

AVALIAÇÃO DO SÊMEN BOVINO DILUÍDO E RESFRIADO COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE GLUTATIONA REDUZIDA

MARIA EDUARDA TOZI DELAZERI^{1*}, JOÃO VITOR PCHIRMER², DANIEL TOBIAS BUENO CAVALHEIRO³, CAMILA KETERINE GOZERLANSKI TRENKEL⁴, ADALGIZA PINTO NETO⁵

1 Introdução

As biotecnologias aplicadas à reprodução animal visam melhorar a genética e preservar características desejáveis no rebanho (OLIVEIRA et al., 2018). No entanto, a criopreservação do sêmen enfrenta desafios, como a redução na motilidade dos espermatozoides, danos à parte acrossomal e menor capacidade de fertilização. Esses problemas são causados pela peroxidação lipídica devido ao excesso de espécies reativas de oxigênio (ROS), que prejudicam as membranas dos gametas (SILVA et al., 2013).

A glutatona é um tripeptídeo presente no organismo animal em formas reduzida (GSH) e oxidada (GSSG). Ambas têm funções importantes em processos biológicos essenciais, como síntese proteica, metabolismo e proteção celular (GUERRA et al., 2012). A forma GSH é um antioxidante predominante nas células e é fundamental como parte do sistema antioxidante, combatendo espécies reativas de oxigênio (ROS) e peróxidos gerados durante o metabolismo do oxigênio (PEIXOTO et al., 2013).

Estudos mostram que a GSH minimiza os efeitos adversos da congelação e descongelação, além de melhorar a fusão dos espermatozoides com o oócito (CHATTERJEE et al., 2011; GADEA et al., 2004; YESTE et al., 2012). Em bovinos, diluentes comerciais com altos níveis de glutatona aumentam a motilidade e reduzem a reação acrossomal dos espermatozoides criopreservados, melhorando sua função e capacidade fertilizante (LÚCIO, 2012).

Diante disso, é evidente que a GSH desempenha um papel benéfico na proteção contra o estresse oxidativo e na melhoria da qualidade espermática durante a criopreservação, tendo potencial para otimizar técnicas de reprodução assistida (GUERRA et al., 2012). Portanto, este estudo visa avaliar os efeitos de diferentes concentrações de GSH na cinética do sêmen bovino resfriado, com o objetivo de melhorar a qualidade espermática durante o processo de criopreservação.

¹Acadêmica de Medicina Veterinária, Universidade Federal da Fronteira Sul, *campus* Realeza/PR, contato: maria.delazeri@uffs.edu.br

²Acadêmico de Medicina Veterinária, Universidade Federal da Fronteira Sul, *campus* Realeza/PR

³Pós-graduanda de Medicina Veterinária, Universidade Federal da Fronteira Sul, *campus* Realeza/PR

⁴Médico Veterinário

⁵Docente Médica Veterinária, Universidade Federal da Fronteira Sul, **Orientadora.**

2 Objetivos

2.1 Geral

Avaliar os efeitos de diferentes concentrações da GSH na cinética do sêmen bovino refrigerado.

2.2 Específicos

Avaliar os efeitos das diferentes concentrações do GSH sobre o movimento dos espermatozoides bovino sob diferentes períodos de resfriamento (12, 24, 36 e 48 horas);

Avaliar os efeitos das diferentes concentrações do GSH sobre a porcentagem dos espermatozoides bovino, vivos e mortos, sob diferentes períodos de resfriamento (12, 24, 36 e 48 horas);

Avaliar os efeitos dos períodos de resfriamento (12, 24, 36 e 48 horas) sobre o movimento dos espermatozoides bovino sob diferentes concentrações de GSH;

Avaliar os efeitos dos períodos de resfriamento (12, 24, 36 e 48 horas) sobre a porcentagem espermatozoides bovino, vivos e mortos, sob diferentes concentrações de GSH, e

Avaliar a interação concentração do GSH e períodos de resfriamento (12, 24, 36 e 48 horas) sobre o movimento dos espermatozoides e sobre a porcentagem dos espermatozoides bovino, vivos e mortos.

3 Metodologia

Esse estudo foi realizado no Laboratório de Reprodução Animal - LABRA, da SUH-VU, Campus Realeza-UFFS, após submissão e aprovação pela Comissão de Ética no Uso de Animais - UFFS. Para tanto, um bovino, em idade reprodutiva, da raça Braford, hígado, foi submetido a seis coletas e avaliação do sêmen, em intervalo de sete dias, segundo as normas e protocolos do CBRA (2013).

