



CENTRO UNIVERSITÁRIO DE BRASÍLIA
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA EDUCAÇÃO E SAÚDE –
FACES
GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA

**AVALIAÇÃO DO USO DE GLUTATIONA EM DIFERENTES ETAPAS DO
PROCESSO DE CRIOPRESERVAÇÃO NA CONGELABILIDADE DO SÊMEN
EQUINO**

ANA JÚLIA OLIVEIRA DE MACEDO

Brasília
Junho 2021

ANA JÚLIA OLIVEIRA DE MACEDO

**AVALIAÇÃO DO USO DE GLUTATIONA EM DIFERENTES ETAPAS DO
PROCESSO DE CRIOPRESERVAÇÃO NA CONGELABILIDADE DO SÊMEN
EQUINO**

Trabalho de conclusão de curso
apresentado à Faculdade de Ciências
da Educação e Saúde para obtenção do
grau de Bacharel em Medicina
Veterinária. Orientador: MSc. Francisco
José Gonçalves de Oliveira.

Brasília

2021

ANA JÚLIA OLIVEIRA DE MACEDO

**AVALIAÇÃO DO USO DE GLUTATIONA EM DIFERENTES ETAPAS DO
PROCESSO DE CRIOPRESERVAÇÃO NA CONGELABILIDADE DO SÊMEN
EQUINO**

Trabalho de conclusão de curso
apresentado à Faculdade de Ciências
da Educação e Saúde para obtenção do
grau de Bacharel em Medicina
Veterinária. Orientador: MSc. Francisco
José Gonçalves de Oliveira.

Brasília, _____ de _____ de 2021.

Banca examinadora

MSc. Francisco José Gonçalves de Oliveira

Dra. Francislete Rodrigues Melo

MV. Samuel Freitas Bastos

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos que tornaram esse trabalho possível, ao meu orientador Msc. Francisco que me acolheu muito bem e que fez despertar em mim um interesse na área da reprodução. Aos colegas, Lucas, Ítalo e Mateus, por me auxiliarem na coleta e nas análises.

Ao Médico Veterinário Samuel, que me ensinou que a medicina veterinária seria um caminho árduo, mas que valeria a pena, me mostrou também como tratar os animais da maneira que eles merecem e a me portar como uma Médica Veterinária.

Esse período de faculdade é um novo começo na vida de todo mundo, onde aprendemos coisas novas e descobrimos quem realmente somos. Para mim foi um período gratificante e ao menos tempo pavoroso, pois passei por diversas dificuldades.

E durante esse período eu tive pessoas incríveis ao meu lado que não me deixaram desistir e são por essas pessoas que estou aqui hoje.

Gostaria de agradecer primeiramente a minha mãe, Rozania por ter dado a vida por mim, todo o seu tempo e dedicação. Agradeço também a minha prima Thalita, que me ajudou em todo meu processo de discente. E agradecer também a toda minha família pelo apoio.

As minhas amigas, Beatriz, Carina e Mariane, que estiveram comigo nos meus melhores e piores momentos.

E a todos que não detalhei, mas que são importantes para mim, muito obrigada.

RESUMO

O objetivo desse experimento foi avaliar o uso de antioxidantes em sêmen equino para prevenir ou diminuir os danos causados pelo estresse oxidativo, adicionando o antioxidante glutaciona em diferentes momentos da criopreservação. A avaliação do congelamento 1 mostra o grupo controle com 30% de motilidade, vigor 4 e 68% células vivas no teste de eosina nigrosina. Os resultados no grupo com adição da glutaciona ao Botusêmen® (Botupharma®, Botucatu, Brasil) foram, 35% de motilidade, vigor 3 (0-5) e 65% de células vivas no teste de eosina nigrosina. Na adição de glutaciona no Botucrio® (Botupharma®, Botucatu, Brasil), os resultados obtidos foram 15% de motilidade, 2 de vigor e 64% vivos no teste de eosina nigrosina. Ainda no 1º dia de coleta, o congelamento 2 obteve, no grupo controle, 50% de motilidade, 3 de vigor e 64% vivos no teste de eosina nigrosina. No grupo do Botusêmen®, foram obtidos 55% de motilidade, 3 de vigor e 57% vivos no teste de eosina nigrosina. No grupo do Botucrio®, 65% de motilidade, 3 de vigor e 67% vivos no teste de eosina nigrosina. De acordo com os experimentos realizados, as duas metodologias de congelamento testadas (com adição do antioxidante glutaciona no diluente à base de leite em pó, Botusêmen® e no diluente crioprotetor, Botucrio®) mostraram-se eficientes em relação aos parâmetros utilizados para mensurar a qualidade do sêmen criopreservado. Entretanto, por ter um número amostral pequeno, torna-se necessário uma ampliação desses experimentos, já que trata-se de um tema de grande importância para a reprodução de equinos. Também se faz imprescindível a realização de mais estudos sobre a adição de outros antioxidantes nos meios de criopreservação e suas dosagens para se obter bons resultados em relação a qualidade espermática.

Palavras-chaves: Equino. Sêmen. Antioxidante. Glutaciona.

