

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

**“ADIÇÃO DE L-CISTEÍNA SOBRE PARÂMETROS ESPERMÁTICOS DE
DOSES INSEMINANTES DE SÊMEN SUÍNO ARMAZENADAS À 5 °C”**

GUILHERME DOS SANTOS

PORTO ALEGRE

2022

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

“ADIÇÃO DE L-CISTEÍNA SOBRE PARÂMETROS ESPERMÁTICOS DE DOSES
INSEMINANTES DE SÊMEN SUÍNO ARMAZENADAS À 5 °C”

Autor: Guilherme Dos Santos

Dissertação apresentada como requisito parcial
para obtenção do grau de Mestre em Ciências
Veterinárias na área de Biotécnicas e
Fisiopatologia da Reprodução Animal

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Ana Paula Gonçalves
Mellagi.

Coorientador: Prof. Dr. Rafael da Rosa
Ulguim

PORTO ALEGRE

2022

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001

CIP - Catalogação na Publicação

Dos Santos, Guilherme
"ADIÇÃO DE L-CISTEÍNA SOBRE PARÂMETROS ESPERMÁTICOS
DE DOSES INSEMINANTES DE SÊMEN SUÍNO ARMAZENADAS À 5
°C" / Guilherme Dos Santos. -- 2022.
72 f.
Orientadora: Ana Paula Gonçalves Mellagi.

Coorientador: Rafael Da Rosa Ulguim.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do
Rio Grande do Sul, Faculdade de Veterinária, Programa
de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Porto
Alegre, BR-RS, 2022.

1. Suinocultura. 2. Reprodução Animal. 3.
Andrologia. 4. Antioxidante. 5. Célula. I. Gonçalves
Mellagi, Ana Paula, orient. II. Da Rosa Ulguim,
Rafael, coorient. III. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

GUILHERME DOS SANTOS

“ADIÇÃO DE L-CISTEÍNA SOBRE PARÂMETROS ESPERMÁTICOS DE DOSES
INSEMINANTES DE SÊMEN SUÍNO ARMAZENADAS À 5 °C”

Aprovado em 10 de março de 2022

APROVADO POR:

Prof^a. Dr^a. Ana Paula Gonçalves Mellagi
Orientadora e Presidente da Comissão

Prof . Dr. Ivan Cunha Bustamante Filho
Membro da Comissão

Prof^a. Dr^a. Mari Lourdes Bernardi
Membro da Comissão

Prof . Dr. Marcelo Bertolini
Membro da Comissão

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, que permitiu com que meus sonhos se tornassem realidade e que meus objetivos fossem alcançados. Agradeço pela saúde e pela resiliência para que eu pudesse finalizar mais esta etapa na minha vida, agradeço também pelas oportunidades, aprendizado e sabedoria.

Aos meus pais, Jacinta e Airton, por todo o apoio emocional e financeiro, por nunca desistirem e sempre sonharem junto comigo. Agradeço também ao meu irmão Leandro e a minha cunhada Cezane, por sempre estarem presentes, mesmo que fisicamente longe. O apoio de todos vocês foi essencial para que eu conseguisse concluir essa jornada.

Aos meus amigos de vida: Patrícia, Paula, Sheyla, Leticia, Jade, Malu e Diogo por muitas vezes me ouvirem reclamar e desabafar. Agradeço por todo o apoio durante esse processo, sem dúvidas a caminhada foi muito mais leve com vocês.

A minha orientadora Ana Paula, que além de um exemplo e inspiração profissional se tornou uma grande amiga. Agradeço por todo o apoio técnico, científico, psicológico, cultural e culinário. Sou muito feliz em poder afirmar que durante todo o período do mestrado, obtive todos os recursos e caminhos necessários para trilhar essa fase, nunca faltando nada, por isso, sempre serei verdadeiramente grato.

Ao meu coorientador Rafael e aos demais professores: Fernando, David e Mari, e também para a técnica do laboratório Thaís, agradeço por todas as orientações, pela amizade, pelos puxões de orelha, mas também pelos bons momentos que vivenciamos juntos. Prometo não decepcionar!

Agradeço a todos os membros do Setor de Suínos da UFRGS, em especial aos estagiários com quem tive mais contato: Lucas, Leonardo e Dalila, tenho certeza de que vocês terão um futuro profissional brilhante, agradeço por todo o auxílio e pelo comprometimento.

Agradeço à Mayara, pela amizade e pelo companheirismo no desenvolvimento dos experimentos, juntamente, gostaria de agradecer à Júlia, Victória Komel, Victória Nunes e a Cristiane, minhas colegas de mestrado. Juntos sofremos, choramos e crescemos! Agradeço pelas risadas e pelos bons momentos.

Agradeço também aos parceiros do laboratório de toxicologia da UFRGS, em especial ao professor Marcelo e à estagiária Yasmin, por todo o auxílio na elaboração dos experimentos e interpretação dos dados, sem dúvidas, o apoio de vocês foi fundamental para a qualidade do nosso estudo.

Agradeço também a ACSURS, em especial ao Médico Veterinário Luciano e aos funcionários da Central de coleta e processamento de sêmen, por toda a ajuda e por não medirem esforços para que esse trabalho fosse realizado.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES, pela concessão da bolsa de pesquisa.

O projeto teve o apoio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS) - EDITAL FAPERGS 10/2021 AUXÍLIO RECÉM-DOUTOR ou RECÉM-CONTRATADO – ARD/ARC (número 22/2551-0000508-0).

A todos que de alguma forma estiveram presentes e auxiliaram nessa importante etapa da minha vida e na elaboração deste trabalho.

Muito obrigado!

RESUMO

“ADIÇÃO DE L-CISTEÍNA SOBRE PARÂMETROS ESPERMÁTICOS DE DOSES INSEMINANTES DE SÊMEN SUÍNO ARMAZENADAS À 5 °C”

Autor: Guilherme Dos Santos

Orientadora: Prof^a Dr^a Ana Paula Gonçalves Mellagi

Coorientador: Prof. Dr. Rafael da Rosa Ulguim

O armazenamento hipotérmico na preservação de sêmen suíno é um método proposto para reduzir a carga bacteriana e conseqüentemente promover o uso prudente de antibióticos em diluentes. No entanto, a redução da temperatura pode levar a danos devido ao choque pelo frio e estresse oxidativo, causando perda na qualidade seminal e redução da fertilidade. O sêmen suíno tem uma sensibilidade especial para danos por estresse oxidativo devido à composição da membrana plasmática e ao baixo sistema de defesa antioxidante no plasma seminal. Este estudo teve como objetivo verificar o efeito de proteção da L-cisteína e identificar a melhor dose-resposta desta suplementação em doses de sêmen armazenadas à 5 °C por 120 horas. Vinte e um ejaculados normospermicos (21 reprodutores) foram diluídos em *Beltsville Thawing Solution* (BTS) em amostra dividida entre os tratamentos: Pos_Cont (armazenamento à 17 °C sem suplementação de L-cisteína); e os grupos com 0, 0,5, 1 e 2 mmol/L de suplementação de L-cisteína (L-cys0; Lcys-0,5; L-cys1 e L-cys2, respectivamente) armazenados à 5 °C. As variáveis obtidas foram analisadas como medidas repetidas, considerando o tratamento, o tempo de armazenamento e sua interação como fatores principais. Nas análises dose-resposta, o efeito da suplementação de L-cisteína em doses de sêmen armazenadas à 5 °C foi investigado por meio de contrastes ortogonais polinomiais. As motilidades espermáticas e o pH das doses foram superiores no grupo controle positivo, em comparação às doses armazenadas a 5°C ($P < 0,05$). Nos modelos de dose-resposta, a motilidade total foi afetada pela interação entre a dose de L-cisteína e tempo de armazenamento ($P = 0,0400$) com aumento linear da motilidade ao aumentar a quantidade de L-cisteína às 72 e 120 h de armazenamento. A motilidade progressiva aumentou linearmente com inclusão de L-cisteína ($P = 0,0013$). No teste de termorresistência após 120 horas, as motilidades total e progressiva de armazenamento aumentaram quadraticamente até o nível 1 mmol/L L-cisteína ($P < 0,05$). A quantidade de espécies reativas ao oxigênio aumentou quadraticamente até 0,5 mmol/L de L-cisteína ($P = 0,0276$), mas sem afetar a integridade da membrana plasmática, defeitos acrossômicos, peroxidação lipídica e o conteúdo sulfidrila. Em conclusão, a suplementação de L-cisteína tem efeito positivo na motilidade espermática e na manutenção da motilidade após teste de termorresistência até 120 horas de armazenamento à 5 °C.

Palavras-chave: Antioxidantes. Armazenamento hipotérmico. Espécies reativas de oxigênio

ABSTRACT

“ADDITION OF L-CYSTEINE ON THE SPERMATIC PARAMETERS OF BOAR EXTENDED SEMEN DOSES STORED AT 5 °C”

Author: Guilherme Dos Santos

Advisor: Prof.^a Dr.^a Ana Paula Gonçalves Mellagi

Co-advisors: Prof. Dr. Rafael da Rosa Ulguim

Hypothermic storage in preserving swine semen is a proposed method to reduce the bacterial load and promote the prudent use of antibiotics in extenders. However, reducing temperature can lead to damage due to cold shock and oxidative stress, causing loss of seminal quality and reduced fertility. Pig semen has a particular sensitivity to damage by oxidative stress due to the composition of the plasma membrane and the low antioxidant defense system in seminal plasma. This study aimed to verify the protective effect of L-cysteine and identify the best dose-response of this supplementation in doses of semen stored at 5 °C for 120 hours. Twenty-one normospermic ejaculates (21 boars) were diluted in Beltsville Thawing Solution (BTS) in a sample divided between treatments: Pos_Cont (storage at 17 °C without L-cysteine supplementation); and the groups with 0, 0.5, 1 and 2 mmol/L of L-cysteine supplementation (L-cys0; Lcys-0.5; L-cys1 and L-cys2, respectively) stored at 5 °C. The variables obtained were analyzed as repeated measures, considering treatment, storage time, and interaction as main factors. In the dose-response analyses, the effect of L-cysteine supplementation on semen doses stored at 5 °C was investigated using polynomial orthogonal contrasts. Sperm motility and dose pH were higher in the positive control group compared to doses stored at 5 °C ($P < 0.05$). In dose-response models, total motility was affected by the interaction between L-cysteine dose and storage time ($P = 0.0400$) with a linear increase in motility when increasing the amount of L-cysteine at 72 and 120 h of storage. Progressive motility increased linearly with the inclusion of L-cysteine ($P = 0.0013$). In the heat resistance test after 120 hours, the total and progressive storage motility increased quadratically up to the 1 mmol/L L-cysteine level ($P < 0.05$). The amount of reactive oxygen species increased quadratically up to 0.5 mmol/L of L-cysteine ($P = 0.0276$), but without affecting plasma membrane integrity, acrosomal defects, lipid peroxidation and sulfhydryl content. In conclusion, L-cysteine supplementation has a positive effect on sperm motility and the maintenance of motility after heat resistance testing up to 120 hours of storage at 5 °C.

Keywords: *Antioxidant. Hypothermic storage. Reactive oxygen species.*

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Redução tetravalente do oxigênio molecular até a formação de água, demonstrando a formação das espécies reativas de oxigênio.....	17
Figura 2 - Reação catalítica do ferro e peróxido de hidrogênio, formando o radical hidroxila (reação de Fenton).....	19
Figura 3 - Reação de dismutação do radical superóxido pela ação da enzima Superóxido Dismutase.....	20
Figura 4 - Reação da Glutathione Peroxidase para a redução de peróxidos até álcoois.....	21
Figura 5 - Reação da decomposição do peróxido de hidrogênio em água mais oxigênio por intermédio da enzima catalase.....	21
Figura 6 - Reação da Glutathione para a decomposição do peróxido de hidrogênio em duas moléculas de água e concomitando com a oxidação da glutathione reduzida.....	22

LISTA DE TABELAS - ARTIGO

Table 1 – Total and progressive motilities, and pH of semen doses stored up to 120 hours, according to treatment (T) and storage time (ST).....	50
Table 2 – Sperm motility after thermoresistance test at 72 and 120 h of storage for 30 or 300 min of incubation time (INC) at 38 °C according to treatment (T).....	51
Table 3 – Effect of L-cysteine supplementation (Cys) and storage time (ST) on oxidative stress parameters of extended boar semen doses, stored at 5 °C, evaluated at 72 and 120 h of storage.....	53

LISTA DE FIGURAS DO ARTIGO

- Figure 1** – Slope responses of total sperm motility to L-cysteine levels according to the interaction between L-cysteine supplementation and storage time.....55
- Figure 2** – Effect of L-cysteine addition in boar semen doses stored at 5 °C on sperm motilities after the thermoresistance test.....57

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	13
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	14
2.1 Evolução dos diluentes	14
2.2 Redução da temperatura de armazenamento	15
2.3 Formação das espécies reativas de oxigênio.....	17
2.4 Espécies reativas de nitrogênio.....	18
2.5 Influência dos metais de transição sobre o status oxidante	19
2.6 Sistema de defesa antioxidante.....	19
2.6.1 Sistema de defesa enzimático	20
2.6.2 Sistema de defesa não-enzimático	21
2.7 Efeitos das espécies reativas sobre a célula espermática.....	22
2.8 Sistema de defesa antioxidante do sêmen suíno.....	23
2.9 Origem das espécies reativas de oxigênio no sêmen	24
2.10 Uso da l-cisteína como antioxidante.....	24
3. ARTIGO.....	26
4. CONCLUSÕES.....	58
REFERÊNCIAS	59
APÊNDICE A – PROTOCOLO: Integridade de membrana plasmática	65
APÊNDICE B – PROTOCOLO: Potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_M$).....	66
APÊNDICE C – PROTOCOLO: Espécies reativas de oxigênio intracelular.....	67
APÊNDICE D - PROTOCOLO: Peroxidação lipídica (TBARS).....	69
APÊNDICE E - PROTOCOLO: Conteúdo de sulfidrilas	71

1. INTRODUÇÃO

A inseminação artificial (IA) teve o seu início na suinocultura na década de 30, porém a sua utilização só ganhou notoriedade após as melhorias obtidas até a década de 90 (BORTOLOZZO *et al.*, 2015). De acordo com Waberski *et al.*, (2019a), a possibilidade de obter um melhor controle sanitário, o desenvolvimento de diluentes modernos que mantêm a viabilidade seminal por vários dias e a evolução na técnica propriamente dita foram os fatores decisivos para a globalização da IA.

A faixa de temperatura usual para o armazenamento do sêmen suíno é de 15-18 °C, nesta faixa, o metabolismo celular é reduzido, prolongando a vida útil das doses inseminantes (JOHNSON *et al.*, 2000). Entretanto, nesta temperatura de armazenamento é necessária a utilização de antibióticos nas doses inseminantes, visto que o crescimento bacteriano ainda é mantido (YESTE, 2016). Devido a isto, a redução da temperatura de armazenamento para 5 °C é uma das alternativas para a retirada dos antibióticos em diluentes comerciais (WABERSKI *et al.*, 2019b). Todavia, essa redução da temperatura promove o choque pelo frio, gerando danos significativos para a célula espermática, reduzindo a sua fertilidade.

O estresse oxidativo é um dos principais fatores envolvidos na perda da qualidade seminal, especialmente em doses inseminantes que passaram por uma redução drástica de temperatura, como na criopreservação (GROSSFELD *et al.*, 2008; CHANAPIWAT; KAEOKET 2020). Dentre os principais efeitos promovidos pelo estresse oxidativo, pode-se citar a peroxidação lipídica, a fragmentação do DNA e a redução da motilidade espermática (AWDA; MACKENZIE-BELL; BUHR, 2009; JOHN AITKEN, 1995). Uma das alternativas para reduzir os impactos do estresse oxidativo sobre a qualidade seminal é a adição de antioxidantes nas doses inseminantes (BANSAL; BILASPURI, 2011).

Desta forma, diversos estudos já descreveram efeitos positivos da adição de antioxidantes sobre a qualidade seminal em doses inseminantes no armazenamento tradicional ou para criopreservação (RIBAS-MAYNOU *et al.*, 2021), entretanto, até onde sabemos, nenhum estudo descreveu sobre os efeitos protetivos do antioxidante L-cisteína para o armazenamento de 5 °C. Devido a isto, o objetivo do presente estudo foi avaliar os efeitos obtidos pela suplementação do antioxidante L-cisteína sobre a qualidade seminal de doses inseminantes com sêmen suíno armazenadas à 5 °C por até 120 horas.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Evolução dos diluentes

Entre as décadas de 30 e 40 a inseminação artificial iniciou na suinocultura utilizando diluentes isosmóticos simples, à base de glicose e sulfato de sódio ou tartarato de sódio e potássio, capazes de manter a qualidade seminal por apenas poucas horas (FOOTE, 2002). Isto ocorria, pois, a coleta de sêmen e a inseminação eram realizados na mesma granja, sem a necessidade de transporte e armazenamento. Após a tecnificação do sistema e a necessidade de centralizar as unidades produtoras de sêmen, a utilização de diluentes modernos que permitissem a manutenção da qualidade seminal por vários dias se fez necessário (KNOX, 2016).

