

**INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E  
TECNOLOGIA GOIANO CAMPUS RIO VERDE  
DIRETORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA**

**EFEITO DA ADIÇÃO DE GLUTATIONA AO DILUENTE  
DE CRIOPRESERVAÇÃO SOBRE A QUALIDADE DO  
SÊMEN BOVINO**

Autor: Fausto Pereira Garcia  
Orientadora: Dra. Karen Martins Leão

Rio Verde - GO  
Setembro - 2015

# **EFEITO DA ADIÇÃO DE GLUTATIONA AO DILUENTE DE CRIOPRESERVAÇÃO SOBRE A QUALIDADE DO SÊMEN BOVINO**

Autor: Fausto Pereira Garcia  
Orientadora: Dra. Karen Martins Leão

Dissertação apresentada, como parte das exigências para obtenção do título de MESTRE EM ZOOTECNIA, no Programa de Pós-Graduação em Zootecnia do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano – Campus Rio Verde, - Área de concentração Zootecnia/Recursos Pesqueiros.

Rio Verde – GO  
Setembro - 2015

Garcia, Fausto Pereira

Efeito da Adição de Glutathione ao Diluente de Criopreservação Sobre a Qualidade do Sêmen Bovino / Fausto Pereira Garcia. - Rio Verde. - 2015.

35 f. : il.

Dissertação (Mestrado) – Instituto Federal Goiano - Campus Rio Verde, 2015.

Orientador: Dr<sup>a</sup>. Karen Martins Leão.

Bibliografia

1. Antioxidante. 2. Viabilidade Espermática. 3. Touros. 4. Sêmen Congelado. I Título. II. Instituto Federal Goiano – Campus Rio Verde.

CDD: 636.21

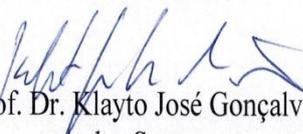
**INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA  
GOIANO – CÂMPUS RIO VERDE  
DIRETORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA**

**EFEITO DA ADIÇÃO DE GLUTATIONA AO DILUENTE DE  
CRIOPRESERVAÇÃO SOBRE A QUALIDADE DO SÊMEN  
BOVINO**

Autor: Fausto Pereira Garcia  
Orientadora: Karen Martins Leão

*TITULAÇÃO:* Mestre em Zootecnia – Área de concentração Zootecnia  
– Zootecnia e Recursos Pesqueiros.

APROVADO em 24 de setembro de 2015.

  
Prof. Dr. Klayto José Gonçalves  
dos Santos  
*Avaliador externo*  
UEG/São Luís de Montes Belos

  
Prof. Dr. Marco Antônio Pereira da  
Silva  
*Avaliador interno*  
IF Goiano/RV

  
Prof. Dr. Karen Martins Leão  
*Presidente da banca*  
IF Goiano/RV

## AGRADECIMENTOS

A Deus, pelas oportunidades e conquistas proporcionadas.

Aos meus Pais, pelo incentivo e auxílio.

A Dr.<sup>a</sup> Karen Martins Leão, orientadora e conselheira, pelos ensinamentos, paciência e incentivo.

Ao Dr. Marco Antônio Pereira da Silva, pelos ensinamentos e auxílio.

Ao PhD. Klayto José Gonçalves dos Santos, pela amizade e esclarecimentos.

Ao meu amigo Dr. Francisco Ribeiro de Araújo Neto, vulgo Franchico, pelos ensinamentos e companheirismo.

As minhas amigas e colegas de mestrado, Ana, Aline, Adriana, Denise, Karoline, Natália, Patrícia, Olivia, pela paciência, dedicação e companheirismo.

Aos meus amigos e colegas de mestrado, Adalto, Chip de Torichoreu, Eduardo, Eneias Aurélio, Sergio Chupis, pela paciência, dedicação e companheirismo.

A minha namorada Fernanda, pela compreensão e dedicação.

A Dr.<sup>a</sup> Aracele, diretora educacional da UEG unidade São Luis de Montes Belos.

Aos Dr. Rafael e Dr. Diogo, ambos, coordenadores do curso de Zootecnia e da Fazenda Escola em que foi desenvolvido o projeto.

À Universidade Estadual de Goiás – Unidade São Luis de Montes Belos/GO, pela disponibilidade dos equipamentos utilizados.

Ao Instituto Federal Goiano, Campus Rio Verde, por proporcionar o mestrado em Zootecnia.

A Universidade Federal de Goiás em especial a Dr.<sup>a</sup> Maria Lúcia, pela disponibilização dos equipamentos.

A Msc. Natália do Carmo Silva, pela colaboração nas análises espermáticas.

A todos os colegas do Mestrado em Zootecnia que cursaram disciplinas em comum.

## BIOGRAFIA DO AUTOR

FAUSTO PEREIRA GARCIA, filho de Maria Célia Clara Pereira Garcia e Benedito Raimundo Garcia. Nascido na cidade de Sanclerlândia – GO, aos 04 dias do mês de dezembro de 1989. Iniciou no curso de Zootecnia em agosto de 2007 e finalizou em junho de 2012. Iniciou no Mestrado em março de 2013, submetendo-se a defesa da dissertação em setembro de 2015.

## ÍNDICE GERAL

	Página
LISTA DE SÍMBOLOS, SIGLAS, ABREVIACÕES E UNIDADES.....	VI
RESUMO.....	VIII
ABSTRACT.....	IX
1 - INTRODUÇÃO GERAL.....	1
1.1 Revisão de literatura.....	2
1.1.1 Célula espermática.....	2
1.1.2 Aspecto e constituintes do sêmen.....	2
1.1.3 Espécies reativas de oxigênio (EROS) e antioxidantes.....	3
1.1.4 Criopreservação.....	5
1.1.5 Diluidores.....	6
1.1.6 Técnicas de congelamento.....	7
1.2 Justificativa e relevância.....	9
1.3 Referências bibliográficas.....	9
2 - OBJETIVO GERAL.....	12
3 – TRABALHO CIENTÍFICO.....	13
EFEITO DA ADIÇÃO DE GLUTATIONA AO DILUENTE DE CRIOPRESERVAÇÃO SOBRE A QUALIDADE DO SÊMEN BOVINO.....	13
RESUMO.....	13
ABSTRACT.....	14
INTRODUÇÃO.....	14
MATERIAL E MÉTODOS.....	15
Local, Animais, Alimentação e Período de colheita.....	15
Colheita e Processamento de sêmen.....	16
Congelamento do sêmen.....	17
Análise do sêmen.....	17
<i>Delineamento estatístico</i> .....	18
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	18
CONCLUSÃO.....	23
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	23

## ÍNDICE DE TABELAS

		Página
Tabela 1	Fontes de variação e quadrados médios utilizados no modelo estatístico para a análise para Motilidade Total (MT), Motilidade Progressiva (MP), vigor (V) e Integridade de Membrana Plasmática (IMP).....	19
Tabela 2	Média e Erro Padrão da Motilidade Total (MT), Motilidade Progressiva (MP), Vigor (0 - 5) e Integridade de Membrana Plasmática (IM) após descongelamento do Sêmen criopreservado com diferentes diluentes, diferentes concentrações de glutathione e diferentes técnicas de criopreservação.....	19
Tabela 3	Média de Motilidade Total (MT) considerando os fatores tipo de diluidor, tipo de congelamento e níveis de glutathione com diferença significativa.....	20
Tabela 4	Médias de Motilidade Progressiva (MP) considerando os fatores tipo de diluidor, tipo de congelamento e níveis de glutathione com diferença significativa.....	20
Tabela 5	Médias de Vigor (V) considerando os fatores tipo de diluidor, tipo de congelamento e níveis de glutathione com diferença significativa.....	21
Tabela 6	Médias de Integridade de Membrana Plasmática (IMP) considerando os fatores tipo de diluidor, tipo de congelamento e níveis de glutathione com diferença significativa.....	22

## LISTA DE SÍMBOLOS, SIGLAS, ABREVIACÕES E UNIDADES

ACG	AndroMed <sup>®</sup> controle - diluente sem adição de glutathione congelado em geladeira
ACM	AndroMed <sup>®</sup> controle - diluente sem adição de glutathione congelado em máquina
A1,5G	AndroMed <sup>®</sup> 1,5 mM de glutathione - diluente com adição de glutathione congelado em geladeira
A1,5M	AndroMed <sup>®</sup> 1,5 mM de glutathione - diluente com adição de glutathione congelado em máquina
A2,5G	AndroMed <sup>®</sup> 2,5 mM de glutathione - diluente com adição de glutathione congelado em geladeira
A2,5M	AndroMed <sup>®</sup> 2,5 mM de glutathione - diluente com adição de glutathione congelado em máquina
ATP	Adenosina trifosfato
BCG	BotuBov <sup>®</sup> controle - diluente sem adição de glutathione, congelado em geladeira
BCM	BotuBov <sup>®</sup> controle - diluente sem adição de glutathione, congelado em máquina
B1,5G	BotuBov <sup>®</sup> 1,5 mM de glutathione - diluente com adição de glutathione congelado em geladeira
B1,5M	BotuBov <sup>®</sup> 1,5 mM de glutathione - diluente com adição de glutathione congelado em máquina
B2,5G	BotuBov <sup>®</sup> 2,5 mM de glutathione - diluente com adição de glutathione congelado em geladeira
B2,5M	BotuBov <sup>®</sup> 2,5 mM de glutathione - diluente com adição de glutathione congelado em máquina
°C	Graus Celsius
Ca <sup>2+</sup>	Cálcio
EROS	Espécies reativas ao oxigênio

