UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP

CÂMPUS DE JABOTICABAL

Criopreservação de sêmen bovino com dois diluentes comerciais suplementados com astaxantina

Alessandra Regina Carrer

Médica Veterinária

2022

D
I
S
S.

/

C
A
R
R
E
R

A.
R.

2
0
2
2

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP

CÂMPUS DE JABOTICABAL

Criopreservação de sêmen bovino com dois diluentes comerciais suplementados com astaxantina

Mestranda: Alessandra Regina Carrer
Orientadora: Profa. Dra. Lindsay Unno Gimenes
Coorientador: Prof. Dr. Rubens Paes de Arruda

Dissertação de Mestrado apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Medicina Veterinária.

2022

C314c

Carrer, Alessandra Regina

Criopreservação de sêmen bovino com dois diluentes comerciais suplementados com astaxantina / Alessandra Regina Carrer. -- Jaboticabal, 2022

60 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal

Orientadora: Lindsay Unno Gimenes

Coorientador: Rubens Paes de Arruda

1. Medicina Veterinária. 2. Reprodução. 3. Andrologia. 4. Criopreservação. 5. Estresse oxidativo. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Jaboticabal

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: CRIOPRESERVAÇÃO DE SÊMEN BOVINO COM DOIS DILUENTES COMERCIAIS SUPLEMENTADOS COM ASTAXANTINA

AUTORA: ALESSANDRA REGINA CARRER

ORIENTADORA: LINDSAY UNNO GIMENES

COORIENTADOR: RUBENS PAES DE ARRUDA

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em MEDICINA VETERINÁRIA, área: Reprodução Animal pela Comissão Examinadora:

Profa. Dra. LINDSAY UNNO GIMENES (Participaçao Virtual)
Departamento de Patologia Reproducao e Saude Unica / FCAV UNESP Jaboticabal

p/ Pesquisador Dr. FABIO MORATO MONTEIRO (Participaçao Virtual)
Instituto de Zootecnia / Sertãozinho/SP

p/ Prof. Dr. MARCILIO NICHI (Participaçao Virtual)
Depto. de Reprodução Animal / USP/FMVZ - São Paulo/SP

Jaboticabal, 14 de abril de 2022

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

Alessandra Regina Carrer – nascida em Curitiba-PR, no dia 03 de novembro de 1993. Graduou-se em Medicina Veterinária no dia 20 de janeiro de 2020, pelo Instituto Federal Catarinense – Câmpus de Araquari – SC. Durante a graduação foi bolsista do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Núcleo de Inovação Tecnológica (NIT), atuando em pesquisas principalmente voltadas para a utilização de óleos essenciais no tratamento e controle de carrapatos bovinos e miíase. Em uma dessas pesquisas, participou da criação de um produto com registro de patente. Participou do Curso de Extensão em Endocrinologia de Cães e Gatos, XIX Congresso Brasileiro de Parasitologia Veterinária, I Evento de Pecuária de Corte, Simpósio de Zoonoses e Saúde Única, curso de oratória, semanas acadêmicas e acompanhamento de Médico Veterinário clínico geral, endocrinologista e cirurgião. Além do ensino e pesquisas, realizou também atividades de extensão, como a participação do projeto Movimento pela Interação Animal. Atualmente é mestranda de Reprodução Animal do Programa de Medicina Veterinária da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”.

Epígrafe

“Demore o tempo que for para decidir o que você quer da vida, e depois que decidir não recue ante nenhum pretexto, porque o mundo tentará te dissuadir”.

Friedrich Nietzsche

Dedicatória

Ao meu papis Eduardo e minha mãe Regina,
os quais batalharam pelo meu futuro,
apoiaram e incentivaram minhas escolhas.

AGRADECIMENTOS

À Deus pela minha vida e saúde.

Aos meus pais por terem me concebido, me amparado e me guiado para tornar-me um ser humano de caráter. Por terem confiado e acreditado que eu seria capaz. Por estarem sempre presentes mesmo a quilômetros de distância. Por serem vocês, especiais em cada gesto. Por se preocuparem todos os dias me mandando mensagem de “Bom dia miúdo”, “Deus te abençoe filha”. Amo vocês!

Ao Cesar, por ter me apoiado em cada decisão que tomei durante e após a graduação. Por me incentivar a ser professora e por sempre acreditar no meu potencial. Desde que nos conhecemos você foi a pessoa que me acalmou, me ajudou de todas as formas e sempre me mostrou o lado bom de cada situação que passei. Obrigada por tanto carinho e cuidado. Você é especial demais, te amo!

À Profª. Dra. Lindsay Unno Gimenes pela oportunidade e confiança em mim depositada. Por sempre ouvir meus áudios e sanar minhas dúvidas. Por salientar que basta ter curiosidade para realizar pesquisas em diversos temas e por nos incentivar a “orientar” as demais meninas do grupo. Eu cresci muito com essas atividades e pude sentir o quão gratificante é conseguir auxiliar no processo de aprendizagem de alguém. Realmente nós aprendemos muito ao ensinar.

Ao Prof. Dr. Rubens Paes de Arruda, por ter me orientado desde o primeiro dia que vim conhecer o Departamento de Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ-USP). Pelo privilégio de acompanhar suas atividades. Por me mostrar a importância de ser um profissional que atue no ensino, pesquisa e extensão. É uma honra poder aprender com o senhor.

À Profª. Dra. Eneiva Carla Carvalho Celeghini, por ser tão doce. Agradeço por sempre estar disposta a me auxiliar, tirar dúvidas e me permitir participar da estação de monta das Éguas. Obrigada por sempre me tranquilizar.

Ao Prof. Dr. Guilherme Pugliesi por ter me socorrido com a estatística. Admirava seu trabalho sem te conhecer. Agora virei sua fã, pois além da sua atuação na Reprodução Animal, possui uma capacidade fora do comum de ser orientador, de tantos alunos. Obrigada por sempre estar disponível a me auxiliar.

Ao Prof. Dr. André Furugen Cesar de Andrade e à doutoranda Ana Paula Pinoti Pavaneli pela disposição em realizarem as análises no citômetro de fluxo.
Ao Departamento de Reprodução da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV), sobretudo Prof. Dr. Guilherme Fazan Rossi, por me permitir acompanhar sua rotina e por tantos conhecimentos transmitidos. Ao Edson por ter me ouvido tantas vezes e estar sempre disposto a ajudar de todas as maneiras. Ao Hugo por todo auxílio com a parte burocrática e por tornar nossos dias mais alegres.
Ao Departamento de Reprodução Animal da FMVZ por terem permitido realizar meu experimento. Ao Cleiton por ser sempre atencioso. Aos Srs. João, Márcio e José Maria, por sempre me auxiliarem com os touros, me socorrerem na hora de buscar as éguas ou quando aparecem ratos rs. Aos pós-graduandos, sobretudo à Patrícia que me ajudou desde o primeiro dia na USP. Ao Rafael, pelo auxílio durante o experimento e ao Felipe que além de toda dedicação, ainda animava nossos dias sendo Dj. Saudades dessa equipe! À Nataly pelo companheirismo, risos e choros compartilhados. À Priscila por ter se tornado uma amiga e estar sempre presente. Ao Jonatas pelas conversas profundas de cada almoço e por ser um bom amigo. E ao Vitinho que me deu muita força na reta final. Obrigada amigos!
Às amigas que formei na graduação Patrícia e Luisa, “Trio para a vida”. Distância nenhuma nos separa! Obrigada por ouvirem meus áudios, por vezes longos demais. Por torcerem e rezarem por mim. Amo vocês meninas. Vocês são fantásticas!
À Letícia, que foi o maior presente de Jaboticabal. A única parte ruim da nossa amizade é não viver mais na mesma cidade para poder fazer qualquer coisa juntas. Te admiro amiga! Obrigada por ser tão presente e especial na minha vida. Te amo!
À Dayse e Sandra pela amizade cultivada ao longo desses anos. Pelo apoio, torcida e por tornarem-se minha família. Saudade de estar perto. Amo vocês!
À Joice, Aline, Maria Eduarda, Claudia, Marina e Fernanda, por poder compartilhar a angústia, frustação e nervoso da pós-graduação haha. Ninguém está sozinha meninas! Um dia estaremos nas Maldivas, rindo de tudo isso (oremos).
O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.
Às empresas Botupharma® e Reprodux® pelo apoio e fornecimento dos diluidores.
À todas as pessoas que me auxiliaram durante esse processo, muito obrigada!

SUMÁRIO

Página

Certificado da Comissão de Ética no Uso de Animais.....iii
Lista de abreviaturas.....iv
Lista de tabelas.....vi
Lista de figuras.....vii
Resumo.....viii
Palavras-chave.....viii
Abstract.....ix
Keywords.....ix
CAPÍTULO 1 - Considerações gerais.....1
1- INTRODUÇÃO.....1
2- REVISÃO DE LITERATURA.....2
2.1 Criopreservação de sêmen.....2
2.2 Diluidores.....4
2.3 Antioxidantes e o estresse oxidativo.....5
2.4 Astaxantina.....6
3- HIPÓTESE.....9
4- OBJETIVO.....10
5- REFERÊNCIAS.....10
CAPÍTULO 2 - A adição de antioxidante astaxantina em meios de criopreservação de sêmen bovino melhora a qualidade espermática pós-descongelação?.....16
1. Introdução.....17
2. Material e métodos.....19
2.1 Animais.....19
2.2 Experimento 1.....19
2.2.1 Grupos experimentais.....19
2.2.2 Avaliações do sêmen *in natura* e diluído.....20
2.2.2.1 Avaliações iniciais e diluição.....20
2.2.2.2 Características de motilidade espermática.....20

2.2.2.3 Morfologia espermática.....21
2.2.3 Criopreservação 21
2.2.4 Avaliações do sêmen pós-criopreservação.....22
2.2.4.1 Integridade das membranas plasmática e acrossomal, potencial de membrana mitocondrial e estresse oxidativo.....22
2.3 Experimento 2.....23
2.4 Análise estatística.....24
3. Resultados.....24
3.1 Experimento 1.....24
3.2 Experimento 2.....28
4. Discussão.....32
5. Conclusão.....35
Agradecimentos.....35
Referências.....35
APÊNDICE.....39
Apêndice A: *Set up* Bovino.....40

unesp UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO DE MESQUITA FILHO" Câmpus de Jaboticabal

CEUA – COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

DECLARAÇÃO

Declaramos que o trabalho de pesquisa intitulado "Efeito crioprotetor da dimetilformamida associada ao glicerol no sêmen bovino", sob a responsabilidade da Profa. Dra. Lindsay Unno Gimenes e Certificado CEUA protocolo nº 269/21, aprovado em reunião ordinária em 11 de fevereiro de 2021, teve o seu título alterado para "Criopreservação de sêmen bovino com dois diluentes comerciais suplementados com Astaxantina", e teve a substituição da molécula "Dimetilformamida" por "Astaxantina" com acréscimo de um diluente para avaliar o sêmen dos animais.

Solicitação aprovada em reunião ordinária de 01 de abril de 2021.

Jaboticabal, 12 de abril de 2021.

