

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA FRONTEIRA SUL
CAMPUS REALEZA, PARANÁ
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE, BEM-ESTAR E PRODUÇÃO
ANIMAL SUSTENTÁVEL NA FRONTEIRA SUL**

CAMILA KETERINE GORZELANSKI TRENKEL

**SÊMEN BOVINO CONGELADO E DESCONGELADO ACRESCIDO DE
EXTRATO NATURAL (NP) COM POTENCIAL ANTIOXIDANTE**

REALEZA, PARANÁ

2024

CAMILA KETERINE GORZELANSKI TRENKEL

**SÊMEN BOVINO CONGELADO E DESCONGELADO ACRESCIDO DE
EXTRATO NATURAL (NP) COM POTENCIAL ANTIOXIDANTE**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde, Bem-Estar e Produção Animal Sustentável na Fronteira Sul da Universidade Federal da Fronteira Sul (UFFS), como requisito para obtenção do título de Mestre em Saúde, Bem-Estar e Produção Animal Sustentável na Fronteira Sul.

Orientadora: Profa. Dra. Adalgiza Pinto Neto

Co-orientador: Prof. Dr. Antonio Campanha Martinez

REALEZA, PARANÁ

2024

Bibliotecas da Universidade Federal da Fronteira Sul - UFFS

, Camila Keterine Gorzelanski Trenkel
SÊMEN BOVINO CONGELADO e descongelado ACRESCIDO DE
EXTRATO NATURAL (NP) COM POTENCIAL ANTIOXIDANTE / Camila
Keterine Gorzelanski Trenkel . -- 2024.
41 f.:il.

Orientadora: Doutora Adalgiza Pinto Neto
Co-orientador: Doutor Antonio Campanha Martinez
Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal da
Fronteira Sul, Programa de Pós-Graduação em Saúde,
Bem-Estar e Produção Animal Sustentável Na Fronteira
Sul, Realeza, PR, 2024.

1. Reprodução Animal. 2. Criopreservação do Sêmen. 3.
Antioxidantes. 4. Estresse Oxidativo. I. , Adalgiza
Pinto Neto, orient. II. , Antonio Campanha Martinez ,
co-orient. III. Universidade Federal da Fronteira Sul.
IV. Título.

CAMILA KETERINE GORZELANSKI TRENKEL

**SÊMEN BOVINO CONGELADO E DESCONGELADO ACRESCIDO DE
EXTRATO NATURAL (NP), COM POTENCIAL ANTIOXIDANTE**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde, Bem-Estar e Produção Animal Sustentável na Fronteira Sul da Universidade Federal da Fronteira Sul (UFFS), como requisito para obtenção do título de Mestre em Saúde, Bem-Estar e Produção Animal Sustentável na Fronteira Sul.

Este trabalho foi defendido e aprovado pela banca em 03/10/2024.

BANCA EXAMINADORA

Documento assinado digitalmente
gov.br ADALGIZA PINTO NETO
Data: 11/10/2024 13:57:19-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Profª. Dra. Adalgiza Pinto Neto – UFFS
Orientadora



Prof. Dr. Rodrigo Garcia Motta – UEM
Avaliador



Profª. Dra. Fabiana Elias – UFFS
Avaliadora



Prof. Dr. Antonio Campanha Martinez – UEM
Convidado

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, à Deus, pois sem Ele essa jornada não seria cumprida;

À minha família, especialmente aos meus pais Gilmar e Soeli, que me ensinaram os valores do ser humano, e a minha irmã Andressa. Cujos amor incondicional e apoio constante foram os pilares que sustentaram minha trajetória. Vocês foram minha fonte de força e inspiração, e não poderia ter chegado até aqui sem vocês;

Ao meu namorado, Vinícius. Sua presença constante e seu apoio incondicional foram fundamentais. Em cada desafio e em cada conquista, você esteve ao meu lado;

Gostaria de dedicar um espaço especial para expressar minha profunda gratidão a minha orientadora Profa. Dra. Adalgiza Pinto Neto. Uma pessoa de grande coração e caráter exemplar, que além de ser minha inspiração, me acolheu, me ensinou e me mostrou o caminho. Sua orientação, paciência e apoio foram fundamentais para a realização deste trabalho. Espero um dia me tornar uma profissional tão competente quanto a senhora. Eu não poderia ter desejado uma orientadora melhor;

Ao meu co-orientador Prof. Dr. Antonio Campanha Martinez, que sempre esteve disposto a ajudar na construção e melhoria deste trabalho;

A todos os estagiários do Laboratório de Reprodução Animal - LABRA da UFFS agradeço de coração, que não mediram esforços para me ajudar a tornar essa pesquisa possível. Obrigada pelo apoio e trabalho em equipe;

Ao corpo docente do Programa de Pós-Graduação em Saúde, Bem-Estar e Produção Animal Sustentável - PPG-SBPAS, que fizeram parte da minha formação. Especialmente, ao Prof. Dr. Jonatas Cattelan, pelo auxílio na construção desses resultados, e

Por fim, a todos que, de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho e para minha trajetória na pós-graduação. Cada gesto de apoio e encorajamento foi valioso e me ajudou a chegar até aqui.

RESUMO

A criopreservação espermática permite um rápido avanço genético em rebanhos comerciais, especialmente em bovinos, devido a sua utilização em biotecnologias reprodutivas como a inseminação artificial, inseminação artificial em tempo fixo e produção *in vitro* de embriões. No entanto, o processo de congelamento e descongelamento do sêmen pode causar danos celulares, especialmente devido à geração excessiva de espécies reativas de oxigênio (EROs), que comprometem a viabilidade dos espermatozoides. Avaliou-se nesse estudo a viabilidade *in vitro* e *in vivo* do sêmen criopreservado acrescido de um extrato natural (NP) com potencial antioxidante, após congelamento e descongelamento. A dissertação está organizada no formato de artigo científico, o qual encontra-se descrito no capítulo 01. Com base nos resultados, foi possível evidenciar que o percentual de espermatozoides móveis e progressivos foi maior no sêmen fresco, com valores de 87,57% e 43,77%, respectivamente, e o percentual de espermatozoides estáticos foi menor no grupo controle fresco, com 12,42%. Os parâmetros de cinética da velocidade, movimento e trajetória não diferiu entre os tratamentos após descongelamento. Não se observou diferenças nos valores de defeitos individuais e totais entre os grupos avaliados, assim como no percentual de espermatozoides íntegros, semi-lesados e lesados. Em relação à taxa de gestação, os resultados parciais descritivos indicaram 70,59%, 77,78%, 50,00% e 70,59% após a IATF utilizando sêmen pertencente aos grupos 1, 2, 3 e 4, respectivamente. Conclui-se que a adição do extrato natural com capacidade antioxidante no diluente de sêmen submetido a criopreservação não prejudicou a cinética de movimento, a viabilidade espermática e/ou a taxa de gestação.

Palavras-chave: Espermatozoides; Congelamento; Peroxidação lipídica; Antioxidante.

ABSTRACT

Sperm cryopreservation allows rapid genetic advancement in commercial herds, especially in cattle, due to its use in reproductive biotechnologies such as artificial insemination, fixed-time artificial insemination and in vitro embryo production. However, the process of freezing and thawing semen can cause cellular damage, especially due to the excessive generation of reactive oxygen species (ROS), which compromise sperm viability. This study evaluated the in vitro and in vivo viability of cryopreserved semen added with a natural extract (NP) with antioxidant potential, after freezing and thawing. The dissertation is organized in the format of a scientific article, which is described in chapter 01. Based on the results, it was possible to demonstrate that the percentage of motile and progressive spermatozoa was higher in fresh semen, with values of 87.57% and 43.77%, respectively, and the percentage of static spermatozoa was lower in the fresh control group, with 12.42%. The kinetic parameters of speed, movement and trajectory did not differ between treatments after thawing. No differences were observed in the values of individual and total defects between the groups evaluated, as well as in the percentage of intact, semi-damaged and damaged spermatozoa. Regarding the pregnancy rate, the partial descriptive results indicated 70.59%, 77.78%, 50.00% and 70.59% after IATF using semen belonging to groups 1, 2, 3 and 4, respectively. It is concluded that the addition of the natural extract with antioxidant capacity in the semen diluent subjected to cryopreservation did not harm the movement kinetics, sperm viability and/or pregnancy rate.

Keywords: Sperm; Freezing; Lipid peroxidation; Antioxidant.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	8
1.1 CÉLULA ESPERMÁTICA	8
1.2 CRIOPRESERVAÇÃO DO SÊMEN	9
1.3 ESPÉCIES REATIVAS AO OXIGÊNIO (EROS) E ESTRESSE OXIDATIVO	10
1.4 ANTIOXIDANTES	12
2 CAPÍTULO 1 - SÊMEN BOVINO CONGELADO E DESCONGELADO ACRESCIDO DE EXTRATO NATURAL: CINÉTICA DE MOVIMENTO, VIABILIDADE ESPERMÁTICA E TAXAS DE GESTAÇÃO APÓS IATF	14
2.1 RESUMO	14
2.2 INTRODUÇÃO	15
2.3 MATERIAL E MÉTODOS	18
2.3.1 Local e animais	18
2.3.2 Coleta e Processamento do sêmen	18
2.3.3 Preparação do extrato natural (NP)	19
2.3.4 Avaliação da propriedade antioxidantes do NP	19
2.3.5 Criopreservação do sêmen	20
2.3.6 Estudo <i>in vitro</i>:	20
2.3.6.1 <i>Avaliação da cinética espermática:</i>	20
2.3.6.2 <i>Morfologia espermática:</i>	21
2.3.6.3 <i>Integridade de membrana plasmática:</i>	21
2.3.7 Estudo <i>in vivo</i>	22
2.3.8 Análise estatística	23
2.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	24
2.5 CONCLUSÃO	36
REFERÊNCIAS	37

1 INTRODUÇÃO

1.1 CÉLULA ESPERMÁTICA

Os espermatozoides são produzidos nos testículos, mais especificamente nos túbulos seminíferos, por meio da proliferação e diferenciação de células da linhagem germinativa em um processo chamado de espermatogênese (CELEGHINI et al., 2008; SILVA et al., 2020). A célula espermática é altamente especializada, caracterizando-se por armazenar e transportar o material genético, sendo composta por cabeça, peça intermediária e flagelo (YOSHIDA, 2000; SILVA et al., 2013). A cabeça, armazena o material genético e interage com o oócito no momento da fertilização, a peça intermediária é o local onde concentram-se as mitocôndrias responsáveis pela geração de energia à célula, e o flagelo, garante a capacidade de movimentação espermática (OLIVEIRA et al., 2014; SILVA, GUERRA, 2012).

A cabeça dos espermatozoides tem formato oval e no seu interior encontra-se o núcleo que comporta o material genético do gameta masculino. A cromatina nuclear é altamente condensada e é recoberta pelo acrossoma (GONZÁLEZ, 2002; CELEGHINI et al., 2008; SILVA et al., 2020), o qual contém enzimas hidrolíticas importantes para a penetração do espermatozoide na zona pelúcida e posterior fusão dos pró-núcleos no momento da fertilização (PALACÍN et al., 2020). A membrana plasmática do espermatozoide, além de recobrir toda a extensão da célula, desempenha um papel fundamental na capacidade fertilizante e na manutenção do equilíbrio osmótico (SILVA et al., 2020). É composta por uma bicamada de fosfolípidios, colesterol, glicolípidios e proteínas associadas (SOUZA et al., 2018). Os fosfolípidios de membrana participam de vários eventos metabólicos, como mudanças químicas envolvidas na maturação e capacitação espermática (GONZÁLEZ, 2002).

Os fosfolípidios da membrana dos espermatozoides, quando expostos a diminuição de temperatura, adotam uma conformação cônica, na qual as extremidades hidrofóbicas são externas e as hidrofílicas internas, sendo chamada de forma hexagonal II e/ou micela invertida (SILVA et al., 2020). Ao ocorrer a transição dos fosfolípidios da membrana, em que a mesma passa da fase fluída para a fase cristalina ou em gel, as micelas presentes nos lipídios são invertidas. Contudo, essa conformação pode se tornar persistente, o que acarreta em perda da permeabilidade seletiva da membrana com o estabelecimento de canais que viabilizam a entrada e saída de íons e pequenas moléculas, resultando na desestabilização da membrana espermática e conseqüentemente, danos irreversíveis na viabilidade dos espermatozoides (LEITE et al., 2011).

1.2 CRIOPRESERVAÇÃO DO SÊMEN

A criopreservação do sêmen é amplamente utilizada para maximizar a eficiência reprodutiva de touros de alto mérito genético, através de sua utilização em programas de inseminação artificial (IA), inseminação artificial em tempo fixo (IATF) e na produção *in vitro* de embriões (PIVE), viabilizando a seleção de reprodutores com características desejáveis para a padronização dos rebanhos (LEITE et al., 2011).