FIV	Fertilização <i>in vitro</i>
G	Gramas
GR	Glutaciona redutase
GPx	Glutaciona peroxidase
GSH	Glutaciona
IA	Inseminação artificial
IMP	Integridade de membrana plasmática
mL	Mililitros
mM	Milimolar
MP	Motilidade progressiva
MT	Motilidade total
O <sub>2</sub>	Oxigênio
pH	Potencial hidrogeniônico
P1S1	Curva de congelamento
SOD	Superóxido dismutase
TE	Transferência de embrião
V	Vigor espermático
®	Marca registrada
%	Porcentagem
µl	Microlitros

## RESUMO

O congelamento de sêmen tem como intuito disseminar genética de animais melhoradores preservando a viabilidade espermática, garantindo a longevidade necessária para a utilização das amostras de sêmen em programas de reprodução animal. Objetivou-se avaliar o efeito da adição de glutatona, em diluentes de criopreservação a base de lecitina de soja e gema de ovo, bem como diferentes técnicas de congelamento, sendo máquina e geladeira, sobre a qualidade do sêmen pós-descongelamento. Foram congelados cinco ejaculados de quatro touros da Raça Holandês, totalizando 20 amostras. Após as colheitas os ejaculados foram colocados em tubos, sendo 0,5 mL de sêmen e 9,5 mL de diluidor, posteriormente a diluição foi adicionado a glutatona nas concentrações de 1,5 e 2,5 mM. Após diluídas e homogeneizadas as amostras foram envasadas em palhetas de 0,5 mL. As amostras foram congeladas de acordo com os seguintes tratamentos, diluidor à base de lecitina de soja, AndroMed<sup>®</sup> controle - diluente sem adição de glutatona congelado em geladeira e máquina, AndroMed<sup>®</sup> 1,5 mM de glutatona - diluente com adição de glutatona congelado em geladeira e máquina, AndroMed<sup>®</sup> 2,5 mM de glutatona - diluente com adição de glutatona congelado em geladeira e máquina, diluente à base de gema de ovo, BotuBov<sup>®</sup> controle - diluente sem adição de glutatona, congelado em geladeira e máquina, BotuBov<sup>®</sup> 1,5 mM de glutatona - diluente com adição de glutatona congelado em geladeira e máquina e BotuBov<sup>®</sup> 2,5 mM de glutatona - diluente com adição de glutatona congelado em geladeira e máquina. O Experimento foi conduzido em delineamento em blocos em esquema fatorial em 2x3x2, sendo 2 diluidores, 3 níveis de glutatona e 2 tipos de congelamento, considerando o touro com bloco. Os dados gerados foram analisados no programa R Project for Statistical Computing pelo teste *t* a 5% de probabilidade, através do R Project versão 3.2.2 (R, 2015). As variáveis avaliadas foram motilidade total e progressiva, vigor e integridade de membrana plasmática. A adição de glutatona não alterou significativamente a motilidade total, motilidade progressiva e vigor, em nenhuma das concentrações utilizadas. Nas análises de integridade de membrana plasmática houve diferença significativa quanto ao uso dos diluidores, o diluidor à base de gema de ovo obteve resultados superiores independente da forma de congelamento ou adição de glutatona.

**Palavras-chave:** antioxidante, viabilidade espermática, touros, sêmen congelado.

## ABSTRACT

The semen freezing has the intention to spread the genetic of improvers animal maintaining sperm viability, assuring the longevity required for the use of the semen samples in animal breeding programs. The objective was to evaluate the effect of glutathione addition in cryopreservation thinners of soy lecithin-based and egg yolk and different freezing techniques, machine and refrigerator on quality of post-thaw semen. Five ejaculates of four Dutch bulls were freezing totaling 20 samples. After harvesting the ejaculates were placed into tubes with 0.5 mL of semen and 9.5 mL of dilutor, after dilution was added the glutathione in concentrations of 1.5 and 2.5 mM. After diluted and homogenized samples were poured into tubes of 0.5 mL. The samples were frozen according to the following treatments, soybean lecithin thinner base AndroMed® control - no added diluent frozen in the refrigerator and machine glutathione, 1.5 mM glutathione AndroMed® - diluent with addition of glutathione frozen in refrigerator and machine, AndroMed® 2.5 mM glutathione - thinner with addition of glutathione frozen in refrigerator and machine, thinner egg yolk base, BotuBov® control - without adding glutathione thinner, frozen in refrigerator and machine, BotuBov® 1.5 mM of glutathione - thinner with addition of glutathione frozen in the refrigerator and machine and BotuBov® 2.5 mM glutathione - thinner with addition of glutathione frozen in refrigerator and machine. The experiment was conducted in randomized block design in a factorial scheme 2x3x2, two thinners, three levels of glutathione and two types of freezing considering the bull as a block. The data were analyzed using the R Project for Statistical Computing program by t test at 5% probability, through the Project R version 3.2.2 (R, 2015). The variables evaluated were total motility and progressive force and plasma membrane integrity. Glutathione added did not alter the total motility, progressive motility and vigor, in any of the concentrations used. In plasma membrane integrity analysis was no significant difference of the thinners use, thinner egg yolk base achieved superior results regardless of the form of freezing or addition of glutathione.

Key words: antioxidant, sperm viability, bulls, frozen semen.

# 1 INTRODUÇÃO GERAL

O Brasil pode melhorar os índices reprodutivos em bovinocultura de leite ou corte, conseqüentemente a lucratividade da pecuária Brasileira. A possibilidade de melhores índices pode propiciar a disseminação rápida de biotécnicas reprodutivas (BARUSELLI et al., 2004).

Técnicas de reprodução assistida como inseminação artificial (IA), transferência de embrião (TE) e fertilização *in vitro* (FIV), surgiram com intuito de acelerar os ganhos genéticos. A IA representa uma ferramenta para o melhoramento genético de bovinos, desde que, bem implantada e associada com correto manejo sanitário, nutricional e reprodutivo (ARRUDA et al., 2005).

O processo de criopreservação das células espermáticas resulta na diminuição da fertilidade quando comparado com sêmen fresco, esse prejuízo surge da combinação da perda da viabilidade espermática e danos na capacidade funcional dos espermatozoides, uma vez que a motilidade e as estruturas dos espermatozoides são afetadas tanto na congelação quanto no descongelamento do sêmen (DIAS, 2010).

A possível redução na fertilidade está associada a técnica de congelamento empregada, em que boa parte dos espermatozoides sofrem comprometimento da capacidade fecundante (MAIA, 2006).

O congelamento e descongelamento de sêmen causam danos estruturais, bioquímicos e conseqüentemente funcionais nos espermatozoides, desde a colheita o sêmen é exposto ao oxigênio, essa exposição promove o aumento de espécies reativas ao oxigênio (EROS). As EROS em excesso comprometem a viabilidade dos espermatozoides (VALENÇA & GUERRA, 2007).

Existe uma infinidade de mecanismos de defesa denominados antioxidantes, que estão envolvidos diretamente nos sistemas biológicos de defesa celular. Durante a criopreservação, vários fatores podem comprometer a funcionalidade dos espermatozoides, mas a redução progressiva de glutathione por causa do processo de criopreservação é um fator determinante na sobrevivência espermática. Sabe-se que a glutathione está presente em todas as células de organismos vivos, tendo ação direta contra os processos oxidativos (GADEA et al., 2005).

Dessa forma o uso de antioxidantes para neutralizar os efeitos das EROS pode melhorar a viabilidade dos espermatozoides criopreservados. A adição de antioxidantes em específico de glutathione a meios diluidores deve ser testada com a finalidade de reduzir os danos celulares provocados pelo estresse oxidativo em sêmen bovino congelado.

## **1.1 Revisão de literatura**

### *1.1.1 Célula espermática*

Os espermatozoides podem ser divididos em duas estruturas, cabeça e cauda. A cabeça possui o núcleo achatado de forma oval, que abriga a cromatina. Já a extremidade anterior do núcleo espermático é recoberta pelo acrossoma uma fina cobertura com dupla camada de membranas que envolve o núcleo (ARRUDA et al., 2005).

O acrossoma é fundamental para a ligação do espermatozoide com a zona pelúcida, deve permanecer intacto antes e durante o trânsito pelo trato reprodutivo da fêmea até que ocorra à ligação com a zona pelúcida. Se a reação acrossômica ocorrer prematuramente haverá queda na fertilidade (SILVA & GADELLA, 2006).

A cauda é composta pelo colo e pelas peças intermediária, principal e terminal. O colo é a ligação da cabeça com a cauda, a peça intermediária é a extensão que abriga a bainha mitocondrial e a peça principal é a maior extensão da cauda do espermatozoide, a porção central dessas peças forma o axonema, o conjunto total dessas estruturas é revestido pela membrana plasmática (HASHIDA et al., 2005).

A membrana plasmática tem importante papel no controle, fluidez e estabilidade da bicamada lipídica. E está diretamente relacionada com a taxa de capacitação. É responsável pela manutenção do equilíbrio osmótico, atua como barreira entre o meio intra e extracelular. Lesões nesta estrutura podem ocasionar perda da homeostase levando a morte celular (RODRIGUEZ & MATINEZ, 2007).

