

Sêmen bovino diluído e resfriado com diferentes concentrações de um composto natural

Diluted and cooled bovine semen with different concentrations of a natural compound

Semen bovino diluido y refrigerado con diferentes concentraciones de un compuesto natural

Recebido: 09/04/2023 | Revisado: 26/04/2023 | Aceitado: 27/04/2023 | Publicado: 02/05/2023

Daniel Tobias Bueno Cavalheiro

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2761-1613>

Universidade Federal da Fronteira Sul, Brasil

E-mail: danieltobiasbueno@gmail.com

Camila Keterine Gorzelanski Trenkel

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7614-1473>

Universidade Federal da Fronteira Sul, Brasil

E-mail: catrenkel@gmail.com

Adalgiza Pinto Neto

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2180-2390>

Universidade Federal da Fronteira Sul, Brasil

E-mail: adalgiza.neto@uffs.edu.br

Matheus Ramos Rosin

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4103-3522>

Universidade Federal da Fronteira Sul, Brasil

E-mail: mtr.rosin@gmail.com

Silmara Mazon

ORCID: <https://orcid.org/0009-0007-4601-671X>

Universidade Federal da Fronteira Sul, Brasil

E-mail: mazonsilmara17@gmail.com

Dalila Moter Benvegnú

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3419-9674>

Universidade Federal da Fronteira Sul, Brasil

E-mail: dalila.benvegnu@uffs.edu.br

Jonatas Cattelam

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4395-2189>

Universidade Federal da Fronteira Sul, Brasil

E-mail: jonatas.cattelam@uffs.edu.br

Resumo

Objetivou-se com o estudo analisar a ação de um extrato natural (NP) adicionado ao sêmen diluído e refrigerado por diferentes períodos de tempo. Para avaliação da propriedade antioxidante do extrato, o método eleito foi o DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil). De início, foi realizado o preparo do radical, adicionando 0,1 mm. - 0,03943g do reativo DPPH dissolvido em 10 mL de metanol a 80%, que então foi parcialmente (2,9mL) alocado em tubos de ensaio com o extrato (0,1mL). As amostras então foram mantidas em repouso e ao abrigo da luz, e após 30 minutos e 24 horas, realizaram-se as medidas de absorbância inicial e final, respectivamente, por meio de espectrofotômetro a 515 nm. Depois de realizada a extração, foram realizadas, através do uso de eletro-ejaculador, oito coletas de sêmen de dois bovinos da raça Braford. As amostras de sêmen foram diluídas e acrescidas do extrato natural, refrigeradas e analisadas pelo CASA (IVOS-IIR, Hamilton Thorne), a fim de averiguar a toxicidade e potencial antioxidante sobre os espermatozoides, avaliando os efeitos do composto sobre a cinética do movimento espermático e sobre a morfologia espermática. A maioria dos parâmetros avaliados, não apresentou alterações significativas ($p < 0,05$). Diante dos dados obtidos, foi concluído que o extrato natural (NP) não possui influência sobre a cinética do movimento espermático e sobre a morfologia espermática do sêmen diluído, acrescido do NP e resfriado.

Palavras-chave: Cinética espermática; Viabilidade seminal; Antioxidante; Resfriamento.

Abstract

The aim of this study was to analyze the action of a natural extract (NP) added to diluted and refrigerated semen for different periods of time. To evaluate the antioxidant property of the extract, the chosen method was the DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl). Initially, the radical was prepared, adding 0.1 mm. - 0.03943g of the DPPH reagent dissolved in 10 mL of 80% methanol, which was then partially (2.9mL) allocated in test tubes with the extract (0.1mL). The samples were then kept at rest and protected from light, and after 30 minutes and 24 hours, the initial and final absorbance measurements were performed, respectively, by means of a spectrophotometer at 515 nm. After the extraction, eight semen collections from two Braford bovines were carried out using an electro-ejaculator. The semen samples were diluted and added to the natural extract, refrigerated and analyzed by CASA (IVOS-IIR,

Hamilton Thorne), in order to ascertain the toxicity and antioxidant potential on the spermatozoa, evaluating the effects of the compound on the kinetics of sperm movement and on sperm morphology. Most of the evaluated parameters did not show significant changes ($p < 0.05$). Given the data obtained, it was concluded that the natural extract (NP) has no influence on the kinetics of sperm movement and on the sperm morphology of diluted semen, plus NP and cooled.

