

## Uso de Glutathiona e Vitamina C na criopreservação seminal de touros Nelore

Use of Glutathione and Vitamin C in seminal cryopreservation of Nelore bulls

Uso de Glutathión y Vitamina C en la criopreservación seminal de toros Nelore

Recebido: 29/05/2023 | Revisado: 18/06/2023 | Aceitado: 20/06/2023 | Publicado: 25/06/2023

### **Fernando de Castro Parizi**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4916-0964>  
Universidade Federal do Acre, Brasil  
E-mail: [fefcp5@hotmail.com](mailto:fefcp5@hotmail.com)

### **Vanessa Balan Julio**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4337-5921>  
Universidade Federal do Paraná, Brasil  
E-mail: [vanessabalan@ufpr.br](mailto:vanessabalan@ufpr.br)

### **Karine Kulik**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4793-6140>  
Universidade Federal do Paraná, Brasil  
E-mail: [karinekulik@ufpr.br](mailto:karinekulik@ufpr.br)

### **Eduarda Stankiwich Vaz**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9373-4262>  
Universidade Federal do Paraná, Brasil  
E-mail: [eduarda.vaz@ufpr.br](mailto:eduarda.vaz@ufpr.br)

### **Francielle Amorim da Silva Paes**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8815-1388>  
Universidade Federal do Paraná, Brasil  
E-mail: [franciellepaes@ufpr.br](mailto:franciellepaes@ufpr.br)

### **Luciane Maria Laskoski**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0888-769X>  
Universidade Federal do Paraná, Brasil  
E-mail: [luci.laskoski@ufpr.br](mailto:luci.laskoski@ufpr.br)

### **Marcos Vinicius Ferrari**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2936-4302>  
Universidade Federal do Paraná, Brasil  
E-mail: [ferrari@ufpr.br](mailto:ferrari@ufpr.br)

### **Fernando Andrade Souza**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9474-9404>  
Universidade Federal do Paraná, Brasil  
E-mail: [fernando.andrade@ufpr.br](mailto:fernando.andrade@ufpr.br)

### **Resumo**

Uma forma de aumentar a eficiência reprodutiva e o mérito genético de um rebanho é através do uso de biotecnologias como a inseminação artificial e a fertilização *in vitro*, nas quais o sêmen congelado é essencial. Assim, objetivou-se com este estudo comparar as concentrações de glutathiona e vitamina-C como agentes antioxidantes, sendo alocados seis ejaculados de seis touros diferentes para cada grupo. Cada ejaculado foi exposto a quatro tratamentos (controle/ 1,25mM/ 2,5mM/ 5,0mM) tanto para glutathiona, quanto para vitamina C. Após a criopreservação realizaram-se testes para avaliar a qualidade seminal pós descongelamento por meio dos testes hiposmótico, de longevidade espermática e do giemsa/azul de Tripan. Não se contrastou grupo de touros, apenas tratamentos dentro de cada grupo. Para o grupo glutathiona não houve diferença significativa ( $P>0,05$ ) entre os resultados e as concentrações utilizadas, já no grupo vitamina-C a concentração de 5,0 mM apresentou resultados desfavoráveis em comparação as demais, indicando lesão de membrana acrossomal, sendo contraindicada.

**Palavras-chave:** Antioxidante; Congelamento; Sêmen; Zebu.

### **Abstract**

One way to increase the reproductive efficiency and genetic merit of a herd is by biotechnologies such as artificial insemination and *in vitro* fertilization, in which frozen semen is essential. Thus, the aim of this study was to compare the concentrations of glutathione and vitamin-C as antioxidant agents, with six ejaculates from six different bulls allocated to each group. Each ejaculate was exposed to four treatments (control/ 1.25mM/ 2.5mM/ 5.0mM) for both glutathione and vitamin C. After cryopreservation, tests were performed to assess seminal quality after thawing through hyposmotic tests, sperm longevity and giemsa/trypan blue. No groups of bulls were contrasted, only treatments within each group. For the glutathione group, there was no significant difference ( $P>0.05$ ) between the

results and the concentrations used, whereas in the vitamin-C group, the 5.0 mM concentration showed unfavorable results compared to the others, indicating damage to the acrosomal membrane, being contraindicated.