A composição dos principais diluentes comercializados é desconhecida, devido ao interesse comercial por parte das empresas que os desenvolvem. Entretanto, para que um diluente seja eficiente ele deve possuir alguns constituintes básicos, como: uma molécula energética, sistema tampão, antibiótico, protetor de membranas e uma molécula que mantenha a osmolaridade do meio (YESTE, 2017).

Diferentes moléculas energéticas foram avaliadas para a utilização nos diluentes (galactose, frutose, ribose ou trealose), todavia, a glicose é a molécula que apresenta os melhores resultados sobre a manutenção da qualidade seminal. Muitas vezes, a concentração de glicose adicionada é superior ao necessário para o metabolismo celular, isto para auxiliar na manutenção da pressão osmótica dos meios (GADEA, 2003; MARIN *et al.*, 2003).

Alguns fatores como a produção de metabólitos pelos espermatozoides, contaminação bacteriana e a quantidade de ar nas doses podem promover alterações significativas do pH durante o armazenamento (PINART *et al.*, 2017; VYT *et al.*, 2007). Devido a isto, a utilização de um sistema tampão é fundamental para manter o pH estável. Os primeiros tampões utilizados foram o bicarbonato de sódio e o citrato de sódio, que apesar de uma boa ação, possuem um aspecto de atuação limitado. Os tampões Mops, Tris e HEPES são tampões modernos que possuem uma ampla faixa de atuação, permitindo um melhor controle do pH e sofrem baixa influência da temperatura (GADEA, 2003; YESTE, 2017).

A manutenção da pressão osmótica é fundamental para que a estabilidade das células seja mantida durante todo o armazenamento. Apesar dos espermatozoides tolerarem uma grande amplitude osmótica (240 – 380 mOsm), oscilações podem reduzir a qualidade seminal

ao longo do armazenamento. Além da molécula energética, alguns sais como o cloreto de sódio ou cloreto de potássio são utilizados para que o controle da pressão osmótica seja mantido (GADEA, 2003).

A membrana plasmática dos espermatozoides de mamíferos possui uma grande quantidade de ácidos graxos poli-insaturados, esta composição bioquímica torna as membranas mais susceptíveis a lesões. A utilização de EDTA e BSA promovem a estabilização da membrana plasmática, mantendo a fluidez necessária para a manutenção do equilíbrio hídrico-eletrolítico (JOHNSON *et al.*, 2000).

Além disso, há a contaminação bacteriana em doses inseminantes, a qual pode ser originada pela coleta ou pelo processamento no laboratório (GOLDBERG *et al.*, 2013; SCHULZE *et al.*, 2015). Fatores como a alta quantidade de nutrientes no diluente e a temperatura de armazenamento são fatores que favorecem o desenvolvimento de bactérias. Em virtude disto, é fundamental a necessidade da utilização de um antibiótico nas doses inseminantes. Muitas moléculas podem ser utilizadas para manter a inocuidade das doses inseminantes, como a gentamicina, cloranfenicol, estreptomicina, penicilina e a lincomicina (MORRELL; WALLGREN, 2014; PEZO *et al.*, 2018).

2.2 Redução da temperatura de armazenamento

A utilização de temperaturas hipotérmicas de armazenamento (abaixo de 12 °C) visa reduzir a proliferação bacteriana nas doses inseminantes, visto que a temperatura tradicional de armazenamento (17 °C) ainda possibilita condições adequadas para o crescimento de bactérias (YESTE, 2017).

Contudo, a redução da temperatura de refrigeração promove sérios danos às células espermáticas devido ao choque pelo frio. Este evento desestabiliza a dupla camada lipídica da membrana plasmática dos espermatozoides, reduzindo a sua fluidez e alterando a sua permeabilidade (DROBNIS *et al.*, 1993). Com a redução de temperatura abaixo dos 12 °C é descrito um aumento na fragmentação do DNA, redução da motilidade espermática de forma irreversível, alteração da morfologia espermática, perda da permeabilidade da membrana plasmática e reação acrossomal precoce (ALTHOUSE *et al.*, 1998; FRASER; STRZEZEK, 2004; GACZARZEWICZ *et al.*, 2015).

Com o desenvolvimento de diluentes comerciais mais recentes, estudos direcionados ao armazenamento hipotérmico foram retomados. Buscando avaliar a eficácia do armazenamento

hipotérmico de doses inseminantes frente ao uso de antibióticos, Waberski *et al.* (2019b) identificaram que 88.9% das doses inseminantes armazenadas à 5 °C sem antibióticos possuíam uma carga bacteriana de $< 10^3$ UFC/mL após 72h, contra 97.2% das doses inseminantes armazenadas à 17 °C com a adição de antibióticos, evidenciando que a redução de temperatura é capaz de diminuir a proliferação bacteriana, sendo uma ferramenta importante na redução do uso de antibióticos. Os autores não identificaram diferenças significativas nos parâmetros espermáticos ou na fertilidade *in vivo* entre os tratamentos.

Buscando identificar os efeitos pela presença ou não do antibiótico, Menezes *et al.* (2020) avaliaram três diferentes temperaturas de armazenamento (5, 10 e 17 °C) sobre a qualidade espermática e a carga bacteriana de doses armazenadas por até 120 h. Como principais resultados, os autores relataram que apesar da motilidade total reduzir com a redução da temperatura de armazenamento, ela se manteve em níveis aceitáveis, superior a 75%, durante todo período de armazenamento. Em relação à contaminação bacteriana, a redução da temperatura para 5°C foi efetiva para promover redução na carga bacteriana.

Outro fator importante é a influência da redução da temperatura sobre a performance reprodutiva *in vivo*. Pensando nisso, Jäkel *et al.* (2021) realizaram um estudo com 194 fêmeas múltiparas divididas em dois grupos: fêmeas inseminadas com doses com antibiótico e armazenadas a 17°C vs. fêmeas inseminadas com doses inseminantes sem antibiótico e armazenadas a 5°C. Como resultados, os autores não observaram diferença entre a taxa de prenhez (98.9 vs. 98.9%), taxa de parto (96.8 vs. 98.9%) e número total de nascidos ($15,3 \pm 0.4$ vs. 15.8 ± 0.3 leitões) entre os grupos 17 °C e 5 °C, respectivamente; evidenciando que não há perda nos indicadores reprodutivos ao se utilizar doses inseminantes armazenadas em temperaturas hipotérmicas. Vale ressaltar que estes estudos foram conduzidos com o uso do diluente Androstar Premium, considerado um diluente tecnológico e de longa duração; pois possui componentes como antioxidantes, protetores de membranas e um sistema tampão mais eficiente do que os diluentes de curta duração. Assim, o uso de armazenamento hipotérmico de doses de sêmen de suíno ainda possui desafios, como o uso de diluente de custo mais elevado, diferença de resposta entre machos (MENEZES *et al.*, 2020; JÄKEL *et al.*, 2021), estabelecimento de curva de resfriamento adequada (PASCHOAL *et al.*, 2020) e adequação da rotina da central à essa nova técnica, para que os resultados *in vitro* e *in vivo* sejam mantidos.

2.3 Formação das espécies reativas de oxigênio

A molécula de oxigênio absorvida pelos organismos aeróbicos (O_2) é um biradical que contém dois elétrons desemparelhados e possuem um *spin* paralelo entre si. Essa estrutura atômica protege as moléculas orgânicas da ação do oxigênio, evitando com que ocorram reações indesejadas, degradando-as. Neste cenário, apenas radicais que também contenham elétrons em *spin* paralelos são capazes de reagir com o O_2 , o que não ocorre com as moléculas orgânicas, visto que a maioria destas moléculas não são radicais (Chow, 1988).

Desta forma, para que o O_2 seja utilizado pelos organismos aeróbicos na respiração celular, é fundamental que uma intervenção no *spin* aconteça. No processo de redução do oxigênio para a formação de energia, são inseridos quatro elétrons na molécula de O_2 , após cada adição de elétron, há a formação de uma molécula transitória denominada de espécie reativa de oxigênio (ERO) (MAGNANI; MATTEVI, 2019; SNEZHKINA *et al.*, 2020).

Figura 1: Redução tetravalente do oxigênio molecular até a formação de água, demonstrando a formação das espécies reativas de oxigênio.

- 1) $O_2 + e^- + H^+ \rightarrow HO_2^\bullet$ (radical hidroperoxila)
- 2) $HO_2^\bullet \rightleftharpoons H^+ O_2^{\bullet -}$ (radical superóxido)
pKa 4.8
- 3) $HO_2^\bullet + e^- + H^+ \rightarrow H_2O_2$ (Peróxido de hidrogênio)
- 4) $H_2O_2 + e^- \rightarrow OH^- + OH^\bullet$ (radical hidroxila)
- 5) $OH^\bullet + e^- + H^+ \rightarrow H_2O$

Adaptado de: Chow, 1988.

As espécies reativas de oxigênio (EROs) incluem todos os radicais livres e não radicais derivados do metabolismo de oxigênio, sendo considerados eletronicamente instáveis e reativos ao contato com componentes celulares, promovendo a oxidação e desestruturação destes compostos.

O radical superóxido é o primeiro radical produzido pela cadeia de reações do oxigênio, sendo considerado muito abundante e pouco reativo com moléculas orgânicas (CHEESEMAN;

SLATER, 1994). Sem a capacidade de atravessar membranas lipídicas, ele possui uma ação localizada no compartimento celular onde foi originado.

Embora o peróxido de hidrogênio não seja considerado um radical livre por não possuir elétrons desemparelhados em sua estrutura atômica (TREMELLEN, 2012), esta molécula é extremamente nociva aos organismos por possuir a habilidade de atravessar membranas e permanecer por longos períodos, atuando como precursor do radical hidroxila (SCHOONEN *et al.*, 2010). O radical hidroxila é considerado a espécie reativa mais prejudicial às células, promovendo a oxidação de diversas biomoléculas e a capacidade de permear membranas celulares, gerando grandes prejuízos ao funcionamento celular, mesmo possuindo uma meia vida curta (CHEESEMAN; SLATER, 1994).

A produção excessiva de EROs pelo metabolismo celular, ou ainda, a redução da quantidade ou atividade dos antioxidantes, promove um evento conhecido como estresse oxidativo. Este evento é relacionado com grandes perdas da qualidade espermática, sendo descritos: perda da permeabilidade da membrana plasmática, redução da capacidade fertilizante, diminuição irreversível da motilidade, alteração da morfologia espermática, fragmentação do DNA nuclear e mitocondrial, redução de proteínas e enzimas intracelulares e inibição da respiração celular (SILVA, 2010; GUTHRIE; WELCH, 2012).

As mitocôndrias são as organelas com maior produção de EROs em todo o espermatozoide, devido ao intenso metabolismo respiratório (BARJA, 2007). Espermatozoides imóveis, ou pouco móveis, e linfócitos presentes no sêmen têm a maior produção de EROs que células espermáticas normais (MAIA; BICUDO 2009).

Contudo, apesar das EROs estarem diretamente relacionadas com o estresse oxidativo e danos celulares, elas possuem funções orgânicas importantes para a viabilidade e fertilidade dos espermatozoides, estando envolvidas no transporte de elétrons da cadeia respiratória, no processo de hiperativação da cauda, capacitação e reação do acrossoma e nos mecanismos de fixação ao oócito. Em situações de homeostase celular, a concentração de EROs é mantida a níveis baixos; isto ocorre devido à ação de mecanismos antioxidantes (ANDRADE *et al.*, 2010; SILVA, 2010).

2.4 Espécies reativas de nitrogênio

Assim como as EROs, as espécies reativas de nitrogênio (ERNs) possuem um papel fundamental na fisiologia espermática, atuando como reguladores e sinalizadores de processos

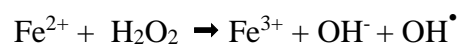
bioquímicos intracelulares (DOSHI *et al.*, 2012). As principais ações das ERN's são: capacitação, reação acrossomal, motilidade e ligação do espermatozoide na zona pelúcida (KOTHARI *et al.*, 2010). As principais ERNs são: óxido nítrico (NO[•]), óxido nítrico (N₂O₃), ácido nítrico (HNO₂), nitritos (NO²⁻), nitratos (NO³⁻) e peroxinitritos (ONOO⁻) (BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006). O estresse oxidativo é promovido simultaneamente pela ação das ERNs e EROs, causando peroxidação lipídica, danos em DNA, diminuição da motilidade, redução da capacitação e ligação oócito espermatozoide (KOTHARI *et al.*, 2010; DOSHI *et al.*, 2012).

2.5 Influência dos metais de transição sobre o status oxidante

Os íons metálicos possuem a capacidade de alterar o seu status oxidante pela simples transferência de um elétron, sendo assim, a restrição imposta pelo *spin*, como comentado anteriormente, não se aplica a estas moléculas. É comum a utilização de íons como o ferro e o cobre como catalisadores em reações bioquímicas no ambiente extracelular, promovendo a eliminação do peróxido de hidrogênio (CHOW, 1988).

A principal ação redox induzida pelos íons metálicos é a reação de Fenton, no qual o Ferro atua como um catalisador. Embora ocorra a eliminação do peróxido de hidrogênio, há a formação do radical hidroxila, que é um radical extremamente reagente com os compostos orgânicos. Desta forma, os metais de transição possibilitam com que o radical hidroxila seja formado em uma quantidade superior ao desejado, promovendo o estresse oxidativo (KREMER, 1999).

Figura 2: Reação catalítica do ferro e peróxido de hidrogênio, formando o radical hidroxila (reação de Fenton).



Adaptado de: Chow, 1988.

2.6 Sistema de defesa antioxidante

Em um sistema biológico, existem diversos mecanismos de defesa antioxidante, atuando em diferentes locais e contra agentes distintos. Desta forma, o termo “antioxidante”

pode ser utilizado para definir qualquer substância que previna, atrase ou remova os danos promovidos pelo estresse oxidativo (CHOW, 1988).

Os principais mecanismos de defesa antioxidante são: remoção direta do O₂ ou de EROs, eliminação de íons metálicos pró-oxidantes, agentes que controlam a formação das EROs, agentes que protegem/reparam as biomoléculas dos danos oxidativos e ‘agentes de sacrifício’ que reagem preferencialmente com as EROs no lugar de moléculas importantes ao funcionamento celular (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2015).

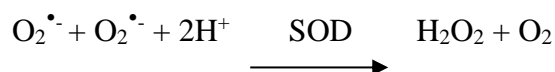
O sistema de defesa antioxidante pode ser dividido em duas categorias: sistema antioxidante enzimático e o sistema antioxidante não-enzimático. O sistema enzimático é composto pelas enzimas superóxido dismutase (SOD), glutathione redutase (GR), glutathione peroxidase (GPx) e catalase (CAT). O sistema antioxidante não-enzimático é constituído por uma gama de substâncias; alguns exemplos são: glutathione reduzida (GSH), α -tocoferol, ácidos orgânicos, carotenoides, resveratrol, L-carnitina, taurina e L-cisteína (BIRBEN *et al.*, 1997; SIES, 1993).

2.6.1 Sistema de defesa enzimático

Os antioxidantes enzimáticos são proteínas especializadas em remover o excesso de EROs, mantendo-as em baixos níveis. Cada enzima deste sistema é responsável pela eliminação de algumas EROs específicas, ou seja, há uma seletividade de ação entre as diferentes enzimas.

A SOD é uma metaloenzima que possui uma estrutura dependente do tipo de metal que se origina (CHOW, 2019; ORZOŁEK *et al.*, 2013). A superóxido dismutase é uma das principais moléculas do sistema de defesa enzimático do sêmen suíno; sua ação se dá pela dismutação de duas moléculas do radical superóxido em peróxido de hidrogênio e oxigênio (MAIA; BICUDO, 2009).

Figura 3: Reação de dismutação do radical superóxido pela ação da Superóxido Dismutase.

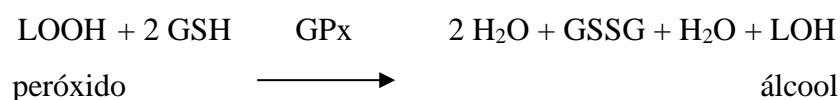


Adaptado de: Halliwell; Gutteridge, 2015.

As glutathionas possuem um importante papel na defesa enzimática contra agentes oxidantes, atuando tanto na transformação do peróxido de hidrogênio em água e oxigênio

molecular, quanto na transformação de outros radicais como o lipoperóxido em álcool. As glutathionas atuam principalmente como doadoras de elétrons nas reações metabólicas da cadeia respiratória, tornando os radicais eletricamente instáveis em substâncias estáveis e não reativas (VASCONCELOS *et al.*, 2007).

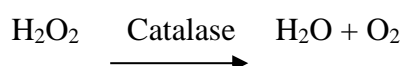
Figura 4: Reação da Glutathiona Peroxidase para a redução de peróxidos até álcoois.



Adaptado de: Halliwell & Gutteridge, 2015.

A CAT atua principalmente sobre o peróxido de hidrogênio, realizando uma dismutação de duas moléculas de H₂O₂ em duas moléculas de H₂O mais uma molécula de O₂. Tanto a CAT quanto as glutathionas possuem grande influência sobre a qualidade seminal, por atuarem diretamente sobre o peróxido de hidrogênio que é o precursor do radical hidroxila, considerado o mais prejudicial para as células (NORDBERG; ARNÉR, 2001).

Figura 5: Reação da decomposição do peróxido de hidrogênio em água mais oxigênio por intermédio da enzima catalase.