Fabiana Pilarski

Profa. Dra. Fabiana Pilarski
Coordenadora – CEUA

Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias
Via de Acesso Prof. Paulo Donato Castellane, s/n CEP 14884-900 - Jaboticabal - SP - Brasil
Tel. 16 3209-7100 - www.fcav.unesp.br

LISTA DE ABREVIATURAS

ABIEC	Associação Brasileira das Indústrias Exportadoras de Carne
ALH	Amplitude do deslocamento lateral da cabeça
ANOVA	Análise de variância
ASBIA	Associação Brasileira de Inseminação Artificial
AST	Astaxantina
BCF	Frequência de batimento
C	Controle
CAPES	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
CASA	*Computer Assisted Sperm Analisys*
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
CNPq	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
CRG	CellROX® *green*
DIC	Contraste de interferência diferencial
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
FCAV	Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias
FITC-PSA	Aglutinina de *Pisum sativum* conjugada a isotiocinato de fluoresceína
FMVZ	Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
JC-1	Iodeto de 5,5',6,6'-tetracloro-1,1,3,3'-tetraetilbenzimidazolilcarbocianina
LIN	Linearidade
LMMD/ZMV	Laboratório de Morfofisiologia Molecular e Desenvolvimento
LTDA	Limitada
MIV	Maturação *in vitro*
MP	Motilidade progressiva
MT	Motilidade total
NIT	Núcleo de Inovação Tecnológica
PIB	Produto Interno Bruto
IP	Iodeto de propídio
PMM	Potencial de membrana mitocondrial
RAP	Células rápidas

STR	Retilinearidade
S59	Syto 59
TALP sperm	Meio de *Tyrode* suplementado com albumina, lactato e piruvato
UNESP	Universidade Estadual Paulista
USP	Universidade de São Paulo
VAP	Velocidade do trajeto
VCL	Velocidade curvilinear
VSL	Velocidade progressiva

LISTA DE TABELAS

Página

Tabela 1. Médias ± erro padrão das características de motilidade espermática, após a adição do sêmen em diluidor à base de gema de ovo (C-GEMA), diluidor à base de gema de ovo + 0,5 µM de astaxantina (GEMA + AST) e diluidor à base de gema de ovo + 0,009% de DMSO (C-GEMA DMSO). 25

Tabela 2.. Médias ± erro padrão das características de motilidade espermática, após criopreservação do sêmen com o diluidor à base de gema de ovo (C-GEMA), diluidor à base de gema de ovo + 0,5 µM de astaxantina (GEMA + AST) e diluidor à base de gema de ovo + 0,009% de DMSO (C-GEMA DMSO).....26

Tabela 3. Médias ± erro padrão das características de motilidade espermática, após a adição do sêmen em diluidor à base de lipossomas (C-LIPO), diluidor à base de lipossomas + 0,5 µM de astaxantina (LIPO + AST) e diluidor à base de lipossomas + 0,009% de DMSO (C-LIPO DMSO).. 29

Tabela 4. Médias ± erro padrão das características de motilidade espermática, após a criopreservação do sêmen com o diluidor à base de lipossomas (C-LIPO), diluidor à base de lipossomas + 0,5 µM de astaxantina (LIPO + AST) e diluidor à base de lipossomas + 0,009% de DMSO (C-LIPO DMSO).....29

LISTA DE FIGURAS

Página

Figura 1. Posição da astaxantina na membrana celular 6

Figura 1. Médias ± erro padrão do percentual de defeitos menores, maiores e totais dos diferentes grupos experimentais avaliados pós criopreservação. Letras diferentes sobrescritas (a, b) no mesmo grupo de defeitos indicam diferença (p ≤ 0,05).. 27

Figura 2. Médias ± erro padrão dos percentuais de espermatozoides com integridade de membranas plasmática e acrossomal e da intensidade de fluorescência associada ao potencial de membrana mitocondrial e estresse oxidativo. **A)** Membrana plasmática íntegra (%); **B)** Membrana acrossomal íntegra (%); **C)** Membrana plasmática e acrossomal íntegras (%); **D)** Intensidade média de fluorescência da sonda JC-1agg, indicando alto potencial de membrana mitocondrial; **E)** Mediana da intensidade de fluorescência da sonda *CellROX® green*, indicativa de estresse oxidativo. Letras diferentes sobrescritas (a, b) no mesmo bloco de colunas de defeitos indicam diferença (p ≤ 0,05).. 28

Figura 3. Médias ± erro padrão dos espermatozoides com defeitos menores, maiores e totais (%) dos diferentes grupos experimentais após a diluição do sêmen 30

Figura 4. Médias ± erro padrão dos espermatozoides com defeitos menores, maiores e totais (%) dos diferentes grupos experimentais, após a criopreservação do sêmen 31

Figura 5. Médias ± erro padrão dos percentuais de espermatozoides com integridade de membranas plasmática e acrossomal, e da intensidade de fluorescência associada ao potencial de membrana mitocondrial e estresse oxidativo. **A)** Membrana plasmática íntegra (%); **B)** Membrana acrossomal íntegra (%); **C)** Membrana plasmática e acrossomal íntegras (%); **D)** Intensidade média da sonda JC-1agg, indicando alto potencial de membrana mitocondrial; **E)** Mediana da intensidade de fluorescência da sonda *CellROX® green*, indicativa de estresse oxidativo 32

CRIOPRESERVAÇÃO DE SÊMEN BOVINO COM DOIS DILUENTES COMERCIAIS SUPLEMENTADOS COM ASTAXANTINA

RESUMO – Neste estudo o objetivo foi avaliar a suplementação com astaxantina em meios diluidores comerciais de criopreservação de sêmen bovino, à base de gema de ovo (Experimento 1) e à base de lipossomas (Experimento 2), quanto à motilidade, morfologia, integridade das membranas plasmática e acrossomal, potencial de membrana mitocondrial e estresse oxidativo. Foram utilizados seis touros da raça Nelore e colhidos sete ejaculados de cada animal (N=42). Cada ejaculado foi dividido para receber um dos seguintes tratamentos: diluidor comercial (C-GEMA ou C-LIPO), diluidor comercial suplementado com 0,5 µM astaxantina (GEMA + AST ou LIPO + AST) e diluidor comercial com 0,009% de dimetilsulfóxido (C-GEMA DMSO ou C-LIPO DMSO). Este último grupo foi incluído como um controle negativo, uma vez que o DMSO foi a substância utilizada para dissolver a astaxantina. Após a diluição, os espermatozoides foram submetidos ao sistema de análises computadorizado da motilidade espermática (CASA), além de serem analisados quanto à morfologia espermática, sob microscopia de contraste de interferência diferencial. Após a criopreservação, as células espermáticas foram reavaliadas para características de motilidade e morfologia espermática, além de mensurar a porcentagem de células com integridade das membranas plasmática e acrossomal, potencial de membrana mitocondrial e estresse oxidativo, sob citometria de fluxo. Os resultados foram expressos como média ± erro padrão da média e foram analisados por ANOVA, utilizando modelo misto (PROC MIXED), considerando o efeito aleatório do ejaculado de cada touro e os efeitos fixos de tratamento, touro e interação. No experimento 1, os espermatozoides dos grupos C-GEMA, GEMA + AST e C-GEMA DMSO apresentaram, respectivamente, os seguintes resultados: velocidade progressiva (VSL) $79,2^{a} \pm 1,3$, $75,3^{b} \pm 1,3$ e $75,4^{b} \pm 1,3$ ($P = 0,02$); frequência de batimento (BCF) $32,7^{a} \pm 0,4$, $30,9^{b} \pm 0,4$ e $31,3^{b} \pm 0,4$ ($P < 0,01$); retilinearidade (STR) $88,9^{a} \pm 0,3$, $87,3^{b} \pm 0,4$ e $87,5^{b} \pm 0,4$ ($P < 0,01$); defeitos menores $2,4^{b} \pm 0,3$, $3,2^{a} \pm 0,3$ e $2,2^{b} \pm 0,2$ ($P = 0,01$); e intensidade média do potencial de membrana mitocondrial $9796,1^{a} \pm 495,5$, $8028,3^{b} \pm 441,3$ e $8732,8^{ab} \pm 370,7$ ($P = 0,04$). As demais características não diferiram entre os grupos ($P > 0,05$). De forma inesperada nas características em que a astaxantina foi superior ou inferior ao grupo C-GEMA, os resultados foram semelhantes ao grupo C-GEMA DMSO, indicando que os efeitos observados não foram propiciados pela astaxantina. No experimento 2 não houve diferença entre os tratamentos. Com isso, apesar de não se ter realizado a comparação entre os diluidores, pode-se inferir que possivelmente eles atuem de formas distintas. Conclui-se que a astaxantina, na concentração utilizada, quando adicionada aos diluidores à base de gema de ovo ou de lipossomas não reduz o estresse oxidativo e, portanto, não preserva a motilidade espermática e o potencial mitocondrial.

Palavras-chave: antioxidante, carotenoide, estresse oxidativo, gema de ovo, lipossomas.

CRYOPRESERVATION OF BOVINE SEMEN WITH TWO COMMERCIAL EXTENDERS SUPPLEMENTED WITH ASTAXANTHIN

ABSTRACT – In this study the object was to evaluate the supplementation with astaxanthin in commercials extenders for cryopreservation of bovine semen, based on egg york (Experimet 1) and based on liposome (Experimet 2) for motility, morphology, plasma and acrosomal membrane integrity, mitochondrial membrane potential and oxidative stress. Were used six Nelore bulls and seven ejaculates from each (N=42). Each ejaculate was divided to receive one of following treatmens: commercial extender (C-YOLK or C-LIPO), commercial extender supplemented with 0,5 µM astaxanthin (YOLK + AST or LIPO + AST) and commercial extender with 0,009% of dimethylsulfoxide (C-YOLK DMSO or C-LIPO DMSO). This last group was included as a negative control, since DMSO was the substance used to dissolve the astaxanthin. After dilution, the spermatozoa were submitted to the computerized sperm motility analysis system (CASA), as well to be analyzed for sperm morphology under differential interference contrast microscopy. After cryopreservation, sperm cells were reevaluated for sperm motility characteristics and morphology, besides measuring plasma and acrosomal membrane integrity, mitochondrial membrane potential and oxidative stress under flow cytometry. The results were expressed as mean ± standard error of the mean and were analyzed by ANOVA, using mixed model (PROC MIXED), considering the aleatory effect of ejaculate of each bull and fixed effects of treatment, bull and interaction. In experiment 1, spermatozoa from C-YOLK, YOLK + AST and C-YOLK DMSO groups showed the following results, respectively: progressive velocity (VSL) $79.2^{a} \pm 1.3$, $75.3^{b} \pm 1.3$ and $75.4^{b} \pm 1.3$ ($P = 0.02$); beat frequency (BCF) $32.7^{a} \pm 0.4$, $30.9^{b} \pm 0.4$ and $31.3^{b} \pm 0.4$ ($P < 0.01$); straightness (STR) $88.9^{a} \pm 0.3$, $87.3^{b} \pm 0.4$ and $87.5^{b} \pm 0.4$ ($P < 0.01$); minor defects $2.4^{b} \pm 0.3$, $3.2^{a} \pm 0.3$, and $2.2^{b} \pm 0.2$ ($P = 0.01$); and mean mitochondrial membrane potential intensity $9796.1^{a} \pm 495.5$, $8028.3^{b} \pm 441.3$, and $8732.8^{ab} \pm 370.7$ ($P = 0.04$). The other characteristics did not differ between groups ($P > 0.05$). Unexpectedly, in the characteristics in which astaxanthin was above and below to the C-YOLK group, the results were similar to the C-YOLK DMSO, indicating that the observed effetcs were not caused by astaxanthin. In experiment 2 there was no difference between treatments. Thus, although there was no comparison between the extenders, it can be presumed that possibly they act in different ways. It is concluded that astaxanthin, at the concentration used, when added to egg yolk or liposome-based extenders does not reduce oxidative stress and, therefore, does not preserve sperm motility and mitochondrial potential.
Keywords: antioxidant, carotenoid, oxidative stress, egg yolk, liposomes.