ABSTRACT

The aim of this experiment was to evaluate the use of antioxidants in equine semen to prevent or reduce damage caused by oxidative stress, adding the antioxidant glutathione at different times of cryopreservation. Freezing 1 evaluation shows the control group with 30% motility, vigor 4 and 68% live cells in the eosin nigrosin test. The results in the group with addition of glutathione to Botusêmen® (Botupharma®, Botucatu, Brazil) were 35% motility, vigor 3 (0-5) and 65% live cells in the eosin nigrosin test. In the addition of glutathione to Botucrio® (Botupharma®, Botucatu, Brazil), the results obtained were 15% motility, 2 vigor and 64% alive in the eosin nigrosin test. Still on the 1st day of collection, freezing 2 obtained, in the control group, 50% motility, 3 vigor and 64% alive in the eosin nigrosin test. In the Botusêmen® group, 55% motility, 3 vigor and 57% alive were obtained in the eosin nigrosin test. In the Botucrio® group, 65% of motility, 3 of vigor and 67% alive in the eosin nigrosin test. According to the experiments carried out, the two tested freezing methodologies (with the addition of the antioxidant glutathione in the powdered milk-based diluent, Botusêmen® and in the cryoprotective diluent, Botucrio®) proved to be efficient in relation to the parameters used to measure the quality of cryopreserved semen. However, as it has a small sample size, it is necessary to expand these experiments, as it is a topic of great importance for the reproduction of horses. It is also essential to carry out further studies on the addition of other antioxidants in cryopreservation media and their dosages to obtain good results in terms of sperm quality.

Key-words: Equine. Semen. Antioxidant. Glutathione.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	8
2. REVISÃO DE LITERATURA	10
2.1 Célula Espermática	10
2.2 Criopreservação	11
2.3 Espécies reativas de oxigênio (ERO's)	12
2.4 Antioxidantes	13
2.4.1 Glutaciona	14
3. METODOLOGIA	16
3.1 Local do experimento	16
3.2 Seleção da égua	16
3.3 Coleta do sêmen	16
3.4 Análise e processamento	17
3.5 Congelamento do sêmen	18
3.6 Protocolos de adição da glutaciona	18
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	19
5. CONCLUSÃO	21
6. REFERÊNCIAS	22

1. INTRODUÇÃO

A equinocultura tem grande importância econômica no país, por se tratar de uma atividade que vem se desenvolvendo em diversos setores como no esporte, alcançando uma representatividade tanto na qualidade dos animais quanto dos cavaleiros (OLIVEIRA, 2011; OLIVEIRA, 2007).

Segundo dados do IBGE (2019), com aproximadamente 5,9 milhões de equinos, o Brasil possui o 3º maior rebanho do mundo e o maior da América Latina. Além da importância econômica já citada anteriormente, os equinos fazem parte da preservação ambiental e da qualidade de vida contribuindo com programas ligados ao turismo rural, temas ecológicos, valorização da vida no campo além da utilização do equino na equoterapia, para tratamentos de pessoas com necessidades especiais (OLIVEIRA, 2011; MOURA, 2017).

Com isso, é possível a oferta de mais de 3,2 milhões de empregos de forma direta e indireta onde se encontram fornecedores de insumos, produtos e serviços, gerando 7,5 milhões de reais por ano na economia nacional (OLIVEIRA, 2011; MOURA, 2017).

A primeira gestação equina oriunda da utilização de espermatozoides criopreservados foi reportada em 1957, quando foi descoberto o efeito do glicerol como crioprotetor do sêmen. Assim, os espermatozoides equinos puderam ser congelados e armazenados por tempo indeterminado para que fossem utilizados em procedimentos de inseminação artificial. (OLIVEIRA *et al*, 2013; OLIVEIRA, 2013).

Além do melhoramento genético, o sêmen congelado é utilizado como banco de reserva genética para animais de alto padrão racial e comercial. Isso viabiliza a difusão de material genético entre os criadores e facilita a seleção e o melhoramento genético de diversas raças (OLIVEIRA, 2013; OLIVEIRA, 2011).

A criopreservação também contribui para reduzir as perdas econômicas decorrentes da morte de reprodutores de alto valor comercial ou que participam de programas de preservação e conservação de raças nativas e de espécies ameaçadas, através da preservação do gene (OLIVEIRA, 2013; OLIVEIRA, 2011).

Vários protocolos de congelamento vêm sendo testados para a criopreservação espermática. Assim, existem vários estudos que procuram avaliar diferentes velocidades e meios de centrifugação, curvas e meios de congelamento, crioprotetores e suas concentrações, inclusão de antioxidantes ao crioprotetor e protocolos de descongelamento. Mesmo assim, não existe um método de congelamento universalmente aceito (OLIVEIRA, 2013; OLIVEIRA, 2011).

Vários autores comprovaram que o uso do sêmen fresco ou resfriado possui maior taxa de fertilidade do que sêmen congelado. Isso ocorre devido aos efeitos deletérios causados no processo de criopreservação. Assim, a necessidade de produzir novos diluidores ou de modificar os diluidores já existentes é uma realidade quando se busca melhorar a eficiência dos procedimentos de criopreservação (OLIVEIRA et al, 2013; STRAIOTO *et al*, 2020).