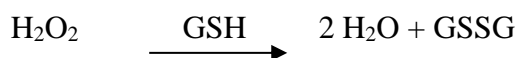


Adaptado de: Halliwell; Gutteridge, 2015.

2.6.2 Sistema de defesa não-enzimático

A segunda defesa antioxidante é o sistema não-enzimático, que atua em associação com o sistema de defesa enzimático para a prevenção do estresse oxidativo. O principal antioxidante não-enzimático é a glutathiona reduzida (GSH) que atua como um doador de elétrons, neutralizando as EROs e ERNs. A ação dos antioxidantes não-enzimáticos está mais relacionada com a sua atividade como cofatores e coenzimas, ou até mesmo como precursores de enzimas antioxidantes (BATHGATE, 2011).

Figura 6: Reação da Glutathione para a decomposição do peróxido de hidrogênio em duas moléculas de água e concomitante com a oxidação da glutathione reduzida.



Adaptado de: Halliwell; Gutteridge, 2015.

2.7 Efeitos das espécies reativas sobre a célula espermática

Embora as EROs possuam funções importantes no desenvolvimento e maturação do espermatozoide, a sua produção exacerbada promove danos irreversíveis à célula. Em comparação com as demais células do organismo, o espermatozoide possui maior suscetibilidade aos danos oxidativos, devido ao seu ineficiente sistema de reparo, e devido à limitada quantidade de antioxidantes presentes no conteúdo citoplasmático (DUTTA; MAJZOUB; AGARWAL, 2019).

A membrana plasmática é um dos principais alvos do estresse oxidativo. Isto ocorre devido à sua alta composição de ácidos graxos poli-insaturados, que são moléculas facilmente oxidáveis (VALENÇA, 2007). A peroxidação lipídica promove a perda da permeabilidade e fluidez da membrana, permitindo que íons transitem livremente entre os ambientes intra e extracelular. Outro efeito promovido pela peroxidação lipídica é inibição de importantes receptores e enzimas na membrana plasmática (AITKEN, 1995).

O estresse oxidativo é capaz de causar danos significativos tanto no DNA mitocondrial quanto no DNA nuclear. Os efeitos relacionados aos danos mitocondriais levam à uma redução na produção de ATP, ocasionando a perda irreversível da motilidade espermática. Já os danos relacionados ao DNA nuclear levam a um aumento das perdas embrionárias (AITKEN; KOOPMAN; LEWIS, 2004; AITKEN; BAKER, 2006).

Um dos efeitos discutidos das EROs sobre a célula espermática é a indução de apoptose, a ruptura induzida pelas EROs entre as faces interna e externa da membrana mitocondrial liberam citocromo C, que por sua vez, ativa as caspases apoptóticas e induz a cascata de reações que promovem a morte celular (AGARWAL *et al.*, 2014; AITKEN; BAKER; NIXON, 2015). Outro efeito importante é a alteração da fluidez da membrana plasmática, um fator predisponente para que ocorra o influxo de cálcio intracelular e gere uma cascata de reações até a capacitação do acrossoma (AWDA; MACKENZIE-BELL; BUHR, 2009).

2.8 Sistema de defesa antioxidante do sêmen suíno

Em comparação com outras espécies de animais domésticos, o sistema de defesa antioxidante enzimático do sêmen suíno apresenta uma menor eficiência. Isto ocorre devido à uma menor presença de enzimas como a GR, GPx e CAT que o tornam mais suscetível aos danos exercidos pelas EROs (STRZEZEK; LAPKIEWICZ; LECEWICZ, 1999).

De acordo com o estudo realizado por Kozirowska-gilun *et al.* (2011), a presença de enzimas antioxidantes varia conforme a região do trato reprodutivo. Dentre as enzimas do sistema de defesa antioxidante, a SOD é a mais frequentemente encontrada no trato reprodutivo masculino e, aparenta ser a de maior relevância no combate ao estresse oxidativo no sêmen suíno.

A atividade da SOD possui uma influência da idade e da estação do ano, Kowalowka *et al.* (2008) descreveram que a SOD está presente em alta atividade no plasma seminal já no início da vida reprodutiva dos machos suínos (8 – 12 meses) e possui uma queda significativa após os 25 meses de idade. No entanto, há relatos de que a atividade da SOD sofre influência sazonal. Em um estudo conduzido na Polônia por Kowalowka *et al.* (2008), o plasma seminal de ejaculados coletados na primavera e outono apresentaram maior atividade enzimática do que nas demais estações do ano. Em contrapartida, o estudo realizado no Brasil por Argenti *et al.* (2018) demonstrou uma maior atividade da SOD nas células espermáticas durante o período de verão em relação ao outono e inverno.

Devido à sua comprovada importância no sistema de defesa antioxidante, alguns grupos de pesquisa buscam utilizar a SOD como um fator preditivo da fertilidade. De acordo com os estudos realizados por Pipan *et al.* (2014), a atividade da SOD no dia 0 de armazenamento possui uma correlação significativa com a motilidade progressiva ($r = -0.686$; $P < 0.05$) e a viabilidade celular ($r = -0.513$; $P < 0.05$) após 3 dias de armazenamento. Em contrapartida, apesar de Barranco *et al.* (2019) também encontrarem uma influência da SOD sobre os parâmetros de qualidade seminal (motilidade espermática e H_2O_2 intracelular) após 72h de armazenamento, a atividade da SOD dos ejaculados não demonstrou efeito sobre a taxa de parto e nascidos totais.

Da mesma forma, a enzima GPx apresenta grande importância no sistema de defesa antioxidante enzimático do sêmen suíno. Jelezarsky *et al.* (2008) realizaram um estudo imunohistoquímico e localizaram esta enzima no aparelho reprodutor de machos suínos como: vesículas seminais, próstata, glândulas bulbouretrais e na célula espermática. Embora a GPx

possa ser encontrada em todo o aparelho reprodutor, a sua atividade está mais concentrada na cauda do epidídimo (KOZIOROWSKA-GILUN *et al.*, 2011).

A enzima CAT pode ser encontrada nos fluidos presentes no sistema reprodutor dos suínos, sendo a próstata o local de maior concentração. Entretanto, a catalase não é detectada dentro da célula espermática, exercendo baixa contribuição para o sistema de defesa antioxidante (KOZIOROWSKA-GILUN *et al.*, 2011).

2.9 Origem das espécies reativas de oxigênio no sêmen

A produção de EROs é fundamental em alguns processos de maturação espermática e durante a fecundação propriamente dita. Entretanto, a sua produção exacerbada é responsável pelo fenômeno denominado de estresse oxidativo. Os espermatozoides podem produzir EROs em duas vias distintas: na membrana plasmática via sistema NADPH oxidase e, na mitocôndria, pela reação redox NAD-dependente (DUTTA; MAJZOUB; AGARWAL, 2019). A disfunção mitocondrial é relatada como a principal geradora de EROs pelo espermatozoide e, a membrana mitocondrial é um dos principais alvos do ataque do estresse oxidativo, promovendo um ciclo mútuo entre lesão e produção de EROs (SANOCKA; KURPISZ, 2004; BEDARD; KRAUSE, 2007).

A presença de células com defeitos morfológicos e células imaturas são fontes de EROs no sêmen. Entre as anormalidades celulares, as gotas citoplasmáticas são descritas como as principais geradoras de EROs no sêmen humano (ZINI *et al.*, 2000). O excesso residual de citoplasma é capaz de ativar o sistema NADPH, liberando elétrons para a formação das EROs (RENGAN *et al.*, 2012). O estudo realizado por Martinez-alborcia *et al.* (2012) demonstrou que ejaculados de suínos que possuem uma população de células não funcionais apresentam maiores danos oxidativos em células funcionais, do que ejaculados que não possuam estas populações.

Processos inflamatórios nos órgãos do sistema reprodutor, que cursem com a liberação de leucócitos junto ao sêmen, são grandes geradores de EROs. Estima-se que células polimorfonucleares e macrófagos ativos produzem 100 vezes mais EROs, quando estão ativos, facilitando o aparecimento do estresse oxidativo (FEDDER, 1996).

2.10 Uso da L-cisteína como antioxidante

A L-cisteína é um aminoácido semi-essencial, obtido principalmente pela via nutricional, possuindo um papel importante na manutenção da homeostase intracelular, síntese proteica e produção de GSH. No meio extracelular está presente na forma L-cistina e, quando transpassa a membrana plasmática, é reduzida até L-cisteína. O desbalanço entre L-cistina/L-cisteína é considerado uns dos fatores predisponentes para o estresse oxidativo (YIN *et al.*, 2016).

A enzima GSH é produzida através da síntese “de novo”, no qual ocorre a ligação entre a L-cisteína com o aminoácido L-glutamato através da enzima glutamato-cisteína ligase, formando o composto γ -glutamilcisteína. Em seguida, a enzima GSH sintase realiza a união entre o aminoácido glicina com a γ -glutamilcisteína, formando a GSH (CHEN *et al.*, 2013; RIBAS; GARCÍA; CHECA, 2014).

Alguns estudos demonstraram uma melhora na manutenção da qualidade seminal quando é adicionado L-cisteína ao diluente. De acordo com Kaeoket *et al.* (2010), a adição de 5 a 10 mmol/L no meio de criopreservação, melhorou a motilidade progressiva, viabilidade e a integridade do acrossoma após o descongelamento. Chanapiwat *et al.* (2012) encontraram um efeito positivo da adição de 10 mmol/L de L-cisteína associado com 290 mg de ácido docosa-hexaenóico. Neste estudo, houve uma melhora na motilidade (34.7 vs. 22.3%, $P < 0.001$), viabilidade (45.0 vs. 28.1%, $P < 0.05$) e na integridade acrossomal (46.9 vs. 36.2%, $P < 0.05$) após o descongelamento.

Os efeitos protetivos da L-cisteína também foram avaliados no armazenamento de sêmen refrigerado. Funahashi and Sano (2005) avaliaram a adição de 5 mmol/L de L-cisteína em doses inseminantes contendo 20% de plasma seminal, armazenadas a 10 °C por até 14 dias. As amostras suplementadas com o aminoácido apresentaram maior viabilidade e penetrabilidade em oócitos do que o grupo controle não suplementado. Chanapiwat and Kaeoket (2021) avaliaram o efeito da adição de 2,5, 5 e 10 mmol/L em doses inseminantes armazenadas em até sete dias a 18 °C. A adição de 2,5 mmol/L apresentou a melhor motilidade espermática (71.3 ± 4.8 , 57.5 ± 8.7 , 46.3 ± 18.9) e viabilidade (72.8 ± 12.8 , 54.1 ± 14.1 , 66.0 ± 15.0) em comparação com as amostras suplementadas com 5 e 10 mmol/L, respectivamente. A adição de 2,5 mmol/L manteve a qualidade espermática similar ao de diluentes de longa duração como o Androstar[®] Plus e Modena[™].

3. ARTIGO

Artigo publicado na revista *Animal Reproduction Science* (formato conforme normas da revista).

L-cysteine improves boar semen motility at 5 °C but does not affect the oxidative status

Guilherme dos Santos^a, Mayara de Souza Costa Tamanini^a, Leonardo Abreu Leal^a, Lucas Michel Wolf^a, Thaís Spohr Christ^a, Yasmin Vendruscolo Piton^b, Marcelo Dutra Arbo^b, Mari Lourdes Bernardi^c, Rafael da Rosa Ulguim^a, Fernando Pandolfo Bortolozzo^a, Ana Paula Gonçalves Mellagi^{a,*}

^aDepartment of Veterinary Medicine, Faculty of Veterinary, Federal University of Rio Grande do Sul, UFRGS, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, 91540-000, Brazil

^bDepartment of Analysis, Faculty of Pharmacy, Federal University of Rio Grande do Sul, UFRGS, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, 90010-150, Brazil

^cDepartment of Animal Science, Faculty of Agricultural and Live Sciences, Federal University of Rio Grande do Sul, UFRGS, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, 91540-000, Brazil

*Corresponding author: ana.mellagi@ufrgs.br

ABSTRACT

Hypothermic storage has been proposed as a method to reduce bacterial loads and promoting prudent use of antibiotics. Reducing temperature, however, can lead to cold shock damage and oxidative stress in boar semen. This study verified the effect of L-cysteine on the quality of semen stored at 5°C for 120 h. Twenty-one normospermic ejaculates were diluted in Beltsville Thawing Solution into five treatments: Positive control (Pos_Cont, storage at 17°C without L-cysteine) and groups with 0, 0.5, 1, and 2 mmol/L of L-cysteine supplementation stored at 5°C. Variables were analyzed as repeated measures, considering treatment, storage time, and

interaction as main factors. The effects of different L-cysteine concentrations were also evaluated using polynomial orthogonal contrasts. Sperm motility and pH were higher in the Pos_Cont compared to the groups stored at 5°C ($P < 0.05$). In polynomial orthogonal contrast models, total motility was affected by the interaction between L-cysteine and storage time ($P = 0.04$), with a linear increase in motility when increasing the amount of L-cysteine at 72 and 120 h. Progressive motility increased quadratically as the L-cysteine reached 1 mmol/L ($P < 0.01$). In the thermoresistance test at 120 hours, sperm motility increased quadratically up to an L-cysteine dose of 1 mmol/L ($P < 0.05$). Sulfhydryl content linearly increased with L-cysteine supplementation ($P = 0.01$), with no effect on intracellular ROS and sperm lipid peroxidation ($P \geq 0.06$) in 5°C-stored doses. In conclusion, L-cysteine supplementation has a positive effect on sperm motility up to 120 h of storage at 5°C.

Keywords: Antioxidant; Hypothermic storage; Reactive oxygen species.

3.1 Introduction

Commonly, liquid boar semen is preserved at a temperature of 15–18°C to reduce sperm metabolism, prolonging sperm lifespan (Johnson et al., 2000). Nonetheless, at this temperature, the addition of antibiotics is still required since bacterial growth is not prevented (Yeste, 2016). The use of hypothermic storage (< 10°C) has therefore recently attracted attention as an alternative for the antibiotic-free storage of liquid boar semen (Waberski et al., 2019; Menezes et al., 2020b; Jäkel et al., 2021). Studies regarding the hypothermic storage were performed with a novel boar semen extender. Even so, there are some limitations, such as different semen resistance to hypothermic storage at 5°C among boars (Menezes et al., 2020a; Jäkel et al., 2021), and a suitable cooling curve (Paschoal et al., 2020). Thus, boar semen storage at 5°C still needs to be explored to be adopted by the boar studs and sow farms.

Oxidative stress is considered one of the primary factors responsible for the loss of sperm quality, increasing lipid peroxidation and DNA fragmentation, and, subsequently, reducing sperm motility (Aitken and Baker, 2006). Reactive oxygen species (ROS) are by-products derived from aerobic cellular metabolism. These molecules act in physiological processes important for the survival and fertility of spermatozoa and are electron donors in processes such as respiratory metabolism, acrosome capacitation, and hyperactivation (De Lamirande et al., 1997). However, ROS are electronically unstable, changing the molecule conformation and reducing the functionality of organelles (Cheeseman and Slater, 1993). The imbalance between ROS production and the antioxidant defense are the key factors responsible for oxidative stress. In both liquid storage and cryopreservation, boar sperm is likely to undergo lipid peroxidation due to the generation of large amounts of ROS and decreased antioxidant levels (Yeste, 2016; Ribas-Maynou et al., 2021). Furthermore, boar semen is more prone to oxidative stress than semen from other species because of its high concentration of polyunsaturated fatty acids in the plasma membrane and the low antioxidant capacity in seminal plasma (Strzezek et al., 1999; Cerolini et al., 2000). Under field conditions, boars with a high seminal plasma antioxidant capacity are more fertile (Barranco et al., 2021). Therefore, studies investigating the use of antioxidant supplementation in boar semen extenders focused on prolonging sperm quality in liquid storage or improving cryopreservation results (Ribas-Maynou et al., 2021). There is, however, little information available on the use of antioxidant agents in the storage of boar semen at 5°C (Jakop et al., 2019).

As a non-essential amino acid with a low molecular weight, L-cysteine penetrates the cell membrane to participate in the intracellular glutathione synthesis, it is one of the essential enzymes in the antioxidant defense against oxidative stress (Çoyan et al., 2011). It also protects the plasma membrane and biomolecules via indirect ROS scavenging (Çoyan et al., 2011; Chen et al., 2013). The use of L-cysteine in boar semen has been described for cryopreservation

(Chanapiwat et al., 2012) and liquid preservation at 10 and 17°C (Funahashi and Sano, 2005; Chanapiwat and Kaeoket, 2021), with an increase in motility, acrosome integrity, and sperm viability. Supplementation of L-cysteine may help to reduce the loss of sperm motility in semen doses stored at 5°C and facilitates antibiotic-free hypothermic storage with short-term extenders. In this study, we hypothesized that L-cysteine supplementation mitigates oxidative stress in boar semen doses stored under hypothermic conditions. To test this hypothesis, we investigated the effects of different levels of L-cysteine supplementation on boar semen quality and oxidative status over 120 h of liquid preservation at 5°C.

3.2 Materials and Methods

The study was conducted with approval from the Veterinary Research Committee of the Federal University of Rio Grande do Sul (project number 40473).

Chemicals

Unless otherwise indicated, the reagents used in this study were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, USA).