Os avanços na criopreservação do sêmen bovino são notórios desde a década de 40, após a descoberta da ação crioprotetora do glicerol, que viabilizou a preservação do sêmen de diferentes espécies (ACIPRESTE et al., 2014). Contudo, sabe-se que mesmo com os melhores protocolos de criopreservação, obtém-se, em média, apenas 50% da viabilidade dos espermatozoides após congelação e descongelação (SILVA et al., 2011).

As etapas de resfriamento, congelação e descongelação do sêmen desencadeiam reações de estresse oxidativo aos espermatozoides, culminando na redução da qualidade espermática, mediante produção excessiva de espécies reativas ao oxigênio (EROs) ou ainda, pela diminuição da concentração e disponibilidade de antioxidantes (SILVA et al., 2013). As EROs podem interagir com inúmeros compostos e moléculas, desempenhando papel de doadores ou receptores de elétrons, sendo eles os principais causadores de danos aos organismos vivos (PINTO et al., 2020).

De maneira semelhante, Branco et al. (2020) relataram que fatores como a composição do meio diluidor, crioprotetores, taxas de congelação e descongelação e a remoção de crioprotetores, afetam a sobrevivência dos espermatozoides no processo de congelação. Ainda, salientaram que mesmo nas melhores condições de processamento do sêmen congelado, em torno de metade dos espermatozoides móveis morrem após a descongelação, e aqueles que sobrevivem podem apresentar alterações funcionais e/ou morfológicas, o que compromete a atividade fertilizante dos gametas.

A célula espermática de mamíferos possuiu grande sensibilidade ao resfriamento rápido, ou seja, passagem da temperatura ambiente até temperatura próxima ao ponto de congelação da água. As crioinjúrias causadas pela redução da temperatura durante o resfriamento até 4° ou 5°C, são denominadas de choque térmico, que acarreta perda da viabilidade dos espermatozoides, com rápida redução da motilidade ou surgimento de padrão anormal do movimento espermático (WATSON, 2000).

Adicionalmente, a redução da temperatura desencadeia à fase de transição dos lipídeos de membrana, a qual passa da fase líquida ou fluida para a cristalina ou em gel, o

que resulta em uma alteração na organização da membrana plasmática, a qual torna-se mais rígida (HOLT, 2000; WATSON, 2000). Dessa forma, se fosse possível eliminar a fase de transição dos lipídeos, a membrana dos espermatozoides permaneceria em seu estado fluido e os danos celulares subsequentes seriam minimizados (LEITE et al., 2011).

Souza et al. (2018) relataram que o colesterol presente na estrutura da membrana plasmática dos espermatozoides, exerce papel fundamental na regulação das funções e, na manutenção da fluidez e permeabilidade da membrana, garantindo sua configuração no estado líquido, quando exposta a baixas temperaturas, minimizando assim, os danos provocados pelo choque térmico durante as etapas de resfriamento, congelação e descongelação do sêmen.

Contudo, deve-se considerar a presença no plasma seminal das proteínas BSP-A1, BSP-A2, BSP-A3 e BSP-30kDa, as quais em conjunto são denominadas de *bovine seminal proteins* (BSP) e constituem um grupo de moléculas que possuem a capacidade de se ligarem aos fosfolipídeos da membrana espermática, atuando na regulação da capacitação dos espermatozoides, por meio da estimulação do efluxo de colesterol e lipoproteínas da membrana plasmática (LEITE et al., 2011). Dessa forma, o plasma seminal no processo de congelação do sêmen, expõe os espermatozoides às BSP, e estas ao desencadear o efluxo de colesterol, tornam a célula espermática mais susceptível aos danos gerados na criopreservação (MANJUNATH et al., 2002).

Leite et al. (2011) relataram que tal efeito pode ser minimizado pelas lipoproteínas de baixa densidade, que são encontradas em crioprotetores extracelulares, como por exemplo, a gema de ovo, o que é justificado ao fato de se ligarem de maneira estável às BSP impedindo seus efeitos nocivos sobre a membrana plasmática.

1.3 ESPÉCIES REATIVAS AO OXIGÊNIO (EROS) E ESTRESSE OXIDATIVO

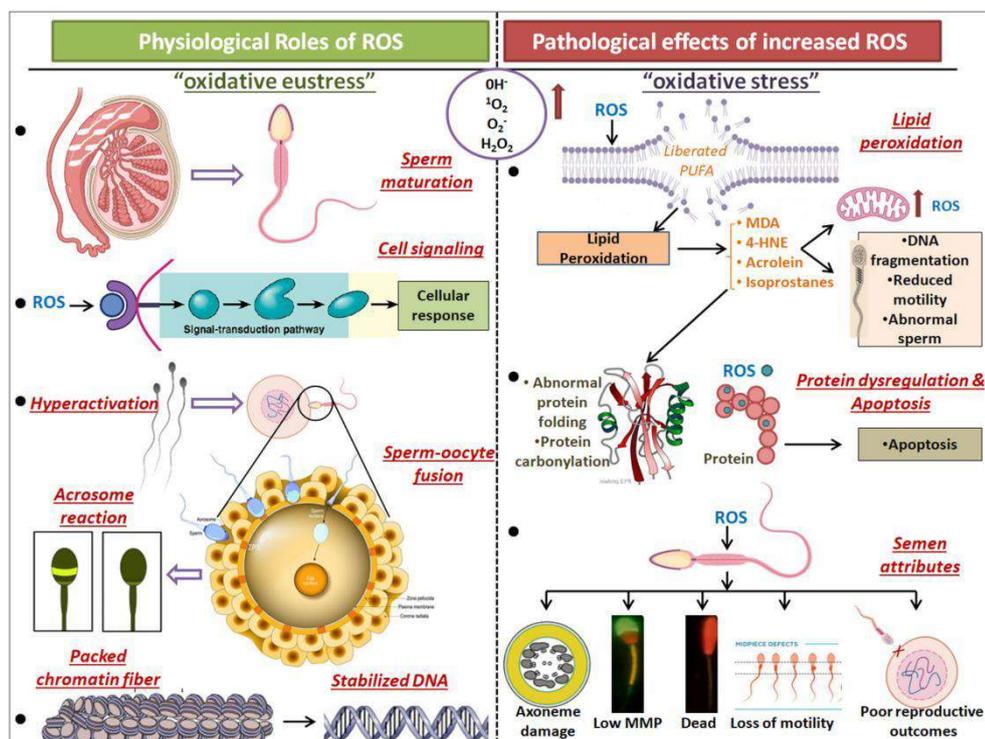
O estresse oxidativo é o resultado do desequilíbrio entre a produção de espécies reativas ao oxigênio (EROs) e os antioxidantes (SOUZA FILHO et al., 2021). Os espermatozoides, como todas as outras células, quando em condições de anaerobiose irão produzir EROs, as quais são provenientes do metabolismo celular (SOUZA et al., 2018).

Ademais, os processos de criopreservação do sêmen intensificam a geração das EROs, desencadeando redução da motilidade espermática, perda da integridade de membrana e redução da capacidade fertilizante dos espermatozoides (HU et al., 2010). A técnica de criopreservação consiste em diluição, resfriamento, congelação, armazenamento e

descongelamento, sendo que todos esses passos estão intimamente relacionados com a estrutura morfológica, funcional e com o metabolismo das membranas (SILVA et al., 2013). Ainda, os processos de diluição do sêmen culminam na redução da concentração e disponibilidade de antioxidantes, resultando em desequilíbrio na proporção oxidantes/antioxidantes, gerando consequentemente, quadros de estresse oxidativo (GUERRA et al., 2012).

Em contrapartida, em baixas concentrações, as EROs atuam na regulação de eventos celulares fisiológicos, como na capacitação espermática e hiperativação dos espermatozoides, na reação acrossomal e na fusão com o oócito (SILVA et al., 2020; BOZZI et al., 2023).

Figura 1: Papel fisiológico das EROs e efeitos patológicos do estresse oxidativo na célula espermática de bovinos



Legenda: EROs: espécies reativas de oxigênio; PUFA: ácido graxo poliinsaturado; MDA: Malondialdeído; 4-HNE: 4-Hidroxinonal; MMP: potencial de membrana da mitocôndria. Fonte: (UPADHYAY et al., 2022).

As EROs são moléculas altamente reativas, que apresentam um ou mais elétrons desapareados, e ao serem produzidas em excesso, maximizam a ocorrência de danos aos fosfolípidios da membrana plasmática e ao DNA espermático (OLLERO et al., 2001). As EROs mais comumente geradas pelo espermatozoide são: o ânion superóxido (O_2^-), o radical hidroxila (OH) e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), sendo a membrana mitocondrial o principal local de produção intracelular (MAIA, BICUDO, 2009; SOUZA et al., 2018).

Os fosfolípidos de membrana dos espermatozoides, durante o estresse oxidativo, são atacados quimicamente pelas EROs, provocando uma reação propagadora de auto-oxidação, que potencializa a formação de novos compostos oxidantes (BORGES et al., 2011). Considerando que a membrana espermática é rica em ácidos graxos poliinsaturados, ela torna-se altamente sensível aos efeitos deletérios do estresse oxidativo (COMHAIRE et al., 1999). Os efeitos nocivos da peroxidação lipídica das membranas incluem a diminuição da concentração de adenosina trifosfato (ATP), perda de motilidade, comprometimento da integridade da membrana plasmática, danos ao DNA, alterações na morfologia e redução da capacidade de fusão com o oócito (LEITE et al., 2011).

A fim de reduzir os efeitos prejudiciais das EROs sobre as células espermáticas, estão sendo sugeridos métodos alternativos para melhorar a qualidade do sêmen após a criopreservação (SAVI et al., 2015). A adição de crioprotetores aos diluentes seminais é fundamental para garantir a viabilidade dos espermatozoides durante os processos de congelação e descongelação do sêmen (RIBEIRO et al., 2022).

1.4 ANTIOXIDANTES

Os antioxidantes são moléculas e/ou substâncias que atuam no combate e neutralização dos efeitos nocivos do estresse oxidativo, sendo capazes de converter as EROs em água, bloqueando assim as reações de auto-oxidação (AGARWAL et al., 2005), desempenhando importante papel na proteção dos sistemas biológicos (SOUZA et al., 2018). No processo de criopreservação, a adição de compostos antioxidantes ao meio diluidor do sêmen, objetiva reduzir as crioinjúrias causadas durante a congelação e descongelação (SILVA et al., 2013).

O papel de defesa dos antioxidantes, é determinado por três mecanismos principais, a prevenção, que bloqueia a produção de EROs; interceptação, que interrompe a reação em cadeia de auto-oxidação e, a reparação, na qual os danos causados pelo estresse oxidativo são corrigidos e reparados (LOPES et al., 2016). Além disto, o sistema de defesa antioxidante é dividido em sistema enzimático e não-enzimático e ambos protegem o organismo contra as EROs (SOUZA et al., 2018; BRANCO et al., 2020).

Os antioxidantes endógenos presentes nos espermatozoides e no plasma seminal, são compostos por enzimas com ação antioxidante, como a glutathione redutase (GSH), glutathione

peroxidase (GSH-Px), catalase (CAT) e superóxido dismutase (SOD), as quais atuam em linhas de proteção celular, combatendo a lipoperoxidação e apoptose espermática (BILODEAU et al., 2000; BRANCO et al., 2020).

Borges et al. (2011) relataram que na espécie bovina, foram observadas no plasma seminal enzimas como a GSH-Px, SOD e CAT, sendo a catalase encontrada em baixas concentrações. Já nos espermatozoides, encontrou-se principalmente SOD e baixos níveis de GSH-Px. Não foi verificado a presença da catalase na célula espermática de bovinos, diferentemente de outras espécies, como em humanos e ovinos (BILODEAU et al., 2000).

Já os antioxidantes não enzimáticos, classificam-se como vitaminas e mineiras, como a vitamina C, vitamina E, selênio e outros, que atuam na remoção das moléculas oxidantes ou como reparadores das injúrias provocadas pelo estresse oxidativo (RIBEIRO et al., 2022).

Diante do exposto, nota-se que a defesa antioxidante primária dos espermatozoides contra ação das EROs, origina-se no citoplasma celular. Contudo, a célula espermática perde grande parte do conteúdo citoplasmático durante a espermatogênese durante a etapa de diferenciação, resultando em perda significativa do número de enzimas antioxidantes, o que desencadeia a maior sensibilidade dos espermatozoides ao estresse oxidativo (BUCAK et al., 2007). Esse processo é agravado pela rica constituição de ácidos graxos poliinsaturados da membrana plasmática dos espermatozoides, que são naturalmente mais susceptíveis ao quadro de peroxidação lipídica (SOUZA et al., 2018). Tais características são as responsáveis pela redução da integridade, disfunção espermática e diminuição da capacidade fertilizante dos espermatozoides após os processos de criopreservação do sêmen (BUCAK et al., 2007).