Keywords: Sperm kinetics; Seminal viability; Antioxidant; Cooling.

Resumen

El objetivo de este estudio fue analizar la acción de un extracto natural (NP) agregado a semen diluido y refrigerado por diferentes períodos de tiempo. Para evaluar la propiedad antioxidante del extracto, el método elegido fue el DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil). Inicialmente, se preparó el radical, agregando 0,1 mm. - 0,03943 g del reactivo DPPH disuelto en 10 mL de metanol al 80%, que luego se colocó parcialmente (2,9 mL) en tubos de ensayo con el extracto (0,1 mL). A continuación, las muestras se mantuvieron en reposo y protegidas de la luz, ya los 30 minutos y 24 horas se realizaron las medidas de absorbancia inicial y final, respectivamente, mediante un espectrofotómetro a 515 nm. Luego de la extracción, se realizaron ocho colectas de semen de dos bovinos Braford utilizando un electroeyaculador. Las muestras de semen diluidas y añadidas al extracto natural, refrigeradas y analizadas por CASA (IVOS-IIR, Hamilton Thorne), con el fin de conocer la toxicidad y el potencial antioxidante sobre los espermatozoides, evaluando los efectos del compuesto sobre la cinética de los espermatozoides. movimiento y en la morfología de los espermatozoides. La mayoría de los parámetros evaluados no presentaron cambios significativos ($p < 0,05$). Dados los datos obtenidos, se concluyó que el extracto natural (NP) no tiene influencia en la cinética de movimiento espermático y en la morfología espermática del semen diluido, más NP y enfriado.

Palabras clave: Cinética del espermatozoa; Viabilidad seminal; Antioxidante; Enfriamiento.

1. Introdução

As biotecnologias da reprodução são ferramentas utilizadas na busca pelo melhoramento genético e replicação das características desejadas pelos bovinocultores em seus rebanhos (Murphy et al., 2017; Alyethodi et al., 2021), viabilizando a obtenção de animais geneticamente superiores, bem como a padronização dos rebanhos (Bozzi, et al., 2023); Dentre estas biotecnologias, as técnicas de criopreservação espermática, como a utilização de sêmen resfriado, são comumente empregadas junto a técnicas de reprodução assistida. Dessa maneira, o aprimoramento das técnicas de resfriamento do sêmen, tem grande importância na busca pela maximização da eficiência reprodutiva e melhoramento genético dos rebanhos bovinos (Felippell et al., 2023).

Durante o processo de resfriamento do sêmen é fundamental a utilização de meios diluidores para a preservação dos espermatozoides. E aliado a isto, é comum a utilização de aditivos a fim de manter a viabilidade do material genético, minimizando os efeitos deletérios provocados pelo processo de resfriamento e posterior aquecimento do sêmen (Upadhyay et al., 2021). Um exemplo desses aditivos são os antioxidantes, que ajudam a combater as Espécies Reativas ao Oxigênio (ERO's) produzidas em excesso e causadoras de injúrias aos espermatozoides, principalmente através de sua ação sobre a membrana plasmática destas células (Hussain et al., 2018; Raheja et al., 2018).

Os antioxidantes atuam no combate aos efeitos nocivos provocados pelos radicais livres, proporcionando melhor qualidade do sêmen fresco e criopreservado. As mudanças de temperatura provocadas durante os processos de congelamento e descongelamento são responsáveis pelos danos aos espermatozoides, alterando sua viabilidade e fertilidade. O estudo dos antioxidantes, os quais constituem a primeira linha de combate às EROs, para a melhora da qualidade do sêmen criopreservado, torna-se de fundamental importância, para desenvolvimento de protocolos padrões e aplicáveis, uma vez que existem muitas controvérsias em relação ao tipo de molécula antioxidante e às doses, o momento adequado para ser acrescentado e possíveis alterações destes aos meios de criopreservação (Da Silva et al., 2018). Estes antioxidantes podem agir impedindo a formação destes ERO's ou ainda combatendo as já existentes (Hussain et al., 2018).