Animals and facilities

In total, ejaculates were collected from 21 different sexually mature boars (AGPIC 337[®], Agroceres PIC, Patos de Minas, Brazil) with an average age (mean \pm SD) of 16 \pm 8.2 months, from a commercial boar stud. The boars were housed in individual crates (0.7 \times 2.4 m) in a temperature-controlled barn (16-18°C) and fed a commercial corn-soybean meal diet, having *ad libitum* access to water. The boars were routinely used to produce semen doses, with a weekly interval between collections.

Semen collection and processing

All ejaculates ($n = 21$) were collected, using a semi-automatic system (BoarMatic[®], Minitube, Tiefenbach, Germany), into a pre-warmed (37°C) vessel equipped with a filter to remove the gel fraction. After collection, sperm motility and concentration were analyzed with a computer-assisted semen analysis system (CASA System; SpermVision[®] Professional, MOFA Global, Verona, USA). Only normospermic (at least 75% morphologically normal spermatozoa) ejaculates with a total sperm motility of more than 70% were used. Semen doses were produced with 1.5×10^9 spermatozoa and stored in 60-mL tubes (QuickTip Flexitube[®], Minitube), with a total volume of 50 mL. The extended semen doses were placed in a temperature-controlled (22–24°C) box (Klimabox für Ebersamen, Minitube) until the arrival at the laboratory for storage and further analysis (2.5 ± 0.12 h). On each evaluation day, a different sealed tube was used to avoid manipulation.

Experimental design

Semen was one-step isothermally diluted in a split sample design in Beltsville thawing solution (BTS, Minitube) at 34°C. Four different levels of L-cysteine (Sigma-Aldrich) were included (0, 0.5, 1.0, and 2 mmol/L - L-cys0, L-cys0.5, L-cys1, and L-cys2, respectively). The L-cysteine was added to the BTS extender prior to dilution. Semen doses with no L-cysteine and stored at 17°C were used as a Pos_Cont group. Groups with L-cysteine supplementation (L-cys0, L-cys0.5, L-cys1, and L-cys2) were stored at 5°C.

A data logger (LogBox-AA, Novus, Canoas, Brazil) was placed into an extra extended semen dose for the temperature monitoring of each temperature-controlled cabinet. Once in the laboratory, semen doses from the Pos_Cont group were immediately placed into a temperature-controlled cabinet at 16.4 ± 0.4 °C (mean \pm SD). The cooling-rate used in the groups stored at 5°C was according to Paschoal et al. (2020). Thus, semen doses were placed into a cardboard box (45 \times 25 \times 20 cm) inside the 5°C unit. The temperature of the extended semen doses was

reduced from 30°C to 10°C, with a cooling rate of 0.035 °C/min; after 10°C, the cooling rate was 0.015°C/min. The final temperature of 6.9 ± 0.4 °C (mean \pm SD) was reached at 23 h after exposure to 5°C.

Sperm motility analysis

Sperm motility was evaluated using a CASA system (AndroVision[®], Minitube). Briefly, the extended semen sample (1 mL) was incubated on a heated thermo block at 37°C for 20 min. A 3- μ L sample was placed into a chamber slide (Leja[®], Leja Products B.V., Nieuw-Vennep, Netherlands) with a depth of 20 μ m and then analyzed at $\times 200$ magnification under a phase-contrast microscope (Axio Scope.A1[®], Zeiss, Oberkochen, Germany). For each sample, five successive fields in the central axis of the chamber were recorded. The software settings were adjusted for boar spermatozoa detection, according to the manufacturer's recommendations, with a minimum head size of 15 μ m² and a maximum of 80 μ m², with a form factor from 1.2 to 5. Immotile cells were considered when sperm amplitude lateral head displacement < 1 μ m and curvilinear velocity < 24 μ m/s. Progressive motility was defined as curvilinear velocity > 40 μ m/s and straight-line velocity > 10 μ m/s. The motility of semen doses was evaluated at 24, 72, and 120 h of storage.

Thermoresistance test

The thermoresistance test (TRT) was performed at 72 and 120 h of storage, using an aliquot of 10 mL of extended semen incubated for 30 and 300 min in a water bath at 37°C, under air access, using open tubes. Sperm motility was evaluated using the CASA system described above.

pH analysis

The pH of the semen doses was assessed with a pH-meter (Kasvi, São José dos Pinhais, PR, Brazil) in extended semen doses at 24, 72, and 120 h. The pH meter was calibrated prior to analysis, using a buffer solution with pH 7.0. The pH meter was also adjusted for use in the temperature of semen doses. In addition, the electrode was cleaned with distilled water between samples.

Sperm morphology and acrosome integrity analyses

Sperm morphology was investigated in raw semen to assess abnormal acrosomes, heads, and midpieces, proximal or distal cytoplasmatic droplets, and folded or coiled tails. An aliquot (25 μ L) of raw semen was fixed in 1 mL of pre-warmed (36°) formaldehyde-citrate solution (2.94%), and acrosome integrity analyses were performed at 24, 72, and 120 h of storage. An aliquot (200 μ L) of extended semen was fixed in 1 mL of formaldehyde-citrate, and 200 spermatozoa were evaluated under a phase-contrast microscope (Olympus®, BX41, Olympus Latin America Inc., Miami, USA) at 1,000 \times magnification and classified as normal and abnormal acrosome spermatozoa (Pursel et al., 1972).

Plasma membrane integrity analysis

The plasma membrane integrity analysis was performed at 72 and 120 h of storage, using a double-staining method with the LIVE/DEAD® Sperm Viability Kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA). Samples (100 μ L of extended semen) were prepared in a dark room by adding 2.5 μ L of SYBR-14/PI and incubated at 37°C for 10 min in a thermo block. Analysis was performed using a fluorescence microscope (Axio Scope.A1® HAL 100FL, Filter Set 09, BP 450-490, Zeiss), at 200 \times magnification. Green-fluorescent spermatozoa were considered

viable, and red-fluorescent ones were considered non-viable. Per sample, 200 cells were evaluated.

Intracellular ROS oxidative stress

At 72 and 120 h of storage, 1 mL of extended semen was centrifuged for 2 min at 1,500 $\times g$, and the pellet was re-suspended in neutral solution (205.37 mM glucose, 20.4 mM sodium citrate, 3.36 mM EDTA, and 10.01 mM potassium chloride). After three washes to remove all extender compounds, the aliquot was incubated with 100 μM of DCFH-DA (Molecular Probes, Eugene, USA) for 1 h. The microplates were read in a fluorescence microplate reader (Spectramax® i3, Molecular Devices, San Jose, USA) using a wavelength of 485 nm for excitation and 532 nm to read the emission (Menegat et al., 2017). The results are expressed as RFU/ 10^6 motile cells. The DCFH-DA is enzymatically hydrolyzed by intracellular esterases to form nonfluorescent dichlorofluorescein (DCFH). When reactive oxygen species are present in intracellular media, DCFH reacts with ROS and is transformed into high-fluorescent dichlorofluorescein (DCF) (Keller et al., 2004).

Sperm lipid peroxidation

To evaluate sperm lipid peroxidation, one aliquot of semen doses (15 mL) stored for 72 and 120 h was prepared as described by Menegat et al. (2017). Briefly, the aliquot was centrifuged at 2,000 $\times g$ for 10 min to form the sperm pellet, which was then re-suspended in 10 mL of 50 mM PBS (pH 7.2). This process was repeated three times to remove all extender compounds that may interfere with the analysis. The last pellet was re-suspended in 1 mL of 50 mM PBS, homogenized, and stored at $-80\text{ }^\circ\text{C}$ until analysis.

Sperm lipid peroxidation was determined using thiobarbituric acid reactive substance (TBARS). The method was first described by Ohkawa et al. (1979) for animal tissue and was

then adapted for semen samples by Nichi et al. (2006). It is based on the reaction with thiobarbituric acid to measure the malondialdehyde content, an end-product of lipid peroxidation. This reaction uses a sample incubation with high temperature and low pH, resulting in a compound with pink color that can be quantified in a spectrophotometer. The results are calculated according to the Beer-Lambert Law and expressed as nmol/10⁶ cells. Briefly, the sample prepared as described above (250 μ L) was thawed at room temperature (20-25°C) and sonicated (Ultra 80, Ultra Stirrer) on ice for 30 s at 8,000 rpm. Subsequently, the sample was mixed with 500 μ L of a 10% solution (w/v) of trichloroacetic acid and then centrifuged (18,000 \times g at 15 min). After centrifugation, 500 μ L of the supernatant and 500 μ L of 1% (w/v) thiobarbituric acid (TBA, 1%) were placed in a glass tube and incubated in a water bath at 100°C for 1 h, followed by cooling in an ice bath to stop the reaction. Absorbance was measured in a microplate reader (Spectramax® i3, Molecular Devices) at a wavelength of 532 nm. The aliquot for positive control was obtained from a pooled sample of the Pos_Con group, from all boars analyzed on the plate. All reagents were used for the analysis of the positive control, and the addition of hydrogen peroxide (4.2mM) was necessary to promote the lipid peroxidation reactions. The negative control consisted of only all reagents used in the analysis. The intra- and inter-assay CV were 2.47% and 3.35%, respectively.

Sulphydryl content

In this method, the glutathione is oxidized by 5,5-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid) (DTNB) and then reduced by glutathione reductase with NADPH as a hydrogen donor. During the oxidation, the molecule 2-nitro-5-thiobenzoic acid is formed and quantified by absorbance (Ellman, 1959). The samples used for this analysis were derived from semen doses stored for 72 and 120 hours, prepared as described above for the lipid peroxidation assay (250 μ L), and thawed at room temperature (20-25°C) and sonicated (Ultra 80, Ultra Stirrer) on ice for 30 s at

8,000 rpm. The remaining sample was centrifuged for 10 min at $6,000 \times g$ to separate the supernatant (50 μL), which was subsequently incubated in 70 μL of PBS and 10 μL of DTNB (10 mM) for 1 h at 20 to 25°C. After the incubation period, absorbance was measured in a microplate reader (Spectramax® i3, Molecular Devices) at a wavelength of 412 nm (Menegat et al., 2017). The results were calculated according to the Beer-Lambert Law and expressed as nmol/ 10^6 cells. The positive and negative controls were performed as described in the sperm lipid peroxidation item. The intra- and inter-assay CV were 8.02% and 9.35%, respectively.

Statistical analysis

The data were analyzed using the Statistical Analysis System Software (SAS® , version 9.4; SAS Institute Inc., Cary, USA). Differences were considered significant at $P \leq 0.05$. All variables were analyzed as repeated measures, using the GLIMMIX procedure, and selecting the adequate covariance structure. Residual assumptions were checked using standard diagnostics on residual plot patterns. Plasma membrane integrity, acrosome integrity, and total and progressive motility were analyzed as binomial distribution. The pH, intracellular ROS, and TBARS were analyzed fitted as a normal distribution, while the sulfhydryl content was analyzed as lognormal variable.

In the first analyses, the samples stored at 5°C (i.e., L-cys0, L-cys0.5, L-cys1, and L-cys2) were compared to the Pos_Cont group (i.e., semen doses stored at 17°C with no L-cysteine). Treatment, storage time, and their interaction were included in the model as fixed effects, whereas boar and plate (oxidative stress assays only) were included as random effects. When significant, Dunnett's test was used to compare each treatment with the Pos_Cont group. The Tukey–Kramer test was applied for multiple comparisons among storage times.

Polynomial orthogonal contrasts were used to determine the linear and quadratic effects of L-cysteine supplementation in semen doses stored at 5°C. In these models, the Pos_Cont

group was not included. The IML procedure was employed to adjust the coefficients after accounting for unequally spaced measures. The repeated measure models included levels of L-cysteine, storage time, and interaction as fixed effects, whereas boar was considered as random effect. Differences in linear or quadratic responses, when the interaction was significant, were investigated using the corresponding contrast coefficients. The *P*-values of slope comparisons were obtained using the LSMESTIMATE statement.

For the TRT, total and progressive motilities were analyzed as repeated measures, considering the incubation time (30 and 300 min). Treatments and their interactions were considered as fixed effects. Polynomial orthogonal contrast models were also used accordingly to investigate the linear and quadratic effects of L-cysteine supplementation in semen doses stored at 5°C.

3.3 Results

The percentages of total motility, progressive motility, and morphologically normal spermatozoa of raw semen were $90.19 \pm 0.5\%$, $79.30 \pm 1.1\%$, and $93.5 \pm 1.3\%$, respectively.

Comparison of L-cysteine supplementation for storage at 5°C and the control condition at 17°C

The interaction between treatment and storage time (**Table 1**) affected total ($P < 0.01$) and progressive sperm motility ($P < 0.01$). Semen doses stored at 17°C had a higher sperm motility than those stored at 5°C with or without L-cysteine supplementation throughout the storage time. Semen doses stored at 17°C showed a decrease in total motility at 120 h and a decrease in progressive motility at 72 h of storage. No effect of storage time was observed in extended semen doses from groups L-cys 0, L-cys 0.5, and L-cys1 for both sperm motilities. However, in the L-cys2 group, a higher total motility ($P < 0.05$) was observed at 72 h compared to 24 and 120 h, and a higher progressive motility ($P < 0.05$) was observed at 72 h compared to

24 h, with no difference at 120 h. In the TRT performed at 72 and 120 h of storage, both sperm motilities were reduced at 300 min compared to 30 min of incubation at 37°C ($P < 0.0001$; **Table 2**). At 72 h of storage, total and progressive motility for all levels of L-cysteine supplementation did not differ from that of the Pos_Cont group ($P > 0.30$). After 120 h of storage, only treatment L-cys0 had reduced total ($P < 0.01$) and progressive motility ($P < 0.01$) values compared to Pos_Cont.

The pH of the semen doses was also affected by the interaction between treatment and storage time ($P = 0.04$; **Table 1**). No difference was observed at 24 h ($P \geq 0.78$) between each group and the Pos_Cont group. However, the pH of the semen doses at 72 and 120 h of storage at 5°C (L-cys0, L-cys0.5, L-cys1, and L-cys2) was lower compared to that of Pos_Cont ($P < 0.05$). Within each treatment, the pH increased from 24 to 72 h ($P < 0.05$), except in group L-cys2, where the pH did not differ throughout the storage period.

The percentage of sperm cells with plasma membrane integrity was affected by treatment ($P < 0.01$) but not by storage time ($P = 0.18$) or their interaction ($P = 0.17$). The Pos_Cont group showed more sperm cells with an intact plasma membrane than the other groups (78.84 ± 1.2 vs. 70.20 ± 1.6 , 73.72 ± 1.4 , 73.09 ± 1.5 , $74.20 \pm 1.4\%$, for Pos_Cont, L-cys0, L-cys0.5, L-cys1, and L-cys 2, respectively). Although the percentage of acrosome defects was not influenced by treatment ($P = 0.32$), the percentage of sperm cells with acrosome defects increased ($P < 0.01$) throughout storage time (0.80 ± 0.09 , 2.40 ± 0.09 , and $3.19 \pm 0.09\%$, for 24, 72, and 120 h, respectively). The interaction between treatment and storage time was not significant for acrosome defects ($P = 0.97$).

Intracellular ROS production was higher in boar semen doses stored at 5 °C than the Pos_Cont group (62915 ± 5623 ; 75748 ± 5623 ; 79044 ± 5623 ; 79866 ± 5623 ; 75449 ± 5623 RFU/ 10^6 motile cells for Pos_Cont, L-cys0, L-cys0.5, L-cys1, and L-cys 2, respectively; $P < 0.01$), with no significant effect of storage time ($P = 0.26$) and the 2-way interaction ($P = 0.98$).

Lipid peroxidation (TBARS content), and the quantification of sulfhydryl groups (-SH) in extended semen doses stored at 5°C did not differ from the Pos_Cont group ($P \geq 0.14$; data not shown). Also, there were no significant effects of storage time ($P \geq 0.11$) and the interaction between treatment and storage time for these variables ($P \geq 0.30$).

Polynomial orthogonal contrast models

Polynomial orthogonal contrasts analysis showed that total motility was affected by the interaction between L-cysteine level and storage time ($P = 0.04$, **Fig. 1A**). In the first 24 h, the addition of L-cysteine did not influence total motility, but after 72 and 120 h of storage, a linear increase was observed as the supplementation of L-cysteine increased ($P < 0.01$). For progressive motility, no significant interaction between L-cysteine supplementation and storage time was observed ($P = 0.14$), but there was a significant effect of treatment ($P_{\text{quad}} = 0.04$) and storage time ($P < 0.01$). Sperm progressive motility increased with increasing L-cysteine doses up to 1 mmol/L (**Fig. 1B**). A slightly higher progressive motility was observed at 72 h ($67.29 \pm 1.537\%$) compared to 24 h ($65.01 \pm 1.588\%$) and 120 h ($64.62 \pm 1.597\%$). In the TRT performed at 72 and 120 h of storage, total and progressive motility were quadratically increased ($P < 0.05$) by L-cysteine supplementation (**Fig. 2**), with higher motilities observed in the group L-cys1.