### *1.1.2 Aspecto e constituintes do sêmen*

O aspecto do sêmen *in natura* pode ser caracterizado como cremoso, espumoso, esbranquiçado ou opalino. A abstinência sexual influencia diretamente seu aspecto,

animais que passam por grande período de abstinência tem o aspecto do seu sêmen amarelado, isso devido a morte espermática e necrose das células haploides (MARQUES, 2006).

O sêmen é caracterizado como um fluido orgânico e tem como função transportar os espermatozoides até as tubas uterinas para que ocorra a fertilização. É constituído por espermatozoides e líquido seminal (ARRUDA et al., 2005).

O líquido seminal é composto pelas secreções da vesícula seminal, próstata e glândula bulbouretral. As principais fontes de energia que nutrem os espermatozoides são oriundas da vesícula seminal, são elas, aminoácidos, citratos, flavinas e frutose. Outros constituintes como fosforicolina e prostaglandinas estão envolvidas no desenvolvimento, já as substâncias que agem como antioxidantes naturais são, proteínas, vitaminas B, C e ferro (SEVERO, 2009).

O líquido prostático tem como função tamponar o pH ácido da uretra e minimizar os danos causados pelo pH alcalino da vagina. Ácido cítrico, fibrinolizina, enzimas proteolíticas e zinco provenientes da próstata estabilizam a cromatina, caso ocorra deficiência de zinco haverá decréscimo na fertilidade (BUCHER et al., 2009).

A galactose, e o muco provenientes das glândulas bulbouretrais aumentam a mobilidade das células espermáticas na vagina e cérvix maximizando a fertilização (VALLE & SILVA FILHO, 2001).

### *1.1.3 Espécies reativas de oxigênio (EROS) e antioxidantes*

Por si só, as células possuem mecanismo de defesa antioxidante enzimático e não enzimático, esses sistemas participam no bloqueio dos radicais livres impedindo que possam vir a existir lesões celulares decorrentes de estresse por fatores externos (GUERRA et al., 2004).

No sistema de defesa enzimático a ação de enzimas específicas inibe os efeitos da EROS, esse sistema tem ação direta no bloqueio dos radicais livres antes que estes causem lesões nas membranas, para cada radical existe determinada enzima que impede a ação do mesmo, são estas, superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutatona peroxidase (GPx), glutatona (GSH) e (GR) glutatona redutase (MARTI et al., 2008).

Já no sistema não enzimático as substâncias que impedem os efeitos deletérios da EROS são vitaminas C e E, alguns compostos à base de selênio, ácido úrico, ácido

lipoico e ubiquinonas que participam na produção de adenosina trifosfato (ATP) e realizam importante papel na cadeia transportadora de elétrons (PENA et al., 2005).

Os radicais livres são substâncias que apresentam número ímpar de elétrons, são altamente instáveis pela ação de luz ou oxigênio. Pode ser causado por diversos fatores, no entanto a diminuição na disponibilidade de antioxidantes é um fator determinante para o desequilíbrio celular (GUERRA et al., 2004).

EROS são formados pela ação de alguma fonte externa ou interna de energia em consequência do metabolismo. Quando essa fonte de energia atinge o átomo faz com que um elétron seja removido de sua órbita, isso gera um novo átomo contendo um elétron extra (BALL, 2008).

A primeira indicação de que o estresse provocado por EROS poderia afetar a viabilidade espermática foi feita em 1943 quando MacLeod em estudo com sêmen humano observou que quando incubado em oxigênio (O<sub>2</sub>) rapidamente perdiam motilidade. Posteriormente foi descoberto que EROS causava a redução da motilidade por causar lesões nas membranas (BALL, 2008).

Quimicamente os ácidos graxos insaturados são atacados pelos radicais livres, isso faz com que ocorram reações de auto-oxidação, com isso as membranas espermáticas que são ricas em ácidos graxos poli-insaturados são afetadas diretamente pela EROS por causar lesões (STRADAIOLI et al., 2007).

As lesões provenientes do estresse advindo do processo de criopreservação podem ser minimizadas através da suplementação com antioxidantes, a adição de substâncias que desintoxiquem as células é de extrema necessidade para a sobrevivência dos espermatozoides (SILVA & GADELLA, 2006).

Os espermatozoides bovinos não conseguem metabolizar o peróxido de hidrogênio, essa substância causa a intoxicação celular em razão das concentrações de superóxido dismutase, e glutatona peroxidase decrescerem no processo de criopreservação (GADEA et al., 2005).

A glutatona sofre um decréscimo progressivo no decorrer da criopreservação, se suplementada pode melhorar ou minimizar os efeitos deletérios da (EROS). Nos espermatozoides as maiores concentrações encontradas estão na peça intermediária, sua função básica é agir na desintoxicação e antioxição de compostos endógenos, sua adição em diluidores tem como função reduzir os danos causados pela oxidação (LUBERDA, 2005).

A utilização de antioxidantes em específico de glutatona como suplemento em meios de diluição, visa melhorar a qualidade das células espermáticas após o processamento do sêmen. Ela é o principal constituinte do sistema de defesa antioxidante celular, participa no mecanismo de proteção removendo a EROS, incluindo peróxidos formados no metabolismo do oxigênio, isso, deve-se ao fato da glutatona doar elétrons (GUERRA et al., 2004).

A glutatona exerce numerosas funções biológicas, participa da maturação oocitária, fertilização inibindo a peroxidação do hidrogênio e na pré-implantação do embrião, está envolvida diretamente na proteção dos danos oxidativos tanto nos gametas masculinos como femininos (LUBERDA, 2005).

Apresenta dupla função na célula espermática podendo ser enzimaticamente ativa na espermátide, funcionando como uma proteína estrutural do espermatozoide ou como inibidor dos efeitos deletérios causados pelos radicais livres (MAIA et al., 2010).

A utilização de glutatona incorporada a diluidores comerciais de congelamento pode aumentar a viabilidade dos espermatozoides, contudo altas concentrações podem diminuir a motilidade total, fator que é descrito por SILVA et al. (2009), em que Tratamentos com concentrações acima de 2,5 mM tiveram decréscimo na motilidade espermática.

#### *1.1.4 Criopreservação*

A criopreservação de sêmen é uma biotecnologia de grande impacto na reprodução animal, visa à suspensão do metabolismo espermático e a manutenção das suas características por tempo prolongado, quando mantido em nitrogênio líquido (PESCH & HOFMAN, 2007).

O uso do sêmen congelado, permite maior aproveitamento de animais com alto potencial genético, transporte do sêmen, formação de bancos de germoplasma tanto de animais que correm risco de extinção como daqueles que não podem ser utilizados na reprodução (BERTOZOO & ZÚCCARI, 2008).

No entanto o congelamento do sêmen sofre influência de variações específicas e individuais que podem causar diferenças biofísicas e bioquímicas nas membranas dos espermatozoides (MAIA et al., 2010).

Basicamente a criopreservação é o processo de troca de substâncias do meio intracelular para o meio extracelular, essa troca causa a desidratação parcial dos

espermatozoides e hidratação com crioprotetores intracelulares, em determinadas situações se o congelamento ocorrer de forma rápida a água contida nas organelas da célula espermática irá causar danos nas membranas pela formação de cristais de gelo (GRAHAM & MOCÉ, 2005).

Durante o processo de criopreservação ocorre a elevação das concentrações de cálcio intracelular e em consequência a reação acrossomal nos espermatozoides é realizada em tempo menor do que as realizadas com sêmen *in natura*, este fato é responsável por danos às membranas espermáticas causando a redução da motilidade (BALL, 2008).

Se o congelamento não sofrer influências relacionadas a tempo de estabilização ou oscilações severas de temperatura os danos decorrentes do processo de criopreservação sofridos pelas células espermáticas serão minimizados (BERTOZOO & ZÚCCARI, 2008).

#### 1.1.5 Diluidores

Durante a criopreservação, adiciona-se diluidores com a função de proteger os espermatozoides no congelamento e descongelamento. São importantes porque evitam a formação de gelo intracelular devido as trocas osmóticas. Em sua composição existe basicamente açúcares, crioprotetores intra e extracelulares, soluções tampões, antibióticos e antioxidantes, cada um destes constituintes exercem funções diretamente relacionadas com a manutenção da funcionalidade dos espermatozoides, os açúcares, por exemplo, fornecem energia, as fontes comumente utilizadas são glicose, frutose e manose (GRAHAM & MOCÉ, 2005).

Os crioprotetores tem como função manter a sobrevivência celular durante a criopreservação e descongelamento do sêmen e podem atuar de forma intracelular ou extracelular, os mais utilizados como fator de proteção intracelular são glicerol, etilenoglicol, acetamida e dimetilsulfóxido, já os extracelulares mais utilizados são leite, gema de ovo e extrato de soja (FICKEL et al., 2007).

A lecitina de soja possui uma fração lipoproteica de baixa densidade similar à encontrada na gema de ovo, é uma alternativa de origem não animal. Seu uso tem como objetivo proporcionar maior biossegurança ao sêmen que será criopreservado. KASIMANICKAM et al. (2011) obtiveram resultados semelhantes entre crioprotetores extracelulares à base de gema de ovo e lecitina de soja.

