

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

**USO DE ANTIOXIDANTES EM DILUENTES DE CRIOPRESERVAÇÃO  
DE SÊMEN BOVINO**

**Autor: Natalia do Carmo Silva**  
**Orientador: Prof. Dr. João Teodoro Pádua**

GOIÂNIA  
2017

**TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO PARA DISPONIBILIZAR  
VERSÕES ELETRÔNICAS DE TESES E DISSERTAÇÕES  
NA BIBLIOTECA DIGITAL DA UFG**

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/UFG), regulamentada pela Resolução CEPEC nº 832/2007, sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a Lei nº 9610/98, o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou download, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

1. Identificação do material bibliográfico: ☐ Dissertação ☒ Tese

2. Identificação da Tese ou Dissertação:

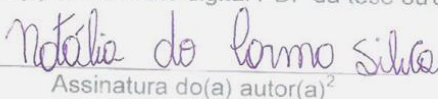
Nome completo do autor: Natalia do Carmo Silva

Título do trabalho: Uso de antioxidantes em diluentes de criopreservação de sêmen bovino

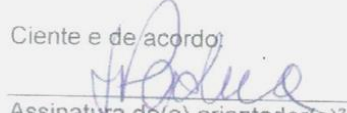
3. Informações de acesso ao documento:

Concorda com a liberação total do documento ☒ SIM ☐ NÃO<sup>1</sup>

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

  
Assinatura do(a) autor(a)<sup>2</sup>

Ciente e de acordo:

  
Assinatura do(a) orientador(a)<sup>2</sup>

Data: 13 / 12 / 2017

<sup>1</sup> Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data de defesa. A extensão deste prazo suscita justificativa junto à coordenação do curso. Os dados do documento não serão disponibilizados durante o período de embargo.

Casos de embargo:

- Solicitação de registro de patente;
- Submissão de artigo em revista científica;
- Publicação como capítulo de livro;
- Publicação da dissertação/tese em livro.

<sup>2</sup> A assinatura deve ser escaneada.

NATALIA DO CARMO SILVA

## **USO DE ANTIOXIDANTES EM DILUENTES DE CRIOPRESERVAÇÃO DE SÊMEN BOVINO**

Tese apresentada para obtenção do título de  
doutora em Zootecnia junto à Escola de  
Veterinária e Zootecnia da Universidade  
Federal de Goiás

### **Área de Concentração**

Produção Animal

### **Linha de Pesquisa**

Interface entre desempenho produtivo,  
reprodutivo, aspectos genéticos e  
ambientais na produção animal

### **Orientador**

Prof. Dr. João Teodoro Pádua

### **Comitê de Orientação**

Prof<sup>a</sup>. Dra. Karen Martins Leão – IF Goiano

Prof<sup>a</sup>. Dra. Cely Marini Melo Oña – UFMT

GOIÂNIA

2017

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do  
Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UFG.

Silva, Natalia doCarmo  
USO DE ANTIOXIDANTES EM DILUENTES DE  
CRIOPRESERVAÇÃO DE SÊMEN BOVINO [manuscrito] / Natalia  
doCarmo Silva. - 2017.  
xxi, 95 f.

Orientador: Prof. Dr. João Teodoro de Pádua; co-orientadora Dra.  
Karen Martins Leão; co-orientador Dr. Cely Marini Melo Oña.

Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Goiás, Escola de  
Veterinária e Zootecnia (EVZ), Programa de Pós-Graduação em  
Zootecnia, Goiânia, 2017.

Bibliografia. Anexos.

Inclui abreviaturas, lista de figuras, lista de tabelas.

1. Desenvolvimento embrionário, espermatozoides, estresse  
oxidativo, fertilização, touro. I. Pádua, João Teodoro de, orient. II. Título.

CDU 635

1 ATA NÚMERO 19 DA SESSÃO DE JULGAMENTO DA DEFESA DE **DOUTORADO** DO  
2 PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA DA ESCOLA DE VETERINÁRIA  
3 E ZOOTECNIA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS, realizada por **NATALIA DO**  
4 **CARMO SILVA**. Aos **08/12/2017** a partir das **13h00min**, na sala de Reuniões do Departamento  
5 de Zootecnia da Escola de Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal de Goiás, nesta  
6 Capital, realizou-se a sessão pública de Defesa de Doutorado apresentado (a) pelo (a) Pós-  
7 Graduando (a) **NATALIA DO CARMO SILVA**, intitulada “**Uso de antioxidantes em**  
8 **diluentes de criopreservação de sêmen bovino**”, para obtenção do **Título de Doutor em**  
9 **Zootecnia**, junto à Área de Concentração: **Produção Animal** desta Universidade. Os trabalhos  
10 foram instalados pelo (a) Presidente da Comissão Julgadora, Orientador (a) **Prof. Dr. João**  
11 **Teodoro Pádua**, com a participação dos demais membros da Banca Examinadora **Prof. Dr.**  
12 **Marco Antonio Pereira da Silva - IFGoiano**; **Prof. Dr. Ubirajara Oliveira Bilego -**  
13 **Comigo-GO**; **Profa. Dra. Luciana Batalha de Miranda Araújo - EVZ/DMV/UFV** e **Profa.**  
14 **Dra. Thaisa Campos Marques - IFGoiano**. Iniciando os trabalhos, o Presidente concedeu a  
15 palavra ao (a) candidato (a) **NATALIA DO CARMO SILVA** para exposição em **cinquenta**  
16 minutos do seu trabalho. A seguir, o senhor Presidente concedeu a palavra, pela ordem, aos  
17 demais membros da banca, os quais passaram a arguir o (a) candidato (a), durante o prazo  
18 máximo de **trinta minutos**, assegurando-se ao mesmo, igual prazo para responder aos Senhores  
19 Membros da Banca Examinadora. Ultimada a arguição, que se desenvolveu nos termos  
20 regimentais, a Comissão, em sessão secreta, expressou seu Julgamento, considerando o (a)  
21 candidato (a) **APROVADA** (**Aprovado/Reprovado**) pelos seus membros.  
22 Proclamados os resultados da Banca Examinadora, foram encerrados os trabalhos e, para constar  
23 lavrou-se a presente ata que, após lida e achada conforme vai assinada pelos membros da Banca  
24 Examinadora.

#### BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. João Teodoro Pádua (Orientador(a))

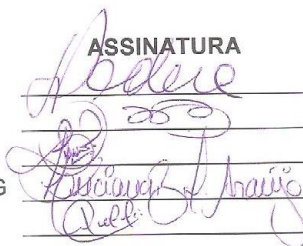
Prof. Dr. Marco Antonio Pereira da Silva - IFGoiano

Prof. Dr. Ubirajara Oliveira Bilego - Comigo-GO

Profa. Dra. Luciana Batalha de Miranda Araújo - EVZ/DMV/UFV

Profa. Dra. Thaisa Campos Marques - IFGoiano

#### ASSINATURA



A Banca Examinadora aprovou a seguinte alteração no título da tese:

*sem alteração*

## RESUMO

Objetivou-se avaliar a adição de antioxidantes em diferentes diluentes de criopreservação sobre a qualidade do sêmen bovino pós-descongelação e a produção *in vitro* de embriões. Primeiramente, avaliou-se os efeitos da adição de diferentes concentrações de glutathione (1,5 e 2,5 mM) e melatonina (0,5 e 1,0 mM) em diluentes de criopreservação de sêmen à base de gema de ovo (Bovimix®) e lecitina de soja (Andromed®). Os resultados demonstraram que a adição do antioxidante glutathione não melhorou a manutenção das características espermáticas do sêmen bovino. A melatonina reduziu a qualidade das características espermáticas avaliadas. O diluente Andromed® obteve melhores variáveis de cinética espermática quando comparado com o diluente Bovimix®. No entanto, com relação às análises de integridade de membrana o diluente Bovimix® demonstrou melhor desempenho na manutenção dessas variáveis. Posteriormente, avaliou-se o efeito dos diluentes de criopreservação e a adição de glutathione sobre a produção *in vitro* de embriões bovinos (PIVE). Avaliou-se a taxa de clivagem, taxa de blastocisto e eclosão oito e nove dias após a fertilização (FIV), assim como a correlação entre as características espermáticas e as taxas de desenvolvimento embrionário. O diluente Andromed® proporcionou melhor taxa de clivagem, sem a necessidade da adição de glutathione no mesmo. Entretanto, a adição de 2,5 mM de glutathione no diluente Bovimix® melhorou a taxa de clivagem. Houve correlação significativa de alta e baixa magnitude entre algumas características espermáticas com a taxa de clivagem. Conclui-se que a glutathione não melhorou a viabilidade espermática. A melatonina reduziu a manutenção das características espermáticas. O diluente Andromed® foi mais eficiente na produção *in vitro* de embriões bovinos não sendo observado efeito da glutathione neste diluente. A adição de glutathione na concentração de 2,5 mM no diluente Bovimix®, à base de gema de ovo, proporcionou maior taxa de clivagem. A avaliação *in vitro* da qualidade do sêmen não é o melhor método para prever o potencial fertilizante do mesmo na PIVE, pois só foram observadas correlações significativas de baixa a moderada magnitude entre algumas características de qualidade do sêmen e a taxa de fertilização.

**Palavras-chave:** Desenvolvimento embrionário, espermatozoides, estresse oxidativo, fertilização, touro.

## ABSTRACT

The objective of this study was to evaluate the addition of antioxidants in different cryopreservation diluents on bovine semen quality after thawing and the in vitro production of embryos. First, the effects of adding different concentrations of glutathione (1.5 and 2.5 mM) and melatonin (0.5 and 1.0 mM) in egg yolk semen cryopreservation diluents (Bovimix<sup>®</sup>) and soy lecithin (Andromed<sup>®</sup>) were evaluated. The results showed that the addition of the antioxidant glutathione did not improve the maintenance of sperm characteristics of bovine semen. Melatonin had a negative effect on the spermatoc parameters evaluated. The diluent Andromed<sup>®</sup> obtained better parameters of spermatoc kinetics when compared with the diluent Bovimix<sup>®</sup>. However, in relation to the membrane integrity analyzes of the Bovimix<sup>®</sup> diluent showed better performance in the maintenance of these parameters. The effect of the cryopreservation diluents and the addition of glutathione in the vitro production of bovine embryos (PIVE) was then evaluated. The rate of cleavage, blastocyst rate and hatching were evaluated eight and nine days after IVF, as well as the correlation between sperm characteristics and PIVE. The diluent Andromed<sup>®</sup> provided a better cleavage rate, with no effect of the addition of glutathione in it. However, the addition of 2.5 mM glutathione in the Bovimix<sup>®</sup> diluent improved the cleavage rate. There was a significant correlation of high and low magnitude between some sperm characteristics with the rate of cleavage. It was concluded that glutathione did not improve sperm viability. Melatonin worsened the maintenance of sperm characteristics. Andromed<sup>®</sup> diluent was more efficient in the in vitro production of bovine embryos with no glutathione effect observed in this diluent. The addition of 2.5 mM glutathione in the egg yolk Bovimix<sup>®</sup> diluent gave a higher cleavage rate. In vitro evaluation of semen quality is not the best method to predict the fertilization potential of the same in PIVE, because only significant low to moderate magnitude correlations were observed between some parameters of semen quality and fertilization rate.

**Key words:** Embryonic development, spermatozoa, oxidative stress, fertilization, bull.

Aos meus Pais, pelo apoio e amor incondicional.

Aos meus familiares, pela compreensão.

Ao meu afilhado Samuel, pelo amor e alegria.

Aos amigos

Com amor dedico.



## AGRADECIMENTOS

A Deus, pela força necessária nos momentos mais difíceis e de luta, por me fornecer paciência e compreensão não somente nesses momentos, mas em todos que precisei nessa trajetória de vida.

Aos meus Pais, pelo apoio, pela vida e amor incondicional e pela paciência e compreensão nos momentos que foram de grandes lutas, mas estavam sempre ao meu lado me dando incentivo necessário para seguir em frente, buscando realizar meus sonhos.

Aos demais familiares, que também sempre me apoiaram e ajudaram mesmo que distantes compreendendo minha ausência.

Aos grandes e eternos amigos que fiz nessa jornada do doutorado, Luíz, Graciela, Poliana, Vanessa e Genilson, os quais levarei para a vida inteira e serei eternamente grata pelo apoio nos momentos difíceis em que pensei em desistir por várias razões, mas que estavam sempre ali do meu lado com palavras de conforto e incentivo para seguir em frente.

Ao meu querido afilhado Samuel, que sempre me trouxe esperanças de dias melhores, quando por várias vezes chegava triste e sem esperanças, mas quando olhava seu sorriso tudo isso mudava, pois sabia que essa luta era para ele também.

À Universidade Federal de Goiás (UFG) junto ao Programa de Pós-Graduação em Zootecnia (PPGZ) pela oportunidade de realizar o Doutorado.

Ao meu orientador João Teodoro Pádua, pelo apoio e compreensão.

A minha co-orientadora Cely Marini, pelo apoio, acolhimento, compreensão e ensinamentos.

A minha co-orientadora Karen Martins Leão pelo acolhimento, apoio, paciência em todos os momentos em que precisei e que em nenhum momento me faltou com sua atenção e total dedicação. Agradeço eternamente tanto pelas oportunidades e conselhos quanto ao profissionalismo.

A Coordenação de aperfeiçoamento de pessoal de nível superior (CAPES) pelo apoio para a realização do doutorado, através da concessão da bolsa de estudos.

Ao Instituto Federal Goiano - Campus Rio Verde, que disponibilizou sua área experimental para realizar algumas das minhas atividades de pesquisa.

Aos funcionários do Instituto Federal Goiano bem como ao Durcinei, que estiverem sempre auxiliando nas atividades necessárias.

Ao pecuarista que disponibilizou os animais para obtenção das amostras de sêmen, e ao Carlos Macedo, que também auxiliou na obtenção dos animais.

Ao Dr. Lázaro Leão, pela compreensão, paciência e apoio, disponibilizando auxílio necessário para obtenção de amostras para o projeto.

A professora Maria Lúcia Gambarini, pelo apoio e discussões necessárias para execução do projeto, e pela disponibilidade de equipamentos e laboratórios necessários para as análises.

Aos amigos Thaisa Campos Marques e Tiago Diesel pelo apoio e auxílio necessário nas execuções de algumas atividades.

Ao Laboratório de parasitologia da UFG, que disponibilizou os equipamentos e microscópios necessários para análises das amostras seminais.

À Dr<sup>a</sup>. Margot Dode, pela abertura das portas do Cenargen e pelo auxílio nas discussões do projeto.

A Embrapa recursos genéticos e biotecnologias por ter disponibilizado laboratórios e equipamentos para realização das análises do experimento.

A Andrielle Cunha pela compreensão, paciência e auxílio disponibilizando maiores conhecimentos em relação às análises realizadas no CASA e citômetro.

Ao abatedouro Copercarne de Rio Verde Goiás, pela disponibilidade de material necessário as pesquisas.

Aos alunos de graduação do IF Goiano, Milena, Viler, Leidiane, Nivaldo e Felipe pela ajuda necessária na execução das atividades do projeto.

Enfim, a todos que presenciaram meus esforços nos estudos, agradeço de coração pelo apoio e peço desculpas por minhas falhas e ausência nesta fase da minha vida.

*“Embora ninguém possa voltar  
atrás e fazer um novo começo, qualquer  
um pode começar agora e fazer um novo fim”*

*Chico Xavier*

## SUMÁRIO

|                                                                                                                                                                      |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS.....                                                                                                                               | 22 |
| 1. INTRODUÇÃO.....                                                                                                                                                   | 22 |
| 2. REVISÃO DE LITERATURA.....                                                                                                                                        | 23 |
| 2.1 A Célula espermática.....                                                                                                                                        | 23 |
| 2.2 Criopreservação.....                                                                                                                                             | 25 |
| 2.2.1 Crioprotetores.....                                                                                                                                            | 27 |
| 2.3 Espécies reativas de oxigênio.....                                                                                                                               | 29 |
| 2.4 Antioxidantes.....                                                                                                                                               | 30 |
| 2.4.1 Glutathione.....                                                                                                                                               | 31 |
| 2.4.2 Melatonina.....                                                                                                                                                | 32 |
| 2.5 Avaliações do espermatozoide bovino.....                                                                                                                         | 33 |
| 2.6 Produção <i>in vitro</i> de embriões.....                                                                                                                        | 34 |
| REFERÊNCIAS.....                                                                                                                                                     | 35 |
| CAPÍTULO 2 – ADIÇÃO DE GLUTATHIONE E MELATONINA EM DILUENTES<br>À BASE DE GEMA DE OVO E LECITINA DE SOJA SOBRE A QUALIDADE DO<br>SÊMEN BOVINO PÓS-DESCONGELAÇÃO..... | 43 |
| RESUMO.....                                                                                                                                                          | 43 |
| ABSTRACT.....                                                                                                                                                        | 44 |
| INTRODUÇÃO.....                                                                                                                                                      | 45 |
| MATERIAL E MÉTODOS.....                                                                                                                                              | 46 |
| Criopreservação do sêmen.....                                                                                                                                        | 46 |
| Análises da qualidade do sêmen.....                                                                                                                                  | 47 |
| Análises da cinética espermática.....                                                                                                                                | 48 |
| Avaliação da integridade de Membrana plasmática em microscópio de<br>fluorescência.....                                                                              | 48 |
| Avaliação em citômetro de fluxo.....                                                                                                                                 | 49 |
| Avaliação da integridade de membrana.....                                                                                                                            | 49 |
| Avaliação da integridade acrossomal.....                                                                                                                             | 50 |
| Avaliação da estabilidade de membrana.....                                                                                                                           | 50 |
| Análise Estatística.....                                                                                                                                             | 51 |
| RESULTADOS.....                                                                                                                                                      | 51 |

|                                                                                                                                                                                             |    |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| DISCUSSÃO.....                                                                                                                                                                              | 57 |
| CONCLUSÃO.....                                                                                                                                                                              | 62 |
| REFERÊNCIAS.....                                                                                                                                                                            | 62 |
| CAPÍTULO 3 – EFICIÊNCIA DA PRODUÇÃO <i>IN VITRO</i> DE EMBRIÕES BOVINOS UTILIZANDO SÊMEN CRIOPRESERVADO COM DILUENTE À BASE DE GEMA DE OVO E LECITINA DE SOJA ACRESCIDOS DE GLUTATIONA..... | 66 |
| RESUMO.....                                                                                                                                                                                 | 66 |
| ABSTRACT.....                                                                                                                                                                               | 67 |
| INTRODUÇÃO.....                                                                                                                                                                             | 68 |
| MATERIAL E MÉTODOS.....                                                                                                                                                                     | 69 |
| Criopreservação do sêmen.....                                                                                                                                                               | 69 |
| Análise do sêmen.....                                                                                                                                                                       | 70 |
| Produção <i>in vitro</i> de embriões.....                                                                                                                                                   | 71 |
| Composição dos meios.....                                                                                                                                                                   | 71 |
| Seleção dos ovócitos e maturação <i>in vitro</i> .....                                                                                                                                      | 72 |
| Fecundação <i>in vitro</i> .....                                                                                                                                                            | 72 |
| Cultivo <i>in vitro</i> dos embriões.....                                                                                                                                                   | 73 |
| Análise Estatística.....                                                                                                                                                                    | 73 |
| RESULTADOS.....                                                                                                                                                                             | 74 |
| DISCUSSÃO.....                                                                                                                                                                              | 78 |
| CONCLUSÃO.....                                                                                                                                                                              | 82 |
| REFERÊNCIAS.....                                                                                                                                                                            | 82 |
| CAPÍTULO 4. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....                                                                                                                                                       | 86 |
| ANEXO A: parecer do comitê de ética.....                                                                                                                                                    | 88 |
| ANEXO B: Equipamento ivos - casa (computer assisted sperm analysis), lâmina de leitura e campo de imagem com alguns padrões de movimento.....                                               | 89 |
| ANEXO C: Protocolos dos corantes utilizados nas análises de fluorescência.....                                                                                                              | 90 |
| ANEXO D: Protocolos dos corantes utilizados nas análises do citômetro de fluxo.....                                                                                                         | 91 |
| ANEXO E: gráfico das avaliações de integridade de membrana, integridade                                                                                                                     |    |

|                                                                     |    |
|---------------------------------------------------------------------|----|
| acrossomal e estabilidade de membrana em citômetro de<br>fluxo..... | 93 |
| ANEXO F – Classificação de complexos cumulus ovócitos.....          | 95 |

## LISTA DE FIGURAS

|          |                                                                    |    |
|----------|--------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 1 | Equipamento CASA.....                                              | 89 |
| Figura 2 | Lâmina de leituta.....                                             | 89 |
| Figura 3 | Campo de visão contendo espermatozoides.....                       | 89 |
| Figura 4 | Análise de integridade de membrana plasmática do sêmen bovino..... | 93 |
| Figura 5 | Análise de integridade acrossomal do sêmen bovino.....             | 93 |
| Figura 6 | Análise de estabilidade de membrana do sêmen bovino.....           | 94 |
| Figura 7 | Diferentes graus de ovócitos de acordo com a qualidade.....        | 95 |

## LISTA DE TABELAS

### CAPÍTULO 2

|          |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |    |
|----------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Tabela 1 | Valores médios e erro padrão das características de cinética espermática do sêmen bovino da raça Holandês criopreservados com diluentes à base de gema de ovo (Bovimix®) e lecitina de soja (AndroMed®) acrescidos dos antioxidantes glutathione e melatonina em diferentes concentrações, Rio Verde, GO, Brasil, 2017.....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          | 53 |
| Tabela 2 | Valores médios e erro padrão das características de integridade celular do sêmen bovino da raça Holândes criopreservadas com diluentes à base de gema de ovo (Bovimix®) e lecitina de soja (AndroMed®) acrescidos dos antioxidantes glutathione e melatonina em diferentes concentrações, Rio Verde, GO, Brasil, 2017.....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           | 54 |
| Tabela 3 | Correlação entre as características de cinética espermática e características de integridade celular, motilidade total (MT-%), motilidade progressiva (MP-%), velocidade média da trajetória (VAP- $\mu\text{m/s}$ ), velocidade linear progressiva (VSL- $\mu\text{m/s}$ ), velocidade curvilínea (VCL- $\mu\text{m/s}$ ), amplitude de deslocamento lateral da cabeça (ALH- $\mu\text{m/s}$ ), frequência de batimentos flagelar cruzado (BCF-Hz), retilinearidade (STR-%), linearidade (LIN-%), integridade de membrana (IM%), integridade acrossomal (PNA%) e estabilidade de membrana (EST), do sêmen bovino da Raça Holândes, Rio Verde, GO, Brasil, 2017..... | 56 |

### CAPÍTULO 3

|          |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |    |
|----------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Tabela 1 | Valores médios e erro padrão das variáveis espermáticas das amostras de sêmen bovino da raça Holandês criopreservadas com diluentes à base de gema de ovo (Bovimix®) e lecitina de soja (AndroMed®) acrescidos de glutathione em diferentes concentrações (1,5 e 2,5mM), Rio Verde, GO, Brasil, 2017.....                                                                                   | 75 |
| Tabela 2 | Valores percentuais de taxa de clivagem (TC), taxa de blastocisto (TB) e taxa de eclosão oito (TE - D8) e nove (TE – D9) dias após a fertilização, com sêmen bovino da raça Holândes criopreservado com diluente à base de lecitina de soja (AndroMed®) e à base de gema de ovo (Bovimix®), com e sem a adição de glutathione em diferentes concentrações, Rio Verde, GO, Brasil, 2017..... | 76 |



|          |                                                                                                                                                                                                                                             |    |
|----------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Tabela 3 | Estimativas de correlação e intervalo de confiança entre as diferentes variáveis espermáticas do sêmen bovino com a taxa de clivagem, taxa de blastocisto e eclosão oito (D8) e nove (D9) dias após a FIV, Rio Verde, GO, Brasil, 2017..... | 77 |
|----------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|

**LISTA DE QUADROS**

|          |                                                                                |    |
|----------|--------------------------------------------------------------------------------|----|
| Quadro 1 | Diferentes características de ovócitos bovinos, quanto ao grau de qualidade... | 95 |
|----------|--------------------------------------------------------------------------------|----|

## LISTA DE ABREVIATURAS

|          |                                                            |
|----------|------------------------------------------------------------|
| AC       | Diluyente Andromed controle – sem adição de antioxidante   |
| AM 0,5   | Diluyente Andromed acrescido de melatonina a 0,5 milimolar |
| AM 1,0   | Diluyente Andromed acrescido de melatonina a 1,0 milimolar |
| AG 1,5   | Diluyente Andromed acrescido de glutatona a 1,5 milimolar  |
| AG 2,5   | Diluyente Andromed acrescido de glutatona a 2,5 milimolar  |
| ALH      | Amplitude lateral de cabeça                                |
| BCF      | Batimento flagelar cruzado                                 |
| BSP      | Proteína de ligação ao espermatozoide                      |
| BC       | Diluyente Bovimix controle – sem adição de antioxidantes   |
| BM 0,5   | Diluyente Bovimix acrescido de melatonina a 0,5 milimolar  |
| BM 1,0   | Diluyente Bovimix acrescido de melatonina a 1,0 milimolar  |
| BG 1,5   | Diluyente Bovimix acrescido de glutatona a 1,5 milimolar   |
| BG 2,5   | Diluyente Bovimix acrescido de glutatona a 2,5 milimolar   |
| CA       | Califórnia                                                 |
| CAT      | Catalase                                                   |
| CASA     | Computer Assisted Semen Analysis                           |
| CIV      | Cultivo <i>in vitro</i>                                    |
| CCO's    | Células do <i>cumulus</i>                                  |
| CFDA     | Diacetato de carboxifluoresceína                           |
| CTC      | Antibiótico Clortetraciclina                               |
| DBP      | Diâmetro biparietal                                        |
| DND-26   | <i>Lyso-G</i>                                              |
| EROS     | Espécies reativas de oxigênio                              |
| EST      | Estabilidade de membrana                                   |
| FSH      | Hormônio folículo estimulante                              |
| FITC-PNA | Sonda fluorescente                                         |
| G        | Gravidade                                                  |
| GSH      | Glutathione reduzida                                       |
| GR       | Glutathione reductase                                      |
| GPx      | Glutathione peroxidase                                     |
| GSSG     | Glutathione oxidada                                        |

|                             |                                                              |
|-----------------------------|--------------------------------------------------------------|
| H33342                      | Hoechst 33342                                                |
| Hz                          | Hertz                                                        |
| IATF                        | Inseminação artificial em tempo fixo                         |
| IETS                        | Sociedade Internacional de Transferência de Embriões         |
| IP                          | Iodeto de propídio                                           |
| IM                          | Integridade de membrana                                      |
| IMF                         | Integridade de membrana em fluorescência                     |
| IMV                         | Marca Comercial de produto                                   |
| LDL                         | Lipoproteica de baixa densidade                              |
| LIN                         | Linearidade                                                  |
| LYSO-G                      | <i>Lyso Tracker Green</i>                                    |
| MIV                         | Maturação <i>in vitro</i>                                    |
| MP                          | Motilidade progressiva                                       |
| MT                          | Motilidade total                                             |
| M540                        | Merocianina                                                  |
| NADPH                       | Fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina            |
| OH <sup>-</sup>             | Hidroxila                                                    |
| O <sub>2</sub> <sup>-</sup> | Ânion superóxido                                             |
| ONOO <sup>-</sup>           | Ânion peroxinitrito                                          |
| TRIS                        | Diluyente à base de gema                                     |
| PSA                         | <i>Aglutinina Pisum sativum</i>                              |
| PNA                         | Aglutinina de amendoim ( <i>Arachis hypogaea</i> )           |
| PIVE                        | Produção <i>in vitro</i> de embriões                         |
| r                           | Grau de correlação linear                                    |
| R                           | <i>Project for Statistical Computing</i>                     |
| SOD                         | Superóxido dismutase                                         |
| SYBER-14                    | Green Master Mix – corante universal                         |
| STR                         | Retilinearidade                                              |
| TALP-FIV                    | <i>Tyrode's albumin – lactate – pyruvate</i> para fecundação |
| TCM 199                     | <i>Tissue culture medium 199</i>                             |
| TFYG                        | <i>Tris-citrate-fructose-egg yolk-glycerol</i>               |
| VCL                         | Velocidade curvilínea                                        |
| VSL                         | Velocidade linear                                            |

|         |                                                     |
|---------|-----------------------------------------------------|
| VAP     | Velocidade média da trajetória                      |
| Yopro-1 | Corante fluorescente de ácido nucléico carbocyanina |

## CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES INICIAIS

### 1. INTRODUÇÃO

Amostras de sêmen de boa qualidade são de fundamental importância para o sucesso nas técnicas da reprodução. Para isso, é necessária adequada manutenção da viabilidade, através dos processos de criopreservação, principalmente a diluição dos mesmos<sup>1</sup>.

