osmótico e tóxico) e rápidas alterações no volume celular, levando a lesões na membrana plasmática (GIRAUD et al., 2000)

3. Espécies reativas de oxigênio

O espermatozoide é uma célula que se utiliza do metabolismo aeróbico, sendo assim o oxigênio se torna essencial para a manutenção das funções. Porém, a geração de energia leva à formação de espécies reativas de oxigênio (*reactive oxygen species* – ROS) que, quando em excesso, podem ocasionar danos ao espermatozoide. As ROS formam um grupo dos derivados do oxigênio que são encontrados em todos os sistemas biológicos. Dentre as ROS, as com maior relevância são as que possuem o radical ânion superóxido, hidroxila, hidroperoxila, óxido nítrico e peróxido de hidrogênio (SHARMA & AGARWAL, 1996).

As células aeróbicas contam com substratos e enzimas que são capazes de neutralizar a potencial toxicidade das ROS, mas os espermatozoides possuem limitadas defesas contra o estresse oxidativo (NAIR et al., 2006). A geração das ROS somado a uma deficiência no sistema antioxidativo da célula resultam no estresse oxidativo, sendo assim acarreta uma reação em cadeia nos ácidos graxos poli-insaturados presentes na membrana plasmática do espermatozoide, denominada de peroxidação lipídica. Deste processo, se resulta a alteração de fluidez plasmática e como consequência o decaimento de motilidade e a capacidade de fecundar (SANOKA & KURPISZ, 2004).

A célula espermática tem especial sensibilidade ao estresse oxidativo por possuir um citoplasma muito reduzido, e por possuir esse menor espaço também tem concentração limitada das enzimas antioxidantes. Sua membrana também possui grande concentração de ácidos graxos poli-insaturados, que eleva sua possibilidade de peroxidação lipídica, devido às ligações dos carbonos (NICHII et al., 2007).

3.1 Estresse oxidativo

Há dois sistemas para a produção de ROS no nível espermático, um se localiza na membrana plasmática, semelhante à NADPH oxidase (enzima que gera H_2O_2), e outro que se encontra na peça intermediária, juntamente ao sistema de respiração mitocondrial, oxido-redutase dependente da NADH (nicotinamida adenina dinucleotídeo). Por isso, NADPH e NADH são fontes que geram ROS (MAKKER et al., 2009).

Geralmente, se observa equilíbrio na produção dos radicais livre e seus inibidores. Nas condições fisiológicas, as ROS mediam as funções normais do espermatozoide, como a reação do acrossomo, capacitação, hiperativação e fusão da célula com o ovócito. Porém, pode acontecer o estresse oxidativo do espermatozoide, seja *in vivo* quanto *in vitro*, recorrente do desequilíbrio da produção das ROS e as ações dos antioxidantes presentes no sêmen (SALEH & AGARWAL, 2002). O excesso de produção de ROS leva a danos à membrana mitocondrial, que leva a modificações patofisiológicas das células espermáticas (MAKKER et al., 2009).

Segundo Makker (2009) as ROS prejudicam a células espermática e quando encontradas em altas concentrações culminam na toxicidade, com a perda da função de motilidade devido a ocorrência da peroxidação lipídica. Os efeitos da peroxidação lipídica incluem irreversibilidade da motilidade, inibição da respiração espermática, lesões ao DNA espermático e a perda das enzimas intracelulares, que interferem na capacidade de fertilizar do espermatozoide (SIKKA, 2004).

Como é de conhecimento os efeitos prejudiciais das ROS, os produtos gerados através da reação da peroxidação lipídica, o maior destaque é o malondialdeído (MDA) que é o mais produzido e pode ser agressivo quanto as ROS (SHARMA & AGARWAL, 1996). O MDA é altamente citotóxico a célula espermática, ocasionando a redução da motilidade, danos ao DNA e o decréscimo na fecundação espermatozoide-oócito, levando a infertilidade da célula (AITKEN et al., 2010).

3.2 Antioxidantes

Os antioxidantes são a defesa principal para o estresse oxidativo pelos radicais livres. Teoricamente, os impactos causados pelas ROS podem ser minimizados com a adição de antioxidantes no plasma seminal ou aos diluentes que são utilizados na criopreservação (SILVA et al., 2008).

Os antioxidantes possuem função inibitória na formação das ROS e de suas ações. No entanto, as enzimas antioxidantes intrínsecas não fornecem uma proteção total ao plasma seminal (ZINI et al., 2001). Ainda não há um consenso quanto a dosagem e o tipo de antioxidante ideal que forneça uma proteção da células espermática, pelo fato de que as

pesquisas utilizam diferentes metodologias, diversas formas de avaliação espermática e de diferenças na criopreservação de sêmen quanto as espécies, raças e aos ejaculados dos animais (SILVA et al., 2008).

Os mecanismos de defesa antioxidante encontradas no plasma seminal e nas células espermáticas se dividem em: sistemas enzimáticos e não enzimáticos. O sistema enzimático compreende enzimas como: superóxido desmutase, catalase, glutathione peroxidase e a glutathione reductase. A catalase age como catalisadora na reação de redução do peróxido de hidrogênio à água e oxigênio molecular. O seu papel como antioxidante minimiza o risco da formação do radical hidroxila a partir do peróxido de hidrogênio. Os antioxidantes não enzimáticos inclui-se: vitamina E, vitamina C, urato, glutathione reduzida, taurina, hipotaurina, ubiquinomas, carotenóides, ácido úrico e ácido lipóico (NORBERG & ÁRNER, 2001).

Sistemas enzimáticos podem atuar como removedores do agente oxidante, previamente a lesão celular (glutathione reduzida, superóxido desmutase, catalase, glutathione peroxidase e vitamina E) ou como reparadores das lesões já ocorridas (vitamina C, glutathione peroxidase, glutathione reductase). Grande parte destes elementos antioxidantes se encontram no meio intracelular, exceto a vitamina E, que também constitui a membrana espermática (FERREIRA & MATSUBARA, 1997).

4. Carnosina

A carnosina (β -alanil-L-histidina) é um dipeptídeo que ocorre de forma natural nos organismos de mamíferos, peixes e aves. Principalmente nos músculos esqueléticos, rins e cérebro em concentrações altas de cerca de 100mmol kg⁻¹ (DUNNET & HARRIS, 1997). Sua descoberta foi realizada por Gulewistch & Amiradzibi na Rússia no ano de 1900 da solução de extrato da carne de bovino (GARIBALLA & SINCLAIR, 2000). As pesquisas realizadas em mamíferos de diferentes espécies demonstram que a maior concentração se localiza no bulbo olfatório e é menor sua concentração no cérebro e medula espinhal (BONFANTI et al., 1999; DE MARCHIS, 2000).