Em estudos realizados por FERNANDEZ (2012), crioprotetores à base de gema ovo tiveram melhores resultados em testes de motilidade do que espermatozoides congelados com crioprotetores à base de extrato de soja, bem como desempenho superior em análises de motilidade espermática.

As soluções tampões são importantíssimas na manutenção do pH neutro, fato que favorece a viabilidade dos espermatozoides, são usadas para neutralizar os íons de hidrogênio fazendo com que o pH seja mantido entre (6,8 e 7,1), os tampões mais utilizados na criopreservação de sêmen bovino são o citrato e tris (PURDY, 2006).

Antibióticos previnem a contaminação das amostras de sêmen durante a colheita e manipulação, os principais antibióticos utilizados são a penicilina e estreptomicina. A penicilina em específico possui função na inibição da peroxidação lipídica atuando paralelamente na proteção contra os radicais livres, contudo, apenas sua ação não inibe os efeitos dos radicais livres (WATSON, 2000).

Os antioxidantes por vez têm como função controlar espécies reativas de oxigênio pelo aumento na fluidez da membrana plasmática, à adição de substâncias antioxidantes nos diluentes de sêmen da espécie bovina causam a redução dos efeitos das EROS melhorando a funcionalidade no fim do processo de congelamento (GUERRA et al., 2004).

No entanto, em estudo realizado por SILVA et al. (2012) observou-se que concentrações iguais ou acima de 5 mM de glutathione reduzida em adição a diluidores não preservaram as características de integridade de membrana plasmática e acrossoma.

No mesmo estudo foi observado que o tempo de estabilização é importante para o influxo de cálcio ( $Ca^{2+}$ ) para o interior da célula com desencadeamento de reação acrossomal prematura, melhorando a qualidade dos espermatozoides (SILVA et al., 2012).

### *1.1.6 Técnicas de congelamento*

A técnica de congelamento a ser usada na criopreservação influencia diretamente a qualidade do sêmen. A velocidade em que a temperatura decresce está inteiramente relacionada com a formação de cristais de gelo (HOLT, 2000).

Fatores físicos e biológicos interferem na viabilidade do sêmen bovino, a porcentagem de espermatozoides que sobrevivem ao congelamento e descongelamento é dependente do resfriamento e aquecimento que foi submetido o ejaculado. Se a célula

for criopreservada em intervalo de tempo curto haverá a formação de gelo extracelular, esse fato não permite que a célula desidrate o necessário, há o comprometimento das trocas osmóticas do meio intracelular para o extracelular, em consequência haverá maior formação de cristais de gelo dentro da célula, esses cristais são extremamente nocivos para os espermatozoides, são estes que comprometem a integridade das membranas (PURDY, 2006).

A interação das curvas de congelamento com os diluidores apresenta grande influência na sobrevivência espermática, a velocidade de congelamento e aquecimento são dependentes uma da outra. Se o sêmen for congelado lentamente e descongelado rapidamente poderá ocorrer danos nas membranas devido os cristais de gelo descongelarem rapidamente e invadirem as células provocando repleção, esse fato compromete a viabilidade das membranas (CÂMARA et al., 2011).

Existem várias curvas de congelamento de sêmen, basicamente todas iniciam o congelamento entre 30 e 36°C, o que as diferenciam é o decréscimo na temperatura (Tempo x Graus °C) até o período de estabilização a 5°C, o período de estabilização proporciona as trocas osmóticas responsáveis pelo sucesso do congelamento, o tempo de estabilização pode variar de 3 a 72 horas, sendo que a partir de 3 horas possivelmente as trocas já tenham ocorrido (OLIVEIRA, 2011).

O tempo de estabilização usado na criopreservação auxilia na manutenção da viabilidade celular pós-congelação/descongelação, CÂMARA et al. (2011) relataram que quanto maior o tempo de estabilização a 5°C e menor for o decréscimo da temperatura sêmen-diluidor melhor serão os resultados obtidos no descongelamento do sêmen para análises de motilidade, integridade de membrana plasmática e acrossoma.

Posteriormente ao período de estabilização, inicia-se a queda da temperatura de +5°C a -5°C, as rampas negativas se iniciam em -5°C decrescendo entre -10°C ou -15°C por minuto dependendo da curva selecionada até -30°C, já na segunda rampa as temperaturas podem decrescer dependendo da curva entre -10°C, -20°C, -30°C ou -60°C por minuto (OLIVEIRA, 2011).

Em estudo realizado por O'HARA et al. (2010) foi avaliado que a viabilidade espermática do sêmen de carneiros nas temperaturas de 5°C e 15°C por um período de 72 horas tiveram diferença significativa na viabilidade, o sêmen refrigerado a 5°C manteve a viabilidade relativamente constante entre 24 e 72 horas, no entanto a 15°C houve o decréscimo linear da viabilidade.

## 1.2 Justificativa e relevância

Não existe um protocolo de congelamento de sêmen que preserve em totalidade as características morfológicas e funcionais dos espermatozoides, isso por causa dos danos que ocorrem à célula durante a criopreservação. Neste sentido, o uso de diferentes diluentes, técnicas de congelamento e adição de antioxidantes pode melhorar a viabilidade dos espermatozoides após a descongelação (VALENÇA & GUERRA, 2007).

Torna-se necessário desenvolver um protocolo de criopreservação de sêmen bovino, capaz de minimizar os danos sofridos pelos espermatozoides durante o processo de criopreservação, melhorando a viabilidade espermática pós-descongelamento, proporcionando amostras de sêmen com melhor potencial fertilizante.

Com base em estudos já realizados a adição de glutatona em diluidores de congelamento pode minimizar os danos que ocorrem no processo de criopreservação relativo as EROS, esse fato vem melhorar a funcionalidade dos espermatozoides em programas reprodutivos.

## 1.3 Referências bibliográfica

ARRUDA, R.P.; CELEGHINI, E.C.C.; SOUZA, L.W.O. Importância da qualidade do sêmen em programas de IATF e TETF. **Acta Sci Vet**, v.33, supl. 1, p.145-150, 2005.

BALL, B.A.; Oxidative stress, osmotic stress and apoptosis: Impactos on sperm function and preservation in the horse. **Animal Reproduction Science**, v.107,p. 257-267, 2008.

BARUSELLI, P. S; REIS, E. L; MARQUES, M. O; NASSER, L. F; BÓ, G. A. The use of hormonal treatments to improve reproductive performance of anestrous beef cattle in tropical climates. **Animal Reproduction Science**. v. 82-3, p.479-86, 2004.

BERTOZZO, B. R. & ZÚCCARI, C. E. S. N. **Efeito da adição do colesterol ao meio de incubação do sêmen bovino congelado sobre a integridade das membranas plasmática e acrossomal**. 10, 2008. Disponível em: <http://www.propp.ufms.br>. Acesso em 07 de Abril, 2015.

BUCHER, A; KASIMANICKAM, R; HALL, J. B; DEJARNETTE, J. M; WHITTIER, W. D; KÄHN, W; XU, Z. Fixed-time AI pregnancy rate following insemination with frozen-thawed or fresh-extended semen in progesterone supplemented CO-Synch protocol in beef cows. **Theriogenology**, v.71, p.1180–1185, 2009.

CÂMARA, D.R.; SILVA, S.V.; ALMEIDA, F.C.; NUNES, J.F.; GUERRA, M.M.P. Effects of antioxidants and duration of pre-freezing equilibration on frozen-thawed ram semen. **Theriogenology**, v. 76, p. 342-350, 2011.

DIAS, HUBERSON SANCHES. **Efeito de meios diluentes sobre a viabilidade de sêmen congelado bovino**. 2010. Dissertação-UNOESTE, Presidente Prudente. 2010.

FERNANDEZ, J.S.; BANDEIRA, N.C.; OLIVEIRA, J.C.G.; SANTOS, B.M.B.; NUNES, J.F. Cinética Espermática do sêmen caprino resfriado à base de água de coco em pó (ACP-101®) adicionado de extrato soja e gema de ovo. **Ciência Animal**. suplemento, 2012.

FICKEL, J.; WAGENER, A.; LUDWIG, A. Semen cryopreservation and the conservation of endangered species. **Eur. J. Wildl Res**, v.53, p.81-89, 2007.

GADEA, J. Sperm factors related to *in vitro* and *in vivo* porcine fertility. **Theriogenology**, v.63, p.431-444, 2005.

GRAHAM, J.K. & MOCÉ, E. Fertility evaluation of frozen/thawed semen. **Theriogenology**, v.64, p.492-504, 2005.

GUERRA, M.M.P.; EVANS, G.; MAXWELL, W.E.C. Papel de oxidantes e antioxidantes na andrologia. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.28, p. 187-195, 2004.

HASHIDA, N.H.; ABDULLAH, R.B.; RAJIKIN, M.H.; MAT NOOR, M. Ultrastructural studies of fresh, frozen-thawed and acrosome-reacted goat sperm. **Biomedical Research**, v.16, n. 2, p. 119-123, 2005.

HOLT, W. V. Basic aspects of frozen storage of semen. **Animal Reproduction Science**, v. 62, n. 1-3, p. 03-22, 2000.

LUBERDA, Z. The role of glutathione in mammalian gametes. **Biology Reproductive**, v.5, p. 5-17, 2005.