A gema de ovo que é um dos constituintes mais utilizados para congelamento do sêmen bovino, tem sua utilização discutida por possuir substâncias que inibem a respiração das células espermáticas podendo levar a redução da motilidade, e ao grande risco de contaminação microbiológica, por se tratar de um produto de origem animal<sup>2</sup>. Em decorrência disso, atualmente tem sido avaliada a substituição por produtos de origem vegetal como a lecitina de soja que, apesar de ser amplamente utilizada, necessita de maiores estudos, pela menor capacidade de manutenção da viabilidade espermática<sup>3</sup>.

Durante o processo de criopreservação das amostras de sêmen, há produção contínua e excessiva de espécies reativas de oxigênio (EROS), que são prejudiciais aos espermatozoides, pois induz a lipoperoxidação, apoptose, danos ao DNA com consequente redução da qualidade espermática, uma vez que a membrana espermática possui altas concentrações de ácidos graxos poli-insaturados que são altamente susceptíveis às EROS<sup>4</sup>. Em contrapartida, baixas concentrações de EROS são responsáveis pela regulação de eventos fisiológicos das células<sup>5</sup>.

Substâncias antioxidantes vêm sendo acrescentadas aos meios diluentes com o intuito de minimizar os efeitos deletérios causados pelas EROS aos espermatozoides de várias espécies, inclusive a bovina. Antioxidantes, tais como a glutatona e melatonina retardam a velocidade de oxidação através da manutenção da produção de EROS em níveis fisiológicos<sup>6</sup>.

A glutatona é um dos antioxidantes mais estudados na criopreservação do sêmen bovino, e reduz os danos causados à membrana do espermatozoide pelos radicais livres aumentando a viabilidade da célula, com consequente, melhora do potencial de fertilização. Também têm sido observados melhores resultados de viabilidade espermática com a adição de outros antioxidantes, como a melatonina, que é um hormônio secretado pela glândula pineal que desempenha importante função na regulação dos ciclos reprodutivos sazonais<sup>7</sup>.

Para obtenção de maior produção embrionária *in vitro* são necessárias amostras com melhor qualidade de sêmen. De acordo com Castro<sup>4</sup>, diversos fatores possuem influência no

sucesso da produção *in vitro* de embriões (PIVE), como a qualidade do espermatozoide, do ovócito e os sistemas de cultivo utilizados. Estudos recentes<sup>8</sup> avaliaram a adição de antioxidantes nas etapas da PIVE, na tentativa de reduzir os danos causados aos ovócitos pelas EROS durante as fases de desenvolvimento. Desse modo, é necessário também avaliar o potencial fertilizante *in vitro* das células espermáticas criopreservadas com diferentes antioxidantes.

Esse estudo foi desenvolvido com base na hipótese de que a adição de antioxidantes aos meios utilizados para criopreservação melhora a qualidade das células espermáticas, pois protegem as células contra os danos causados pelas EROS durante as etapas da criopreservação, com consequente aumento das taxas de fertilização *in vitro*. A utilização do diluente à base de lecitina de soja em substituição ao diluente à base de gema de ovo poderá resultar em melhor manutenção das características do sêmen bovino, devido ao teor de colesterol presente na composição, proporcionando maior fluidez e proteção contra o estresse térmico causado as células.

Deste modo, objetivou-se avaliar a adição dos antioxidantes melatonina e glutatona em diferentes concentrações em diluentes de criopreservação à base de gema de ovo (Bovimix<sup>®</sup>) e à base de lecitina de soja (Andromed<sup>®</sup>) sobre a qualidade do espermatozoide bovino pós-descongelamento e a produção *in vitro* de embriões bovinos.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 A célula espermática

Os espermatozoides são produzidos dentro dos túbulos seminíferos dos testículos por meio da divisão e transformação das células germinativas<sup>9</sup>. São células altamente polarizadas e especializadas que perdem a habilidade de biossíntese, reparo, crescimento e divisão celular durante a fase final da espermatogênese, tornando-se apta à fecundação do ovócito e formação do zigoto<sup>10</sup>.

As mudanças morfológicas que ocorrem durante a diferenciação das espermátides, como a formação do acrossoma e flagelo, modelação nuclear e condensação da cromatina, ocorrem após a divisão meiótica (espermio gênese)<sup>11</sup>.

Os espermatozoides são divididos morfológicamente em cabeça, peça intermediária e cauda (flagelo). A cabeça contém o núcleo, acrossoma e um conjunto de elementos citosólicos reduzido, dividindo região acrossomal, região pós-acrossomal e segmento equatorial. A cauda é subdividida em peça intermediária, principal e final<sup>12</sup>.

Os principais elementos estruturais do flagelo incluem o axonema, as mitocôndrias, as fibras densas e a bainha fibrosa, dispostas de forma helicoidal. O axonema é disposto por um par de microtúbulos centrais contornado por outros nove periféricos, ligados por braços de dineínas<sup>13</sup>.

A cromatina é o nucleossoma, composto de DNA envolvido por várias proteínas de ligação chamadas histonas. A cromatina é fortemente compactada devido às protaminas espermáticas que permitem proteção mais eficiente ao DNA.

A espermiogênese fornece aos espermatozoides todas as estruturas necessárias para as funções potenciais. Os espermatozoides são liberados nos túbulos seminíferos e se direcionam para o epidídimo. O trânsito dos espermatozoides ao longo do epidídimo é importante para a maturação final e aquisição da capacidade de motilidade espermática<sup>11</sup>.

As mitocôndrias encontram-se na peça intermediária e são estruturas responsáveis pela produção da energia necessária para a movimentação das células espermáticas, tendo como principal fonte de energia a metabolização da glicose<sup>14</sup>.

A membrana plasmática do espermatozoide é a estrutura mais susceptível a modificações durante os processos de criopreservação, sendo de extrema importância a integridade para que os espermatozoides estejam aptos à fecundação<sup>15</sup>. A mesma engloba toda a célula espermática e define os limites mantendo a diferença entre citosol e ambiente extracelular. É composta por camadas lipídicas e proteicas unidas por ligações não covalentes, permitindo assim que as moléculas individuais dos lipídios e das proteínas se movam lateralmente no plano da membrana. Dentre os constituintes estão fosfolipídios, colesterol, glicolipídios, carboidratos e diferentes tipos de proteínas<sup>16</sup>. A membrana é uma estrutura fina, auto selante, flexível e seletivamente permeável aos solutos polares, com espessura de 7,5 a 10 nm, formada quase que inteiramente por proteínas e lipídios, sendo as proporções desses componentes relativamente distintas em diferentes tipos de membranas.

A membrana exerce papel fundamental na manutenção da capacidade fertilizante do espermatozoide, pois é responsável pela manutenção do equilíbrio osmótico, atuando como barreira entre o meio intra e extracelular. Lesões nessa estrutura podem levar a perda da homeostase e resultar em morte celular<sup>10</sup>.



Os fosfolipídios quando submetidos a redução de temperatura, assumem forma cônica, em que as extremidades hidrofóbicas são externas e as hidrofílicas internas. Essa estrutura é denominada de forma hexagonal II e/ou micela invertida. Quando a membrana está em transição, passando da fase fluida para fase cristalina, as micelas presentes nos lipídios são invertidas, entretanto, para certos fosfolipídios, esta estrutura persiste. Como consequência, tem-se aumento da permeabilidade da membrana com o estabelecimento de canais que permitem a entrada de íons e pequenas moléculas, podendo desestabilizar a membrana e, assim, causar danos irreparáveis<sup>17</sup>.

A proporção de colesterol:fosfolipídios, assim como a natureza dos fosfolipídios e a temperatura determinam a fluidez da membrana. A resistência ao choque frio é maior nas espécies em que a proporção colesterol:fosfolipídios da membrana plasmática são altos. O colesterol preenche os espaços entre as cadeias de ácidos graxos dos fosfolipídios, estabilizando a membrana, enquanto os glicolipídios estão localizados na superfície da membrana, sendo responsáveis pela transição das fases de congelação e descongelação<sup>18</sup>.

De acordo com todas as características da membrana do espermatozoide é de fundamental importância a manutenção da integridade, pois é um fator determinante no potencial de fecundação. Vários testes foram desenvolvidos para a avaliação da integridade da membrana plasmática, dentre estes, pode-se citar: a eosina-nigrosina, teste hiposmótico e mais recentemente o uso de sondas fluorescentes como diacetato de carboxifluoresceína (CFDA), iodeto de propídio (IP), SYBR-14 e PNA<sup>19</sup>.

## **2.2 Criopreservação**

O processo de criopreservação espermática possibilita o uso de amostras de sêmen por períodos relativamente longos, reduz riscos e custos com aquisição de reprodutores, além de favorecer a rápida difusão do material genético<sup>20</sup>. O uso do sêmen congelado permite maior aproveitamento de animais com alto potencial genético, transporte do sêmen para várias localidades, formação de bancos de germoplasma tanto de animais que correm risco de extinção como daqueles que não podem ser utilizados na reprodução, por danos ocasionados durante o manejo dos animais, e também possibilita replicar características de determinados grupos genéticos ao longo do tempo<sup>21</sup>.

A rápida congelação do sêmen, juntamente com lenta descongelação, implica em danos causados pela formação de cristais de gelo, que se agrupam formando grandes cristais, que rompem a membrana. A curva de congelação ideal deve ser suficientemente lenta para permitir que os espermatozoides se desidratem, e rápida o bastante para evitar que as células espermáticas fiquem expostas por muito tempo às elevadas concentrações dos solutos<sup>22</sup>.

As células espermáticas não são adaptadas para as variações de temperatura que ocorrem durante o processo de criopreservação que resultam em várias alterações a célula espermática. Alterações essas, causadas na motilidade e estrutura dos espermatozoides ocorrem simultaneamente nas diferentes etapas de congelação e descongelação. O resfriamento do sêmen é realizado entre 30°C e 0°C e induz ao estresse letal para algumas células que é proporcional à taxa de resfriamento, devido o intervalo de temperatura e ao limite de temperatura, sendo geralmente mais severo na faixa de 2 a 12°C. Esse fenômeno é conhecido como choque frio, que afeta as espécies<sup>23</sup>.

O choque frio é verificado pela presença de muitos espermatozoides em movimento circular ou apresentando motilidade espermática alterada (movimento retrogrado, presença de peças intermediárias dobradas), perda da motilidade, redução da produção de energia, aumento da permeabilidade da membrana e perda de moléculas e íons intracelulares<sup>16</sup>.

Com o intuito de reduzir os danos causados as células espermáticas sobre os processos de criopreservação em que são submetidos, são necessários adequados protocolos de refrigeração e congelação do sêmen. E mesmo no resfriamento lento, a mudança da temperatura causa estresse sobre a membrana, por causa da mudança de fase dos lipídios da bicamada e alteração do estado funcional da membrana. Esses estresses sobre a membrana podem ocorrer em temperaturas abaixo de 0°C, uma vez que as mudanças de fase não estão completas a 0°C. Sabe-se que no sêmen bovino a maior mudança de fase ocorre entre 5 e 15°C, intervalo de temperatura em que o espermatozoide está mais susceptível a injúrias<sup>23</sup>.

A congelação dos espermatozoides abaixo de 0°C em taxa lenta promove maior entrada de água na célula, ao contrário do que ocorre quando o resfriamento é realizado numa taxa rápida. Dessa forma um resfriamento muito lento pode levar a desidratação celular muito intensa, enquanto, um resfriamento muito rápido é insuficiente para permitir a entrada de água nas células, e acarreta a formação de cristais de gelo intracelular. A taxa de resfriamento ideal deve ser relativamente rápida, proporcionando a retirada de água suficiente e não excessiva da célula, e pode levar a formação de cristais de gelo intracelulares pequenos e não letais, proporcionando boas condições de sobrevivência da célula após o reaquecimento<sup>16</sup>.

O descongelamento desses cristais causa a diluição dos solutos e lentamente ocorre a reidratação das células. Porém, se o sêmen for descongelado muito rapidamente, os cristais extracelulares descongelam-se muito rápido e a água do meio invade bruscamente as células, causando ingurgitamento e danos à membrana plasmática. As células congeladas em curva rápida necessitam de uma mesma curva de descongelamento, pois deste modo o gelo intracelular que se formou durante o congelamento não consegue se recrystalizar<sup>24</sup>.

### 2.2.1 Crioprotetores

Somente o plasma seminal não é capaz de proteger adequadamente os espermatozoides contra mudanças de temperatura. Para o sêmen ser estocado em baixas temperaturas é necessário que os mesmos sejam acrescidos de diluidores especiais e apropriados<sup>22</sup>.

A composição dos meios diluidores apresenta grande influência sobre a sobrevivência espermática, sendo de extrema importância que ocorra interação entre os componentes do meio e as curvas de refrigeração/congelamento<sup>1</sup>.

Agentes crioprotetores são solventes orgânicos utilizados na composição de diluentes seminais com a finalidade de proteger as células e/ou tecidos contra as injúrias causadas pela desidratação e resfriamento durante o processo de criopreservação. Essas substâncias são importantes para evitar a formação de gelo intracelular, redução do estresse osmótico por meio da reposição de água necessária para manutenção do volume celular e a interação com íons e macromoléculas<sup>25</sup>.

Além disso, os mesmos possuem fator limitante para o sucesso da criopreservação das células que é a toxicidade, principalmente quando utilizados de forma inadequada<sup>26</sup>.

O glicerol é o primeiro crioprotetor intracelular utilizado com sucesso na maioria das espécies e trata-se de um álcool poli-hídrico, com seis sítios de ligação incluindo a molécula de água e mesmo possuindo baixa permeabilidade em comparação a outros crioprotetores, é considerado eficiente, pois torna mais lenta a desidratação celular durante a criopreservação ao se ligar à água. No entanto, são necessários cuidados com a dosagem utilizada, uma vez que altas concentrações são tóxicas às células espermáticas<sup>27</sup>.

A gema de ovo é um dos agentes mais efetivos para proteção extracelular dos espermatozoides contra o choque frio e demonstrou melhora nas funções espermáticas e preservação da fertilidade após o armazenamento na forma líquida ou congelada. Quando

presente nos meios diluentes, a gema de ovo permite a redução da concentração do glicerol reduzindo a possível toxidez das células. Grande parte dos diluentes utilizados na criopreservação de espermatozoides bovinos contém em torno de 20% de gema de ovo<sup>28</sup>.

A utilização destes diluidores à base de gema de ovo são recomendados pela excelente proteção dos espermatozoides. No entanto, o uso de composto de origem animal como a gema de ovo e leite estão sendo restringidos em alguns países, por razões imunológicas e riscos microbiológicos por meio da transmissão de doenças. Além da dificuldade de padronização desses componentes utilizados na criopreservação do sêmen bovino<sup>29</sup>.

Desse modo, estudos recentes estão em andamento com o objetivo de desenvolver diluentes livres de produtos de origem animal. Glazar et al<sup>27</sup>, demonstraram que diluentes à base de gema podem apresentar efeitos negativos sobre a respiração e motilidade dos espermatozoides devido a outras substâncias específicas na composição. E também podem interferir na análise microscópica do sêmen por meio da presença de glóbulos de gordura.

Segundo Pugliesi et al<sup>30</sup>, além das preocupações sanitárias quanto ao uso de produtos de origem animal, tanto a gema como o leite desnatado podem alterar a integridade estrutural e funcional pós-descongelamento. E com base nessas questões a indústria de reprodução artificial tem buscado novos produtos em substituição aos de origem animal, sendo os mais utilizados atualmente a lecitina de soja<sup>31</sup>.

Devido a preocupação em relação ao uso da gema de ovo nos diluentes seminais, alguns estudos têm utilizado a gema de ovo em pó, após ser submetida ao processo de pasteurização com o intuito de evitar contaminação das amostras e melhorar a viabilidade seminal. Segundo Toniolli et al.<sup>32</sup> ao avaliarem a adição de diferentes concentrações de gema de ovo em pó, adicionada ao diluente com água de coco em pó sobre a qualidade do sêmen de suínos, concluíram que a adição de 3 a 7% de gema de ovo em pó demonstrou efeito positivo na manutenção da qualidade espermática do sêmen suíno.

Chaudhari et al.<sup>33</sup> avaliaram o uso do diluente à base de gema de ovo (TFYG) e dois diluentes comerciais sem produtos de origem animal (Optixcell<sup>®</sup> e Bioxcell<sup>®</sup>), e observaram diferença com maiores percentuais de motilidade total, integridade acrossomal, integridade de membrana plasmática e baixo percentual de anormalidades quando utilizado o diluente Optixcell em relação ao TFG e Bioxcell<sup>®</sup> (Biodux, São Paulo).

A lecitina é uma fosfatidilcolina poli-insaturada, que contém componentes para funções energéticas e estruturais de todas as membranas biológicas. É extraída dos grãos de soja, sendo constituída de fosfolípidos, triglicerídeos e outras substâncias derivadas das refinarias de óleo<sup>34</sup>.

Diluentes acrescidos de lecitina de soja apresentam menor eficiência sobre a criopreservação de sêmen bovino, devido a baixa quantidade de lipoproteínas de baixa densidade (LDL) na composição. Tais são moleculares, estruturais e lipoproteínas suficientes para ligarem-se a maioria das moléculas de proteínas-BSP e sofrerem a peroxidação lipídica sem que as proteínas da membrana estejam envolvidas<sup>3</sup>.

Dentre os primeiros diluidores disponíveis, compostos por lecitina de soja, estão os Biociphos-Plus® (IMV®, L'Aigle, France), Andromed® (Minitub®, Tiefenbach, Germany) e Bioxcell® (Biodux, São Paulo)<sup>35</sup>.

Apesar da lecitina de soja ser apresentada como alternativa para obtenção de diluidores seminais livres de contaminação biológica e quimicamente padronizados, atualmente, os diluentes constituídos de gema de ovo são os mais eficientes na manutenção da capacidade fecundante da célula espermática<sup>36</sup>.

Neste intuito, vários estudos têm sido desenvolvidos com o objetivo de avaliar a adição da lecitina de soja nos diluentes do sêmen bovino<sup>35</sup>, búfalos<sup>37</sup>, ovinos<sup>38</sup> e equinos<sup>39</sup>. Entretanto, como a função crioprotetora da lecitina no sêmen bovino ainda é bastante discutida, são necessários maiores estudos sobre a real ação desse componente sobre a viabilidade espermática.

Salmani et al<sup>40</sup> e Vidal et al<sup>41</sup> sugerem o uso de 0,04 e 0,08% de lecitina de soja na criopreservação do sêmen de carneiros, verificando resultados satisfatórios quanto a manutenção espermática do sêmen de carneiros com esses percentuais avaliados.

### **2.3 Espécies reativas de oxigênio**

As espécies reativas de oxigênio (EROS) são formadas a partir da reação de redução das moléculas de oxigênio. Essas substâncias apresentam número ímpar de elétrons instáveis e altamente reativos, devido tanto a ação direta com moléculas de oxigênio, respiração celular, quanto a fatores externos como ação da luz. Uma vez a célula sob condições de estresse oxidativo perde elétrons tornando-se uma molécula instável. Na tentativa de se tornar estável há aumento dos radicais livres causando total desequilíbrio no ambiente celular denominado estresse oxidativo<sup>42</sup>.

As espécies reativas ao oxigênio também estão envolvidas em várias funções espermáticas essenciais como a função cinética, que permite a movimentação espermática pelo trato reprodutivo da fêmea. Promove a capacitação, função fusogênica, hiperativação,

reação acrossômica, ligação espermática a zona pelúcida, além de promover a estabilização da cápsula mitocondrial na peça intermediária dos espermatozoides bovinos<sup>43</sup>.

A ação das EROS tem sido estudada na fisiologia da reprodução, embora envolvidas no controle fisiológico de algumas funções espermáticas, a produção excessiva se torna prejudicial uma vez que os espermatozoides são altamente susceptíveis as lesões oxidativas, resultando em perdas irreversíveis, por meio da peroxidação lipídica da membrana celular, oxidação das proteínas e danos ao DNA<sup>44</sup>.

O estresse oxidativo pode ser causado por diversos fatores relacionados com o aumento da produção de EROS e/ou a redução da disponibilidade de antioxidantes como, nutrição inadequada, permanência dos animais em condições de estresse, inflamações leucocitárias causadas por insuficiências de antioxidantes, e colheita do sêmen. Embora, o mais comum é a geração de quantidades excessivas de EROS pelos próprios espermatozoides<sup>45</sup>.

Os danos causados pelo estresse oxidativo resultam no desequilíbrio entre a produção de espécies reativas e a falta de sistemas antioxidantes adequados. Desta maneira, é considerada uma das causas frequentes da redução da qualidade espermática e lesões no DNA da célula, sendo também um fator associado a baixa fertilidade e baixa produção de embriões normais<sup>46, 47</sup>.

O impacto do estresse oxidativo durante o processo de armazenamento seria minimizado através da suplementação dos meios diluentes com agentes antioxidantes, garantindo maior qualidade das amostras de sêmen<sup>48</sup>. Nesse sentido, diversos antioxidantes têm sido adicionados aos meios como superóxido dismutase, glutathione peroxidase, glutathione, melatonina, resveratrol dentre outros, utilizados como estratégia para melhorar a viabilidade dos diluentes de criopreservação<sup>49</sup>.

## **2.4 Antioxidantes**

Durante o processo da criopreservação do sêmen ocorre redução da motilidade espermática, integridade acrossomal, viabilidade e potencial fertilizante em função da peroxidação lipídica desencadeada pelas EROS, tendo em vista os altos níveis de fosfolípidos e ácidos graxos saturados e poli-insaturados<sup>50</sup>.

Enzimas removedoras de EROS, como a superóxido dismutase, glutathione reductase, glutathione peroxidase ou catalase, já foram detectadas no espermatozoide e no plasma seminal

de várias espécies, incluindo ovinos<sup>51</sup>, caprinos<sup>52</sup> e bovinos<sup>53</sup>. A enzima superóxido dismutase presente no citoplasma e na mitocôndria é responsável pela dismutação de duas moléculas do ânion superóxido ( $O_2^-$ ) em uma de peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), enquanto enzimas como a catalase e a glutathione peroxidase catalisam a redução do  $H_2O_2$  à água e  $O_2$ <sup>42</sup>.

Conforme descrito por diversos autores, inúmeros antioxidantes compostos podem ser encontrados tanto no plasma seminal quanto no espermatozoide de várias espécies. Contudo, devido aos processos de criopreservação os mesmos são reduzidos pelas técnicas utilizadas para armazenamento. Deste modo, ressalta-se a importância da adição de antioxidantes aos meios de congelamento do sêmen, visando maior proteção aos espermatozoides contra os efeitos lesivos causados pelas EROS no processo de criopreservação<sup>54</sup>.

No sêmen bovino submetido à criopreservação, também foi detectada atividade de glutathione, glutathione peroxidase, superóxido dismutase e catalase<sup>53</sup>. Entretanto, após um ciclo de congelamento e descongelamento, os mesmos observaram redução de 50% na atividade total de superóxido dismutase (SOD) e de 70% no nível total de glutathione no espermatozoide em relação ao sêmen fresco. Stradaioli et al.<sup>29</sup> também observaram redução de 58% nos níveis de glutathione no espermatozoide bovino após a criopreservação com o diluente tradicional Tris-gema, quando comparado ao sêmen fresco.

Estudos para a preservação das células contra os efeitos deletérios das EROS mediante adição de antioxidantes nas amostras de sêmen criopreservadas estão sendo realizados com o intuito de reduzir a desnaturação de proteínas e a peroxidação lipídica causada pelos radicais livres e proporcionar maior capacidade fecundante dos espermatozoides nos ovócitos<sup>55</sup>.

#### 2.4.1 Glutathione

O antioxidante glutathione está presente em grande maioria das células, na forma reduzida (GSH), predominante no meio intracelular, ou oxidada (GSSG) como dissulfeto resultante da oxidação da GSH após exposição ao agente oxidante. É utilizada pela enzima glutathione peroxidase (GPx) para reduzir o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) em água, formando a GSSH. Logo após, a GSSH é reduzida a GSH pela glutathione reductase, utilizando a fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina (NADPH) como co-fator<sup>56</sup>.

A GSH é um potente antioxidante e atua na remoção dos radicais livres, como o peróxido de hidrogênio, que lesa as células espermáticas, reduz a viabilidade e o potencial

fertilizante das mesmas. É considerado um dos agentes mais importantes do sistema de defesa antioxidante protegendo as células das lesões causadas por radiação e luz ultravioleta<sup>57</sup>.