CAPÍTULO 1

CAPÍTULO 1 – Considerações gerais

1- INTRODUÇÃO

A pecuária de corte vem contribuindo fortemente na economia do Brasil. Em 2020 o Produto Interno Bruto (PIB) da pecuária de corte cresceu 20,8%, somando R$ 747,05 bilhões, valor que representa 10% do PIB nacional, demonstrando a importância do setor no país (ABIEC, 2021). Entre os fatores que vêm possibilitando o crescimento da pecuária, está o melhoramento genético, associado à utilização de técnicas que auxiliam na maximização da produção, dentre elas, a inseminação artificial (Dias et al., 2013).

Nos rebanhos de corte foi verificado significativo crescimento do emprego da inseminação artificial, passando de 5,9% em 2002 (do total de 56.185.081 matrizes de corte) para 17,8% em 2019 (do total de 56.208.822 matrizes de corte) (Baruselli, 2020). Com a expansão da inseminação artificial no país, a demanda por doses de sêmen é crescente. Dados do terceiro semestre de 2021 demonstram crescimento de 27% na venda de doses de sêmen de corte no mercado nacional, comparando com o mesmo período de 2020 (ASBIA, 2021). Com o aumento da demanda é essencial melhorar a eficiência e a qualidade das doses de sêmen (Pinto, 2020).

A criopreservação de sêmen é um fator crucial na pecuária, isso porque permite e acelera a disseminação da diversidade genética e facilita a distribuição de animais geneticamente superiores ao redor do mundo (Ugur et al., 2019). Entretanto, geralmente fornece menores taxas de fertilidade em relação ao sêmen fresco, principalmente devido às mudanças de temperatura durante o processamento, ao estresse osmótico e à formação e dissolução de cristais de gelo extracelulares (Papa et al., 2015).

Entre os motivos de redução nas taxas de fertilidade, destacamos alguns danos que podem ser ocasionados à célula espermática no processo de criopreservação, como motilidade reduzida, alteração nas membranas plasmática, acrossomal e função mitocondrial. Além disso, a criopreservação pode ocasionar estresse oxidativo nos espermatozoides, resultante da peroxidação lipídica, aumentando a formação de espécies reativas de oxigênio (Watson, 2000; Layek et al., 2016).

O estresse oxidativo ocorre quando a produção de espécies reativas de oxigênio é muito exacerbada ou devido à perda da capacidade das enzimas antioxidantes (Incalza et al., 2018). É relatado que durante a maturação espermática as células perdem grande parte do seu citoplasma e sofrem condensação cromossômica, reduzindo sua capacidade antioxidante e tornando-se dependente do meio extracelular (Fang et al., 2015).

Neste sentido, têm-se realizado pesquisas com o uso de antioxidantes visando combater a formação de espécies reativas de oxigênio nos espermatozoides. No entanto, essa tarefa tem sido muito difícil em função da pouca repetibilidade nos resultados alcançados. Um composto que vem se mostrando promissor é a astaxantina, relatado como duas vezes mais eficaz que o β-caroteno na prevenção da peroxidação lipídica (Goto et al., 2001). Ao ser adicionada a um diluidor à base de lecitina de soja, a astaxantina demonstrou aumentar a motilidade espermática e reduzir a formação de malondialdeído após a criopreservação de sêmen bovino (Farzan et al., 2014).

Desta forma, estudos a fim de buscar métodos para proteger a célula espermática contra danos no processo de criopreservação são importantes, sendo uma proposta realizar a suplementação com a astaxantina em dois diluidores comerciais com composições diferentes.

2- REVISÃO DE LITERATURA

Nessa revisão, serão abordados os seguintes temas: criopreservação de sêmen, diluidores e antioxidante astaxantina.

2.1 Criopreservação de sêmen

A criopreservação de sêmen é uma forma de beneficiar a produção animal, sendo reconhecida como fonte de contribuição para a conservação de espécies ameaçadas de extinção (Watson, 2000). Além disso, a técnica facilita o transporte do sêmen independente da distância e permite o uso da genética, mesmo após a morte do animal (Bailey et al. 2000). Apesar de ser uma ferramenta importante para a

pecuária, a criopreservação espermática apresenta ainda muitas lacunas que necessitam de estudo (Zoca et al., 2021).

Durante a criopreservação a célula espermática passa pelas etapas de refrigeração, tempo de equilíbrio, congelação e descongelação, as quais são capazes de causar diversos graus de dano ao espermatozoide (Zoca et al., 2021), podendo inclusive torná-lo infértil (Bailey et al., 2000). Dentre os danos, destacamos as alterações nas membranas plasmática, acrossomal, função mitocondrial e motilidade reduzida. Além disso, a etapa de congelação pode ocasionar estresse oxidativo nos espermatozoides, resultante da peroxidação lipídica (Layek et al., 2016), que em níveis elevados podem ocasionar modificações na permeabilidade da membrana e morte celular (Batellier et al., 2001).

A curva de congelação apresenta relação direta com os efeitos deletérios impostos aos espermatozoides, principalmente na membrana plasmática. Se ocorre de forma rápida, não há tempo para que ocorra a desidratação dos espermatozoides e isso possibilita a formação de gelo intracelular, extremamente prejudicial à célula espermática. Em casos de curva de congelação lenta, haverá a desidratação dos espermatozoides impedindo a formação de gelo intracelular, porém a alta concentração de solutos também pode causar danos à célula (Watson, 1995).

Zoca e colaboradores (2021) demonstraram que a etapa de congelação/descongelação promoveu maior índice de lesões nas membranas plasmática e acrossomal, além de afetar a função mitocondrial, enquanto que a etapa de refrigeração foi responsável por promover maior alteração no citoesqueleto F-actina. Além disso, foi observado que o tempo de equilíbrio é o período menos prejudicial à célula espermática.

O processo de reaquecimento da célula após a descongelação também pode causar danos, uma vez que a membrana é submetida a rearranjos estruturais envolvendo lipídios e proteínas e a passagem rápida de água para o interior da célula pode causar o rompimento das membranas (Watson, 1995; Holt, 2000). Assim, a fase de descongelação é tão importante quanto a congelação para a sobrevivência da célula (Papa et al., 2015).

A composição do meio diluidor e a escolha por crioprotetores mais adequados são um dos fatores que podem alterar a sobrevivência dos espermatozoides. Por isso,

estudos vêm sendo realizados a fim de minimizar os efeitos deletérios na criopreservação (Leite et al., 2011).

2.2 Diluidores

A busca por diluidores que garantam um ambiente favorável à sobrevivência dos espermatozoides, conservando a integridade e a função das membranas é constante (Celeghini et al., 2008). Desse modo, muitos diluidores foram e continuam sendo desenvolvidos com o objetivo de minimizar os danos e melhorar a viabilidade pós-descongelação (Ugur et al., 2019).

Diluidores de diferentes formulações protegem os compartimentos celulares em uma extensão variável durante a criopreservação (Celeghini et al., 2008). Diluidores à base de gema de ovo são os mais utilizados para criopreservar sêmen bovino (Ugur et al., 2019), pois fornecem proteção contra choque térmico, preservando a motilidade espermática e integridade das membranas plasmática e acrossomal (Turner et al*.,* 2020).

Bergeron e colaboradores (2004) concluíram que a gema de ovo presente no diluidor protege a célula espermática pela associação de lipoproteínas de baixa densidade com as principais proteínas do plasma seminal do touro, impedindo que estas se liguem aos espermatozoides e danifiquem intrinsicamente a membrana espermática ao remover os lipídeos. Além disso, as lipoproteínas de baixa densidade associam-se à membrana espermática preservando a sua integridade durante a criopreservação.

Entretanto, a falta de padronização dos componentes presentes na gema de ovo e a possibilidade de contaminação (Layek et al., 2016), têm motivado o uso de diluidores formulados com diferentes compostos, que apresentem a mesma ou melhor eficácia que os produtos disponíveis a base de substâncias de origem animal.

Baseado nisso, há disponibilidade do uso de lipossomas, substâncias compostas por fosfolipídios e ácidos graxos saturados e insaturados, que atuam unindo-se à membrana plasmática do espermatozoide, reduzindo danos causados pela criopreservação (Saadeldin et al., 2020). Ao serem utilizados na criopreservação de espermatozoides bovinos, verificou-se maior motilidade espermática, integridade

de membrana plasmática, integridade da membrana acrossomal, além de apresentar 66% de taxa de prenhez, sendo superior aos demais diluidores que obtiveram 51 e 52% para diluidor a base de citrato-gema de ovo e tris-cítrico gema de ovo, respectivamente (Ansari et al., 2017).

2.3 Antioxidantes e o estresse oxidativo

Antioxidantes são substâncias capazes de remover os radicais livres de um sistema ou que unem-se a eles para juntos produzirem compostos inofensivos ou interromperem as reações de oxidação, decorrentes da formação de espécies reativas de oxigênio (Britton, 1995). O estresse oxidativo ocorre quando a produção de espécies reativas de oxigênio é muito exacerbada ou devido à perda da capacidade das enzimas antioxidantes de equilibrarem esse excesso (Incalza et al., 2018).

O plasma seminal contém antioxidantes enzimáticos como superóxido dismutase (SOD), catalase e glutationa peroxidase/glutationa redutase (GSH), além de antioxidantes não enzimáticos, como ascorbato, urato, vitamina E, piruvato, glutationa, albumina, vitamina A, ubiquitol, taurina e hipotaurina (Agarwal et al., 2008). Entretanto a capacidade antioxidante do sêmen pode ser insuficiente para impedir a formação de espécies reativas de oxigênio.

Na espermatogênese, a célula espermática perde grande parte do seu citoplasma durante o evento de maturação e isso promove a redução da sua capacidade antioxidante e tornando a célula dependente do meio extracelular (Fang et al., 2015). Além disso, a membrana espermática é rica em ácidos graxos poli-insaturados, contribuindo para a suscetibilidade aos ataques das espécies reativas de oxigênio (Nichi et al., 2007).