**Keywords:** Antioxidant; Freezing; Semen; Zebu.

### Resumen

Una forma de aumentar la eficiencia reproductiva y el mérito genético de un rebaño es mediante el uso de biotecnologías como la inseminación artificial y la fertilización *in vitro*, en las que el semen congelado es fundamental. Por lo tanto, el objetivo de este estudio fue comparar las concentraciones de glutatión y vitamina C como agentes antioxidantes, con seis eyaculados de seis toros diferentes asignados a cada grupo. Cada eyaculado se expuso a cuatro tratamientos (control/ 1,25 mM/ 2,5 mM/ 5,0 mM) tanto para glutatión como para vitamina C. Después de la criopreservación, se realizaron pruebas para evaluar la calidad seminal después de la descongelación a través de pruebas hiposmóticas, longevidad de los espermatozoides y giemsa/azul de tripano. No se contrastaron grupos de toros, solo tratamientos dentro de cada grupo. Para el grupo de glutatión, no hubo diferencia significativa ( $P>0,05$ ) entre los resultados y las concentraciones utilizadas, mientras que en el grupo de vitamina C, la concentración de 5,0 mM mostró resultados desfavorables en comparación con los demás, lo que indica daño a la membrana acrosomal, estando contraindicado.

**Palabras clave:** Antioxidante; Congelación; Semen; Cebú.

## 1. Introdução

Uma forma de aumentar a eficiência reprodutiva e o mérito genético do rebanho é através do uso de biotecnologias como a inseminação artificial e a fertilização *in vitro*, nas quais o sêmen congelado é essencial (Baruselli et al., 2018). No Brasil, de acordo com a Associação Brasileira de Inseminação Artificial (Asbia), houve aumento de 67% na comercialização de doses congeladas de sêmen, perfazendo um total, no ano de 2022, de 23.141.134 doses (Asbia, 2022). Entretanto, apesar da grande utilização de sêmen congelado, a técnica ainda possui limitações. Pois, os protocolos de criopreservação existentes possuem baixa eficiência, causando queda de, aproximadamente, 50% da viabilidade dos espermatozoides, com consequente diminuição da fertilidade da amostra (Bilodeau, et al., 2002; Ugur, et al., 2019).

Os processos de congelamento e descongelamento de sêmen causam danos estruturais, bioquímicos e, conseqüentemente, funcionais nos espermatozoides, os quais já se iniciam desde a colheita, onde o sêmen passa a ser exposto ao oxigênio (Amann & Pickett, 1987; Watson, 1995). Essa exposição promove o aumento de espécies reativas ao oxigênio (EROS). As EROS em excesso, sendo oriundas de maior exposição ao oxigênio ou por lesão celular, comprometem a viabilidade e funcionalidade dos espermatozoides (Valença & Guerra, 2007). Além disso, o aumento desses radicais (EROS) tem sido correlacionado com o envelhecimento, o qual leva ao aumento da peroxidação lipídica e, conseqüentemente, à formação de mais espécies reativas de oxigênio (ROS) (Gunes et al., 2016).

Assim, uma vez que os radicais livres possam ter aumento com a idade, sugere-se o uso específico de alguns antioxidantes, podendo-se lançar mão da vitamina-C para animais mais velhos, pois tem forte ação na prevenção da oxidação da bicamada lipídica espermática (Hu et al., 2010), e a glutatona em animais jovens, pois é relacionada como o primeiro sistema de defesa intracelular contra EROS e radicais livres (Cai et al., 1998).

Segundo Silva & Gadella (2006), uso de antioxidantes tentando neutralizar os efeitos das EROS oriundas do processo de criopreservação, pode vir a melhorar a viabilidade dos espermatozoides submetidos a este processo, podendo os mesmos serem utilizados de formas distintas frente a idade do animal. Desta maneira, buscando corroborar essa afirmativa, objetivou-se com este trabalho determinar as respostas morfofuncionais das células espermáticas criopreservadas em meio diluidor acrescido de glutatona no sêmen de animais jovens e vitamina-C em animais velhos.

## 2. Metodologia

Todas as técnicas e procedimentos utilizados neste estudo foram aprovados pelo Comitê de Ética e Experimentação Animal da Universidade Federal do Acre (CEUA/UFAC, protocolo nº. 51/2017).

## 2.1 Local e animais

Foram utilizados 12 touros da raça Nelore, sendo divididos em dois grupos, touros glutaciona (n= 6), com médias de idade e peso de 1,5 ano e 510 kg, e touros vitmaina C (n= 6), com 8 anos e 950 kg, respectivamente. Todos os animais vieram de uma mesma propriedade, localizada na BR 364, km 109, Rio Branco/Ac, sendo previamente selecionados por exame andrológico de acordo com o Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (Henry & Neves, 2013).

Cada animal passou por uma colheita, sendo o ejaculado dos touros velhos diluídos com vitamina-C e dos jovens com glutaciona, ficando um delineamento em blocos ao acaso. Uma vez que não se obteve interação entre classe de touros (velhos e jovens) e reagentes utilizados (vitamina-C ou Glutaciona), tratou-se cada grupo como um bloco. Assim, os dados aqui apresentados não fazem contraste entre grupos e reagentes, mas sim das concentrações de cada reagente em cada grupo.