Este antioxidante está presente em todas as células vivas aeróbicas, sendo o mais abundante no meio intracelular. Atua sobre vários compostos via conjugação em reações catalisadas pela glutathione S-transferase ou diretamente, como é o caso com o peróxido de hidrogênio na reação catalisada pela glutathione peroxidase<sup>42</sup> evitando assim danos causados pelas EROS.

Nadeem et al<sup>58</sup>, ao avaliarem a adição de glutathione na criopreservação do sêmen bovino, verificaram que a adição de 0,5mM de glutathione no diluente à base de gema proporcionou aumento da porcentagem de espermatozoides com atividade mitocondrial e reduziu o percentual de espermatozoides com DNA fragmentado. E ressaltaram que a glutathione favorece a sobrevivência dos espermatozoides, atuando diretamente nas vias apoptóticas e de criopacitação.

#### 2.4.2 Melatonina

A melatonina (N-acetil-5-metoxitriptamina) é uma indolamina produzida especialmente de forma endógena a partir do aminoácido triptofano, principalmente na glândula pineal, sendo produzida por todas as espécies de mamíferos<sup>59</sup>. Além disso, a melatonina estimula a atividade de outras enzimas antioxidantes como a SOD, GPx, glutathione redutase e catalase<sup>60</sup>.

Em condições fisiológicas, a melatonina regula a expressão de genes relacionados a importantes enzimas antioxidantes, que estão envolvidas no metabolismo de derivados oxidativos prejudiciais às células e ainda induz a síntese de outros antioxidantes endógenos<sup>61</sup>. A melatonina atua também de forma antiapoptótica prevenindo danos causados as células com redução da perda de elétrons da cadeia transportadora mitocondrial<sup>62</sup>.

O efeito antioxidante da melatonina ocorre em função da capacidade quelante dos radicais de nitrogênio e oxigênio, incluindo o radical hidroxila ( $\text{OH}^\cdot$ ), peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), molécula de oxigênio ( $\text{O}_2$ ), ânion de peroxinitrito ( $\text{ONOO}^-$ ) e óxido nítrico ( $\text{NO}$ )<sup>63</sup>.

Alguns estudos mostram a ação da melatonina sobre a maturação e cultivo *in vitro* de ovócitos<sup>8</sup>. Porém, a ação sobre a qualidade espermática no sêmen bovino quanto ao efeito antiapoptótico ainda não está totalmente elucidada.



## 2.5 Avaliações do espermatozoide bovino

A avaliação das características dos espermatozoides tem sido utilizada como meio de qualificar o sêmen após a descongelação. Entretanto, alguns pesquisadores contestam a correlação entre a motilidade e fertilidade, uma vez que os espermatozoides podem estar móveis, mas danificados, impedindo assim a penetração e fertilização no ovócito<sup>64</sup>.

O sistema CASA vem substituindo as técnicas de análise subjetiva em laboratório de processamento de sêmen. As primeiras pesquisas com o uso deste método foram iniciadas em 1979, por Dott e Foster com o sêmen de bovinos, suínos, coelhos, ratos e carneiros<sup>65</sup>. Assim, tem-se tornado o método mais eficiente para as análises de características do sêmen<sup>66</sup>.

A avaliação da integridade da membrana plasmática dos espermatozoides pode ser realizada por meio de técnicas mais avançadas como o citômetro de fluxo, bem como o uso de colorações mais simples, que não exigem equipamentos específicos e são facilmente realizadas a campo. A integridade espermática é essencial para o metabolismo normal do espermatozoide, capacitação e reação acrossômica, podendo ser também usada para analisar a viabilidade do espermatozoide<sup>67</sup>.

Com os ensaios de citometria de fluxo disponíveis é possível realizar avaliação eficiente de todas as características de integridade de membrana, podendo assim melhor identificar os danos causados às células espermáticas<sup>68</sup>.

No entanto, o iodeto de propídio vem se destacando em algumas pesquisas pela facilidade de preparação, aplicação da técnica, estabilidade e eficiência na avaliação da integridade da membrana plasmática, além de apresentar bons resultados, tanto com o sistema de citometria de fluxo quanto em microscopia de epifluorescência. Pelo motivo desta sonda possuir afinidade ao DNA, o núcleo de células com membrana plasmática lesada é corado de vermelho, enquanto os espermatozoides viáveis apresentam a membrana plasmática impermeável ao iodeto e, por isso os núcleos não são corados<sup>16</sup>.

Dentre as outras formas de mensurar a integridade acrossomal estão o uso de lecitinas conjugadas, em que as lecitinas ligam-se a manose, glucose, galactose e outros carboidratos específicos de glicoproteínas que estão exclusivamente no acrossoma. Dependendo das espécies as mais comumente utilizadas são a PSA (*Pisum sativum*) e PNA (*Arachis hypogaea*)<sup>69</sup>.

Essas lecitinas são impermeáveis ao acrossoma intacto, porém, a reação acrossomal ou acrossoma danificado permite a entrada dessas macromoléculas. O PNA liga-se a

glicoproteínas da membrana acrossomal externa e o PSA liga-se a componentes enzimáticos da matriz na luz do acrossoma, acoplando-se ao açúcar  $\alpha$ -manosidade, encontrado no conteúdo acrossomal<sup>70</sup>.

Durante a fertilização, a membrana espermática passa por grandes modificações. As moléculas de superfície da membrana passam por reorientações e modificações quando os fatores de capacitação ativam o espermatozoide. Essas mudanças são necessárias, pois possibilita que o espermatozoide se ligue à zona pelúcida<sup>71</sup>. O processo de capacitação pode ser verificado por meio da sonda Merocianina 540, pois monitora o nível de desordem dos fosfolipídeos da bicamada lipídica da membrana plasmática. Sua intensidade de fluorescência aumenta com a elevação da desordem das células, ou seja, da desestabilização da membrana, corando em vermelho as células mortas instáveis, processo similar que ocorre durante os primeiros passos da capacitação. Este corante é adicionado a sonda fluorescente YoPro-1 para a análise simultânea da integridade da membrana plasmática, onde são corados de verde as células íntegras estáveis<sup>72</sup>.

## 2.6 Produção *in vitro* de embriões

A PIVE é uma biotécnica reprodutiva que permite a interação entre o espermatozoide e o ovócito fora do trato reprodutivo da fêmea, formando assim um novo indivíduo. Este processo envolve as etapas de coleta dos ovócitos, maturação *in vitro* (MIV), fecundação *in vitro* (FIV) e o cultivo ou co-cultivo *in vitro* (CIV) de zigotos e embriões<sup>73</sup>.

A coleta de ovócitos para produção *in vitro* de embriões pode ser realizada por meio de diversas técnicas: obtenção de ovários de animais de abatedouro, *in vivo* por meio da laparotomia e/ou laparoscopia via flanco, e ainda por laparoscopia vaginal ou pela técnica da aspiração folicular transvaginal guiada por meio de ultrassom<sup>74</sup>. Há décadas, a técnica de aspiração folicular transvaginal tem apresentado maior flexibilidade e tem sido a melhor opção para a recuperação de ovócitos *in vivo* na espécie bovina<sup>75</sup>.

Após a recuperação dos ovócitos, são realizados os processos de maturação, fecundação e cultivo embrionário *in vitro* em laboratório. Durante a maturação ocorre uma série de mudanças no citoplasma e núcleo das células que possibilitam sua fecundação, podendo se desenvolver até blastocisto.

Para que ocorra adequada produção *in vitro* de embriões, são necessários meios e protocolos que forneçam ambiente adequado, permitindo assim, o metabolismo dos ovócitos e das células do *cumulus*, além da manutenção das funções esperáticas para que ocorra a fecundação<sup>76</sup>.

Durante os processos de produção embrionária há formação de espécies reativas de oxigênio, que atuam diretamente sobre as células resultando em menores taxas de desenvolvimento embrionário. Com o intuito de reduzir a ação das EROS sobre os ovócitos e embriões na PIVE, diversos antioxidantes vêm sendo testados. Superoxido dismutase, catalase, vitamina C e E e melatonina, em diferentes concentrações e nas diferentes etapas da PIVE<sup>77</sup>. Entretanto, Takada et al<sup>78</sup> ressaltaram que nenhum efeito foi observado sobre a maior exposição de embriões a diferentes concentrações de oxigênio e glicose.

Em geral, o efeito dos diferentes antioxidantes é dose dependente e alguns estudos mostram que as concentrações que resultaram em melhor qualidade embrionária e taxas de blastocistos não foram significativamente maiores, podendo ser explicado pelo fato das EROS representar papel fundamental em alguns processos fisiológicos<sup>78</sup>.

Segundo Silva et al.<sup>79</sup> a glutathione está presente no ovócito e no fluido folicular, e tem função no desenvolvimento do zigoto do estágio de mórula para blastocisto. Além disso, tem sido identificada como essencial para maturação dos ovócitos, principalmente na maturação citoplasmática.

Remião et al.<sup>8</sup> ao avaliarem a utilização de nanocápsulas de melatonina nas etapas de maturação de ovócitos bovinos, verificaram melhor maturação dos mesmos. Ressaltaram ainda que o uso de melatonina encapsulada tem efeito superior na maturação dos ovócitos *in vitro* quando comparada com a melatonina normalmente utilizada.

## REFERÊNCIAS

1. Chaveiro A, Machado L, Frijters A, Engel B WH. Improvement of parameters of freezing protocol for bull sperm using two osmotic Supports. Theriogenology [Internet]. 2006;65(9):1875–90. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16310842>
2. Najafi A, Zhandi M, Towhidi A, Sharafi M, Akbari Sharif A, Khodaei Motlagh M, Martinez-Pastor F. Trehalose and glycerol have a dose-dependent synergistic effect on the post-thawing quality of ram semen cryopreserved in a soybean lecithin-based

- extender. *Cryobiology* [Internet]. 2013;66(3):275–82. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2013.03.002>
3. Forouzanfar M, Sharafi M, Hosseini SM, Ostadhosseini S, Hajian M, Hosseini L, Abedi P, Nili N, Rahmani HR, Nasr-Esfahani MH. In vitro comparison of egg yolk-based and soybean lecithin-based extenders for cryopreservation of ram semen. *Theriogenology*. 2010;73(4):480–7.
  4. Castro LS. Efeito do estresse oxidativo no espermatozoide e relação com o desenvolvimento embrionário. Universidade de São Paulo; 2014.
  5. Kothari S, Thompson A, Agarwal A, Du Plessis SS. Free radicals: their beneficial and detrimental effects on sperm function. *Indian J Exp Biol* [Internet]. 2010;48(5):425–35. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20795359>
  6. Ashok A, Gurpriya V, Chloe O, Du plessis SS. Effect of Oxidative Stress on Male Reproduction. *World J Mens Heal* [Internet]. 2014;32(1):1–17. Available from: 10.5534/wjmh.2014.32.1.1
  7. Reiter RJ, Rosales-Corral SA, Manchester LC, Tan DX. Peripheral Reproductive Organ Health and Melatonin: Ready for Prime Time. *Int J Mol Sci*. 2013;14:7231–72.
  8. Remião MH, Lucas CG, Domingues WB, Silveira T, Barther NN, Komninou ER, Basso AC, Jornada DS, Beck RC, Pohlmann AR, Junior AS, Seixas FK, Campos VF, Guterres SS CT. Melatonin delivery by nanocapsules during in vitro bovine oocyte maturation decreased the reactive oxygen species of oocytes and embryos. *Theriogenology* [Internet]. 2016;63:70–81. Available from: 10.1016/j.reprotox.2016.05.016
  9. Chenoweth P, Lorton S. *Animal Andrology: Theories and Applications*. 1ª. CAB international. USA; 2014. 584 p.
  10. Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K WP. *Biologia Molecular da Célula*. 5ª. Artmerd, editor. 2010.
  11. Yadav RP, Kotaja N. Small RNAs in spermatogenesis. *Mol Cell Endocrinol* [Internet]. 2014;382(1):498–508. Available from: 10.1016/j.mce.2013.04.015
  12. Varner DD, Gibb Z, Aitken RJ. Stallion fertility: a focus on the spermatozoon. *Equine Vet J* [Internet]. 2015;47(1):16–24. Available from: 10.1111/evj.12308
  13. Varner DD, Johnson L. From a sperm's view: revisiting our perception of this intriguing cell. In: EM G, editor. *Proceedings of the 53rd Annual Convention of the American Association of Equine Practitioners* [Internet]. Orlando, Florida, USA; 2007. p. 104–77. Available from: <http://www.aaep.org>
  14. Brito LFC. Evaluation of stallion sperm morphology. *Clin Tech Equine Pr* [Internet]. 2007;6(4):249–64. Available from: <https://doi.org/10.1053/j.ctep.2007.09.004>
  15. Borges JC, Silva MR, Guimarães JD, Esper CR, Franceschini PH. Membrana plasmática de espermatozoides bovinos: efeito de metabólitos do oxigênio, antioxidantes e criopreservação. *Rev Bras Reprodução Anim*. 2011;35(3):303–14.
  16. Celeghini ECC. Efeitos da criopreservação do sêmen bovino sobre as membranas

- plasmática, acrossomal e mitocondrial e estrutura da cromatina dos espermatozóides utilizando sondas fluorescentes. Diss (Mestrado em Ciências) - Fac Med Veterinária e Zootec Univ São Paulo. 2005;186.
17. Khosrowbeygi A, Zarghami N. Levels of oxidative stress biomarkers in seminal plasma and their relationship with seminal parameters. *BMC Clin Pathol*. 2007;1(7):6.
  18. Pinho RO, Lima DM, Shiomi HH, Siqueira JB, Silveira CO, Faria VR, Lopes PS, Guimarães SE GJ. Effect of cyclodextrin-loaded cholesterol conjugates on plasma membrane viability of Piau swine breed frozen/thawed spermatozoa. *Cryobiology* [Internet]. 2016;73(1):1–6. Available from: doi: 10.1016/j.cryobiol.2016.07.004
  19. Neto JOC, Dode MAN. Técnica de coloração com peanut agglutinin (PNA) - isocianato de fluoresceína (FITC) para avaliação da integridade acrossomal de espermatozoide bovino [Internet]. Brasília; 2010. Available from: <https://www.embrapa.br/recursos-geneticos-e-biotecnologia>
  20. Castelo TS, Frota TR, Silva AR. Considerações sobre a criopreservação do sêmen de caprinos. *Acta Veterinária Bras*. 2008;2:67–75.
  21. Bertozzo BR, Shiroma MYM, Zúccari CESN. Efeito da adição de colesterol ao meio de incubação do sêmen bovino congelado sobre a integridade das membranas plasmática e acrossomal. 2009;10:16–33. In: X Encontro Iniciação Científica UFMS, 2009, Campo Grande. Anais, X Encontro Iniciação Científica UFMS.
  22. Snoeck P. Aspectos da criopreservação de sêmen equino: composição do meio diluidor, curvas de congelamento e fertilidade. Universidade Federal de Minas Gerais; 2003.
  23. González RAF. Efeito da criopreservação usando diferentes técnicas de congelamento e crioprotetores sobre parâmetros espermáticos e a integridade de membranas do espermatozoide bovino. Univ São Paulo. 2004;94.
  24. Holt WV. Basic aspects of frozen storage of semen. *Anim Reprod Sci*. 2000;61(1–3):03–22.
  25. Medeiros ASL. Utilização de vários tipos de amidas como agentes crioprotetores para espermatozóides de garanhões. Dissertação (Faculdade de Medicina Veterinária). Universidade Estadual Paulista; 2003.
  26. Fahy GM. Cryoprotectant toxicity neutralization. *Cryobiology* [Internet]. 2010;60(3):45–53. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19501081>
  27. Glazar AI, Mullen SF, Liu J, Benson JD, Critser JK, Squires EL GJ. Osmotic tolerance limits and membrane permeability characteristics of stallion spermatozoa treated with cholesterol. *Cryobiology* [Internet]. 2009;59(2):201–6. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19646432>
  28. Snoeck PPN, Henry M, Melo MI V. Efeito de diferentes diluidores sobre a viabilidade espermática pós-descongelamento de sêmen equino. *Arq Bras Med Vet e Zootec*. 2007;59(1):56–64.
  29. Stradaoli G, Noro T, Sylla L MM. Decrease in glutathione (GSH) content in bovine sperm after cryopreservation: comparison between two extenders. *Theriogenology*

- [Internet]. 2007;67(7):1249–55.  
Available from: <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2007.01.009>
30. Pugliesi G, De Carvalho GR, Rates DM, Ker PG, Da Matta MP, De Oliveira RR FJ. Viability and fertility of cooled equine semen diluted with skimmed milk or glycine egg yolk-based extenders. *R Bras Zootec* [Internet]. 2012;41(12):2411–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1590/S1516-35982012001200005>
  31. Singh VK, Singh AK, Kumar R AS. Development of soya milk extender for semen cryopreservation of karan fries (crossbreed cattle). *Cryo-Letters*. 2013;34(1):52–61.
  32. Toniolli R, Barros TB, Toniolli L de S, Guimarães DB, Freitas EN de, Nunes TGP. Diferentes Concentrações De Gema De Ovo Em Pó Adicionada Ao Diluente Acp-103® Na Conservação Do Sêmen Suíno. *Ciência Anim Bras* [Internet]. 2016;17(2):243–51.  
Available from: [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1809-68912016000200243&lng=pt&tlng=pt](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1809-68912016000200243&lng=pt&tlng=pt)
  33. Chaudhari D V, Dhami AJ, Hadiya KK, Patel JA. Relative efficacy of egg yolk and soya milk-based extenders for cryopreservation (-196°C) of buffalo semen. *Vet World*. 2015;8(2):239–44.
  34. Seidman MD, Khan MJ, Tang WX, Quirk WS. Influence of lecithin on mitochondrial DNA and age-related hearing loss. *Otolaryngol Head Neck Surg* [Internet]. 2002;127(3):138–44. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12297801>
  35. Muino R, Fernández M, Peña AI. Post-thaw survival and longevity of bull spermatozoa frozen with an egg yolk-based or two egg yolk-free extenders after an equilibration period of 18 h. *Reprod Domest Anim*. 2007;42(3):305–11.
  36. Crespilho AM, Sá Filho MF, Dell'Aqua JA, Nichi M, Monteiro GA, Avanzi BR, et al. Comparison of in vitro and in vivo fertilizing potential of bovine semen frozen in egg yolk or new lecithin based extenders. *Livest Sci* [Internet]. 2012;149(1–2):1–6. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.livsci.2012.05.011>
  37. Akhter S, Ansari MS, Rakha BA, Andrabi SM, Iqbal S, Ullah N. Cryopreservation of buffalo (*Bubalus bubalis*) semen in Bioxcell®. *Theriogenology* [Internet]. 2010;74(6):951–5. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20570331>
  38. Toker MB, Alcay S, Gokce E, Ustuner B. Cryopreservation of ram semen with antioxidant supplemented soybean lecithin-based extenders and impacts on incubation resilience. *Cryobiology* [Internet]. 2016;72(3):205–9. Available from: [10.1016/j.cryobiol.2016.05.001](https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2016.05.001)
  39. Papa FO, Felício GB, Melo-Oña CM, Alvarenga MA, De Vita B, Trinquê C, Puoli-Filho JN, Dell'Aqua JA Jr. Replacing egg yolk with soybean lecithin in the cryopreservation of stallion sêmen. *Anim Reprod Sci* [Internet]. 2011;129(1–2):73–7. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22112939>
  40. Salmani H, Towhidi A, Zhandi M, Bahreini M, Sharafi M. In vitro assessment of soybean lecithin and egg yolk based diluents for cryopreservation of goat semen. *Cryobiology* [Internet]. 2014;68(2):276–80.  
Available from: [10.1016/j.cryobiol.2014.02.008](https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2014.02.008) [Indexed for MEDLINE]

41. Vidal AH, Batista AM, Silva ECB, Gomes WA, Pelinca MA, Silva SV GM. Soybean lecithin-based extender as an alternative for goat sperm cryopreservation. *Small Rumin Res* [Internet]. 2013;109(1):47–51. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.smallrumres.2012.07.022%0A>
42. Nordberg J AE. Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. *Free Radic Biol Med* [Internet]. 2001;31(11):1287–312. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11728801>
43. Gonçalves FS, Barretto FSS, Arruda RP, Perri SHV MG. Effect of antioxidants during bovine in vitro fertilization procedures on spermatozoa and embryo development. *Reprod Domest Anim* [Internet]. 2010;45(1):129–35. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18992086>
44. Aitken RJ, Jones KT RS. Reactive oxygen species and sperm function--in sickness and in health. *J Androl* [Internet]. 2012;33(6):1096–106. Available from: [10.2164/jandrol.112.016535](https://doi.org/10.2164/jandrol.112.016535)
45. Peña FJ, Rodríguez Martínez H, Tapia JA, Ortega Ferrusola C, González Fernández L MGB. Mitochondria in mammalian sperm physiology and pathology: a review. *Reprod Domest Anim* [Internet]. 2009;44(2):345–9. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19144010>
6. Aitken, RJ, De iuliis GN, Finnie JM, Hedges A, Mclachlan R. Analysis of the relationships between oxidative stress, DNA damage and sperm vitality in a patient population: development of diagnostic criteria. *Hum Reprod*. 2010;25:2415–2426.
47. Guthrie HD, Welch GR. Effects of reactive oxygen species on sperm function. *Theriogenology*. 2012;78:1700–8.
48. Michael AJ, Alexopoulos C, Pontiki EA, Hadjipavlou-Litina DJ, Saratsis P, Ververidis HN BC. Effect of antioxidant supplementation in semen extenders on semen quality and reactive oxygen species of chilled canine spermatozoa. *Anim Reprod Sci* [Internet]. 2009;112(1–2):119–35. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18499366>
49. De Graaf SP, Evans G, Gillan L, Guerra MM, Maxwell WM OJ. The influence of antioxidant, cholesterol and seminal plasma on the in vitro quality of sorted and non-sorted ram spermatozoa. *Theriogenology* [Internet]. 2007;67(2):217–27. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16934321>
50. Ball BA. Oxidative stress, osmotic stress and apoptosis: Impact of sperm function and preservation in the horse. *Anim Reprod Sci* [Internet]. 2008;107(3–4):257–67. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18524506>
51. Bucak MN, Atessahin A YA. Effect of anti-oxidants and oxidative stress parameters on ram semen after the freeze–thawing process. *Small Rumin Res* [Internet]. 2008;75(2–3):128–34. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.smallrumres.2007.09.002%0A>
52. Bucak MN, Sariözkan S, Tuncer PB, Ulutas PA AH. Effect of antioxidants on microscopic semen parameters, lipid peroxidation and antioxidant activities in Angora goat semen following cryopreservation. *Small Rumin Res* [Internet]. 2009;81(2–3):90–5. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2008.11.011>

53. Sariözkan S, Bucak MN, Tuncer PB, Ulutas PA BA. The influence of cystein and taurine on microscopic-oxidative stress parameters and fertilizing ability of Bull sêmen following cryopreservation. *Cryobiology*. 2009;58:134–8.
54. Guerra MMP, Evans G MW. Papel de oxidantes e antioxidantes na andrologia. *Rev Bras Reprod Anim*. 2004;28(4):187–95.
55. Borges JC. Efeito Da Utilização De Antioxidante No Diluidor Para a Criopreservação De Sêmen Bovino Avaliado Através De Testes Complementares , Inseminação Artificial E. 2008;70.
56. Gadea J, Molla M, Selles E, Marco MA, Garcia-Vazquez FA, Gardon JC. Reduced glutathione content in human sperm is decreased after cryopreservation: Effect of the addition of reduced glutathione to the freezing and thawing extenders. *Cryobiology*. 2011;62:40–6.
57. Nehring H, Rothe L. Insemination of cryopreserved bull semen portions with reduced sperm numbers after dilution with two egg yolk-free extenders. In: In: European A.I. Vets Meeting, editor. Budapest Proccedings. Budapeste, Europa; 2003. p. 14.
58. Shah N, Singh V, Yadav HP, Verma M, Chauhan DS, Saxena A, Yadav S, Swain DK. Effect of reduced glutathione supplementation in semen extender on tyrosine phosphorylation and apoptosis like changes in frozen thawed Haryana bull spermatozoa. *Anim Reprod Sci*. 2017;182:111–22.
59. Halder C, Ahmad R. Photoimmunomodulation and melatonin. *Photochem Photobiol B*. 2010;98:107–17.
60. Tamura H, Takasaki A, Miwa I, Taniguchi K, Maekawa R, Asada H, Taketani T, Matsuoka A, Yamagata Y, Shimamura K, Morioka H, Ishikawa H, Reiter RJ, Sugino N. Oxidative stress impairs oocyte quality and melatonin protects oocytes from free radical damage and improves fertilization rate. *J Pineal Res* [Internet]. 2008;44(3):280–7. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18339123>
61. Rodriguez C, Mayo JC, Sainz RM, Antolín I, Herrera F, Martín V, Reiter RJ. Regulation of antioxidant enzymes: a significant role of melatonin. *J Pineal Res* [Internet]. 2004;36(1):1–9. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14675124>
62. Reiter RJ, Tan DX, Manchester LC, Pilar Terron M, Flores LJ, Koppisepi S. Medical implications of melatonin: Receptor-mediated and receptor-independent actions. *Adv Med Sci* [Internet]. 2007;52:11–28. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18217386>
63. Rao MV, Gangadharan B. Antioxidative potential of melatonin against Mercury induced intoxication in spermatozoa in vitro. *Toxicol Vitro*. 2008; 22(4):935–42.
64. Schober D, Aurich C, Nohl H, Gille L. Influence of cryopreservation on mitochondrial functions in equine spermatozoa. *Theriogenology* [Internet]. 2007;68(5):745–54. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17644168>
65. Schäfer-Somi S, Aurich C. Use of a new computer-assisted sperm analyzer for the



- assessment of motility and viability of dog spermatozoa and evaluation of four different semen extenders for predilution. *Anim Reprod Sci* [Internet]. 2007;102(1–2):1–13. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17045428>
66. Amann RP, Waberski D. Computer-assisted sperm analysis (CASA): Capabilities and potential developments. *Theriogenology* [Internet]. 2014;81(1):5–17. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2013.09.004>
  67. Celeghini ECC, De Arruda RP, De Andrade AFC, Nascimento J, Raphael CF. Practical techniques for bovine sperm simultaneous fluorimetric assessment of plasma, acrosomal and mitochondrial membranes. *Reprod Domest Anim*. 2007;42(5):479–88.
  68. Sellem E, Broekhuijse ML, Chevrier L, Camugli S, Schmitt E, Schibler L, Koenen EP. Use of combinations of in vitro quality assessments to predict fertility of bovine semen. *Theriogenology* [Internet]. 2015;84(9):1447–54. Available from: [10.1016/j.theriogenology.2015.07.035](https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2015.07.035)
  69. Arruda RP, Andrade AFC, Peres KR, Raphael CF, Nascimento J, Celeghini ECC. Biotécnicas aplicadas à avaliação do potencial de fertilidade do sêmen equino. *Rev Bras Reprod Anim*. 2007;31(1):8–16.
  70. Silva PF, Gadella BM. Detection of damage in mammalian sperm cells. *Theriogenology*. 2006;65(5):958–78.
  71. Gadella BM. Sperm membrane physiology and relevance for fertilization. *Anim Reprod Sci*. 2008;107(3–4):229–36.
  72. Saravia F, Hernández M, Wallgren M, Johannisson A, Rodríguez-Martínez H. Controlled cooling during semen cryopreservation does not induce capacitation of spermatozoa from two portions of the boar ejaculate. *Int J Androl* [Internet]. 2007;30(6):485–499. Available from: [10.1111/j.1365-2605.2006.00741.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2605.2006.00741.x)
  73. Gonçalves PBD, Figueredo JR, Freitas VJF. *Biotécnicas Aplicadas à Reprodução Animal*. 2nd ed. Roca, editor. São Paulo; 2008. 395 p.
  74. Varago FC, Mendonça LF, Lagares MA. Produção in vitro de embriões bovinos: estado da arte e perspectiva de uma técnica em constante evolução. *Rev Bras Reprod Anim*. 2008;32:100–9.
  75. Andrade GA, Fernandes MA, Knychala RM, Bonato GL, Santos RM. Fatores que afetam a taxa de prenhez de receptoras de embriões bovinos produzidos in vitro. *Rev Bras Reprodução Anim*. 2012;36(1):66–9.
  76. Gonçalves PBD, Barreta MB, Sandri LR, Ferreira R, Antoniazzi AQ. Produção in vitro de embriões bovinos: o estado da arte. *Rev Bras Reprodução Anim*. 2007;31:212–7.
  77. Feugang JM, de Roover R, Moens A, Léonard S, Dessy F, Donnay I. Addition of beta-mercaptoethanol or Trolox at the morula/blastocyst stage improves the quality of bovine blastocysts and prevents induction of apoptosis and degeneration by prooxidant agents. *Theriogenology* [Internet]. 2004;61(1):71–90. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14643863>
  78. Takada L, Junior AM, Mingoti GZ, Balieiro JC, Cipolla-Neto J, Coelho LA. Effect of melatonin on DNA damage of bovine cumulus cells during in vitro maturation (IVM)

- and on in vitro embryo development. *Res Vet Sci.* 2012;92(1):124–7.
79. Silva GM, Araújo VR, Duarte ABG, Lopes CAP, Figueiredo JR. Papel dos antioxidantes no cultivo in vitro de células ovarianas. *Rev Bras Reprod Anim.* 2011;35(3):315–26.