Neste contexto, é importante a realização de estudos sobre a adição de compostos antioxidantes ao meio diluidor do sêmen, como forma de estabelecer a concentração adequada destes compostos, a fim de mitigar os efeitos deletérios do estresse oxidativo, sendo capaz de maximizar a viabilidade espermática e aprimorar capacidade de fertilização dos espermatozoides após congelação e descongelação (BRANCO et al., 2020).

Com base no exposto, o presente estudo avaliou a viabilidade *in vitro* e *in vivo* do sêmen criopreservado acrescido de extrato natural (NP) com potencial antioxidante, após congelação e descongelação. O delineamento experimental e os resultados encontrados, estão organizados no formato de artigo científico, o qual está descrito no capítulo 01.

2 CAPÍTULO 1 - SÊMEN BOVINO CONGELADO E DESCONGELADO ACRESCIDO DE EXTRATO NATURAL: CINÉTICA DE MOVIMENTO, VIABILIDADE ESPERMÁTICA E TAXAS DE GESTAÇÃO APÓS IATF

2.1 RESUMO

A inseminação artificial apresenta vantagens que torna sua utilização benéfica e lucrativa nos rebanhos bovinos, destacando os avanços na utilização de sêmen criopreservado e a preservação do material genético. No entanto, as técnicas de criopreservação estão sendo aprimoradas, com o intuito de reduzir as perdas de espermatozoides viáveis durante todo processo. Os antioxidantes são substâncias que combatem e neutralizam os efeitos deletérios causados pelos radicais livres no sêmen criopreservado. O objetivo desse estudo foi avaliar a viabilidade *in vitro* e *in vivo* do sêmen acrescido de um extrato natural (NP) com potencial antioxidante, após congelação e descongelação. Para tanto, um bovino reprodutor, da raça Braford, foi submetido a nove coletas de sêmen, com intervalo de quinze dias. As amostras foram submetidas a avaliação de pré-congelação pelo sistema CASA (IVOS-II[®], Hamilton Thorne) para certificação da viabilidade espermática, e então diluídas em Tris-hidroximetilaminometano e gema de ovo, acrescidas de NP de acordo com o grupo experimental: Grupo 1: controle, apenas diluente; Grupo 2: diluente com 0,5% de NP; Grupo 3: diluente mais 0,75% de NP e o Grupo 4: diluente com 1,0% de NP. O sêmen de cada grupo foi envasado em palhetas de 0,25mL e submetido ao método de congelação convencional. Duas semanas após a congelação, duas palhetas de cada grupo experimental foram descongeladas (37°C, por 30 segundos) e avaliadas quanto à viabilidade e cinética espermática (CASA; IVOS-IIR[®], Hamilton Thorne). Ademais, avaliou-se parâmetros referentes à morfologia espermática, por esfregaço corado, e a integridade de membrana plasmática dos espermatozoides utilizando a associação de sondas fluorescentes de iodeto de propídeo e diacetato de β -carboxifluoresceína. O sêmen congelado, foi utilizado para a inseminação artificial de 68 fêmeas bovinas, previamente submetidas a protocolo de sincronização hormonal para a IATF. O percentual de espermatozoides móveis e progressivos foi maior no grupo controle fresco, com valores de 87,57% e 43,77%, respectivamente. De maneira semelhante, o percentual de espermatozoides estáticos foi menor no sêmen fresco (12,42%). Os parâmetros de velocidade da cinética espermática, no grupo controle fresco diferiu dos demais grupos analisados, tendo valores de VAP, VCL e VSL superiores. Os valores de BCF não diferiram entre os grupos experimentais avaliados. Não houve diferença entre os valores de defeitos individuais e totais nos grupos experimentais avaliados nesse estudo, bem como no percentual de espermatozoides íntegros, semi-lesados e lesados. Em relação à taxa de gestação, os resultados indicaram 70,59% (12/17), 77,78% (14/18), 50,00% (08/16) e 70,59% (12/17) nos Grupos 1 (Controle), 2, 3 e 4, respectivamente. Concluiu-se que a adição do extrato natural com capacidade antioxidante no diluente de sêmen submetido a criopreservação não prejudicou a cinética de movimento, a viabilidade espermática e/ou a taxa de gestação.

Palavras-chave: Criopreservação; Estresse oxidativo; Membrana plasmática; Eficiência reprodutiva.

2.2 INTRODUÇÃO

A utilização em grande escala de biotecnologias da reprodução viabilizou a obtenção de animais geneticamente superiores, bem como a padronização dos rebanhos e maximização da eficiência produtiva e reprodutiva dos plantéis (BOZZI et al., 2023). De maneira semelhante, a comercialização de sêmen bovino criopreservado vem crescendo nos últimos anos, uma vez que, as técnicas de congelação espermática permitem o rápido avanço genético dos rebanhos comerciais, mediante sua incorporação em programas de inseminação artificial (IA), inseminação artificial em tempo fixo (IATF) e produção *in vitro* de embriões (LEITE et al., 2011; RIBEIRO et al., 2022).

Ademais, a criopreservação do sêmen apresenta inúmeras vantagens, dentre elas o armazenamento do material genético por longos períodos, diminuição dos custos com aquisição e transporte de reprodutores, rápida perpetuação de características genéticas desejáveis e redução da propagação de doenças venéreas transmissíveis entre os rebanhos bovinos (BORGES et al., 2020). É sabido que estudos têm sido desenvolvidos, sobre a sincronização hormonal do ciclo estral de fêmeas bovinas, buscando otimizar as taxas de gestação, mediante implantação de programas de IATF. Contudo, é válido ressaltar que a qualidade do sêmen utilizado em biotecnologias da reprodução assistida, é essencial para a obtenção de melhores taxas de gestação (DUARTE JÚNIOR et al., 2015).

As taxas de gestação podem ser afetadas pela utilização de sêmen congelado, o que é atribuído aos danos desencadeados pelos protocolos às células espermáticas, resultando em número considerável de espermatozoides que não resistem aos processos da criopreservação (RIBEIRO et al., 2022). Partindo do exposto, sabe-se que existem diferenças na viabilidade entre o sêmen fresco e criopreservado, uma vez que, a utilização de sêmen fresco confere maiores taxas de gestação, enquanto o sêmen congelado oferece maior flexibilidade quanto ao seu uso. Contudo, após a descongelação são perceptíveis alterações na viabilidade espermática, em decorrência do intenso estresse térmico, químico, mecânico e osmótico (BARCELOS, SAVI, 2022).

A criopreservação espermática conta com as etapas de resfriamento, congelação e descongelação, as quais são capazes de desencadear diferentes graus de injúrias celulares, que podem resultar em redução da motilidade e integridade da membrana espermática,

levando a um decréscimo significativo da viabilidade e capacidade fertilizante dos espermatozoides (SOUZA et al., 2019; VARELA-GIRALDO et al., 2022).

O processo de criopreservação induz a geração contínua e excessiva de espécies reativas ao oxigênio (EROs), substâncias formadas a partir da reação de redução das moléculas de oxigênio, que são prejudiciais aos espermatozoides e contribuem para a ocorrência de danos celulares, provocando alterações de motilidade, danos ao DNA e as membranas espermáticas (STRADAIOLI et al., 2007; BORGES et al., 2020). Ademais, os danos oxidativos são causados pela produção excessiva de EROs, especialmente o ânion superóxido (O_2^-), o radical hidroxila (OH) e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), os quais induzem mecanismos de peroxidação lipídica, resultando em alterações estruturais e na permeabilidade das membranas celulares, o que acarreta em modificações da função, e conseqüentemente, disfunção espermática, redução da motilidade e fertilidade dos espermatozoides (DUARTE JÚNIOR et al., 2015).

É de conhecimento que os espermatozoides são susceptíveis a danos causados por EROs em virtude da maior concentração de ácidos graxos poli-insaturados em sua membrana plasmática (BOZZI et al., 2023). Além disso, possuem quantidades insuficientes de enzimas citoplasmáticas com função antioxidante para neutralizar o excesso das espécies reativas ao oxigênio, o que aumenta a predisposição à danos celulares, os quais podem culminar em morte celular (AITKEN, BAKER, 2004).

Dessa forma, a fim de minimizar a ação deletéria das EROs sobre as células espermáticas, têm-se sugerido métodos alternativos para potencializar a qualidade do sêmen após a criopreservação (SAVI et al., 2015). A adição de crioprotetores aos diluentes seminais, possui grande relevância na sobrevivência dos espermatozoides no processo de congelação e descongelação do sêmen (RIBEIRO et al., 2022). Neste contexto, estudos em torno da utilização de compostos antioxidantes nos meios diluidores são de grande relevância para elucidar a melhor concentração a ser adicionada ao sêmen, a fim de controlar os efeitos do estresse oxidativo e melhorar os parâmetros espermáticos pós-descongelação de motilidade e capacidade fertilizante (BRANCO et al., 2020).

Os antioxidantes são substâncias como vitamínicas, minerais, aminoácidos, ácidos graxos e outros compostos vegetais, que possuem papel no combate e/ou de neutralização dos efeitos nocivos causados pelas EROs no sêmen criopreservado, por serem capazes de proteger a membrana plasmática dos espermatozoides, garantindo sua viabilidade e atividade metabólica, bloqueando a peroxidação lipídica, que promove danos irreversíveis à célula espermática (SILVA et al., 2013).

Estudos tem demonstrado um efeito promissor na melhoria da preservação espermática com adição de extratos naturais de plantas no diluente seminal de várias espécies animais, os quais são abundantes em compostos fenólicos, tocoferóis e flavonóides, que podem fornecer equilíbrio osmótico e crioproteção aos espermatozoides (ZHONG, ZHOU, 2013). Leite et al. (2011), ao analisarem os danos causados pelo estresse oxidativo no sêmen de touros de corte, observaram alta correlação negativa entre a peroxidação lipídica das membranas e a redução da motilidade e viabilidade espermática, demonstrando que o declínio de tais parâmetros é maior conforme a peroxidação torna-se mais intensa. Além do mais, observaram correlação positiva na preservação da qualidade espermática quando se aumenta a concentração de enzimas antioxidantes no sêmen, como a superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), Glutathione peroxidase (GSH) e Glutathione reduzida (GR), as quais possuem ação na redução da suscetibilidade espermática sob as condições de criopreservação (BRANCO et al., 2020).

A *Carya illinoensis*, conhecida como noqueira que produz fruto a noz pecã, apresenta elevado teor de ácidos graxos monoinsaturados em suas nozes e casca, com grande potencial antioxidante, o que é atribuído à sua alta concentração de compostos fenólicos e taninos condensados (AMARAL et al., 2019). A utilização do extrato aquoso da casca de noz pecã como antioxidante é abordada por Benvegnú et al. (2010), em estudos com ratos submetidos ao tratamento com quimioterápicos, no qual, a noz pecã mostrou-se eficaz na redução dos efeitos deletérios dos ROS provocados no tratamento de câncer. Ainda, os autores relatam, que o principal constituinte do extrato aquoso da *Carya illinoensis*, é o ácido gálico (GA), correspondente a 1,8 gramas para cada 100 gramas do extrato. De acordo com Gungor et al. (2021), o ácido gálico (ácido 3,4,5-tri-hidroxibenzoico) encontra-se em algumas plantas com ácidos orgânicos, como na sementes de uvas, alfarrobas, morangos, nozes e entre outros compostos. Caracteriza-se por apresentar propriedades antioxidantes, antifúngicas e antivirais (BAKI et al., 2024).

Adicionalmente, o GA é utilizado como componente primário em diversos compostos medicinais (GHADIMI et al., 2024). A presença de ésteres em sua constituição é o que confere seu papel de redução dos danos celulares provocados pelo estresse oxidativo (ALHAZMI et al., 2024).

Sendo assim, a avaliação da adição de antioxidantes no sêmen porta-se como uma ferramenta de relevância, uma vez que, eles atuam fortemente no bloqueio das espécies reativas ao oxigênio, otimizando a qualidade do sêmen criopreservado e conseqüentemente as taxas de gestação de rebanhos bovinos.

Diante disso, objetivou-se com este estudo avaliar a viabilidade *in vitro* e *in vivo* do sêmen criopreservado acrescido de extrato natural (NP) com potencial antioxidante, após congelação e descongelação.

2.3 MATERIAL E MÉTODOS

2.3.1 Local e animais

O estudo foi realizado no Laboratório de Reprodução Animal - LABRA, da Superintendência Unidade Hospitalar Veterinária Universitária (SUHVU), Universidade Federal da Fronteira Sul, *Campus* Realeza, Paraná, após aprovação pela Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA, sob protocolo n°437302124.

Para tanto, um bovino reprodutor da raça Braford, hígado e em idade reprodutiva, com escore de condição corporal (ECC) 3-4, seguindo a escala de 1-5, proposta por Meneghetti e Vasconcelos (2008), foi submetido a nove coletas de sêmen, após avaliação andrológica (CBRA, 2013).

2.3.2 Coleta e Processamento do sêmen

Para as coletas de sêmen, o reprodutor foi contido em tronco, a fim de garantir as boas práticas de manejo, segurança do animal e manipuladores.