Increasing the L-cysteine dosage did not affect the pH of boar extended semen doses stored at 5°C (7.24, 7.26, 7.25, 7.26 ± 0.02 for L-cys0, L-cys0.5, L-cys1, and L-cys2, respectively; $P \geq 0.31$). However, the pH was slightly higher at 72 and 120 h for storage at 5°C (7.27 ± 0.02), compared to 24 h (7.21 ± 0.02). The pH of semen doses stored at 5°C was not affected by the interaction between L-cysteine supplementation and storage time ($P = 0.92$). For the extended semen doses stored at 5°C, the addition of L-cysteine did neither improve plasma membrane integrity (70.2%, 73.7%, 73.1%, and $74.2 \pm 0.2\%$ for L-cys0, L-cys0.5, L-cys1, and L-cys 2, respectively; $P_{\text{lin}} = 0.07$; $P_{\text{quad}} = 0.30$) nor decreased the percentage of sperm

with acrosome defects (1.7%, 1.7%, 2.0%, and $2.0 \pm 0.1\%$ for L-cys0, L-cys0.5, L-cys1, and L-cys2, respectively; $P_{\text{lin}} = 0.16$; $P_{\text{quad}} = 0.49$).

The addition of L-cysteine in semen doses stored at 5°C did not affect the intracellular ROS and sperm lipid peroxidation ($P \geq 0.06$; Table 3). The sulfhydryl content linearly increased as the L-cysteine supplementation was increased in 5°C-stored doses ($P = 0.01$; **Table 3**).

3.4 Discussion

This study was performed to determine the protective effect of L-cysteine on liquid boar semen stored under hypothermic conditions for a period of up to 120 h. The semen doses were diluted in commercial BTS extender supplemented with L-cysteine at four different levels (0, 0.5, 1, and 2 mmol/L). Treatments were compared to a Pos_Cont group, i.e., without antioxidant addition and stored at 17°C, which is the reference for the conventional storage conditions. Only groups stored at 5°C were submitted to polynomial orthogonal analysis to verify the effectiveness of L-cysteine supplementation on semen characteristics at hypothermic storage. The findings of the present study show that, L-cysteine supplementation in doses stored at 5°C did not result in similar sperm motility, pH after 72 h of storage, plasma membrane integrity, and intracellular ROS compared to the Pos_Cont group. A positive effect, however, was found with 1 and 2 mmol/L of L-cysteine supplementation on sperm motility during hypothermic storage and after TRT, and on the sulfhydryl content. It is important to emphasize that the differences observed throughout storage were slight and may not be biologically significant. Considering the practical point of view, however, this difference can show an additive effect of other factors, such as dilution rate, bacterial load, water quality, season, temperature oscillation during storage, and handling.

The use of hypothermic storage has been proposed as an alternative method of boar semen storage to reduce bacterial loads and, consequently, decrease the use of antimicrobials

in semen extender (Waberski et al., 2019). Despite the maintenance of *in vitro* sperm quality (Waberski et al., 2019) and satisfactory *in vivo* fertility (Jäkel et al., 2021), some limitations have been identified, such as different boar semen resistances (Menezes et al., 2020a) and the necessity of a cooling curve (Paschoal et al., 2020). In addition, all these recent studies were conducted with a modern long-term extender, evidencing the relationship between semen extender compounds and sperm cold resistance. As extensively revised by Yeste (2016), cold shock damages include the destabilization of plasma membrane, acrosome integrity, and membrane lipid disorder. In the cryopreservation, sperm injuries are more evident, due to the removal of natural antioxidants in the seminal plasma, making the spermatozoa more susceptible to oxidative stress (Ribas-Maynou et al., 2021). Although the real impact of oxidative stress on sperm is not clearly related to cold shock, lipid peroxidation and loss of sperm quality are commonly reported after freezing/thawing (Großfeld et al., 2008; Chanapiwat and Kaeoket, 2020). However, cooling and freeze-thawing procedures can negatively affect the antioxidant capacity of seminal plasma and the lipid peroxidation of the sperm membrane. Thus, the addition of antioxidant substances in freeze-thawing protocols has shown positive effects on sperm quality and functionality parameters (Yeste, 2016; Ribas-Maynou et al., 2021).

The BTS extender is used to maintain sperm quality for up to 3 days (Gadea, 2003). However, in another study, 2.5 mmol/L of L-cysteine supplementation in BTS extender prolonged boar semen quality for 7 days at 18°C, similar to the semen diluted in long-term extenders (Chanapiwat and Kaeoket, 2021). To the best of our knowledge, the use of L-cysteine in boar semen doses stored at 5°C has never been reported. Our results demonstrate that, at BTS expiration (> 72 h of storage), there was a linear increase in total sperm motility with increasing doses of L-cysteine. The lack of effect observed at 24 h may have been due to the low storage challenge in the first hours after cooling. As the semen doses reached the final temperature after 23 h, there may not have been sufficient time for the potential protective action of L-cysteine.

The dosage of L-cysteine seems to be dependent on the challenge that boar extended semen is submitted. The use of L-cysteine at higher concentrations (5.0 mmol/L) in long-term extender has been reported by Funahashi and Sano (2005), with beneficial effects on the viability and functional status of boar spermatozoa preserved for a long period at 10°C. However, in this study, the spermatozoa were washed and resuspended in a commercial extender with 20% (v/v) boar seminal plasma. This procedure could impede the natural antioxidant defense system, requiring a higher supplementation dose to maintain sperm quality. It should be mentioned that the dose of 1.25 mmol/L resulted in similar values compared to that of 5 mmol/L regarding the percentage of live sperm after 7 and 14 d of storage at 10°C. Chanapiwat and Kaeoket (2021), who found better results for sperm motility in BTS supplemented with 2.5 mmol/L L-cysteine, reported that 5.0 and 10.0 mmol/L showed detrimental effects under storage at 18°C. The authors assumed that higher amounts of L-cysteine could overwhelm the uptake capacity and processing by the spermatozoa. Since we found linear effects of L-cysteine supplementation, for some variables, in semen doses stored at 5°C, higher amounts should be tested in further studies. In addition, a study exploring the interaction between L-cysteine and extender type could determine the minimal amount of this amino acid to be added in each situation.

In our study, we detected a slight alkalization during storage at 17°C, with little influence of L-cysteine. The lower pH value observed at 5°C could be associated to the reduced sperm motility since sperm metabolism is reduced in more acidic media (Johnson et al., 2000). Alkalinization has also been reported by Menezes et al. (2020a) for semen doses stored above 10°C. A negative correlation ($r = -0.514$) between sperm motility and pH of extended boar semen was reported by Vyt et al. (2004), demonstrating that pH oscillations can compromise sperm motility. Despite this oscillation, the pH values were maintained above 7.2, the threshold for boar semen quality (Johnson et al., 2000).

Gączarzewicz et al. (2015) reported that boar sperm, diluted in long-term extender and stored at 5°C, showed a reduced motility, a lower mitochondrial transmembrane potential, and an impeded oxidoreductive capability, but with a similar plasma membrane integrity (SYBR/PI) compared to sperm stored at 16°C. The aspartate aminotransferase test showed a loss in sperm membrane integrity for the semen doses stored at 5°C, which was not revealed by SYBR-14/PI staining or hypo-osmotic swelling testing. These findings suggest that the damage by a reduction in temperature to 5°C may be subtle and difficult to identify in some specific tests. In our study, the protective effects of L-cysteine on plasma and acrosomal membrane were not significant.

Oxidative stress is one of the main causes of human infertility and reduced sperm quality (Dutta et al., 2019). Mammalian spermatozoa are susceptible to oxidative damage due to the high concentrations of polyunsaturated fatty acids in their plasma membrane, which can be a substrate for ROS formation and a lipid peroxidation target (Cerolini et al., 2000). The antioxidant system is strongly influenced by temperature variations; during cryopreservation, the glutathione content can decrease up to 32% compared to fresh semen (Gadea et al., 2004). In the study performed by Bamba and Cran (1992), the BHT antioxidant was effective against cold shock only when spermatozoa were subjected to a slower cooling rate to 5°C, demonstrating a clear effect of temperature on antioxidant efficiency. In addition, boar seminal plasma has a limited antioxidant defense system compared to that of other animal species (Strzezek et al., 1999), and some studies have demonstrated the benefits of using exogenous antioxidants to preserve boar sperm quality during liquid preservation or cryopreservation (Ribas-Maynou et al., 2021). Although the addition of L-cysteine showed a protective effect on spermatozoa, maintaining motilities up to 120 h in hypothermic storage, our results suggest that the mechanism of L-cysteine protection is not directly involved in the antioxidant system and still needs to be elucidated. We assume that the protective effect is related to metabolic

regulations; as glycolysis and oxidative phosphorylation can be regulated by ROS production, the presence of antioxidants, such as L-cysteine, can indirectly help in this metabolism process (Peña et al., 2022).

3.5 Conclusions

The addition of L-cysteine to boar semen doses stored at 5°C improved total and progressive motility up to 120 h of storage. However, no effect of L-cysteine was observed on pH, plasma membrane integrity, acrosome integrity, lipid peroxidation, and sulfhydryl content.

Conflict of interest

None of the authors declare any conflict of interest.

Acknowledgment

This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Finance Code 001. The authors are grateful to Associação de Criadores de Suínos do Rio Grande do Sul (ACSURS) for providing the semen used in this study.

Funding sources

This work was supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul – FAPERGS [EDITAL FAPERGS 10/2021 N° 22/2551-0000508-0]

CRedit authorship contribution statement

Guilherme dos Santos: Conceptualization, Methodology, Investigation, Data curation, Writing – original draft. **Mayara de Souza Costa Tamanini:** Methodology, Investigation. **Leonardo Abreu Leal:** Methodology, Investigation. **Lucas Michel Wolf:** Methodology, Investigation. **Thaís Spohr Christ:** Methodology, Writing – review & editing. **Yasmin Vendruscolo Piton:** Methodology, Investigation. **Marcelo Dutra Arbo:** Conceptualization, Methodology. **Mari Lourdes Bernardi:** Data curation, Formal analysis. **Rafael da Rosa Ulguim:** Conceptualization, Methodology. **Fernando Pandolfo Bortolozzo:** Conceptualization, Methodology, Writing – review & editing. **Ana Paula Gonçalves Mellagi:** Conceptualization, Methodology, Formal analysis, Writing – review & editing, Formal analysis, Resources, Supervision, Project administration.

References

- Aitken, R.J., Baker, M.A., 2006. Oxidative stress, sperm survival and fertility control. *Mol. Cell. Endocrinol.* 250, 66–69. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2005.12.026>
- Bamba, K., Cran, D.G., 1992. Effects of treatment with butylated hydroxytoluene on the susceptibility of boar spermatozoa to cold stress and dilution. *J. Reprod. Fertil.* 95, 69–77. <https://doi.org/10.1530/jrf.0.0950069>
- Barranco, I., Rubio, C.P., Tvarijonaviciute, A., Rodriguez-Martinez, H., Roca, J., 2021. Measurement of oxidative stress index in seminal plasma can predict in vivo fertility of liquid-stored porcine artificial insemination semen doses. *Antioxidants* 10. <https://doi.org/10.3390/antiox10081203>
- Cerolini, S., Maldjian, A., Surai, P., Noble, R., 2000. Viability, susceptibility to peroxidation and fatty acid composition of boar semen during liquid storage. *Anim. Reprod. Sci.* 58, 99–111. [https://doi.org/10.1016/S0378-4320\(99\)00035-4](https://doi.org/10.1016/S0378-4320(99)00035-4)
- Chanapiwat, P., 2012. Improvement of the frozen boar semen quality by docosahexaenoic acid (DHA) and L-cysteine supplementation. *African J. Biotechnol.* 11, 3697–3703. <https://doi.org/10.5897/AJB11.4022>
- Chanapiwat, P., Kaeoket, K., 2021. L-Cysteine Prolonged Fresh Boar Semen Qualities, But Not for Docosahexaenoic Acid. *Czech J. Anim. Sci.* 66, 21–28. <https://doi.org/10.17221/199/2020-CJAS>
- Chanapiwat, P., Kaeoket, K., 2020. Cryopreservation of boar semen: Where we are. *Thai J. Vet. Med.* 50, 283–295.
- Cheeseman, K.H., Slater, T.F., 1994. An introduction to free radicals. *Choice Rev. Online* 31, 31-2692-31–2692. <https://doi.org/10.5860/choice.31-2692>
- Chen, Y., Dong, H., Thompson, D.C., Shertzer, H.G., Nebert, D.W., Vasiliou, V., 2013. Glutathione defense mechanism in liver injury: Insights from animal models. *Food*

- Chem. Toxicol. 60, 38–44. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2013.07.008>
- Çoyan, K., Başpınar, N., Bucak, M.N., Akalin, P.P., 2011. Effects of cysteine and ergothioneine on post-thawed Merino ram sperm and biochemical parameters. *Cryobiology* 63, 1–6. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2011.04.001>
- De Lamirande, E., Jiang, H., Zini, A., Kodama, H., Gagnon, C., 1997. Reactive oxygen species and sperm physiology. *Rev. Reprod.* 2, 48–54. <https://doi.org/10.1530/ror.0.0020048>
- Dutta, S., Majzoub, A., Agarwal, A., 2019. Oxidative stress and sperm function: A systematic review on evaluation and management. *Arab J. Urol.* 17, 87–97. <https://doi.org/10.1080/2090598X.2019.1599624>
- Ellman, G.L., 1959. Tissue sulfhydryl groups. *Arch. Biochem. Biophys.* 82, 70–77. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(59\)90090-6](https://doi.org/10.1016/0003-9861(59)90090-6)
- Funahashi, H., Sano, T., 2005. Select antioxidants improve the function of extended boar semen stored at 10°C. *Theriogenology* 63, 1605–1616. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2004.06.016>
- Gączarzewicz, D., Udała, J., Piasecka, M., Błaszczuk, B., Stankiewicz, T., 2015. Storage temperature of boar semen and its relationship to changes in sperm plasma membrane integrity, mitochondrial membrane potential, and oxidoreductive capability. *Turkish J. Biol.* 39, 582–594. <https://doi.org/10.3906/biy-1412-76>
- Gadea, J., 2003. Review: semen extenders used in the artificial insemination of swine. *Spanish J. Agric. Res.* 1, 17. <https://doi.org/10.5424/sjar/2003012-17>
- Gadea, J., Sellés, E., Marco, M.A., Coy, P., Matás, C., Romar, R., Ruiz, S., 2004. Decrease in glutathione content in boar sperm after cryopreservation: Effect of the addition of reduced glutathione to the freezing and thawing extenders. *Theriogenology* 62, 690–701. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2003.11.013>
- Großfeld, R., Sieg, B., Struckmann, C., Frenzel, A., Maxwell, W.M.C., Rath, D., 2008. New

- aspects of boar semen freezing strategies. *Theriogenology* 70, 1225–1233.
<https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2008.07.017>
- Jäkel, H., Scheinpflug, K., Mühlendorfer, K., Gianluppi, R., Lucca, M.S., Mellagi, A.P.G., Bortolozzo, F.P., Waberski, D., 2021. In vitro performance and in vivo fertility of antibiotic-free preserved boar semen stored at 5 °C. *J. Anim. Sci. Biotechnol.* 12, 1–12.
<https://doi.org/10.1186/s40104-020-00530-6>
- Jakop, U., Svetlichnyy, V., Schiller, J., Schulze, M., Schroeter, F., Mueller, K., 2019. In vitro supplementation with unsaturated fatty acids improves boar sperm viability after storage at 6 °C. *Anim. Reprod. Sci.* 206, 60–68.
<https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2019.05.008>
- Johnson, L.A., Weitze, K.F., Fiser, P., Maxwell, W.M.C., 2000. Storage of boar semen. *Anim. Reprod. Sci.* 62, 143–172. [https://doi.org/10.1016/S0378-4320\(00\)00157-3](https://doi.org/10.1016/S0378-4320(00)00157-3)
- Keller, A., Mohamed, A., Dröse, S., Brandt, U., Fleming, I., Brandes, R.P., 2004. Analysis of dichlorodihydrofluorescein and dihydrocalcein as probes for the detection of intracellular reactive oxygen species. *Free Radic. Res.* 38, 1257–1267.
<https://doi.org/10.1080/10715760400022145>
- Menegat, M.B., Mellagi, A.P.G., Bortolin, R.C., Menezes, T.A., Vargas, A.R., Bernardi, M.L., Wentz, I., Gelain, D.P., Moreira, J.C.F., Bortolozzo, F.P., 2017. Sperm quality and oxidative status as affected by homogenization of liquid-stored boar semen diluted in short- and long-term extenders. *Anim. Reprod. Sci.* 179, 67–79.
<https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2017.02.003>
- Menezes, T. de A., Bustamante-Filho, I.C., Paschoal, A.F.L., Dalberto, P.F., Bizarro, C.V., Bernardi, M.L., Ulguim, R. da R., Bortolozzo, F.P., Mellagi, A.P.G., 2020a. Differential seminal plasma proteome signatures of boars with high and low resistance to hypothermic semen preservation at 5°C. *Andrology* 8, 1907–1922.