Neste contexto, compostos naturais com capacidade antioxidante são amplamente estudados, como por exemplo, o extrato da casca de noz pecã, fruto da noqueira-pecã, que apresenta significativos teores de compostos fenólicos e taninos condensados, que possuem ação promissora como antioxidantes naturais, os quais auxiliam na prevenção de processos

oxidativos (Flores-Cordova et. al., 2017).

Da Dosa e colaboradores (2011) relataram que o alto teor de compostos antioxidante da noz pecã, inclusive quando comparado a vitamina E, que é potencial antioxidante utilizado na criopreservação, apresentou resultados superiores quando realizados testes, como o DPPH, para mensuração do potencial dos antioxidantes.

Diante da escassez de informações a respeito do uso de extratos alternativos como aditivo no sêmen bovino, este estudo objetivou avaliar a ação de um extrato natural sobre o sêmen diluído e resfriado por até 48 horas.

2. Metodologia

O estudo foi realizado no Laboratório de Reprodução Animal - LABRA, da Superintendência Unidade Hospitalar Veterinária Universitária (SUHVU), após aprovação pela Comissão de Ética no Uso de Animais – UFFS, sob protocolo CEUA nº 6089171220. A pesquisa trata-se de um estudo de campo e laboratorial de caráter quantitativo (Pereira, et al., 2018).

Para a avaliação das propriedades antioxidantes do composto natural (NP) utilizou-se o método DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil), consoante ao estudo de Brand-Willian et al. (1995). Inicialmente, realizou-se o preparo do radical, adicionando-se 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 realizada pela NP sobre o radical, foi realizado utilizando-se a seguinte fórmula:

$$\% \text{ de inibição do radical: } \frac{1 - Af}{Ao} \times 100$$

Onde: “Ao” refere-se a absorbância inicial e “Af” se refere a absorbância final.

Após esta etapa o NP passou a ser adicionado ao sêmen bovino fresco diluído e resfriado. Para a coleta do sêmen, utilizou-se dois reprodutores bovinos da Raça Braford, após avaliação andrológica (Cbra, 2013). Os reprodutores encontravam-se com escore de condição corporal (ECC) 4,0, mantidos em piquetes com silagem de Capi-açu (*Pennisetum purpureum Schumach*), acrescida de 4 kg/dia de ração (18% de proteína – INSUAGRO®), pastagem e água ad libitum.

Foram realizadas oito coletas de sêmen, mediante eletro-ejaculador BOJEKTOR®, 2001. As amostras dos ejaculados foram diluídas em diluidor TRIS-gema de ovo (Cbra, 2013), utilizando-se a diluição 1:10 para os ejaculados do touro 1 e 1:5 para o ejaculado do touro 2. Após diluição, o sêmen foi avaliado através do sistema computadorizado de análise espermática - CASA (IVOS-IIR®, Hamilton Thorne), para avaliação da viabilidade espermática, considerando dez campos de análise. Essa avaliação foi considerada tempo zero.

Após avaliação do sêmen diluído, confirmada sua viabilidade, o sêmen diluído foi dividido em dois grupos experimentais como se segue: grupo 1: Controle, com sêmen diluído e, grupo 2: Sêmen diluído, acrescido de 1% de extrato natural – NP.

Amostras foram fracionadas em tubos eppendorf identificadas de acordo com animal e grupo, nas quantidades de 990µl por tubo. Posteriormente foram acrescidos 10µl do NP em cada tubo, representando 1% do conteúdo total da amostra. Todas as amostras foram resfriadas por 12, 18, 24, 36 e 48 horas em caixas em caixas isotérmicas (BotuFLEX®).

Ao final de cada período de resfriamento, as caixas foram abertas e os tubos eppendorf transferidos para o banho-maria (CENTURO®) a uma temperatura de 37°C. Em seguida as amostras foram analisadas no CASA (IVOS-IIR®, Hamilton Thorne) a fim de verificar a viabilidade e cinética do movimento espermático.