Foram realizadas nove coletas de sêmen, com intervalo de quinze dias, mediante eletroejaculador (DUBOI®). Após a contenção do animal, realizou-se a higienização da região prepucial, tricotomia, lavagem do prepúcio e região adjacente com solução de Cloreto de Sódio (0,9%) e secagem com papel toalha. Na sequência, foi realizada a limpeza do reto do animal, com a remoção do excesso de fezes e posicionamento do probe do eletroejaculador, com os eletrodos direcionados para a mucosa ventral do reto.

Em seguida, procedeu-se a liberação das correntes elétricas, geradas de forma pulsante, estimulando os centros nervosos da ejaculação (CBRA, 2013). O sêmen foi depositado em tubos plásticos graduados do tipo Falcon de 15mL e avaliado no sistema computadorizado de análise espermática - CASA (IVOS-IIR®, Hamilton Thorne), para avaliação da viabilidade espermática.

Posteriormente, o sêmen foi diluído em diluidor TRIS-gema de ovo, preparado de acordo com Crespilho et al. (2006), com a seguinte formulação: Tris (Tris hidroximetilaminometano): 2,42 gramas; ácido cítrico: 1,34 gramas; Glicerol: 06mL; Glicose: 1,0 gramas

e gema de ovo: 10mL. Para tanto, utilizou-se uma balança de precisão para a pesagem dos componentes que foram dissolvidos em 100mL de água ultrapura (Milli-Q®).

Após certificação da viabilidade espermática, o sêmen diluído foi acrescido de um extrato natural com potencial antioxidante (NP), de acordo com o grupo experimental, como se segue:

- Grupo 1: Controle, sêmen diluído;
- Grupo 2: Sêmen diluído, acrescido de 0,5% de extrato natural – NP
- Grupo 3: Sêmen diluído, acrescido de 0,75% de extrato natural – NP
- Grupo 4: Sêmen diluído, acrescido de 1% de extrato natural – NP

2.3.3 Preparação do extrato natural (NP)

As cascas do composto natural (NP) foram cedidas pela empresa Divinut, localizada no município de Cachoeira do Sul, no estado do Rio Grande do Sul. Para obtenção do extrato aquoso do NP, as cascas foram lavadas em água corrente e, posteriormente submetidas à secagem em estufa à 36°C, por 24 horas. Quando secas, elas foram trituradas em almofariz de porcelana e pistilo, e na sequência, mediante balança de precisão, pesadas 50 gramas das cascas do NP.

O extrato foi obtido no Laboratório de Química da Universidade Federal da Fronteira Sul – *campus* Realeza, usando o extrator Soxhlet, utilizando como solvente 250 mL de água destilada. Haja vista que, o ciclo de extração do extrato aquoso (NP) se deu por completo após quatro horas do início da extração, seguindo a metodologia proposta por Amaral et al. (2019).

2.3.4 Avaliação da propriedade antioxidantes do NP

Realizou-se avaliação das propriedades antioxidantes NP utilizando o método DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil), consoante ao estudo de Brand-Willian et al. (1995). Inicialmente, procedeu-se com o preparo do radical, adicionando 0,1mm-0,03943g do reativo DPPH dissolvido em 10mL de metanol 80%. Em seguida, realizou-se a adição de 2,9mL do radical preparado, em tubo de ensaio com 0,1mL do NP.

As amostras do radical acrescidas de NP foram mantidas em repouso e após 30 minutos foi realizada a leitura de absorbância inicial e absorbância final após 24 horas, mediante espectrofotômetro a 515nm. O cálculo de porcentagem de inibição do NP sobre o radical, foi realizado utilizando-se a seguinte fórmula:

$$\% \text{ inibição do radical} = \frac{1 - AF}{Ao} \times 100$$

Onde: “Ao” refere-se a absorvância inicial e “AF” se refere a absorvância final. Após esta etapa o NP passou a ser adicionado ao sêmen bovino fresco diluído e resfriado.

2.3.5 Compatibilidade e toxicidade do NP

A avaliação da compatibilidade e da toxicidade do NP no sêmen bovino, foi investigada por Cavalheiro et al. (2023), em estudo preliminar, com base na avaliação de parâmetros referentes à cinética, velocidade, trajetória e morfologia espermática, após diluição do sêmen fresco e adição da concentração máxima (1,0% do NP), no sêmen bovino resfriado.

2.3.6 Criopreservação do sêmen

O sêmen diluído, em cada grupo experimental, foi envasado manualmente em palhetas de 0,25mL, identificadas previamente de acordo com o grupo experimental e número de coleta, contendo em média 10×10^6 espermatozoides viáveis por dose. As palhetas foram vedadas com álcool polivinílico e submetidas ao método de congelação convencional. Foram envasadas 20 palhetas por grupo experimental, totalizando 80 palhetas por coleta, totalizando 720 palhetas no experimento.

Após o envase, todas as palhetas foram resfriadas por quatro horas, em caixas isotérmicas (Botuflex®), com o intuito de atingir temperatura de 4°C, com taxa de resfriamento de menos 0,14°C/minuto. Após as quatro horas de resfriamento, as caixas isotérmicas foram abertas, e as palhetas submetidas ao pré-congelação em vapor de nitrogênio por 12 minutos, mantidas horizontalmente a uma distância de três a quatro centímetros da lâmina de nitrogênio e, em então submersas em nitrogênio líquido a -196°C (SALISBURY, et al., 1978), e armazenadas em botijão criogênico.

2.3.7 Estudo in vitro:

2.3.7.1 Avaliação da cinética espermática:

Duas semanas após congelação, duas palhetas de cada grupo experimental foram descongeladas em banho-maria (37°C, por 30 segundos), homogeneizadas em tubos

ependorff e avaliadas pelo sistema CASA (IVOS-IIR®, Hamilton Thorne), considerando os parâmetros referentes à cinética, trajetória e velocidade espermática, como: motilidade (%), motilidade progressiva (%), células estáticas (%), células lentas (%), distância do percurso médio (DAP - $\mu\text{m}/\text{seg}$), velocidade de percurso média (VAP - μm), velocidade curvilínea (VCL - $\mu\text{m}/\text{seg}$), velocidade em linha reta (VSL - $\mu\text{m}/\text{seg}$) distância curvilínea (DCL - $\mu\text{m}/\text{seg}$), distância em linha reta (DSL - $\mu\text{m}/\text{seg}$), linearidade (LIN - $\mu\text{m}/\text{seg}$), índice de oscilação da célula (WOB %), amplitude lateral da cabeça (ALH - $\mu\text{m}/\text{seg}$), retidão (STR - $\mu\text{m}/\text{seg}$) e frequência de batimento flagelar (BCF - Hz).

2.3.7.2 Morfologia espermática:

Foram avaliados parâmetros referentes à morfologia espermática, utilizando a coloração Vermelho Congo (CBRA, 2013). Para preparação do corante, utilizou-se 100mL de solução aquosa saturada de vermelho congo e 100mL de solução aquosa a 0,5% de violeta genciana. Após preparo do corante realizou-se esfregaço delgado de sêmen de cada grupo experimental, em lâmina pré-aquecida.

Na sequência, a lâmina foi imersa em solução de vermelho congo por um minuto e lavada suavemente em água corrente, seca ao ar, submersa em solução violeta genciana por 30 segundos, lavada suavemente em água corrente e seca ao ar (CBRA, 2013).

Para cada grupo experimental foram preparadas duas lâminas e avaliadas 200 células espermáticas. A contagem e avaliação dos espermatozoides foi realizada por três avaliadores, com auxílio de microscópio óptico (Olympus® CX23), em aumento de 1000x. Para as alterações espermáticas, considerou-se a classificação de Barth e Oko (1989), que as divide em defeitos maiores, menores e totais, sendo agrupadas de acordo com a sua localização em defeitos de acrossoma, cabeça, peça intermediária e cauda.

2.3.7.3 Integridade de membrana plasmática:

Para avaliação da integridade de membrana plasmática dos espermatozoides, após congelamento e descongelamento do sêmen nos diferentes grupos experimentais, utilizou-se a associação das sondas fluorescentes de Iodeto de Propídeo - PI (P4170, 25mg, Sigma-Aldrich®, Brasil Ltda) e Diacetato de β -carboxifluoresceína - CFDA (C5041, 25mg, Sigma-Aldrich®, Brasil Ltda). Para o preparo e diluição das sondas, foram utilizados os protocolos descritos no Quadro 1.

Quadro 1: Descrição dos protocolos para preparo das soluções das sondas fluorescentes de iodeto de propídeo e diacetato de β -carboxifluoresceína.

SOLUÇÕES	PROTOCOLOS
Solução de estoque - PI (corante vermelho)	Diluir 25mg de iodeto de propídeo em 50 mL de solução salina (0,9% NaCl). Congelar a -20°C , mantendo no escuro
Solução de estoque - CFDA (corante verde)	Diluir 25mg de diacetato de β -carboxifluoresceína em 54,34 mL de Dimetilsulfóxido (DMSO). Congelar a -20°C , mantendo no escuro
Solução de trabalho	Foram descongeladas em banho maria seco as soluções de diacetato de β -carboxifluoresceína e iodeto de propídeo (37°C , por 10 minutos). Posteriormente, em tubo <i>ependorf</i> foram adicionados: 1,0 mL de solução de Citrato de Sódio (2,96%); 130 μL de iodeto de propídeo; 30 μL de diacetato de β -carboxifluoresceína e, 20 μL de solução formol salino

Fonte: Harrison & Sally (1990).

Após o preparo de cada protocolo, adicionou-se 45 μL da solução de trabalho a 20 μL do sêmen criopreservado previamente diluído em Citrato de Sódio (diluição 2:1). Na sequência, realizou-se uma preparação úmida entre lâmina e lamínula e 200 espermatozoides foram imediatamente avaliados e classificados quanto ao padrão de coloração, em microscópio de epifluorescência invertido (Nikon[®] Eclipse Ts2), com aumento de 1000x, em filtro de excitação 400-570 nm e emissão de 460-610 nm.

Para a avaliação da integridade de membrana espermática, considerou-se a classificação de Garner et al. (1986), em que espermatozoides com a membrana plasmática íntegra foram corados de verde, aqueles com a membrana lesada de vermelho e, espermatozoides com membrana semi-lesada foram corados com ambas as colorações.

2.3.8 Estudo *in vivo*

O sêmen congelado foi utilizado para IATF de 68 fêmeas bovinas, púberes, da raça Nelore, híidas, mantidas a pasto, água *ad libitum*, com idade entre três e 10 anos, previamente submetidas a protocolo de sincronização hormonal, em propriedades, localizadas no município de Realeza, Paraná.

A escolha das doses dos diferentes grupos experimentais no momento da inseminação artificial foi ao acaso. Concomitantemente, realizou-se a avaliação do escore da condição corporal das vacas, seguindo a escala proposta por Meneghetti e Vasconcelos (2008). Para a IATF, foi utilizado protocolo de sincronização hormonal de quatro manejos, como se segue:

- D0 - dia zero: inserção do implante intravaginal de Progesterona (1g) (Sincrogest[®]) + administração de 2mg Benzoato de Estradiol (Sincrodiol[®]) por via intramuscular (IM);
- D8 - dia oito: remoção do implante de Progesterona + administração de 0,5mg Prostaglandina (Sincronize[®]) + 300 UI de Gonadotrofina Coriônica Equina (Novormon[®]), por via intramuscular (IM);
- D9 - dia nove: administração de 0,01mg de Hormônio Liberador de Gonadotrofina (Gestran Plus[®]), por via intramuscular (IM), e
- D10 - dia dez: IA realizada por profissional treinado e qualificado.

Aos 45 dias após a IATF foi realizado o diagnóstico de gestação, mediante ultrassonografia, sendo considerada gestação a presença de vesícula embrionária, embrião e/ou batimento cardíaco fetal.

2.3.9 Análise estatística

Os dados foram submetidos a análise de variância pelo procedimento proc GLM, sendo o modelo matemático adotado:

$$Y_{ijk} = \mu + T_j + \epsilon_{ijk}$$

em que: Y_{ij} representa as variáveis dependentes; μ a média geral das observações; T_i efeito do tratamento utilizado; e ϵ_{ij} o erro residual aleatório. Os parâmetros foram submetidos ao Teste F, e quando observadas diferenças entre os tratamentos avaliados as médias foram comparadas pelo Teste Tukey, com $p < 0,05$. As análises estatísticas foram realizadas através do pacote estatístico Statistical Analysis System, versão 9.2 (SAS, 2009). A taxa de gestação foi calculada e apresentada de forma descritiva.

2.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Tabela 1 apresenta os parâmetros de motilidade do sêmen bovino fresco e após congelamento/descongelamento. Observa-se que o percentual de espermatozoides móveis e progressivos foi maior no grupo fresco, com valores de 87,57% e 43,77%, respectivamente, quando comparado ao grupo controle descongelado, e aos grupos acrescidos do extrato natural (NP) em diferentes concentrações. Celeghini et al. (2008) relataram achados semelhantes, com maior motilidade total e progressiva superior no sêmen fresco, ressaltando que a criopreservação altera a motilidade da célula espermática.