Com isso, muitos compostos antioxidantes vêm sendo estudados na adição aos meios diluidores, com o propósito de melhorar a criopreservação das células espermáticas (Farzan et al., 2014). Entretanto, não há consenso na literatura quanto ao efeito preventivo das substâncias antioxidantes adicionadas ao diluidor, pois alguns estudos relatam efeitos positivos, enquanto outros não observaram nenhum benefício. Essa divergência de resultados pode ocorrer, dentre outros fatores, devido à quantidade de antioxidante utilizada, pois é necessário obter um equilíbrio entre

antioxidantes e espécies reativas de oxigênio, pois elas apresentam papel fisiológico nos processos de capacitação, hiperativação e a fusão espermatozoide-oócito (Aitken et al., 1991).

2.4 Astaxantina

A astaxantina é um carotenoide vermelho, que pode ser extraído de fontes naturais como fermento, salmão, truta, krill, camarão, lagostim e, principalmente, da alga *Haematococcus pluvialis* (Ambati et al., 2014; Higuera-Ciapara et al., 2007). Possui ação anti-inflamatória, anti-cancerígena e, sobretudo, antioxidante, relatada como duas vezes mais eficaz que o β-caroteno na prevenção da peroxidação lipídica (Goto et al., 2001). Há relatos de maior atividade antioxidante da astaxantina comparando com outros carotenoides como a luteína, licopeno, α e β-caroteno e α-tocoferol (Fang et al., 2015; Naguib, 2000).

A astaxantina possui dois anéis terminais unidos por uma cadeia de polieno que aprisiona os radicais na membrana celular e impede que ocorra reação em cadeia, enquanto os anéis terminais podem eliminar as espécies reativas de oxigênio tanto na parte interna quanto externa da membrana celular, conforme ilustrado pela Figura 1 (Goto et al., 2001; Ambati et al., 2014).

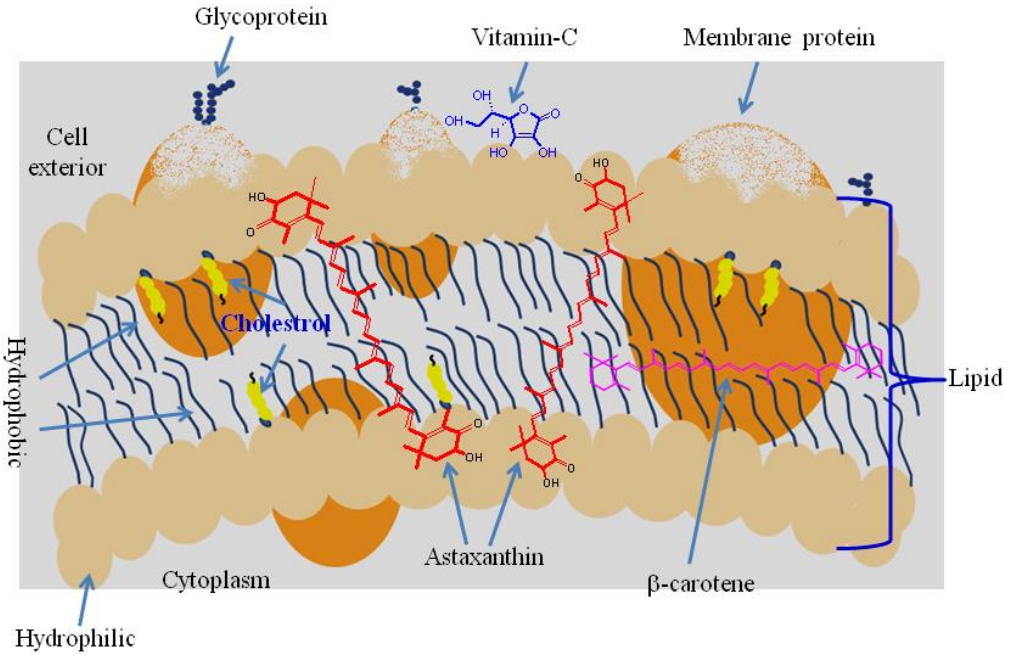

Figura 1. Posição da astaxantina na membrana celular (Ambati et al., 2014).

Basioura e colaboradores (2018) utilizaram o diluidor comercial *Beltsville Thawing Solution* (Minitube®) para avaliar a atividade das astaxantina (0,5 μmol/L) em sêmen suíno refrigerado. As células espermáticas apresentaram melhor motilidade total e progressiva, além de integridade de membrana plasmática, teste de termorresistência, assim como ao final da incubação *in vitro*, quando foram refrigeradas com diluidor suplementado com astaxantina.

A suplementação com astaxantina no sêmen de suíno foi também avaliado durante a criopreservação utilizando o diluidor Beltsville Thawing Solution (Minitube®) (Basioura et al., 2020). A astaxantina foi utilizada nas seguintes doses: 0, 0,5, 5 e 15 µM. Houve redução da motilidade total e integridade de membrana plasmática e acrossomal, quando os espermatozoides foram criopreservados com 15 µM. Ao utilizar 0,5 µM de astaxantina foi observada maior porcentagem de espermatozoides viáveis com alterações semelhantes à apoptose do que o grupo controle. Os autores concluíram que a adição de astaxantina a 0,5 µM no diluidor de descongelação apresentou efeito sutil, porém benéfico nas alterações apoptóticas e efeito negativo em todas as características avaliadas, quando utilizada a maior dose.

Fang e colaboradores (2015) estudaram a atividade da astaxantina (concentrações de 0, 0,5, 1, 2 e 4 µM) na suplementação de um diluidor não-comercial à base de gema de ovo para sêmen de carneiro. As motilidades total e progressiva e a integridade de membrana plasmática apresentaram os melhores resultados quando utilizado 2 e 4 µM, após 72 horas de armazenamento. A capacidade antioxidante, mensurada pela dosagem da concentração de malondialdeído e de espécies reativas de oxigênio alcançou os melhores índices com 2 e 4 µM, a partir de 24 horas. Além dos resultados favoráveis, os autores concluíram que a ausência de proteção acrossômica mediada pelo antioxidante pode sugerir que o estresse oxidativo não é a única causa de dano acrossômico nessas condições.

Neamah e Houbi (2020a) avaliaram a suplementação da astaxantina (0,5 e 1 µM) e taurina (35 e 45 mM), de forma isolada e associada em sêmen de carneiro refrigerado. Os tratamentos que associaram astaxantina e taurina, independente da dose, apresentaram motilidade subjetiva superior ao grupo controle em 0 hora. A dose associando 1 µM de astaxantina + 45 mM de taurina foi superior ao controle quando avaliado em 72 horas. A integridade do acrossomo foi melhor preservada quando

usado 45 mM de taurina (tempo = 0 hora), sendo que esse mesmo tratamento não diferiu de 0,5 μM de astaxantina + 45 mM de taurina (tempo = 24 horas) e de 0,5 μM de astaxantina (tempo = 48 horas). Além disso, a porcentagem de anormalidades do sêmen foi reduzida quando utilizado 1 μM de astaxantina + 45 mM de taurina (tempo = 0 hora). A mesma associação se destacou assim como 1 μM de astaxantina, quando avaliada em 24 horas. Com 48 horas de armazenamento, 1 μM foi superior ao grupo controle. Os autores concluíram que astaxantina e taurina podem ser utilizadas como uma combinação para melhorar a viabilidade dos espermatozoides.

Os mesmos autores, avaliaram características seminais após 2 meses do sêmen criopreservado de carneiros, armazenado em nitrogênio líquido, com base nos mesmos tratamentos do estudo citado anteriormente (Neamah; Houbi, 2020b**)**. Os tratamentos 1 e 0,5 μM de astaxantina, assim como 1 μM de astaxantina + 35 mM de taurina e 0,5 μM de astaxantina + 45 mM de taurina foram superiores ao grupo controle ao avaliar a motilidade espermática. Exceto o grupo criopreservado com 1 μM de astaxantina + 45 mM de taurina, todos foram eficientes para reduzir anormalidades espermáticas quando comparado ao grupo controle. Essas diferenças encontradas entre os grupos podem ser devido à concentração utilizada de cada antioxidante e o sinergismo entre eles. Não houve diferença dos tratamentos em relação ao grupo controle, quando realizado o teste hiposmótico. Ao avaliar a concentração de malondialdeído, células criopreservadas com 1 μM de astaxantina apresentaram a menor concentração, diferindo do grupo controle e da associação de 1 μM de astaxantina + 35 mM de taurina. Os autores concluíram que a adição de astaxantina e taurina melhoram as características espermáticas no processo de congelação.

Foi avaliada a qualidade de sêmen criopreservado com diluidor suplementado com astaxantina e sua fertilidade em sêmen de carneiro (Abdi-Benemar et al., 2020). As concentrações testadas foram 0,5, 1, 2 e 4 μM suplementadas em diluidor não comercial à base de tris-citrato-frutose-gema. A motilidade total e progressiva foi avaliada de forma subjetiva. Foi utilizada a coloração eosina-nigrosina, classificando os espermatozoides não corados como viáveis. A anormalidade acrossomal foi avaliada pela fixação de espermatozoides em formalina-citrato. Foi realizado teste hiposmótico para avaliar a integridade de membrana plasmática e a peroxidação lipídica foi avaliada pela mensuração da concentração de malondialdeído. Para todas

essas variáveis, as concentrações de 2 e 4 µM de astaxantina promoveram melhores resultados. Posteriormente aos testes *in vitro*, um grupo de ovelhas (n=171) foram sincronizadas e inseminadas com o sêmen criopreservado com 2 e 4 µM. As taxas de fertilidade obtidas após a inseminação artificial foram maiores para espermatozoides criopreservados em 2 e 4 µM de astaxantina (48,3% e 45,7%, respectivamente) em comparação com o grupo de controle (21,1%), concluindo que a astaxantina tem capacidade crioprotetora como um componente no meio de criopreservação para espermatozoides ovinos.

Em bovinos, foi encontrado somente um estudo que avaliou a atividade da astaxantina (concentrações de 0, 0,5, 1 e 2 µM) por meio da concentração espermática de malondialdeído, utilizando um diluidor formulado à base de lecitina de soja (Andromed®,Minitube®; Farzan et al., 2014). A dose de 0,5 µM proporcionou melhor índice de motilidade progressiva e menor concentração de malondialdeído, diferindodos demais tratamentos.

Até o momento, nenhum estudo foi desenvolvido suplementando diluidores à base de gema de ovo e de lipossomas com astaxantina no sêmen bovino. Essa é uma proposta para melhorar a qualidade espermática durante o processo de criopreservação, visto que a composição dos diluidores comerciais utilizados na rotina de criopreservação de sêmen não é bem definida e, com isso, as propriedades antioxidantes presentes em sua composição são desconhecidas. Desse modo, avaliar características espermáticas ao utilizar diluidores suplementados ou não com antioxidantes é pertinente para entender se o meio comercial promove proteção suficiente (Soares e Guerra, 2009).

3- HIPÓTESE

A suplementação com astaxantina aos dos diluidores comerciais à base de gema de ovo ou lipossomas reduz o estresse oxidativo, preservando a motilidade espermática, integridade de membranas plasmática e acrossomal e potencial de membrana mitocondrial.

4- OBJETIVO

Avaliar a suplementação de astaxantina aos diluidores à base de gema de ovo (Experimento 1) e à base de lipossomas (Experimento 2), na criopreservação espermática, quanto à motilidade, morfologia, integridade das membranas plasmática e acrossomal, potencial de membrana mitocondrial e estresse oxidativo em espermatozoides bovinos.