KASIMANICKAM, R.; KASIMANICKAMB, V.; TIBARYC, A.; PELZERA, K.; Effect of semen extenders on sperm parameters of ram semen during liquid storage at 4°C; **Small Ruminant Research**, v. 99, p. 208-213, 2011.

MARQUES, D. C. **Criação de bovinos**. 7. Ed. ver, atual e ampliada. Belo Horizonte: CVP- Consultoria Veterinária e Publicações, 2006. Cap. 4, p. 269-271.

MARTI, E.; MARTÍ, J.I.; MUIÑO-BLANCO, T.; CEBRIÁN-PÉREZ, J.A. Effect of the cryopreservation process on the activity and immunolocalization of antioxidant enzymes in ram spermatozoa. **Journal Androl**, v.29, p.459-467, 2008.

MAIA, V.N.; CARNEIRO, G.F.; SILVA, S.V.; GOMES NETO, O.C.; ALMEIDA, F.C.; SALGUEIRO, C.C.M.; NUNES, J.F.; DELL'AQUA JR., J.A.; GUERRA, M.M.P. Equine semen extender without animal derived ingredients: Preliminary results. **Acta Scientia Veterinariae**. 38 (supl 2): s675-s821. P. s730, abstract 85. Anais, SBTE, 2010.

MAIA, M.S. **Viabilidade espermática e geração de metabólitos reativos 60 do oxigênio (ROS) no sêmen ovino criopreservado em diluidor aditivado de Lauril Sulfato de Sódio (OEP), Trolox – C e Catalase**. 2006. 147p. Tese – Universidade Estadual Paulista – UNESP – Botucatu, 2006.

PEÑA, F. J; SARAVIA, F; JOHANNISSON, A; WALGREN, M; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. A new and simple method to evaluate early membrane changes in frozen-thawed boar spermatozoa. **International Journal of Andrology**. v.28, p.107–114, 2005.

PESCH, S. & HOFMANN, B. Cryopreservation of spermatozoa in veterinary medicine. **Journal fur Reproduktionsmedizin Endokrinologie**, v2, p. 101-105. 2007.

PURDY, P.H. A review on goat sperm cryopreservation. **Small Rumin Res**, v.63, p.215-225, 2006.

RODRIGUEZ & MARTÍNEZ. State of art in farm sperm evaluation. **Reprod Fertil Dev**, v.19, p.91-101, 2007.

O'HARA, L; HANRAHAN, J. P; RICHARDSON, L; DONOVAN, A; FAIR, S; EVANS, A. C. O; LONERGAN, P. Effects of storage duration, storage temperature, and diluent on the viability and fertility of fresh ram sperm. **Theriogenology**, v. 73, p. 541-549, 2010.

OLIVEIRA, R.A. Antioxidantes na viabilidade do sêmen equino congelado e resfriado. **Tese-UNB**, Brasília, 2011.

SEVERO, N. C. Influência da qualidade do sêmen bovino congelado sobre a fertilidade. **A Hora Veterinária**. ano 28. Jan-Fev. 2009.

SILVA, S.V.; SILVA, E.C.B.; SOUZA, H.M.; GUERRA, M.M.P. Ação da glutatona reduzida na criopreservação do sêmen caprino em diferentes tempos de estabilização. **Ciência Animal**. suplemento, 2012.

SILVA, K.M.G.; MORAES, T.A.P.; SILVA, E.C.B. et al. Efeito da adição de trolox e pentoxifilina na motilidade, integridade do acrossoma e do DNA de espermatozoides após descongelação. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 61, n.1, p. 42-49, 2009.

SILVA, P.F.N. & GADELLA, B.M. Detection of damage in mammalian sperm cells. **Theriogenology**, v.65, p.958-78, 2006.

STRADAIOLI, G.; NORO, T.; SYLLA, L.; MONACI, M. Decrease in glutathione (GSH) content in bovine sperm after cryopreservation: comparison between two extenders. **Theriogenology**, v.67, p.1249-1255, 2007.

VALENÇA, R.M.B.; GUERRA, M.M.P. Espécies Reativas ao Oxigênio (ROS) e a utilização de antioxidantes na criopreservação do sêmen suíno. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 31, n. 1, p. 47-53, 2007.

VALLE, G. R; SILVA FILHO, J. M. Membrana plasmática do espermatozóide. **Cadernos Técnicos de Veterinária e Zootecnia**, n. 36, p. 45-53, 2001.

WATSON, P. F. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. **Animal Reproduction Science**, v. 60, p. 481-492, 2000.

## 2 - OBJETIVO GERAL

Desenvolver um protocolo de criopreservação de sêmen bovino, capaz de minimizar os danos sofridos pelos espermatozoides durante o processo de criopreservação, melhorando a viabilidade espermática pós-descongelamento, proporcionando amostras de sêmen com melhor potencial fertilizante.

Objetivou-se avaliar o efeito da adição de glutathione, em diluentes de criopreservação à base de soja e gema de ovo, bem como diferentes técnicas de congelamento, sendo máquina TK- 4000 para congelamento de sêmen ou embriões e geladeira, sobre a qualidade do sêmen pós-descongelamento.

Os objetivos específicos foram:

1 - Avaliar o efeito dos diluidores à base de lecitina de soja e à base de gema de ovo com adição de glutathione sobre a qualidade do sêmen de touros da raça Holandês.

2 - Avaliar a influência da técnica de congelamento, sendo através de máquina e geladeira a 5° C sobre qualidade dos espermatozoides pós-descongelamento.

### 3 – TRABALHO CIENTÍFICO

#### EFEITO DA ADIÇÃO DE GLUTATIONA AO DILUENTE DE CRIOPRESERVAÇÃO SOBRE A QUALIDADE DO SÊMEN BOVINO

#### EFFECT OF ADDING TO GLUTATHIONE CRYOPRESERVATION THINNER ON THE QUALITY OF SPERM BEEF

GARCIA, Fausto Pereira<sup>1</sup>; LEÃO, Karen Martins<sup>2</sup>; SANTOS, Klayto José Gonçalves dos<sup>3</sup>.

<sup>1</sup> Discente do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia do Instituto Federal de Educação Ciência e Tecnologia Goiano - Campus Rio Verde, Goiás, Brasil.

<sup>2</sup> Docente do Instituto Federal de Educação Ciência e Tecnologia Goiano - Campus Rio Verde, Goiás, Brasil.

<sup>3</sup> Docente da Universidade Estadual de Goiás - Campus São Luís de Montes Belos, Goiás, Brasil.

\*Endereço para correspondência: [faustog444@gmail.com](mailto:faustog444@gmail.com)

**RESUMO:** Objetivou-se avaliar o efeito da adição de glutathione, em diluentes de criopreservação à base de soja e gema de ovo, bem como diferentes técnicas de congelamento, sendo máquina e geladeira, sobre a qualidade do sêmen pós-descongelamento. Foram congelados cinco ejaculados de quatro touros da Raça Holandês. Após diluídas e homogeneizadas as amostras foram envasadas em palhetas de 0,5 ml. As amostras foram congeladas de acordo com os seguintes Tratamentos, AndroMed<sup>®</sup> controle - diluente sem adição de glutathione congelado em geladeira e máquina, AndroMed<sup>®</sup> 1,5 mM de glutathione - diluente com adição de glutathione congelado em geladeira e máquina, AndroMed<sup>®</sup> 2,5 mM de glutathione - diluente com adição de glutathione congelado em geladeira e máquina, BotuBov<sup>®</sup> controle - diluente sem adição de glutathione, congelado em geladeira e máquina, BotuBov<sup>®</sup> 1,5 mM de glutathione - diluente com adição de glutathione congelado em geladeira e máquina e BotuBov<sup>®</sup> 2,5 mM de glutathione - diluente com adição de glutathione congelado em geladeira e máquina. O Experimento foi conduzido em delineamento em blocos em esquema fatorial em 2x3x2, sendo 2 diluidores, 3 níveis de glutathione e 2 tipos de congelamento, considerando o touro com bloco. Os dados gerados foram analisados pelo teste *t* a 5% de probabilidade. As variáveis avaliadas foram motilidade total e progressiva, vigor e integridade de membrana plasmática. A adição de glutathione não

alterou significativamente a motilidade total, motilidade progressiva e vigor, em nenhuma das concentrações utilizadas. Nas análises de integridade de membrana plasmática houve diferença estatística quanto ao uso dos diluidores, o diluidor à base de gema de ovo obteve resultados superiores independente da forma de congelamento ou adição de glutathione.

**Palavras-chaves:** Antioxidante. Viabilidade Espermática. Touros. Sêmen congelado.

**ABSTRACT:** This study aimed to evaluate the effect of addition of glutathione in cryopreservation thinners of soy and egg yolk, as well as different freezing techniques, machine and refrigerator on the quality of post-thaw semen. Five ejaculates of four Dutch bulls were frozen. After diluted and homogenized the samples were poured in tubes of 0.5 ml. The samples were frozen according to the following treatments, AndroMed® control - thinner without adding glutathione frozen in refrigerator and machine, AndroMed® 1.5 mM glutathione - thinner with addition of glutathione frozen in refrigerator and machine, AndroMed® 2, 5 mM glutathione - thinner with addition of glutathione frozen in refrigerator and machine, BotuBov® control - without adding glutathione thinner, frozen in refrigerator and machine, BotuBov® 1.5 mM glutathione - thinner with addition of glutathione frozen in the refrigerator and machine and BotuBov® 2.5 mM glutathione - thinner with addition of glutathione frozen in refrigerator and machine. The experiment was conducted in randomized block design in a factorial scheme 2x3x2, two thinners, three levels of glutathione and two types of freezing considering the bull as a block. The data generated were analyzed by t test at 5% probability. The variables evaluated were total motility and progressive force and plasma membrane integrity. Glutathione added did not significantly alter the total motility, progressive motility and vigor, in any of the concentrations used. In plasma membrane integrity analysis was no statistical difference in the thinners use, thinner egg yolk base achieved superior results regardless of the form of freezing or addition of glutathione.