As coletas foram feitas através de eletroejaculador (Boijector®) avaliando-se posteriormente o sêmen quanto as suas características, como: volume, cor, aspecto, turbilhonamento, motilidade, vigor, concentração e morfologia espermática (Henry & Neves, 2013).

## 2.2 Análises prévias

Imediatamente após a colheita, o sêmen foi colocado em banho-maria à 37 °C, sendo avaliado quanto aos aspectos físicos. A morfologia espermática foi analisada posteriormente no laboratório de Reprodução Animal da Universidade Federal do Acre (UFAC).

Para análise de turbilhonamento (escala de 0 – 5) foram aliqüotados 10µL de sêmen em lâmina previamente aquecida a 37 °C, sem uso de lamínula. Logo após, para avaliação da motilidade espermática (0 – 100%) e vigor (0 – 5), aliqüotaram-se 10µL de sêmen, sendo avaliados entre lâmina e lamínula e sob microscopia óptica em objetiva de 20x. A concentração espermática foi feita com auxílio da câmara de Neubauer usando fator de diluição de 1:100, segundo Henry & Neves (2013).

## 2.3 Diluidor para a criopreservação de sêmen

No experimento foi utilizado o diluidor TRIS-GEMA, segundo Leite et al. (2010), o qual utilizou 36,05 g de tris (Tris-hidroximetil-aminometano), 20,24 g de ácido cítrico, 14,88 g de frutose, 500.000 UI de penicilina G, 500.000 µg de estreptomicina e água destilada em quantidade suficiente para 1000 mL.

Após a colheita e avaliação prévia do sêmen, dividiu-se cada ejaculado em quatro frações iguais, para cada grupo na proporção de 1:1 com o diluente controle, Tris-Gema. Os antioxidantes foram acrescidos, separadamente em cada grupo, glutaciona ou vitamina-C, na diluição final em quatro concentrações distintas, 0 (controle), 1,25, 2,5 e 5,0 mM/mL.

## 2.4 Congelação do sêmen

Após as diluições, de acordo com cada tratamento e classe de touro, o sêmen foi envasado em palhetas de 0,5 mL e congelado em caixa de isopor com nitrogênio líquido (Forero-Gonzalez et al., 2012). Para a curva de resfriamento utilizou-se a caixa botuflex®. A curva de 5 °C foi obtida segundo as recomendações do fabricante, colocando-se duas pedras de gelo reciclável dentro da caixa. Assim, ao atingir os 5 °C o sêmen passou por um tempo de equilíbrio de 4 horas.

Em seguida, as palhetas foram acondicionadas em plataforma de congelamento e transferidas para uma caixa térmica de 27 litros contendo uma coluna de nitrogênio líquido de 5 cm. As palhetas na caixa térmica foram dispostas a 3 cm acima da lâmina de nitrogênio, permanecendo por 15 minutos, gerando uma curva com queda de -15 °C/ minuto para atingir a temperatura de -120°C dentro do tempo estipulado. Ao chegar a essa temperatura as palhetas foram retiradas do porta-palhetas e submergidas no nitrogênio líquido a -196°C. As palhetas foram organizadas em raques e armazenadas em botijões criogênicos até o momento da análise.

## 2.5 Testes pós-descongelamento

Para a análise, se fez um “pool” de cada partida congelada. Assim, duas palhetas de sêmen de cada animal por tratamento, foram descongeladas a 37 °C por 30 segundos.

O volume total do sêmen, 1 mL, foi colocado em um microtubo, homogeneizado e analisado quanto a motilidade e alterações morfológicas. A motilidade espermática foi analisada em microscopia óptica utilizando objetiva de 10x em duplo-cego (Arruda et al., 2011). Para as alterações morfológicas, o sêmen foi diluído em formol salina sendo a leitura realizada em preparações úmidas, sob microscopia com aumento de 1000x, contando-se 100 células por amostra.

## 2.6 Teste Hiposmótico (HOST)

As palhetas foram descongeladas em banho-maria, a 37 °C para análise de motilidade inicial. Alíquotas de 30 µL de sêmen foram diluídas em 300 µL de solução hiposmótica, composta por 3,68 g/L de citrato de sódio + 6,75 g/L de frutose, homogeneizada em 500 mL de água destilada.

A mistura de sêmen e solução hiposmótica foi incubada por uma hora, para estabilizar, a 37 °C. Outras alíquotas de 10 µL das mesmas amostras eram separadas em tubos tipo eppendorf e adicionados 500 µL de formol-salina para posterior cálculo de espermatozoides reativos ao HOST. Foram colocadas, entre lâmina e lamínula, 10µL de cada amostra para contagem de 100 espermatozoides, sob microscopia óptica (Aumento de 1000x, sob óleo de imersão) (Brito et al., 2003; Ribeiro, et al., 2022).