## **CAPÍTULO 2 – ADIÇÃO DE GLUTATIONA E MELATONINA EM DILUENTES À BASE DE GEMA DE OVO E LECITINA DE SOJA SOBRE A QUALIDADE DO SÊMEN BOVINO PÓS-DESCONGELAÇÃO**

### **RESUMO**

Objetivou-se avaliar a adição de glutathione e melatonina em diluentes à base de gema de ovo e lecitina de soja sobre a qualidade do sêmen bovino pós-descongelamento. Foram realizadas seis colheitas de sêmen de cinco touros da raça Holandês. Após as colheitas os ejaculados foram divididos em duas porções, diluídos com diluente AndroMed® e Bovimix® para uma concentração de  $30 \times 10^6$  espermatozoides/mL, acrescidos dos antioxidantes glutathione e melatonina em diferentes concentrações. Cada porção foi fracionada em tubos cônicos de 15 mL, resultando nos seguintes tratamentos: 1.Bovimix® Controle (BC), sem adição de antioxidantes; 2.Bovimix® 0,5 mM de melatonina (BM0,5); 3.Bovimix® 1,0 mM de melatonina (BM1,0); 4.Bovimix® 1,5 mM de glutathione (BG1,5); 5.Bovimix® 2,5 mM de glutathione (BG2,5); 6.AndroMed® Controle (AC), sem a adição de antioxidante; 7.AndroMed® 0,5 mM de melatonina (AM0,5); 8.AndroMed® 1,0 mM de melatonina (AM1,0); 9.AndroMed® 1,5 mM de glutathione (AG1,5); 10.AndroMed® 2,5 mM de glutathione (AG2,5). A glutathione não apresentou melhora na manutenção da viabilidade espermática do sêmen bovino criopreservado. A melatonina teve efeito negativo sobre as características espermáticas do sêmen. O diluente Andromed® demonstrou melhores resultados quanto aos parâmetros de cinética espermática do sêmen bovino. O diluente Bovimix® foi mais eficiente na manutenção dos parâmetros de integridade de membrana (IM), integridade acrossomal (PNA) e estabilidade de membrana (EST). Observou-se correlação significativa positiva entre os parâmetros de cinética espermática avaliados, bem como entre os parâmetros de integridade celular. Conclui-se que o diluente Andromed® foi mais eficiente na manutenção das características de cinética espermática, porém, o diluente Bovimix® proporciona melhor manutenção dos parâmetros de integridade celular. O antioxidante glutathione não melhora a viabilidade das células espermáticas. A melatonina reduz a viabilidade das características do sêmen.

**Palavras-chave:** Antioxidantes, *bos taurus*, criopreservação, espermatozoides, reprodução.

## ABSTRACT

The objective of this study was to evaluate the addition of glutathione and melatonin in egg yolk and soy lecithin diluents on the quality of bovine semen after thawing. Six semen harvests were made from five bulls of the Dutch breed. After harvesting the ejaculates were divided into two portions, diluted with AndroMed<sup>®</sup> and Bovimix<sup>®</sup> diluent at a concentration of  $30 \times 10^6$  sperm/mL, plus antioxidants glutathione and melatonin at different concentrations. Each portion was fractionated in 15 mL conical tubes, resulting in the following treatments: 1. Bovimix<sup>®</sup> Control (BC), without addition of antioxidants; 2. Bovimix<sup>®</sup> 0,5 mM melatonin (BM0,5); 3. Bovimix<sup>®</sup> 1,0 mM melatonin (BM1,0); 4. Bovimix<sup>®</sup> 1,5 mM glutathione (BG1,5); 5. Bovimix<sup>®</sup> 2,5 mM glutathione (BG2,5); 6. AndroMed<sup>®</sup> Control (AC), without the addition of antioxidant; 7. AndroMed<sup>®</sup> 0,5 mM melatonin (AM0,5); 8. AndroMed<sup>®</sup> 1,0 mM melatonin (AM1,0); 9. AndroMed<sup>®</sup> 1,5 mM glutathione (AG1,5); 10. AndroMed<sup>®</sup> 2.5 mM glutathione (AG2,5). Glutathione showed no improvement in the maintenance of sperm viability of cryopreserved bovine semen. Melatonin had a negative effect on sperm characteristics of semen. The diluent Andromed<sup>®</sup> showed better results regarding the parameters of sperm kinetics of bovine semen. Bovimix<sup>®</sup> diluent was more efficient in the maintenance of membrane integrity (IM), acrosomal integrity (PNA) and membrane stability (EST) parameters. Significant positive correlation was observed between the parameters of sperm kinetics evaluated, as well as between cellular integrity parameters. It is concluded that the diluent Andromed<sup>®</sup> was more efficient in maintaining the characteristics of spermatoc kinetics, however, the diluent Bovimix<sup>®</sup> provides better maintenance of cellular integrity parameters. The antioxidant glutathione does not improve the viability of sperm cells. Melatonin reduces the viability of semen characteristics.

**Key words:** Antioxidants, *bos taurus*, cryopreservation, spermatozoa, reproduction.

## INTRODUÇÃO

A qualidade do sêmen é de extrema importância para o sucesso dos programas de inseminação artificial em bovinos. Dessa forma, torna-se imprescindível a manutenção das características dos espermatozoides por meio de adequado processo de criopreservação<sup>1</sup>.

A diluição do sêmen protege as células espermáticas do estresse químico e físico causado durante o processo de criopreservação, sendo necessário que o diluente apresente baixa toxicidade, adequada osmolaridade, capacidade de manutenção de pH em torno da neutralidade, contenha nutrientes necessários como açúcares e lipídeos, bem como, possua na composição antibióticos para reduzir a contaminação bacteriana e, por fim ser de baixo custo e fácil preparo<sup>2</sup>.

Além disso, diluentes que contêm produtos de origem animal, como gema de ovo podem trazer riscos de contaminação por microrganismos, podendo afetar a capacidade fecundante das células espermáticas. Do ponto de vista sanitário, para a comercialização internacional de sêmen bovino, é recomendado o uso de diluentes quimicamente definidos, constituídos de substâncias de origem vegetal em relação aos diluentes tradicionais, compostos por substâncias de origem animal<sup>3</sup>.

Os processos de criopreservação das amostras de sêmen causam a produção contínua e excessiva de espécies reativas de oxigênio (EROS), resultando na redução da concentração intracelular dos antioxidantes presentes no plasma seminal, com consequente queda na eficiência reprodutiva das diversas espécies animais<sup>4</sup>. Para tanto, faz-se necessário adicionar antioxidantes aos meios diluentes para garantir maior proteção as células espermáticas contra o estresse oxidativo<sup>5</sup>.

Campuzano et al<sup>6</sup> observaram que a adição do antioxidante glutatona aos diluentes de criopreservação de sêmen bovino demonstraram, respostas positivas quanto a melhora da qualidade seminal durante a criopreservação, através da manutenção das características seminais contra o estresse oxidativo.

Outro antioxidante recentemente estudado é a melatonina, que participa da regulação da defesa antioxidante no plasma seminal, bem como da fisiologia do macho, por meio do estímulo das enzimas antioxidantes e pelo sequestro dos radicais livres, que induzem a danos celulares e apoptose das células espermáticas<sup>7</sup>.

Dessa forma, objetivou-se avaliar o efeito de diluentes à base de gema de ovo (Bovimix<sup>®</sup>) e lecitina de soja (Andromed<sup>®</sup>), e a adição de glutatona (1,5 e 2,5 mM) e

melatonina (0,5 e 1,0 mM) em diferentes concentrações sobre a qualidade do sêmen bovino pós-descongelamento.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

### **Criopreservação do sêmen**

O estudo foi conduzido no Laboratório de Reprodução Animal do Instituto Federal Goiano - Campus Rio verde, Goiás, Brasil, após aprovação pelo Comitê de Ética do IF Goiano, protocolo 011/2014 (ANEXO A).

Foram utilizados cinco touros da raça Holandês aptos para reprodução, selecionados por meio de exame andrológico, sendo os touros com idade de três anos e escore de condição corporal 3 (escala de 1 a 5). Posteriormente, foram submetidos a seis colheitas de sêmen, através de eletroejaculador (Boijector<sup>®</sup>, modelo 65A), com intervalo de cinco dias entre as colheitas. Para a realização das colheitas os animais foram mantidos em bretes de contenção e submetidos à higienização do prepúcio com papel toalha e quando necessário realizava-se a tricotomia dos mesmos, para evitar a contaminação das amostras. Imediatamente após a colheita, avaliou-se os percentuais de motilidade total (%), motilidade progressiva (%) e vigor (0-5) em microscópio óptico, por meio da deposição de uma gota de sêmen entre lâmina e lamínula pré-aquecidas a 37°C, em placa aquecedora. Apenas os ejaculados que atenderam aos critérios preconizados pelo manual de exame andrológico e avaliação de sêmen animal do Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA<sup>8</sup>), foram utilizados no experimento.

Os ejaculados foram divididos em duas porções, diluídas para uma concentração de  $30 \times 10^6$  espermatozoides moveis por mL, com diluentes à base de gema de ovo (Bovimix<sup>®</sup>, Nutricell, Campinas-SP) ou lecitina de soja (AndroMed<sup>®</sup>, Minitub, Hauptstrasse-Alemanha), acrescidos dos antioxidantes melatonina (Sigma Co., St. Louis, MO, USA - M5250) ou glutathione (Sigma Co., St. Louis, MO, USA - G6013-10G) de acordo com os tratamentos experimentais.

Cada porção foi fracionada em cinco tubos cônicos de poliestireno de 15 mL, que resultaram nos seguintes tratamentos: 1.Bovimix<sup>®</sup> Controle (BC), 2.Bovimix<sup>®</sup> + 0,5 mM de melatonina (BM0,5); 3.Bovimix<sup>®</sup> + 1,0 mM de melatonina (BM1,0); 4.Bovimix<sup>®</sup> + 1,5 mM de glutathione (BG1,5); 5.Bovimix<sup>®</sup> + 2,5 mM de glutathione (BG2,5); 6.AndroMed<sup>®</sup> Controle (AC); 7.AndroMed<sup>®</sup> + 0,5 mM de melatonina (AM0,5); 8.AndroMed<sup>®</sup> + 1,0 mM de

melatonina (AM1,0); 9.AndroMed® + 1,5 mM de glutathione (AG1,5) e 10.AndroMed® + 2,5 mM de glutathione (AG2,5).

A adição dos antioxidantes glutathione e melatonina aos meios diluentes foi realizada somente no momento do uso através de soluções de trabalho. Para a concentração de 1,5 mM de glutathione foi adicionado 0,004609 g (solução stock1) de glutathione às amostras de sêmen diluídas com AndroMed® e Bovimix®. A concentração de 2,5 mM foi resultante da adição de 0,00768 g (solução stock2) de glutathione às amostras de sêmen diluídas com os meios AndroMed® e Bovimix® em um total de 10 mL.

Para a adição de melatonina na concentração de 0,5 mM foi inicialmente preparada uma solução stock de 0,0232 g diluído em 2 mL de etanol e posteriormente foram retirados 100 µL e acrescidos em 9900 µL de meio AndroMed® e Bovimix® diluídos com sêmen, resultando na concentração final de 0,5 mM de melatonina. O mesmo foi realizado para a concentração de 1,0 mM de melatonina, sendo acrescidos aos meios AndroMed® e Bovimix® diluídos com sêmen, 200 µL da solução stock em 9800 µL de meio, resultando na concentração final de 1,0 mM de melatonina.

Após homogeneizadas as amostras foram envasadas em palhetas de 0,5 mL dispostas horizontalmente sobre bandeja de aço telada e submetidas à refrigeração em geladeira Minitub® (Porto Alegre-RS) a 5°C por cinco horas. Após refrigeração, as bandejas foram colocadas a 3 cm acima do nível de nitrogênio em caixa de isopor de 40 litros. Após 15 minutos em vapor de nitrogênio as palhetas foram imersas, acondicionadas em raques e armazenadas em botijão de nitrogênio.

### **Análises da qualidade do sêmen**

Para todas as análises realizadas as amostras foram descongeladas em banho-maria a 37°C/30 segundos. Avaliou-se os parâmetros das características de cinética espermática pelo sistema computadorizado de sêmen – CASA, as análises de integridade de membrana através das sondas SYBR-14 e iodeto de propídio, a integridade acrossomal por meio das sondas isocianato de fluoresceína FITC-PNA e iodeto de propídio, e estabilidade de membrana pelas sondas merocianina (M540) e Yopro-1, através de citometria de fluxo. Também foi realizada a análise de integridade de membrana em fluorescência através da associação das sondas fluorescentes carboxifluoresceína e iodeto de propídio por meio de microscópio de fluorescência.

## **Análises da cinética espermática**

As análises de cinética espermática das amostras seminais foram realizadas pelo sistema computadorizado - CASA (Sperm Analysis System, Ivos Ultimate 12's, Hamilton Thorne Biosciences, Beverly, MA, USA), previamente ajustado para análise do espermatozoide bovino. Para análise, foram retirados 10  $\mu\text{L}$  de sêmen e depositados sobre a lâmina de leitura (Makler, Santa Ana, CA, USA) aquecida a 37°C. Em seguida, foram selecionados três campos para leitura e análise das amostras (ANEXO B).

Todas as análises foram realizadas por meio da captura de imagem das células, em que é representado cada espermatozoide numa sequência completa do movimento para reconstituir a trajetória, classificando-a conforme os padrões definidos como: móvel não progressivo, linear lento, linear rápido e imóvel<sup>9</sup>.

As variáveis de cinética espermática mensurados foram: a) motilidade total (MT%) representada pela população de células móveis totais; b) motilidade progressiva (MP%) caracterizada pela porcentagem de células com movimento progressivo; c) velocidade média da trajetória (VAP-  $\mu\text{m/s}$ ) que é a velocidade média do trajeto da célula; d) velocidade retilínea (VSL-  $\mu\text{m/s}$ ) que é a velocidade mínima que o espermatozoide percorre entre duas avaliações; e) velocidade curvilínea (VCL-  $\mu\text{m/s}$ ) que é a média da velocidade espermática medida através da trajetória real percorrido; f) amplitude de deslocamento lateral de cabeça (ALH- $\mu\text{m}$ ) que é o comprimento médio da oscilação da cabeça do espermatozoide; g) frequência de batimento flagelar cruzado (BCF- Hz) que é a frequência do movimento lateral de cabeça do espermatozoide cruzando percursos em ambas as direções; h) linearidade (LIN%) representa a qualidade do movimento retilíneo real percorrido, sendo a proporção entre (VSL/VCL) e retilinearidade (STR-%) representada pela qualidade do movimento retilíneo suavizado, sendo a proporção entre VSL/VAP<sup>10</sup>.

## **Avaliação da integridade de membrana plasmática em microscópio de fluorescência**

As avaliações de integridade de membrana plasmática em microscópio de fluorescência (Carl Zeiss, Gottingen, Alemanha) foram realizadas utilizando a associação das sondas fluorescentes iodeto de propídio (Sigma, Co., St. Louis, MO, USA, Propidium iodide - P4170) e carboxifluoresceína (Sigma, Co., St. Louis, MO, USA, 6-Carboxyfluorescein



diacetate, C5041). A diluição dessas sondas foi obtida a partir da produção de soluções stock, acrescidas de 10 µL de sêmen para confecção das lâminas (ANEXO C).

Nas análises de integridade de membrana foram avaliadas 100 células espermáticas em microscópio de fluorescência, com aumento de 400x, usando filtro de emissão DBP 580 - 630nm e excitação DBP 485-520 nm. Os espermatozoides corados em verde foram classificados como membrana íntegra, e os corados em vermelho ou laranja foram considerados lesados.

### **Avaliação em citômetro de fluxo**

As avaliações de integridade de membrana, integridade acrossomal e estabilidade de membrana foram mensuradas conforme as recomendações do fabricante para análise de sêmen bovino em citômetro de fluxo (FlowSight®- Amnis Imaging Flow Cytometers, Merck Milipore, Darmstadt, Alemanha). Este equipamento contém quatro lasers de excitação (405, 488, 561 e 642 nm), 96 poços para avaliações quantitativas de imagens e realiza leitura de 10.000 células.

As amostras foram descongeladas em banho-maria a 37°C e incubadas a 37°C durante 10 minutos em microtubo cônico contendo as diferentes soluções trabalho de acordo com as análises avaliadas (ANEXO D), em ausência de luz cobertos por papel alumínio. Logo após, para análise, adicionou-se 10 µL de sêmen à solução de trabalho.

Para cada amostra descongelada foram realizadas todas as análises de integridade de membrana, integridade acrossomal e estabilidade de membrana.

### ***Avaliação da integridade de membrana***

A membrana exerce um papel fundamental na manutenção da capacidade fertilizante do espermatozoide, pois é responsável pela manutenção do equilíbrio osmótico, atuando como uma barreira entre o meio intra e extracelular. Lesões nessa estrutura podem levar a perda da homeostase e resultar em morte celular<sup>11</sup>. As características da membrana do espermatozoide são de fundamental importância a manutenção de sua integridade, pois é um fator determinante no potencial de fecundação.

As análises de integridade de membrana foram determinadas por meio da combinação das sondas fluorescentes SYBER-14 e iodeto de propídio (Sperm Viability Kit L-7011, Molecular Probes Inc, Eugene, OR, USA).

O SYBER identifica as células com membrana íntegra através da coloração verde e o iodeto de propídio identifica as células com membrana lesada através da coloração vermelha.

#### *Avaliação da integridade acrossomal*

A análise de integridade acrossomal tem como intuito avaliar a integridade do acrossoma das células espermáticas, sendo de suma importância a manutenção para, evitar perda de enzimas necessárias no momento da fusão entre o gameta masculino e a zona pelúcida<sup>12</sup>.

Utilizou-se as sondas isocianato de fluoresceína conjugada com lecitina de amendoim - FITC-PNA (Sigma, Louis, MO, USA) em associação com iodeto de propídio (Molecular Probes, Eugene, OR, USA).

Nesta técnica são verificados os espermatozoides vivos e mortos com acrossoma reagido ou intacto. O PNA liga-se à membrana acrossomal do espermatozoide com acrossoma danificado. Já o IP penetra na membrana lesada do espermatozoide, ligando-se ao DNA e indicando os espermatozoides vivos e mortos (ANEXO E).

#### *Avaliação da estabilidade de membrana*

Essa análise tem como intuito avaliar a habilidade da cromatina espermática previamente condensada em se descondensar e o aumento da susceptibilidade à desnaturação do DNA, por meio da perda de fluidez da membrana, detectando o percentual de células estáveis e instáveis. Como o desenvolvimento embrionário depende da integridade do DNA espermático, o acesso à estabilidade do material genético dos espermatozoides pode demonstrar informações adicionais sobre a qualidade das amostras seminais<sup>13</sup>.

Para análise de estabilidade de membrana das amostras seminais foi utilizado a associação das sondas fluorescentes Merocianina 540 (M540, Molecular Probes, Eugene, OR, USA) e YOPRO-1 (Molecular Probes, Eugene, OR, USA). As medições foram realizadas no citômetro de fluxo (Amnis Merck Milipore, Darmstadt, Alemanha), e submetidas a emissões de laser de 488 a 20 mW para M540 e 405 a 50 mW para Hoechst (3342). As células vivas e

mortas estáveis, vivas e mortas instáveis foram determinadas e apresentadas nos gráficos (ANEXO E).

### **Análise Estatística**

Os dados foram aleatoriamente distribuídos em blocos ao acaso, sendo cada touro um bloco. Quanto às análises das características de cinética espermática, diferentes antioxidantes e diluentes avaliados, realizou-se transformação logarítmica devido os dados não apresentarem distribuição normal, e posteriormente foram submetidos ao teste não paramétrico de Friedman ( $P < 0,05$ ).

Para análise de correlação entre as características de movimento espermático, avaliadas pelo sistema computadorizado (CASA) e a integridade de membrana, integridade acrossomal e estabilidade de membrana em citômetro, os dados foram submetidos a análise por meio do coeficiente de correlação de Spearman ( $r$ ).

Para interpretação dos coeficientes de correlação existente entre os dados foram considerados como estimativa de correlação de alta magnitude ( $r=0,90$  e  $0,70$ ), estimativa de correlação de média a moderada magnitude ( $r=0,69$  e  $0,40$ ), estimativa de correlação de baixa magnitude ( $r=0,39$  e  $0,20$ ) e estimativa de correlação de fraca magnitude ( $r=0,19$  e  $0,00$ )<sup>14</sup>.

Todas as análises foram realizadas no programa R Project for Statistical Computing, através do R Project versão 3.2.2<sup>15</sup>.

## **RESULTADOS**

Verificou-se que o diluente Andromed<sup>®</sup> sem adição de glutathione nas diferentes concentrações melhorou as características de cinética espermática do sêmen bovino. A melatonina reduziu a viabilidade do sêmen. O diluente Bovimix<sup>®</sup> obteve melhores resultados quanto às características de integridade celular.

O percentual de motilidade total no tratamento AG 1,5 (47,0%) foi igual ao tratamento AC (42,5%) e maior que os demais tratamentos. A motilidade progressiva foi igual entre os tratamentos AC (43,0%), AG 1,5 (46,0%) e AG 2,5 (38%), mas maiores do que os demais tratamentos (Tabela 1).

O VAP foi maior no tratamento AG1,5 (48  $\mu\text{m/s}$ ) que foi semelhante apenas ao tratamento AC (46  $\mu\text{m/s}$ ), sendo os menores valores obtidos nos tratamentos BM1,0 (8  $\mu\text{m/s}$ )

e AM1,0 (11  $\mu\text{m/s}$ ). Os resultados de VSL apresentaram o mesmo perfil do VAP, sendo maior no tratamento AG1,5 (48  $\mu\text{m/s}$ ) que os demais tratamentos, exceto o tratamento AC (46  $\mu\text{m/s}$ ), tendo os menores valores nos tratamentos BM1,0 (8  $\mu\text{m/s}$ ) e AM1,0 (11  $\mu\text{m/s}$ ). A VCL foi maior nos tratamentos AC (45  $\mu\text{m/s}$ ), AG1,5 (47  $\mu\text{m/s}$ ) e AG2,5 (43  $\mu\text{m/s}$ ).

Os maiores valores de ALH foram encontrados nos tratamentos AC (43  $\mu\text{m/s}$ ), AG1,5 (42  $\mu\text{m/s}$ ) e AG2,5 (41  $\mu\text{m/s}$ ), que ainda foram semelhantes ao tratamento AM0,5.

Dentre as variáveis de cinética espermática avaliadas, o BCF foi maior no tratamento AG1,5 (41 Hz) quando comparado com os tratamentos BM0,5 (20 Hz), BM1,0 (11 Hz), BG1,5 (25 Hz) e AM1,0 (9 Hz).

A STR foi semelhante entre os tratamentos BC (46%), BG1,5 (41%) e BG2,5 (38%) sendo o BC maior que os demais sete tratamentos. A linearidade observada no BC (41%) foi maior que os tratamentos BM1,0 (22%), AC (24,5%), AM1,0 (5%) e AG2,5 (24%).

Quanto à análise de integridade de membrana plasmática avaliada através de microscópio de imunofluorescência (IMF), pode-se observar que o tratamento BG2,5 apresentou maior percentual de espermatozoides com membrana plasmática íntegra, não diferindo somente dos tratamentos BC, BG 1,5 e AG 1,5 (Tabela 2).

Os resultados obtidos de integridade de membrana plasmática (IM) realizada em citômetro de fluxo foram maiores nos tratamentos BC (43%), BG1,5 (44%) e BG2,5 (45%). A integridade acrossomal (PNA) teve o mesmo perfil do resultado que a IM, sendo maior nos tratamentos BC (45%), BG1,5 (44%) e BG2,5 (45%), (Tabela 2).