Certificada a viabilidade seminal (CBRA, 2013), o sêmen diluído, em diluidor (TRIS-gema de ovo) foi acrescido da GSH e/ou resfriado de acordo com o grupo experimental, como se segue:

- Grupo 1: Controle, sêmen diluído, e resfriado.
- Grupo 2: sêmen diluído com adição de 1,0mM de GSH, e resfriado

O sêmen foi acondicionado em palhetas finas de 0,25mL (IMV, IMV Technologies), identificadas por animal e grupo, colocadas em bandejas plásticas e acondicionadas juntas em caixas isotérmicas (Botuflex), a 4°C. O período de resfriamento foi de zero, 12, 18, 24, 36 e 48 horas.

Após cada período de resfriamento, a caixa era aberta uma única vez, uma amostra de sêmen, de cada animal e grupo era retirada e submetida a análise espermática pelo CASA (IVOS-IIR, Hamilton Thorne) quanto a velocidade média (VAP), velocidade linear (VSL), retidão (STR) e oscilação (WOB).

Como valor de concentração média de cada coleta foi considerado o valor de 17,1 bilhões de espermatozoides por mL e 10 campos de leitura para análise pelo CASA. Em algumas amostras surgiram precipitações que poderiam interferir no estudo. Buscando diminuir o montante destas, realizou-se a filtragem do diluente TRIS-gema de ovo e da glutathiona reduzida (GSH) por meio de filtros de seringa estéreis de 0,22 micras (Unifil®).

Os dados obtidos foram coletados, organizados em planilhas, tabulados e submetidos à análise estatística, e as diferenças comparadas pelo Teste Tukey, considerando 5% como nível de significância ($p < 0,05$).

4 Resultados e Discussão

O uso de GSH aumentou a motilidade dos espermatozoides, especialmente nas primeiras 36 horas após o resfriamento. As médias de motilidade foram mais altas no grupo com GSH em comparação com o grupo controle em vários intervalos de tempo: fresco (61 vs. 53), 12 horas (62 vs. 52), 18 horas (74 vs. 70), 24 horas (80 vs. 53) e 36 horas (71 vs. 60). Quanto à VAP (velocidade média), houve diferenças notáveis entre os grupos em vários momentos: fresco (6,73 vs. 5,79), 12 horas (5,57 vs. 4,75), 18 horas (6,15 vs. 3,73) e 48 horas (4,58 vs. 4,56). Para VSL (velocidade linear), os valores médios também variaram: fresco (7,16 vs. 5,50), 12 horas (8,13 vs. 6,67), 24 horas (4,38 vs. 4,33) e 48 horas (8,77 vs. 6,28). Em relação ao parâmetro STR (taxa de retidão), os valores médios variaram consideravelmente: fresco (8,63 vs. 6,50), 12 horas (7,19 vs. 6,26), 18 horas (8,71 vs. 5,34) e 48 horas (8,66 vs. 8,15). Finalmente, a oscilação também mostrou variações: fresco (5,52 vs. 4,76), 12 horas (6,29 vs. 5,53), 24 horas (5,37 vs. 5,31), 36 horas (5,27 vs. 5,05) e 48 horas (5,50 vs. 5,14).

As variáveis de VAP e VSL estão ligadas à capacidade de fertilização dos espermatozoides, sendo que os que apresentam maiores valores de velocidade tendem a ter maior capacidade fertilizante. As células espermáticas de animais com velocidades mais altas também são mais resistentes à criopreservação, mantendo uma melhor capacidade fertilizante após descongelamento, ao contrário dos espermatozoides com velocidades mais baixas. (SOARES et al., 2016; MARTINS et al., 2020).

O estudo de De Toni et al. (2018) revelou que a adição de GSH ao sêmen melhorou a motilidade, velocidade média (VAP) e amplitude de movimento lateral (ALH) em comparação com o grupo de controle. Outros parâmetros tiveram efeitos variados sem diferenças significativas. Um estudo similar de Angrimani et al. (2018) também demonstrou vantagens do GSH no sêmen de cães. O grupo com GSH apresentou valores mais altos em diversos parâmetros medidos pelo sistema CASA, incluindo VAP, VSL e STR. A diferença nos valores para esses parâmetros foi de 1,06, 1,54 e 0,40, respectivamente, em comparação com o grupo de controle. O estudo também apontou melhorias significativas em VCL e BCF.

Em estudo sobre o efeito do extrato de alecrim e da Glutathione sobre o sêmen bovino, Daghigh-Kia et al. (2014), relatam que os valores de motilidade, VAP, VSL e ainda de VCL foram superiores no grupo acrescido de GSH quando comparado ao grupo controle, apresentando os seguintes valores nos grupos controle e acrescido de GSH, respectivamente: motilidade 28,4% e 32,7%, VAP 43 e 46, VSL 35,3 e 37,8 e no caso da VCL foram 73,2 e 77,6.