<https://doi.org/10.1111/andr.12869>

- Menezes, T. de A., Mellagi, A.P.G., da Silva Oliveira, G., Bernardi, M.L., Wentz, I., Ulguim, R. da R., Bortolozzo, F.P., 2020b. Antibiotic-free extended boar semen preserved under low temperature maintains acceptable in-vitro sperm quality and reduces bacterial load. *Theriogenology* 149, 131–138. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2020.03.003>
- Nichi, M., Bols, P.E.J., Züge, R.M., Barnabe, V.H., Goovaerts, I.G.F., Barnabe, R.C., Cortada, C.N.M., 2006. Seasonal variation in semen quality in *Bos indicus* and *Bos taurus* bulls raised under tropical conditions. *Theriogenology* 66, 822–828. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2006.01.056>
- Ohkawa, H., Ohishi, N., Yagi, K., 1979. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal. Biochem.* 95, 351–358. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(79\)90738-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(79)90738-3)
- Paschoal, A.F.L., Luther, A.M., Jäkel, H., Scheinpflug, K., Mühldorfer, K., Bortolozzo, F.P., Waberski, D., 2020. Determination of a cooling-rate frame for antibiotic-free preservation of boar semen at 5°C. *PLoS One* 15, 1–14. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0234339>
- Peña, F.J., Ortiz-Rodríguez, J.M., Gaitskell-Phillips, G.L., Gil, M.C., Ortega-Ferrusola, C., Martín-Cano, F.E., 2022. An integrated overview on the regulation of sperm metabolism (glycolysis-Krebs cycle-oxidative phosphorylation). *Anim. Reprod. Sci.* 246, 106805. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2021.106805>
- Pursel, V.G., Johnson, L.A., Rampacek, G.B., 1972. Acrosome Morphology of Boar Spermatozoa Incubated before Cold Shock. *J. Anim. Sci.* 34, 278–283. <https://doi.org/10.2527/jas1972.342278x>
- Ribas-Maynou, J., Mateo-Otero, Y., Delgado-Bermúdez, A., Bucci, D., Tamanini, C., Yeste, M., Barranco, I., 2021. Role of exogenous antioxidants on the performance and function

- of pig sperm after preservation in liquid and frozen states: A systematic review. *Theriogenology* 173, 279–294. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2021.07.023>
- Strzezek, J., Lapkiewicz, S., Lecewicz, M., 1999. A note on antioxidant capacity of boar seminal plasma. *Anim. Sci. Pap. Reports* 17, 181–188.
- Vyt, P., Maes, D., Dejonckheere, E., Castryck, F., Van Soom, A., 2004. Comparative Study on Five Different Commercial Extenders for Boar Semen. *Reprod. Domest. Anim.* 39, 8–12. <https://doi.org/10.1046/j.1439-0531.2003.00468.x>
- Waberski, D., Luther, A.M., Grünther, B., Jäkel, H., Henning, H., Vogel, C., Peralta, W., Weitze, K.F., 2019. Sperm function in vitro and fertility after antibiotic-free, hypothermic storage of liquid preserved boar semen. *Sci. Rep.* 9, 1–10. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-51319-1>
- Yeste, M., 2016. Sperm cryopreservation update: Cryodamage, markers, and factors affecting the sperm freezability in pigs. *Theriogenology* 85, 47–64. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2015.09.047>

Table 1. Total and progressive motilities, and pH of boar semen doses stored up to 120 hours, according to treatment (T) and storage time (ST).

	Treatment	Storage time			SEM	P-value		
		24 h	72 h	120 h		T	ST	T × ST
Total motility (%)	Pos_control	82.73 ^A	80.42 ^{AB}	79.45 ^B	1.31	<.0001	0.0008	0.0004
	L-cys0	70.88*	71.50*	68.70*	1.71			
	L-cys0.5	71.74*	72.76*	70.97*	1.64			
	L-cys1	72.34*	74.80*	73.23*	1.60			
	L-cys2	70.32 ^{A*}	76.69 ^{B*}	73.54 ^{A*}	1.66			
Progressive motility (%)	Pos_control	77.78 ^A	74.81 ^B	73.90 ^B	1.56	<.0001	0.0019	0.0039
	L-cys0	63.87*	64.24*	61.51*	1.90			
	L-cys0.5	65.98*	66.22*	64.39*	1.84			
	L-cys1	66.00*	68.77*	65.79*	1.80			
	L-cys2	64.14 ^{A*}	69.79 ^{B*}	66.68 ^{AB*}	1.85			
pH	Pos_control	7.22 ^A	7.35 ^B	7.36 ^B	0.02	<.0001	<.0001	0.0385
	L-cys0	7.20 ^A	7.26 ^{B*}	7.27 ^{B*}	0.02			
	L-cys0.5	7.22 ^A	7.28 ^{B*}	7.27 ^{B*}	0.02			
	L-cys1	7.21 ^A	7.27 ^{B*}	7.27 ^{B*}	0.02			
	L-cys2	7.22	7.28*	7.26*	0.02			

Values are expressed as LSM means. SEM: standard error of the mean.

Different uppercase letters within rows indicate significant difference among storage times ($P < 0.05$).

* Indicates a significant difference between each group with the Pos_Cont group for each variable ($P < 0.05$; Dunnett's test).

Boar semen ($n = 21$) was extended into split samples among the treatments: Pos_Cont (semen doses stored at 17°C, without L-cysteine supplementation), and L-cys0, L-cys0.5, L-cys1 and L-cys2: extended boar semen doses supplemented with 0, 0.5, 1.0, and 2 mmol/L L-cysteine, respectively, and stored at 5°C.

Table 2. Sperm motility after the thermoresistance test at 72 and 120 h of storage for 30 or 300 min of incubation time (INC) at 38°C according to treatment (T).

72 h of storage	INC		SEM	Mean	P-value		
	30 min	300 min			T	INC	T × INC
<i>Total motility (%)</i>							
Pos_control	70.16	41.00	4.41	56.11 ± 3.28	0.3040	<.0001	0.1246
L-cys0	59.21	40.81	4.40	50.01 ± 3.33			
L-cys0.5	63.21	46.97	4.54	55.23 ± 3.29			
L-cys1	66.30	45.12	4.51	55.98 ± 3.28			
L-cys2	66.84	40.73	4.40	54.06 ± 3.31			
Mean	65.23	42.91	2.92	-			
<i>Progressive motility (%)</i>							
Pos_control	63.64	30.25	4.24	46.56 ± 3.59	0.3170	<.0001	0.0854
L-cys0	51.11	30.97	4.29	40.65 ± 3.48			
L-cys0.5	56.22	37.81	4.72	46.91 ± 3.59			
L-cys1	59.39	35.72	4.61	47.41 ± 3.60			
L-cys2	60.22	31.65	4.34	45.57 ± 3.58			
Mean	58.17	33.22	2.84	-			
120 h of storage	INC				P-value		
<i>Total motility (%)</i>	30 min	300 min	SEM	Mean	T	INC	T × INC
Pos_control	69.82	45.81	3.48	58.30 ± 2.63	0.0014	<.0001	0.1270
L-cys0	57.40	44.29	3.45	50.86 ± 2.708*			
L-cys0.5	65.10	47.83	3.49	56.67 ± 2.65			
L-cys1	67.43	51.91	3.49	59.91 ± 2.59			
L-cys2	67.50	45.00	3.47	56.59 ± 2.65			
Mean	65.56	46.96	2.52	-			
<i>Progressive motility (%)</i>							

Pos_control	63.14	35.12	3.40	49.06 ± 2.87	0.0013	<.0001	0.0709
L-cys0	48.97	34.38	3.36	41.49 ± 2.78*			
L-cys0.5	57.81	38.93	3.54	48.31 ± 2.86			
L-cys1	60.36	43.27	3.65	51.87 ± 2.86			
L-cys2	60.76	36.34	3.45	48.46 ± 2.86			
Mean	58.27	37.56	2.49	-			

Values are expressed as LSMeans. SEM: standard error of the mean.

* Within the column indicates a significant difference ($P < 0.05$) Pos_Cont (Dunnett's test).

Boar semen ($n = 21$) was extended into split samples among the treatment groups: Pos_Cont, Pos_Cont (semen doses stored at 17°C, without L-cysteine supplementation); L-cys0, negative control (semen doses stored at 5°C, without L-cysteine); groups with L-cysteine supplementation L-cys0.5; L-cys1, and L-cys2 (with 0.5, 1, and 2 mmol/L, respectively) and stored at 5°C.

Table 3. Effects of L-cysteine supplementation (Cys) and storage time (ST) on oxidative stress parameters of extended boar semen doses, stored at 5 °C, evaluated at 72 and 120 h of storage.

	Cys	ST		Mean (Cys)	SEM	ST	P-value		
		72 h	120 h				Cys L	Cys Q	ST × Cys
Intracellular ROS	L-cys0	78357	72868	75612	6271.83	0.3621	0.7235	0.0610	0.8600
(RFU/10 ⁶ motile cells)	L-cys0.5	80680	77138	78909	6271.83				
	L-cys1	81247	78215	79731	6271.83				
	L-cys2	74609	76019	75314	6271.83				
	Mean (ST)	78723	76060						
Sperm lipid peroxidation	L-cys0	0.4350	0.4331	0.4340	0.01649	0.8565	0.1003	0.9081	0.5472
(TBARS; nmol/10 ⁶ cells)	L-cys0.5	0.4139	0.4411	0.4275	0.01649				
	L-cys1	0.4355	0.4147	0.4251	0.01649				
	L-cys2	0.4097	0.4138	0.4118	0.01649				
	Mean (ST)	0.4235	0.4257						
Sulfhydryl content	L-cys0	3.5575	3.5928	3.5751	0.07552	0.4669	0.0124	0.1419	0.5371
	L-cys0.5	3.5641	3.6494	3.6065	0.07552				
(log μmol/10 ⁶ cells)	L-cys1	3.7061	3.6512	3.6786	0.07552				

L-cys2	3.6496	3.6824	3.6660	0.07552
Mean (ST)	3.6188	3.6438		

Values are expressed as LSMeans. SEM: standard error of the mean.

Cys L: Probability of linear effect. Cys Q: Probability of quadratic effect.

Boar semen samples ($n = 21$) were extended into split samples among the treatments: L-cys0, L-cys0.5, L-cys1, and L-cys2: extended boar semen doses supplemented with 0, 0.5, 1.0, and 2 mmol/L L-cysteine, respectively. TBARS = thiobarbituric acid reactive substance; ROS = reactive oxygen species

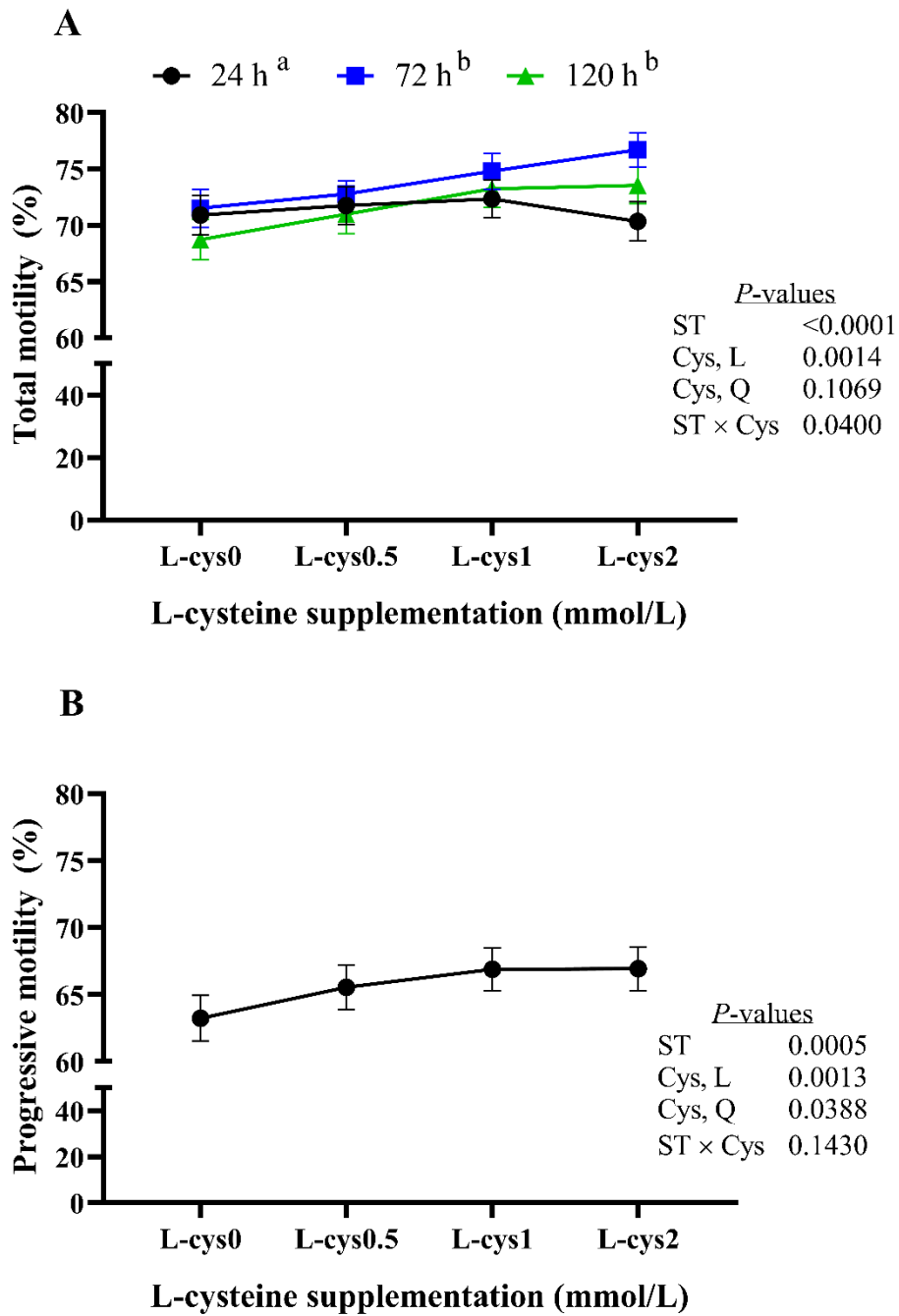


Figure 1. Slope responses of total sperm motility to L-cysteine levels according to the interaction between L-cysteine supplementation and storage time.

Cys L: Probability of linear effect. Cys Q: Probability of quadratic effect.

ST: Storage time (24, 72 and 120 h).

Boar semen samples ($n = 21$) were extended into split samples among the treatments: L-cys0.5, L-cys1, and L-cys2: extended boar semen doses supplemented with 0, 0.5, 1.0, and 2 mmol/L L-Cysteine, respectively, and stored at 5°C.

a, b Different letters indicate that slopes in response were different ($P < 0.05$).

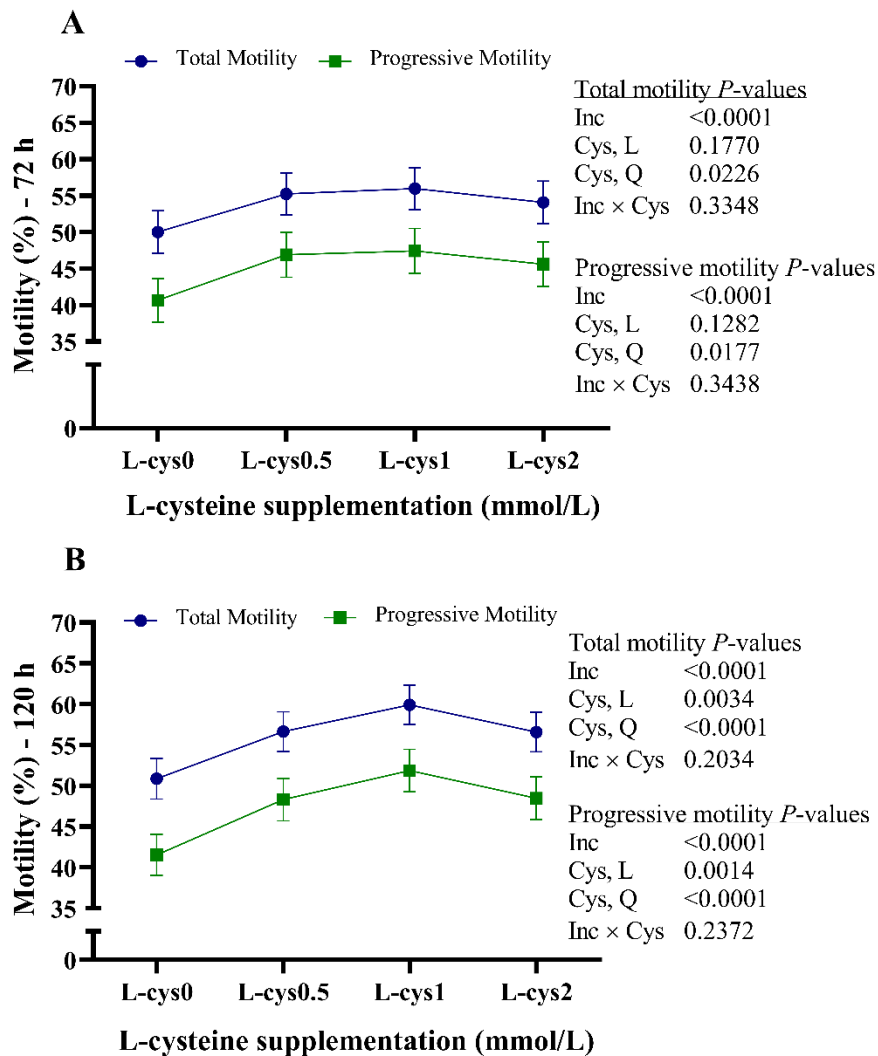


Figure 2. Effect of L-cysteine addition in boar semen doses stored at 5 °C on sperm motilities in the thermoresistance test.