Durante o processo de criopreservação, a célula espermática passa por modificações causadas pelo gradiente osmótico gerado entre o meio extra e intracelular, causando danos à membrana plasmática e acromossomal. O desequilíbrio causado pelas concentrações de oxidantes e antioxidantes resultam na produção em excesso de ERO[•]s (espécies reativas ao oxigênio). Isso resulta na formação dos radicais livres que, em altas concentrações, reduzem a motilidade e viabilidade dos espermatozóides e diminuem a taxa de fertilidade (COSTA, 2015).

Assim, objetivou-se através desse experimento descritivo avaliar o uso de antioxidantes em sêmen equino para prevenir ou diminuir os danos causados pelo estresse oxidativo, adicionando o antioxidante glutathiona em diferentes momentos da criopreservação.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Célula Espermática

A produção dos espermatozoides acontece dentro dos tubos seminíferos dos testículos por meio da divisão e transformação das células germinativas. Essas células são extremamente polarizadas e possuem especialidades como habilidade de biossíntese, reparo, crescimento e divisão celular durante a fase final da espermatogênese. Para tornar-se competente à fecundação do ovócito e formação do zigoto, a célula espermática passa pelo processo de maturação no epidídimo (COSTA, 2015; SILVA, 2017).

O espermatozoide é uma célula composta de microtubo, fibras e estruturas membranosas nos quais cada componente sofre uma resposta única no processo de criopreservação (COSTA, 2015). Apresenta formato alongado e é dividido morfológicamente em cabeça e flagelo. A cabeça é onde se encontra o material genético (DNA) e o acrossomo (OLIVEIRA, 2011; SILVA, 2017).

A membrana plasmática presente na cabeça do espermatozoide tem um papel importante na capacidade de fertilização. Possui uma permeabilidade seletiva e atua como uma barreira, mantendo o equilíbrio osmótico entre os meios intra e extracelular. Essa estrutura é a mais suscetível a danos durante o processo de criopreservação, levando a perda da homeostase e morte celular. Sendo assim, é muito importante manter a integridade da membrana plasmática pela sobrevivência do espermatozoide no trato genital da fêmea e sua capacidade de fertilização (OLIVEIRA, 2011; SILVA, 2017).

A formação do acrossoma se dá por uma transformação do complexo de golgi da espermatide, célula precursora do espermatozoide no túbulo seminífero. Trata-se de uma vesícula que contém enzimas hidrolíticas necessárias para a penetração dos espermatozoides nos ovócitos (RONDON *et al*, 2012). E o flagelo promove motilidade para a célula permitindo sua passagem pelo trato reprodutivo feminino e a penetração da zona pelúcida do óócito (OLIVEIRA, 2011).

2.2 Criopreservação

A criopreservação é uma biotécnica que proporciona vantagens à indústria de produção de animais com programas de melhoramento genético que possibilitam armazenamento de material genético por longos períodos, reduzindo riscos e custos com aquisição de reprodutores, além de beneficiar a difusão do material genético (BAPTISTA SOBRINHO, 2009; COSTA, 2015; SILVA, 2017).

O processo de criopreservação mantém a capacidade funcional dos espermatozoides que, para a fertilização do ovócito, deve manter algumas características como o metabolismo para produção de energia, motilidade progressiva, viabilidade das enzimas localizadas no acrossomo e proteínas na membrana plasmática que são importantes para a sobrevivência do espermatozoide no trato reprodutivo feminino e para a ligação da membrana plasmática do espermatozoide com a membrana plasmática do ovócito para a fertilização (COSTA, 2015; OLIVEIRA, 2011).

No decorrer do processo de criopreservação, a célula espermática passa por variações bruscas de temperatura que faz com que a célula sofra alterações na organização de seus componentes estruturais, danificando suas propriedades, reduzindo sua habilidade funcional. Essas alterações estão ligadas à mudança na permeabilidade e na habilidade de sofrer fusão, acarretando em inchaços e rupturas na membrana plasmática e acrossomal, alterações na fluidez da membrana plasmática, desregulação no influxo de cálcio intracelular e alterações na atividade enzimática (COSTA, 2015).

Alguns fatores causam alterações nas células espermáticas durante o processo de criopreservação. Dentre esses a qualidade do sêmen *in natura*, materiais usados (palheta, mini tubo, pelets), velocidade do congelamento e descongelamento, tempo inicial do congelamento, concentração do crioprotetor e composição do diluidor (COSTA, 2015).

Além disso, as alterações causadas pelo congelamento como a transição de fase na membrana, o estresse oxidativo, apoptose, estresse osmótico, formação de cristais de gelo intracelulares e concentração de soluto

resultante do processo de desidratação (COSTA, 2015; STRAIOTO *et al*, 2020).

Diversos pesquisadores em seus estudos, vêm buscando aprimorar a qualidade do sêmen criopreservado reduzindo danos causados como o estresse oxidativo, sendo feito o uso de antioxidantes nos diluidores ou crioprotetores em diversas espécies (STRAIOTO *et al*, 2020).

2.3 Espécies reativas de oxigênio (ERO's)

Os termos radicais livres, oxidantes e espécies reativas de oxigênio (EROs) são usados no meio científico para identificar agentes químicos reativos originários do metabolismo do oxigênio. As EROS envolvem todos os derivados do oxigênio e são encontrados em todos os sistemas biológicos em condições fisiológicas (MAIA e BICUDO, 2009; RONDON *et al*, 2012).