A síntese da carnosina ocorre em diversas formas a partir dos aminoácidos beta-alanina e histidina, pela enzima carnosina sintetas, que é dependente do ATP com grande especificidade ao seu substrato. A enzima possui um domínio C-terminal, que pertence ao sítio catalítico responsável pela ligação da L-histidina com a beta-alanina e os aminoácidos relacionados (DROZAK et al., 2010). Entre as funções fisiológicas da carnosina, podemos destacar a regulação da sensibilidade do aparato contrátil ao cálcio, quelação de íons metálicos, tamponamento de íons de hidrogênio, liberação de cálcio contido nos retículos

sarcoplasmáticos na contração muscular, inibe a formação de produtos avançados da glicoxidação e lipooxidação e se demonstra um potencial antioxidante (DUTKA et al., 2012).

É de conhecimento que o dipeptídeo tem função de realizar os sequestro de radicais hidroxila, sendo assim possui ação antioxidante por efetivar a regulação de espécies reativas de oxigênio em volume intracelular e neutralizar os produtos oriundos da peroxidação lipídica como os aldeídos insaturados (KYRIAZIS, 2010).

A carnosina tem atuação no decaimento da senescência e longevidade de fibroblasto humanos, sendo conhecido como um potente agente antienvelhecimento, que está diretamente ligado a uma produção elevada de radicais livres, também com a glicação não enzimática de proteínas (HIPKISS et al., 1998). O envelhecimento tem como característica a modificação das proteínas como a oxidação, desaminação e glicação não enzimática. A ação antioxidante da carnosina é intermediado por diferentes maneiras que estão envolvidos neutralizar os radicais livres e o hidroxil, e quelar os íons metálicos (BOLDYREV; ALDINI; DERAIVE, 2013). Por ser hidrossolúvel, atua no citosol como um sistema antioxidativo, no qual os metais de transição e radicais livres mediadores estão em maior concentração (GARIBALLA; SINCLAIR, 2000). Segundo Rocha (2017) os testes realizados em sêmen de garanhões a quantificação de carnosina contida no ejacula obteve influência direta e positiva na neutralização de radicais livres, ocasionando a diminuição das lesões provocadas pelas ROS's.

5. CASA (computer-assisted sperm analysis)

O CASA é um sistema de análise computadorizada no qual consiste em uma alta sucessão de fotos das células espermáticas, que unidas formam um pequeno filme onde é possível identificar com precisão as informações de movimento dos espermatozoides (AMANN & KARTZ, 2004).

A captura das fotografias é realizada por um estroboscópio ligado ao computador, com a digitalização das imagens, um *software* as interliga e possibilita a formação do vídeo. O sistema realiza o trajeto do espermatozoide pela marcação da cabeça em cada quadro da imagem, essa marcação é realizada por ter uma viabilidade melhor acompanhar a cabeça e não outras peças como o flagelo (AMANN & KARTZ, 2004). A micrometragem varia conforme a espécie animal em um tamanho máximo e mínimo pré-estabelecido.

Após a identificação, os espermatozoides são classificados quanto a seu movimento que são: móvel não progressivo, imóvel, linear lento e linear rápido. Segundo Sousa (2002), para o estabelecimento de qual movimento a célula apresenta, é necessário a mensuração dos parâmetros:

- VAP: Velocidade de trajeto ($\mu\text{m/s}$); É a velocidade da trajetória média do espermatozoide.
- VSL: Velocidade progressiva ($\mu\text{m/s}$); É o espaço retilíneo percorrido dividido pelo tempo.
- VCL: Velocidade curvilínea ($\mu\text{m/s}$); É a velocidade da trajetória real.
- ALH: Amplitude de deslocamento lateral da cabeça (μm); É a largura média da variação da cabeça do espermatozoide em seu deslocamento.
- BCF: Frequência de batimento de flagelos (Hz); É a medida da frequência que a cabeça da célula ultrapassa a trajetória independente do direcionamento.
- STR: Retilinearidade (%); É o quanto o espermatozoide se afasta da trajetória considerando uma linha reta e estima a proximidade de um percurso retilíneo.
- LIN: Linearidade (%); É a medida do afastamento da célula de uma linha reta.

6. Citômetro de fluxo

O citômetro de fluxo permite a avaliação da célula espermática em uma série de características como: integridades das membranas plasmáticas e acrossomal, viabilidade e função celular. A técnica permite o isolamento, contagem e classificação dos espermatozoides, marcando as células com sondas específicas que unitariamente são movidas por um sistema detector óptico em fluxo laminar para a contagem (FREITAS-DELL'AQUA et al., 2009). A especificidade e variedade dos fluorocromos e suas conjugações de fluorescência possibilitam a análise com maior detalhamento da qualidade das células espermáticas nos níveis estruturais, bioquímicos e moleculares. A utilização da técnica também possibilita a avaliação de diversos parâmetros na amostra. As associações das sondas varia conforme o tipo de laser, dos filtros e dos detectores de radiação do aparelho. Sua composição é de basicamente quatro sistemas: fluido, óptico, eletrônico e software (HOSSAIN et al. 2011).

A avaliação da viabilidade espermática pode ser feita de diversas formas dos quais muitos são subjetivos e sua avaliação classifica-se em apto e não apto a reprodução, ignorando o fato da subfertilidade de certos indivíduos. A utilização da citometria de fluxo tem ganhado espaço e tendo maior utilização por seu alta repetibilidade nas análises bioquímicas e moleculares do sêmen mas também nos detalhes estruturais. A técnica se demonstra vantagem quando comparada com técnicas utilizadas rotineiramente para a viabilidade e integridade espermática, pois possibilita a avaliação de 10.000 espermatozoides em tempo extremamente reduzido entregando resultados mais ágeis e com maior exatidão (ARRUDA, 2000).

REFERÊNCIAS

AITKEN, R. J.; DE IULIIS, G. N.; FINNIE, J. M.; HEDGES, A.; MCLACHLAN, R. I. Analysis of the relationships between oxidative stress, DNA damage and sperm vitality in a patient population: development of diagnostic criteria. **Human Reproduction**, v.25, p.2415-2426, 2010.

ALBERTS, B. **Biologia Molecular da Célula**. 3 Ed. Porto Alegre: Artes médicas, 1294 p., 1997.

AMANN, R. P.; KATZ D. F. Reflections on CASA after 25 years. **Journal of Andrology**, v.25, p.317-325, 2004.