**Key words:** Antioxidant. Sperm viability. Bulls. Frozen semen.

## INTRODUÇÃO

A diluição do sêmen é imprescindível para a criopreservação, os diluidores são utilizados para proteger os espermatozoides oferecendo condições de sobrevivência no trato reprodutivo da fêmea. Proteção que é oferecida durante as fases de desidratação, congelação e estabilização da bicamada lipídica, que é dependente diretamente das substâncias que compõem o meio diluidor prevenindo danos nas estruturas dos espermatozoides bem como alterações relacionadas a capacidade fecundante (FICKEL et al., 2007).

O processo de criopreservação das células espermáticas resulta na diminuição da fertilidade quando comparado com sêmen fresco, esse prejuízo surge da combinação da perda da viabilidade espermática e danos na capacidade funcional dos espermatozoides, uma vez que a motilidade e as estruturas dos espermatozoides são afetadas tanto na congelação quanto no descongelamento do sêmen (DIAS, 2010).

A criopreservação está diretamente associada ao estresse oxidativo dos espermatozoides, em razão das espécies reativas de oxigênio (EROS) afetarem diretamente as membranas, interferindo na capacidade fecundante (ÇOIAN et al., 2010).

EROS são formados pela ação de alguma fonte externa ou interna de energia em consequência do metabolismo. Quando essa fonte de energia atinge o átomo faz com que um elétron seja removido de sua órbita, isso gera um novo átomo contendo um elétron extra (BALL, 2008).

Quimicamente os ácidos graxos insaturados são atacados pelos radicais livres, isso faz com que ocorra reações de auto-oxidação, com isso as membranas espermáticas que são ricas em ácidos graxos poli-insaturados são afetadas diretamente pela EROS por causar lesões (STRADAIOLI et al., 2007).

O balanço entre a produção de EROS, e a adição de enzimas antioxidantes é um fator importantíssimo na sobrevivência e funcionalidade dos espermatozoides durante a criopreservação. Os espermatozoides bovinos não metabolizam o peróxido de hidrogênio eficientemente devido as concentrações de superóxido dismutase (SOD) e glutathione peroxidase (GPx), decrescerem na criopreservação (MARTI et al., 2008).

A adição de substâncias antioxidantes nos diluentes de sêmen da espécie bovina causa a redução dos efeitos nocivos provocados pelas EROS, sendo este um fator importante para a sobrevivência e funcionalidade dos espermatozoides durante o processo de criopreservação (BALL, 2008).

Objetivou-se avaliar o efeito da adição de glutathione, em diluentes de criopreservação à base de soja e gema de ovo, bem como diferentes técnicas de congelamento, sendo máquina e geladeira, sobre a qualidade do sêmen pós-descongelamento.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

Local, Animais, Alimentação e Período de colheita

O experimento foi conduzido na cidade de São Luís de Montes Belos, Goiás - Brasil, no campus II da Universidade Estadual de Goiás. Foram utilizados quatro touros da raça Holandês, com idades de quatro a nove anos, mantidos em pasto *Brachiaria Brizantha cv. Marandu*, com suplementação mineral e água *ad libitum*.

Os touros foram selecionados previamente por exame andrológico e apresentavam qualidade de sêmen dentro dos padrões determinado pelo Colégio Brasileiro de Reprodução Animal com vigor acima de 3, motilidade total acima de 70% e soma dos defeitos morfológicos inferiores a 30%.

O período de colheita foi de dezembro de 2014 a março de 2015, sendo que os animais foram mantidos em repouso sexual por 30 dias antes do início das colheitas.

#### Colheita e Processamento do sêmen

As colheitas foram realizadas através de eletroejaculador (TK-8000<sup>®</sup> Uberaba-MG) em brete de contenção. Antes da colheita o prepúcio foi higienizado com soro fisiológico com o objetivo de evitar contaminação das amostras.

Foram realizadas cinco colheitas de cada touro e imediatamente após a colheita o sêmen foi avaliado pelos aspectos físicos, sendo percentual de motilidade total (MT), percentual de motilidade progressiva (MP) e vigor espermático (V; 0-5).

Após a avaliação os ejaculados foram divididos em 12 tubos de centrifuga de 15 mL para serem diluídos de acordo com os seguintes tratamentos: BotuBov<sup>®</sup> controle - diluente sem adição de glutathione, congelado em máquina e geladeira (BCM e BCG); BotuBov<sup>®</sup> 1,5 mM de glutathione - diluente com adição de glutathione congelado em máquina e geladeira (B1,5M e B1,5G); BotuBov<sup>®</sup> 2,5 mM de glutathione - diluente com adição de glutathione congelado em máquina e geladeira (B2,5M e B2,5G); AndroMed<sup>®</sup> controle - diluente sem adição de glutathione congelado em máquina e geladeira (ACM e ACG); AndroMed<sup>®</sup> 1,5 mM de glutathione - diluente com adição de glutathione congelado em máquina e geladeira (A1,5M e A1,5G); AndroMed<sup>®</sup> 2,5 mM de glutathione - diluente com adição de glutathione congelado em máquina e geladeira (A2,5M e A2,5G).

Em todos os tubos os diluentes foram adicionados até completar 10 mL de solução sêmen/diluidor. Nos Tratamentos que foram adicionados 1,5 mM de glutathione, utilizou-se 0,0045g de L-Glutathione reduced (G6013, Sigma-Aldrich, ST. Louis). E

nos Tratamentos em que foram adicionados 2,5 mM de glutatona adicionou-se 0,0077g do mesmo produto.

Após diluídas e homogeneizadas as amostras foram envasadas em palhetas de 0,5 mL previamente identificadas com número de partida, nome do touro e Tratamento, sendo todas as palhetas lacradas com álcool polivinílico.

#### Congelamento do sêmen

Todos os ejaculados foram submetidos a dois sistemas de refrigeração, sendo geladeira convencional previamente estabilizada a 5°C, e em máquina para congelamento de sêmen e embriões TK-4000® (TK-Equipamentos veterinários, Uberaba-MG).

Para criopreservação das amostras na máquina, utilizou-se a curva de congelamento P1S1, com estabilização programada pelo operador a 5°C por três horas, a temperatura inicial da criopreservação em máquina foi de 22,5°C, a curva de resfriamento programada decresceu 0,25°C/minuto em rampa positiva até o período de estabilização, após o período de estabilização em máquina, rodava-se a curva para decréscimo da temperatura até -140°C.

No processo de criopreservação em geladeira a temperatura inicial era de 5°C, as palhetas após o envase eram levadas para a mesma e ficavam em estabilização por três horas, após esse período foram colocadas sobre suporte a 6 cm do nível de nitrogênio em vapor por 15 minutos, posteriormente foram imersas em nitrogênio. Após o congelamento as amostras foram raqueadas e armazenadas em botijões criogênicos.

#### Análise do sêmen

Para a realização das análises as amostras foram descongeladas a 37°C por 30 segundos em banho maria. As análises realizadas no pós-congelamento foram de motilidade total (MT%), motilidade progressiva (MP%) e Vigor (0-5) em microscópio óptico, em que uma fração de 10 µl foi colocado sobre lâmina e lamínula para realização das análises.

Na realização da avaliação de integridade de membrana plasmática foi utilizado microscópio de epifluorescência, as sondas fluorescentes utilizadas foram iodeto de propídio e carboxifluoresceína, a diluição dessas sondas foi obtida da seguinte forma,

Solução 1- 9,2 mg de diacetato de carboxifluoresceína e 20 mL de dimetilsulfóxido; Solução 2 – 10 mg de iodeto de propídio e 20 mL de solução fisiológica; Solução 3 – formalina a 40 %; Solução 4 – 3 g de citrato de sódio e 100 mL de solução fisiológica.

Posteriormente a pré-diluição do iodeto de propídio e da carboxifluoresceína foi confeccionada a solução de trabalho utilizada na coração dos espermatozoides, esta solução foi obtida a partir da homogeneização das frações descritas acima adicionando os seguintes volumes em tubo *ependorf*, Solução 1 - 20 µl; Solução 2 – 10 µl; Solução 3 – 10 µl; Solução 4 – 960 µl.

Para confecção das lâminas uma fração de 10 µl de sêmen era adicionado em 40 µl de solução trabalho em *ependorf*, 10 µl da solução obtida era posta sobre lâmina e lamínula para realização da avaliação de integridade de membrana plasmática, 200 espermatozoides foram avaliados em microscópio de epifluorescência (Carl Zeiss, Göttingen, Alemanha), com aumento de 400x, usando filtro de emissão DBP 580 - 630nm e excitação DBP 485-520nm, e classificados com membrana intacta os corados em verde, espermatozoides corados em vermelho ou laranja foram considerados lesados.