Em condições fisiológicas o oxigênio sofre uma redução tetravalente, com aceitação de quatro elétrons, resultando em formação de água, nesse processo, são criados reativos intermediários: radical superóxido (O_2^-), radical hidroxila (OH^*) e o não radical peróxido de hidrogênio (H_2O_2) que são extremamente tóxicos à célula e em grandes concentrações são capazes de atravessar membranas biológicas (MAIA e BICUDO, 2009; RONDON *et al*, 2012).

Os espermatozoides produzem quantidades controladas de EROS com o objetivo de induzir a capacitação espermática e a reação acrossomal, promovendo sua habilidade fertilizante. Entretanto, quando essa produção é excessiva ocorre redução da motilidade espermática, da capacidade de fusão dos gametas e, conseqüentemente, da fertilidade, isso ocorre através da interação dos EROS com lipídios da membrana, proteínas e DNA mitocondrial e nuclear (OLIVEIRA, 2011).

O estresse oxidativo ocorre quando há um desequilíbrio na quantidade de EROS. Assim como o estresse osmótico, o estresse oxidativo causa danos à membrana plasmática e acrossomal e contribui para antecipação, a capacitação e da reação acrossomal já durante o processo de congelação e descongelação. Isso representa perda de capacidade de fertilização uma vez

que esses processos ocorrem fora do trato reprodutivo feminino e matam a célula rapidamente (RONDON *et al*, 2012).

Nos túbulos seminíferos o estresse oxidativo das células germinativas é neutralizado pela presença de antioxidantes nas secreções do trato reprodutivo masculino. Essas secreções incluem enzimas protetoras liberadas no espaço extracelular na cabeça e cauda do epidídimo (TONIOLLI, 2012).

O plasma seminal possui removedores de radicais livres que protegem a célula dos danos causados pela produção excessiva dos EROS, esta possui um sistema de defesa antioxidante podendo remover o agente antes da lesão e/ou reparar a lesão já existente (TONIOLLI, 2012).

2.4 Antioxidantes

Os antioxidantes participam do sistema de defesa da célula, possuindo dois sistemas: o sistema intracelular (enzimático e não enzimático) e o sistema extracelular.

O sistema intracelular enzimático é composto por macromoléculas, produzidas ou não do próprio organismo. Essas macromoléculas são enzimas proteicas que fazem a proteção diretamente nos agentes redutores ou reparando os danos causados no organismo. São exemplificados por: superóxido dismutase (SDO), que tem a capacidade de remover o radical superóxido transformando-o em hidrogênio; a catalase (CAT), que por sua vez destrói o peróxido de hidrogênio produzindo água e oxigênio; glutathione peroxidase (GPx); e glutathione reductase (GR), que é o mais importante na remoção de peróxidos nas células (SILVA e GUERRA, 2012; TONIOLLI, 2012).

O sistema intracelular não enzimático é composto por micromoléculas produzidas ou não do próprio organismo, que fazem a proteção contra as ações deletérias dos EROS. São compostos por vitaminas como: ácido ascórbico (vitamina C) e o α -tocoferol (vitamina E) (SILVA e GUERRA, 2012; TONIOLLI, 2012).

O sistema extracelular que é a proteção vinda do plasma seminal que contém redutores de EROS, são eles: redutores não enzimáticos: vitamina C,

ácido úrico, albumina, vitamina E, tirosina; e os redutores enzimáticos: catalase, glutathione, taurina e hipotaurina (SILVA e GUERRA, 2012; TONIOLLI, 2012).

Os antioxidantes são compostos que regulam, removem e suprimem a formação de EROS evitando o início ou a propagação das reações em cadeia da oxidação. O mecanismo de defesa antioxidante é dividido em prevenção (onde é inibida a produção de EROS); interceptação (que interrompem a reação em cadeia); e de reparação (que não é observada nos espermatozoides por falta de um sistema enzimático) (SILVA e GUERRA, 2012).

Células somáticas possuem antioxidantes dentro do seu citoplasma. O espermatozoide por sua vez perde a maioria do seu citoplasma durante a maturação, o que os mecanismos endógenos que regulam e realizam a defesa enzimática que reduziria os danos oxidativos causados pela concentração alta de EROS (OLIVEIRA, 2011).

As enzimas antioxidantes intracelulares não proporcionam uma proteção total a membrana plasmática, que envolve o acrossomo e a cauda. Assim o espermatozoide necessita da proteção conferida pelo plasma seminal, que contém antioxidantes enzimáticos que neutralizam a ação O_2^- e $H_2O_2^-$ (OLIVEIRA, 2011).

O estresse oxidativo causado pela ERO's, está ligado diretamente ao processo de criopreservação que provoca mudanças físicas e químicas na membrana espermática, prejudicando o sistema de defesa antioxidante. Isso leva a redução da motilidade, viabilidade, integridade acrossomal e o potencial e fertilização (OLIVEIRA, 2011).