AMANN, R. P.; PICKETT, B. W. **Cryopreservation of semen**. In: Mckinnon A.O., Voss J.L. Equine reproduction. Philadelphia: Lea e Febiger, 789p. 1993.

AMANN, R. P.; PICKETT, B. W. Principles of cryopreservation and review of cryopreservation of stallion spermatozoa. **Journal of Equine Veterinary Science**, v.7, p.145-173, 1987.

ARRUDA, R.P. **Avaliação dos efeitos de diluidores e crioprotetores para o espermatozoídeo equino pelo uso de microscopia de epifluorescência, citometria de fluxo, análises computadorizadas da motilidade (CASA) e da morfometria (ASMA)**. 2000. 121f. Tese (Livre Docência) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2000.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL (ASBIA). Disponível em: <http://www.asbia.org.br/vendas-de-semen-crescem-18-e-atingem-mais-de-185-milhoes-de-doses-em-2019/>. Acesso em: 20 de março de 2020.

BOLDYREV, A. A.; ALDINI, G.; DERAIVE, W. Physiology and pathophysiology of carnosine. **Physiological reviews**, v.93, n.4, p.1803-1845, 2013.

BONFANTI, L.; PERETTO, P.; DE MARCHIS, S.; FALOSO, A. Carnosine – related dipeptides in the mammalian brain. **Prog Neurobiol**, v.59, p.333-353, 1999.

BORGES, J.C.; SILVA, M.R.; GUIMARÃES, J.D.; ESPER, C.R.; FRANCESCHINI, P.H. Membrana plasmática de espermatozoides bovinos: efeito metabólitos do oxigênio, antioxidantes e criopreservação. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte. v. 35, p. 303 – 314, 2011.

CELEGHINI, E. C. C. **Efeitos da criopreservação do sêmen bovino sobre as membranas plasmáticas, acrossomal e mitocondrial e estrutura da cromatina dos espermatozoides utilizando sondas fluorescentes**. São Paulo, 186p., 2005, Dissertação (Doutorado em Medicina Veterinária) – Departamento de reprodução animal. Universidade Federal de São Paulo. 2005.

DE MARCHIS, S.; MODENA, C.; PERETTO, P.; MIGHELI, A.; MARGOLIS, F. L. Carnosine- related dipeptides in neurons and glia. **Biochem**, v.65, p.824-833, 2000.

DROZAK, J.; CUNHA, M. V.; VERTOMMEN, D.; STROOBANT, V.; VAN SCHAFTINGEN, E. Molecular identification of carnosine synthase as ATP-grasp domain-containing protein 1 (ATPGD1). **Journal Biol Chem**, v.285, p. 9346-9356, 2010.

DUNNET, M.; HARRIS, R.C. High-performance liquid chromatographic determination of imidazole dipeptides, histidine, 1-methylhistidine and 3-methylhistidine in equine and camel muscle and individual muscle fibres. **Journal Chromatography Biomedical Science Application**, v.688, p.47-55, 1997.

DUTKA, T. L.; LAMBOLEY, C. R.; MCKENNA, M. J.; MURPHY, R. M.; LAMB, G. D. Effects of carnosine on contractile apparatus Ca^{2+} sensitivity and sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} release in human skeletal muscle fibers. **Journal of Applied Physiology**, v.112, n.5, p.728-736, 2012.

FERREIRA, A. L. A.; MATSUBARA, L. S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v.43, n.1, p.61-68, 1997.

FREITAS-DELL'AQUA, C.P.; CRESPILO, A.M.; PAPA F.O.; DELL'AQUA JUNIOR, J.A. Metodologia de avaliação laboratorial do sêmen congelado bovino. **Rev Bras Reprod Anim**, v.33, p.213-222, 2009.

GARIBALLA, S. E.; SINCLAIR, A. J. Carnosine: physiological properties and therapeutic potential. **Age and Ageing**, v.29, n.3, p.207-210, 2000.

GIRAUD, M. N.; MOTTA, C.; BOUCHER, D., GRIZARD, G. Membrane fluidity predicts the outcome of cryopreservation of human spermatozoa. **Human Reproduction**, v.15, p.2160-2164, 2000.

HIPKISS, A. R.; WORTHINGTON, V. C.; HIMSWORTH, D. T. J.; HERWING, W. Protective effects of carnosine against protein modification mediated by malondialdehyde and hypochlorite. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – General subjects**, v.1380, n.1, p.46-54, 1998.

HOSSAIN, M.D.S.; JOHANISSON, A.; WALLGREEN, M.; NAGY, S.; SIQUEIRA, A.P.; RODRIGUEZ- MARTINEZ, H. Flow cytometry for the assessment of animal sperm integrity and functionality: state of the art. **J Androl**, v.13 p.406-419, 2011.

KYRIAZIS, M. Anti-ageing potential of carnosine, approaches toward successful ageing. **Drug Discovery Today**, v.3, n.7, p.45-49, 2010.

MAKKER, K.; AGARWAL, A.; SHAMAR, R. Oxidative stress & male infertility. **Indian Journal of Medical Research**, v.129, p.357-367, 2009.

Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Projeções do Agronegócio–Brasil 2016/2017 a 2026/2027. 2017. 125p. Disponível em: www.agricultura.gov.br/assuntos/politica-agricola/todaspublicacoes-de-politicaagricola/projecoes-do-agronegocio-2017-a-2027-versaopreliminar-25-07-2017.pdf/view. Acesso em 01 de maio de 2018.

NAIR, S. J.; BRAR, A. S.; AHUJA, C. S.; SANGHA, S. P. S.; CHAUDHARY, K. C. A comparative study on lipid peroxidation, activities of antioxidante enzymes and viability of cattle and buffalo bull spermatozoa during storage at refrigerantion temperature. **Animal Reproduction Science**, v.96, p.21-29, 2006.

NICHI, M.; GOOVAERTS, I.G.F.; CORTADA, C.N.M.; BARNABE, V.H.; DECLERCQ, J.B.P.; BOLS, P.E.J. Roles of lipid peroxidation and cytoplasmic droplets on *in vitro* fertilization capacity of sperm collected from bovine epididymis stored at 4 and 34 °C. **Theriogenology**, v.67, p.334-340, 2007.

NORBERG, J.; ÁRNER, E. S. J. Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thiredoxin system. **Free Radical Biology & Medicine**, v.31, p.1287-1312, 2001.