Boar semen samples ($n = 21$) were extended into split sample among the treatments: L-cys0, L-cys0.5, L-cys1, and L-cys2: extended boar semen doses supplemented with 0, 0.5, 1.0, and 2 mmol/L L-cysteine, respectively, and stored at 5°C.

Cys L: Probability of linear effect. Cys Q: Probability of quadratic effect.

Inc: Incubation time (30 and 300 min).

A: Total and progressive motility after TRT at 72 h of storage.

B: Total and progressive motility after TRT at 120 h of storage

4. CONCLUSÕES

A suplementação de doses inseminantes de sêmen suíno com o aminoácido L-cisteína demonstrou uma boa proteção frente ao desafio do armazenamento hipotérmico à 5 °C. A adição de L-cisteína melhorou as motilidades espermáticas de forma linear, até as 120 h. No teste de termorresistência, a motilidade melhorou de forma quadrática, com os melhores resultados para o grupo 1 mmol/L. Entretanto, não houve efeito do antioxidante sobre o pH, integridade de membrana plasmática, acrossoma, peroxidação lipídica, conteúdo sulfidril e produção de EROs intracelular.

REFERÊNCIAS

AGARWAL, A. et al. Effect of Oxidative Stress on Male Reproduction. *The World Journal of Men's Health*, [s. l.], v. 32, n. 1, p. 1, 2014. Available at: <https://doi.org/10.5534/wjmh.2014.32.1.1>

AITKEN, J. R. Free radicals, lipid peroxidation and sperm function. *Reproduction, Fertility and Development*, [s. l.], v. 7, n. 4, p. 659–668, 1995. Available at: <https://doi.org/10.1071/RD9950659>

AITKEN, R. J.; BAKER, M. A.; NIXON, B. Are sperm capacitation and apoptosis the opposite ends of a continuum driven by oxidative stress? *Asian Journal of Andrology*, [s. l.], v. 17, n. 4, p. 633–639, 2015. Available at: <https://doi.org/10.4103/1008-682X.153850>

AITKEN, R. J.; BAKER, M. A. Oxidative stress, sperm survival and fertility control. *Molecular and Cellular Endocrinology*, [s. l.], v. 250, n. 1–2, p. 66–69, 2006. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.mce.2005.12.026>

AITKEN, R. J.; KOOPMAN, P.; LEWIS, S. E. M. Seeds of concern. *Nature*, [s. l.], v. 432, n. 7013, p. 48–52, 2004. Available at: <https://doi.org/10.1038/432048a>

ALTHOUSE, G.C; et al. Characterization of lower temperature storage limitations of fresh-extended porcine semen. *Theriogenology*, v. 50, n. 4, p. 535-543, set. 1998.

ANDRADE, E. R. et al. Consequências da produção das espécies reativas de oxigênio na reprodução e principais mecanismos antioxidantes. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v. 34, n. 2, p. 79-85, 2010.

ARGENTI, L. E. et al. Effects of season on boar semen parameters and antioxidant enzymes in the south subtropical region in Brazil. *Andrologia*, [s. l.], v. 50, n. 4, p. 1–8, 2018. Available at: <https://doi.org/10.1111/and.12951>

AWDA, B. J.; MACKENZIE-BELL, M.; BUHR, M. M. Reactive oxygen species and boar sperm function. *Biology of Reproduction*, [s. l.], v. 81, n. 3, p. 553–561, 2009. Available at: <https://doi.org/10.1095/biolreprod.109.076471>

BANSAL, A. K.; BILASPURI, G. S. Impacts of oxidative stress and antioxidants on semen functions. *Veterinary Medicine International*, [s. l.], v. 2011, 2011. Available at: <https://doi.org/10.4061/2011/686137>

BARJA, G. Mitochondrial Oxygen Consumption and Reactive Oxygen Species Production are Independently Modulated: implications for aging studies. *Rejuvenation Research*, [s.l.], v. 10, n. 2, p. 215-224, jun. 2007.

BARRANCO, I. et al. Levels of activity of superoxide dismutase in seminal plasma do not predict fertility of pig AI-semen doses. *Theriogenology*, [s. l.], v. 140, p. 18–24, 2019. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2019.08.010>

BARREIROS, A. L. B. S.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P. Oxidative stress: Relations between the formation of reactive species and the organism's defense. *Quimica Nova*, [s. l.], v. 29, n. 1, p. 113–123, 2006. Available at: <https://doi.org/10.1590/s0100-40422006000100021>

BATHGATE, R. Antioxidant mechanisms and their benefit on post-thaw boar sperm quality. *Reproduction in Domestic Animals*, [s. l.], v. 46, n. SUPPL. 2, p. 23–25, 2011. Available at: <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2011.01826.x>

BEDARD, K.; KRAUSE, K. H. The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: Physiology and pathophysiology. *Physiological Reviews*, [s. l.], v. 87, n. 1, p. 245–313, 2007. Available at: <https://doi.org/10.1152/physrev.00044.2005>

BIRBEN, E. et al. Oxidative Stress and Antioxidant Defense Mechanism in. *Science*, [s. l.], v. 22, n. 96, p. 161–168, 1997. Available at: <https://waojournal.biomedcentral.com/track/pdf/10.1097/WOX.0b013e3182439613>

BORTOLOZZO, F. P. et al. New Artificial Insemination Technologies for Swine. *Reproduction in domestic animals = Zuchthygiene*, [s. l.], v. 50, p. 80–84, 2015. Available at: <https://doi.org/10.1111/rda.12544>

CHANAPIWAT, P.; KAEOKET, K. Cryopreservation of boar semen: Where we are. *Thai Journal of Veterinary Medicine*, [s. l.], v. 50, n. 3, p. 283–295, 2020.

CHANAPIWAT, P.; KAEOKET, K. L-Cysteine Prolonged Fresh Boar Semen Qualities, But Not for Docosahexaenoic Acid. *Czech Journal of Animal Science*, [s. l.], v. 66, n. 1, p. 21–28, 2021. Available at: <https://doi.org/10.17221/199/2020-CJAS>

CHANAPIWAT. Improvement of the frozen boar semen quality by docosahexaenoic acid (DHA) and L-cysteine supplementation. *African Journal of Biotechnology*, [s. l.], v. 11, n. 15, p. 3697–3703, 2012. Available at: <https://doi.org/10.5897/ajb11.4022>

CHEESEMAN, K. H.; SLATER, T. F. An introduction to free radicals. *Choice Reviews Online*, [s. l.], v. 31, n. 05, p. 31-2692-31–2692, 1994. Available at: <https://doi.org/10.5860/choice.31-2692>

CHEN, Y. et al. Glutathione defense mechanism in liver injury: Insights from animal models. *Food and Chemical Toxicology*, [s. l.], v. 60, p. 38–44, 2013. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.fct.2013.07.008>

CHOW, C. K. Cellular Antioxidant Defense Mechanisms. [S. l.: s. n.], 2019. Available at: <https://doi.org/10.1201/9780429289323>

DOSHI, S. B. et al. Role of reactive nitrogen species in male infertility. *Reproductive Biology and Endocrinology*, [s. l.], v. 10, p. 1–11, 2012. Available at: <https://doi.org/10.1186/1477-7827-10-109>

DROBNIS, E.Z et al. Cold shock damage is due to lipid phase transitions in cell membranes: a demonstration using sperm as a model. *Journal Of Experimental Zoology*, v. 265, n. 4, p. 432-437, 15 mar. 1993.

DUTTA, S.; MAJZOUB, A.; AGARWAL, A. Oxidative stress and sperm function: A systematic review on evaluation and management. *Arab Journal of Urology*, [s. l.], v. 17, n. 2, p. 87–97, 2019. Available at: <https://doi.org/10.1080/2090598X.2019.1599624>

FEDDER, J. Nonsperm cells in human semen: With special reference to seminal leukocytes and their possible influence on fertility. *Archives of Andrology*, [s. l.], v. 36, n. 1, p. 41–65, 1996. Available at: <https://doi.org/10.3109/01485019608987883>

FOOTE, R. H. The history of artificial insemination: Selected notes and notables The online version of this article, along with updated information and services , is located on the World

Wide Web at : The history of artificial insemination : Selected notes and notab. Journal of Animal Science, [s. l.], v. 80, p. 1–10, 2002. Available at: <http://www.zds-bonn.de/services/files/boarsemen2011/AI-History.pdf>

FRASER, L.; J. STRZEZEK. "The use of comet assay to assess DNA integrity of boar spermatozoa following liquid preservation at 5 degrees C and 16 degrees C." *Folia Histochemica et cytobiologica*. 2004.

FUNAHASHI, H.; SANO, T. Select antioxidants improve the function of extended boar semen stored at 10°C. *Theriogenology*, [s. l.], v. 63, n. 6, p. 1605–1616, 2005. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2004.06.016>

GAÇZARZEWICZ, et al. Storage temperature of boar semen and its relationship to changes in sperm plasma membrane integrity, mitochondrial membrane potential, and oxidoreductive capability. *Turkish Journal Of Biology*, v. 39, p. 582-594, 2015.

GADEA, J. Enhanced Reader.pdf. [S. l.]: Journal of Agricultural Research, 2003.

GOLDBERG, A. M. G. et al. Risk factors for bacterial contamination during boar semen collection. *Research in Veterinary Science*, [s. l.], v. 95, n. 2, p. 362–367, 2013. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2013.06.022>

GROSSFELD, R. et al. New aspects of boar semen freezing strategies. *Theriogenology*, [s. l.], v. 70, n. 8, p. 1225–1233, 2008. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2008.07.017>

GUTHRIE, H.d.; WELCH, G.r. Effects of reactive oxygen species on sperm function. *Theriogenology*, [s.l.], v. 78, n. 8, p. 1700-1708, nov. 2012.

HALLIWELL, Barry; GUTTERIDGE, John M.C. *Free Radicals in Biology and Medicine*. 5. ed. Oxford: Oxford University Press, 2015.

JÄKEL, H. et al. Assessment of chilling injury in hypothermic stored boar spermatozoa by multicolor flow cytometry. *Cytometry Part A*, [s. l.], v. 99, n. 10, p. 1033–1041, 2021. Available at: <https://doi.org/10.1002/cyto.a.24301>

JELEZARSKY, L. et al. Localization and characterization of glutathione peroxidase (GPx) in boar accessory sex glands, seminal plasma, and spermatozoa and activity of GPx in boar semen. *Theriogenology*, [s. l.], v. 69, n. 2, p. 139–145, 2008. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2007.08.016>

JOHNSON, L. A. et al. Storage of boar semen. *Animal Reproduction Science*, [s. l.], v. 62, n. 1–3, p. 143–172, 2000. Available at: [https://doi.org/10.1016/S0378-4320\(00\)00157-3](https://doi.org/10.1016/S0378-4320(00)00157-3)

KAEOKET, K. et al. Supplemental effect of varying L-cysteine concentrations on the quality of cryopreserved boar semen. *Asian Journal of Andrology*, [s. l.], v. 12, n. 5, p. 760–765, 2010. Available at: <https://doi.org/10.1038/aja.2010.48>

KNOX, R. V. Artificial insemination in pigs today. *Theriogenology*, [s. l.], v. 85, n. 1, p. 83–93, 2016. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2015.07.009>

KOTHARI, S. et al. Free radicals: Their beneficial and detrimental effects on sperm function. *Indian Journal of Experimental Biology*, [s. l.], v. 48, n. 5, p. 425–435, 2010.

KOWALOWKA, M. et al. Extracellular superoxide dismutase of boar seminal plasma. *Reproduction in Domestic Animals*, [s. l.], v. 43, n. 4, p. 490–496, 2008. Available at: <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2007.00943.x>

- KOZIOROWSKA-GILUN, M. et al. Antioxidant defence system of boar cauda epididymidal spermatozoa and reproductive tract fluids. *Reproduction in Domestic Animals*, [s. l.], v. 46, n. 3, p. 527–533, 2011. Available at: <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2010.01701.x>
- KREMER, M. L. Mechanism of the Fenton reaction. Evidence for a new intermediate. *Physical Chemistry Chemical Physics*, [s. l.], v. 1, n. 15, p. 3595–3605, 1999. Available at: <https://doi.org/10.1039/a903915e>
- MAGNANI, F.; MATTEVI, A. Structure and mechanisms of ROS generation by NADPH oxidases. *Current Opinion in Structural Biology*, [s. l.], v. 59, p. 91–97, 2019. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2019.03.001>
- MAIA, M.S.; BICUDO, S.D. Radicais livres, antioxidantes e função espermática em mamíferos: uma revisão. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v.33, n.4, p.183-193, 2009.
- MARIN, S. et al. Metabolic strategy of boar spermatozoa revealed by a metabolomic characterization. *FEBS Letters*, [s. l.], v. 554, n. 3, p. 342–346, 2003. Available at: [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(03\)01185-2](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(03)01185-2)
- MARTINEZ-ALBORCIA, M. J. et al. Detrimental effects of non-functional spermatozoa on the freezability of functional spermatozoa from Boar Ejaculate. *PLoS ONE*, [s. l.], v. 7, n. 5, 2012. Available at: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0036550>
- MENEZES, T. de A. et al. Differential seminal plasma proteome signatures of boars with high and low resistance to hypothermic semen preservation at 5°C. *Andrology*, [s. l.], v. 8, n. 6, p. 1907–1922, 2020. Available at: <https://doi.org/10.1111/andr.12869>
- MORRELL, J. M.; WALLGREN, M. Alternatives to antibiotics in semen extenders: A review. *Pathogens*, [s. l.], v. 3, n. 4, p. 934–946, 2014. Available at: <https://doi.org/10.3390/pathogens3040934>
- NORDBERG, J; ARNÉR, E.S.J. Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. *Free Radical Biology and medicine*, v.31, n.11, p.1287-1312, 2001.
- ORZOLEK, A. et al. Superoxide dismutase (SOD) in boar spermatozoa: Purification, biochemical properties and changes in activity during semen storage (16 °C) in different extenders. *Reproductive Biology*, [s. l.], v. 13, n. 1, p. 34–40, 2013. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.repbio.2013.01.176>
- PASCHOAL, A. F. L. et al. Determination of a cooling-rate frame for antibiotic-free preservation of boar semen at 5°C. *PLoS ONE*, [s. l.], v. 15, n. 6, p. 1–14, 2020. Available at: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0234339>
- PINART, E. et al. A comparative study of the effects of *Escherichia coli* and *Clostridium perfringens* upon boar semen preserved in liquid storage. *Animal Reproduction Science*, [s. l.], v. 177, p. 65–78, 2017. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2016.12.007>
- RENGAN, A. K. et al. An investigation of excess residual cytoplasm in human spermatozoa and its distinction from the cytoplasmic droplet. *Reproductive Biology and Endocrinology*, [s. l.], v. 10, p. 1–8, 2012. Available at: <https://doi.org/10.1186/1477-7827-10-92>
- RIBAS, V.; GARCÍA-RUIZ, C.; FERNÁNDEZ-CHECA, J. C. Glutathione and mitochondria. *Frontiers in Pharmacology*, [s. l.], v. 5 JUL, n. July, p. 1–19, 2014. Available at: <https://doi.org/10.3389/fphar.2014.00151>

RIBAS-MAYNOU, J. et al. Role of exogenous antioxidants on the performance and function of pig sperm after preservation in liquid and frozen states: A systematic review. *Theriogenology*, [s. l.], v. 173, p. 279–294, 2021. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2021.07.023>

SANOCKA, D.; KURPISZ, M. Reactive oxygen species and sperm cells. *Reproductive Biology and Endocrinology*, [s. l.], v. 2, n. Table 2, p. 1–7, 2004. Available at: <https://doi.org/10.1186/1477-7827-2-12>

SCHOONEN, M. A. A. et al. Role of hydrogen peroxide and hydroxyl radical in pyrite oxidation by molecular oxygen. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, [s. l.], v. 74, n. 17, p. 4971–4987, 2010. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.gca.2010.05.028>

SCHULZE, M. et al. Analysis of hygienic critical control points in boar semen production. *Theriogenology*, [s. l.], v. 83, n. 3, p. 430–437, 2015. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2014.10.004>

SIES, H. Strategies of antioxidant defense. *European Journal of Biochemistry*, [s. l.], v. 215, n. 2, p. 213–219, 1993. Available at: <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1993.tb18025.x>

SILVA, E.C. B. Espécies reativas de oxigênio e nitrogênio: produção e efeitos sobre a integridade estrutural e funcional dos espermatozoides. *Ciênc. Vet. Tróp, Recife*, v. 13, n. 1, p. 9-16, out. 2010.

SNEZHKINA, A. V. et al. ROS generation and antioxidant defense systems in normal and malignant cells. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, [s. l.], v. 2019, 2020. Available at: <https://doi.org/10.1155/2019/6175804>

STRZEZEK, J.; LAPKIEWICZ, S.; LECEWICZ, M. A note on antioxidant capacity of boar seminal plasma. *Animal Science Papers and Reports*, [s. l.], v. 17, n. 4, p. 181–188, 1999.