Os dados coletados foram organizados, tabulados em planilhas e submetidos à análise estatística. O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado, sendo os dados submetidos à análise de variância pelo modelo matemático:

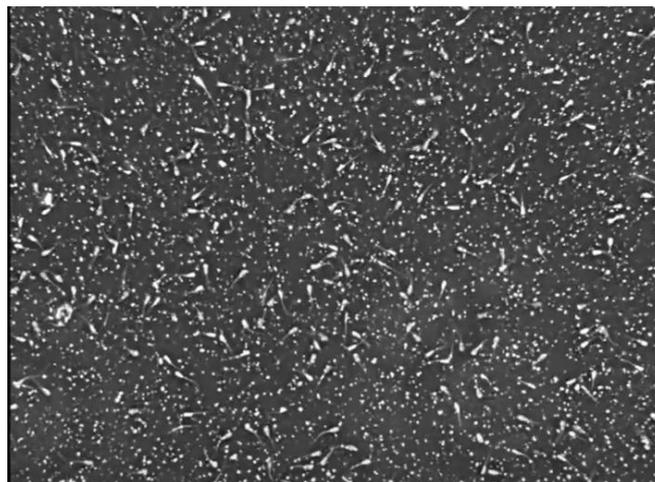
$$Y_{ij} = \mu + T_i + t_j + T(t)_{ij} + \epsilon_{ij}$$

em que: Y_{ij} representa as variáveis dependentes; μ a média geral das observações; T_i o efeito do aditivo utilizado; t_j o efeito do tempo de avaliação; $T(t)_{ij}$ o efeito do tratamento na hora de avaliação; e ϵ_{ij} o erro residual aleatório. Os parâmetros foram classificados pelo teste “F” e as médias com efeito significativo para $T(t)_{ij}$ foram comparados pelo teste de t de Student, com $\alpha = 0,05$. As análises foram realizadas pelo programa estatístico SAS versão 9.2 (SAS, 2009).

3. Resultados e Discussão

Das amostras analisadas, considerou-se em média 3,27 bilhões de espermatozoides /mL, e 9,97 campos de análise no CASA. Em algumas amostras observou-se formação de aglutinados que impediram a avaliação fidedigna da amostra, uma vez que cada grupo era interpretado como cabeça de espermatozoide, impossibilitando assim, a avaliação desse tipo de amostra, como mostra a Figura 1.

Figura 1 - Amostra de sêmen com precipitações em forma de grumos ao ser visualizada no CASA (IVOS-IIR®, Hamilton Thorne). LABRA – SUHVU. Campus Realeza-UFFS.



Fonte: Acervo pessoal (2022).

A fim de minimizar a ocorrência dos grumos/aglutinação, realizou-se a filtragem do diluente TRIS-gema de ovo e do extrato natural - NP com filtros estéreis de 0,22 micras (UniFil®).

A Tabela 1 apresenta os resultados da cinética do movimento espermático relativa à motilidade total e motilidade progressiva do sêmen diluído e resfriado, acrescido ou não de aditivo natural – NP.

Tabela 1 - Parâmetros do sêmen bovino, diluído e resfriado, acrescido ou não de extrato natural (NP), relativos à motilidade total e motilidade progressiva avaliados pelo CASA (IVOS-IIR®, Hamilton Thorne). LABRA – SUHVU. Campus Realeza-UFFS.