O’FLAHERTY, C. M.; BEORLEGUI, N. B.; BECONI, M. T. Reactive oxygen species requirements for bovine sperm capacitation and acrosome reaction. **Theriogenology**, v.52, p.289-301, 1999.

PARKS, J. E. Hypothermia and Mammalian gametes. **Reproduction Tissue Banking: scientific principles**. San Diego: Academic Press, p. 229-261, 1997.

ROCHA, C. C. **Identificação e quantificação da carnosina no plasma seminal, características seminais e congelabilidade do sêmen de garanhões**. São Paulo, 91p., 2017, Tese (Doutorado) – Departamento de reprodução animal. Universidade de São Paulo. 2017.

ROCHA, C.C.; KAWAI G.K.V.; LOSANO J.D.A.; ANGRIMANI D.S.R.; RUI B.R.; BICUDO L.C.; SILVA B.C.S.; ALONSO M.A.; MENDES C.M.; ASSUMPÇÃO M.E.O.D.; PEREIRA R.J.G.; BARNABE V.H.; NICHI M. Carnosine as malondialdehyde scavenger in stallion seminal plasma and its role in sperm function and oxidative status. **Theriogenology**, v.119, p. 10-17, 2018.

SALEH, R. A.; AGARWAL, A. Oxidative stress and male infertility: from research bench to clinical practice. **Journal of andrology**, v.23, p.737-752, 2002.

SANOKA, D.; KURPISZ, M. Reactive oxygen species and sperm cells. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v.2, p.12-19, 2004.

SHARMA, R. K.; AGARWAL, A. Role of reactive oxygen species in male infertility. **Urology**, v.48, p.835-850, 1996.

SIKKA, S. C. Role of oxidative stress and antioxidants in andrology and assisted reproductive technology. **Journal of andrology**, v.25, p.5-18, 2004.

SILVA, K. M. G.; GAMBOA, S. C.; RODRIGUES, A. S.; SANTOS, J. R.; GUERRA, M. M. Adição de piruvato de sódio e trolox ao diluidor utilizado para a congelação de sêmen de garanhões férteis e subférteis. **Ciência Rural**, v.38, n.8, p.2271-2277, 2008.

SOUSA, D. B. **Viabilidade do sistema Equitainer® na refrigeração do sêmen ovino avaliado pelas análises computadorizada, de microscopia epifluorescente e inseminação artificial**. 2002. Dissertação - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, SP, 2002.

TURNER, R. M. Tales from the tail: what do we really know about sperm motility? **Journal of Andrology**, v.24, p. 790-802, 2003.

WATSON, P. F. Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function. **Reprod Fertil Dev**, v.7, p.871-891, 1995.

WATSON, P. F. The roles of lipid and protein in the protection of ram spermatozoa at 5°C by egg-yolk lipoprotein. **Journal Repro Fertil**, v.62, p.483-492, 1981

ZINI, A.; KAMAL, K.; PHANG, D. Biologic variability of sperm DNA denaturation in infertile men. **Urology**, v.58, p.259-261, 2001.

ARTIGO

*Artigo redigido conforme os padrões exigidos pela Revista Brasileira de Reprodução Animal:

<http://cbra.org.br/br/publicacoes/revista-brasileira-de-reproducao-animal/instrucoes-rbra/>

ADIÇÃO DE CARNOSINA COMO ANTIOXIDANTE EM SÊMEN BOVINO CONGELADO

ADDITION OF CARNOSINE AS ANTIOXIDANT IN FROZEN BOVINE SEMEN

Mozarth Vieira Junior¹, Eliane Vianna da Costa e Silva¹, Gustavo Guerino Macedo¹, Willian Vaniel Alves dos Reis¹, Raiza Rocha Pereira¹, Bianca Rodrigues Acácio¹, Breno Fernandes Barreto Sampaio^{1*}

¹Univerdade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS, Brasil

*Autor para correspondência – breno.sampaio@ufms.br

Resumo

As biotecnologia aplicadas a reprodução tem constantemente destacando-se na área de produção animal, devido ao fato de elevar as taxas de fertilidade e ganhos genéticos dos rebanhos. Neste cenário, a utilização do sêmen congelado tem destaque por facilitar o intercâmbio de genes e aumentar a disseminação da genética de um macho em uma grande quantidade de fêmeas. Porém, ainda há algumas dificuldades na qualidade final dos espermatozoides após o descongelamento, principalmente ligado a lesões ocasionadas pelas ações das espécies reativas a oxigênio (ERO's). Objetivou-se avaliar a ação antioxidante da proteína carnosina em sêmen congelado de bovinos adicionando a um diluente comercial, tentando neutralizar ou diminuir as lesões ocasionadas pelas ações das espécies reativas. Foram utilizados 15 ejaculados de 5 touros adultos da raça Nelore divididos em três grupos de diluidores com diferentes concentrações de carnosina (100ng/ml, 200ng/ml e 300ng/ml) e um grupo apenas com o diluente de congelação (controle), as amostras foram submetidas ao teste de termo-regulação (TTR) rápida em incubação de 46°C durante 30 minutos e avaliadas em dois momentos, no descongelamento (M0) e após a TTR (M30), as avaliações foram realizadas usando-se o sistema de análise computadorizada do movimento espermático (CASA) para a avaliação da cinética espermática e citometria de fluxo para a quantificação de células lesionadas e quais componentes acometidos. Os resultados obtidos não demonstraram diferença estatística ($P < 0,05$) na ação antioxidante, porém também não demonstrou afetar negativamente os parâmetros de motilidade e de oxidação do espermatozoide.

Palavras-chave: Lipoperoxidação, radicais livres, motilidade, crioprotetor.

Abstract

Biotechnology applied to reproduction has constantly stood out in the area of animal production, due to the fact of raising the fertility rates and genetic gains of herds. In this scenario, the use of frozen semen stands out for facilitating the exchange of genes and increasing the dissemination of a male's genetics in a large number of females. However, there are still some difficulties in the final quality of sperm after thawing, mainly linked to injuries caused by the actions of reactive oxygen species (ROSs). The objective was to evaluate the antioxidant action of carnosine protein in frozen bovine semen by adding it to a commercial diluent, trying to neutralize or reduce the lesions caused by the actions of reactive species.

Fifteen ejaculates from 5 adult Nelore bulls were used, divided into three groups of thinners with different concentrations of carnosine (100ng / ml, 200ng / ml and 300ng / ml) and one group with only the freezing diluent (control), the samples were subjected to the rapid thermo-regulation test (TTR) in an incubation of 46°C for 30 minutes and evaluated in two moments, in thawing (M0) and after TTR (M30), the evaluations were performed using the computerized analysis system sperm movement (CASA) for the evaluation of sperm kinetics and flow cytometry for the quantification of injured cells and which components are affected. The results obtained did not demonstrate a statistical difference ($P < 0.05$) in the antioxidant action, but it also did not demonstrate to negatively affect the motility and oxidation parameters of the sperm.