Diferentemente, Gungor et al. (2019), ao avaliarem o efeito da adição do ácido gálico no diluente seminal de carneiros, evidenciaram maior motilidade total no grupo suplementado com 2mM de GA, quando comparado ao grupo controle ($p < 0,05$). O que também foi relatado pelos autores em estudo realizado com sêmen criopreservado de touros, que ao adicionarem 50µg/mL e 100µg/mL de ácido gálico no sêmen diluído, observaram maior motilidade progressiva em relação ao grupo controle ($p < 0,05$) (GUNGOR et al., 2021).

Tabela 1: Motilidade do sêmen bovino fresco e após descongelamento, utilizando-se um extrato natural (NP) em diferentes concentrações no meio diluidor.

Grupos experimentais	Espermatozoides			
	Móveis (%)	Progressivos (%)	Estáticos (%)	Lentos (%)
Fresco	87,57 ^a	43,77 ^a	12,42 ^b	0,48 ^a
Controle descongelado	34,26 ^b	17,98 ^b	65,73 ^a	0,93 ^a
NP 0,5% descongelado	33,80 ^b	21,05 ^b	66,20 ^a	0,85 ^a
NP 0,75% descongelado	33,02 ^b	20,11 ^b	66,97 ^a	0,77 ^a
NP 1,0% descongelado	28,60 ^b	16,94 ^b	71,40 ^a	0,70 ^a

^{ab}Valores seguidos por letras diferentes, na mesma coluna, diferem ($p < 0,05$).

De maneira semelhante, o percentual de espermatozoides estáticos foi menor no sêmen fresco (12,42%), em relação aos demais grupos experimentais. Gupta et al. (2022) ao avaliarem o potencial antioxidante e crioprotetor da Curcumina no sêmen bovino criopreservado, evidenciaram uma redução do número de espermatozoides móveis, bem como diminuição dos parâmetros de velocidade e trajetória da cinética espermática, a medida que aumentavam as concentrações do composto natural acrescido ao diluidor seminal. Evidências semelhantes às de Gupta e colaboradores foram encontradas nesse estudo.

Apesar dos protocolos de criopreservação do sêmen bovino serem bem estabelecidos, viabilizado sua aplicação comercial em programas de reprodução assistida, os mesmos

desencadeiam uma redução significativa no número de espermatozoides viáveis (CELEGHINI et al., 2008), resultando em disfunção da célula espermática com perdas de aproximadamente 50% da motilidade e 60% da integridade de membrana dos espermatozoides (WATSON, 2000; MARQUI et al., 2023). Assim, a utilização de compostos antioxidantes adicionados ao meio diluidor do sêmen bovino, tem por objetivo neutralizar os efeitos deletérios das EROs geradas durante a criopreservação espermática (SAPANDIOU et al., 2022).

Alam et al. (2024), ao avaliarem o efeito do extrato de *Cinnamomum zeylanicum*, como antioxidante no sêmen criopreservado de búfalos, evidenciaram melhora nos parâmetros de motilidade progressiva, percentual de espermatozoides vivos e HOS-positivos, além da diminuição da porcentagem de anormalidades no sêmen após congelação e descongelação. No entanto, nesse estudo, em condições semelhantes, a adição de NP ao meio diluidor não afetou os parâmetros citados.

Já Assunção et al. (2021), observaram aumento na motilidade progressiva dos espermatozoides ($p < 0,01$), ao realizarem a suplementação com 0,05 mM de resveratrol, quando comparado ao grupo não suplementado e ao grupo suplementado de 1,0 mM de resveratrol. Dessa forma, os autores disseram que o efeito da adição do resveratrol nos parâmetros da cinética espermática é dose-dependente. Ademais, salientaram a importância da avaliação da motilidade total e progressiva, imediatamente após a descongelação do sêmen como forma de prever a fertilidade dos espermatozoides bovinos. Ao se considerar as observações de Assunção et al. (2021), o aumento da dose de NP utilizada também não afetou a motilidade progressiva dos espermatozoides congelados/descongelados (Tabela 1).

Nos parâmetros de velocidade da cinética espermática, os espermatozoides do grupo fresco diferiram dos demais grupos analisados, tendo valores de VAP, VCL e VSL superiores (Tabela 2), concordando com os achados de Celeghini et al. (2008) e Correa et al. (2024).

O que corrobora com Gungor et al. (2021), que ao avaliarem a adição de diferentes concentrações de ácido gálico no sêmen bovino congelado e descongelado, evidenciaram maior valor de VAP no grupo suplementado com 200 µg/mL de GA, em contrapartida, os autores relataram menores valores de VSL e VCL no grupo controle, quando comparados aos grupos suplementados ($p < 0,05$). Já Mehdipour et al. (2022), ao pesquisarem os efeitos da rosiglitazona no sêmen de carneiros após congelação e descongelação, sob a cinética e viabilidade espermática, observaram que a rosiglitazona na concentração de 60 µM foi capaz de aumentar os valores de VAP, VCL e VSL ($p < 0,05$).

Mortimer et al. (2000) relataram que os indicadores de velocidade (VAP, VCL e VSL) definem quantitativamente a velocidade do movimento espermático. Nota-se assim, com base nos resultados desse estudo, que o processo de congelação e descongelação provocaram redução da velocidade do movimento espermático, uma vez que, possivelmente, os espermatozoides apresentaram grande sensibilidade ao resfriamento rápido, sendo susceptíveis a crioinjúrias provocadas pela redução da temperatura nos protocolos de criopreservação, o que acarretou em perda da viabilidade, com redução da motilidade e/ou surgimento de padrão anormal do movimento espermático, como descrito por Watson (2000). Além disso, a alta sensibilidade espermática ao estresse oxidativo após os processos de congelação e descongelação intensifica o declínio da viabilidade e da capacidade fertilizantes dos espermatozoides (CORREA et al., 2024).

Tabela 2: Cinética da velocidade espermática no sêmen bovino a fresco e após descongelação, utilizando-se um extrato natural (NP) em diferentes concentrações no meio diluidor.

Grupos experimentais	Parâmetros de velocidade espermática avaliados		
	VAP	VCL	VSL
Fresco	136,42 ^a	266,1 ^a	101,38 ^a
Controle descongelado	78,83 ^b	137,29 ^b	65,37 ^b
NP 0,5% descongelado	87,17 ^b	155,11 ^b	74,89 ^b
NP 0,75% descongelado	86,48 ^b	161,77 ^b	73,08 ^b
NP 1,0% descongelado	90,15 ^b	164,78 ^b	72,16 ^b

^{ab}Valores seguidos por letras diferentes, na mesma coluna, diferem ($p < 0,05$).

Legenda: **VAP:** Velocidade de Percurso Médio ($\mu\text{m}/\text{seg}$); **VCL:** Velocidade Curvilínea ($\mu\text{m}/\text{seg}$) e **VSL:** Velocidade em Linha Reta ($\mu\text{m}/\text{seg}$).

Sharafi et al. (2022) propuseram classificar os indicadores de velocidade dos espermatozoides em imóveis, aqueles com $VCL < 40 \mu\text{m}/\text{seg}$, lentos com VCL entre 40 e 80 $\mu\text{m}/\text{s}$, médios com VCL entre 80 e 150 $\mu\text{m}/\text{s}$ e rápidos com $VCL > 150 \mu\text{m}/\text{s}$. Ao se considerar esses indicadores, observou-se que os espermatozoides do grupo controle, após descongelação, foram considerados espermatozoides com velocidade média, com valor de VCL numericamente inferior (137,29 $\mu\text{m}/\text{s}$) aos demais espermatozoides dos grupos suplementados com o NP, que apresentaram valores superiores a 150 $\mu\text{m}/\text{s}$, sendo considerados rápidos (Tabela 1).

Dessa forma, observou-se que espermatozoides após a congelação e descongelação com diferentes concentrações do extrato natural apresentaram valor de VCL superior a 150 $\mu\text{m}/\text{s}$, caracterizando-se pela presença de células rápidas (SHARAFI et al., 2022).

Mesmo sem diferença estatística entre os grupos experimentais, observou-se que ao adicionar o NP no sêmen bovino, após congelação e descongelação, houve um aumento nos

valores de VAP, VCL e VSL, em relação ao grupo controle descongelado (Tabela 2), sugerindo potencial promissor do composto, e encorajando estudos mais aprofundados.

Adicionalmente, Robayo et al. (2008) correlacionaram na avaliação do sêmen, os parâmetros de VCL, VSL e VAP com a capacidade dos espermatozoides em migrarem pelo muco cervical de fêmeas bovinas e caprinas. A capacidade de migração espermática pelo muco cervical, e posterior chegada à tuba uterina, pode ser afetada pelos padrões do movimento espermático, como foi observado por Cox et al. (2006) em estudo realizado com cabras. Haja vista que, o potencial de migração espermática pelo trato reprodutivo da fêmea se correlaciona ao perfil hidrodinâmico conferido pela flexão e batimento flagelar, como também pela resistência exercida pelas secreções do lúmen do trato genital (SUAREZ, PACEY, 2006; COX et al., 2006). Assim, os valores de VAP, VCL e VSL (Tabela 1) relatados nesse estudo, especialmente, quando da adição de NP, poderia se correlacionar a parâmetros de fertilidade como relatado por Robayo et al. (2008).

Para a certificação da viabilidade espermática é necessário avaliar tanto os parâmetros de velocidade, como aqueles ligados a qualidade do movimento espermático, que são responsáveis por promoverem a propulsão e trajetória dos espermatozoides no trato reprodutivo da fêmea até a tuba uterina (COX et al., 2006). Dentre eles, destaca-se os parâmetros de STR, WOB, LIN, BCF e ALH, que se apresentam como os mais importantes para prever a capacidade fertilizante dos espermatozoides (MORTIMER et al., 2000). A Tabela 3 mostra os valores da trajetória espermática nos diferentes grupos experimentais.

Tabela 3: Cinética da trajetória espermática no sêmen bovino a fresco e após descongelamento, utilizando-se um extrato natural (NP) em diferentes concentrações no meio diluidor.

Grupos experimentais	Parâmetros de trajetória espermática avaliados							
	STR	WOB	LIN	BCF	ALH	DSL	DCL	DAP
Fresco	81,04 ^b	51,30 ^b	40,54 ^b	30,52 ^a	11,66 ^a	30,99 ^a	87,83 ^a	46,41 ^a
Controle descongelado	88,72 ^a	57,24 ^a	48,84 ^a	33,06 ^a	7,33 ^b	18,65 ^b	40,20 ^b	22,81 ^b
NP 0,5% descongelado	90,27 ^a	56,14 ^{ab}	49,04 ^a	33,61 ^a	6,98 ^b	20,04 ^b	43,58 ^b	24,09 ^b
NP 0,75% descongelado	89,45 ^a	54,96 ^{ab}	47,53 ^{ab}	31,97 ^a	7,40 ^b	18,21 ^b	41,80 ^b	22,69 ^b
NP 1,0% descongelado	88,72 ^a	53,93 ^{ab}	46,93 ^{ab}	31,01 ^a	7,62 ^b	18,16 ^b	42,01 ^b	22,59 ^b

^{ab}Valores seguidos por letras diferentes, na mesma coluna, diferem ($p < 0,05$).

Legenda: **STR:** Retidão; **WOB:** Índice de Oscilação da Célula; **LIN:** Linearidade; **BCF:** Frequência de Batimento Flagelar; **ALH:** Amplitude do Deslocamento Lateral da Cabeça; **DSL:** Distância em Linha Reta; **DCL:** Distância Curvilínea e **DAP:** Distância do Percurso Médio.

Observa-se que os valores de STR, ALH, DSL, DCL e DAP do grupo fresco diferiram em relação aos demais grupos experimentais estudados ($p < 0,05$). Em contrapartida, neste estudo, as diferentes concentrações do NP adicionado ao sêmen bovino, não apresentaram

diferenças entre os parâmetros citados ($p > 0,05$). Mehdipour et al. (2022) também não encontraram diferença ao utilizarem diferentes concentrações de rosiglitazona no sêmen de ovinos, nos parâmetros ALH, STR e LIN.

O que corrobora com o encontrado por Cavalheiro et al. (2023), que ao avaliarem a ação do NP adicionado ao sêmen bovino diluído e refrigerado por diferentes períodos, não evidenciaram diferenças nos parâmetros de ALH, BCF, DCL, LIN, STR e WOB, ao comparar o grupo controle e o grupo acrescido de 1,0% de NP.

Ainda, é possível observar diferença entre o índice de oscilação da célula (WOB) e a linearidade (LIN), entre os grupos fresco e controle descongelado, uma vez que tanto WOB como LIN foram menores no grupo fresco ($p < 0,05$). Os valores de BCF não diferiram entre os grupos experimentais avaliados neste estudo ($p > 0,05$). Mehdipour et al. (2022), relataram valores de BCF de 25,6 Hz, no sêmen de carneiros suplementados com 60 μM de rosiglitazona, sendo inferior aos valores encontrados nesse estudo.