O cálculo do número de espermatozoides reativos ao teste Hiposmótico foi feito por intermédio da fórmula citada por Melo et. al. (2005), a saber:  $HO\% = (\% \text{ de alterações na região da cauda após teste HOST}) - (\% \text{ de alterações na região da cauda antes do teste HOST})$ .

## 2.7 Teste de longevidade (Teste de termorresistência rápido - TTRr)

O TTRr foi realizado segundo Vianna et al. (2008), no qual descongelaram-se as palhetas em banho-maria, primeiramente a 37 °C para avaliação da motilidade inicial, tempo 0, e depois as palhetas eram mantidas em banho-maria, a temperatura de 45 °C, durante 30 minutos, sendo avaliada a motilidade progressiva a cada 10 minutos, com objetivo de determinar a resistência dos espermatozoides às condições impostas.

## 2.8 Teste de Giemsa e Azul de Tripán

Para a coloração do azul de tripan e Giemsa, foram incubados em banho-maria, a 37 °C, por 10 minutos, 200 µL de suspensão de sêmen, acrescidos de 200 µL de azul de tripan. Após a incubação foram adicionados ao tubo 2 mL de DMPBS<sup>®</sup>, sendo centrifugado a 700g por 6 minutos (Centrífuga Excelsa II, modelo 206). Então, removido o sobrenadante, o sedimento era ressuspenso com 2 mL de DMPBS<sup>®</sup>, sendo a centrifugação repetida até que a solução se apresentasse na cor azul pálido. Após ressuspenso o sedimento final com DMPBS<sup>®</sup>, foram feitos esfregaços fixados em metanol (C3OH, Cromato produtos químicos LTDA.) e posterior coloração com solução Giemsa a 10%, que ficaram incubados por 8 horas para corar. As lâminas foram, então, lavadas em água corrente e deixadas para secar ao ar livre. A análise foi feita sob microscopia óptica, aumento de 400x, sendo contadas 100 células (Arruda, et al., 2013).

## 2.9 Análise Estatística

O delineamento utilizado foi em blocos ao acaso, não fazendo contraste entre categoria de idade animal, somente entre os tratamentos dentro de cada categoria. As variáveis passaram por teste de normalidade de Shapiro-Wilk, sendo as paramétricas avaliadas por ANOVA e testadas pelo teste de Tukey e as não paramétricas pelo teste de Friedman. Utilizou-se o

programa BioEstat 5.0 para a análise. Todas as médias ou ranqueamentos foram comparados com significância de 5%.

### 3. Resultados e Discussão

Os resultados obtidos no Teste Hiposmótico (HOST) são apresentados na Tabela 1, segundo cada categoria animal e tratamento.

**Tabela 1** - Média e desvio padrão ( $\bar{x} \pm SD$ ) das células espermáticas após teste HOST em touros jovens (glutaciona) e velhos (vitamina-C), respectivamente.

GRUPOS	CONCENTRAÇÕES (mM/MI)			
	0	1,25	2,50	5
Glutaciona	14,16 ± 7,88	12,5 ± 8,26	16,33 ± 6,43	16,66 ± 4,5
Vitmaina C	14,66 ± 6,86	11,16 ± 7,25	15,16 ± 4,99	13,33 ± 7,94

Médias comparadas pelo teste de Friedman ( $P > 0,05$ ). Fonte: Autoria própria.

Não houve diferença estatística ( $P > 0,5$ ) entre os tratamentos, dentro de cada categoria animal. A habilidade do teste HOST em avaliar a integridade funcional da membrana plasmática torna-o um teste complementar importante na avaliação *in vitro* do sêmen criopreservado, uma vez que tanto a congelamento quanto o resfriamento podem levar a efeitos deletérios sobre a membrana (Melo et al., 2005). Pois, características espermáticas padrão (concentração, motilidade e morfologia) são frequentemente insuficientes, por si só, para o diagnóstico de fertilidade/infertilidade, a não ser que individualmente sejam muito diferentes dos valores da normalidade para a espécie.

Esperava-se encontrar maior integridade da membrana plasmática da célula espermática em algum dos tratamentos efetuados, corroborando os achados de Hu et al. (2010) e Oliveira et al. (2013), que trabalhando com bovinos e equinos, respectivamente, obtiveram melhor resultados utilizando as concentrações de 4,5 mg/mL e de 2,5 mM/mL, respectivamente. Contudo, não houve efeito sobre a integridade da membrana plasmática das células espermáticas, isto tanto para a glutaciona, em touros jovens, quanto para a vitamina C, em touros velhos.

Segundo Pinto et al. (2020), citando o estudo de Gadea et al. (2004), estes resultados podem ser devido a glutaciona reduzida ter melhor resposta quando a mesma é adicionada ao sêmen pós-descongelamento, uma vez que esta aumentaria a glutaciona intracelular a ser usada pela glutaciona peroxidase para evitar danos causados pela peroxidação lipídica, pois durante a criopreservação há diminuição desse antioxidante. Algo não efetivado no presente estudo, onde se adicionou os antioxidantes previamente ao congelamento seminal.