#### *Delineamento estatístico:*

O Experimento foi conduzido em um delineamento em blocos em esquema fatorial em 2x3x2, sendo 2 diluidores, 3 níveis de glutathione e 2 tipos de congelamento, o touro foi considerado como bloco. Os dados gerados foram analisados no programa R Project for Statistical Computing pelo teste **t** a 5% de probabilidade, através do R Project versão 3.2.2 (R, 2015), cujo modelo matemático proposto é:

$$Y_{kijnb} = m + d_k + g_j + c_n + d_k \times g_i + d_k \times c_n + g_j \times c_n + d_k \times g_j \times c_n + \text{touro}_b + e_{icjnb}$$

Em que:

$Y_{kijnb}$  = é a observação na unidade experimental que recebeu o tratamento  $d_k + g_j + c_n$  no bloco  $b$ ;

$m$  = é a média geral;

$d_k$  = é efeito do tratamento  $i$ ;

$g_j$  = é o efeito do tratamento  $j$ ;

$c_n$  = é o efeito do tratamento  $n$ ;

$e_{icjnb}$  = é o erro na unidade experimental observada.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Após o descongelamento do sêmen foi avaliado e observado os percentuais de motilidade total, motilidade progressiva, vigor e integridade de membrana plasmática.

Não foi observada diferença significativa em nenhum dos parâmetros entre os Tratamentos avaliados conforme descrito nas Tabelas 3, 4 e 5. A tabela 1 apresenta as fontes de variação e quadrados médios que foram utilizados no modelo estatístico para as análises de MT, MP, V e IMP, comprovando a afirmação de OLIVEIRA (2011). Neste delineamento, mesmo considerando o touro como bloco, quem apresentou a maior diferença entre os Tratamentos analisados foi o touro.

Tabela 1 – Fontes de variação e quadrados médios utilizados no modelo estatístico para a análise para Motilidade Total (MT), Motilidade Progressiva (MP), vigor (V) e Integridade de Membrana Plasmática (IMP).

Fontes de Variação	Quadrados Médios			
	MT	MP	V	IMP
Touro	1720,382*	823,149*	3,672*	279,882*
Diluyente	87,604	9,204	1,667	1535,204*
Glutaciona	219,479	86,413	0,200	19,163
Tipo Congelamento	413,438	226,204	0,267	0,104
Diluyente X Glutaciona	183,229	80,954	1,517*	33,329
Diluyente X Tipo Congelamento	175,104	53,204	0,150	78,204
Glutaciona X Tipo Congelamento	141,563	50,404	0,617	58,629
Diluyente X Glutaciona X Tipo Congelamento	18,229	28,779	0,650	25,579

\*Significativo ao nível de 5% de probabilidade

Na Tabela 2, podem ser observados as médias e erro padrão dos parâmetros avaliados entre os Tratamentos. Não foi observada diferença significativa em nenhum dos parâmetros entre os tratamentos avaliados conforme descrito na Tabela 2.

Tabela 2 – Média e Erro Padrão da Motilidade Total (MT%), Motilidade Progressiva (MP%), Vigor (0 - 5) e Integridade de Membrana Plasmática (IMP) após descongelação do Sêmen Bovino criopreservado com diferentes diluentes, diferentes concentrações de glutaciona e diferentes técnicas de criopreservação.

Tratamentos	MT%	MP%	V (0 - 5)	IMP%
Gema Controle Máquina	17,25 ± 3,11	8,45 ± 1,88	1,10 ± 0,16	11,45 ± 2,38
Gema 1,5mM Glutaciona Máquina	17,25 ± 3,17	9,10 ± 2,02	1,10 ± 0,16	13,50 ± 2,26

Gema 2,5mM Glutaciona Máquina	25,75 ± 4,43	14,50 ± 2,89	1,55 ± 0,15	12,70 ± 2,47
Gema Controle Geladeira	15,75 ± 2,60	7,50 ± 1,67	1,10 ± 0,12	13,08 ± 2,11
Gema 1,5mM Glutaciona Geladeira	14,25 ± 2,70	7,20 ± 1,70	1,20 ± 0,14	11,45 ± 2,09
Gema 2,5mM Glutaciona Geladeira	17,50 ± 3,39	8,70 ± 2,11	1,16 ± 0,16	15,95 ± 2,91
Soja Controle Máquina	18,50 ± 2,72	9,55 ± 1,86	1,45 ± 0,13	8,00 ± 1,49
Soja 1,5mM Glutaciona Máquina	19,75 ± 2,93	10,55 ± 1,93	1,40 ± 0,17	9,55 ± 2,05
Soja 2,5mM Glutaciona Máquina	20,75 ± 3,31	10,30 ± 2,09	1,25 ± 0,14	8,35 ± 1,42
Soja Controle Geladeira	19,75 ± 2,91	9,80 ± 1,87	1,65 ± 0,22	7,35 ± 1,48
Soja 1,5mM Glutaciona Geladeira	18,50 ± 2,62	8,55 ± 1,51	1,20 ± 0,09	7,75 ± 1,50
Soja 2,5mM Glutaciona Geladeira	18,00 ± 3,02	9,05 ± 1,78	1,20 ± 0,15	7,50 ± 1,44

MT = motilidade total; MP = motilidade progressiva; V = vigor; IMP = integridade de membrana plasmática.

A Tabela 3 apresenta as médias de motilidade total de todos Tratamentos considerando tipo de diluidor, tipo de congelamento e nível de glutaciona, de acordo com o teste F, as médias deste fator podem ser consideradas iguais.

Tabela 3 – Médias de Motilidade Total (MT%) considerando os fatores tipo de diluidor, tipo de congelamento e níveis de glutaciona com diferença significativa.

TIPO DE DILUIDOR	TIPO DE CONGELAMENTO	NÍVEIS DE GLUTACIONA		
		0	1,5	2,5
GEMA	GELADEIRA	15,75 <sup>aaa</sup>	14,25 <sup>aaa</sup>	17,50 <sup>aaa</sup>
	MÁQUINA	17,50 <sup>aaa</sup>	17,25 <sup>aaa</sup>	25,75 <sup>aaa</sup>
SOJA	GELADEIRA	19,75 <sup>aaa</sup>	18,50 <sup>aaa</sup>	18,00 <sup>aaa</sup>
	MÁQUINA	18,50 <sup>aaa</sup>	19,75 <sup>aaa</sup>	20,75 <sup>aaa</sup>

\*médias seguidas da mesma letra na primeira posição são estatisticamente iguais para o tipo de diluidor;

\*médias seguidas da mesma letra na segunda posição são estatisticamente iguais para o tipo de congelamento;

\*médias seguidas da mesma letra na terceira posição são estatisticamente iguais para o nível de glutaciona;

Na Tabela 4, pode ser observado que de acordo com o teste F não houve diferença significativa entre os tratamentos em nenhum dos parâmetros analisados.

Tabela 4 – Médias de Motilidade Progressiva (MP%) considerando os fatores tipo de diluidor, tipo de congelamento e níveis de glutaciona com diferença significativa.

TIPO DE DILUIDOR	TIPO DE CONGELAMENTO	NÍVEIS DE GLUTACIONA		
		0	1,5	2,5
GEMA	GELADEIRA	7,50 <sup>aaa</sup>	7,20 <sup>aaa</sup>	8,70 <sup>aaa</sup>
	MÁQUINA	8,45 <sup>aaa</sup>	9,10 <sup>aaa</sup>	14,50 <sup>aaa</sup>
SOJA	GELADEIRA	9,80 <sup>aaa</sup>	8,55 <sup>aaa</sup>	9,05 <sup>aaa</sup>
	MÁQUINA	9,55 <sup>aaa</sup>	10,55 <sup>aaa</sup>	10,30 <sup>aaa</sup>

\*médias seguidas da mesma letra na primeira posição são estatisticamente iguais para o tipo de diluidor;

\*médias seguidas da mesma letra na segunda posição são estatisticamente iguais para o tipo de congelamento;

\*médias seguidas da mesma letra na terceira posição são estatisticamente iguais para o nível de glutaciona;

Não houve diferença estatística para tipo de diluidor, tipo de congelamento e nível de glutatona na MT e MP. Entretanto, estudos realizados por GADEIA et al. (2005), obtiveram resultados diferentes ao deste trabalho, em concentrações com adição de 1 a 5mM de glutatona observaram melhora na MT e MP, quando comparados com os grupos controles não alterando V e IMP.

A divergência entre os resultados obtidos por GADEIA et al. (2005), e os resultados obtidos neste trabalho pode ser, resultantes da variação de idade dos animais utilizados, da composição dos diluidores utilizados no congelamento, da curva de congelamento aplicada e até mesmo pela interação do antioxidante presente no diluidor com o que foi adicionado (OLIVEIRA, 2011).

Na Tabela 5, observando as médias de Vigor (0-5) constata-se que não houve diferença estatística entre os tratamentos em nenhum dos parâmetros analisados.

Tabela 5 – Médias de Vigor (0-5) considerando os fatores tipo de diluidor, tipo de congelamento e níveis de glutatona com diferença significativa.