PARÂMETROS SEMINAIS	SÊMEN BOVINO											
	FRESCO		12 HORAS		18 HORAS		24 HORAS		36 HORAS		48 HORAS	
	CTL	NP	CLT	NP	CLT	NP	CTL	NP	CTL	NP	CTL	NP
MOTILIDADE TOTAL												
AMPLITUDE LATERAL DA CABEÇA - ALH (µm)	7.32	0.95	7.21	0.89	9.37	1.21	8.20	1.07	0.74	0.99	0.87	1.17
FREQUÊNCIA DE BATIMENTO FLAGELAR - BCF (Hz)	2.59	2.59	2.89	2.69	2.66	3.04	2.62	2.85	3.30	2.82	2.68	2.80
DESLOCAMENTO MÉDIO - DAP (µm)	6.37 ^a	3.80 ^b	5.53	4.32	6.87 ^a	4.16 ^b	4.70	5.02	6.28 ^a	4.04 ^b	6.82 ^a	3.18 ^b
VELOCIDADE MÉDIA - VAP (µm)	5.79	2.29	4.75	1.73	3.73	3.34	4.64	2.77	5.09	1.68	4.56	1.87
DESLOCAMENTO CURVILINEAR - DCL (µm)	1.44	3.27	2.30	2.31	1.58	2.30	2.38	2.51	1.59	2.31	1.74	1.59
VELOCIDADE RETILÍNEO - VSL (µm)	5.50	5.24	6.67	4.55	6.61	8.00	4.33	4.02	6.04	7.37	6.28	6.14
LINEARIDADE - LIN (%)	3.53	3.32	4.58	3.93	4.00	2.93	3.95	3.54	4.29	3.47	4.12	3.57
RETILINEARIDADE STR (%)	6.50	7.70	6.26	4.96	5.34	6.51	8.32	8.04	8.20	7.03	8.15	7.33
ÍNDICE DE OSCILAÇÃO DA CÉLULA - WOB (%)	4.76	4.98	5.53	5.08	4.92	4.31	5.31	4.54	5.05	5.12	5.14	4.32
MOTILIDADE PROGRESSIVA												
AMPLITUDE LATERAL DA CABEÇA - ALH (µm)	6.66	0.78	7.31	0.97	7.41	0.86	9.23	0.87	0.85	0.98	0.73	1.03
FREQUÊNCIA DE BATIMENTO FLAGELAR - BCF (Hz)	2.32	2.68	2.72	2.70	2.57	2.27	3.58	2.84	2.11	2.67	2.94	2.55
DESLOCAMENTO MÉDIO - DAP (µm)	5.91 ^a	3.69 ^b	6.56 ^a	4.82 ^b	5.99 ^a	4.32 ^b	6.43 ^a	3.93 ^b	6.05	4.77	7.62 ^a	1.60 ^b
VELOCIDADE MÉDIA - VAP (µm)	5.69	3.15	4.33	1.89	3.37	2.07	3.31	2.13	3.51	2.96	1.03	2.04
DESLOCAMENTO CURVILINEAR - DCL (µm)	1.61 ^b	4.11 ^a	1.54	2.43	1.74	2.25	1.66	2.09	1.63	2.06	1.95	1.60
VELOCIDADE RETILÍNEO - VSL (µm)	6.80	3.20	4.85	2.69	3.83	2.64	3.95	3.36	3.18	3.63	3.23	2.93
LINEARIDADE - LIN (%)	4.16 ^b	6.12 ^a	5.04	5.03	5.35	4.54	5.73	4.45	5.69	5.06	5.57	5.37
RETILINEARIDADE STR (%)	7.62	8.36	8.28	8.35	7.39	8.05	7.75	6.80	9.19	7.15	9.02	7.29
ÍNDICE DE OSCILAÇÃO DA CÉLULA - WOB (%)	4.79	6.46	5.09	5.49	5.93	5.19	6.20	4.95	5.65	5.10	6.04	5.25

Fonte: Elaborado pelos autores (2023).

Observou-se que os parâmetros ALH, BCF, VAP, DCL, VSL, LIN, STR e WOB, referentes à movimentação espermática, não apresentaram diferença ao se considerar o sêmen diluído e resfriado, acrescido ou não de aditivo - NP ($p > 0,05$ – Tabela 1).

Na tabela 1 é possível observar que o deslocamento médio das células móveis sofreu diferença significativa ($p < 0,05$) a fresco, as 18, 36 e 48 horas de resfriamento ao se comparar o sêmen diluído sem e acrescido de NP. Observou-se ainda, que o deslocamento médio foi menor no sêmen acrescido de extrato natural ($p < 0,05$). O deslocamento médio é a distância percorrida pelo espermatozoide ao longo do percurso VAP. Não foram encontrados estudos relatando alterações significativas nos valores de deslocamento médio, o que remete as precipitações apresentadas pelas amostras. Suspeita-se que as aglutinações encontradas surtiram efeito sobre esse parâmetro, enfatizando a necessidade de estudos adicionais para a elucidação das aglutinações encontradas, e possíveis correlações com a cinética do movimento espermático.