5- REFERÊNCIAS

Abdi-Benemar H, Khalili B, Zamiri MJ, Ezazi H, Ardabili GS, Moghadam SH, Simanoor N (2020). Effects of astaxanthin supplementation on the freezability, lipid peroxidation, antioxidant enzyme activities and post-thawing fertility of ram semen. **Small Ruminant Research** 192:1-5.

ABIEC (2021). Associação Brasileira das Indústrias Exportadoras de Carne, BeefREPORT. **Perfil da Pecuária no Brasil**, 60 p.

Aitken RJ, Irvine DS, Wu FC (1991). Prospective analysis of sperm-oocyte fusion and reactive oxygen species generation as criteria for the diagnosis of infertility. **American Journal of Obstetrics and Gynecology** 164:542-551.

Agarwal A, Makker K, Sharma R (2008). Clinical relevance of oxidative stress in male factor infertility: an update. **American Journal of Reproductive Immunology** 59:2-11.

Ambati RR, Phang SM, Ravi S, Aswathanarayana RG (2014). Astaxanthin: sources, extraction, stability, biological activities and its commercial applications - a review. **Marine Drugs** 12:128-152.

Ansari MS, Rakha BA, Akhter S (2017). Cryopreservation of bull semen in OptiXcell® and conventional extenders: Comparison of semen quality and fertility. **Animal Science Papers & Reports** 35:317-328.

ASBIA (2021). **Associação Brasileira de Inseminação Artificial** - ASBIA. Index ASBIA Mídia, 3º trimestre 2021, 38 p.

Bailey JL, Bilodeau JF, Cormier N (2000). Semen cryopreservation in domestic animals: a damaging and capacitating phenomenon. **Journal of Andrology** 21:1-7.

Baruselli PS (2020). Evolução da inseminação artificial em fêmeas bovinas de corte e de leite no Brasil. **Boletim Eletrônico do Departamento de Reprodução Animal/FMVZ/USP** 4:1-2.

Basioura A, Boscos CM, Parrilla I, Tsousis G, Tsakmakidis IA (2018). Effect of astaxanthin on the quality of boar sperm stored at 17°C, incubated at 37°C or under in vitro conditions. **Reproduction in Domestics Animal** 53:463-471.

Basioura A, Tsakmakidis IA, Martinez EA, Roca J, Li J, Molina MF, Theodoritis A, Boscos CM, Parrilla I (2020). Effect of astaxanthin in extenders on sperm quality and functional variables of frozen-thawed boar semen. **Animal Reproduction Science** 218:1-10.

Batellier FVMF, Vidament M, Fauquant J, Duchamp G, Arnaud G, Yvon JM, Magistrini M (2001). Advances in cooled semen technology. **Animal Reproduction Science** 68:181-190.

Bergeron A, Crête MH, Brindle Y, Manjunath (2004). PLow-density lipoprotein fraction from hen's egg yolk decreases the binding of the major proteins of bovine seminal plasma to sperm and prevents lipid efflux from the sperm membrane. **Biology of Reproduction** 70:708-717.

Britton G (1995). Structure and properties of carotenoids in relation to function. **The FASEB Journal** 9:1551-1558.

Celeghini ECC, Arruda RP, de Andrade AFC, Nascimento J, Raphael CF, Rodrigues PHM (2008). Effects that bovine sperm cryopreservation using two different extenders has on sperm membranes and chromatin. **Animal Reproduction Science** 104:119-131.

Dias VHC, Santos TGD, Simonelli SM, Andreazzi MA (2013). Descrição das principais técnicas e métodos de melhoramento genético animal, suas aplicações e contribuição na produção animal. In: Encontro Internacional de produção científica, **Anais Eletrônico**, Maringá.

Fang YI, Zhong R, Chen L, Feng C, Sun H, Zhou D (2015). Effects of astaxanthin supplementation on the sperm quality and antioxidant capacity of ram semen during liquid storage. **Small Ruminant Research** 130:178-182.

Farzan M, Chamani M, Varnaseri H (2014). The antioxidant effect of astaxanthin on quantitative and qualitative parameters of bull sperm. **Indian Journal of Foundamental and Applied Life Sciences** 4:425-430.

Goto S, Kogure K, Abe K, Kimata Y, Kitaham K, Yamashita E, Terada H (2001). Efficient radical trapping at the surface and inside the phospholipid membrane is responsible for highly potent antiperoxidative activity of the carotenoid astaxanthin. **Biochimica Et Biophysica Acta - Biomembranes** 1512:251-258.

Higuera-Ciapara I, Felix-Valenzuela L, Goycoolea FM (2007). Astaxanthin: a review of its chemistry and applications. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition** 46:185-196.

Holt WV (2000). Fundamental aspects of sperm cryobiology: The importance of species and individual differences. **Theriogenology** 43:47-58.

Incalza MA, D'Oria R, Natalicchio A, Perrini S, Laviola L, Giorgino F (2018). Oxidative stress and reactive oxygen species in endothelial dysfunction associated with cardiovascular and metabolic diseases. **Vascular Pharmacology** 100:1-19.

Layek SS, Mohanty TK, Kumaresan A, Parks JE (2016). Cryopreservation of bull semen: Evolution from egg yolk based to soybean based extenders. **Animal Reproduction Science** 172:1-9.

Leite PA, Schreder GG, De Almeida CLR, Zúccari CESN, Da Costa EV (2011). Criopreservação do sêmen bovino. **Journal of Health Sciences** 13:1-8.

Naguib YMA (2000). Antioxidant activities of astaxanthin and related carotenoids. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** 48:1150-1154.

Neamah HJ, Houbi AA (2020a). Effect of adding astaxanthin and taurine to the Tris extender on the semen quality of Awassi rams during cooling storage. **Annals of Tropical Medicine & Public Health** 23:1062-1011.

Neamah HJ, Houbi AA (2020b). Effect of adding astaxanthin and taurine as antioxidants to improve characteristics of awassi ram semen after freezing storage. **Plant Archives** 20:604-608.

Nichi M, Goovaerts IGF, Cortada CNM, Barnabe VH, De Clercq JBP, Bols PEJ (2007). Roles of lipid peroxidation and cytoplasmic droplets on in vitro fertilization capacity of sperm collected from bovine epididymides stored at 4 and 34 C. **Theriogenology** 67:334-340.

Papa PM, Maziero RD, Guasti PN, Junqueira CR, Freitas-Dell'Aqua CP, Papa FO, Vianna FP, Alvarenga MA, Crespilho AM, Dell'Aqua Jr JÁ (2015). Effect of glycerol on the viability and fertility of cooled bovine semen. **Theriogenology** 88:107-113.

Pinto SCC (2020). **Criopreservação de sêmen bovino com adição de insulina e fator de crescimento semelhante à insulina do tipo I (IGF-I) em touros de baixa congelabilidade**. 118 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – USP, São Paulo.

Saadeldin IM, Khalil WA, Alharbi MG, Lee SH (2020). The current trends in using nanoparticles, liposomes, and exosomes for semen cryopreservation**. Animals** 10:1-16.

Soares AT, Guerra MMP (2009). Efeitos da criopreservação sobre a viabilidade espermática. **Tecnologia & Ciência Agropecuária** 3:53-63.

Turner Z, Canisso I, Podico G, Garrett E, Stewart J, Henley P, Shike D, Ellerbrock R, Hurley D, Palomares R, Ferrer M (2020). Cryopreservation of epididymal and electroejaculated bull semen using liposome-and egg yolk-based extenders. **Clinical Theriogenology** 12:29-38.

Ugur MR, Abdelrahman AS, Evans HC, Gilmore AA, Hitit M, Arifiantini RI, Purwantara B, Kaya A, Memili E (2019). Advances in cryopreservation of bull sperm. **Frontiers in Veterinary Science** 6:1-15.

Watson PF (1995). Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function. **Reproduction, Fertility and Development** 7:871-891.

Watson PF (2000). The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. **Animal Reproduction Science** 60:481–492.

Zoca GB, Celeghini ECC, Pugliesi G, Carvalho CPT, Assumpção MEOD'A, Siqueira AFP, Oliveira LZ, Lançoni R, Arruda RP (2021). Influence of seminal plasma during different stages of bovine sperm cryopreservation. **Reproduction in Domestic Animals** 00:1-12.

CAPÍTULO 2

CAPÍTULO 2 - A adição de antioxidante astaxantina em meios de criopreservação de sêmen bovino melhora a qualidade espermática pós-descongelação?[1]

Alessandra Regina Carrer[1], Rubens Paes de Arruda[2], Carla Patrícia Teodoro de Carvalho[2], Ana Paula Pinoti Pavaneli[2], Felipe Casellatto Antonioli[2], Rafael Cuel Bortoletto[2], Maria Eduarda Hernandes Chaim[1], Raphaela Gabrielle Brito Sousa[3], José Antonio Dell'Aqua Junior[4], André Furugen Cesar de Andrade[2], Marcilio Nichi[3], Guilherme Pugliesi[2], Lindsay Unno Gimenes[1]*

[1] Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" – UNESP, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – FCAV, Campus de Jaboticabal – SP.

[2] Universidade de São Paulo "Fernando Costa" – USP, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – FMVZ, Campus de Pirassununga – SP.

[3] Universidade de São Paulo – USP, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – FMVZ, Campus de São Paulo – SP.

[4] Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" – UNESP, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - FMVZ, Campus de Botucatu – SP.

* Autor correspondente.

RESUMO

O objetivo deste estudo foi avaliar a suplementação com astaxantina em meios de criopreservação de sêmen bovino, à base de gema de ovo (Experimento 1) e à base de lipossomas (Experimento 2), quanto à motilidade, morfologia, integridade das membranas plasmática e acrossomal, potencial de membrana mitocondrial e estresse oxidativo. Foram utilizados seis touros da raça Nelore e colhidos sete ejaculados de cada animal (N=42). Cada ejaculado foi dividido para receber os seguintes tratamentos: diluidor comercial (C-GEMA ou C-LIPO), diluidor comercial suplementado com 0,5 µM astaxantina (GEMA + AST ou LIPO + AST) e diluidor comercial com 0,009% de dimetilsulfóxido (C-GEMA DMSO ou C-LIPO DMSO). Após a diluição, os espermatozoides foram submetidos ao sistema de análises computadorizado da motilidade espermática (CASA), além de serem analisados quanto à morfologia espermática, sob microscopia de contraste de interferência diferencial. Após a criopreservação, os espermatozoides foram reavaliadas quanto a motilidade e morfologia, além de mensurar as células com integridade das membranas plasmática, acrossomal, potencial mitocondrial e estresse oxidativo, sob citometria de fluxo. Os resultados foram expressos como média ± erro padrão e foram analisados por ANOVA, utilizando modelo misto. No experimento 1, os espermatozoides dos

grupos C-GEMA, GEMA + AST e C-GEMA DMSO apresentaram, respectivamente, os seguintes resultados: velocidade progressiva $79,2^{a} \pm 1,3$, $75,3^{b} \pm 1,3$ e $75,4^{b} \pm 1,3$ (P=0,02); frequência de batimento $32,7^{a} \pm 0,4$, $30,9^{b} \pm 0,4$ e $31,3^{b} \pm 0,4$ (P<0,01); retilinearidade $88,9^{a} \pm 0,3$, $87,3^{b} \pm 0,4$ e $87,5^{b} \pm 0,4$ (P<0,01); defeitos menores $2,4^{b} \pm 0,3$, $3,2^{a} \pm 0,3$ e $2,2^{b} \pm 0,2$ (P=0,01); e intensidade média do potencial mitocondrial $9796,1^{a} \pm 495,5$, $8028,3^{b} \pm 441,3$ e $8732,8^{ab} \pm 370,7$ (P=0,04). As demais características não diferiram entre os grupos (P>0,05). Nas características em que o grupo GEMA + AST foi superior ou inferior ao C-GEMA, os resultados foram semelhantes ao C-GEMA DMSO, indicando que os efeitos observados não foram propiciados pela astaxantina. No experimento 2 não houve diferença entre os tratamentos. Apesar de não se ter realizado a comparação entre os diluidores, pode-se inferir que possivelmente eles atuem de formas distintas. Conclui-se que a astaxantina, na concentração utilizada, quando adicionada aos meios de criopreservação bovino não reduz o estresse oxidativo e, portanto, não preserva a motilidade espermática e o potencial mitocondrial.
Palavras-chave: antioxidante, carotenoide, estresse oxidativo, gema de ovo, lipossomas.