2.4.1 Glutathione

De acordo com Baptista Sobrinho (2009), as glutathione peroxidases (GPx) são enzimas que podem ser divididas em dois grupos, as selênio-dependentes e as selênio independentes. As enzimas do grupo selênio-dependente podem decompor o $H_2O_2^-$ em vários hidros ou lipoperóxidos. Nesta reação, catalisada pela glutathione peroxidase, a glutathione reduzida (GSH, glutamyl-L-cysteinylglycine) é usada como substrato para metabolizar o $H_2O_2^-$, resultando em H_2O e glutathione oxidada (GSSG). A GSSG, por sua vez, pode

ser reduzida novamente para GSH pela enzima glutathione redutase (GRD), dependente do NADPH.

Para que a atividade protetora da glutathione expressa pela redução de espécies oxidantes, e consequente oxidação da GSH a glutathione oxidada (GSSG) seja mantida, a GSH precisa ser regenerada através do ciclo catalítico. Nele podemos identificar a atividade de três grupos de enzimas: a glutathione oxidase (GO), a glutathione peroxidase (GSH-Px) e a glutathione redutase (GR). As duas primeiras enzimas, GO e GSH-Px, catalisam a oxidação de GSH a GSSG e a última, GR, é responsável pela regeneração de GSH, a partir de GSSG, na presença de NADPH (BAPTISTA SOBRINHO, 2009; HUBER e ALMEIDA, 2008).

As glutathiones selênio-dependentes podem ser divididas em quatro formas geneticamente distintas, GPx1, GPx2, GPx3 e GPx4. A GPx2 é encontrada no citosol e a GPx3, no meio extracelular, e são pouco detectadas na maioria dos tecidos, exceto trato gastrointestinal e rins. A GPx1 e a GPx4 são localizadas na maioria dos tecidos, estando a GPx1 restrita às mitocôndrias e a GPx4 ao citosol e à membrana. A GPx1 provoca a redução de hidroperóxidos de ácidos graxos e H_2O_2 utilizando a GSH. Já a GPx4 pode reduzir diretamente hidroperóxidos de fosfolípidios, de ácidos graxos e de colesterol, que são produzidos em membranas peroxidadas e lipoproteínas oxidadas. A GPx1 é predominantemente presente em eritrócitos, rins e fígado e a GPx4 é altamente expressa nas células epiteliais renais e nos testículos (BAPTISTA SOBRINHO, 2009; HUBER e ALMEIDA, 2008).

3. METODOLOGIA

3.1 Local do experimento

A coleta do sêmen foi realizada na Associação dos Tratadores de Animais de Tração e Esporte (ATRATE) de Planaltina-DF e analisada na Central de Reprodução Equino Estábulo localizada em Sobradinho-DF.

3.2 Seleção da égua

A égua utilizada para a monta, tinha 6 anos de idade, SRD com bom escore corporal (6 a 8, HENNEKE et al, 1983) e não estava em estro. Para indução do cio, foi feito um protocolo com uso de 5 mg de dinoprost trometamina e mais 5 mg de benzoato de estradiol por via intramuscular no primeiro dia. O tratamento com benzoato de estradiol continuou com aplicações de 3 mg no segundo dia e mais 2 mg no terceiro dia também de forma intramuscular. O animal foi utilizado como manequim um dia após o término deste protocolo.

3.3 Coleta do sêmen

Foram coletados sêmen de 2 garanhões com 6 e 7 anos de idade, SRD e com bom escore corporal (6 a 7, HENNEKE *et al*, 1983). Foi realizada 1 coleta onde cada garanhão teve seu sêmen coletado apenas 1 vez.

Cada sêmen coletado foi dividido em 3 grupos, grupo controle que foi feito o processo normal da criopreservação; grupo com glutathiona no diluidor, onde a glutathiona foi adicionada somente antes da centrifugação e depois foi feito o processo normal do congelamento; e grupo com criopreservador onde foi feita o processo normal antes da centrifugação e a glutathiona foi adicionada após esse processo, seguida do congelamento. A diluição logo após a coleta foi feita com 7,5 mL de sêmen para cada 7,5 mL de diluidor.

Foi usada na coleta a vagina artificial modelo Botupharma (Botupharma®, Botucatu, Brasil) metodologia de coleta fechada, onde a mucosa interna da

vagina foi preenchida com água a 48°C e completada com ar para atingir pressão suficiente para ter atrito e estimular o macho (FELICIO *et al*, 2019; CASTRO *et al*, 2017).

Após a coleta foi feita a diluição do sêmen com o extensor comercial Botusêmen® (Botupharma®, Botucatu, Brasil) na proporção de uma parte do sêmen para uma parte diluente, 1:1 (FELICIO *et al*, 2019; MAZIERO *et al*, 2018). Para o transporte do sêmen diluído, foi utilizado uma caixa de isopor Botuflex® (Botupharma®, Botucatu, Brasil) que manteve as amostras a uma temperatura de 15°C.

3.4 Análise e processamento

As análises laboratoriais seguiram o padrão mínimo exigido pelo Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA) para avaliação do sêmen, *in natura* e/ou criopreservado que são: motilidade espermática (%); vigor (1 - 5); concentração espermática (milhões/ml); anormalidades espermáticas (%); e teste de integridade de membrana plasmática e acrossomal (AIDAR, 2013; CASTRO *et al*, 2017).