Os resultados de motilidade obtidos nos Testes de Termoresistência Rápido (TTRr) são apresentados na Tabela 2.

**Tabela 2** - Média e desvio padrão ( $\bar{x} \pm SD$ ) das células espermáticas após teste de Termoresistência Rápido TTR em touros jovens (glutaciona) e velhos (vitamina-C) respectivamente.

Grupos	Concentrações	0'	10'	20'	30'	$\Delta$
Glutaciona	0 mM/mL	38,33 $\pm$ 29,77	31,66 $\pm$ 29,26	18,33 $\pm$ 16,93	9,16 $\pm$ 12,81	76,10
	1,25 mM/mL	39,16 $\pm$ 23,32	30,00 $\pm$ 26,64	17,5 $\pm$ 17,24	5,00 $\pm$ 7,74	87,23
	2,50 mM/mL	53,33 $\pm$ 21,83	40,83 $\pm$ 22,22	30,83 $\pm$ 22,22	16,66 $\pm$ 17,22	68,76
	5,00 mM/mL	40,00 $\pm$ 23,45	36,66 $\pm$ 22,06	22,5 $\pm$ 23,18	10,00 $\pm$ 15,81	75,00
Vitamina C	0 mM/mL	35,83 $\pm$ 19,60	37,5 $\pm$ 22,96	24,16 $\pm$ 19,85	13,33 $\pm$ 17,51	62,79
	1,25 mM/mL	33,33 $\pm$ 22,94	25,83 $\pm$ 22,45	16,66 $\pm$ 19,40	8,33 $\pm$ 11,25	75,00
	2,50 mM/mL	39,16 $\pm$ 23,75	39,16 $\pm$ 21,54	25,00 $\pm$ 24,08	12,50 $\pm$ 19,17	68,07
	5,00 mM/mL	35,00 $\pm$ 17,88	33,33 $\pm$ 20,65	10,00 $\pm$ 12,64	9,16 $\pm$ 12,81	73,82

Médias comparadas, entre linhas e colunas dentro de cada categoria e não entre categoria animal pelo teste de Friedman ( $P > 0,05$ ). Vit: vitamina.  $\Delta$ : Diferença em percentual da perda de motilidade do momento inicial e final. Fonte: Autoria própria.

Um dos objetivos deste estudo foi buscar resultados que corroborassem que a integridade da membrana plasmática, assim como a motilidade espermática, poderia ser melhor protegida frente ao antioxidante utilizado dentro de cada categoria animal. Segundo Hu et al., (2010) a vitamina-C tem forte ação antioxidante prevenindo a oxidação da bicamada lipídica espermática, assim como a glutaciona está relacionada como o primeiro sistema de defesa intracelular contra EROS e radicais livres (Cai et al., 1998). Assim, justificando aqui as escolhas de glutaciona e vitamina- C, para touros jovens e velhos, respectivamente.

Alguns autores como Ball et al. (2001) mostraram que os antioxidantes atuam em alguns casos na manutenção da viabilidade espermática de garanhões, como de touros (Hu, et al., 2010). Entretanto, os resultados diferem devido a variação das concentrações utilizadas e o desconhecimento da quantidade adequada para manutenção das características das células espermáticas, bem como os diferentes mecanismos de ação que ocorrem (Baumber et al., 2005).

Assim, esperava-se, no presente trabalho, que o sêmen dos touros jovens se apresentasse em melhor condição em relação a motilidade e vigor, do que nos animais velhos. Contudo, não se observou diferença estatística ( $P > 0,05$ ) entre os tratamentos dentro de cada categoria, nem dentro de tempo, nem entre tempos.

Segundo Silva & Guerra (2012), trabalhando com a glutaciona como antioxidante, concentrações iguais e/ou acima de 2,5 mM/mL apresentam decréscimo na motilidade espermática, o que no presente trabalho não se confirmou. Pois, foi observado uma tendência na manutenção de melhor motilidade, tanto usando glutaciona quanto vitamina C, na concentração de 2,5 mM/mL, isto constatado pela menor queda da motilidade ( $\Delta$ ) (Tabela 1), apesar de não haver diferença estatística ( $P > 0,05$ ) nos grupos glutaciona e vitamina C.

Os dados aqui apresentados são corroborados pelos achados de Oliveira et al. (2013), os quais trabalhando com sêmen equino, adicionando 2,5 mM de glutaciona ao extensor de congelamento, conseguiram melhor resposta das motilidades, total e progressiva, na viabilidade e na integridade da membrana plasmática, semelhante a Eidan (2016) trabalhando com touros. Contudo, ressaltaram que concentrações de glutaciona acima deste valor foram deletérias para os espermatozoides.