1. Introdução

A criopreservação de sêmen beneficia a pecuária, pois permite e acelera a disseminação da diversidade genética [1] e possibilita o transporte do sêmen, independente da distância [2]. Além disso, permite utilizar o sêmen mesmo após a morte do animal e contribui para a conservação de espécies ameaçadas de extinção [3].

Entretanto, a criopreservação pode promover danos à célula espermática, dentre eles alterações nas membranas plasmática, acrossomal, função mitocondrial e motilidade reduzida. Além disso, a etapa de congelação pode ocasionar estresse oxidativo nos espermatozoides, resultante da peroxidação lipídica [4] que em níveis elevados pode ocasionar modificações na permeabilidade da membrana e morte celular [5]. Com isso, muitos diluidores foram produzidos com o objetivo de reduzir os danos na célula espermática e melhorar a viabilidade pós descongelação [1,6].

Diluidores à base de gema de ovo são os mais utilizados para criopreservar sêmen bovino [1], pois preservam a motilidade dos espermatozoides e mantém a integridade acrossomal e mitocondrial [7]. Porém a substância representa um risco de contaminação bacteriana ou xenobiótica [4]. Além disso, a falta de padronização dos

componentes da gema de ovo vem motivando a realização de estudos visando a substituição por outras substâncias [8].

Neste contexto, os lipossomas protegem os espermatozoides por meio da ligação com a membrana celular durante a criopreservação [9], garantindo a troca de colesterol e fosfolipídios [10], excluindo as desvantagens em termos de bioseguridade associadas à gema de ovo. Pesquisa realizada com touros leiteiros evidenciou que um diluidor à base de lipossomas preservou melhor a integridade das membranas plasmática e acrossomal, promoveu maior potencial de membrana mitocondrial, menor taxa de fragmentação de DNA, mantendo a motilidade semelhante a espermatozoides criopreservados com diluidor à base de gema de ovo que apresentou proteção antioxidante reduzida [11].

Devido à peroxidação lipídica, muitos compostos antioxidantes vêm sendo estudados para adição aos meios diluidores, com o propósito de melhorar a criopreservação das células espermáticas. Dentre eles, a astaxantina, um carotenoide extraído principalmente da alga *Haematococcus pluvialis* [12], parece promissora. Possui ação antiinflamatória, anti-cancerígena e, sobretudo, antioxidante, relatada como mais eficaz que o β-caroteno na prevenção da peroxidação lipídica [13].

Pesquisadores avaliaram a atividade da astaxantina (concentrações de 0,5, 1 e 2 µM) no sêmen de touros por meio da concentração espermática de malondialdeído, utilizando um diluidor formulado à base de lecitina de soja (Andromed®, Minitube, Tiefenbach, Germany) [14]. Como resultados, houve aumento na motilidade progressiva e redução nas concentrações de malondialdeído quando 0,5 ou 1 µM de astaxantina foram adicionados ao diluidor.

Até o momento, nenhum estudo foi desenvolvido suplementando diluidores à base de gema de ovo e de lipossomas com astaxantina, sendo esta uma proposta para melhorar a integridade dos espermatozoides durante o processo de criopreservação.

Sendo assim, o objetivo foi avaliar a suplementação de astaxantina aos diluidores à base de gema de ovo (Experimento 1) e à base de lipossomas (Experimento 2) na criopreservação espermática, quanto à motilidade, morfologia, integridade das membranas plasmática e acrossomal, potencial de membrana mitocondrial e estresse oxidativo em espermatozoides bovinos. A hipótese do estudo

é que a suplementação com astaxantina aos diluidores comerciais reduz o estresse oxidativo, preservando a motilidade espermática, integridade de membranas e potencial mitocondrial.

2. Material e métodos

2.1 Animais

O experimento foi conduzido entre os meses de maio e setembro de 2021. Foram utilizados seis touros da raça Nelore, com idades entre 48 e 60 meses e colhidos sete ejaculados de cada animal (6 touros x 7 colheitas, n=42). O prepúcio e o pênis foram higienizados previamente a cada colheita com Ringer com Lactato e o sêmen foi colhido por eletroejaculação (Autojac V3®, Neovet®, Uberaba, Brasil). O ejaculado foi cuidadosamente transportado para o laboratório e mantido à temperatura de 37°C até a realização do processamento para análise e criopreservação. Os procedimentos experimentais deste estudo foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista (protocolo CEUA número 269/21) e da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (protocolo CEUA número 8865260121).

2.2 Experimento 1

2.2.1 Grupos experimentais

Cada ejaculado foi dividido nos seguintes grupos experimentais:

Grupo 1: C-GEMA; Controle: diluidor à base de gema de ovo (Botu-Bov®,Botupharma, Botucatu, Brasil);

Grupo 2: GEMA + AST; Diluidor à base de gema de ovo (BotuBov®) suplementado com 0,5 µM de astaxantina (SML0982; Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) diluída em 0,009% de dimetilsulfóxido (DMSO; D4540; Sigma-Aldrich, St. Louis, USA);

Grupo 3: C-GEMA DMSO; Controle: diluidor à base de gema de ovo (BotuBov® + 0,009% de DMSO).

O DMSO foi utilizado no experimento como um solvente, em virtude da astaxantina apresentar característica lipossolúvel. Com isso, o grupo C-GEMA DMSO foi incluído no experimento como um controle negativo, com o objetivo de diferenciar se os efeitos encontrados são, de fato, da astaxantina ou apenas de seu solvente. Com base no trabalho de Farzan e colaboradores [14], foi realizado um pré-experimento com as doses 0,5, 1 e 2 µM de astaxantina. Devido aos melhores resultados de motilidade total e progressiva, optamos por utilizar a menor dose do antioxidante na condução dos dois experimentos a seguir.

2.2.2 Avaliações do sêmen in natura e diluído

2.2.2.1 Avaliações iniciais e diluição

Para promover uma avaliação inicial, a motilidade (%) e o vigor (1-5) foram avaliados subjetivamente *in natura* sob microscópio de contraste de fase equipado com platina aquecedora (37°C) em aumento de 100x. A concentração espermática foi realizada com o sêmen diluído a 1:200 (5 µL de sêmen: 995 µL de Solução Salina Tamponada com Fosfato de Dulbecco - DPBS com 4% de formaldeído) e a leitura foi realizada em câmara de Neubauer, sob microscopia óptica em aumento de 400x. Após as análises iniciais, o sêmen foi diluído conforme os tratamentos na concentração de 40 x 10^6 espermatozoides/mL. Ao realizar a diluição, aguardaram-se 10 minutos, para que ocorresse interação entre os tratamentos e os espermatozoides.

2.2.2.2 Características de motilidade espermática

Posteriormente a esse período, os grupos experimentais foram submetidos ao sistema de análises computadorizada da motilidade espermática (*Computer Assisted Sperm Analisys* - CASA), usando o aparelho Hamilton Thorne Research Motility Analysis (HTM-IVOS, Versão 12.3, Hamilton Thorn Research, Beverly USA). Foram previamente realizados ajustes (*set up*) no equipamento para a análise do sêmen

bovino (conforme o Apêndice A). Dez µL de amostra foram depositados na câmara de Makler® (SEFI, Medical Instruments LTDA, Haifa, Israel). As características analisadas foram: motilidade total (%), motilidade progressiva (%), velocidade de trajeto (VAP, µm/s), velocidade progressiva (VSL, µm/s), velocidade curvilinear (VCL, µm/s), amplitude do deslocamento lateral da cabeça (ALH, µm), frequência de batimento (BCF, Hz), retilinearidade (STR, %), linearidade (LIN, %) e células rápidas (%), cujas definições foram descritas por Arruda [15].

2.2.2.3 Morfologia espermática

Uma amostra de sêmen diluído foi separada para avaliação de morfologia espermática (250 µL de DPBS com 4% de formaldeído e 250 µL de sêmen diluído), a qual foi realizada em preparação úmida com uma gota entre lâmina e lamínula em aumento de 1000x sob microscopia de contraste de interferência diferencial - DIC (Nikon, Modelo Eclipse Ni-U 80i, Melville, USA). Foram contadas 200 células por amostra e as alterações morfológicas foram agrupadas em defeitos maiores, menores e totais [16].

2.2.3 Criopreservação

Para a congelação, o sêmen diluído foi envasado em palhetas de 0,25 mL (IMV® Technologies, Campinas, Brasil), previamente identificadas segundo o tratamento, colheita e animal, lacradas com esferas de metal (Minitub®, Brasil) e colocadas em máquina de criopreservação automática (TK 3000®, TK Tecnologia em Congelação Ltda, Uberaba, Brasil). A máquina foi pré-ajustada com curva de refrigeração de -0,25°C /min de ± 22°C a 5°C, uma hora de tempo de equilíbrio (estabilização) a 5°C e curva de congelação de -20°C /min de 5°C a -120°C. Ao atingir -120°C as palhetas foram mergulhadas em nitrogênio líquido a -196°C. Após, as palhetas congeladas foram armazenadas em *racks* de metal previamente identificadas e transferidas para o botijão criogênico.

2.2.4 Avaliações do sêmen pós-criopreservação

Para todas as avaliações foram descongeladas duas palhetas, do mesmo touro, partida e tratamento, a temperatura de 37°C por 30 segundos e homogeneizadas. Para analisar das características da motilidade espermática, as amostras descongeladas foram analisadas conforme a descrição do item 2.2.2.2. Para avaliar as alterações morfológicas, o conteúdo das palhetas homogeneizadas foi acrescido de 5 µL de DPBS com 4% de formaldeído. Os espermatozoides foram classificados, no dia seguinte após a descongelação, conforme a descrição do item 2.2.2.3.