De acordo com o CBRA (2013), a motilidade é expressa em porcentagem (0 a 100%), a proporção de espermatozóides móveis. O vigor representa a força e a velocidade do movimento dos espermatozóides em que 0 é ausência e 5 é o movimento retilíneo e rápido. A concentração representa o número de espermatozóide por cm³ e o cálculo de contagem é feito na câmara de Neubauer. A avaliação da membrana é feita pelo teste eosina nigrosina. (CASTRO *et al*, 2017; FÜRST *et al*, 2005).

Após a análise, o sêmen foi centrifugado para fazer a retirada do plasma seminal. A centrifugação foi feita com tubo Falcon 15 mL, com força gravitacional de 600G (1200 rpm) por 10 minutos (AIDAR, 2013; FELICIO *et al*, 2019; MAZIERO *et al*, 2018).

Logo em seguida, foi feita a retirada do sobrenadante (plasma seminal + diluente) e a ressuspensão do sêmen com o crioprotetor comercial a base de gema de ovo, Botucio® (Botupharma®, Botucatu, Brasil). Após esse processo, o sêmen ressuspensionado foi colocado em palhetas de 0,5 mL na concentração 200

x 10⁶ espermatozoides/mL, em cada palheta (FELICIO *et al*, 2019; MAZIERO *et al*, 2018).

3.5 Congelamento do sêmen

Após envasar o sêmen, as palhetas foram acondicionadas em uma geladeira mantida a uma temperatura interna constante de 5° C por 20 minutos (FELICIO *et al*, 2019; MAZIERO *et al*, 2018). Após esse período, foi realizado o congelamento das amostras em uma caixa de isopor preenchida parcialmente com nitrogênio líquido (N₂). As palhetas foram posicionadas a uma distância de 6 cm acima do nível do nitrogênio por 20 minutos. Em seguida elas foram submersas e armazenadas dentro de um recipiente criobiológico até o descongelamento e análise (FELICIO *et al*, 2019; MAZIERO *et al*, 2018).

O descongelamento das palhetas foi realizado em banho-maria a uma temperatura de 37°C por 30 segundos (CASTRO *et al*, 2017).

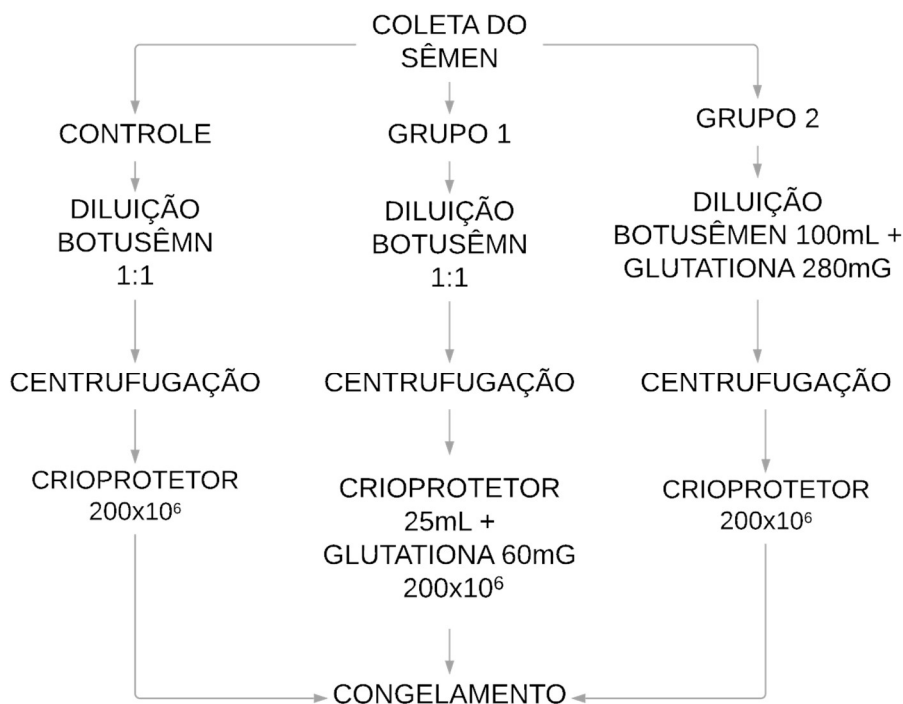
3.6 Protocolos de adição da glutathiona

Com o objetivo de avaliar a adição da glutathiona em diferentes momentos da criopreservação, foi feito um cálculo para a adição no Botusêmen[®] e um cálculo para o Botucrio[®], a fim de não atingir a dosagem tóxica, como mostrado na figura 1.

Para a adição de glutathiona no Botusêmen[®], o cálculo utilizado mostrou resultados significativos. A diluição foi, 280 mg de glutathiona para 100 mL de Botusêmen[®] (Botupharma[®], Botucatu, Brasil) onde o objetivo final era alcançar a dose de 2,5 mM/mL. Para isso, pegamos 50mL de Botusêmen[®] já com a glutathiona e adicionamos 7,5 mL de sêmen, desta diluição foi retirado 15 mL para a análise espermática.

O cálculo de diluição no Botucrio[®] foi feito da seguinte maneira: 60 mg de glutathiona para 25mL de Botucrio[®] (Botupharma[®], Botucatu, Brasil) alcançando no final 2,5 mM.

Figura 1. Protocolo de adição de glutatona.