As respostas do vigor espermático entre os tempos dentro de cada grupo não apresentaram diferença estatística ( $p > 0,05$ ), tendo valor médio, tanto para vitamina-C quanto para glutaciona de  $1,72 \pm 1,11$  e  $1,81 \pm 1,15$ . Os resultados obtidos no Teste Giemsa e Azul de Tripán, contabilizando os espermatozoides vivos com e sem acrossomo, são representados na Tabela 3.



**Tabela 3** - Média e desvio padrão ( $\bar{x} \pm SD$ ) das células espermáticas vivas com e sem acrossomo dos touros congelados com os antioxidantes, coradas pelo Giemsa/azul de tripan.

GRUPOS	TRATAMENTO	VIVO COM ACROSSOMA	VIVO SEM ACROSSOMA
Glutationa	Controle	44,66 ± 8,09a	32,00 ± 6,16b
	1,25 mM/mL	47,16 ± 9,70a	27,83 ± 9,68b
	2,50 mM/mL	44,83 ± 7,41a	26,50 ± 13,57b
	5,00 mM/mL	44,83 ± 4,49a	28,83 ± 9,53b
Vitamina C	Controle	57,16 ± 3,92Ba	3,16 ± 0,75b
	1,25 mM/mL	56,33 ± 3,38Ba	2,66 ± 1,21b
	2,50 mM/mL	56,00 ± 4,89Ba	6,5 ± 6,83b
	5,00 mM/mL	49,83 ± 2,56Aa	7,16 ± 9,26b

Letras maiúsculas e minúsculas distintas na mesma coluna e linha, respectivamente, diferem ( $p < 0,05$ ) pelo teste de Tukey.  
Fonte: Autoria própria.

Houve diferença ( $P < 0,05$ ) entre vivos, com e sem acrossoma, dentro dos grupos de touros jovens e velhos. Touros jovens não apresentaram diferença ( $P > 0,05$ ) dentro de cada variável comparando-se tratamentos. Já nos touros velhos, o tratamento 4 (5,0 mM/mL) apresentou diferença dos demais, tendo menor número de vivos com acrossoma, demonstrando maior reação acrossomal desta categoria, o que pode indicar, menor taxa de fertilidade por aumentar o número de defeitos não compensatórios frente aos demais tratamentos.

Segundo Silva et al. (2007), a suplementação de diluidores espermáticos com a vitamina-C gera um efeito positivo sobre a funcionalidade espermática por reduzir os danos celulares pelo sistema contínuo de proteção contra os radicais livres. Entretanto, há conflito nesta afirmativa. Pois, segundo Beconi et al. (1993), ao adicionarem 5 mM de ácido ascórbico ao crioprotetor de sêmen bovino, constataram que tal antioxidante protegeu, eficientemente, as células espermáticas durante o processo de congelamento e descongelamento. Contrário aos dados aqui apresentados, os quais utilizou-se vitamina-C a 5mM/mL em touros velhos, tendo a pior resposta ( $P < 0,05$ ) quanto a manutenção da membrana acrossomal.

Corroborando esse achado, Monteiro et al. (2009), utilizando 5 mM/ml em cães, também apresentaram resultados desfavoráveis, frente às concentrações mais baixas. Ainda, ressalta-se que as concentrações de 2,5 mM/mL de vitamina-C, aqui apresentadas, tiveram melhor resposta de motilidade pós criopreservação, o que vai de encontro aos autores supracitados que apresentaram melhor resposta da vitamina-C com concentração de 5 mM.

Essa resposta contraditória dos antioxidantes, avaliados isoladamente, pode ser explicada pela concentração que não foi capaz de neutralizar o efeito das ROS e/ou se igualou ao nível basal, podendo se justificar, segundo Asadpour et al. (2012) citado por Pinto et al. (2020) em outros fatores, tais como a diferença entre laboratórios no protocolo de diluição dos antioxidantes e criopreservação das células, o tempo de adição e exposição do sêmen com o antioxidante e a concentração daquele antioxidante para aquela determinada espécie.

Apesar do conflito entre os resultados apresentados é sabido que a adição de vitamina-C (Donnelly et al., 1999) e glutathione (Donnelly et al., 2000) nos meios de extensores de espermatozoides tem mostrado proteger a célula espermática do ataque oxidativo. Entretanto, essa afirmativa ainda precisa de maiores estudos para se determinar dose resposta destes antioxidantes frente as modificações ocorridas no processo de criopreservação.

#### 4. Conclusão

Segundo os dados aqui apresentados concluiu-se que a adição de glutathione no meio extensor de congelamento não proporcionou nenhuma melhora da qualidade espermática, independente da variável analisada. Já a adição de vitamina C, na

concentração de 5 mM/mL, foi lesiva a membrana acrossomal.