2.2.4.1 Integridade das membranas plasmática e acrossomal, potencial de membrana mitocondrial e estresse oxidativo

Para avaliar a integridade das membranas plasmática e acrossomal, potencial de membrana mitocondrial e estresse oxidativo, as sondas fluorescentes iodeto de propídio (IP; P4170) e aglutinina de *Pisum sativum* conjugada a isotiocinato de fluoresceína (FITC-PSA; L0770) foram adquiridas da Sigma-Aldrich e as sondas iodeto de 5,5',6,6'-tetracloro-1,1,3,3'-tetraetilbenzimidazolilcarbocianina (JC-1; T3168), CellROX® *green* (CRG; C10444) e Syto 59 (S59; S11341), foram adquiridas da Thermo Fisher, Waltham, USA.

Para iniciar as avaliações, as amostras descongeladas de sêmen foram diluídas em meio de *Tyrode* suplementado com albumina, lactato e piruvato (TALP *sperm)* [17], com pH ajustado para 7,4, para atingir a concentração de 5 x 10^6 espermatozoides/mL. Todas as amostras foram coradas com a sonda S59 (concentração final: 5 nM), que possui afinidade com o DNA, durante 10 minutos a 37°C. Com isso, eventuais partículas que não continham DNA com o mesmo tamanho e propriedades de dispersão que os espermatozoides foram excluídas da análise [18]. As emissões fluorescentes das sondas excitadas por argônio foram capturadas pelos detectores FL1 (passagem de banda: 533/30 nm), FL2 (passagem de banda 585/40 nm) e FL3 (passagem longa > 670 nm), enquanto a fluorescência emitida pelas sondas excitadas com o laser vermelho foi capturada pelo FL4 (passagem de banda:

675/25 nm). O FL1 foi utilizado para detectar a fluorescência verde (monômeros JC-1; FITC-PSA e CRG). O FL2 foi utilizado para detectar fluorescência vermelha (IP), e o FL4 foi utilizado para detectar fluorescência vermelha distante (S59). A sobreposição espectral da coloração nas análises da citometria de fluxo foi compensada sempre que necessário.

A integridade das membranas plasmática e acrossomal foram avaliadas com IP (concentração final: 3,3 µg/mL) e FITC-PSA (concentração final: 0,6 mg/mL), respectivamente. As amostras foram coradas simultaneamente com S59, IP e FITC-PSA e incubadas a 37°C durante 10 minutos [18]. Foram registradas porcentagens de três categorias de espermatozoides: membrana plasmática íntegra (%); membrana acrossomal íntegra (%); membranas plasmática e acrossomal íntegras (%).

O potencial de membrana mitocondrial (PMM) foi avaliado em células com membrana plasmática íntegra (IP negativo) por JC-1 (concentração final: 1 µM). As amostras foram coradas simultaneamente com S59, IP e JC-1 e depois incubadas a 37°C durante 10 minutos [18]. Foram registradas intensidades médias JC-1agg (FL2) [19].

O estresse oxidativo foi avaliado por CRG (concentração de 5 µM). As amostras foram inicialmente coradas com CRG e incubadas a 37°C durante 30 minutos, sendo que nos últimos 10 minutos foram adicionadas S59 e IP [20]. Foi registrada a intensidade mediana do CRG (FL1) em espermatozoide IP negativo.

Após a coloração com as sondas, todas as amostras foram rediluídas em TALP para $2,5 \times 10^6$ espermatozoides/mL para então serem analisadas por citometria de fluxo [21, 22]. Para a avaliação foi utilizado o aparelho Accuri C6 (Becton, Dickinson and Company, San Jose, USA). As amostras foram processadas a uma taxa de fluxo de aproximadamente 600 a 1000 eventos/segundo, totalizando 10.000 eventos S59-positivos por ensaio.

2.3 Experimento 2

Cada ejaculado foi dividido nos seguintes grupos experimentais:

Grupo 01: C-LIPO; Controle: diluidor à base de lipossomas (Optidux®, Reprodux, Itapira, Brasil);

Grupo 02: LIPO + AST; Diluidor à base de lipossomas (Optidux®) suplementado com 0,5 µM de astaxantina, diluída em 0,009% de DMSO;

Grupo 03: C-LIPO DMSO; Controle: diluidor à base de lipossomas (Optidux®) + 0,009% de DMSO

A metodologia utilizada foi a mesma descrita no Experimento 1.

2.4 Análise estatística

Para os dois experimentos a análise estatística foi realizada por meio do software SAS (Versão 9.2; SAS Institute). As variáveis foram testadas quanto à normalidade dos resíduos pelo Teste de Shapiro-Wilk e homogeneidade das variâncias usando o PROC UNIVARIATE e, quando isso não ocorreu, os dados foram transformados para Log [Log (X+1)] ou ranqueados. Os dados originais ou transformados das características espermáticas foram analisados por meio de ANOVA utilizando modelo misto (PROC MIXED), considerando o efeito aleatório do ejaculado de cada touro e os efeitos fixos de tratamento, touro e interação. Quando detectado efeito significativo de tratamento, as médias foram comparadas pelo método de Fisher de Menor Diferença Significativa para múltiplas comparações. Foram considerados como diferença significativa quando $P \leq 0,05$. Os dados foram expressos como média ± erro padrão da média.

3. Resultados

3.1 Experimento 1

Os resultados da motilidade espermática logo após a diluição estão demonstrados na Tabela 1. A adição de astaxantina ao diluidor à base de gema de ovo aumentou a motilidade total e o percentual de células rápidas, sem diferir do grupo C-GEMA DMSO. O grupo C-GEMA foi superior aos demais grupos nas características de velocidade progressiva e retilinearidade. Ao avaliar a frequência de batimento, o grupo C-GEMA foi superior ao grupo C-GEMA DMSO, porém o grupo GEMA + AST não diferiu de ambos. Para as demais variáveis (motilidade progressiva, velocidade

do trajeto, velocidade curvilinear, amplitude do deslocamento lateral da cabeça e linearidade, não houve diferença entre os tratamentos.

Tabela 1. Médias ± erro padrão das características de motilidade espermática, após a adição do sêmen em diluidor à base de gema de ovo (C-GEMA), diluidor à base de gema de ovo + 0,5 µM de astaxantina (GEMA + AST) e diluidor à base de gema de ovo + 0,009% de DMSO (C-GEMA DMSO).

Características de motilidade espermática	**Diluído (22˚C)**			
	C-GEMA	**GEMA + AST**	**C-GEMA DMSO**	**Valor de P**
MT (%)	91,2^{b} ± 0,8	93,6^{a} ± 0,6	93,0^{a} ± 0,8	**< 0,01**
MP (%)	77,9 ± 0,7	77,8 ± 0,6	76,9 ± 0,6	0,46
VAP (µm/s)	107,0 ± 1,0	106,3 ± 1,4	105,5 ± 1,1	0,60
VSL (µm/s)	86,3^{a} ± 0,9	84,2^{b} ± 1,1	83,1^{b} ± 1,0	**< 0,01**
VCL (µm/s)	181,0 ± 2,2	179,4 ± 2,7	179,0 ± 2,3	0,68
ALH (µm)	7,3 ± 0,1	7,3 ± 0,1	7,4 ± 0,1	0,86
BCF (Hz)	27,7^{a} ± 0,4	26,8^{ab} ± 0,4	26,3^{b} ± 0,4	**0,03**
STR (%)	80,7^{a} ± 0,5	79,2^{b} ± 0,5	78,6^{b} ± 0,4	**< 0,01**
LIN (%)	49,6 ± 0,5	48,8 ± 0,5	48,3 ± 0,4	0,12
RAP (%)	89,7^{b} ± 0,9	91,9^{a} ± 0,7	91,4^{a} ± 0,8	**0,03**

Letras diferentes sobrescritas (a, b) na mesma linha indicam diferença (p ≤ 0,05).
Motilidade total (MT), motilidade progressiva (MP), velocidade do trajeto (VAP), velocidade progressiva (VSL), velocidade curvilinear (VCL), amplitude do deslocamento lateral da cabeça (ALH), frequência de batimento (BCF), retilinearidade (STR), linearidade (LIN), células rápidas (RAP).

Após a criopreservação, a adição de astaxantina no diluidor promoveu resultado inferior nas células espermáticas para as características de velocidade progressiva, frequência de batimento e retilinearidade quando comparadas com células do grupo C-GEMA, conforme demostrado na Tabela 2. A redução dessas características também ocorreu no grupo C-GEMA DMSO.

Não foi possível avaliar a morfologia espermática do sêmen diluído, em virtude da desnaturação proteica, que possivelmente ocorreu entre o formol e as partículas de gema de ovo, durante o armazenamento das amostras em geladeira (± 15°C).

Tabela 2. Médias ± erro padrão das características de motilidade espermática, após criopreservação do sêmen com o diluidor à base de gema de ovo (C-GEMA), diluidor à base de gema de ovo + 0,5 µM de astaxantina (GEMA + AST) e diluidor à base de gema de ovo + 0,009% de DMSO (C-GEMA DMSO).

Características de motilidade espermática	**Descongelado**			
	C-GEMA	**GEMA + AST**	**C-GEMA DMSO**	**Valor de P**
MT (%)	45,6 ± 2,5	48,7 ± 2,7	45,9 ± 2,5	0,58
MP (%)	41,7 ± 2,2	43,4 ± 2,4	40,8 ± 2,3	0,66
VAP (µm/s)	88,8 ± 1,3	86,5 ± 1,3	86,0 ± 1,4	0,19
VSL (µm/s)	$79,2^{a}$ ± 1,3	$75,3^{b}$ ± 1,3	$75,4^{b}$ ± 1,3	**0,02**
VCL (µm/s)	140,6 ± 2,8	137,9 ± 2,1	137,0 ± 2,5	0,45
ALH (µm)	5,5 ± 0,1	5,6 ± 0,1	5,5 ± 0,1	0,71
BCF (Hz)	$32,7^{a}$ ± 0,4	$30,9^{b}$ ± 0,4	$31,3^{b}$ ± 0,4	**< 0,01**
STR (%)	$88,9^{a}$ ± 0,3	$87,3^{b}$ ± 0,4	$87,5^{b}$ ± 0,4	**< 0,01**
LIN (%)	58,9 ± 0,7	57,5 ± 0,6	57,7 ± 0,7	0,08
RAP (%)	43,5 ± 2,4	46,4 ± 2,6	43,4 ± 2,5	0,54

Letras diferentes sobrescritas (a, b) na mesma linha indicam diferença ($p \leq 0,05$).
Motilidade total (MT), motilidade progressiva (MP), velocidade do trajeto (VAP), velocidade progressiva (VSL), velocidade curvilinear (VCL), amplitude do deslocamento lateral da cabeça (ALH), frequência de batimento (BCF), retilinearidade (STR), linearidade (LIN), células rápidas (RAP).

As médias ± erro padrão da % de defeitos espermáticos do sêmen descongelado está demonstrada na Figura 1. O grupo GEMA + AST apresentou mais defeitos menores que os demais grupos (P = 0,01). Não houve diferença entre os grupos experimentais para defeitos maiores e defeitos totais (P= 0,10 e 0,16, respectivamente).