Keywords: Lipoperoxidation, free radicals, motility, cryoprotectant.

Introdução

Com destaque na pecuária mundial, o Brasil, por contar com grandes extensões terrestres possui potencial para aumentar sua produção, e conseguir atender as demandas internas e externas. O setor da pecuária de corte há um protagonismo por atender os rígidos parâmetros de exportação que outros países exigem. Para haver aumento de lucro do produtor, o emprego das biotecnologias tornam-se necessárias para possibilitar a otimização dos sistemas de produção. As biotecnologias com foco na reprodução, possibilitam a maximização dos ganhos genéticos com animais que apresentam maior produtividade (MAPA, 2017).

A técnica de inseminação artificial em tempo fixo, em bovinos é a biotecnologia de maior viabilidade econômica para aumentar o ganho genético dos rebanhos. O comércio de sêmen quando comparado os anos de 2018 e 2019, apresentaram alta de cerca de 14% na produção com um total de cerca de 10 milhões de doses, e para exportação cerca de 16%, sendo encabeçado por sêmen de animais destinados ao corte (ASBIA, 2020). Na técnica da IATF, o sêmen utilizado tem fundamental importância no resultado final, não dizendo somente ao doador do material genético, mas também a uma série de eventos que ocorrem durante o processo de congelamento e descongelamento. A criopreservação de sêmen bovino possui grande importância para a conservação de material genético de touros, por tempo indeterminado, o que possibilita o resgate de genes perdidos que expressam características desejadas para certas situações (WATSON, 1995).

Para a otimização da qualidade e viabilidade do sêmen após o processo de descongelamento é a neutralização das moléculas pró-oxidantes, produzidas pelo espermatozoide por seu metabolismo aeróbico, durante o processo de congelamento e descongelamento há uma elevação na produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) através de processo de respiração celular, com o aumento da concentração dessas moléculas oxidativas há também o comprometimento das membranas plasmática e acrossomal concomitante com a elevação permeabilidade e peroxidação lipídica (SANOKA et al., 2004; BORGES et al., 2011).

Dentre várias moléculas com função antioxidativa, a carnosina (β -alanil-L-histidina) apesar de recente seu uso como potencial antioxidante, possui diversas funções como tampão fisiológico, cicatrizante e agente antiglicante. A carnosina age eliminando os produtos da peroxidação lipídica, com especial predileção a molécula malondialdeído (MDA). O experimento teve como objetivo a adição da carnosina ao diluente de congelamento em concentrações diferentes e realizar a análise dos parâmetros de motilidade e de nívelação de danos ocasionados pela ação das espécies reativas a oxigênio e atestar sua função antioxidante (DROZAK et al., 2010).

Material e métodos

Considerações éticas e local de desenvolvimento da pesquisa

Este experimento foi aprovado pela Comissão de Ética de Uso Animal (CEUA) da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, sob o protocolo nº 1.082/2019. Após a aprovação o estudo foi conduzido no laboratório de Reprodução Animal da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul.

Coleta do sêmen, processo de congelamento e análises

Foram utilizados 15 ejaculados, obtidos de cinco touros com idades superiores a 24 meses, Nelore, com fertilidade comprovada para submeter o sêmen ao processo de congelamento onde motilidade mínima

de 60%, vigor mínimo de 3 e concentração média de 350×10^6 de espermatozoides por ml, conforme determinado pelo Colégio Brasileiro de Reprodução Animal. Foram realizadas 3 coletas por touro através da técnica de eletroejaculação, previamente a coleta foi realizada a higienização interna e externa do prepúcio com tricotomia e lavagem com solução fisiológica (NaCl 0,9%), todos os animais foram coletados no mesmo dia e sob as mesmas condições.

As amostras de sêmen foram mantidas em banho-maria a 37°C e submetidas a análises das variáveis macroscópicas (volume, aspecto e cor) e microscópicas (motilidade, vigor, concentração e morfologia espermática). Para a análise subjetiva de motilidade (0 – 100%) e vigor (escore 0 – 5), uma alíquota (10µl) foi depositada entre a lâmina e lamínula previamente aquecidas e mantidas a 37°C sobre a mesa aquecedora e posteriormente avaliadas em microscópio óptico de contraste de fase com objetiva de 200x.

Para a análise de concentração espermática, uma amostra (10µl) de sêmen foi diluída em 2000µl de água destilada (1:200) e realizada a contagem em câmara de Neubauer. A partir do estabelecimento da concentração foi adicionado o diluente comercial BotuBov® estabelecendo a concentração de 30 milhões de espermatozoides viáveis por palheta de volume de 0,5 ml. Cada ejaculado foi distribuído em 4 grupos experimentais, sendo: CONT (controle – contém somente o diluente para o congelamento), CAR1 (100 ng/ml de carnosina), CAR2 (200ng/ml) e CAR3 (300ng/ml), foi utilizado a carnosina sólida (Sigma – Aldrich Brasil Ltda, São Paulo – SP) previamente diluída em água deionizada.

Após o envase iniciou-se o processo de congelamento lento convencional em que as palhetas foram acomodadas em caixa térmica de gelo por 4 horas, sob refrigeração a 5°C, para a estabilização dos espermatozoides como aponta Leite et al. (2010), após esse período foram realocadas para uma caixa de isopor que continha nitrogênio líquido mantendo uma distância de 5cm da lâmina do líquido por 20 minutos, após o tempo decorrido as palhetas foram mergulhadas totalmente reduzindo a temperatura a -196°C, após o término do processo foram armazenadas em um botijão criogênico.

O processo de descongelamento foi realizado com a submersão da palheta em banho-maria à 37°C por 30 segundos, imediatamente uma parcela da amostra foi retirada para a análise pós-descongelamento (M0) no sistema de análise computadorizada do movimento espermático (CASA) e citometria de fluxo, o restante da amostra foi devidamente acomodada em um eppendorf e direcionado para o processo de teste de termo resistência (TTR), sendo incubado por 30 minutos à 46°C, após decorrido o tempo a amostra foi submetida a segunda análise (M30). A utilização do teste de termo resistência tem como objetivo aproximar o máximo o ambiente do trato genital da fêmea, forçando reações que deveriam ocorrer no interior da fêmea a ocorrerem em eppendorfs.