Fonte: MACEDO, 2021

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos após o descongelamento das análises, mostram que a adição da glutatona em diferentes momentos da criopreservação pode ser benéfica para a congelabilidade da célula espermática, como vemos na tabela 1.

Tabela 1. Avaliação da motilidade (MOT), vigor e teste de integridade de membrada corados com Eosina-Nigrosina (VIVOS), tratados ou não com glutatona.

	Grupo controle			Grupo com Glutatona no Botusêmen®			Grupo com Glutatona no Botucrio®		
	MOT	VIGOR	VIVOS	MOT	VIGOR	VIVOS	MOT	VIGOR	VIVOS
Congelamento 1	30%	4	68%	35%	3	65%	15%	2	64%
Congelamento 2	50%	3	64%	55%	3	57%	65%	3	67%

Fonte: MACEDO, 2021

Os resultados do congelamento 1 entre o grupo controle e grupo com glutathione no Botusêmen[®] mostra uma melhora na motilidade, mas em relação ao vigor e a porcentagem de células vivas houve uma redução. Entre o grupo controle e o grupo com glutathione no Botucrío[®], se mostra notória a redução nas características espermáticas, resultado esse que pode ser devido as influências de alguns fatores, como: grau de estimulação sexual, frequência de ejaculação, idade, tamanho testicular e método de coleta (CASTRO *et al*, 2017).

O congelamento 2, mostra resultados satisfatórios em relação a motilidade e vigor quando se compara o grupo controle ao grupo com glutathione no Botusêmen[®], mas mostra uma redução em relação a porcentagem de células vivas. Comparando o grupo controle ao grupo com glutathione no Botucrío[®], os resultados mostram que nos parâmetros de motilidade e células vivas, houve um aumento significativo nos valores e manteve o vigor.

Podemos presumir que o uso da glutathione quando colocada no Botusêmen[®], pode trazer resultados benéficos a célula espermática, mesmo não encontrando estudos para confirmar esse resultado. Já a utilização no Botucrío[®], mostra mais estudos em relação ao seu uso, trazendo resultados tanto positivos quanto negativos.

De acordo com OLIVEIRA (2011), concentrações superiores a 2,5 mM de glutathione causam efeitos deletérios ao sêmen. Seu trabalho mostra também que adição de 2,5 mM em meio de congelamento, preserva a motilidade total, incrementa significativamente a motilidade progressiva e a integridade de membrana plasmáticas, tanto em sêmen congelado e refrigerado.

Já BAPTISTA SOBRINHO (2009), avaliou com 1 mM e 5 mM de glutathione. Os resultados encontrados foram que, o grupo tratado com 1 mM apresentou uma porcentagem maior de células com membrana íntegra, e o grupo tratado com 5 mM apresentou melhores resultados na atividade mitocondrial.

Por outro lado, SILVA (2017) relatou que a adição de glutathione em diferentes diluentes de criopreservação, não melhorou a manutenção das características espermáticas. Entretanto, a adição de 2,5 mM da glutathione no

diluyente Bovimix ®, melhorou a taxa de clivagem, taxa de divisão celular após a fertilização.

BENDER, et al (2015) avaliou o uso da glutathione reduzida com o objetivo de reduzir o estresse oxidativo sofrido pelos espermatozoides. Foi usada a glutathione nas concentrações de 3 mM, 5 mM e 7 mM, no Botucricio. Após o descongelamento foram avaliados: motilidade, morfologia, viabilidade/*status* acrossomal, atividade mitocondrial e nível de lipoperoxidação. Onde foi observado efeito deletério sobre a motilidade espermática e a não proteção contra a lipoperoxidação, nas concentrações de 5 mM e 7 mM.

5. CONCLUSÃO

De acordo com os experimentos realizados, as duas metodologias de congelamento testadas (com adição do antioxidante glutathione no diluyente à base de leite em pó, Botusêmen® e no diluyente crioprotetor, Botucricio®) mostraram-se eficientes em relação aos parâmetros utilizados para mensurar a qualidade do sêmem criopreservado. Entretanto, por ter um número amostral pequeno, torna-se necessário uma ampliação desses experimentos, já que trata-se de um tema de grande importância para a reprodução de equinos. Também se faz imprescindível a realização de mais estudos sobre a adição de outros antioxidantes nos meios de criopreservação e suas dosagens para se obter bons resultados em relação a qualidade espermática.

6. REFERÊNCIAS

AIDAR, N. B. **CRIOPRESERVAÇÃO DE SÊMEN EQUINO**. Orientação do Prof. Dr. Rodrigo Arruda de Oliveira, Brasília-DF, Universidade de Brasília. 51p.: il. Monografia – Universidade de Brasília – UnB/Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, 2013.

BAPTISTA SOBRINHO, C. A. **EFEITO DO TRATAMNETO COM ANTIOXIDANTES NA QUALIDADE DE ESPERMATOZÓIDES CRIOPRESERVADOS EM CÃES**. Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Reprodução Animal, São Paulo, 2009.

BENDER, E. S. C. et al. **GLUTATIONA REDUZIDA NA LIPOPEROXIDAÇÃO DO SÊMEN EQUINO CRIOPRESERVADO**. Enciclopédia Biosfera, Centro Científico Conhecer - Goiânia, v.11 n.22; p. 1418, 2015.