A estabilidade de membrana (EST) do tratamento BC (43%) foi semelhante aos tratamentos BM0,5; BG1,5; BG2,5 e AC e maior que os tratamentos BM1,0; AM0,5; AM1,0; AG1,5 e AG2,5.

Com relação ao uso de diferentes diluentes observou-se diferença em ambos os tratamentos testados quanto as características de cinética espermática. Observou-se que o diluente Andromed<sup>®</sup> demonstrou melhores resultados quanto a manutenção das características de cinética espermática. Porém, o diluente Bovimix<sup>®</sup> obteve melhores resultados quanto as variáveis integridade de membrana em fluorescência (IMF), integridade de membrana em citômetro (IM), integridade acrossomal (PNA) e estabilidade de membrana (EST), conforme demonstrado nas Tabelas 1 e 2.

TABELA 1 – Valores médios e erro padrão das características de cinética espermática do sêmen bovino da raça Holandês criopreservados com diluentes à base de gema de ovo (Bovimix®) e lecitina de soja (AndroMed®) acrescidos dos antioxidantes glutatona e melatonina em diferentes concentrações, Rio Verde, GO, Brasil, 2017.

| Grupos | MT%         | MP%          | VAP (µm/s)  | VSL (µm/s)  | VCL (µm/s)  | ALH (µm)     | BCF (Hz)     | STR%         | LIN%        |
|--------|-------------|--------------|-------------|-------------|-------------|--------------|--------------|--------------|-------------|
| BC     | 37,0±4,29b  | 33,5±5,54bc  | 24,0±1,79de | 25,0±4,11d  | 22,0±7,41cd | 28,0±1,29bc  | 30,5±4,22abc | 46,0±2,78a   | 41,0±1,22a  |
| BM0,5  | 16,0±2,31d  | 15,0±2,02e   | 16,0±2,54ef | 16,0±4,43e  | 16,0±7,76de | 16,0±1,28de  | 20,0±4,47cde | 27,5±3,50cd  | 30,0±2,34ab |
| BM1,0  | 7,01±1,23e  | 6,0±0,67f    | 8,0±3,91f   | 8,0±5,35f   | 7,0±7,82f   | 10,0±1,19e   | 11,0±4,80de  | 19,5±5,82d   | 22,0±4,07b  |
| BG1,5  | 25,5±2,80c  | 27,0±3,55cd  | 25,0±1,49de | 25,0±4,78d  | 25,0±7,04bc | 20,0±1,22cde | 25,0±4,06bcd | 41,0±2,91ab  | 40,5±1,67a  |
| BG2,5  | 35,5±5,68b  | 33,0±7,12bcd | 27,0±1,49d  | 24,0±4,43d  | 24,0±7,11cd | 25,0±1,33cd  | 31,5±4,22abc | 38,0±2,62abc | 31,0±1,32ab |
| AC     | 42,5±3,19ab | 43,0±3,88a   | 46,0±2,60ab | 45,0±7,38ab | 45,0±10,9a  | 43,0±1,26a   | 36,0±3,35ab  | 18,0±3,21d   | 24,5±0,78b  |
| AM0,5  | 21,5±2,10cd | 24,5±1,85d   | 32,0±2,35cd | 37,0±6,98c  | 33,0±9,57b  | 37,0±1,29ab  | 33,0±3,12abc | 29,5±3,77bcd | 29,5±1,41ab |
| AM1,0  | 8,0±1,08e   | 9,0±1,37ef   | 11,0±5,03f  | 7,0±6,44f   | 13,0±10,1ef | 13,0±1,19e   | 9,0±4,17e    | 5,0±6,50e    | 5,0±4,35c   |
| AG1,5  | 47,0±2,49a  | 46,0±2,91a   | 48,0±2,43a  | 48,0±7,46a  | 47,0±10,8a  | 42,0±1,18a   | 41,0±3,37a   | 28,0±3,22cd  | 27,5±1,22ab |
| AG2,5  | 35,0±2,37b  | 38,0±2,76ab  | 38,0±2,55bc | 40,0±6,89bc | 43,0±10,3a  | 41,0±1,15a   | 38,0±3,30ab  | 22,5±3,27d   | 24,0±0,93b  |

\*Letras diferentes na mesma coluna diferem estatisticamente ( $P<0,05$ ) pelo teste de Friedman. Motilidade total (MT-%), motilidade progressiva (MP-%), velocidade média da trajetória (VAP-µm/s), velocidade linear progressiva (VSL-µm/s), velocidade curvilínea (VCL-µm/s), amplitude de deslocamento lateral da cabeça (ALH-µm/s), frequência de batimentos flagelar cruzado (BCF-Hz), retilinearidade (STR-%) e linearidade (LIN-%). BC: diluente Bovimix® sem adição de antioxidante (controle), BM0,5: diluente acrescido de 0,5mM de melatonina, BM1,0: diluente acrescido de 1,0mM de melatonina, BG1,5: diluente acrescido de 1,5mM de glutatona, BG2,5: diluente acrescido de 2,5mM de glutatona, AC: diluente AndroMed® sem adição de antioxidante (controle), AM0,5: diluente acrescido de 0,5mM de melatonina, AM1,0: diluente acrescido de 1,0mM de melatonina, AG1,5: diluente acrescido de 1,5mM de glutatona, AG2,5: diluente acrescido de 2,5mM de glutatona.

TABELA 2 – Valores médios e erro padrão das características de integridade celular do sêmen bovino da raça Holândes criopreservadas com diluentes à base de gema de ovo (Bovimix®) e lecitina de soja (AndroMed®) acrescidos dos antioxidantes glutatona e melatonina em diferentes concentrações, Rio Verde, GO, Brasil, 2017.

| Grupos | IMF (%)      | IM (%)      | PNA (%)    | EST (%)      |
|--------|--------------|-------------|------------|--------------|
| BC     | 39,0±1,34ab  | 43,0±3,07a  | 45,0±3,08a | 43,0±3,51a   |
| BM 0,5 | 17,0±1,43de  | 31,0±3,72b  | 31,0±2,22b | 32,0±2,70abc |
| BM 1,0 | 8,0±1,43e    | 12,0±2,29cd | 13,0±2,32c | 14,0±2,30ef  |
| BG 1,5 | 34,0±1,80abc | 44,0±2,68a  | 44,0±2,69a | 35,0±3,53abc |
| BG 2,5 | 45,0±1,65a   | 45,0±3,45a  | 45,0±3,42a | 41,0±3,88ab  |
| AC     | 33,0±2,07bc  | 25,0±2,20b  | 29,0±2,26b | 32,0±2,10abc |
| AM 0,5 | 23,0±1,39cd  | 13,0±1,40c  | 14,0±1,37c | 18,0±1,19def |
| AM 1,0 | 8,0±2,09e    | 5,0±0,63d   | 5,0±0,80d  | 5,0±0,61f    |
| AG 1,5 | 37,0±1,74ab  | 26,0±2,36b  | 24,0±2,21b | 27,0±2,24cde |
| AG 2,5 | 31,0±1,10bc  | 31,0±2,00b  | 25,0±1,88b | 28,0±1,63bcd |

\*Letras diferentes na mesma coluna diferem estatisticamente ( $P<0,05$ ) pelo teste de Friedman. Integridade de membrana plasmática em microscópio de fluorescência (IMF), integridade de membrana plasmática (IM), integridade acrossomal (PNA) e estabilidade de membrana (EST) em citômetro de fluxo. BC: diluente Bovimix® sem adição de antioxidante (controle), BM0,5: diluente acrescido de 0,5mM de melatonina, BM1,0: diluente acrescido de 1,0mM de melatonina, BG1,5: diluente acrescido de 1,5mM de glutatona, BG2,5: diluente acrescido de 2,5mM de glutatona, AC: diluente AndroMed® sem adição de antioxidante (controle), AM0,5: diluente acrescido de 0,5mM de melatonina, AM1,0: diluente acrescido de 1,0mM de melatonina, AG1,5: diluente acrescido de 1,5mM de glutatona, AG2,5: diluente acrescido de 2,5mM de glutatona.

Quanto a adição do antioxidante melatonina no meio de criopreservação do sêmen bovino, pode-se observar que nas duas concentrações testadas, a melatonina piorou a manutenção da viabilidade espermática após a congelção, bem como observado nas variáveis, integridade de membrana (IM) e integridade acrossomal (PNA). Devido a concentração utilizada ter sido tóxica aos espermatozoides o que reduziu a viabilidade das mesmas.

Na Tabela 3, estão apresentados os resultados de correlação entre as características de qualidade do sêmen avaliadas. Observou-se correlação positiva de alta magnitude e significativa entre a MT e MP (0,9087), VAP e VCL (0,9046), entre MP e VSL (0,7351), VSL e ALH (0,7624), STR e LIN (0,8017), IM e PNA (0,8974), IM e EST (0,8159) e PNA e EST (0,7296).

Verificou-se estimativa de correlação positiva de moderada magnitude e significativa entre a MT com os parâmetros VAP (0,5624), VSL (0,4868), VCL (0,4693), e ALH (0,4127). Como entre a MP com as características VAP (0,4782), ALH (0,6050), e BCF (0,4060). Também foi observado estimativa de correlação positiva de moderada magnitude e significativa entre os parâmetros VSL e BCF (0,6433), ALH e BCF (0,584) e ALH e STR (0,4483).

As correlações entre as características de cinética espermática e entre as características de integridade de membrana celular foram significativas, porém, apresentaram baixa magnitude.

TABELA 3 – Correlação entre as características de cinética espermática e características de integridade celular, motilidade total (MT-%), motilidade progressiva (MP-%), velocidade média da trajetória (VAP- $\mu\text{m/s}$ ), velocidade linear progressiva (VSL- $\mu\text{m/s}$ ), velocidade curvilínea (VCL- $\mu\text{m/s}$ ), amplitude de deslocamento lateral da cabeça (ALH- $\mu\text{m/s}$ ), frequência de batimentos flagelar cruzado (BCF-Hz), retilinearidade (STR-%), linearidade (LIN-%), integridade de membrana (IM%), integridade acrossomal (PNA%) e estabilidade de membrana (EST), do sêmen bovino da Raça Holândes, Rio Verde, GO, Brasil, 2017.

| CARACTERÍSTICAS |    |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |
|-----------------|----|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|
| Características | MT | MP      | VAP     | VSL     | VCL     | ALH     | BCF     | STR     | LIN     | IMF     | IM      | PNA     | EST     |
| <b>MT</b>       | -- | 0,9087* | 0,5624* | 0,4868* | 0,4693* | 0,4127* | 0,2340* | 0,0956  | 0,0127  | 0,3795* | 0,3904* | 0,3964* | 0,3195* |
| <b>MP</b>       | -- | --      | 0,4782* | 0,7351* | 0,2940* | 0,6050* | 0,4060* | 0,0940  | 0,0592  | 0,3774* | 0,2499* | 0,2725* | 0,1684* |
| <b>VAP</b>      | -- | --      | --      | 0,3390* | 0,9046* | 0,1730* | 0,0779  | 0,3470* | 0,0662  | 0,1881* | 0,1051* | 0,1259* | 0,1110* |
| <b>VSL</b>      | -- | --      | --      | --      | 0,0697  | 0,7624* | 0,6433* | 0,1981* | 0,0339  | 0,3086* | 0,0885  | 0,0436  | 0,1275* |
| <b>VCL</b>      | -- | --      | --      | --      | --      | 0,0663  | 0,2271* | 0,3678* | 0,0220  | 0,1029* | 0,1374* | 0,1390* | 0,2001* |
| <b>ALH</b>      | -- | --      | --      | --      | --      | --      | 0,5845* | 0,4483* | 0,3665* | 0,3105* | 0,0285  | 0,0244  | 0,0072  |
| <b>BCF</b>      | -- | --      | --      | --      | --      | --      | --      | 0,1794* | 0,0357  | 0,3463* | 0,0540  | 0,0157  | 0,0510  |
| <b>STR</b>      | -- | --      | --      | --      | --      | --      | --      | --      | 0,8017* | 0,0732  | 0,3336* | 0,3449* | 0,2662* |
| <b>LIN</b>      | -- | --      | --      | --      | --      | --      | --      | --      | --      | 0,0783  | 0,3021* | 0,3317* | 0,1633* |
| <b>IMF</b>      | -- | --      | --      | --      | --      | --      | --      | --      | --      | --      | 0,2907* | 0,3094* | 0,2180* |
| <b>IM</b>       | -- | --      | --      | --      | --      | --      | --      | --      | --      | --      | --      | 0,8974* | 0,8159* |
| <b>PNA</b>      | -- | --      | --      | --      | --      | --      | --      | --      | --      | --      | --      | --      | 0,7296* |
| <b>EST</b>      | -- | --      | --      | --      | --      | --      | --      | --      | --      | --      | --      | --      | --      |

\* Correlação de Sperman entre as características espermáticas do sêmen bovino.  $P < 0,05$ .



## DISCUSSÃO

Observou-se que o diluente Andromed<sup>®</sup> sem adição de glutathione nas duas concentrações avaliadas melhorou as características de cinética espermática do sêmen bovino. A melatonina reduziu a viabilidade do sêmen. O diluente Bovimix<sup>®</sup> obteve melhores resultados quanto às características de integridade celular.

Verificou-se que a adição do antioxidante glutathione nas duas concentrações (1,5 e 2,5 mM) não melhorou a viabilidade espermática do sêmen bovino criopreservado.

Também não foi verificada diferença entre os tratamentos controle e tratados com glutathione a 1,5 e 2,5 mM nas variáveis MT e MP, no diluente à base de lecitina de soja. O mesmo foi observado por Soares<sup>16</sup> que não observou diferença entre o grupo controle e tratado com glutathione nas concentrações 2,5 e 7 mM no diluente à base de leite desnatado em caprinos.

Tuncer et al.<sup>17</sup> não verificaram nenhuma diferença quanto às características de cinética espermática nas amostras acrescidas de glutathione nas concentrações de 0,5 e 2,0 mM em diluente à base de soja no sêmen de bovinos (Laiciphose<sup>®</sup>), contrário ao presente estudo.

Foi observada maior motilidade total nos tratamentos BC e BG2,5 mM, quando avaliou-se os tratamentos à base de gema, diferindo do tratamento BG1,5 mM. Entretanto, Bilodeau et al.<sup>18</sup>, relataram que a adição do antioxidante catalase aos diluentes à base de gema de ovo, resultou em maior motilidade e viabilidade do espermatozoide bovino, com consequente melhora na capacidade de fertilização.

Perez et al.<sup>19</sup> e Câmara et al.<sup>20</sup> não observaram efeito dos tratamentos com glutathione sobre as características espermáticas avaliadas. Já Campuzano et al.<sup>6</sup>, observaram que o antioxidante glutathione tem impacto positivo na qualidade do sêmen, bem como maiores taxas de fertilização quando comparado com demais antioxidantes, resultado este contrário ao observado neste estudo.

Os tratamentos com adição de glutathione não demonstraram efeito positivo sobre a qualidade espermática. No entanto, a melatonina piorou a viabilidade das células espermáticas nas duas concentrações avaliadas (0,5 e 1,0 mM), nos diferentes diluentes testados, notando-se que a melatonina influenciou de forma negativa na qualidade espermática das amostras avaliadas. Acredita-se que a melatonina possa ter causado efeito citotóxico as células espermáticas nessas concentrações. Somente na variável EST, o tratamento BM 0,5 foi semelhante aos tratamentos BC, BG 1,5; BG 2,5 e AC ( $P>0,05$ ).

Ashrafi et al.<sup>21</sup> verificaram melhora na qualidade das amostras de sêmen bovino pós-descongelamento, criopreservadas com melatonina em diferentes concentrações (2 ou 3 mM). No entanto, Oliveira et al.<sup>22</sup> observaram que a adição de 0,001 mM e 0,1 mM no sêmen de carneiros, foram ineficientes na manutenção das características espermáticas, reduzindo a ação da melatonina, semelhante ao observado neste estudo nas concentrações (0,5 e 1,0 mM) de melatonina. Dessa forma é necessário maiores pesquisas quanto a adequada concentração de melatonina nas amostras de sêmen, pois concentrações mais baixas ou intermediárias às avaliadas, podem resultar em melhor ação da melatonina sobre a manutenção das características espermáticas. Foi observado que as concentrações de melatonina avaliadas proporcionaram pior qualidade espermática do sêmen bovino, sendo necessárias maiores pesquisas quanto à adequada concentração para a criopreservação do sêmen bovino, pois não há padronização quanto a concentração adequada deste antioxidante a ser utilizada nos diluentes de congelamento do sêmen<sup>17,23</sup>.

Souza et al.<sup>22</sup> observaram aumento no percentual de células com acrossoma íntegro nos tratamentos com adição de 1 mM de melatonina quando comparado com o tratamento controle no diluente de congelamento do sêmen de carneiros à base de gema. E ressaltam, que a melatonina adicionada ao meio diluente permite maior proteção à membrana acrossomal contra os danos oxidativos e mecânicos causados pela criopreservação. Fato este que não foi observado neste estudo com as diferentes concentrações de melatonina em ambos os diluentes testados.

Com relação aos diferentes diluentes (Andromed<sup>®</sup> e Bovimix<sup>®</sup>), observou-se diferença entre os tratamentos controle, sendo verificado melhores resultados de MP, VAP, VSL, VCL e ALH das amostras diluídas com diluente Andromed<sup>®</sup> à base de lecitina de soja. Entretanto, com relação às características de integridade de membrana, foi verificado que o diluente Bovimix<sup>®</sup> obteve melhores percentuais quando comparado com o diluente Andromed<sup>®</sup>.

Resultado semelhante foi observado por Aires et al.<sup>24</sup> que verificaram maior motilidade (73,54% e 59,57%) no sêmen de touros de aptidão leiteira criopreservado com diluente à base de lecitina de soja (AndroMed<sup>®</sup>), ressaltando que o uso de diluentes livres de proteína animal pode solucionar problemas associados ao uso de gema do ovo, incluindo contaminação bacteriana e variações na composição do diluente, resultado semelhante ao observado neste estudo.

Lakey et al.<sup>25</sup> ressaltaram que o uso de lecitina de soja ainda é restrito por ser priorizada na alimentação bovina, bem como os custos com o processamento da soja. Com isso vem sendo avaliado o uso de outros derivados da soja (leite de soja) para a

criopreservação das amostras de sêmen em substituição a gema de ovo, como alternativa simples e barata com relação aos subprodutos baseado em animais.

O diluente a base de soja proporcionou maiores percentuais de velocidades, resultado este semelhante a Salmani et al.<sup>26</sup> que avaliaram diferentes concentrações de lecitina de soja (0,5; 1; 1,5; 2 e 2,5%) e gema de ovo (15%) na criopreservação do sêmen de caprinos e não observaram diferença entre a motilidade, viabilidade e integridade de membrana do sêmen diluído com ambos os diluentes. No entanto, evidenciaram maiores percentuais quanto as características de velocidade e linearidade (VAP, VCL, VSL, ALH e LIN) para o diluente contendo 1 e 1,5% de lecitina de soja. Resultado semelhante ao observado neste estudo, em que o diluente à base de soja proporcionou maiores percentuais de velocidade.

Com relação as características retilinearidade (STR) e linearidade (LIN) foi observado comportamento diferente quanto aos diluentes avaliados, resultando em maior percentual no diluente Bovimix<sup>®</sup> (BC). Contrário ao observado por Crespilho et al<sup>27</sup>, que observaram maiores percentuais de LIN e STR das amostras criopreservadas com diluente à base de lecitina.

A criopreservação reduz a motilidade espermática pós-descongelamento devido a danos causados às mitocôndrias, diminuindo assim, a síntese de energia necessária para a movimentação dos espermatozoides no trato genital da fêmea<sup>28</sup>. Esses danos causados nas mitocôndrias são determinantes nas mudanças da trajetória linear e na redução das velocidades espermáticas<sup>29</sup>, podendo explicar a redução da VCL e VAP dos espermatozoides do grupo tratado com diluente Bovimix<sup>®</sup>.

Amostras de sêmen com altos valores de velocidade (VAP, VCL, VSL e ALH) e baixo percentual de STR e LIN são indicativos de hiperativação das células, não pelo tipo de antioxidante utilizado, mas pelo diluente avaliado. Deste modo, essa característica é considerada indesejada, uma vez que a ativação espermática deveria ocorrer próximo ao local de fertilização. Assim, essa ativação precoce resulta em menor tempo de vida útil do espermatozoide, reduzindo a capacidade fecundante do animal<sup>10</sup>.

Portanto, acredita-se que o diluente Bovimix<sup>®</sup> foi mais eficiente na manutenção das características espermáticas, pois proporcionou melhores percentuais de integridade de membrana e integridade acrossomal com menores velocidades.

Dessa forma, pressupõe-se que houve hiperativação das células criopreservadas com diluente à base de lecitina de soja. Verificou-se maiores valores médios de velocidade e baixo percentual de STR e LIN quando comparado aos tratamentos submetidos à diluição com Bovimix<sup>®</sup>.

Durante a criopreservação das amostras de sêmen também ocorre redução da proporção colesterol:fosfolipídios, 45% durante a refrigeração e 60% na congelação, resultando em menor fluidez da membrana e baixa viabilidade das células espermáticas, pois se tornam mais susceptíveis aos danos causados pelas mudanças bruscas de temperatura<sup>30</sup>. A adição de colesterol nas amostras de sêmen proporciona maior resistência ao choque frio, redução do estresse osmótico causado pelos processos de criopreservação, pela ação estabilizadora e moduladora da fluidez da membrana.

Quanto às análises de integridade de membrana plasmática e integridade acrossomal, verificou-se maiores percentuais com o diluente Bovimix<sup>®</sup> quando comparado com o diluente Andromed<sup>®</sup> conforme demonstrado na Tabela 2. No entanto, quanto à estabilidade de membrana não houve diferença entre os tratamentos AC e BC, diferindo apenas o BC dos demais tratamentos. Semelhante ao observado por Celeghini et al.<sup>31</sup> e Muinõ et al.<sup>32</sup>, que observaram melhores percentuais de membrana plasmática com diluente à base de gema de ovo no sêmen bovino.

Thun et al.<sup>33</sup> também observaram maior porcentagem de integridade de membrana para espermatozoides criopreservados com diluentes à base de gema de ovo em relação aqueles processados em diluentes composto por lecitina de soja. Sugerem que diluidores à base de gema de ovo podem oferecer melhor proteção à membrana plasmática e ao potencial mitocondrial de espermatozoides bovinos do que diluidores à base de soja.

Crespilho et al.<sup>27</sup> compararam a eficiência de três diferentes diluentes na criopreservação do sêmen bovino: Tris-frutose (20% de gema de ovo), Botubov<sup>®</sup> (20% de gema de ovo) e Botubov<sup>®</sup>-L (1% de lecitina de soja). Observaram que o diluente à base de gema de ovo proporcionou maior motilidade total e progressiva, bem como maiores taxas de concepção. No entanto, constatou-se redução na integridade das amostras de sêmen criopreservadas com lecitina pós-descongelação.

Dell'Aqua Jr et al.<sup>34</sup> e Zhang et al.<sup>35</sup> observaram melhor resposta dos meios à base de lecitina de soja em relação ao diluente com gema de ovo ao avaliarem sêmen de bovinos e javalis, resultado este semelhante ao observado neste estudo.

Neste estudo, foi verificada estimativa significativa de correlação, porém de baixa magnitude entre as características de cinética espermática, e características de integridade de membrana (IMF, IM, PNA e EST). Resultado contrário ao observado por Zuccari et al.<sup>36</sup> que observaram correlação significativa de moderada magnitude ( $r=0,70$ ) entre o número de células íntegras (IM) e motilidade total pós-descongelação. Rodriguez-Martinez<sup>37</sup> também

observou correlação entre motilidade e integridade de membrana, e ressaltou que apesar de significativas estas correlações têm variado em torno de 0,15 a 0,83.

Barros et al.<sup>38</sup> verificaram estimativa de correlação de alta magnitude entre a motilidade progressiva e as variáveis MT, VCL, VSL, VAP e LIN. No entanto, a motilidade total apresentou correlação de moderada magnitude entre as características VCL, VSL, VAP, LIN e STR, resultado contrário ao verificado no presente estudo.

Kirk et al.<sup>39</sup> demonstraram que grande parte dos testes avaliados não possuem alta correlação com a fertilidade, pela complexidade da célula espermática, bem como o processo de fertilização. Sendo assim necessária a utilização de modelos de análises de regressões múltiplas, bem como a realização de análises das características do sêmen tanto pelo método CASA quanto pelo citômetro de fluxo para melhor predizer os índices de prenhez.

Apesar da grande controvérsia a respeito da correlação entre as características do movimento espermático com os índices de fertilidade *in vivo*, são observadas diferenças entre o movimento desempenhado pelos espermatozoides que alcançam altas e baixas taxas de fertilização<sup>10</sup>. Nesse caso, algumas variáveis geradas pelo CASA, como a linearidade, parecem apresentar maior correlação com a fertilidade<sup>37</sup>.

Usualmente, a motilidade dos espermatozoides ainda é estimada de forma subjetiva, por meio da avaliação visual das células sob microscopia óptica convencional, representando a principal análise laboratorial utilizada pelas centrais de colheita e congelamento de sêmen. No entanto, é essencial a associação de todas as variáveis avaliadas pelo sistema computadorizado CASA, pois somente a característica motilidade não determina a capacidade fecundante de uma amostra de sêmen, sendo necessárias maiores análises quanto as características de velocidade e integridade de membrana. As características de velocidade e integridade têm correlação positiva com a taxa de fertilização, isto representa maior número de prenhez para o produtor<sup>40</sup>.

Assim, pode-se verificar neste estudo, que a avaliação *in vitro* da qualidade do sêmen não é o melhor método de predição da fertilidade das amostras de sêmen, uma vez que, foram verificadas correlações significativas de baixa e moderada magnitude entre as características de cinética espermática e as características de integridade de membrana avaliadas.

## CONCLUSÃO

O diluente Andromed<sup>®</sup> melhorou a manutenção as características de cinética espermática do sêmen bovino. Entretanto, o diluente Bovimix<sup>®</sup> foi mais eficiente para manutenção dos parâmetros de integridade de membrana (IM), integridade acrossomal (PNA) e estabilidade de membrana (EST).

A glutathione não proporcionou melhora na manutenção das características espermáticas do sêmen bovino criopreservado e a melatonina piorou a qualidade das características espermáticas após a descongelação.

Existe correlação entre as características de cinética espermática, bem como entre as características de integridade de membrana em fluorescência, integridade de membrana em citômetro, integridade acrossomal e estabilidade de membrana. Entretanto, as correlações existentes entre as características de cinética espermática e as características de integridade de membrana celular são significativas, porém, apresentaram baixa magnitude.