A avaliação no CASA foi realizada acomodando uma parcela de 10µl do ejaculado na câmara de contagem, posteriormente foi realizado a captura de 5 campos aleatórios, fornecendo os resultados médios de valores de motilidade. As avaliações pela citometria de fluxo foram realizadas com a utilização de sondas fluorescentes e as quantidades conforme a Tabela 1. A avaliação da integridade acrossomal e da membrana plasmática foi utilizado a conjugação de Hoeschst, iodeto de propício (PI) e FITC-PNA (aglutinina de Peanut associada a isotiocianato de fluoresceína) conforme afirma Freitas-Dell'Aqua et al.(2012) e modificado adicionando MitoStatus Red (MST). Para a fluidez de membrana foi utilizada a associação de Hoechst, Yopro e Mericianina. Das amostras retirou-se uma alíquota de 200µl de sêmen e diluiu-se em TALP-PVA na concentração de 5×10^6 de spz/ml e adicionando-se a mistura de sondas, posteriormente incubadas por 20 minutos em banho-maria à 37°C sem a incidência de luminosidade. Para a avaliação de peroxidação lipídica foi utilizada a associação de Hoechst e Bodipy conforme indicado por Guasti et al., diluindo 500µl de sêmen em TALP-PVA e incubado por 30 minutos à 37°C, após o tempo decorrido foi realizado 2 lavagens seguidas por centrifugação de 300g durante 5 minutos, o pellet produzido foi ressuspenso em 500µl de TALP-PVA.

Para a análise dos dados utilizou-se o software SAS (Statistical Analysis System), utilizando o método de análise de variância, considerando os efeitos fixos de momento e tratamento com nível de significância de 5%.

Resultados e discussão

As amostras não apresentaram diferença estatística significativa ($P < 0,05$). No descongelamento (M0), o grupo CAR3 descongelou com média pouco maior que o grupo controle, indicando que o fator de crioproteção da carnosina começa a ser observado na concentração de 300ng/ml. Em experimentos conduzido por Rocha et al. (2018) em sêmen garanhões, os grupos com maiores concentrações de carnosina demonstraram congelabilidade melhor, quando comparado com grupos que possuíam menor

concentrações, guardadas as diferenças entre espécies, os resultados nos espermetazoides de bovinos corroboram com os apontados no experimento. Os parâmetros de motilidade espermática podem ser observados na Tabela 1.

Tabela 1. Média e DP dos parâmetros de motilidade total (MT), motilidade progressiva (MP), velocidade de trajeto (VAP), velocidade de trajeto (VSL) e deslocamento de cabeça (ALH) avaliada por CASA (Computer Assisted Semen Analyzer) nos momentos M0 e M30.

Item	Tratamento			
	CONT	CAR1	CAR2	CAR3
M0				
MT(%)	55,56 ± 22,37	54,04 ± 16,67	53,49 ± 14,66	60,91 ± 19,38
MP(%)	37,11 ± 18,71	37,11 ± 18,71	35,62 ± 12,63	41,09 ± 15,72
VAP(μm/s)	36,15 ± 7,08	36,15 ± 7,08	36,61 ± 7,91	36,94 ± 9,16
VSL(μm/s)	30,08 ± 6,54	31,00 ± 7,87	30,51 ± 7,78	31,02 ± 9,08
ALH (μm)	2,2 ± 0,16	2,2 ± 0,12	2,29 ± 0,23	2,2 ± 0,13
M30				
MT(%)	30,41 ± 16,36	29,09 ± 16,07	31,61 ± 16,01	31,08 ± 15,84
MP(%)	18,58 ± 12,49	17,55 ± 12,27	18,69 ± 12,15	18,16 ± 11,95
VAP(μm/s)	23,26 ± 11,87	26,86 ± 11,55	24,13 ± 11,21	26,23 ± 10,82
VSL(μm/s)	19,48 ± 11,82	23,02 ± 11,48	20,26 ± 11,12	22,74 ± 10,76
ALH (μm)	1,82 ± 0,39	1,78 ± 0,38	1,89 ± 0,38	1,78 ± 0,37

CONT (controle), CAR1 (carnosina 100ng/ml), CAR2 (200ng/ml), CAR3 (300ng/ml), M0 (pós descongelamento), M30 (após TTR).

A adição das concentrações de carnosina não demonstraram influência no parâmetro de motilidade dos espermatozoides bovinos, resultados que divergem do experimento de Losano et al. (2017) que submeteu sêmen de cães à diferentes concentrações de carnosina e constatou sua influência negativa na motilidade conforme aumentava-se a dosagem. A carnosina pode ter influência na produção de ATP, sugere-se que a ação desse dipeptídeo possui influência direta na inibição da glicólise e por consequência diminuindo a produção de ATP (BEORLEGUI et al., 1997; HIPKISS & GAUNITZ, 2014).

Os resultados da ação antioxidativa da carnosina, também não apresentaram diferenças entre os grupos. Porém novamente o grupo CAR3 após o M30, demonstrou médias superiores de espermatozoides não peroxidados, o que aponta guardada as respectivas proporções a concentração com melhores resultados para a peroxidação. A potencial função antioxidativa da carnosina demonstrou parâmetros melhores na concentração 300ng/ml.

O potencial mitocondrial dos espermatozoides mensurados, o grupo CAR1 demonstrou menor taxa de decaimento quando comparado com os dois momentos de análise, isso por ter a menor concentração de carnosina, o que possivelmente influenciou pouco a produção de ATP. Porém o grupo CAR3 mostrou os maiores níveis de alta performance mitocondrial.