CASTRO, C. S. et al. **APLICAÇÃO DA CRIOPRESERVAÇÃO EM SÊMEN EQUINO**. Vol. 38 (Nº 42) Año 2017. Pág. 18.

COSTA, J. M. S. **EFEITO DA ADIÇÃO DE ANTIOXIDANTES NO SÊMEN DE CARNEIROS SOBRE A QUALIDADE ESPERMÁTICA APÓS DESCONGELAMENTO**. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Universidade Federal do Vale do São Francisco, Campus de Ciências Agrárias, Petrolina, 2015.

FELICIO, L. C. S. et al. **EQUINE SEMEN CRYOPRESERVATION: COMPARISON BETWEEN CENTRIFUGATION AND FILTRATION**. *Pferdeheilkunde– Equine Medicine* 35 (2019) 5 (September/October) 437–441.

FÜRST, R et al. **EFEITO DO RESFRIAMENTO DO SÊMEN EQUINO SOBRE SUA CONGELABILIDADE**. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.57, n.5, p.599-607, 2005.

HENNEKE, D. R. et al. **RELATIONSHIP BETWEEN CONDITION SCORE, PHYSICAL MEASUREMENTS AND BODY FAT PERCENTAGE IN MARES**. *Equine Veterinary Journal Equine vet. J.* (1983) 15(4), 371-372.

HUBER, P. C.; ALMEIDA, W. P. **GLUTATIONA E ENZIMAS RELACIONADAS: PAPEL BIOLÓGICO E IMPORTÂNCIA EM PROCESSOS PATOLÓGICOS.** *Quim. Nova*, Vol. 31, No. 5, 1170-1179, 2008.

MAIA, M. S.; BICUDO, S. D. **RADICAIS LIVRES, ANTIOXIDANTES E FUNÇÃO ESPERMÁTICA EM MAMÍFEROS: UMA REVISÃO.** *Rev. Bras. Reprod. Anim.*, Belo Horizonte, v.33, n.4, p.183-193, Oct./Dez. 2009. Disponível em www.cbra.org.br.

MAZIERO, R. R. D. et al. **EFFECT OF USING TWO CRYOPRESERVATION METHODS ON VIABILITY AND FERTILITY OF FROZEN STALLION SPERM.** *Journal of Equine Veterinary Science* (2018), doi: <https://doi.org/10.1016/j.jevs.2018.10.008>.

MOURA, T. C. M. **USO DE SACAROSE COMO SUPLEMENTO EM DILUIDOR PARA CRIOPRESERVAÇÃO DE SÊMEN DE GARANHÕES.** Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal Tropical, Recife, BR-PE, 2017.

OLIVEIRA et al. **CRIOPRESERVAÇÃO DO SÊMEN EQUINO: UMA REVISÃO.** *Rev. Bras. Reprod. Anim.*, Belo Horizonte, v.37, n.1, p.23-28, jan./mar. 2013. Disponível em www.cbra.org.br.

OLIVEIRA, F. J. G. **EFEITO DA ADIÇÃO DE GLICEROL EM DIFERENTES ETAPAS DO RESFRIAMENTO SOBRE A CONGELABILIDADE DO SÊMEN DE GARANHÕES.** Tese (Mestrado) – Universidade Federal de Viçosa. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Viçosa, MG, 2007.

OLIVEIRA, R. A. **ANTIOXIDANTES NA VIABILIDADE DE SÊMEN EQUINO CONGELADO E RESFRIADO.** Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Goiás, Escola de Veterinária e Zootecnia, Goiânia, 2011.

OLIVEIRA, R. A. **CRIOPRESERVAÇÃO DE SEMEN EQUINO, UM DESAFIO A SER VENCIDO.** *PUBVET*, Londrina, V. 7, N. 26, Ed. 249, Art. 1647, Suplemento 2, 2013.

RONDON et al. **PERSPECTIVAS SOBRE O USO DE ANTIOXIDANTES NA CONSERVAÇÃO DO SÊMEN DE SUÍNOS.** *Rev. Bras. Reprod. Anim.*, Belo Horizonte, v.36, n.3, p.141-147, jul./set.2012. Disponível em www.cbpa.org.br.

SILVA E. C. B.; Guerra M. M. P. **TERAPIAS ANTIOXIDANTES NA CRIOPRESERVAÇÃO ESPERMÁTICA.** Laboratório de Andrologia, Departamento de Medicina Veterinária, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, PE, Brasil. *RPCV* (2012) 111 (583-584) 143-149.

SILVA, N. C. **USO DE ANTIOXIDANTES EM DILUENTES DE CRIOPRESERVAÇÃO DO SÊMEN BOVINO.** Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Goiás, Escola de Veterinária e Zootecnia (EVZ), Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, Goiânia, 2017.

STRAIOTO et al. **UTILIZAÇÃO DA QUERCETINA NO CRIOPRESERVADOR DE SÊMEN EQUINO.** *Revista Thêma et Scientia – Vol. 10, no 2, jul/dez 2020.*

TONIOLLI, R. **UTILIZAÇÃO DE ANTIOXIDANTES NA PRESERVAÇÃO SEMINAL EM SUÍNOS.** *Ciência Animal*, 22(1); 365-375, 2012 – Edição Especial.