## REFERÊNCIAS

1. Schober D, Aurich C, Nohl H, Gille L. Influence of cryopreservation on mitochondrial functions in equine spermatozoa. *Theriogenology* [Internet]. 2007;68(5):745–54. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17644168>
2. Maia MS, Bicudo SD. Radicais livres, antioxidantes e função espermática em mamíferos : uma revisão. *Rev Bras Reprodução Anim.* 2010;33(4):183–93.
3. Pugliesi G, Carvalho GR, Rates DM, Ker PG, Da Matta MP, De Oliveira RR, Filho JMS. Viability and fertility of cooled equine semen diluted with skimmed milk or glycine egg yolk-based extenders. *R Bras Zootec* [Internet]. 2012;41(12):2411–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1590/S1516-35982012001200005>
4. Agarwal A, Saleh RA, Bedaiwy MA. Role of reactive oxygen species in the pathophysiology of human reproduction. *Fertil Steril.* 2003;79(4):829–43.
5. Bansal AK, Bilaspuri GS. Impacts of oxidative stress and antioxidants on semen functions. *Vet Med Int* [Internet]. 2010; 7. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20871827>
6. Mata-Campuzano M, Álvarez-Rodríguez M, Tamayo-Canul J, López-Urueña E, de Paz P, Anel L, Martínez-Pastor F, Álvarez M. Refrigerated storage of ram sperm in presence of Trolox and GSH antioxidants: Effect of temperature, extender and storage time. *Anim Reprod Sci.* 2014;151(3–4):137–47.
7. Du Plessis, S. S. Magenaar K, Lampiao F. The in vitro effects of melatonin on human

- sperm function and its scavenging activities on NO and ROS. first Int J Androl [Internet]. 2010;42(2):112–6. Available from: [10.1111/j.1439-0272.2009.00964.x](https://doi.org/10.1111/j.1439-0272.2009.00964.x)
8. CBRA- Colégio brasileiro de reprodução animal. 3 ed. Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal. Belo Horizonte, MG; 2013. 104 p.
  9. Mortimer ST. CASA — Practical Aspects Andrology Lab Corner. J Andrology,. 2000;21:515–24.
  10. Verstegen J, Iguer-Ouada M, Onclin K. Computer assisted sêmen analyzers in andrology research and veterinary practice. Theriogenology [Internet]. 2002;57(1):149–79. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11775967>
  11. Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K WP. Biologia Molecular da Célula. 5ª. Artmerd, editor. 2010.
  12. Areekijserree M, Veerapraditsin T. Characterization of porcine oviductal epithelial cells, cumulus cells and granulosa cells-conditioned media and their ability to induce acrosome reaction on frozen-thawed bovine spermatozoa. micron [Internet]. 2008;39(2):160–7. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17331736>
  13. Rodriguez-Martinez H. Methods for semen evaluation and their relationship to fertility. Congr Bras Reprodução Anim. 2005;8.
  14. Silva S. Interpretação do coeficiente de correlação [Internet]. 2011. Available from: <http://www.leg.ufpr.br/~silvia/CE055/node102.html>
  15. R Project. R Foundation for Statistical Computing [Internet]. Austria; 2015. Available from: <http://www.r-project.org/>
  16. Soares AT. Avaliação in vitro de espermatozóides caprinos criopreservados em diluente à base de leite desnatado acrescido de glutathione reduzida e trolox em diferentes concentrações. Recife; 2010.
  17. Tuncer PB, Bucak MN, Büyükleblebici S, Sariözkan S, Yeni D, Eken A, Akalın PP, Kinet H, Avdatek F, Fidan AF, Gündoğan M. The effect of cysteine and glutathione on sperm and oxidative stress parameters of post-thawed bull semen. Cryobiology. 2010; 61(3):303–7.
  18. Bilodeau JF, Blanchette S, Cormier N, Sirard MA. Reactive oxygen species-mediated loss of bovine sperm motility in egg yolk Tris extender: protection by pyruvate, metal chelators and bovine liver or oviductal fluid catalase. Theriogenology [Internet]. 2002; 57(3):1105–22. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12041904>
  19. Perez EGA, Nichi M, Viana CH, Silva ROC, Dalmazzo A, Góes PAA, Gurgel JRC, Barnabe RC, Barnabe VH, Barnabe RC. Efeito da adição de glutathione na função e estresse oxidativo em sêmen ovino criopreservado. Braz j vet res anim sci [Internet]. 2012; 49(4):262–8. Available from: <http://www.revistas.usp.br/bjvras/article/download/51705/55766>
  20. Câmara DR, Mello-Pinto MMC, Pinto LC, Brasil OO, Nunes JF, Guerra MMP. Effects of reduced glutathione and catalase on the kinematics and membrane functionality of sperm during liquid storage of ram semen. Small Rumin Res [Internet]. 2011; 100(1):44–9. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2011.05.010>

21. Ashrafi I, Kohram H, Ardabili FF. Antioxidative effects of melatonin on kinetics, microscopic and oxidative parameters of cryopreserved bull spermatozoa. *Anim Reprod Sci* [Internet]. 2013; 139(1–4):25–30.  
Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.anireprosci.2013.03.016>
22. Souza WL, Moraes EA, Costa JMS, Sousa PHF, Lopes Junior ES, Oliveira RP, Toniolli R. Efeito de diferentes concentrações de melatonina em espermatozoides de carneiros sobre estresse oxidativo após criopreservação. *Pesqui Vet Bras*. 2016; 36(7):657–64. Available from: <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-736X2016000700017>
23. Succu S, Berlinguer F, Pasciu V, Satta V, Leoni GG, Naitana S. Melatonin protects ram spermatozoa from cryopreservation injuries in a dose-dependent manner. *J Pineal Res* [Internet]. 2011; 50(3):310–8.  
Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21214627>
24. Aires VA, Hinsch KD, Mueller-Schloesser F, Bogner K, Mueller-Schloesser S, Hinsch E. In vitro and in vivo comparison of egg yolk-based and soybean lecithin-based extenders for cryopreservation of bovine semen. *Theriogenology* [Internet]. 2003;60(2):269–79.  
Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0093691X02013699>
25. Layek SS, Mohanty TK, Kumaresan A, Parks JE. Cryopreservation of bull semen: Evolution from egg yolk based to soybean based extenders. *Anim Reprod Sci* [Internet]. 2016; 172:1–9. Available from: [10.1016/j.anireprosci.2016.04.013](http://dx.doi.org/10.1016/j.anireprosci.2016.04.013)
26. Salmani H, Towhidi A, Zhandi M, Bahreini M, Sharafi M. In vitro assessment of soybean lecithin and egg yolk based diluents for cryopreservation of goat semen. *Cryobiology* [Internet]. 2014; 68(2):276–80.  
Available from: [10.1016/j.cryobiol.2014.02.008](http://dx.doi.org/10.1016/j.cryobiol.2014.02.008)
27. Crespilho AM, Sá Filho MF, Dell'Aqua JA, Nichi M, Monteiro GA, Avanzi BR, Martins A, Papa FO. Comparison of in vitro and in vivo fertilizing potential of bovine semen frozen in egg yolk or new lecithin based extenders. *Livest Sci* [Internet]. 2012; 149(1–2):1–6. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.livsci.2012.05.011>
28. Schober D, Aurich C, Nohl H, Gille L. Influence of cryopreservation on mitochondrial functions in equine spermatozoa. *Theriogenology* [Internet]. 2007; 68(5):745–54.  
Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17644168>
29. Ortega-Ferrusola C, García BM, Gallardo-Bolaños JM, González-Fernández L, Rodríguez-Martínez H, Tapia JÁ, Peña FJ. Apoptotic markers can be used to forecast the freezeability of stallion spermatozoa. *Anim Reprod Sci* [Internet]. 2009; 114(4):393–403.  
Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19019584>
30. Srivastava N, Srivastava SK, Ghosh SK, Kumar A, Jerome A, Singh M, Askok K, Ramteke S. Cryoinjury in relation to cholesterol content of bull spermatozoa. *Indian J Anim Res* [Internet]. 2015; 49(3):308–12.  
Available from: [10.5958/0976-0555.2015.00140.5](http://dx.doi.org/10.5958/0976-0555.2015.00140.5)
31. Celeghini ECC, De Arruda RP, De Andrade AFC, Nascimento J, Raphael CF. Practical techniques for bovine sperm simultaneous fluorimetric assessment of plasma,



- acrosomal and mitochondrial membranes. *Reprod Domest Anim.* 2007; 42(5):479–88.
32. Muino R, Fernández M, Peña AI. Post-thaw survival and longevity of bull spermatozoa frozen with an egg yolk-based or two egg yolk-free extenders after an equilibration period of 18 h. *Reprod Domest Anim.* 2007; 42(3):305–11.
  33. Thun R, Hurtado M, Janett F. Comparison of Biociphos-Plus® and TRIS-egg yolk extender for cryopreservation of bull semen. *Theriogenology* [Internet]. 2002; 57(3):1087–94. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12041902>
  34. Dell'aqua JR JÁ, Papa FO, Freitas CP, Alvarenga MA, Melo CM, Crespilho A, Siqueira filho ER, Alberti K, De vita B, Barcellos G, Medeiros AS. Nova proposta de diluidor para sêmen bovino quimicamente definido. 2007, v.35, *Acta Scientiae Veterinariae*. 2007.
  35. Zhang SS, Hu JH, Li QW, Jiang ZL, Zhang XY. The cryoprotective effects of soybean lecithin on boar spermatozoa quality. *African J Biotechnol.* 2009; 8(22):6476–80.
  36. Zúccari CESN, Leite PA, Passos TS, Carrijo PR, Kiefer C. Correlação entre métodos de avaliação da integridade da membrana plasmática do espermatozóide bovino criopreservado. *Rev Bras Saúde e Produção Anim.* 2009; 10(3):678–84.
  37. Rodriguez-Martinez H. Methods for semen evaluation and their relationship to fertility. In: In: *Congresso Brasileiro de Reprodução Animal*. Belo Horizonte, MG; 2005. p. 8.
  38. Barros LO, Silva SV, Almeida FC, Silva ECB, Guerra MMP. Efeito da adição de glutathione peroxidase e cisteína ao diluidor de congelamento do sêmen equino. *Arq Bras Med Vet e Zootec.* 2013; 65(2):430–8.
  39. Kirk ES, Squires EL, Graham JK. Comparison of in vitro laboratory analyses with the fertility of cryopreserved stallion spermatozoa. *Theriogenology.* 2005; 64:1422–39.
  40. Crespilho AM, Papa FO, Alberti K, Siqueira filho ER, Martins JR A, Novaes JLC, Dell'aqua JA. Eficiência comparativa entre dois diluidores para a congelamento de sêmen bovino sobre os padrões de motilidade e integridade de membrana plasmática. *Ars Vet* [Internet]. 2006; 22(3). Available from: <http://dx.doi.org/10.15361/2175-0106.2006v22n3p229-235>

### **CAPÍTULO 3 – EFICIÊNCIA DA PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES BOVINOS UTILIZANDO SÊMEN CRIOPRESERVADO COM DILUENTE À BASE DE GEMA DE OVO E LECITINA DE SOJA ACRESCIDOS DE GLUTATIONA**

#### **RESUMO**

Objetivou-se avaliar a eficiência da produção *in vitro* de embriões bovinos (PIVE), utilizando sêmen criopreservado com diluente à base de gema de ovo (Bovimix<sup>®</sup>) e lecitina de soja (AndroMed<sup>®</sup>) acrescidos ou não com antioxidante glutatona. Foram realizadas seis colheitas de sêmen de um touro da raça Holandês previamente selecionado por exame andrológico. O ejaculado foi dividido em quatro porções e diluído com diluente à base de gema de ovo e lecitina de soja, acrescidos de glutatona de acordo com os seguintes tratamentos: 1.Bovimix<sup>®</sup> Controle (BC): diluente Bovimix<sup>®</sup> sem adição de antioxidante; 2.Bovimix<sup>®</sup> 2,5 mM (BG2,5): diluente Bovimix<sup>®</sup> acrescido de 2,5 mM de glutatona; 3.AndroMed<sup>®</sup> Controle (AC): diluente AndroMed<sup>®</sup> sem adição de antioxidante; 4.AndroMed<sup>®</sup> 1,5 mM (AG1,5): diluente AndroMed<sup>®</sup> acrescido de 1,5 mM de glutatona. As amostras foram inicialmente refrigeradas a 5°C por cinco horas e posteriormente congeladas em nitrogênio líquido. Para produção *in vitro* dos embriões foram utilizados ovários de animais de abatedouro. Após seleção dos ovócitos realizou-se a maturação, fertilização e cultivo dos possíveis zigotos. Avaliou-se a taxa de clivagem três dias (D3) após a fertilização (FIV), a taxa de blastocisto sete dias (D7) após a FIV e a taxa de eclosão oito (D8) e nove (D9) dias após a FIV. Avaliou-se a correlação entre as características espermáticas e produção *in vitro* de embriões. O diluente Andromed<sup>®</sup> foi mais eficiente na taxa de clivagem, não havendo efeito da adição de glutatona neste diluente. Entretanto, a adição de 2,5 mM de glutatona no diluente à base de gema de ovo melhorou a taxa de clivagem. Verificou-se estimativa significativa de correlação de moderada magnitude entre a taxa de clivagem e características de cinética espermática. Conclui-se que o diluente à base de lecitina de soja foi mais eficiente para produção *in vitro* de embriões bovinos, não havendo efeito da adição de glutatona neste diluente. Entretanto, a adição de 2,5 mM de glutatona no diluente à base de gema de ovo para criopreservação do sêmen bovino melhorou a produção *in vitro* de embriões. Ademais, a avaliação *in vitro* da qualidade do sêmen não é o melhor método para predizer o potencial fertilizante do mesmo na PIVE.

**Palavras-chaves:** Criopreservação, *bos taurus*, estresse oxidativo, espermatozoides, fertilização, ovócitos.

## ABSTRACT

The objective of this study was to evaluate the efficiency of the in vitro production of bovine embryos (EVIP) using cryopreserved semen with egg yolk diluent (Bovimix®) and soy lecithin (AndroMed®), with or without antioxidant glutathione. Six semen samples were collected from a previously selected andrological bull. The ejaculate was divided into four portions and diluted with egg yolk diluent and soy lecithin plus glutathione according to the following treatments: 1. Bovimix® Control (BC): Bovimix® diluent without antioxidant addition; 2. Bovimix® 2,5 mM (BG2,5): Bovimix diluent plus 2,5 mM glutathione; 3. AndroMed® Control (AC): AndroMed® diluent without antioxidant addition; 4. AndroMed® 1,5 mM (AG1,5): AndroMed® diluent plus 1,5 mM glutathione. The samples were initially refrigerated at 5°C for five hours and then frozen in liquid nitrogen. For in vitro production of the embryos, ovaries from slaughter animals were used. After oocyte selection, maturation, fertilization and cultivation of possible zygotes were performed. Three-day (D3) cleavage rate after fertilization (IVF), blastocyst rate seven days (D7) after IVF and hatch rate eight (D8) and nine (D9) days after IVF were evaluated. The correlation between sperm characteristics and in vitro embryo production was evaluated. The Andromed® diluent was more efficient at the rate of cleavage, with no effect of the addition of glutathione in this diluent. However, the addition of 2,5 mM glutathione in the egg yolk diluent improved the cleavage rate. There was a significant estimate of a moderate magnitude correlation between the rate of cleavage and characteristics of spermatoc kinetics. It was concluded that soy lecithin diluent was more efficient for the in vitro production of bovine embryos, with no effect of the addition of glutathione in this diluent. However, the addition of 2,5 mM glutathione in the egg yolk diluent for cryopreservation of bovine semen improved the in vitro production of embryos. In addition, in vitro evaluation of semen quality is not the best method to predict the fertilization potential of the same in EVIP.

**Key words:** Cryopreservation, *bos taurus*, oxidative stress, spermatozoa, fertilization, oocytes.

## INTRODUÇÃO

A produtividade do rebanho bovino tem aumentado consideravelmente, devido a intensa seleção de características produtivas de animais geneticamente melhorados associado ao uso das biotecnologias reprodutivas. Desta forma, biotécnicas como a inseminação artificial em tempo fixo (IATF), produção *in vitro* de embriões (PIVE), bem como a transferência de embriões (TE), tem sido utilizadas a fim de maximizar os indicativos de produtividade dos rebanhos, com consequente aumento do potencial reprodutivo<sup>1</sup>.

A produção *in vitro* de embriões é uma importante biotécnica reprodutiva, pois viabiliza a utilização de animais jovens, permite a seleção de matrizes geneticamente melhoradas e reduz o intervalo das gerações. Essa técnica tem como objetivo a interação entre o ovócito e a célula espermática em laboratório<sup>2</sup> (*in vitro*).

As etapas da PIVE envolvem a maturação *in vitro* (MIV), fertilização *in vitro* (FIV), e o cultivo ou co-cultivo *in vitro* (CIV), dos zigotos e embriões. A eficiência desses processos depende tanto da qualidade dos procedimentos realizados em laboratório, como cuidados na manipulação dos ovócitos e utilização de meios adequados, bem como o uso de amostras de sêmen de qualidade<sup>3</sup>.

Dessa forma, é imprescindível o uso de diluentes adequados na criopreservação do sêmen, prevenindo danos nas estruturas dos espermatozoides bem como alterações na capacidade fecundante. O uso de diluentes eficazes para criopreservação de sêmen pode incrementar os resultados de produção *in vitro* de embriões bovinos<sup>4</sup>.

Os diluentes mais utilizados para criopreservação do sêmen bovino são à base de gema de ovo, devido a boa capacidade de proteção aos espermatozoides. No entanto, vem sendo restrito o uso de produtos de origem animal por razões microbiológicas e até mesmo pela dificuldade de padronização dos componentes necessários para criopreservação do sêmen bovino<sup>5</sup>. Diante disso, estudos recentes têm testado a utilização de produtos de origem vegetal como a lecitina de soja, com o intuito de reduzir os possíveis problemas sanitários nas amostras de sêmen<sup>6</sup>.

Outra preocupação recente é a excessiva produção das espécies reativas de oxigênio (EROS) durante os processos de criopreservação do sêmen. Alguns estudos correlacionam os níveis das EROS nos espermatozoides e índice de fertilidade, sugerindo que espermatozoides expostos a ambiente oxidante resultam em componentes nucleares e citoplasmáticos afetados, interferindo diretamente no desenvolvimento do embrião<sup>7</sup>.

Dessa forma, vem sendo adicionados antioxidantes nos diluentes de criopreservação do sêmen com a finalidade de melhorar a integridade de membrana das células espermáticas resultando em maiores taxas de fertilização<sup>8</sup>. Os antioxidantes normalmente utilizados na congelação do sêmen bovino são a glutatona, ácido ascórbico, cisteína e vitamina E.

Mesmo com os grandes avanços na PIVE, é relativamente baixa a qualidade dos embriões *in vitro* quando comparadas com os produzidos *in vivo*. Apenas 30 a 40% dos ovócitos maturados desenvolvem-se até blastocisto, mesmo com as melhores técnicas de colheita. Logo, têm sido estudadas novas formas de incrementar as etapas da PIVE, visando maior eficiência da técnica<sup>9</sup>.

Desse modo, objetivou-se avaliar a eficiência da produção *in vitro* de embriões bovinos, utilizando sêmen criopreservado com diluente à base de gema de ovo (Bovimix<sup>®</sup>) ou lecitina de soja (AndroMed<sup>®</sup>) acrescidos ou não com antioxidante glutatona e a correlação entre as características espermáticas com a PIVE.

## MATERIAL E MÉTODOS

O projeto foi realizado no Instituto Federal Goiano Campus Rio verde, Goiás, Brasil, após aprovação pelo Comitê de ética do IF Goiano, sob protocolo 011/2014 (ANEXO A).

### Criopreservação do Sêmen

Foram realizadas seis colheitas de sêmen de um touro da raça Holandês (melhor resultado no experimento I) selecionado por meio de exame andrológico e análise de sêmen pós-descongelação pelo método CASA e citômetro de fluxo. As colheitas foram realizadas através de eletroejaculador (Boijector<sup>®</sup>, modelo 65A) com intervalo de cinco dias entre colheitas. Para realização das colheitas o animal foi mantido em brete de contenção e submetido à higienização do prepúcio com papel toalha, para evitar contaminação das amostras. Imediatamente após a colheita foram avaliados os percentuais de motilidade total (%), motilidade progressiva (%) e vigor (0-5) em microscópio óptico, por meio da deposição de uma gota de sêmen entre lâmina e lamínula aquecidas a 37°C.

Os ejaculados foram divididos em quatro porções, adicionado diluente à base de gema de ovo (Bovimix<sup>®</sup>, Nutricell, Campinas-SP) ou lecitina de soja (AndroMed<sup>®</sup>, Minitub,

Hauptstrasse-Alemanha), para atingir a concentração de  $30 \times 10^6$  espermatozoides moveis por mL, e, acrescidos do antioxidante glutathione (Sigma Co., St. Louis, MO, USA - G6013-10G) em diferentes concentrações. Para a concentração de 1,5 mM de glutathione foi adicionado 0,004609 g de glutathione às amostras de sêmen diluídas com AndroMed®. A concentração de 2,5 mM foi resultante da adição de 0,00768 g de glutathione as amostras de sêmen diluídas com o diluente Bovimix® em um total de 10 mL. Resultando nos seguintes tratamentos: 1. Bovimix® controle; 2. Bovimix® acrescido de 2,5 mM de glutathione; 3. AndroMed® controle; 4. AndroMed® acrescido de 1,5 mM de glutathione.

Após homogeneizadas, as amostras de sêmen foram envasadas em palhetas de 0,5mL dispostas horizontalmente sobre bandeja de aço telada e submetidas à refrigeração em geladeira Minitub® (Porto Alegre-RS) a 5°C por cinco horas. Posteriormente, as bandejas foram colocadas a 3 cm acima do nível de nitrogênio em caixa de isopor de 40 litros por 15 minutos (-80°C). Em seguida, as palhetas foram imersas em nitrogênio líquido para congelamento, e posteriormente acondicionadas em raques e armazenadas em botijão criogênico.

### **Análise do sêmen**

As amostras de sêmen foram descongeladas em banho-maria a 37°C por 30 segundos e posteriormente, submetidas as análises das características de cinética espermática (CASA), integridade de membrana em fluorescência e integridade de membrana, integridade acrossomal e estabilidade de membrana em citômetro de fluxo.

As características de cinética espermática avaliados foram: motilidade total (%) sendo a população de células móveis totais; motilidade progressiva (%) a porcentagem de células com movimento progressivo; velocidade de trajeto (VAP), a velocidade da trajetória da célula; velocidade retilínea (VSL), velocidade mínima que o espermatozoide percorre entre duas avaliações; velocidade curvilinear (VCL), média da velocidade espermática medida através do percurso real percorrido, amplitude do deslocamento lateral da cabeça (ALH) comprimento médio da oscilação da cabeça do espermatozoide; frequência de batimentos flagelar cruzado (BCF), frequência do movimento lateral de cabeça do espermatozoide cruzando percursos em ambas as direções; retilinearidade (STR) qualidade do movimento retilíneo suavizado, sendo a proporção entre (VSL/VAP); e linearidade (LIN) a qualidade do movimento retilíneo real percorrido, sendo a proporção entre (VSL/VCL).

As avaliações de integridade de membrana em fluorescência foram realizadas por meio da associação das sondas fluorescentes carboxifluoresceína (Sigma, Co., St. Louis, MO,

USA, 6-Carboxyfluorescein diacetate, C5041) e iodeto de propídio (Sigma, Co., St. Louis, MO, USA, Propidium iodide - P4170) em microscópio de fluorescência, sendo avaliadas um total de 100 células.

Para as análises de integridades de membrana, integridade acrossomal e estabilidade de membrana foram utilizadas a combinação das sondas SYBER-14 e iodeto de propídio (Sperm Viability Kit L-7011, Molecular Probes Inc, Eugene, OR, USA) para integridade de membrana plasmática, FITC-PNA (Sigma, Louis, MO, USA) em associação com iodeto de propídio (Molecular Probes, Eugene, OR, USA) para integridade acrossomal, Merocianina 540 (Molecular Probes, Eugene, OR, USA) e Yopro-1 (Molecular Probes, Eugene, OR, USA) para análise de estabilidade de membrana, sendo estas avaliações realizadas em citometria de fluxo.

### **Produção *in vitro* de Embriões**

Foram realizadas seis rodadas de PIVE e a cada fertilização (FIV) foram utilizados os quatro tratamentos avaliados. Foram avaliadas a taxa de clivagem três dias (D3) após a FIV, a taxa de blastocisto sete dias (D7) após a FIV e taxa de eclosão oito (D8) e nove (D9) dias após a FIV. A taxa de blastocisto foi calculada sobre a taxa de clivagem, e taxas de eclosão calculadas sobre a taxa de blastocisto.

### **Composição dos meios**

Para PIVE foram utilizados meios de maturação, fecundação, capacitação e cultivo comerciais.

*Meio de maturação* – Meio TCM 199 com sais de Earle e L-glutamina (Gibco<sup>®</sup>, Invitrogen Co, Grand Island, NY, USA) suplementado com 10% de soro fetal bovino (v/v), 0,2 mM de piruvato, 5 mg/mL de hormônio luteinizante (Lutropin-V<sup>®</sup>, Bioniche Co., Belleville, ON, Canada), 1 mg/mL de hormônio folículo estimulante (Folltropin<sup>®</sup>, Bioniche Co., Belleville, ON, Canada), 75 µg/mL de amicacina e 1 mM de cistamina.

*Meio de fecundação* – TALP-FIV suplementado com 6 mg/mL de albumina sérica bovina (BSA) e livre de ácidos graxos, 0,2 mM de piruvato, 30 µg/mL de heparina, 20 µM de penicilamina, 10 µM de hipotaurina, 1 µM de epinefrina e 75 µg/mL de amicacina.

*Meio CAP* – Meio tamponado Tyrode's HEPES, suplementado com 0,2 mM de piruvato e 75 µg/mL de amicacina.

*Meio de cultivo* – SOFaa<sup>10</sup> suplementado com 2,7 mM de mio-inositol, 0,2 mM de piruvato, 2,5% de soro fetal bovino (v/v), 5 mg/mL de BSA-livre de ácido graxo e 75 µg/mL de amicacina.

### **Seleção de ovócitos e maturação *in vitro***

Ovários bovinos de raças mestiças provenientes de animais do abatedouro Coopercarne, Rio Verde, Goiás com inspeção estadual (SEM), foram colhidos e transportados em garrafas térmicas contendo solução salina fisiológica (NaCL- 0,9%) a 35°C para o laboratório e processados em até 4 horas.