A literatura mostra resultados variáveis quanto ao efeito do GSH na cinética do movimento espermático, com estudos diferentes apresentando resultados distintos sobre a influência desse antioxidante no sêmen bovino (TORRES, 2018). Nesse contexto, Pinto et al. (2020) investigaram o uso de vitamina C e Glutathione Reduzida. Eles destacaram que, ao usar apenas a Glutathione, no sêmen bovino diluído e resfriado, não observaram resultados significativos ao comparar o grupo que recebeu GSH com o grupo controle.

5 Conclusão

A suplementação de glutathione reduzida no sêmen bovino pode ajudar a proteger a célula do dano oxidativo, melhorando a qualidade do sêmen criopreservado. Os níveis de glutathione estarão correlacionados a motilidade dos espermatozoides, onde a mesma apresenta ação benéfica sobre essas células. Ainda são necessários estudos para que os resultados sejam afunilados, levando a valores de referência fidedignos quanto a concentração do aditivo e seu efeito relativo sobre o sêmen criopreservado.

Referências Bibliográficas

ANGRIMANI, D. S. R. et al. (2018). O uso de glutathione reduzida (GSH) como antioxidante para espermatozoides criopreservados em cães. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 70, n. 2, p. 419-428.

CBRA. **Manual para Exame Andrológico e Avaliação de Sêmen Animal**. Colégio Brasileiro de Reprodução Animal. 2. ed., CBRA, Belo Horizonte: CBRA, 2013.

CHATTERJEE S.; LAMIRANDE E.; & GAGNON C. A criopreservação altera o status da membrana sulfidrilica dos espermatozoides de touro: proteção pela glutatona oxidada. **Mol Reprod. Desenvolver**, v. 4, n. 60, p. 498–506, 2011.

DAGHIGH-KIA, H. et al. Effect of rosemary (*Rosmarinus officinalis*) extracts and glutathione antioxidants on bull semen quality after cryopreservation. **Spanish Journal of Agricultural Research**, v. 12, n. 1, p. 98-105, 2014.

DE TONI, M. C. et al. Effects of reduced glutathione supplementation in sêmen extenders on quality and in vitro fertilizing ability of Nelore bull sperm during storage at 5°C for 96 hours. **Animal Reproduction Science**, v.193, p.132-141, 2018.

GADEA J.; et al. Diminuição do conteúdo de glutatona no esperma do javali após criopreservação. Efeito da adição de GSHaos extensores de congelamento e descongelamento. **Theriogenology**, v. 62, n. 3-4, p. 690 – 701, 2004.

GUERRA, P. M. M; et al. Uso de antioxidantes no sêmen ovino. **Ciência Animal**, Fortaleza, v. 22, n. 1, p. 354-364, 2012.

LÚCIO, C.F. Efeito da DE GSH(GSH) na criopreservação de espermatozoides da espécie canina: avaliação *in vitro* e *in vivo*. **Tese de Doutorado** (Programa de Pós-Graduação em Reprodução Animal), Universidade de São Paulo, 2012.

MARTINS, C. F. et al. (2020) Objective evaluation of hyperactivated motility in rat spermatozoa using computer-assisted sperm analysis. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 55, n. 6, p. 750-755.

OLIVEIRA, W; et al. Criopreservação de sêmen e emprego de vitaminas no meio diluidor: Revisão de Literatura. **Scientific Electronic Archives**, v. 11, n.6, p. 1-8, 2018.

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

PEIXOTO, P.C.V.A.; et al. Efeito da adição de Trolox de de GSH na viabilidade *in vitro* de espermatozoides de cães. **Cien. Anim. Bras.**, v.14, n.4, p.436-447, 2013.

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

SOARES, J. M. et al. (2016). Functional variables of bull sperm associated with ryotolerance. **Animal Reproduction Science**, v.27, n. 3, p. 371-379.

TORRES, J. O. S. El Adición de fuentes antioxidantes al diluyente de semen bovino y sus efectos posdescongelamiento. **Tese de Doutorado**. Universidad Autonoma De Chihuahua, 2018. YESTE, M.; FLORES, E.; ESTRADA, E.; BONET, S.; RIGAU, T.; RODRIGUEZ-GIL, J.E. A redução da glutatona e do cloridrato de procaína protegem a estrutura da nucleoproteína dos espermatozoides de javali durante o congelamento-descongelamento, estabilizando as ligações dissulfeto. **Reprod. Fertil. Dev.**, v.25, n. 7, p.1036-1050, 2012.

Palavras-chave: GSH; motilidade; peroxidação lipídica; estresse oxidativo; criopreservação.

Nº de Registro no sistema Prisma: PES 2022 - 0161

Financiamento: Fundação Araucária.