Tabela 2. Percentual de células espermáticas lesionadas antes e após o processo de TTR de acordo com a adição de carnosina

Item (%)	Tratamento			
	CONT	CAR1	CAR2	CAR3
M0				
MPI/ACI	55,22 ± 0,18	52,59 ± 0,18	48,55 ± 0,18	51,48 ± 0,18
PI-/MS+	12,07 ± 0,13	4,75 ± 0,12	9,67 ± 0,14	10,48 ± 0,15
YO-/MERO-	22,49 ± 0,23	31,83 ± 0,23	13,94 ± 0,23	13,17 ± 0,24
BO	21,92 ± 0,14	23,66 ± 0,14	23,24 ± 0,14	24,81 ± 0,14
M30				
MPI/ACI	35,83 ± 0,18	37,54 ± 0,18	32,37 ± 0,18	38,50 ± 0,17
PI-/MS+	5,47 ± 0,07	3,40 ± 0,07	2,74 ± 0,07	8,23 ± 0,08
YO-/MERO-	18,74 ± 0,27	25,13 ± 0,27	24,30 ± 0,26	20,05 ± 0,27
BO	18,42 ± 0,14	11,54 ± 0,14	10,98 ± 0,14	20,19 ± 0,13

MPI/ACI (membrana plasmática e acrossoma íntegro), PI-/MS+ (integridade de membrana e potencial mitocondrial), YO-/MERO- (permeabilidade de membrana), BO (peroxidação lipídica)

Os resultados, quando comparados entre a motilidade espermática e a peroxidação, mostram uma relação, em que o grupo que apresentou uma motilidade relativamente menor (CAR1), também foi o que houve a maior parcela de lipoperoxidação ao decorrer do teste. Os resultados corroboram com a pesquisa de Beorlegui et al. (1997), que relacionaram a baixa motilidade espermática de bovinos, com a elevação da produção de espécies reativas a oxigênio, levando consequentemente a maior peroxidação da membrana plasmática induzida pelo cálcio ionóforo. Nesses dados, é demonstrado também que os espermatozoides com menores lesões de membrana plasmática, tem melhor capacidade de passar pela reação acrossomal.

Possivelmente a carnosina não teve influência nas taxas de motilidade devido a fonte de obtenção de ATP do espermatozoide bovino. Em experimentos com cães e equinos a carnosina apresentou relação negativa quanto a dose e motilidade, pois a cerca de 90% da obtenção energética é em forma de fosforilação oxidativa, enquanto o espermatozoide bovino obtém cerca de 60% de glicólise e o restante da fosforilação. Ou seja, tendo uma variação de fonte energética, a influência do carnosina principalmente na molécula de piruvato, é mais prejudicial para as células com predominância maior do processo de fosforilação oxidativa.

As análises realizadas pela citometria de fluxo, mostram também que o grupo CAR3 apresentou maior estabilidade quanto a integridade de acrossoma, quando comparados com outros grupos, como demonstrado na figura 1.

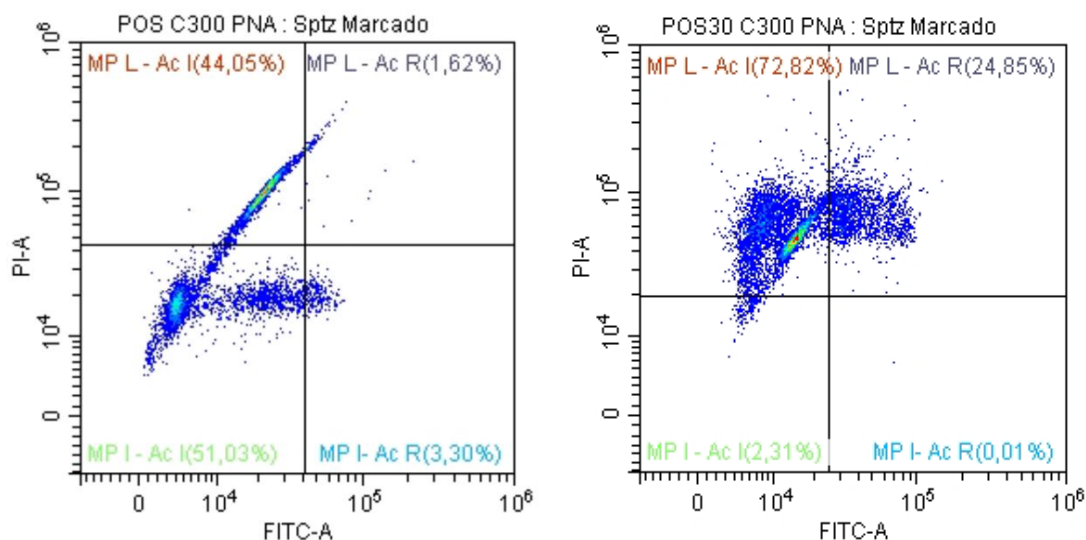


Figura 2. Exemplificação sobre a comparação entre integridade de acrossoma no M0 e M30 de amostra de CAR3 (300ng/ml).

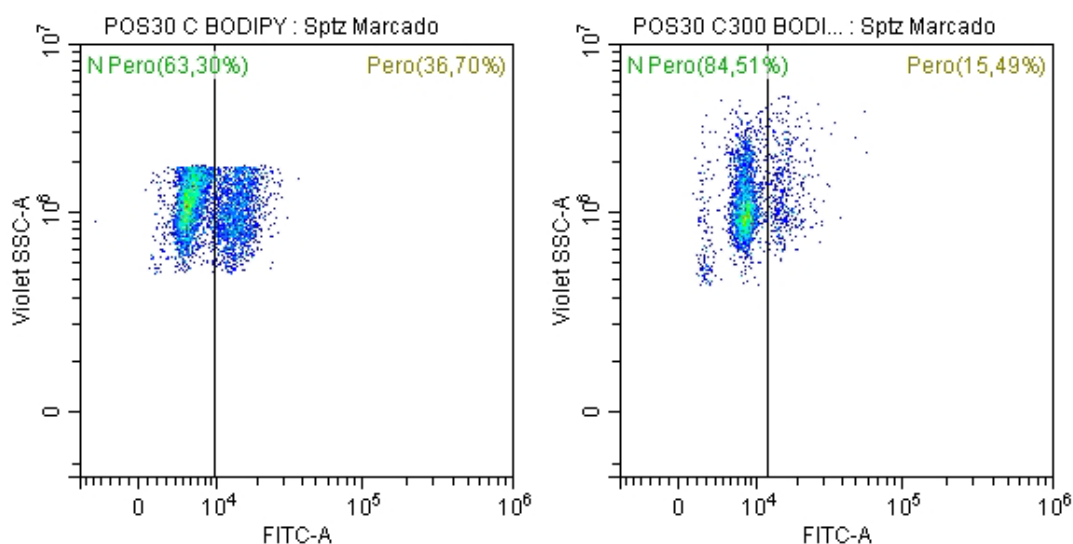


Figura 1. Comparativo de peroxidação lipídica entre amostras dos grupos CONT e CAR3 da mesma partida, ambas avaliadas no M30.

As avaliações sobre integridade de acrossoma (Fig. 1) e peroxidação lipídica (Fig. 2) do grupo CAR3, apresentam valores superiores, consequentemente, o valor biológico de viabilidade espermática da amostra demonstra melhor qualidade. Evidentemente o processo de criopreservação afeta diversos atributos estruturais e fisiológicos dos espermatozoides, afetando diretamente o tempo e as taxas de fertilização, sendo assim, economicamente representa um aproveitamento melhor de doses de sêmen, possibilitando que os ejaculados de touros congelados tenham melhor qualidade e aproveitamento nos processos de fertilização.