TREMELLEN, K. Oxidative stress and male infertility: A clinical perspective. *Studies on Men's Health and Fertility*, [s. l.], v. 14, n. 3, p. 325–353, 2012. Available at: https://doi.org/10.1007/978-1-61779-776-7_16

VALENÇA, R.M.B. Espécies Reativas ao Oxigênio (ROS) e a utilização de antioxidantes na criopreservação do sêmen suíno. Disponível em: <http://cbra.org.br/pages/publicacoes/rbra/download/RB105Valencapag47-53.pdf>. Acesso em: mar. 2007.

VASCONCELOS, S.M.L et al. Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: principais métodos analíticos para sua determinação. *Química Nova*, v.30, n.5, p.1323-1338, 2007.

VYT, P. et al. Air contact influences the pH of extended porcine semen. [S. l.: s. n.], 2007. Available at: <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2006.00733.x>

WABERSKI, D. et al. Application of preserved boar semen for artificial insemination: Past, present and future challenges. *Theriogenology*, [s. l.], v. 137, p. 2–7, 2019a. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2019.05.030>

WABERSKI, D. et al. Sperm function in vitro and fertility after antibiotic-free, hypothermic storage of liquid preserved boar semen. *Scientific Reports*, [s. l.], v. 9, n. 1, p. 1–10, 2019b. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41598-019-51319-1>

YESTE, M. Sperm cryopreservation update: Cryodamage, markers, and factors affecting the sperm freezability in pigs. *Theriogenology*, [s. l.], v. 85, n. 1, p. 47–64, 2016. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2015.09.047>

YESTE, M. State-of-the-art of boar sperm preservation in liquid and frozen state. *Animal Reproduction*, [s. l.], v. 14, n. 1, p. 69–81, 2017. Available at: <https://doi.org/10.21451/1984-3143-AR895>

YIN, J. et al. l-Cysteine metabolism and its nutritional implications. *Molecular Nutrition and Food Research*, [s. l.], v. 60, n. 1, p. 134–146, 2016. Available at: <https://doi.org/10.1002/mnfr.201500031>

ZAKOŠEK PIPAN, M. et al. Superoxide dismutase: A predicting factor for boar semen characteristics for short-term preservation. *BioMed Research International*, [s. l.], v. 2014, 2014. Available at: <https://doi.org/10.1155/2014/105280>

ZINI, A. et al. Varicocele is associated with abnormal retention of cytoplasmic droplets by human spermatozoa. *Fertility and Sterility*, [s. l.], v. 74, n. 3, p. 461–464, 2000. Available at: [https://doi.org/10.1016/S0015-0282\(00\)00703-2](https://doi.org/10.1016/S0015-0282(00)00703-2)

APÊNDICE A – Protocolo: integridade de membrana plasmática

Princípio do método:

A integridade de membrana plasmática é avaliada pelo método de fluorescência em dupla coloração, utilizando os corantes SYBR-14/Iodeto de propídio (PI). O SYBR-14 é um corante de DNA que possui a capacidade de permear a membrana plasmática, mesmo que íntegra, corando a célula espermática de verde. O iodeto de propídio também é um corante de DNA, porém só consegue permear a membrana plasmática quando está se encontra lesionada.

Reagentes:

O SYBR-14/PI é encontrado no kit LIVE/DEAD® Sperm Viability Kit (L7011, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)

↔ Diluição do SYBR-14: 1:50 em DMSO

↔ Diluição do PI: 1:1 em DMSO

Observação: Realizar todo o preparo no escuro, longe da presença de luz intensa.

O SYBR-14 não deve ser congelado após a diluição.

Método:

Uma alíquota de 100 µL da dose inseminante é incubada com 2.5 µL da solução de SYBR-14/PI diluída, a 37 °C por 10 min no banho-maria seco. Após o processo de incubação, 3 µL da amostra deve ser avaliada entre lâmina e lamínula em microscópio de fluorescência (Axio Scope.A1 HAL 100FL, Filter Set 09, BP 450-490, Zeiss® Germany).

A contagem deve ser realizada imediatamente, sendo preconizada a contagem de pelo menos 200 células de forma manual ou 1.000 células utilizando o sistema CASA. As células coradas em verde possuem a membrana plasmática íntegra e as células coradas em vermelho possuem a membrana plasmática lesionada.

Utilizar lâminas e lamínulas novas!

Observação¹: Realizar todo o processo de incubação e avaliação no escuro

Observação²: Utilizar luvas durante toda a manipulação do SYBR-14/PI e DMSO;

Resultados:

Os resultados são expressos em porcentagem de células com a membrana íntegra.

APÊNDICE B – Protocolo: potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\psi_m$)

Princípio do método:

Para a avaliação do potencial da membrana mitocondrial é utilizado o corante fluorescente JC-1. Após transpassar as membranas e se direcionar até a mitocôndria, o corante fluorescente JC-1 é transformado em J-agregados quando há um alto potencial mitocondrial. Na forma natural de monômero, o JC-1 possui a fluorescência na coloração verde; já na forma J-agregado, o JC-1 possui a coloração alaranjada.

Reagentes:

Solução de trabalho JC-1 (T3168, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA): deve-se diluir o JC-1 em DMSO até a concentração de 1.53 mM.

↪ Pesar 0.00498 g de JC-1

↪ Diluir em 5 mL de DMSO

Observação: Caso haja a pretensão de realizar a avaliação em microscópio de fluorescência, deve-se diluir o JC-1 para a concentração de 153 mM.

Pode-se utilizar a calculadora no site da Sigma Aldrich para a realização do cálculo: <https://www.sigmaaldrich.com/BR/en/support/calculators-and-apps/mass-molarity-calculator>.

Observação¹: Realizar todo o preparo no escuro, longe da presença de luz intensa.

Observação²: Utilizar luvas durante toda a manipulação do JC-1 e DMSO;

Método:

Uma alíquota de 200 μ L da dose inseminante deve ser incubada junto a 1 μ L de JC-1, na temperatura de 37 °C por 40 min. Após o período de incubação, deve-se realizar a leitura da placa de 96 poços na leitora de microplacas (Spectramax® i3, Molecular Devices, Sunnyvale, USA). Observação: Todo o procedimento deve ser realizado no escuro.

Na leitora:

- 1) Selecionar a opção “*Settings*”, depois fluorescência “*FL*” e “*Endpoint*”;
- 2) Selecionar os comprimentos de onda 485/595 nm para excitação/emissão;
- 3) Identificar “*96 Well Standart crlbtm*” como a placa utilizada (Quando a placa for transparente!);
- 4) Na aba “*More Settings*”, desmarcar a opção “*Show Pre-Read Optimization Options*”.

Resultados:

Na avaliação, utilizamos os resultados da fluorescência Laranja (J-agregados) para comparar os grupos, além de ter sido utilizada a quantidade de células presentes no poço para expressar os resultados em RFU/10⁶ Espermatozoides.

APÊNDICE C – Protocolo: espécies reativas de oxigênio intracelular

Princípio do método:

Para a quantificação das espécies reativas de oxigênio no ambiente intracelular, é utilizado o corante DCFH-DA. Neste método, o DCFH-DA é absorvido pelas células espermáticas viáveis e hidrolisado enzimaticamente pelas esterases intracelulares, formando a molécula não fluorescente dichlorofluorescein (DCFH). Quando há a presença de espécies reativas de oxigênio o DCFH se transforma na molécula fluorescente dichlorofluorescein (DCF), sendo quantificada pela leitora de microplacas.

Reagentes:

Solução estoque de DCFH-DA (D399, Molecular probes, Eugene, USA): deve-se diluir o DCFH-DA em DMSO até a concentração de 10 mM.

Pode-se utilizar a calculadora no site da Sigma Aldrich para a realização do cálculo:

<https://www.sigmaaldrich.com/BR/en/support/calculators-and-apps/mass-molarity-calculator>

Observação¹: Realizar todo o preparo no escuro, longe da presença de luz intensa.

Observação²: Utilizar luvas durante toda a manipulação do DCFH-DA e DMSO;

- Solução neutra:
 - ↪ 205.37 mM glicose, 20.4 mM citrato de sódio diidratado, 3.36 mM EDTA, 10.01 mM cloreto de potássio.
 - ↪ 37 g/L glicose, 1.25 g/L, EDTA, 6 g/L citrato de sódio diidratado, 0.75 g/L cloreto de potássio, 1 L de água destilada.
 - ↪ *Seguir a mesma proporção quando preparar volumes menores.
- Peróxido 4,2 mM
 - ↪ 4,29 µL de peróxido (9,78 M) em 10 mL de água destilada.

Método:

1. Adicionar 1 mL da dose inseminante em um eppendorf;
2. Centrifugar a $1500 \times g$ por 2 min;
3. Descartar o sobrenadante e secar a boca do eppendorf com papel;
4. Adicionar 1 mL da solução neutra;
 - ↪ lavagem do pellet para retirar qualquer resíduo que reaja com DCF (principalmente o bicarbonato de sódio do diluente);

5. Centrifugar a $1500 \times g$ por 2 min;
6. Descartar o sobrenadante e secar a boca do eppendorf com papel;
7. Adicionar 1 mL da solução neutra contendo DCF 100 μM (concentração final);
8. Ressuspender o pellet com ajuda de uma pipeta;
9. Pipetar 200 μL das amostras na placa em triplicata
10. Adicionar o DCFH-DA (*stock solution*) em todos os poços
11. Realizar a incubação de uma triplicata de controle positivo, contendo solução neutra + μL de DCFH-DA (*stock solution*) + 10 μL peróxido de hidrogênio 4,2 mM (para verificar se o DCFH-DA está funcionando);
12. Realizar a incubação do branco: solução neutra + DCFH-DA e realiza a leitura após 1 h de incubação à 37 °C;

Na leitora:

- 1) Selecionar a opção “*Settings*”, depois fluorescência “*FL*” e “*Endpoint*”;
- 2) Selecionar os comprimentos de onda 485/532 nm para excitação/emissão;
- 3) Identificar “*96 Well Standart crlbtm*” como a placa utilizada
(Quando a placa for transparente);
- 4) Na aba “*More Settings*”, desmarcar a opção “*Show Pre-Read Optimization Options*”.

Observação: Realizar todo o preparo no escuro, longe da presença de luz intensa.

Resultados:

Os resultados são expressos em RFU/ 10^6 espermatozoides, utilizando a quantidade de células espermáticas do poço para realizar o cálculo.

APÊNDICE D - Protocolo: peroxidação lipídica (TBARS)

Princípio do método:

A peroxidação lipídica é determinada pelo método de TBARS (*thiobarbituric acid reactive substance*) que foi descrito por Ohkawa *et al.* (1979) para tecido animal e adaptado por Nichi *et al.* (2006) para amostras de sêmen. Neste método, o ácido tiobarbitúrico reage com o malondialdeído (um dos produtos finais obtidos na reação de peroxidação de lipídios) e promove a alteração da cor para rosa. Para que esta reação ocorra, é necessário que as amostras sejam expostas a alta temperatura (100 °C) e baixo pH. Após a reação, a alteração de cor pode ser quantificada por espectrofotometria.

Reagentes:

Ácido tricloroacético (TCA) 10%;

- ↪ Adicionar 10 g de TCA em 100 mL de água destilada;
- ↪ Realizar a diluição no momento da análise, não guardar a solução pronta!
- ↪ Acondicionar o TCA no dessecador com sílica pois os cristais são altamente higroscópicos!

Ácido tiobarbitúrico (TBA) 1% ;

- ↪ Adicionar 1 g de TBA em 100 mL de água destilada;
- ↪ Aquecer a solução até 60 – 80 °C por 1 h para dissolver completamente o TBA

*Utilizar a mesma proporção para fazer volumes menores!

Método:

1. Realizar a sonicagem da amostra (250 µL) em gelo por 30 s (8.000 rpm);
2. Adicionar 500 µL de TCA;
3. Centrifugar por 60 s a 13.000 rpm;
4. Retirar 500 µL do sobrenadante e adicionar 500 µL de TBA;
5. Incubar em banho-maria por 1 hora a 100 °C.
6. Refrigerar as amostras em banho-maria de gelo por 10 min para parar a reação;
7. Plaquear 200 µL, em placa de 96 poços, e realizar a leitura no comprimento de onda de 535 nm;

Na leitora:

- 1) Selecionar a opção “*Settings*”, depois absorvância “*ABS*” e “*Endpoint*”;
- 2) Selecionar o comprimento de onda 535 nm;
- 3) Identificar “*96 Well Standart crlbtm*” como a placa utilizada (Quando a placa for transparente!);
- 4) Na aba “*Speed Read*”, desmarcar a opção de leitura rápida;
- 5) Na aba “*More Settings*”, desmarcar a opção “*Show Pre-Read Optimization Options*”.

Resultados:

Os valores da leitura são utilizados no cálculo para transformação de absorvância para concentração, utilizando a lei de Beer-Lambert.

Os valores são expressos em nmol/10⁶ espermatozoides (utilizar a quantidade de células do poço da placa de 96 poços).

$$\text{Conc. (nmol /Sptz)} = \frac{(\text{Absorbância} - \text{Absorbância do branco}) \times 1000000 \times \text{F.D}}{\epsilon \times \text{Pathlength}}$$

ϵ = Coeficiente de extinção molar do MDA na leitura de 535 nm = $1.56 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$

Pathlength = É o comprimento do percurso que a luz atravessa a amostra, no caso de TBARS é 0.57 porque foi plaqueado 200 µL de volume na placa de 96 poços e isso corresponde a uma altura de 0.57 cm no poço.

Observação: se o volume plaqueado for de 350 µL o comprimento do percurso é de 1 cm, isso significa que pode utilizar a regra de três para descobrir o pathlength quando plaqueia volumes diferentes.

×1000000 = A multiplicação é realizada para transformar de mol/L para nmol

F.D = Fator de diluição. É o quanto a amostra é diluída pelos reagentes do teste, no caso do TBARS, o conteúdo total do ensaio (reagentes + amostra) é de 1200 µL, sendo que 200 µL é a amostra. Então o fator de diluição é $1200/200 = 6$

F.D = 6

Os valores devem ser ajustados pela concentração espermática do poço para expressar os resultados em nmol de MDA/10⁶ espermatozoides.

APÊNDICE E - Protocolo: conteúdo de sulfidrina

Princípio do método:

O conteúdo de sulfidrina está relacionado à concentração de glutatona da amostra. Neste método, a glutatona é oxidada pelo 5,5-ditiobis (2-nitrobenzoic acid) (DTNB) e depois reduzida pela glutatona redutase. Durante a oxidação da glutatona, a molécula 2-nitro-5 thiobenzoic acid (NTB) é formada, podendo ser quantificada por espectrofotometria pela coloração amarela. Este método foi descrito por Ellman (1959).

Reagentes:

- PBS 10 mM (pH 7,4)
- Tampão forte SH (pH 8,5)
 - ↪ 100 mM ácido bórico = (0,1236 g/20 mL)
 - ↪ 0,2 mM EDTA (0,00148 g/20 mL)
- DTNB (ácido 5,5'-ditio-bis-2-nitrobenzóico) 10 mM
 - ↪ 0,0081 g de DTNB em 2 ml de etanol 95%
 - ↪ passar no vórtex
 - ↪ diluir só na hora, não armazenar pronto

Método:

1. Realizar a sonicagem da amostra em gelo por 30 s (8.000 rpm);
2. Pipetar 50 µl de amostra na placa;
3. Pipetar 70 µl de PBS;
4. Pipetar 35 µL de tampão forte;
5. Pipetar o branco com 120 µL PBS + 35 µL tampão forte;
6. Adicionar 10 µL DTNB 10 mM;
 - a. colocar no espectrofotômetro para dar shake
7. Incubar por 1 hora em temperatura ambiente;
8. Ler a 412 nm;

Na leitora:

- 1) Selecionar a opção “*Settings*”, depois absorbância “*ABS*” e “*Endpoint*”;
- 2) Selecionar o comprimento de onda 412 nm para a leitura;

- 3) Identificar “96 Well Standart crlbtm” como a placa utilizada (Quando a placa for transparente!);
- 4) Na aba “Speed Read”, desmarcar a opção de leitura rápida;
- 5) Na aba “More Settings”, desmarcar a opção “Show Pre-Read Optimization Options”.

Resultados:

Os valores da leitura são utilizados no cálculo para transformação de absorbância para concentração, utilizando a lei de Beer-Lambert.

$$\text{Conc. (nmol /Sptz)} = \frac{(\text{Absorbância} - \text{Absorbância do branco}) \times 1000000 \times \text{F.D}}{\varepsilon \times \text{Pathlength}}$$

ε = Coeficiente de extinção molar do NTB na leitura de 412 nm = 14.15 mM⁻¹

Pathlength = É o comprimento do percurso que a luz tem de atravessar na amostra, no caso de NTB é 0.47 porque foi plaqueado 165 µL de volume na placa de 96 poços e isso corresponde a uma altura de 0.47 cm no poço.

×**1000000** = A multiplicação é realizada para transformar de mol/L para nmol

F.D = Fator de diluição. É o quanto a amostra é diluída pelos reagentes do teste; no caso da dosagem do conteúdo de sulfidrina, o conteúdo total do ensaio (reagentes + amostra) é de 165 µL, sendo que 50 microlitros é a amostra. Então o fator de diluição é 165/50 = 3.3 **F.D** = 3.3

Os valores devem ser ajustados pela quantidade de células espermáticas do poço para expressar os resultados em nmol de NTB/10⁶ espermatozoides.