Ghadimi et al. (2024), ao avaliarem o efeito do ácido gálico fornecido na dieta de galos idosos, sob a viabilidade espermática, observaram aumento nos parâmetros de motilidade, motilidade progressiva, VCL, VAP, LIN, ALH e BCF, nos grupos tratados com 200mg/Kg de GA. Contudo, os autores discorrem que a suplementação não afetou parâmetros de STR e VSL.

A avaliação espermática após criopreservação porta-se como uma medida importante para prever a capacidade fertilizante dos espermatozoides, tendo em vista o declínio da viabilidade dos gametas, frente ao estresse térmico e osmótico provocado pelos processos de congelação e descongelação (GUIMARÃES et al., 2018). Dessa forma, uma série de análises laboratoriais são empregadas na rotina da criopreservação do sêmen bovino, contudo, a correlação entre os parâmetros espermáticos e a taxa de fertilidade *in vivo* ainda são variáveis (SOUZA et al., 2020).

A avaliação da morfologia espermática possibilita a identificação de touros com baixo potencial de fertilidade, uma vez que defeitos na morfologia dos espermatozoides relacionam-se com quadros de sub e/ou infertilidade de reprodutores bovinos (MAZIERO et al., 2009). Ademais, durante o processo de criopreservação, os danos causados à membrana celular pela desestabilização da bicamada lipídica, desencadeiam alterações na estrutura morfológica dos espermatozoides, sendo de suma importância a análise e quantificação das patologias espermáticas após criopreservação do sêmen (SANTOS et al., 2018).

Phillips et al. (2004), ao realizarem estudos sobre os índices de fertilidade no sêmen bovino descongelado, observaram que a morfologia espermática pós descongelação,

apresentou correlação significativa com a taxa de concepção após programas de inseminação artificial.

A Tabela 4 apresenta a porcentagem de defeitos espermáticos do sêmen bovino acrescido de diferentes concentrações de NP, após congelação e descongelação. Observou-se que não houve diferença na porcentagem de defeitos individuais e totais nos grupos experimentais avaliados nesse estudo ($p>0,05$).

Vale et al. (2024, p.382) relataram que para o sêmen bovino percentuais acima de 30% de defeitos totais, correlaciona-se diretamente com a fertilidade do animal, sendo necessária a exclusão do reprodutor dos programas de reprodução. Ainda, os autores complementaram que alterações na morfologia da cabeça superior a 12%, gota citoplasmática superior a 3% e defeitos de cauda acima de 10% já são sugestivos de comprometimento da fertilidade do macho. Tanto nas descrições de Vale et al. (2024), quanto nas preconizadas pelo CBRA (2013), as características do sêmen utilizado nesse estudo, tem correlação preditiva para a fertilidade.

Tabela 4: Morfologia espermática no sêmen bovino após descongelação, utilizando-se um extrato natural (NP) em diferentes concentrações no meio diluidor.

Grupos experimentais	Morfologia espermática											
	Defeitos Maiores (%)						Defeitos Menores (%)					
	Acrossoma	Cabeça	Cauda	PI	GCP	TER	TOTAL	Cabeça	Cauda	PI	GCD	TOTAL
Controle descongelado	0,66	2,03	1,92	0,88	0,22	0,01	5,72	5,00	8,51	1,72	0,14	15,37
NP 0,5% descongelado	0,32	2,15	1,44	0,75	0,15	0,03	4,84	4,28	9,73	1,28	0,19	15,48
NP 0,75% descongelado	0,37	2,16	1,83	1,06	0,22	0,02	5,66	4,27	8,20	1,29	0,22	13,98
NP 1,0% descongelado	0,29	2,14	2,62	0,70	0,18	0,01	5,94	4,29	7,03	1,53	0,09	12,94

Legenda: **PI:** Peça Intermediária; **GCP:** Gota Citoplasmática Proximal; **TER:** Teratológicos e **GCD:** Gota Citoplasmática Distal.

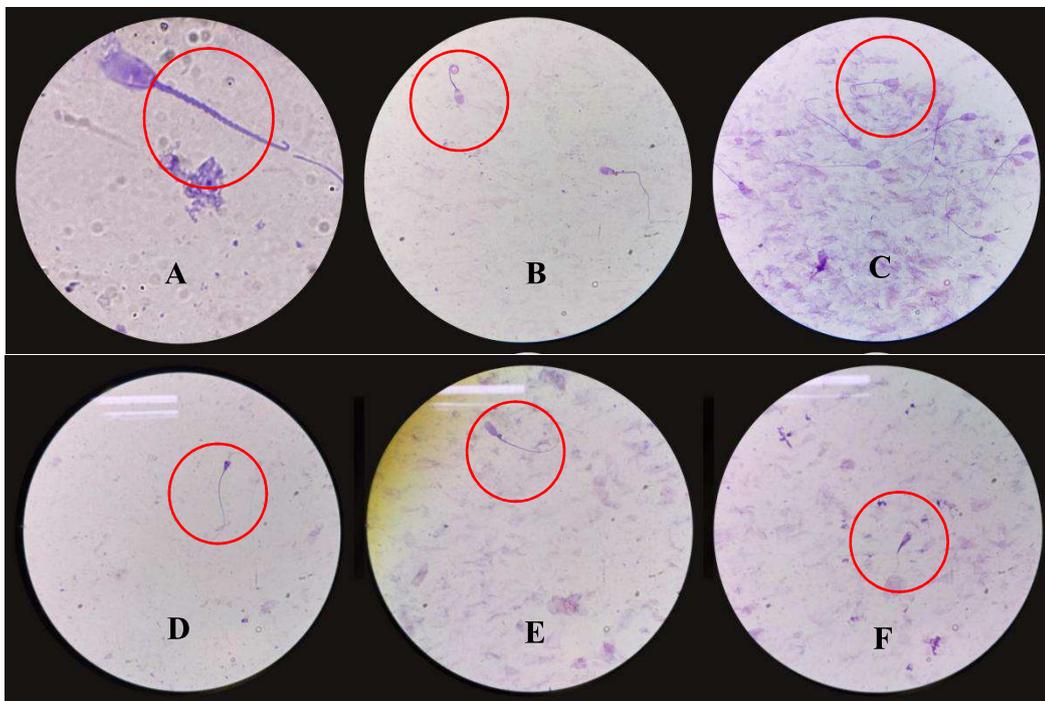
Nota-se neste estudo, ao avaliar o percentual de defeitos de acrossoma, houve uma redução numérica na ocorrência dessas alterações, à medida que se aumentou a concentração de NP quando comparada ao grupo controle descongelado (Tabela 4). É coerente sugerir que o extrato natural possa ter exercido seu efeito antioxidante sob a morfologia espermática, com redução das EROs e, conseqüentemente, menor lesão a membrana acrossomal, resultando em menor percentual de defeitos de acrossoma após descongelação. Roy e Atreja (2008), discutiram que experimentalmente as EROs, como o ânion superóxido (O_2^-) e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), são potenciais indutores da capacitação espermática no sêmen de bovinos e bubalinos, sendo a adição de antioxidantes uma forma de minimizar os efeitos desses

radicais, reduzindo as alterações de acrossoma e otimizando a ocorrência da capacitação dos espermatozoides no momento adequado.

Já Castro (2022) evidenciou redução no número de defeitos de acrossoma e da capacitação espermática após descongelação, ao adicionar Vitamina C e pentoxifilina no sêmen de búfalos.

A Figura 2 apresenta algumas alterações encontradas na morfologia dos espermatozoides avaliados.

Figura 2: Defeitos na morfologia espermática no sêmen bovino após descongelação. Coloração de vermelho congo, aumento de 1000X.



Legenda: **A:** espermatozoide com peça intermediária rugosa; **B:** espermatozoide com cauda enrolada; **C:** espermatozoide com cauda dobrada; **D:** espermatozoide com cabeça subdesenvolvida; **E:** espermatozoide com gota citoplasmática proximal; **F:** espermatozoide com inserção da cauda retroabaxial. Fonte: acervo pessoal (2024).

Ao avaliar a estrutura morfológica dos espermatozoides, sabe-se que a membrana plasmática é responsável pela manutenção do equilíbrio osmótico da célula, agindo como uma barreira entre o meio intra e extracelular, exercendo papel fundamental na viabilidade dos espermatozoides (CELEGHINI et al., 2008). Durante a criopreservação do sêmen bovino, a membrana plasmática é a estrutura mais susceptível às crioinjúrias (VARELA et al., 2020), o que acarreta distúrbios no metabolismo espermático e, conseqüentemente na redução da capacitação, reação acrossômica e no potencial fertilizante dos espermatozoides (ROTA et al.,

2010), que muitas vezes poderiam não ser visualizados e/ou quantificados na morfologia espermática (Figura 2 e Tabela 4).

Khalil et al. (2018) relataram que os parâmetros de avaliação da viabilidade espermática após congelação e descongelação, em centrais de inseminação artificial, geralmente limitam-se a análises de motilidade e morfologia dos espermatozoides. Sendo a avaliação da motilidade, tanto por métodos subjetivos como por análises computadorizadas, o principal parâmetro para determinar a qualidade e prever a fertilidade espermática em humanos e animais (BROEKHUIJSE et al., 2012). No entanto, a motilidade apresenta um elevado grau de variabilidade (KHALIL et al., 2018), como no estudo de Broekhuijse et al. (2012), que relataram variações na motilidade espermática de 60 a 90%, e apresentaram baixa correlação com as taxas de gestação em suínos. Em bovinos e ovinos, variações em torno de 20% no número de espermatozoides móveis após descongelação, correlacionou-se com baixos índices de fertilidade (KHALIL et al., 2018).

Diante disso, além da avaliação da cinética do movimento espermático e da morfologia, a utilização de testes de avaliação da integridade de membrana dos espermatozoides apresenta-se como uma ferramenta relevante nos testes de viabilidade espermática após protocolos de criopreservação do sêmen (CELEGHINI et al., 2008). A utilização de métodos de coloração por meio de sondas fluorescentes ou fluorocromos, permite uma análise mais criteriosa da integridade estrutural dos espermatozoides (SILVA, MARTINS, 2016).

Celeghini et al. (2008) relataram que as sondas fluorescentes estão sendo empregadas de maneira isolada ou em combinação para determinar a viabilidade e a integridade celular, uma vez que se ligam a pontos específicos das células, proporcionado por meio de técnicas de epifluorescência a avaliação da integridade estrutural de membranas, acrossoma e DNA dos espermatozoides (OLIVEIRA et al., 2014).

A Tabela 5 apresenta os resultados da avaliação de integridade de membrana dos espermatozoides após congelação e descongelação. Não se evidenciou diferença entre o percentual de espermatozoides íntegros, semi lesados e lesados entre grupos experimentais inseridos nesse estudo ($p > 0,05$).

Tabela 5: Integridade da membrana de espermatozoides no sêmen bovino após descongelamento, utilizando-se um extrato natural (NP) em diferentes concentrações no meio diluidor.

Grupos experimentais	Integridade de membrana plasmática (%)		
	Semi lesados	Lesados	Íntegros
Controle descongelado	24,05	1,44	74,50
NP 0,5% descongelado	24,11	3,61	72,27
NP 0,75% descongelado	28,05	3,55	67,88
NP 1,0% descongelado	21,11	1,55	77,33

Souza et al. (2017), ao adicionarem uma combinação de antioxidantes (melatonina, vitamina C e Trolox) no sêmen criopreservado de carneiros, observaram neutralização dos efeitos das EROs e da peroxidação lipídica sobre a integridade da membrana plasmática dos espermatozoides após congelação e descongelamento. Os autores discorreram que a associação dos compostos antioxidantes resultou em maior resistência aos danos oxidativos e crioinjúrias durante as variações de temperatura, proporcionando a manutenção da fluidez da membrana plasmática, garantindo sua integridade durante o processo de criopreservação.

Corroborando com os achados de Oliveira et al. (2024), que ao avaliarem a interação da adição conjunta entre Trolox e vitamina C no sêmen de touros, observaram melhora nos parâmetros de motilidade (38,08%) e na viabilidade espermática (49,41%) no sêmen descongelado, submetido a TRT e ao HOST, sendo os valores superiores em comparação ao grupo controle e aos grupos em que os antioxidantes foram adicionados separadamente ($p < 0,05$).