A susceptibilidade às lesões oxidativas, possuem uma vasta variação sobre os indivíduos, espécies e ejaculados, com isso a incidência e a gravidade das peroxidações também possuem diferenças segundo Maia e Bicudo (2009), mas a questão mais importante é a severidade das lesões causadas e não a presença dessas espécies reativas a oxigênio no sêmen.

Conclusão

Conclui-se que a adição de carnosina nas proporções testadas, não surtiram efeito antioxidativo, porém observou-se valor biológico superiores dos espermatozoides, a literatura escassa sobre a sua influência sobre o sêmen bovino dificulta a relação comparativa de resultados, sendo necessários novos experimentos com maiores concentrações para atestar sua real efetividade.

Agradecimentos

A toda a equipe do laboratório de pesquisa de Reprodução Animal da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul e a CAPES pelo apoio e fomento à pesquisa desenvolvida.

Referências

- ASBIA - ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL.** Disponível em: <http://www.asbia.org.br/vendas-de-semen-crescem-18-e-atingem-mais-de-185-milhoes-de-doses-em-2019/>. Acesso em: 20 de março de 2020.
- Beorlegui N, Cetica P, Trinchero G, Córdoba M, Beconi M.** Comparative study of functional and biochemical parameters in frozen bovine sperm. *Andrologia*, 29º ed, p.37-42, 1997.
- Borges JC, Silva MR, Guimarães JD, Esper CR, Franceschini PH.** Membrana plasmática de espermatozoides bovinos: efeito metabólitos do oxigênio, antioxidantes e criopreservação. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, Belo Horizonte. v. 35, p. 303 – 314, 2011.
- CBRA – Colégio Brasileiro de Reprodução Animal.** Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal. Belo Horizonte, 3º ed., 104 p., 2013.
- Drozak J, Cunha MV, Vertommen D, Stroobant V, Van schaftingen E.** Molecular identification of carnosine synthase as ATP-grasp domain-containing protein 1 (ATPGD1). *Journal Biol Chem*, v.285, p. 9346-9356, 2010.
- Freitas-Dell'Aqua CP, Guasti PN, Monteiro GA, Maziero RRD, Dell'Aqua Jr JA, Papa FO.** Flow cytometric analysis of fertile and subfertile frozen stallion spermatozoa. *Animal Reproduction*, v.9, p. 941, 2012.
- Gariballa SE, Sinclair AJ.** Carnosine: physiological properties and therapeutic potential. *Age and Ageing*, 3ºed, v.29, p. 207-210, 2000.
- Guasti PN, Freitas-Dell'aqua CP, Maziero RRD, Hartwig FP, Monteiro GA, Lisboa FP.** Validation of flow cytometry for assessment of membrane lipid peroxidation of equine spermatozoa. *Animal Reproduction*, v.9, p.929, 2012
- Hipkiss AR, Gaunitz F.** Inhibition of tumour cell growth by carnosine: some possible mechanisms. *Amino Acids*. 2ºed, v.46, p.327-337, 2014.
- Leite TG, Vale Filho VR, Arruda RP, Andrade AFC, Emerick LL, Zaffalon FG, Martins JAM, Andrade VJ.** Effects of extender and equilibration time on post-thaw and membrane integrity of cryopreserved Gyr bull semen evaluated by CASA and flow cytometry. *Animal Reproduction Science*, v.120, p. 31-38, 2010.
- Losano JDA, Angrimani DSR, Redondo RF, Brito MM, Rui BR, Kawai GKV, Silva BCS, Mendes CM, Assumpção MEOD, Nichi M.** Deleterious effect of high carnosine concentration in extenders during sperm cryopreservation in dogs. *Journal of veterinary andrology*, 2ºed, v.2, p. 60-67, 2017.

Mais MS, Bicudo SD. Radicais livres, antioxidantes e função espermática em mamíferos: uma revisão. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, Belo Horizonte, 4ªed, v.33, p.183-293, 2009.

Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Projeções do Agronegócio–Brasil 2016/2017 a 2026/2027. 2017. 125p. Disponível em: www.agricultura.gov.br/assuntos/politica-agricola/todaspublicacoes-de-politicaagricola/projecoes-do-agronegocio-2017-a-2027-versaopreliminar-25-07-2017.pdf/view. Acesso em 01 de maio de 2018.

Oppermann H, Schnabel L, Meixensberger J, Gaunitz F. Pyruvate attenuates the anti-neoplastic effect of carnosine independently from oxidative phosphorylation. *Oncotarget*, v.7, p. 46-49, 2016.

Rocha CC, Kawai GKV, Losano JDA, Angrimani DSR, Rui BR, Bicudo LC, Silva BCS, Alonso MA, Mendes CM, Assumpção MEOD, Pereira RJG, Barnabe VH, Nichi M. Carnosine as malondialdehyde scavenger in stallion seminal plasma and its role in sperm function and oxidative status. *Theriogenology*, v.119, p10-17, 2018.

Sanoka D, Kurpisz M. Reactive oxygen species and sperm cells. *Reproductive Biology and Endocrinology*, v.2, p.12-19, 2004.

SAS Institute. Statistical Analysis System: user guide [CD-ROM]. Version 8. Cary (NC): SAS Institute Inc., 2001.

WATSON PF. Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function. *Reprod Fertil Dev*, v.7, p.871-891, 1995.

ANEXO I – Certificado de aprovação da Comissão de Ética de Uso de Animais (CEUA)

Serviço Público Federal
Ministério da Educação

Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul

**CERTIFICADO**

Certificamos que a proposta intitulada “Efeitos de diferentes aditivos antioxidantes na criopreservação de sêmen de bovinos”, registrada com o nº 1.082/2019, sob a responsabilidade de **Eliane Vianna da Costa e Silva** - que envolve a utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata, para fins de pesquisa científica - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS/CEUA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL/UFMS, na 7ª reunião ordinária do dia 26/09/2019.

FINALIDADE	() Ensino (x) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	02/09/2019 a 28/02/2020
Espécie/Linhagem/Raça	<i>Bos indicus</i> / Nelore
Nº de animais	5
Peso/Idade	450 kg / Adulto
Sexo	Machos
Origem	Fazenda Escola / FAMEZ

Fábio José Carvalho Faria
Coordenador da CEUA/UFMS
Campo Grande, 30 de setembro de 2019.