Frente a escassez de estudos sobre a utilização do extrato natural utilizado como aditivo seminal nos programas de criopreservação do sêmen, se faz necessária a comparação e discussão considerando estudos que empregam a utilização de antioxidantes no sêmen, a fim de avaliar características pertinentes à cinética espermática, após o processo de criopreservação.

Resultados similares aos encontrados nesse estudo foram relatados por Pinto et al. (2020), ao avaliarem a utilização de Vitamina C e Glutathione Reduzida, quando adicionados de forma isolada ao diluidor do sêmen, antes dos processos de criopreservação. Esses autores não relataram efeito sobre a cinética do movimento espermático.

Zhao e colaboradores (2015) relataram que a Vitamina C, junto a Vitamina E, apresentaram ação benéfica sobre o sêmen criopreservado ($p < 0,05$) em relação as variáveis de VSL, VCL e STR, enquanto os parâmetros de LIN e VAP não foram alterados significativamente ($p > 0,05$). Quando isolada, a Vitamina C não apresentou efeitos significativos sobre a cinética do movimento espermático em relação a nenhum parâmetro.

Adicionalmente, Rostami e colaboradores (2020) reforçaram que o uso de Vitamina C adicionada ao diluente TRIS-gema de ovo não apresentou efeitos benéficos significativos sobre a cinética do movimento espermático ($p > 0,05$). Da mesma maneira, ao avaliarem a aplicação da vitamina E ao diluente antes da criopreservação, não encontraram efeitos significativos ($p > 0,05$) sobre os parâmetros VAP, VSL, STR e LIN em diferentes períodos de tempo avaliados após o início da criopreservação. Silva e colaboradores (2012) relataram que o uso do Resveratrol e da Quercetina como antioxidantes aplicados ao Tris-gema de ovo-glicerol, isolados, antes da criopreservação, não apresentaram efeitos significativos ($p > 0,05$) sobre parâmetros referentes a movimentação espermática e ainda mostraram efeito negativo sobre o potencial de membrana mitocondrial.

No estudo de Rao e colaboradores (2017) foi relatado que o extrato da casca de Terminalia arjuna (ECTA) apresenta-se como um potencial antioxidante, e estudos foram feitos com sêmen humano, apresentando efeitos benéficos sobre a morfologia espermática, protegendo o material genético e evitando alterações morfológicas significativas nas células seminais. Em 2021, Kowalczyk e colaboradores, comprovaram que o uso de Elamipretide como antioxidante no sêmen bovino criopreservado, apresenta resultados significativamente positivos, apontando o composto como potencial antioxidante para utilização na criopreservação.

Os estudos de Silva et al. (2012); Zhao et al. (2015); Rao et al. (2017); Pinto et al. (2020); Rostami et al. (2020) e de Kowalczyk et al. (2021) mostram a diversidade de estudos, variedade de métodos e resultados inconclusivos a ação de diferentes antioxidantes sobre a cinética da espermática, como o encontrado nesse estudo. Mas todos, em comum, ressalta a necessidade de estudos complementares.

No estudo proposto, não foi possível observar correlação direta do efeito do aditivo natural sobre a morfologia da célula espermática, sobretudo decorrente dos diferentes tempos de resfriamento. Estudos posteriores com diferentes concentrações de NP e períodos de resfriamento devem ser realizados, visando a elucidação quanto a ação efetiva do extrato diretamente sobre o espermatozoide bovino resfriado.

Na Tabela 2 são encontrados os valores obtidos referentes aos defeitos morfológicos das células espermáticas avaliadas através do sistema computadorizado de análise espermática-CASA.