## Referências

- Amann, R. P. & Pickett, B. W. (1987). Cryopreservation principles and a review of stallion sperm cryopreservation. *Journal of Equine Veterinary Science*. 7 (3), 145-173.
- Arruda, R. P.; Silva, D. F.; Affonso, F. J.; Lemes, K. M.; Jaimes, J. D.; Celeghini, E. D. C.; Alonso, M. A., Carvalho, H. F.; Oliveira, L. Z. & Nascimento, J. (2011). Métodos de avaliação da morfologia e função espermática: momento atual e desafios futuros. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*. 35(2), 145-151.
- Arruda, R. L. P., Zúccari, C. E. S. N., Fernandes, C. E., Abreu, U.G.P. & Costa e Silva, E. V. (2013). Características do sêmen congelado relacionadas à fertilidade in vitro em bovinos. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*. 37(1), 72-80. [http://www.cbra.org.br/pages/publicacoes/rbra/v37n1/p72-80%20\(RB283\).pdf](http://www.cbra.org.br/pages/publicacoes/rbra/v37n1/p72-80%20(RB283).pdf)
- Asadpour, R.; Jafari, R. & Tayefi-Nasrabadi, H. (2012). The effect of antioxidant supplementation in semen extenders on semen quality and lipid peroxidation of chilled bull spermatozoa. *Iranian Journal of Veterinary Research*. 13(3), 246-249. <https://globorural.globo.com/Noticias/Criacao/noticia/2017/09/globorural-asbia-venda-de-semen-de-boi-cresce-76-no-primeiro-semester.html>
- Associação Brasileira de Inseminação Artificial. (2022). Index ASBIA 2022. [https://asbia.org.br/wp-content/uploads/Index/Index\\_ASBIA\\_2022.pdf](https://asbia.org.br/wp-content/uploads/Index/Index_ASBIA_2022.pdf)
- Ball, B. A.; Vo, A. T. & Baumber, J. (2001). Generation of reactive oxygen species by equine spermatozoa. *American journal of veterinary research*. 62(4), 508-515.
- Baruselli, P. S., Souza, A. H., Sá Filho, M. F., Marques, M. O. & Sales, J. N. S. (2018). Genetic market in cattle (Bull, AI, FTAI, MOET and IVP): financial payback based on reproductive efficiency in beef and dairy herds in Brazil. In: Proceedings of the 32nd Annual Meeting of the Brazilian Embryo Technology Society (SBTE); Florianópolis, SC, Brazil, *Animal Reproduction*. 15(3), 247-255.
- Baumber, J., Ball, B. A. & Linfor, J. J. (2005). Assessment of the cryopreservation of equine spermatozoa in the presence of enzyme scavengers and antioxidants. *American journal of veterinary research*. 66(5), 772-779.
- Bilodeau, P. S.; Urbanowski, J. L.; Winistorfer, S. C. & Piper, R. C. (2002). The Vps27p-Hse1p complex binds ubiquitin and mediates endosomal protein sorting. *Nature cell biology*. 4(7), 534-539.
- Beconi, M. T.; Francia, C. R.; Mora, N. G. & Affranchino, M. A. (1993). Effect of natural antioxidants on frozen bovine semen preservation. *Theriogenology*. 40(4), 841-851.
- Brito, L. F.; Barth, A. D.; Bilodeau-Goeseels, S.; Panich, P. L. & Kastelic, J. P. (2003). Comparison of methods to evaluate the plasmalemma of bovine sperm and their relationship with in vitro fertilization rate. *Theriogenology*. 60(8), 1539-1551.
- Cai, J.; Yang, J. & Jones, D.P. 1998. Mitochondrial control of apoptosis: the role of cytochrome c. *Biochim Biophys Acta*. 1366(1-2), 139-49.
- Donnelly, E. T.; McClure, N. & Lewis, S. E. (1999). The effect of ascorbate and  $\alpha$ -tocopherol supplementation in vitro on DNA integrity and hydrogen peroxide-induced DNA damage in human spermatozoa. *Mutagenesis*. 14(5), 505-512.
- Donnelly, E.T.; McClure, N. & Lewis, S. E. (2000). Glutathione and hypotaurine in vitro: effects on human sperm motility, DNA integrity and production of reactive oxygen species. *Mutagenesis*. 15, 61-68.
- Eidan, S. M. (2016). Effect on post-cryopreserved semen characteristics of Holstein bulls of adding combinations of vitamin C and either catalase or reduced glutathione to Tris extender. *Animal Reproduction Science*. 167, 1-7. [10.1016/j.anireprosci.2016.01.014](https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2016.01.014) 0378-4320/© 2016
- Forero-Gonzalez, R. A., Celeghini, E. C.C., Raphael, C. F., Andrade, A. F. C., Bressan, F. F. & Arruda RP. 2012. Effects of bovine sperm cryopreservation using different freezing techniques and cryoprotective agents on plasma, acrosomal and mitochondrial membranes. *Andrologia*, 44, 159-154.
- Gadea, J.; Sellés, E.; Marco, M. A.; Coy, P.; Matás, C.; Romar, R. & Ruiz, S. (2004). Decrease in glutathione content in boar sperm after cryopreservation: Effect of the addition of reduced glutathione to the freezing and thawing extenders. *Theriogenology*. 62(3-4), 690-701.
- Gunes, S., Hekim, G. N., Arslan, M. A. & Asci, R. 2016. Effects of aging on the male reproductive system. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*. 33, 441-454. doi: [10.1007/s10815-016-0663-y](https://doi.org/10.1007/s10815-016-0663-y)
- Henry, M. & Neves, J. P. (2013). Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal. CBRA, 2ed, 49p.
- Hu, J. H.; Tian, W. Q.; Zhao, X. L.; Zan, L. S.; Wang, H.; Li, Q. W. & Xin, Y. P. (2010). The cryoprotective effects of ascorbic acid supplementation on bovine semen quality. *Animal reproduction science*. 121(1-2), 72-77.
- Leite, T. G., Vale Filho, V. R., Arruda, R. P., Cesar, A. F., Emerick, L. L., Zaffalon, F. G., Martins, J. A. M. & Andrade, V. J. 2010. Effects of extender and equilibration time on post-thaw motility and membrane integrity of cryopreserved Gyr bull semen evaluated by CASA and flow cytometry. *Animal Reproduction Science*. 120, 31-38.
- Melo, M. I. V.; Henry, M. & Beker, A. R. C. L. (2005). Teste hiposmótico para avaliação da viabilidade do sêmen equino resfriado com diferentes diluidores. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*. 57, 757-763.
- Monteiro, J. C.; Gonçalves, J. S. A.; Rodrigues, J. A.; Lucio, C. F.; Silva, L. C. G.; Assumpção, M. E. O. A. & Vannucchi, C. I. (2009). Influence of ascorbic acid and glutathione antioxidants on frozen. *Canine and feline reproduction IV*, 44, 359-362.