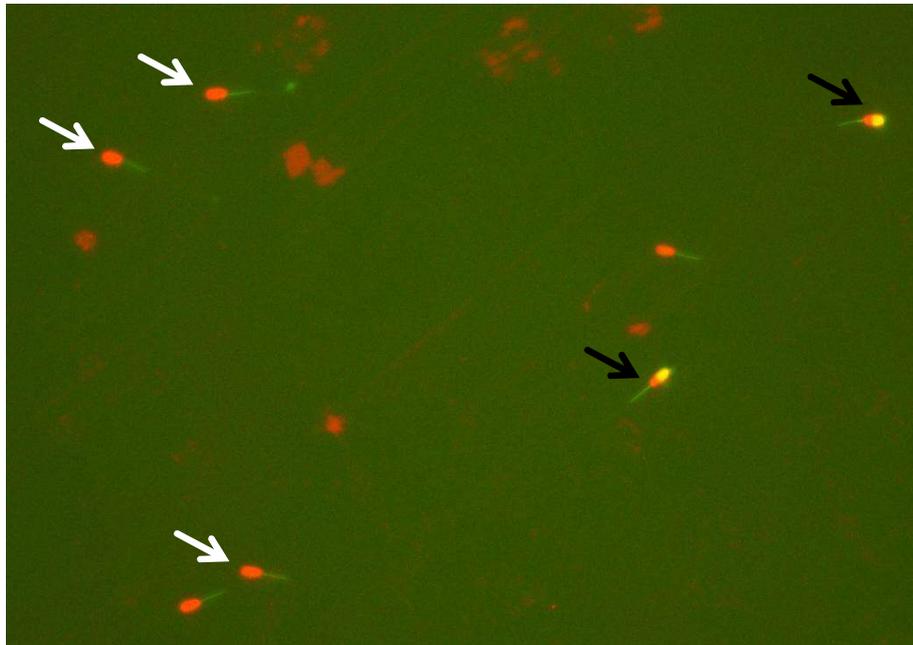
De maneira semelhante, Cerolini et al. (2000) ao adicionarem α -tocoferol ao sêmen de varrões, observaram redução da lipoperoxidação da membrana plasmática dos espermatozoides, permitindo maior proteção contra os efeitos deletérios da criopreservação sobre a integridade da membrana espermática. Da mesma forma, Tvrdá et al. (2016), evidenciaram que a adição de curcumina ao diluidor seminal de bovinos, exibe efeitos de proteção da integridade estrutural e funcional dos espermatozoides, potencializando os sistemas de defesas antioxidantes do sêmen.

Oliveira et al. (2014) relataram que a qualidade do sêmen está intimamente ligada com a fertilidade dos espermatozoides. Dessa forma, a avaliação da integridade estrutural e funcional da membrana plasmática e do acrossoma das células espermáticas apresenta-se como uma técnica eficaz para predizer as taxas de fertilidade *in vitro* e *in vivo*. O que vai de encontro com as descobertas de Januskauskas et al. (2000), que relataram que células com

membrana plasmática lesada são negativamente correlacionadas com os índices de fertilidade ($r = -0,39$), corroborando com os resultados encontrados por Oliveira et al. (2014).

Neste estudo, a avaliação da integridade da membrana plasmática dos espermatozoides, considerou a classificação proposta por Garner et al. (1986), por meio da associação das sondas fluorescentes de iodeto de propídeo e diacetato de β -carboxifluoresceína, uma vez que os espermatozoides íntegros foram corados de verde, aqueles com a membrana lesada de vermelho e já espermatozoides com membrana semi-lesada apresentaram-se com ambas as colorações, como mostra a Figura 3.

Figura 3: Avaliação da integridade de membrana de espermatozoides no sêmen bovino após descongelação. Associação das sondas fluorescentes de iodeto de propídeo e diacetato de β -carboxifluoresceína em microscópio invertido de epifluorescência em aumento de 1000x.



Legenda: **seta branca:** espermatozoides com membrana semi-lesada (lesão presente na cabeça e flagelo intacto); **seta preta:** espermatozoides com membrana semi-lesada (lesão na cabeça, com membrana de acrossomo e flagelo intactas). Fonte: acervo pessoal (2024).

A utilização do PI para avaliação da integridade de membrana dos espermatozoides no sêmen criopreservado de touros foi proposta por Alm et al. (2001). Tendo em vista, que o PI tem afinidade pelo DNA da célula, corando em vermelho o núcleo dos espermatozoides com a membrana plasmática lesionada (CELEGHINI et al., 2008). Em associação com o PI utiliza-se o CFDA como um contra-corante, o qual é hidrolisado por esterases, produzindo diacetato de carboxifluoresceína livre, que é retido no interior das células com a membrana plasmática íntegra, resultando em fluorescência na coloração verde amarelada (BERGSTEIN, WEISS, BICUDO, 2014).

A taxa de gestação de fêmeas bovinas submetidas a protocolo de IATF com sêmen congelado e descongelado acrescido de diferentes concentrações do extrato natural, ainda é inconclusivo. O que é justificado pelo fato de que o estudo *in vitro* e a criopreservação do sêmen foram concluídos no final da estação de monta, sendo disponível um número reduzido de fêmeas inseminadas para IATF com o sêmen experimental.

Apesar de parciais, observou-se um indicativo de que a utilização do extrato natural acrescido ao diluidor do sêmen bovino, não afetou a capacidade fertilizante dos espermatozoides. Ainda, sugere-se que o NP adicionado na concentração de 0,5% tem uma perspectiva otimista em aumentar a taxa de gestação das fêmeas, como pode ser observado na Tabela 6.

Tabela 6: Taxa de gestação após IATF com sêmen bovino utilizando-se um extrato natural (NP) em diferentes concentrações no meio diluidor.

Grupos experimentais	Diagnóstico de gestação*	
	Positivo	Negativo
Controle descongelado	70,59% (12/17)	29,41% (5/17)
NP 0,5% descongelado	77,78% (14/18)	22,22% (4/18)
NP 0,75% descongelado	50,00% (8/16)	50,00% (8/16)
NP 1,0% descongelado	70,59% (12/17)	29,41% (5/17)

*Dados descritivos

As biotecnologias da reprodução utilizadas em programas de melhoramento genético de bovinos, como a IATF, viabilizam a dispersão de características desejáveis nos plantéis, permitindo a obtenção de animais geneticamente superiores e a padronização dos rebanhos (ABUD et al., 2014). No entanto, sabe-se que a taxa de gestação, utilizando sêmen criopreservado, depende da capacidade dos espermatozoides em se manterem viáveis após descongelamento, e passarem por uma completa modificação morfológica, bioquímica e biofísica, com potencial de capacitação e reação acrossomal quando em contato com a zona pelúcida do oócito (SIQUEIRA et al., 2007; SANTOS et al., 2018).

Duarte Júnior et al. (2015) observaram que a adição de 10mmol/mL de tocoferol ao meio diluidor do sêmen bovino criopreservado, não influenciou na taxa de gestação das fêmeas após protocolo de IATF ($p>0,05$), quando comparado ao grupo controle, sem adição do aditivo. Corroborando com os achados de Borges et al. (2011), que não evidenciou diferença na taxa de gestação (58% vs 58,7%) utilizando 0,2mmol/mL de Trolox no extensor de sêmen em comparação ao grupo controle.

Embora os estudos citados, não tenham demonstrado incrementos nas taxas de gestação, sabe-se que os antioxidantes apresentam inúmeras vantagens na melhoria da qualidade espermática, principalmente conferindo proteção aos danos causados pela lipoperoxidação lipídica das membranas (SOUZA et al., 2018; BOZZI et al., 2023). Ademais, faltam informações na literatura em torno da utilização de antioxidantes não enzimáticos em testes *in vivo* em bovinos, mediante utilização de protocolos de IATF (DUARTE JÚNIOR et al., 2015).

2.5 CONCLUSÃO

Nas condições desse estudo, conclui-se que a adição do composto natural (NP) com potencial antioxidante, nas concentrações utilizadas, não comprometeu a cinética do movimento e trajetória espermática, a morfologia, a integridade de membrana e/ou na taxa de gestação das fêmeas submetidas a IATF com sêmen congelado e descongelado.

REFERÊNCIAS

- ABUD, C. O. G. et al. Comparação entre os sistemas automatizado e convencional de criopreservação de sêmen bovino. **Ciência Animal Brasileira**, v.15, n.1, p. 32-37, 2014.
- ACIPRESTE, A. C. et al. Avaliação da eficácia de crioprotetores permeantes e não permeantes no descongelamento rápido e lento do sêmen canino. **Ciência Animal Brasileira**, v.15, n.1, p. 107-114, 2014.
- AGARWAL, A. et al. Prevention of Oxidative Stress Injury to Sperm. **Journal of Andrology**, v. 26, n. 6, 2005.
- AITKEN, R. J.; BAKER, M. A. Oxidative stress and male reproductive biology. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 16, p. 581-588, 2004.
- ALAM, K. et al. Cryopreservation of bovine semen using extract of *Cinnamomum zeylanicum*. **Cryo Letters**, v. 45, n.3, p.168-176, 2024.
- ALM, K. et al. A novel automated fluorometric assay to evaluate sperm viability and fertility in dairy bulls. **Theriogenology**, v. 56, n.4, p. 677-684, 2001.
- ALHAZMI, A.I. et al. Protective effects of gallic acid against nickel-induced kidney injury: impact of antioxidants and transcription factor on the incidence of nephrotoxicity. **Renal Failure**, v.46, n. 01, p.1-14, 2024.
- AMARAL, A. A. D. et al. Antioxidant Evaluation of Extracts of Pecan NutShell (*Carya illinoensis*) in Soybean Biodiesel B100. **Global Challenges**, v. 3, n. 11, p. 1900001, 2019.
- ASSUNÇÃO, C. M. et al. Effects of resveratrol in bull semen extender on post-thaw sperm quality and capacity for fertilization and embryo development. **Animal Reproduction Science**, v. 226, p. 1-9, 2021.
- BAKI, K.B. et al. Curcumin and gallic acid have a synergistic protective effect against ovarian surface epithelium and follicle reserve damage caused by autologous intraperitoneal ovary transplantation in rats. **Pathology**, v. 258, p. 1-11, 2024.
- BARCELOS, R. D. O.; SAVI, P. C. F. Uso de sêmen resfriado e congelado em programas de inseminação artificial em tempo fixo em bovinos. **Revista Ibero-Americana de Humanidades, Ciências e Educação**, v. 8, n. 10, p. 4217–4229, 2022.
- BARTH, A.D., OKO, R.J. Defects of the sperm head. In: Barth, A.D., Oko, R.J. **Abnormal morphology of bovine spermatozoa**. Iowa State University press/Ames, 1a ed, USA, p. 130-192, 1989.
- BENVEGNÚ, D. M. et al., Protective Effects of a By-Product of the Pecan Nut Industry (*Carya illinoensis*) on the Toxicity Induced by Cyclophosphamide in Rats *Carya illinoensis* Protects Against Cyclophosphamide-Induced Toxicity. **Journal of Environmental Pathology, Toxicology, and Oncology**, v. 29, n.3, p.185-197, 2010.

- BERGSTEIN, T.G.; WEISS, R.R.; BICUDO, S.D. Técnicas de análise de sêmen. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, v.38, n.4, p.189-194, 2014.
- BILODEAU, J.F. et al. Levels of antioxidant defenses are decreased in bovine spermatozoa after a cycle of freezing and thawing. **Molecular Reproduction and Development**, v. 55, n. 3, p. 282, 2000.
- BORGES, J.C. et al. Membrana plasmática de espermatozoides bovinos: efeito de metabólitos do oxigênio, antioxidantes e criopreservação. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, v.35, n.3, p.303-314, 2011.
- BORGES, M. et al. Cinética e integridade de espermatozoides caprinos criopreservados utilizando Red Cushion® como estratégia de proteção espermática durante a centrifugação do sêmen. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.44, n.1, p.32-38, 2020.
- BOZZI, A. D. R. et al. Adição de sucos de laranja, abacaxi e beterraba em diluidor para criopreservação de sêmen de carneiros. **Ciência Animal Brasileira**, v. 24, 2023.
- BRANCO, Y. N. T. C. C. et al. O uso do eugenol na criopreservação do sêmen bovino/the use of eugenol in the cryopreservation of bovine sêmen. **Brazilian Journal of Development**, v. 6, n. 11, p. 86336–86355, 2020.
- BROEKHUIJSE, M. L. W. J. et al. The value of microscopic semen motility assessment at collection for a commercial artificial insemination center, a retrospective study on factors explaining variation in pig fertility. **Theriogenology**, v. 77, p. 1466 –1479, 2012.
- BUCAK, M. N. et al. The influence of trehalose, taurine, cysteamine and hyaluronan on ram semen: Microscopic and oxidative stress parameters after freeze–thawing process. **Theriogenology**, v. 67, n. 5, p. 1060-1067, 2007.
- CASTRO, C. S. et al. Aplicação de antioxidantes naturais na reprodução animal. **Ciênc. Anim. Bras.**, v. 23, p. 1-9, 2022.
- CBRA. Manual para Exame Andrológico e Avaliação de Sêmen Animal. 2ª ed. Colégio Brasileiro de Reprodução Animal, Belo Horizonte, MG. 45p, 2013.
- CAVALHEIRO, D. T. B. et al. Sêmen bovino diluído e resfriado com diferentes concentrações de um composto natural. **Research, Society and Development**, v. 12, n. 5, 2023.
- CELEGHINI, E. C. C. et al. Effects that bovine sperm cryopreservation using two different extenders has on sperm membranes and chromatin. **Animal Reproduction Science**, v. 104, p. 119–131, 2008.
- CEROLINE, S. et al. Viability, susceptibility to peroxidation and fatty acid composition of boar semen during liquid storage. **Animal Reproduction Science**, v. 58, p. 99–111, 2000.
- COMHAIRE, F.H. et al. Mechanisms and effects of male genital tract infection on sperm quality and fertilizing potential: the andrologist's viewpoint. **Hum Reprod Update**, v. 5, n.5, p.393-398, 1999.