Tabela 2 - Parâmetros do sêmen bovino, diluído e resfriado, acrescido ou não de extrato natural (NP), relativos à morfologia espermática, avaliados pelo CASA (IVOS-IIR®, Hamilton Thorne). LABRA – SUHVU. Campus Realeza-UFFS.

PARÂMETROS	0 HORAS		12 HORAS		18 HORAS		24 HORAS		36 HORAS		48 HORAS	
	CTL	NP	CTL	NP	CTL	NP	CTL	NP	CTL	NP	CTL	NP
% GOTA PROXIMAL	2,07 B	5,50 A	3,38	2,05	1,65	2,40	4,12	1,88	2,74	1,86	1,20	1,63
% GOTA DISTAL	3,85 B	13,5 A	6,12	4,46	4,54	7,22	7,64	4,15	7,25	5,43	2,88	4,16
% CAUDA DOBRADA	6,37 B	10,9 A	7,00 A	2,42 B	6,00	4,58	11,38	3,09 B	8,70 A	3,16 B	4,24	1,70
% CAUDA ENROLADA	0,50	1,12	0,51	0,18	0,43	0,33	1,06	0,43	1,62 A	0,35 B	0,25	0,15

Fonte: Elaborado pelos autores (2023).

Dentre os parâmetros avaliados, o único que apresentou alterações significativas após resfriamento do sêmen, foi a porcentagem (%) de cauda dobrada, que se manteve elevada no grupo 1, na maioria dos períodos de resfriamento.

Segundo Rua e colaboradores (2016), as caudas levemente dobradas ou enroladas são características de defeitos que aparecem após a ejaculação ou mediante ao transporte do material genético. Ainda relatam que a cauda costuma sofrer alterações mediante as mudanças de temperatura.

Devido à escassez de estudos a respeito da ação de antioxidantes sobre parâmetros específicos da morfologia espermática, não foi possível a comparação do resultado da ação do extrato natural (NP) sobre a morfologia espermática, com resultados anteriores.

4. Conclusão

Nas condições desse estudo, a adição de um extrato natural ao sêmen bovino diluído com TRIS-GEMA, e resfriado por até 48 horas, leva a formação de aglutinados/grumos em algumas amostras que impediram a avaliação da cinética do movimento espermático pelo CASA.

Nas amostras possíveis de avaliação, não se observou uma relação direta do aditivo natural sobre a cinética do movimento espermático, embora os espermatozoides das amostras de sêmen contendo aditivo, sem resfriamento, resfriado por 18, 36 e 48 horas apresentaram menor deslocamento médio quando avaliado pelo CASA, possivelmente decorrente da formação dos grumos. Sobre a morfologia espermática não foi possível concluir que as alterações encontradas sejam em decorrência do extrato natural e se as mesmas evidenciam atividade negativa do extrato sobre o sêmen diluído e resfriado.

No entanto, estudos complementares serão desenvolvidos com o intuito de elucidar a origem da formação dos aglutinados/grumos em amostras de sêmen diluído acrescido de aditivo natural, bem como, salienta-se a necessidade de estudos posteriores em torno da adição de compostos antioxidantes no sêmen bovino resfriado, visando minimizar os impactos da criopreservação seminal e otimizar a viabilidade espermática, a fim de incrementar, futuramente, as taxas de gestação dos rebanhos bovinos.

Agradecimentos

Agradecimento à Universidade Federal da Fronteira Sul, pelo fomento, que financiou e possibilitou a realização do estudo.