Em laboratório, os ovários obtidos foram lavados com a mesma solução e os complexos cumulus-ovócito (CCO's) aspirados de folículos com 2 a 8 mm de diâmetro com o auxílio de seringas de 10 mL e agulhas 40x12 mm. Logo após, os CCO's foram armazenados em tubos cônicos com capacidade de 15 mL e mantidos em banho-maria a 35°C por 10 minutos para decantação.

Logo após, foi realizado o rastreamento dos ovócitos, segundo Stojkovic et al.<sup>11</sup> por meio da deposição de fluido folicular contendo o pellet com os CCO's em placa de Petri de 35 mm, sobre estereomicroscópio (Lupa, Nikon SMZ745). Grupos de 30 a 35 CCO's com qualidade grau I e II, segundo Stojkovic et al.<sup>11</sup> (ANEXO F), foram lavados e incubados em gotas de 200 µL de meio de maturação (MIV), cobertas com óleo mineral (Sigma, Corning, New York, EUA) em placa de petri de 96x21 mm por 22 a 24 horas em incubadora a 38,8°C em atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> e umidade relativa saturada sem condensação.

### **Fecundação *in vitro***

Após o período de maturação, os CCO's foram lavados em duas gotas do meio de fertilização (FEC) acrescidos de antibióticos (penicilina + estreptomicina) segundo recomendação do fabricante (10 µL para 1 mL de meio FEC). Em seguida, foram transferidos para placas de Petri contendo gotas de 200 µL do mesmo meio, coberto com óleo mineral.



Para fecundação *in vitro* as amostras de sêmen foram descongeladas em banho-maria a 36°C por 30 segundos, sendo avaliada motilidade total (%) >60%, motilidade progressiva (%) e vigor (0-5) em microscópio óptico (Olympus, CX21). As células espermáticas foram selecionadas por centrifugação em gradiente descontínuo de Percoll 90% e 45% e meio de capacitação (CAP).

Para preparo do gradiente de Percoll, foi acondicionado em um microtubo cônico Percoll 90% e sobre este lentamente o Percoll 45% (para evitar que os dois gradientes se misturem) e 1 mL de meio CAP em outro tubo cônico. O sêmen foi colocado lentamente sobre a coluna de Percoll, previamente preparada e submetido à centrifugação de 544,32 G por 5 minutos. Após a centrifugação, o pellet foi retirado e ressuspensionado em 1,0 mL de meio CAP, e então submetido novamente a centrifugação de 168,0 G por 3 minutos. Logo após foi retirado o sobrenadante e acrescentado 50 µL de meio FEC.

Em micro-tubo cônico foi colocado 95 µL de água e acrescentado 5 µL do sêmen ressuspensionado em meio FEC para contagem da concentração espermática em câmara de Neubauer. Logo depois, calculou-se a dose inseminante para ser adicionada às gotas de fecundação para obter a concentração final  $1 \times 10^6$  SPTZ/mL.

### **Cultivo *in vitro* dos embriões**

Os espermatozoides e ovócitos foram incubados por 10 horas a 38,8° C em 5% de CO<sub>2</sub> e umidade relativa saturada sem condensação, sendo o dia da inseminação *in vitro* considerado como dia zero (D0). Os zigotos oriundos de ovócitos fecundados foram lavados e transferidos para gotas de 200 µL do meio de cultivo (CIV) e incubados a 38,8° C em 5% de CO<sub>2</sub> por sete dias. A taxa de clivagem foi avaliada 72 horas após a inseminação (D3), sendo realizada a substituição da metade do meio de cultivo de cada gota. A fase de blastocisto foi observada com sete dias (D7) após a FIV. As taxas de eclosão foram avaliadas oito (D8) e nove (D9) dias após a FIV.

### **Análise Estatística**

Os dados analisados foram distribuídos aleatoriamente em blocos ao acaso, sendo o touro o bloco. Quanto às análises das características de cinética espermática, diferentes antioxidantes e diluentes avaliados, realizou-se transformação logarítmica devido os dados

não apresentarem distribuição normal, e posteriormente foram submetidos ao teste não paramétrico de Friedman ( $P < 0,05$ ).

Para comparação dos percentuais de taxa clivagem, blastocistos e eclosão entre os tratamentos, foi utilizado o teste Qui-Quadrado.

Também realizou-se a análise da estimativa de correlação existente entre as variáveis de qualidade *in vitro* do sêmen e eficiência da produção *in vitro* de embriões bovinos, buscando-se avaliar a associação entre as características, por meio do coeficiente de correlação de Spearman ( $r$ ).

Para interpretação dos coeficientes de correlação existente entre os dados foram considerados como estimativa de correlação de alta magnitude os valores de ( $r=0,90$  e  $0,70$ ), estimativa de correlação de média a moderada magnitude ( $r=0,69$  e  $0,40$ ), estimativa de correlação de baixa magnitude ( $r=0,39$  e  $0,20$ ) e estimativa de correlação de fraca magnitude ( $r=0,19$  e  $0,00$ )<sup>12</sup>.

As análises foram realizadas no programa R Project for Statistical Computing, através do R Project versão 3.2.2<sup>13</sup>.

## RESULTADOS

Na Tabela 1 estão apresentados os valores médios e erro padrão das variáveis espermáticas avaliadas após descongelação de amostras de sêmen criopreservadas com diluentes à base de gema de ovo (Bovimix®) e lecitina de soja (AndroMed®) acrescidos ou não de glutathione.

Observou-se que o diluente Andromed® melhorou as características de cinética espermática do sêmen bovino sem a adição do antioxidante glutathione nas diferentes concentrações avaliadas. A melatonina reduziu a qualidade do sêmen bovino. O diluente Bovimix® proporcionou melhora nos percentuais de linearidade, retilinearidade e nas características de integridade de membrana e integridade acrossomal quando comparado com o diluente Andromed®.

A Tabela 2 apresenta os resultados de taxa de clivagem, taxa de blastocisto e eclosão oito (D8) e nove (D9) dias após a fertilização dos embriões bovinos produzidos *in vitro*, utilizando sêmen criopreservado com diluente à base de lecitina de soja (AndroMed®) e diluente à base de gema de ovo (Bovimix®) com e sem adição de glutathione.

Tabela 1- Valores médios e erro padrão das variáveis espermáticas das amostras de sêmen bovino da raça Holandês criopreservadas com diluentes à base de gema de ovo (Bovimix®) e lecitina de soja (AndroMed®) acrescidos de glutathione em diferentes concentrações (1,5 e 2,5mM), Rio Verde, GO, Brasil, 2017.

| Variáveis  | AC           | AG1,5        | BC           | BG2,5        |
|------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| MT (%)     | 43,67±5,53a  | 40,17±6,42a  | 30,83±4,10a  | 31,17±2,86a  |
| MP (%)     | 28,50±4,72a  | 24,84±4,86a  | 16,17±2,09a  | 17,84±2,13a  |
| VAP (µm/s) | 77,33±1,69a  | 69,38±3,21ab | 60,20±3,55b  | 62,04±1,48b  |
| VSL (µm/s) | 59,05±2,22a  | 54,42±2,84a  | 50,77±3,32a  | 51,91±1,62a  |
| VCL (µm/s) | 154,48±3,31a | 135,63±7,24a | 100,35±4,32b | 102,87±3,16b |
| ALH (µm/s) | 7,65±0,10a   | 7,05±0,40a   | 5,75±0,24b   | 5,60±0,09b   |
| BCF (Hz)   | 24,98±0,20a  | 24,38±0,86a  | 22,57±0,98a  | 23,55±0,59a  |
| STR (%)    | 76,34±1,72b  | 78,50±1,38ab | 83,84±1,64a  | 83,00±1,65a  |
| LIN (%)    | 40,00±1,00b  | 42,17±1,74b  | 52,00±2,78a  | 51,34±1,40a  |
| IMF (%)    | 21,84±4,47a  | 23,84±2,67a  | 27,51±1,93a  | 26,34±3,53a  |
| IM (%)     | 27,94±4,01b  | 37,54±6,72ab | 51,07±2,67a  | 51,54±2,98a  |
| PNA (%)    | 31,15±3,19b  | 38,71±5,17ab | 51,81±2,42a  | 46,85±7,04ab |
| EST (%)    | 20,68±4,61a  | 27,21±7,58a  | 33,95±3,97a  | 23,47±5,84a  |

\*Letras diferentes na mesma linha diferem ( $P < 0,05$ ) pelo teste t. Motilidade total (MT-%), motilidade progressiva (MP-%), velocidade média da trajetória (VAP-µm/s), velocidade linear progressiva (VSL-µm/s), velocidade curvilínea (VCL-µm/s), amplitude de deslocamento lateral da cabeça (ALH-µm/s), frequência de batimentos flagelar cruzado (BCF-Hz), retilinearidade (STR-%), linearidade (LIN-%), integridade de membrana em fluorescência (IMF%), integridade de membrana (IM%), integridade acrossomal (PNA%) e estabilidade de membrana (EST) em citômetro. AC: diluente AndroMed® sem adição de antioxidante (controle), AG1,5: diluente acrescido de 1,5 mM de glutathione, BC: diluente Bovimix® sem adição de antioxidante (controle), BG2,5: diluente acrescido de 2,5 mM de glutathione.

Verificou-se o efeito do uso dos diferentes diluentes de criopreservação sobre a taxa de clivagem, sendo observada diferença entre o tratamento com diluente à base de lecitina de soja (Andromed®) e gema de ovo (Bovimix®). O diluente à base de soja demonstrou maior taxa de clivagem, mas sem diferença entre os tratamentos quanto a taxa de blastocisto e taxa de eclosão oito e nove dias após a FIV.

A adição de glutathione no meio de criopreservação à base de soja (Andromed®) não proporcionou maiores taxa de clivagem. No entanto, a adição de 2,5 mM de glutathione no

meio à base de gema de ovo para criopreservação do sêmen bovino melhorou a taxa de clivagem quando comparado com o tratamento Bovimix® sem adição de glutathione.

Quanto às taxas de blastocisto e eclosão oito e nove dias após a FIV, não foi observada diferença nos tratamentos avaliados.

TABELA 2 – Valores percentuais de taxa de clivagem (TC), taxa de blastocisto (TB) e taxa de eclosão oito (TE - D8) e nove (TE – D9) dias após a fertilização, com sêmen bovino da raça Holândes criopreservado com diluente à base de lecitina de soja (AndroMed®) e à base de gema de ovo (Bovimix®), com e sem a adição de glutathione em diferentes concentrações, Rio Verde, GO, Brasil, 2017.

| Grupos | Nº de Ovócitos | TC (%)            | TB (%)           | TE - D8         | TE - D9         |
|--------|----------------|-------------------|------------------|-----------------|-----------------|
| BC     | 484            | 35,12 (170/484) c | 35,29 (60/170) a | 36,67 (22/60) a | 46,67 (28/22) a |
| BG2,5  | 508            | 43,31 (220/508) b | 30,45 (67/220) a | 41,79 (28/67) a | 44,78 (30/28) a |
| AC     | 489            | 51,33 (251/489) a | 37,45 (94/251) a | 42,55 (40/94) a | 47,88 (45/40) a |
| AG1,5  | 502            | 52,99 (266/502) a | 34,96 (93/266) a | 40,86 (38/93) a | 50,54 (47/38) a |

\* Letras distintas na mesma coluna diferem entre si ( $P < 0,05$ ) pelo teste Qui-quadrado. Bovimix® controle, Bovimix® acrescido de 2,5 mM de glutathione, AndroMed® controle, AndroMed® acrescido de 1,5 mM de glutathione.

Na Tabela 3, estão apresentados os valores de correlação entre os parâmetros de cinética espermática do sêmen bovino e das integridades celulares realizadas em citômetro, bem como a taxa de clivagem, taxas de blastocisto e eclosão oito (D8) e nove (D9) dias após a FIV.

Verificou-se estimativa de correlação significativa, positiva, de moderada magnitude entre as características de velocidade (VAP, VCL e ALH) e taxa de clivagem. As variáveis LIN, IM e PNA apresentaram correlação significativa, negativa, de moderada magnitude com a taxa de clivagem. Quanto as taxas de blastocisto e eclosão oito (D8) e nove (D9) dias após a FIV, não foi observado correlação com as características espermáticas avaliadas.

TABELA 3 – Estimativas de correlação e intervalo de confiança entre as diferentes variáveis espermáticas do sêmen bovino com a taxa de clivagem, taxa de blastocisto e eclosão oito (D8) e nove (D9) dias após a FIV, Rio Verde, GO, Brasil, 2017.

| Variáveis  | Taxa de clivagem        | Taxa de Blastocisto    | Taxa de eclosão        |                        |
|------------|-------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|
|            |                         |                        | D8                     | D9                     |
| <b>MT</b>  | 0.278 (-0.105;0.590)    | 0.091 (-0,291;0,448)   | - 0.107 (-0,462;0,276) | - 0.235 (-0,559;0,150) |
| <b>MP</b>  | 0.3712 (-0,002;0,653)   | 0.124 (-0,261;0,475)   | - 0.048 (-0,413;0,330) | - 0.165 (-0,507;0,221) |
| <b>VAP</b> | 0.433* (0,071;0,694)    | 0.155 (-0,230;0,499)   | 0.136 (-0,248;0,485)   | 0,081 (-0,300;0,441)   |
| <b>VSL</b> | 0.325 (-0,053;0,623)    | 0.213 (-0,173;0,543)   | 0.091 (-0,291;0,449)   | 0.030 (-0,346;0,399)   |
| <b>VCL</b> | 0.506* (0,164;0,739)    | 0.096 (-0,286;0,453)   | 0.135 (-0,250;0,484)   | 0.943 (-0,288;0,451)   |
| <b>ALH</b> | 0.483* (0,134;0,725)    | 0.020 (-0,354;0,390)   | 0.187 (-0,199;0,523)   | 0.112 (-0,271;0,466)   |
| <b>BCF</b> | 0.255 (-0,129;0,573)    | - 0.128 (-0,478;0,257) | 0.113 (-0,271;0,466)   | 0.100 (-0,283;0,456)   |
| <b>STR</b> | - 0.358 (-0,645;0,016)  | 0.100 (-0,283;0,456)   | - 0.204 (-0,536;0,182) | -0,122 (-0,474;0,262)  |
| <b>LIN</b> | - 0.452*(-0,706;0,095)  | 0.021 (-0,354;0,391)   | - 0.087 (-0,446;0,295) | - 0,053 (-0,418;0,325) |
| <b>IMF</b> | - 0.330 (-0,626;0,048)  | 0.345 (-0,031;0,636)   | - 0.030 (-0,399;0,346) | - 0,018 (-0,389;0,357) |
| <b>IM</b>  | - 0.421* (-0,686;0,057) | 0.057 (-0,322;0,421)   | - 0.191 (-0,527;0,195) | - 0,283 (-0,593;0,100) |
| <b>PNA</b> | - 0.420* (-0,685;0,055) | - 0.091 (-0,449;0,291) | - 0.182 (-0,520;0,204) | - 0,103 (-0,458;0,280) |
| <b>EST</b> | -0.128 (-0,478;0,256)   | 0.093 (-0,289;0,450)   | - 0.136 (-0,487;0,249) | - 0,152 (-0,497;0,233) |

\* Correlação de Pearson entre as características espermáticas e taxas de desenvolvimento embrionário ( $P < 0,05$ ). Motilidade total (MT-%), motilidade progressiva (MP-%), velocidade média da trajetória (VAP- $\mu\text{m/s}$ ), velocidade linear progressiva (VSL- $\mu\text{m/s}$ ), velocidade curvilínea (VCL- $\mu\text{m/s}$ ), amplitude de deslocamento lateral da cabeça (ALH- $\mu\text{m/s}$ ), frequência de batimentos flagelar cruzado (BCF-Hz), retilinearidade (STR-%), linearidade (LIN-%), integridade de membrana em fluorescência (IMF%), integridade de membrana (IM%), integridade acrossomal (PNA%) e estabilidade de membrana (EST) em citômetro de fluxo.

## DISCUSSÃO

O diluente Andromed<sup>®</sup> melhorou as variáveis de cinética espermática do sêmen bovino e proporcionou maior taxa de clivagem sem adição do antioxidante glutatona nas duas concentrações avaliadas. Porém, não houve diferença entre os diferentes tratamentos avaliados para as taxas de blastocisto e eclosão oito e nove dias após a fertilização.

Verificou-se que o diluente à base de lecitina de soja proporcionou bons resultados quanto a viabilidade espermática do sêmen bovino, podendo assim ser realizada a substituição do diluente à base de gema de ovo por meios à base de soja. Aires et al.<sup>14</sup> também ressaltaram que a criopreservação do sêmen bovino pode ser realizada com diluente a base de soja em substituição a gema de ovo. Com relação ao uso de diferentes diluentes na PIVE, não foi observado diferença entre os mesmos quanto à taxa de clivagem, sendo necessários maiores estudos quanto ao uso de diluentes livres de produtos de origem animal na produção de embriões bovinos *in vitro*<sup>18</sup>.

O diluente Andromed<sup>®</sup> foi melhor na manutenção das características de cinética espermática do sêmen bovino e resultou em maior taxa de clivagem quando comparado com o diluente à base de gema de ovo, devido os maiores percentuais de velocidade das amostras criopreservadas com o diluente Andromed<sup>®</sup> e correlação dessas características com a taxa de fertilização.

Como as amostras de sêmen apresentaram altas velocidades, pode ser um indicativo de que o meio à base de soja proporcionou hiperativação das células espermáticas<sup>15</sup>. Esta característica é positiva para a produção *in vitro* de embriões, uma vez que os espermatozoides são depositados juntamente aos ovócitos maturados e aptos a fertilização. Assim, o mesmo não pode ser transposto para a fertilização *in vivo*, que necessita de maior tempo de vida útil dos espermatozoides para a fertilização, uma vez que esse tempo é reduzido quando há hiperativação devido ao maior metabolismo das células.

Comprovou-se que o uso de diferentes diluentes de criopreservação testados tiveram efeito sobre a taxa de clivagem, sendo observado diferença entre o tratamento com diluente à base de lecitina de soja (Andromed<sup>®</sup>) e gema de ovo (Bovimix<sup>®</sup>). O diluente à base de lecitina de soja demonstrou maior taxa de clivagem, mas sem diferença entre os tratamentos quanto a taxa de blastocisto e taxa de eclosão oito (D8) e nove (D9) dias após a FIV.

Resultado semelhante foi observado por Prado et al.<sup>16</sup> que não observaram diferença entre os diluidores testados, Andromed<sup>®</sup> e a base de gema de ovo, sobre a taxa de blastocisto em bovinos. Forouzanfar et al.<sup>17</sup> observaram maiores taxas de clivagem com sêmen ovino no

grupo tratado com lecitina, ressaltando que a mesma pode ser utilizada para a substituição da gema de ovo nos diluidores de amostras de sêmen para a PIVE.

Nabiev et al.<sup>18</sup> comparando o uso do diluente Andromed<sup>®</sup> e à base de gema de ovo, não observaram diferença no resultado da PIVE. Quanto as taxas de blastocisto e eclosão não foi observado diferença entre os diferentes diluentes avaliados neste estudo, resultado semelhante ao observado por Rodrigues<sup>19</sup> que não observou diferença entre o diluente à base de gema de ovo e lecitina de soja sobre as taxas de clivagem. A taxa de blastocisto e eclosão demonstrou resultado semelhante ao presente estudo.

Valente et al.<sup>20</sup> observaram melhor percentual de motilidade, termorresistência e fertilidade *in vitro* e *in vivo*, em amostras seminais criopreservadas com diluente à base de soja. Já Crespilho et al.<sup>21</sup> observaram que as amostras de sêmen bovino criopreservadas com diluente Tris-frutose (com 20% de gema de ovo) apresentaram maiores taxas de concepção (59,26%) do que Botubov<sup>®</sup> (com 20% de gema de ovo) e Botubov<sup>®</sup>-L (1% de lecitina de soja).

Foi notado neste trabalho uma taxa média de clivagem de 51,33% para o tratamento à base de lecitina de soja, e 35,12% para o tratamento à base de gema de ovo. Semelhante ao observado por Coelho et al.<sup>22</sup> que obtiveram taxa média de clivagem mais baixa quando utilizaram diluente a base de gema de ovo (54,50% e 66,58%).

Quanto ao acréscimo do antioxidante glutathiona no meio à base de soja (Andromed<sup>®</sup>), não foi verificado maiores taxas de clivagem. No entanto, a adição de 2,5 mM de glutathiona no meio Bovimix<sup>®</sup> para criopreservação de sêmen bovino melhorou a taxa de clivagem quando comparado com o tratamento controle.

Também não foi verificada diferença entre a taxa de blastocisto e taxas de eclosão entre os diferentes tratamentos avaliados. Entretanto, houve aumento no número de embriões no tratamento com glutathiona a 2,5 mM em relação ao tratamento controle no mesmo diluente, resultado este representativo numericamente quanto ao resultado biológico de prenhez, considerando que as taxas de prenhez de receptoras bovinas com embriões produzidos *in vitro* variam de 30 a 51%<sup>23</sup>. Contrário ao observado por Borges<sup>26</sup> que verificou maior taxa de blastocisto no tratamento acrescido com antioxidante trolox, em relação ao diluente Tris-gema sem antioxidante, não sendo verificada diferença quanto a taxa de clivagem.

Simões et al.<sup>25</sup> ressaltaram que o sêmen bovino é resistente as alterações causadas na membrana durante os procedimentos realizados na criopreservação e na PIVE. Porém, os danos causados nas membranas resultam em modificações na cromatina e DNA da célula não

bloqueando a fecundação *in vitro*, e também não alterando a taxa de clivagem. No entanto, após as primeiras clivagens, induz a apoptose das células com baixa taxa de blastocisto. Podendo essas alterações terem ocorrido nas amostras utilizadas neste estudo, pois a concentração do antioxidante estudado não teve efeito positivo na proteção das células espermáticas contra as EROS, resultando em baixa taxa de blastocisto.

Há um aumento da resistência da cromatina espermática quando suplementado com antioxidantes, resultando em maior produção de embriões, sugerindo que a estrutura da cromatina possui relação direta aos índices da PIVE<sup>27</sup>. Gonçalves et al.<sup>28</sup> ressaltaram que a suplementação com antioxidantes nos diluentes mantém a qualidade espermática garantindo o desenvolvimento embrionário até o estágio de blastocisto.

Alguns estudos ressaltaram que durante o processo de fertilização as células espermáticas estão aptas a realizarem a capacitação. Porém há produção de EROS pela presença de oxigênio causando a redução do desenvolvimento embrionário. Além disso, a capacitação das células espermáticas induzido para a FIV leva a produção de EROS e a fragmentação do DNA dos zigotos com redução da integridade dos blastocistos produzidos *in vitro*<sup>29</sup>.

Além dos procedimentos de separação das células por meio da centrifugação necessários na PIVE, há também a manipulação dos embriões nos diferentes momentos que resultam em mudanças no ambiente térmico, alterações na quantidade de oxigênio entre o meio e a placa com ovócitos. Sendo o ambiente adequado em torno de 5% de CO<sub>2</sub> diferente do ambiente atmosférico, em torno de 20%, podendo todos esses fatores resultarem também em baixas taxas de desenvolvimento embrionário.

No entanto, pode ser verificado que o acréscimo de glutatona no diluente à base de soja não possibilitou maiores taxas de fertilização. Porém, quando adicionado ao meio à base de gema na concentração de 2,5 mM possibilitou maior taxa de clivagem.

Em estudo realizado sobre o efeito da indução do estresse oxidativo nas amostras de sêmen sobre o desenvolvimento embrionário, foi observado efeito do estresse oxidativo sobre a baixa taxa de clivagem, sendo verificado que quanto maior as doses de peróxido de hidrogênio na criopreservação do sêmen, maior redução da motilidade com consequente baixa taxa de fertilidade<sup>30</sup>.

As avaliações das características de cinética espermática, integridade celular bem como a correlação entre essas características com a fertilização são importantes tanto para a inseminação artificial como para produção *in vitro* de embriões, pois predizem, a curto prazo, o potencial fertilizante de uma partida de sêmen<sup>31</sup>. Enquanto, os testes *in vivo* possuem custo



elevado, exige grande número de fêmeas para inseminação, mão de obra qualificada e demanda longo período de tempo.

Embora tenha sido crescente o desenvolvimento de técnicas e equipamentos para possivelmente identificar com maior acurácia estruturas e funções espermáticas<sup>19</sup>, ainda é importante afirmar que o método de predição da fertilidade das amostra de sêmen *in vitro* não é simples, considerando vários fatores dependentes do indivíduo e do próprio espermatozoide, bem como a forma de processamento do sêmen e avaliação<sup>16</sup>. Dessa forma, estas estimativas do potencial de fertilidade do sêmen são difíceis, principalmente pela heterogeneidade do ejaculado, devido as diferentes características funcionais do mesmo, que podem contribuir para processo de fecundação<sup>32</sup>.

Neste estudo, observou-se que as características espermáticas VAP, VCL e ALH, tiveram correlação positiva de moderada magnitude com a taxa de clivagem, enquanto os parâmetros LIN, IM e PNA apresentaram correlação negativa de moderada magnitude com a taxa de clivagem. Quanto as taxas de blastocisto e eclosão oito (D8) e nove (D9) dias após a FIV, não foi observada correlação significativa entre as variáveis avaliadas. Contrário ao observado por Bertozzo et al.<sup>33</sup> que verificaram alta correlação entre o número de células íntegras e taxa de formação de pró-núcleos.

Corroborando com os resultados deste estudo, Verstegen et al.<sup>15</sup> verificaram que as características VCL e VSL, bem como o número total de espermatozoides demonstraram correlação positiva com a taxa de concepção. Os valores de VAP, VCL e VSL, foram maiores em amostras que produziram mais de 50% de ovócitos fertilizados.

Pode-se verificar que a avaliação *in vitro* da qualidade do sêmen não é o melhor método de predição da fertilidade do mesmo na PIVE, uma vez que se observou correlações significativas de baixa e moderada magnitude entre alguns parâmetros espermáticos do sêmen e taxa de fertilização.

Com o crescente avanço do desenvolvimento tecnológico ocorrido nos últimos anos com relação as técnicas empregadas na PIVE, criam-se oportunidades da entrada de patógenos nos sistemas. Assim faz-se necessárias boas práticas de colheita, técnicas laboratoriais adequadas durante o processamento e armazenamento das amostras. Isso porque durante os procedimentos realizados, há contaminação por diversos fatores, uma vez que o muco prepucial possui rica microbiota, além de microrganismos oportunistas, sendo risco potencial para contaminação do sêmen. Também é importante ressaltar que os meios de cultivo utilizados durante a FIV são ricos em nutrientes e tornam-se propícios ao desenvolvimento de contaminantes.