CORREA, F. et al. Quality and redox state of bovine sperm cryopreserved with resveratrol use of resveratrol in bovine semen. **Reprod Dom Anim**, v.59, p. 1-8, 2024.

COX, J.F. et al. Computer-assisted analysis of sperm motion in goats and its relationship with sperm migration in cervical mucus. **Theriogenology**, v. 66, p. 860–867, 2006.

CRESPILHO, A. M. et al. Eficiência comparativa entre dois diluidores para a congelamento de sêmen bovino sobre os padrões de motilidade e integridade de membrana plasmática. **Ars Veterinária**, v. 22, n.3, p. 229-235, 2006.

DUARTE JÚNIOR, M.F. et al. Avaliação do tocoferol no congelamento do sêmen bovino e nas taxas de prenhez após inseminação artificial em tempo fixo. **Revista Brasileira Ciências Veterinárias**, v. 22, n. 2, p. 114-118, 2015.

GARNER, D. L. et al. Assessment of spermatozoal function using dual fluorescent staining and flow cytometric analyses. **Biol Reprod**, v. 34, n.1, p.127-38, 1986.

GONZÁLEZ F. H. D. *Introdução à endocrinologia veterinária*. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS Copyright: 2002.

GUERRA, P. M. M. et al. Uso de antioxidantes no sêmen ovino. **Ciência Animal**, p. 1-11, 2012.

GUIMARÃES, D. B. et al. Qualidade espermática durante a curva de resfriamento do sêmen suíno diluído em água de coco em pó visando sua criopreservação. **Ciênc. anim. bras.**, Goiânia, v.19, p. 1-16, 2018.

GUNGOR, S. et al. Gallic and carnosic acids improve quality of frozen-thawed ram Spermatozoa. **Andrologia**, v. 51, p. 1-6, 2019.

GUNGOR, S. et al. The Effect of Gallic Acid Addition to Tris-Based Extender on Frozen Bull Semen. **Kafkas Univ Vet Fak Derg**, v. 27, n.5, p. 633-639, 2021.

GUPTA, S. et al. Curcumin in a tris-based semen extender improves cryosurvival of *Hariana* bull spermatozoa. **Andrologia**, v. 54, p. 1-15, 2022.

HARRISON, R. A. P.; SALLY, E. V. Use of fluorescent probes to assess membrane integrity in mammalian spermatozoa. **J. Reprod. Fertil**, v. 88, n.1, p. 343-352, 1990.

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

HU, J. H. et al. Effects of trehalose supplementation on semen quality and oxidative stress variables in frozen-thawed bovine semen. **J. Anim. Sci**, v. 88, p.1657–1662, 2010.

JANUSKAUSKAS, A. et al. Assessment of sperm quality through fluorometry and sperm chromatin structure assay in relation to field fertility of frozen thawed semen from sewdsh ai bulls. **Theriogenology**, v. 55, p. 947-961, 2000.

KHALIL, W. A. et al. Evaluation of bull spermatozoa during and after cryopreservation: Structural and ultrastructural insights. **International Journal of Veterinary Science and Medicine**, v. 6, p. 49–56, 2018.

LEITE, A. P. et al. Criopreservação do Sêmen Bovino. **UNOPAR Cient Ciênc Biol Saúde**, v. 13, n. 4, p. 279–86, 2011.

LOPES, J. T. et al. Presença de antioxidantes no sêmen de teleósteos e sua utilização na suplementação de meios de congelação seminal. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, v. 40, n.1, p.29-34, 2016.

MAIA, M.S.; BICUDO, S.D. Radicais livres, antioxidantes e função espermática em mamíferos: uma revisão. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, v.33, n.4, p.183-193, 2009.

MANJUNATH, P. et al. Major Proteins of Bovine Seminal Plasma Bind to the Low-Density Lipoprotein Fraction of Hen's Egg Yolk. **Biology of Reproduction**, v. 67, p. 1250–1258, 2002.

MARQUI, F. N. et al. Iodixanol supplementation in freezing extender improves the antioxidant capacity of semen. **Reprod Dom Anim**, v. 58, p.1551–1558, 2023.

MAZIERO, R. R. D. et al. Análise de sêmen bovino e sua relação com a fertilidade. **Revista Brasileira Reprodução Animal**, n.6, p.5-10, 2009.

MEHDIPOUR, M. et al. Protective effect of rosiglitazone on microscopic and oxidative stress parameters of ram sperm after freeze- thawing. **Sci Rep**, v.17-12, n.1, p. 139-149.

MENEGHETTI, M.; VASCONCELOS, J. L. M. Mês de parição, condição corporal e resposta ao protocolo de inseminação artificial em tempo fixo em vacas de corte primíparas. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 60, n. 4, p.786-793, 2008.

MORTIMER, S. T. et al. The future of computer-aided sperm analysis. **Journal of Andrology**, v. 17, p. 545-553, 2015.

OLIVEIRA, B. M. et al. Fertility and uterine hemodynamic in cows after artificial insemination with semen assessed by fluorescent probes. **Theriogenology**, v. 82, p. 767–772, 2014.

OLIVEIRA, W. et al. In vitro viability of bovine semen cryopreserved with addition of vitamin c and trolox to the extender medium. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 45, n. 5, p. 1349-1366, 2024.

OLLERO, M. et al. Characterization of subsets of human spermatozoa at different stages of maturation: implications in the diagnosis and treatment of male infertility. **Hum Reprod**, v. 16, n.9, p.1912-1921, 2001.

PALACIN, I. et al. Relationship of sperm plasma membrane and acrosomal integrities with sperm morphometry in *Bos taurus*. **Asian J Androl**, v. 22, n.6, p.578-582, 2020.

PHILLIPS, N. J. et al. Measures used to assess frozen thawed semen in Australian livestock semen processing centres. **Australian Veterinary Journal**, v. 82, n.5, p. 309-310, 2004.

PINTO, S.C.C. et al. Does supplementation of vitamin C, reduced glutathione or their association in semen extender reduce oxidative stress in bovine frozen semen? **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v.72, n.1, p.9-17, 2020.

RIBEIRO, V. H. A. et al. Avaliação da qualidade do sêmen bovino criopreservado com diluidores de origem animal e vegetal. **Brazilian Journal of Development**, v. 8, n. 10, p. 66182–66190, 2022.

ROBAYO, I.; MONTENEGRO, V.; VALDÉS C.; COX, J.F. CASA Assessment of Kinematic Parameters of Ram Spermatozoa and their Relationship to Migration Efficiency in Ruminant Cervical Mucus. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 43, p. 393–399, 2008.

ROTA, A. et al. Evaluation of Plasma Membrane Integrity of Donkey Spermatozoa. **Reprod. Dom. Anim**, v. 45, p. 228–232, 2010.

ROY, S.C.; ATREJA, S. K. Effect of reactive oxygen species on capacitation and associated protein tyrosine phosphorylation in buffalo (*Bubalus bubalis*) spermatozoa. **Animal Reproduction Science**, v.107, p. 68–84, 2008.

SALISBURY G.W., VANDEM A.R.K. N.L, LODGE J.R, editores. *Fisiologia da reprodução e inseminação artificial de bovinos*. 2ª ed. WH Freeman and Co.; São Francisco: 1978.

SANTOS, J. F. D. et al. Qualidade do sêmen bovino criopreservado. **Revista Espacios**, v. 39, n. 14, p. 18-33, 2018.

SAPANIDOU, V. et al. The addition of crocin in the freezing medium extender improves post-thaw semen quality. **Reprod Dom Anim**, v. 57, p. 269–276, 2022.

SAVI, P. A. P. et al. Uso de antioxidantes em meios diluidores para sêmen ovino: revisão de literatura /Use of antioxidants in semen extenders for sheep: literature review. **Ars Veterinária**, v. 31, n. 1, p. 12–018, 2015.

SHARAFI, M. ET AL. Hydroxytyrosol and resveratrol improves kinetic and flow cytometric parameters of cryopreserved bull semen with low cryotolerance. **Animal Reproduction Science**, v. 245, p.1-10, 2022.

SAS, Statistical Analysis System, Software - SAS Brasil, 2009.

SILVA, A. M. D. F.; MARTINS, C.F. Morfofisiologia Espermiática, Aspectos da Criopreservação de Sêmen Bovino e Importância da Avaliação Laboratorial. *In: Atlas de Morfologia Espermiática Bovina*. Carlos Frederico Martins, Margot Alves Nunes Dode, Antônio Emídio Dias Feliciano Silva, editores técnicos. Brasília, DF, Embrapa, 2016.

SILVA, C. N. et al. Ação de antioxidantes na manutenção da viabilidade espermiática de sêmen bovino criopreservado. **Centro Científico Conhecer**, v. 9, n. 17, p. 1-17, 2013.

SILVA, N. C. et al. Avaliação de dois diluentes e diferentes técnicas de criopreservação de sêmen bovino. **PUBVET**, v. 5, n. 19, p.1-34, 2011.

- SILVA, E.C.B.; GUERRA, M.M.P. Aspectos fundamentais da morfofisiologia e criopreservação espermática em pequenos ruminantes. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, v.36, n.3, p.181-187, 2012.
- SILVA, N. C. et al. Efeito da adição de diferentes antioxidantes em diluentes de criopreservação sobre a qualidade do sêmen e a produção in vitro de embriões bovinos. **Research, Society and Development**, v. 9, n. 8, p. 1-23, 2020.
- SIQUEIRA, J. B. et al. Relação da taxa de gestação com sêmen bovino congelado e testes de avaliação espermática *in vitro*. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.36, n.2, p.387-395, 2007.
- SOUZA FILHO, M. A. C. et al. Efeito da adição do ácido palmítico e da vitamina E ao diluidor Tris-gema na criopreservação de sêmen canino. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 49, n.1839, p. 1-8, 2021.
- SOUZA, J. A. T. et al. Novos enfoques na avaliação andrológica de bovinos e sua contribuição no melhoramento genético do rebanho. **Ciência Animal**, v.30, n.4, p.44-56, 2020.
- SOUZA, S. E. et al. Adição de vitamina E ao meio de criopreservação de sêmen de bovinos pantaneiros. **Investigação**, v. 18, n. 1, p. 2177-4080, 2019.
- SOUZA, W. L. et al. Adição de antioxidantes ao sêmen de carneiros e seus efeitos após a descongelação. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.37, n.5, p. 471-478, 2017.
- SOUZA, W. L. et al. Antioxidantes e crioprotetores na criopreservação do sêmen de ovinos. **Nutritime Revista Eletrônica**, v.15, n.01, p.8051-8064, 2018.
- STRADAIOLI, G. et al. Decrease in glutathione (GSH) content in bovine sperm after cryopreservation: Comparison between two extenders. **Theriogenology**, v. 67, n. 7, p. 1249-1255, 2007.
- SUAREZ, S. S.; PACEY, A.A. Sperm transport in the female reproductive tract. **Human Reproduction Update**, v. 12, n.1 , p. 23-37, 2006.
- TVRDÁ, E. et al. Antioxidant efficiency of lycopene on oxidative stress - induced damage in bovine spermatozoa. **Journal of Animal Science and Biotechnology**, p. 7-50, 2016.
- UPADHHYAY, V.R. et al. Bimodal interplay of reactive oxygen and nitrogen species in physiology and pathophysiology of bovine sperm function. **Theriogenology**, v. 187, p. 82-94, 2022.
- VALE, W. G. et al. Exame biológico do ejaculado-sêmen fresco e congelado. *In: Compêndio de Andrologia Veterinária*. 1ª ed. Fortaleza, Arte Visual Gráfica e Editora, 2024.
- VARELA, E.; ROJAS, M.; RESTREPO, G. Membrane stability and mitochondrial activity of bovine sperm frozen with low-density lipoproteins and trehalose. **Reprod Dom Anim**, v. 55, p.146-153, 2020.

VARELA-GIRALDO, E. et al. Effect of low-density lipoproteins and trehalose on the quality of cryopreserved bovine semen. **Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias**, v. 34, n. 3, p. 200–211, 2022.

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

YOSHIDA, M. Conservation of sperms: current status and new trends. **Animal Reproduction Science**, v.60, n. 2, p. 349-355, 2000.

ZHONG, R. ZHEN; ZHOU, D. WEI. Oxidative stress and role of natural plant derived antioxidants in animal reproduction. **Journal of Integrative Agriculture**, v. 12, n. 10, p. 1826-1338, 2013.