Referências

- Almeida, S. et al. (2022) Morfologia espermática em touros: quais os principais defeitos e o porquê ocorrem. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, 102-110.
- Alyethodi, R. R. et al. (2021) Role of seminal MDA, ROS, and antioxidants in cryopreservation and their kinetics under the influence of ejaculatory abstinence in bovine semen. *Cryobiology*, 98, 187-193.
- Brand-Williams, W. et al. (1995) Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT-Food science and Technology*, 28(1), 25-30.
- Bozzi, A. D. R. et al. (2023) Adição de sucos de laranja, abacaxi e beterraba em diluidor para criopreservação de sêmen de carneiros. *Ciência Animal Brasileira*, v. 24.
- Carrer, A. R. (2022) *Criopreservação de sêmen bovino com dois diluentes comerciais suplementados com astaxantina*. 2022. f.60. Dissertação (Mestrado). Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal.
- CBRA. Manual para Exame Andrológico e Avaliação de Sêmen Animal. (2a ed.), *Colégio Brasileiro de Reprodução Animal*, 45p, 2013.
- Da Silva, A. F. et al. (2018) Efeito da adição de antioxidantes sobre a viabilidade do sêmen bovino. *Arq. Ciênc. Vet. Zool. UNIPAR*, 21(4), Anais do II Concivet 2018, 145-146.
- De La Rosa, L. A. et al. (2011) Fereidon. Compostos fenólicos e atividade antioxidante de grãos e cascas de noz-pecã mexicana (*Carya illinoensis*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(1), 152-162.
- Felippelli, G., et al. (2023) "Viability of *Toxoplasma Gondii* in Cattle Semen Cryopreserved with Different Concentrations of Cryoprotectant." *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 43.
- Flores-Cordova, M. et al. (2017) Phytochemical composition and antioxidant capacity in Mexican pecan nut. *Emirates Journal of Food and Agriculture*, 29(5), 346-350.
- Hussain, M. et al. (2018) Additives used in semen preservation in animals: A short review. *International Journal of Chemical Studies*, 6(5), 354-361.
- Kowalczyk, A. et al. (2021) Antioxidant effect of Elamipretide on bull's sperm cells during freezing/thawing process. *Andrology*, 9(4), 1275-1281.
- Leite, P. et al. (2011) Bovine Semen Cryopreservation. *Journal of Health Sciences*, 13(4), 279-286.
- Matos, D. L. et al. (2008) Análise computarizada de espermatozoides: revisão de literatura. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, 32(4), 225-32.
- Mizera, A. et al. (2019) Impact of the *Spirulina maxima* extract addition to semen extender on bovine sperm quality. *Italian Journal of Animal Science*, 18(1), 601-607.
- Murphy, E. M. et al. (2017) A comparison of semen diluents on the in vitro and in vivo fertility of liquid bull semen. *Journal of dairy science*, 100(2), 1541-1554.
- Pereira, A., S., Shitsuka, D., M., Parreira, F., J. & Shitsuka, R. (2018). *Metodologia da pesquisa científica*. UFSM. <https://repositorio.ufsm.br/>.
- Pinto, S. C. C. et al. (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.
- Raheja, N. et al. (2018) A review on semen extenders and additives used in cattle and buffalo bull semen preservation. *Journal of Entomology and Zoology Studies*, 6(3), 239-245.
- Rao, K. A. et al. (2017) Human sperm DNA damage inhibition and antioxidant activity of *T. arjuna* bark: an in vitro study. *Biotech*, 7, 1-9.
- Rostami, B. et al. (2020) Effects of supplementation of tris-egg yolk extender with different sugars and antioxidants on freezability of ram semen. *Cryobiology*, 92, 62-66.
- Rua, M. A. S. et al. (2016) Repetibilidade das características seminais, espermáticas e fertilidade de garanhões. *Revista Brasileira de Ciências Agrárias*, 11(2), 124-131.
- Silva, E. C. B. et al. (2012) Effect of antioxidants resveratrol and quercetin on in vitro evaluation of frozen ram sperm. *Theriogenology*, 77(8), 1722-1726.
- Silva, N. C. (2017) *Uso de antioxidantes em diluentes de criopreservação de sêmen bovino*. 2017. 95 f. Tese (Doutorado em Zootecnia) - Universidade Federal de Goiás, Goiânia.
- Snoeck, P. P. N. et al. (2020) Padronização do Sperm Class Analyzer®(SCA®) para avaliação de espermatozoides equinos criopreservados. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 72, 1163-1171.
- Upadhyay, V. R. et al. (2021) Implications of cryopreservation on structural and functional attributes of bovine spermatozoa: An overview. *Andrologia*, 53(8), 1-16.
- Zhao, X. L. et al. (2015) *Genetics and Molecular Research*, 14(1), 2572-2581.