- Oliveira, R. A.; Wolf, C. A.; de Oliveira Viu, M. A. & Gambarini, M. L. (2013). Addition of glutathione to an extender for frozen equine semen. *Journal of Equine Veterinary Science*. 33(12), 1148-1152.
- Pinto, S. C. C., Almeida, D. S., Alves, M., Florez-Rodríguez, S., Abreu Junior, G., Alves, N. B. E., Celeghini, E. C. C., Laskoski, L. M. & Souza, F. A. 2020. Does supplementation of vitamin C, reduced glutathione or their association in semen extender reduce oxidative stress in bovine frozen semen? *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 72, 9-17.
- Ribeiro, V. H. A., Ribeiro, B. V., Silva, C. M. G., Martins, C. F., Abud, C. O. G. & Abud, L. C. (2022). Avaliação da qualidade do sêmen bovino criopreservado com diluidores de origem animal e vegetal. *Brazilian Journal of Development*. 8(10), 66182-66190.
- Silva, P. F. N. & Gadella, B. M. (2006). Detection of damage in mammalian sperm cells. *Theriogenology*. 65(5), 958-978.
- Silva, P. F.; Gadella, B. M.; Colenbrander, B. & Roelen, B. A. (2007). Exposure of bovine sperm to pro-oxidants impairs the developmental competence of the embryo after the first cleavage. *Theriogenology*. 67(3), 609-619.
- Silva, E. C. B. & Guerra, M. M. P. (2012). Terapias antioxidantes na criopreservação espermática. *Revista Portuguesa de Ciências Veterinária*. 107, 143-9.
- Ugur, M. R., Abdelrahman, A. S., Evans, H. C., Gilmore, A. A., Hitit, M., Arifiantini, R. I., Purwantara, B., Kaya, A. & Memili, E. (2019). Advances in Cryopreservation of Bull Sperm. *Frontiers in Veterinary Science*. 6(268), 1-15. doi:10.3389/fvets.2019.00268.
- Valença, R. M. B. & Guerra, M. M. P. (2007). Espécies reativas ao oxigênio (ROS) e a utilização de antioxidantes na criopreservação do sêmen suíno. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*. 31(1), 47-53.
- Vianna, F. P., Papa, F. O., Zahn, F. S., Melo, C. M. & Dell'Aqua Junior, J. A. (2008) Thermoresistance sperm tests are not predictive of potential fertility for cryopreserved bull semen. *Animal Reproduction Science*, 113, 279-282.
- Watson, P. F. (1995). Recent development and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post thawing function. *Reproduction, Fertility and Development*, 7, 871-891.