Deste modo, é necessário a adição de antibióticos aos meios de fertilização conforme foi realizada neste estudo. No entanto, Piccolomini et al.<sup>34</sup> citaram que o uso de antibióticos resulta em baixa taxa de clivagem e blastocisto, assim como foi verificado neste estudo, não havendo diferença entre os tratamentos avaliados. Este efeito pode ser em decorrência do acréscimo de antibióticos ao meio de fertilização, resultando provavelmente em baixa taxa de clivagem, blastocisto e eclosão oito (D8) e nove (D9) dias após a FIV. Pode-se também verificar que há efeito touro, partida de sêmen e dos tipos de ovários utilizados (vacas mestiças) sobre as taxas de desenvolvimento embrionário.

O diluente Andromed<sup>®</sup> proporciona melhor manutenção das características espermáticas e maior taxa de clivagem quando comparado com o diluente a base de gema de ovo, sem a necessidade de adição de antioxidantes. E há correlação entre as características espermáticas e as características de integridade celular. Porém de baixa magnitude, sendo necessário realizar outras análises, como a avaliação da taxa de concepção dos rebanhos.

## CONCLUSÃO

O diluente à base de lecitina de soja foi mais eficiente para produção *in vitro* de embriões bovinos por proporcionar maior número de ovócitos fertilizados, sem a necessidade da adição de glutathione neste diluente. A adição de 2,5 mM de glutathione no diluente à base de gema de ovo proporcionou maior taxa de clivagem na produção *in vitro* de embriões bovinos.

A avaliação *in vitro* da qualidade do sêmen não é o melhor método para prever o potencial fertilizante do mesmo na PIVE, uma vez que só foram observadas correlações significativas de baixa a moderada magnitude entre algumas variáveis de qualidade do sêmen e taxa de fertilização.

Recomenda-se o uso das avaliações de cinética espermática para a inseminação artificial e análises de integridade de membrana celular para a produção *in vitro* de embriões.

## REFERÊNCIAS

1. Buratini Jr J. Foliculogênese em bovinos. In: In: II Simpósio Internacional de Reprodução Animal Aplicada. Londrina PR; 2006. p. 55–62.
2. Varago FC, Mendonça LF, Lagares MA. Produção *in vitro* de embriões bovinos:

- estado da arte e perspectiva de uma técnica em constante evolução. *Rev Bras Reprod Anim.* 2008; 32:100–9.
3. Gonçalves PBD, Figueredo JR, Freitas VJF. *Biotécnicas Aplicadas à Reprodução Animal*. 2nd ed. Roca, editor. São Paulo; 2008. 395 p.
  4. Fickel J, Wagener A, Ludwig A. Semen cryopreservation and the conservation of endangered species. *Eur J Wildl Res.* 2007; 53(2):81–9.
  5. Stradaioli G, Noro T, Sylla L, Monaci M. Decrease in glutathione (GSH) content in bovine sperm after cryopreservation: comparison between two extenders. *Theriogenology* [Internet]. 2007; 67(7):1249–55.  
Available from: <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2007.01.009>
  6. Pugliesi G, De Carvalho GR, Rates DM, Ker PG, Da Matta MP, Oliveira RR, Filho JMS. Viability and fertility of cooled equine semen diluted with skimmed milk or glycine egg yolk-based extenders. *R Bras Zootec* [Internet]. 2012; 41(12):2411–7.  
Available from: <http://dx.doi.org/10.1590/S1516-35982012001200005>
  7. Agarwal A, Said TM. Oxidative stress, DNA damage and apoptosis in male infertility: A clinical approach. *BJU Int.* 2005; 95(4):503–7.
  8. Shah N, Singh V, Yadav HP, Verma M, Chauhan DS, Saxena A, Yadav S, Swain DK. Effect of reduced glutathione supplementation in semen extender on tyrosine phosphorylation and apoptosis like changes in frozen thawed Haryana bull spermatozoa. *Anim Reprod Sci.* 2017; 182:111–22.
  9. Gilbert I, Macaulay ARC. Competência no desenvolvimento oocitário e qualidade embrionária: melhoria e novas perspectivas. In: *Reunião anual da Sociedade Brasileira de Tecnologias de Embrião: Anais.* 2015. p. 76–87.
  10. Holm P, Booth PJ, Schmidt MH, Greve T, Callesen H. High bovine blastocyst development in a static in vitro production system using SOFaa medium supplemented with sodium citrate and myo-inositol with or without serum-proteins. *Theriogenology.* 1999; 52(4):683–700.
  11. Stojkovic M. Mitochondrial distribution and adenosine triphosphate content of bovine oocytes before and after in vitro maturation: correlation with morphological criteria and developmental capacity after in vitro fertilization and culture. *Biol Reprod* [Internet]. 2001; 64(3):904–9.  
Available from: <http://www.biolreprod.org/content/64/3/904.abstract>
  12. Silvia S. Interpretação do coeficiente de correlação [Internet]. 2011. Available from: <http://www.leg.ufpr.br/~silvia/CE055/node102.html>
  13. R Project. R Foundation for Statistical Computing [Internet]. Austria; 2015. Available from: <http://www.r-project.org/>
  14. Aires VA, Hinsch KD, Mueller-Schloesser F, Bogner K, Mueller-Schloesser S, Hinsch E. In vitro and in vivo comparison of egg yolk-based and soybean lecithin-based extenders for cryopreservation of bovine semen. *Theriogenology* [Internet]. 2003; 60(2):269–79.  
Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S00933691X02013699>

15. Verstegen J, Iguer-Ouada M, Onclin K. Computer assisted sêmen analyzers in andrology research and veterinary practice. *Theriogenology* [Internet]. 2002; 57(1):149–79. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11775967>
16. Prado RB, Koivisto MB, Carreira JT, Perri SH V, Rodrigues LH, Netto HA, Torregrossa TLG, Vicente WRR, Feliciano MAR. Efeito da utilização de diferentes diluidores para a produção in vitro de embriões bovinos. *Arq Bras Med Vet e Zootec*. 2012; 64(5):1118–26.
17. Forouzanfar M, Sharafi M, Hosseini SM, Ostadhosseini S, Hajian M, Hosseini L, Abedi P, Nili N, Rahmani HR, Nasr-Esfahani MH. In vitro comparison of egg yolk-based and soybean lecithin-based extenders for cryopreservation of ram semen. *Theriogenology*. 2010; 73(4):480–7.
18. Nabiev D, Gilles M, Schneider H, Mahabir E, Wimmers K, Ponsuksili S, Schellander HK. Comparison of Andromed® and Trisegg yolk extender bovine post-thaw sperm function parameters and in vitro fertility. *Theriogenology* [Internet]. 2003; 1:226. Available from: <http://www.fcav.unesp.br/download/pgtrabs/ra/m/3711.pdf>
19. Florez-Rodriguez SA, Arruda RP, Bianchi-Alves MR, Affonso FJ, Carvalho HF, Lemes KM, Lançon R, De Andrade AFC, Celeghini ECC. Morphofunctional characterization of cooled sperm with different extenders to use in equine-assisted reproduction. *J Equine Vet Sci* [Internet]. 2014; 34(7):911–7. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jevs.2014.04.007>
20. Valente SS, Pereira RM, Baptista MC, Marques CC, Vasques MI, Silva Pereira MV, Horta AE, Barbas JP. In vitro and in vivo fertility of ram semen cryopreserved in different extenders. *Anim Reprod Sci*. 2010; 117:74–5.
21. Crespilho AM, Sá Filho MF, Dell'Aqua JA, Nichi M, Monteiro GA, Avanzi BR, Martins A, Papa FO. Comparison of in vitro and in vivo fertilizing potential of bovine semen frozen in egg yolk or new lecithin based extenders. *Livest Sci* [Internet]. 2012; 149(1–2):1–6. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.livsci.2012.05.011>
22. Coelho LA, Esper CR, Garcia JM, Vantini R, Junior ILA. Fecundação in vitro de oócitos bovinos com sêmen submetido a diferentes diluidores. *Rev Bras Zootec*. 2000; 29(2):397–404.
23. Andrade GA, Fernandes MA, Knychala RM, Bonato GL, Santos RM. Fatores que afetam a taxa de prenhez de receptoras de embriões bovinos produzidos in vitro. *Rev Bras Reprodução Anim*. 2012; 36(1):66–9.
24. Zullo G, Alberio G, Neglia G, De Canditiis C, Bifulco G, Campanile G, Gasparrini B. L-ergothioneine supplementation during culture improves quality of bovine in vitro-produced embryos. *Theriogenology*. 2016;85:668–97.
25. Simões R, Feitosa WB, Siqueira AFP, Nichi M, Paula-Lopes FF, Marques MG, Peres MA, Barnabe VH, Visintin JA, Assumpção ME. Influence of bovine sperm DNA fragmentation and oxidative stress on early embryo in vitro development outcome. *Reproduction*. 2013; 146(5):433–41.
26. Borges JC. Efeito da utilização de antioxidante no diluidor para a criopreservação de sêmen bovino avaliado através de testes complementares, inseminação artificial e

fecundação in vitro. [Tese], Unesp, 2008;70.

27. Gadea J, Gumbao D, Cánovas S, García-Vázquez FA, Grullón LA, Gárdon JC. Supplementation of the dilution medium after thawing with reduced glutathione improves function and the in vitro fertilizing ability of frozen-thawed bull spermatozoa. *Int J Androl* [Internet]. 2007;31(1):40–9. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18190425>
28. Gonçalves FS, Barretto LS, Arruda RP, Perri SH, Mingoti G. Effect of antioxidants during bovine in vitro fertilization procedures on spermatozoa and embryo development. *Reprod Domest Anim* [Internet]. 2010; 45(1):129–35. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18992086>
29. Kato Y, Nagao Y. Changes in Sperm Motility and Capacitation Induce Chromosomal Aberration of the Bovine Embryo following Intracytoplasmic Sperm Injection. *PLoS One* [Internet]. 2015; 10(6). Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26061876>
30. Castro LS. Efeito do estresse oxidativo no espermatozoide e relação com o desenvolvimento embrionário. [Dissertação], Universidade de São Paulo; 2014, 65f.
31. Graham JK, Móce E. Fertility evaluation of frozen/thawed semen. *Theriogenology*. 2005; 64(3):492–504.
32. Martínez-rodríguez H. Can we increase the estimative value of semen assessment? *Reprod Domest Anim*. 2006; 41(2):2–10.
33. Bertozzo BR, Shiroma MYM, Zúccari CESN. Efeito da adição de colesterol ao meio de incubação do sêmen bovino congelado sobre a integridade das membranas plasmática e acrossomal. In: X Encontro Iniciação Científica UFMS, Campo Grande. Anais...X Encontro Iniciação Científica UFMS, 2009.
34. Piccolomini MM, Goes AC, Castroxo M, Miyashiro S, Nassar AFC, Angelo MD. Alterações na morfologia e na viabilidade no desenvolvimento de embriões bovinos fecundados in vitro com sêmen contaminado experimentalmente à *Escherichia coli* produtora da toxina Shiga stx2. *Arq Inst Biol*. 2015; 82:1–6. Available from: <http://dx.doi.org/10.1590/1808-1657000052013>

## CAPÍTULO 4 – CONSIDERAÇÕES FINAIS

O diluente à base de lecitina de soja proporcionou melhor manutenção das características de cinética espermática do sêmen bovino resultando em maior produção *in vitro* de embriões bovinos.

Em um primeiro momento o objetivo foi avaliar a adição dos diferentes antioxidantes glutathione e melatonina em diluentes à base de gema de ovo e lecitina de soja sobre a qualidade do sêmen bovino pós-descongelamento. Foi verificado que o antioxidante glutathione não demonstrou melhora na manutenção da viabilidade espermática do sêmen bovino criopreservado. O diluente Andromed<sup>®</sup> demonstrou melhores resultados quanto aos parâmetros de cinética espermática do sêmen bovino e o diluente Bovimix<sup>®</sup> foi mais eficiente na manutenção dos parâmetros de integridade de membrana (IM), integridade acrossomal (PNA) e estabilidade de membrana (EST). Foi observada também correlação significativa de moderada a alta magnitude entre os parâmetros de cinética espermática, bem como entre os parâmetros de integridade celular. Entretanto, foi observada correlação significativa de baixa magnitude entre as características de cinética espermática e integridade de membrana.

Na segunda fase, o objetivo foi avaliar a eficiência da produção *in vitro* de embriões bovinos, utilizando sêmen criopreservado com diluente à base de gema de ovo (Bovimix<sup>®</sup>) e lecitina de soja (AndroMed<sup>®</sup>) acrescidos ou não com antioxidante glutathione. E pode-se observar que o diluente Andromed<sup>®</sup> foi mais eficiente quanto a taxa de clivagem, não havendo efeito da adição do antioxidante glutathione neste diluente. Entretanto, a adição de 2,5mM de glutathione no diluente à base de gema de ovo melhorou a taxa de clivagem. Pode-se também verificar correlação significativa de baixa magnitude entre a taxa de clivagem e as características de cinética espermática.

Conforme demonstrados nos resultados obtidos neste estudo, é essencial a realização das análises das características de cinética espermática do sêmen bovino, bem como as avaliações de integridade de membrana celular, pois constatou-se correlação de baixa magnitude entre as características de cinética e de integridade de membrana, sendo necessário a realização de todas análises para melhor predizer a capacidade fecundante das amostras de sêmen a serem utilizadas.

Também foi observado que as amostras de sêmen criopreservadas com diluente à base de soja (AndroMed<sup>®</sup>) apresentaram altas velocidades sendo indicativo de que o meio à base de soja proporcionou hiperativação das células espermáticas, sendo esta característica positiva para a produção *in vitro* de embriões. Não podendo ser transposto para a fertilização *in vivo*,

pois é necessário maior tempo de vida útil dos espermatozoides para a fertilização, e esse tempo é reduzido quando há hiperativação devido ao maior metabolismo das células. Podendo o diluente à base de gema de ovo apresentar melhores resultados na fertilização *in vivo*.

No entanto, ainda são necessárias novas pesquisas quanto ao uso de diferentes diluidores e demais antioxidantes na criopreservação com ênfase na produção *in vitro* de embriões e até mesmo acréscimo de antioxidantes aos meios de maturação dos possíveis embriões buscando melhores taxas de desenvolvimento embrionário.

## ANEXO A: PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA



INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA  
E TECNOLOGIA GOIANO - IF GOIANO  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA, PÓS-GRADUAÇÃO E INOVAÇÃO  
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS DO IF GOIANO – CEUA IF GOIANO

### RESOLUÇÃO DA COMISSÃO

#### APROVADO:

A Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA IF Goiano, na sua reunião de **21/10/2014**, **APROVOU** os procedimentos éticos apresentados neste Protocolo 011/2014, projeto intitulado **Adição de glutathione ao diluente de criopreservação e relação da qualidade do sêmen com a produção *in vitro* de embriões bovinos.**

Pesquisador responsável: Karen Martins Leão

Coordenadora - CEUA IF Goiano



**ANEXO B: EQUIPAMENTO IVOS - CASA (COMPUTER ASSISTED SPERM ANALYSIS), LÂMINA DE LEITURA E CAMPO DE IMAGEM COM ALGUNS PADRÕES DE MOVIMENTO.**

Fonte: Arquivo pessoal (2017)



Figura 1: Equipamento CASA



Figura 2: Lâmina de leituta

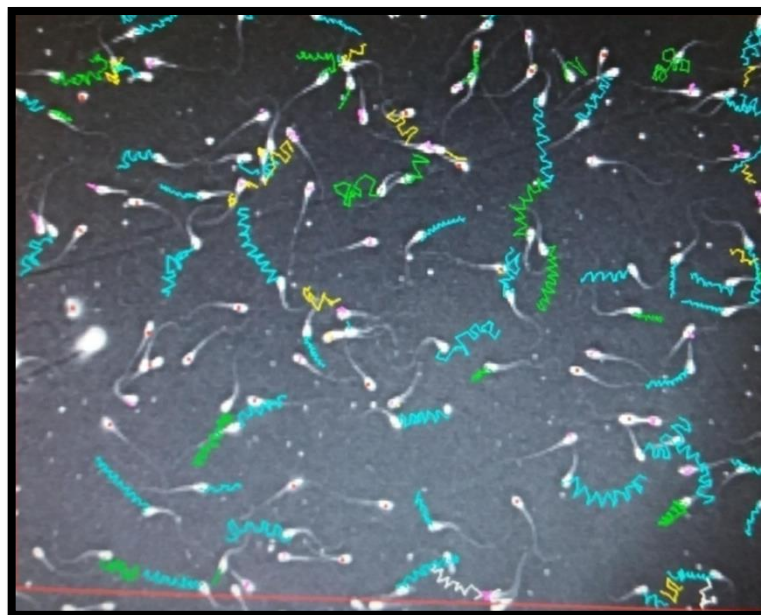


Figura 3: Campo de visão contendo espermatozoides

## **ANEXO C: PROTOCOLOS DOS CORANTES UTILIZADOS NAS ANÁLISES DE FLUORESCÊNCIA**

- **Soluções stock:**

- ✓ **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.

- **Solução Trabalho:**

- ✓ **Solução 1** - 20 µL
- ✓ **Solução 2** – 10 µL
- ✓ **Solução 3** – 10 µL
- ✓ **Solução 4** – 960 µL

**OBS:** Sendo deste total retirado 40 µL/amostra a ser avaliada.

- **Confecção das lâminas:**

- ✓ Amostra de sêmen: 10 µL adicionada em 40 µL da solução trabalho.

## **ANEXO D: PROTOCOLOS DOS CORANTES UTILIZADOS NAS ANÁLISES DO CITÔMETRO DE FLUXO**

- Citrato de Sódio 3% → Solução tampão;
- Solução de Hoechst 33342 → 2,5mL de Citrato de sódio 3% + 1µL Hoechst 33342;

### **Concentrações dos corantes:**

- ✓ Hoechst 33342 (5mg/mL);
- ✓ Iodeto de Propídeo (0,5mg/mL) – usado no PNA;
- ✓ Iodeto de Propídeo (2mg/mL) – usado no Syber;
- ✓ Syber Green (100nM/mL);
- ✓ Merocianina 540 1mM/mL;
- ✓ YoPro1 25µM/mL;

### **Protocolos das soluções de trabalho:**

- Para avaliação Integridade de Membrana Plasmática:
  - ✓ 333µL Citrato de sódio 3%
  - ✓ 166µL Solução de Hoechst 33342
  - ✓ 0,5µL Syber
  - ✓ 2,5µL IP
  - ✓ 10min incubação 37°C
- Para avaliação de integridade acrossomal:
  - ✓ FITC-PNA + IP
  - ✓ 100µL Citrato de sódio 3%
  - ✓ 1,5 µL PNA
  - ✓ 1 µL IP
  - ✓ 33 µL Solução de Hoechst 33342
  - ✓ 10min incubação 37°C

- Para avaliação de estabilidade de membrana:
  - ✓ 5mL Citrato de sódio 3%
  - ✓ 1 µL YoPro1
  - ✓ 2,6 µL Merocianina 540
  - ✓ 1,666 mL Solução de Hoechst 33342
  - ✓ 10min incubação 37°C

**ANEXO E – GRÁFICO DAS AVALIAÇÕES DE INTEGRIDADE DE MEMBRANA, INTEGRIDADE ACROSSOMAL E ESTABILIDADE DE MEMBRANA REALIZADAS EM CITÔMETRO DE FLUXO**

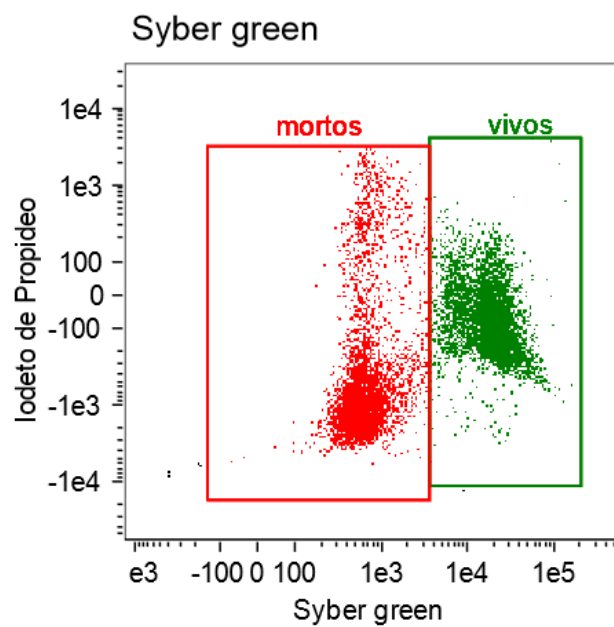


Figura 4: Análise de integridade de membrana plasmática do sêmen bovino.

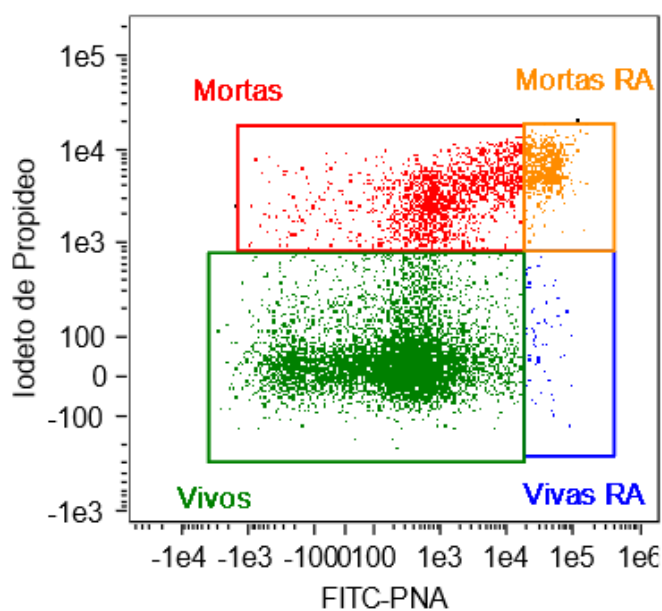


Figura 5: Análise de integridade acrossomal do sêmen bovino.

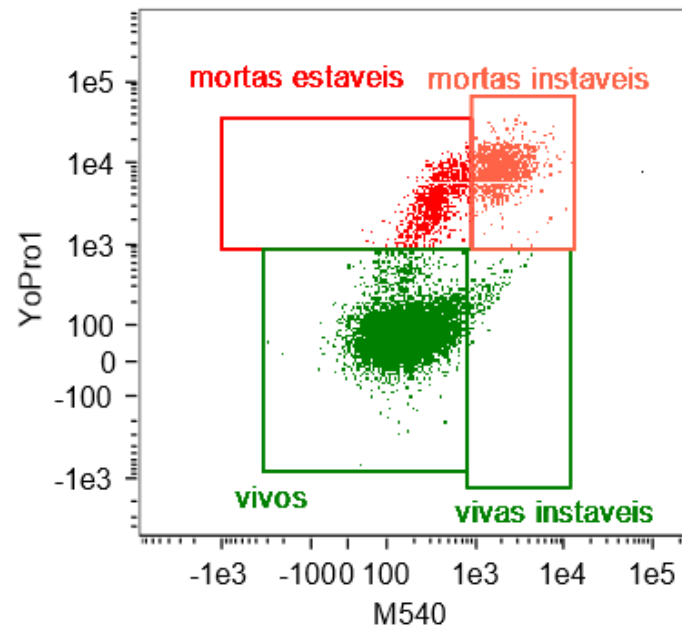


Figura 6: Análise de estabilidade de membrana do sêmen bovino.

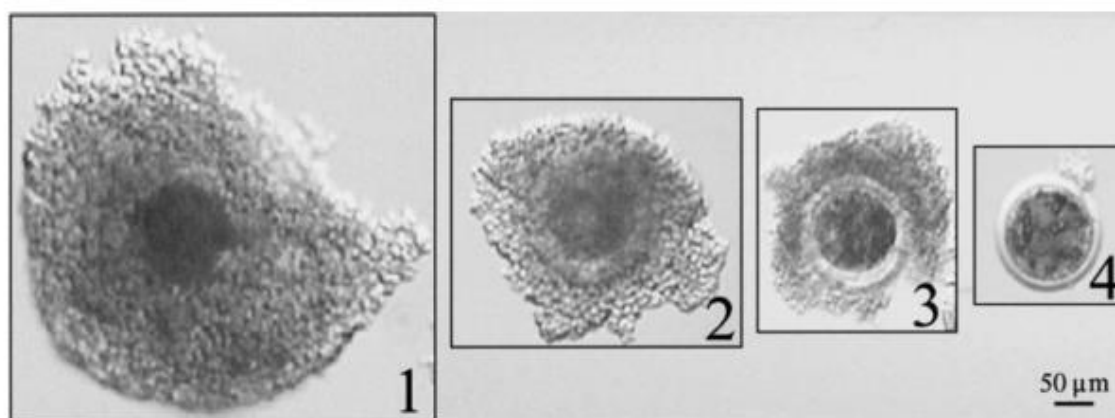
**Fonte:** Arquivo pessoal (2017)

## ANEXO F: CLASSIFICAÇÃO DE COMPLEXOS CUMULUS OVÓCITOS

Quadro 1: Diferentes características de ovócitos bovinos, quanto ao grau de qualidade.

| QUALIDADE | CARACTERÍSTICAS                                                                                                                                                          |
|-----------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Grau1     | Ovócitos com citoplasma homogêneo e múltiplas camadas compactas de células do cumulus.                                                                                   |
| Grau2     | Ovócito com citoplasma homogêneo com pequenas áreas mostrando pigmentações irregulares, cumulus compacto menor do que na categoria 1 com pelo menos 5 camadas completas. |
| Grau3     | Ovócito com citoplasma heterogêneo/vacuolizado, zona pelúcida coberta com 3 a 5 camadas de células do cumulus e/ou com pequenas áreas desnudas.                          |
| Grau4     | Citoplasma heterogeneamente pigmentado e o cumulus completamente/parcialmente ausente ou expandido.                                                                      |

Figura 7: Diferentes graus de ovócitos de acordo com a qualidade



**Fonte:** Stojkovic, M, Machado, AS, Stojkovic, P, Zakhartchenko, V, Hutzler, P. Mitochondrial Distribution and Adenosine Triphosphate Content of Bovine Oocytes Before and After In Vitro Maturation: Correlation with Morphological Criteria and Developmental Capacity After In Vitro Fertilization and Culture. Biology of reproduction. 2001; 64(3):904–909.