TIPO DE DILUIDOR	TIPO CONGELAMENTO	NÍVEIS DE GLUTATIONA		
		0	1,5	2,5
GEMA	GELADEIRA	1,10 <sup>aaa</sup>	1,20 <sup>aaa</sup>	1,10 <sup>aaa</sup>
	MÁQUINA	1,10 <sup>aaa</sup>	1,10 <sup>aaa</sup>	1,55 <sup>aaa</sup>
SOJA	GELADEIRA	1,65 <sup>aaa</sup>	1,20 <sup>aaa</sup>	1,20 <sup>aaa</sup>
	MÁQUINA	1,45 <sup>aaa</sup>	1,40 <sup>aaa</sup>	1,25 <sup>aaa</sup>

\*médias seguidas da mesma letra na primeira posição são estatisticamente iguais para o tipo de diluidor;

\*médias seguidas da mesma letra na segunda posição são estatisticamente iguais para o tipo de congelamento;

\*médias seguidas da mesma letra na terceira posição são estatisticamente iguais para o nível de glutatona;

Resultados semelhantes ao deste trabalho foram obtidos por OLIVEIRA et al. (2009), em relação ao tipo de congelamento para MT e V, no estudo o sêmen equino congelado em máquina e geladeira tiveram resultados similares quando congelado, o período de estabilização adotado para o congelamento do sêmen equino foi de 1 hora a 5°C tanto em máquina automatizada como em geladeira pré-estabelecida a 5°C, os resultados de MT no sistema automatizado foram de 54% e no congelamento manual de 47%, o vigor variou de 4 em máquina para 3 no congelamento em geladeira.

A Tabela 6 demonstra as médias de IMP considerando os fatores tipo de diluidor, tipo de congelamento e níveis de glutatona. A integridade de membrana plasmática é um importante parâmetro de qualidade seminal, e em nenhum dos

momentos avaliados foi observada diferença estatística na integridade de membrana entre os sistemas de refrigeração.

Nas médias referentes a IMP houve diferença significativa para tipo de diluidor à base de soja, as médias tanto nos congelamentos em máquina como em geladeira para o diluidor à base de soja, mostraram-se inferiores ao tratamento com uso de gema de ovo nas concentrações de 0, 1,5 e 2,5 mM com congelamento em máquina e geladeira.

Tabela 6 – Médias de Integridade de Membrana Plasmática (IMP) considerando os fatores tipo de diluidor, tipo de congelamento e níveis de glutathiona com diferença significativa.

TIPO DE DILUIDOR	TIPO CONGELAMENTO	NÍVEIS DE GLUTATIONA		
		0	1,5	2,5
GEMA	GELADEIRA	13,80 <sup>aaa</sup>	11,45 <sup>aaa</sup>	15,95 <sup>aaa</sup>
	MÁQUINA	11,45 <sup>aaa</sup>	13,50 <sup>aaa</sup>	12,70 <sup>aaa</sup>
SOJA	GELADEIRA	7,35 <sup>baa</sup>	7,75 <sup>baa</sup>	7,50 <sup>baa</sup>
	MÁQUINA	8,00 <sup>baa</sup>	9,55 <sup>baa</sup>	8,35 <sup>baa</sup>

\*médias seguidas da mesma letra na primeira posição são estatisticamente iguais para o tipo de diluidor;

\*médias seguidas da mesma letra na segunda posição são estatisticamente iguais para o tipo de congelamento;

\*médias seguidas da mesma letra na terceira posição são estatisticamente iguais para o nível de glutathiona;

Em estudos realizados por FERNANDEZ et al. (2012), crioprotetores à base de gema ovo tiveram resultados similares aos encontrados neste trabalho, espermatozoides congelados com crioprotetor à base de gema de ovo tiveram desempenho superior em relação a MT e IMP, em relação a espermatozoides congelados com diluidor à base de lecitina de soja. A motilidade total encontrada em espermatozoides caprinos que passaram por período de estabilização a 4°C por 24 horas em diluidor à base de gema de ovo apresentou desempenho superior em relação ao diluidor à base de soja tendo MT 91,7% é o diluidor à base de soja 65,5%.

Já KASIMANICKAM et al. (2011), obtiveram resultados semelhantes entre crioprotetores extracelulares à base de gema de ovo e lecitina de soja em que a IMP encontrada foi de 40% para congelamentos com gema e de 39% em congelamentos à base de soja, resultados diferentes dos encontrados neste trabalho.

Não houve diferença significativa nas concentrações de glutathiona, esse fato pode decorrer da composição dos diluidores utilizados que podem ter efeito protetor (PAGL et al., 2006). Em estudo desenvolvido por SOARES et al. (2011) em sêmen caprino as concentrações de glutathiona 2mM, 5mM e 7mM, não foram satisfatórias na manutenção da viabilidade dos espermatozoides.

No mesmo estudo foi observado que o aumento da concentração de glutathione reduz o percentual de gametas vivos, a maior porcentagem de espermatozoides com IMP foi observada no tratamento 2mM, respectivamente por ser a concentração mais baixa de glutathione, os valores obtidos referentes a IMP foram, Glutathione 2mM,  $43,31 \pm 9,91$ , 5mM,  $39,14 \pm 9,80$  e 7mM,  $36,09 \pm 7,66$ .

O mesmo autor ressalva que a adição de antioxidantes pode alterar a osmolaridade celular fragilizando a membrana plasmática. Fato que justifica os resultados deste trabalho, não havendo diferença significativa entre tratamentos com adição de glutathione em diluidores comerciais.

## CONCLUSÃO

Os diluidores AndroMed® e BotuBov® com adição de glutathione nas avaliações de MT%, MP% e Vigor não demonstrou diferença entre os Tratamentos, contudo na avaliação de IMP o diluidor à base de gema de ovo obteve resultados superiores.

Os sistemas de congelamento avaliados foram semelhantes para manutenção da viabilidade espermática.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BALL, B.A.; Oxidative stress, osmotic stress and apoptosis: Impactos on sperm function and preservation in the horse. **Animal Reproduction Science**, v.107, p. 257-267, 2008.

ÇOIAN, K.; BASPINAR, N.; BUCAK, M. N.; AKALIN, P. P.; ATAMAN, M. B.; ÖMÜR, A. D.; GÜNGÖR, S.; KÜRÜKÜNAY, S.; ÖZKALP, B.; SARIOZKAN, S. Influence of methionine and dithioerythritol on sperm motility, lipid peroxidation and antioxidant capacities during liquid storage of ram semen. **Research in Veterinary Science**, v.89, n.3, p.426-431, 2010.

DIAS, HUBERSON SANCHES. **Efeito de meios diluentes sobre a viabilidade de sêmen congelado bovino**. 2010. Dissertação-UNOESTE, Presidente Prudente. 2010.

FERNANDEZ, J.S.; BANDEIRA, N.C.; OLIVEIRA, J.C.G.; SANTOS, B.M.B.; NUNES, J.F. Cinética Espermática do sêmen caprino resfriado à base de água de coco em pó (ACP-101®) adicionado de extrato soja e gema de ovo. **Ciência Animal**. suplemento, 2012.

FICKEL, J.; WAGENER, A.; LUDWIG, A. Semen cryopreservation and the conservation of endangered species. **Eur J Wildl Res**, v.53, p.81-89, 2007.

GADEA, J. Sperm factors related to *in vitro* and *in vivo* porcine fertility. **Theriogenology**, v.63, p.431-444, 2005.

PAGL, R.; AURICH, J.E.; MULLER-SCHLOSSER, F.; KANKOFER, M.; AURICH, C. Comparison of an extender containing defined milk protein fractions with a skim milk-base extender for storage equine sêmen at 5°C. **Theriogenology**, v.66, p. 1115-1122, 2006.

KASIMANICKAM, R.; KASIMANICKAMB, V.; TIBARYC, A.; PELZERA, K.; Effect of semen extenders on sperm parameters of ram semen during liquid storage at 4°C; **Small Ruminant Research**, v. 99, p. 208-213, 2011.

MARTI, E.; MARTÍ, J.I.; MUIÑO-BLANCO, T.; CEBRIÁN-PÉREZ, J.A. Effect of the cryopreservation process on the activity and immunolocalization of antioxidant enzymes in ram spermatozoa. **Journal Androl**, v.29, p.459-467, 2008.

OLIVEIRA, R.A. Antioxidantes na viabilidade do sêmen equino congelado e resfriado. **Tese-UNB**, Brasília, 2011.

OLIVEIRA, R.A; LIMA, S.F.L; SALVAGNI, C.A; GAMBARINI, M.L. Comparação entre sistemas automatizado e geladeira/vapor de nitrogênio líquido na criopreservação do sêmen equino fresco e resfriado por 24h no Brasil Central. **Equirepro**. v.1, UFG, Goiânia, 2009.

SOARES, A.T; SILVA, S.V; ALMEIDA, F.C; LEMOS, P.F.B.A; NUNES, J.F; PEIXOTO, C.A; GUERRA, M.M. P. Espermatozoides caprinos criopreservados em meio à base de leite desnatado acrescido de glutathione reduzida. **Ciência Rural**. v.41, p.1991-1997, 2011.

STRADAIOLI, G.; NORO, T.; SYLLA, L.; MONACI, M. Decrease in glutathione (GSH) content in bovine sperm after cryopreservation: comparison between two extenders. **Theriogenology**, v.67, p.1249-1255, 2007.