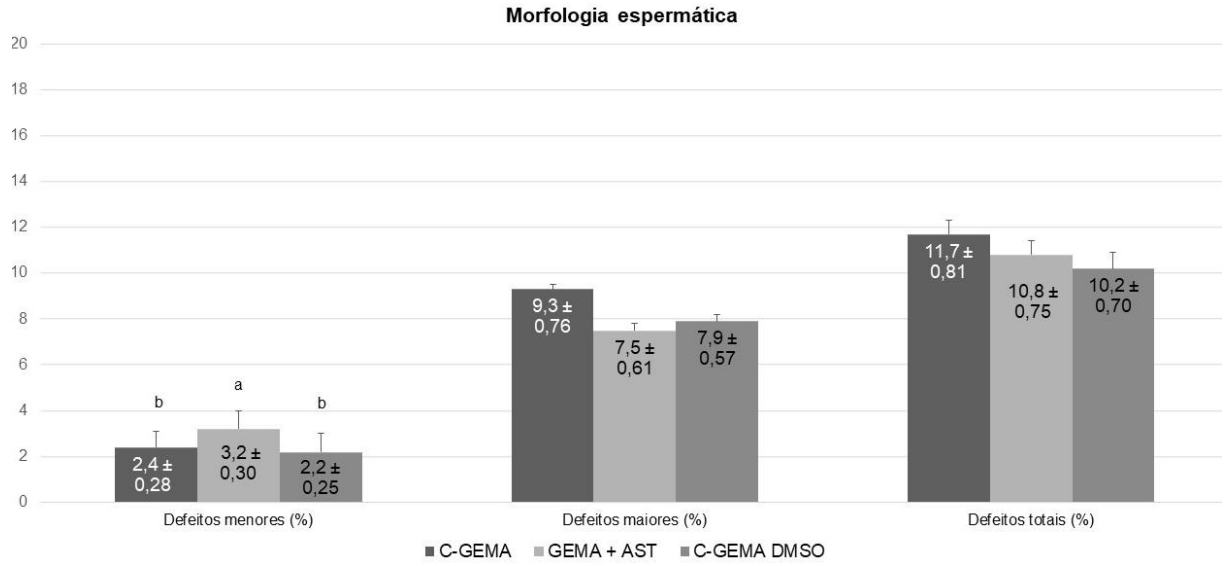

Figura 1. Médias ± erro padrão do percentual de defeitos menores, maiores e totais dos diferentes grupos experimentais avaliados pós criopreservação. Letras diferentes sobrescritas (a, b) no mesmo grupo de defeitos indicam diferença ($p \leq 0,05$).

As médias ± erro padrão da integridade das membranas plasmática e acrossomal, potencial de membrana mitocondrial e estresse oxidativo estão demonstradas na Figura 2. Os espermatozoides criopreservados com astaxantina não diferiram dos demais grupos ao analisar as células com integridade de membrana plasmática (Figura 2A; P = 0,66), integridade de membrana acrossomal (Figura 2B; P = 0,58) e percentual de células com integridade de membrana plasmática e acrossomal (Figura 2C; P = 0,84). As células criopreservadas com astaxantina apresentaram menor quantidade de células com alto potencial mitocondrial, ao comparar com o grupo C-GEMA, sendo que ambos não diferiram do grupo C-GEMA DMSO (Figura 2D; P = 0,04). Os espermatozoides do grupo GEMA + AST não diferiram dos demais quando avaliado o estresse oxidativo (Figura 2E; P = 0,69).

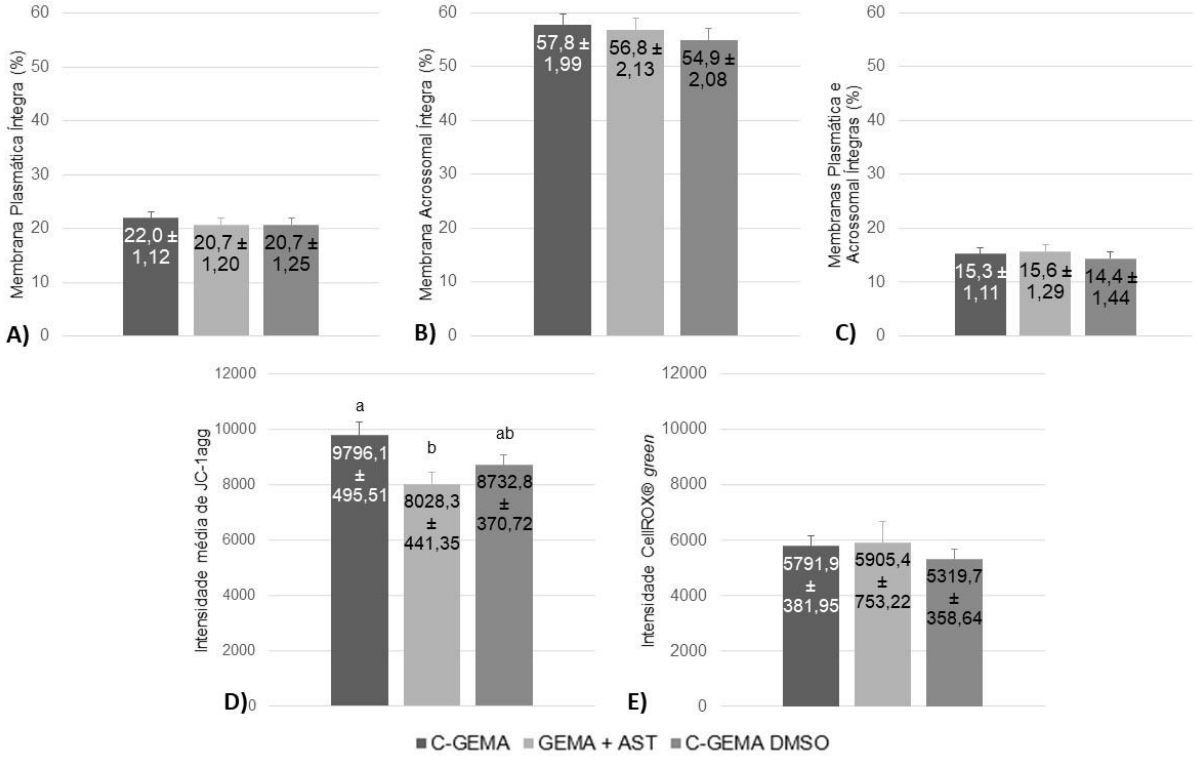

Figura 2. Médias ± erro padrão dos percentuais de espermatozoides com integridade de membranas plasmática e acrossomal e da intensidade de fluorescência associada ao potencial de membrana mitocondrial e estresse oxidativo. **A)** Membrana plasmática íntegra (%); **B)** Membrana acrossomal íntegra (%); **C)** Membrana plasmática e acrossomal íntegras (%); **D)** Intensidade média de fluorescência da sonda JC-1agg, indicando alto potencial de membrana mitocondrial; **E)** Mediana da intensidade de fluorescência da sonda *CellROX® green,* indicativa de estresse oxidativo. Letras diferentes sobrescritas (a, b) no mesmo bloco de colunas de defeitos indicam diferença ($p \leq 0,05$).

3.2 Experimento 2

A adição de astaxantina ao diluidor não promoveu diferença nas características de motilidade espermática ao avaliar o sêmen diluído, bem como no sêmen pós criopreservação, conforme demostrado nas Tabelas 3 e 4, respectivamente.

Tabela 3. Médias ± erro padrão das características de motilidade espermática, após a adição do sêmen em diluidor à base de lipossomas (C-LIPO), diluidor à base de lipossomas + 0,5 µM de astaxantina (LIPO + AST) e diluidor à base de lipossomas + 0,009% de DMSO (C-LIPO DMSO).

Características de motilidade espermática	Diluído (22˚C)			
	C-LIPO	LIPO + AST	C-LIPO DMSO	Valor de P
MT (%)	95,4 ± 0,7	95,3 ± 0,5	95,7 ± 0,5	0,82
MP (%)	73,6 ± 1,1	76,3 ± 0,9	74,7 ± 1,1	0,27
VAP (µm/s)	141,4 ± 2,3	137,4 ± 2,3	139,7 ± 2,4	0,25
VSL (µm/s)	104,2 ± 1,4	104,3 ± 1,6	103,7 ± 1,5	0,96
VCL (µm/s)	253,2 ± 4,2	245,0 ± 4,4	250,5 ± 4,6	0,25
ALH (µm)	9,7 ± 0,1	9,4 ± 0,1	9,6 ± 0,1	0,15
BCF (Hz)	26,8 ± 0,4	28,2 ± 0,5	27,0 ± 0,4	0,06
STR (%)	73,8 ± 0,6	76,0 ± 0,6	74,4 ± 0,6	0,06
LIN (%)	42,5 ± 0,4	44,0 ± 0,5	42,9 ± 0,5	0,12
RAP (%)	94,6 ± 0,7	94,6 ± 0,6	94,9 ± 0,6	0,89

Motilidade total (MT), motilidade progressiva (MP), velocidade do trajeto (VAP), velocidade progressiva (VSL), velocidade curvilinear (VCL), amplitude do deslocamento lateral da cabeça (ALH), frequência de batimento (BCF), retilinearidade (STR), linearidade (LIN), células rápidas (RAP).

Tabela 4. Médias ± erro padrão das características de motilidade espermática, após a criopreservação do sêmen com o diluidor à base de lipossomas (C-LIPO), diluidor à base de lipossomas + 0,5 µM de astaxantina (LIPO + AST) e diluidor à base de lipossomas + 0,009% de DMSO (C-LIPO DMSO).

Características de motilidade espermática	Descongelado			
	C-LIPO	LIPO + AST	C-LIPO DMSO	Valor de P
MT (%)	54,5 ± 2,1	52,7 ± 2,1	55,0 ± 2,0	0,90
MP (%)	43,9 ± 1,9	42,8 ± 1,8	45,0 ± 1,8	0,51
VAP (µm/s)	105,7 ± 1,6	104,7 ± 1,5	106,9 ± 1,4	0,56
VSL (µm/s)	80,7 ± 1,5	80,3 ± 1,4	82,2 ± 1,3	0,55
VCL (µm/s)	199,2 ± 3,0	200,8 ± 3,1	201,4 ± 2,8	0,31
ALH (µm)	8,6 ± 0,1	8,7 ± 0,2	8,7 ± 0,1	0,71
BCF (Hz)	27,8 ± 0,3	27,7 ± 0,2	28,3 ± 0,3	0,20
STR (%)	77,2 ± 0,5	77,5 ± 0,5	77,6 ± 0,4	0,77
LIN (%)	42,8 ± 0,5	42,4 ± 0,6	43,1 ± 0,5	0,68
RAP (%)	52,7 ± 2,1	50,5 ± 2,0	53,0 ± 2,0	0,13

Motilidade total (MT), motilidade progressiva (MP), velocidade do trajeto (VAP), velocidade progressiva (VSL), velocidade curvilinear (VCL), amplitude do deslocamento lateral da cabeça (ALH), frequência de batimento (BCF), retilinearidade (STR), linearidade (LIN), células rápidas (RAP).

As médias ± erro padrão da % de defeitos menores, maiores e totais dos espermatozoides após a diluição não diferiram entre os tratamentos e estão demonstradas na Figura 3 (P= 0,65, 0,57 e 0,47, respectivamente).

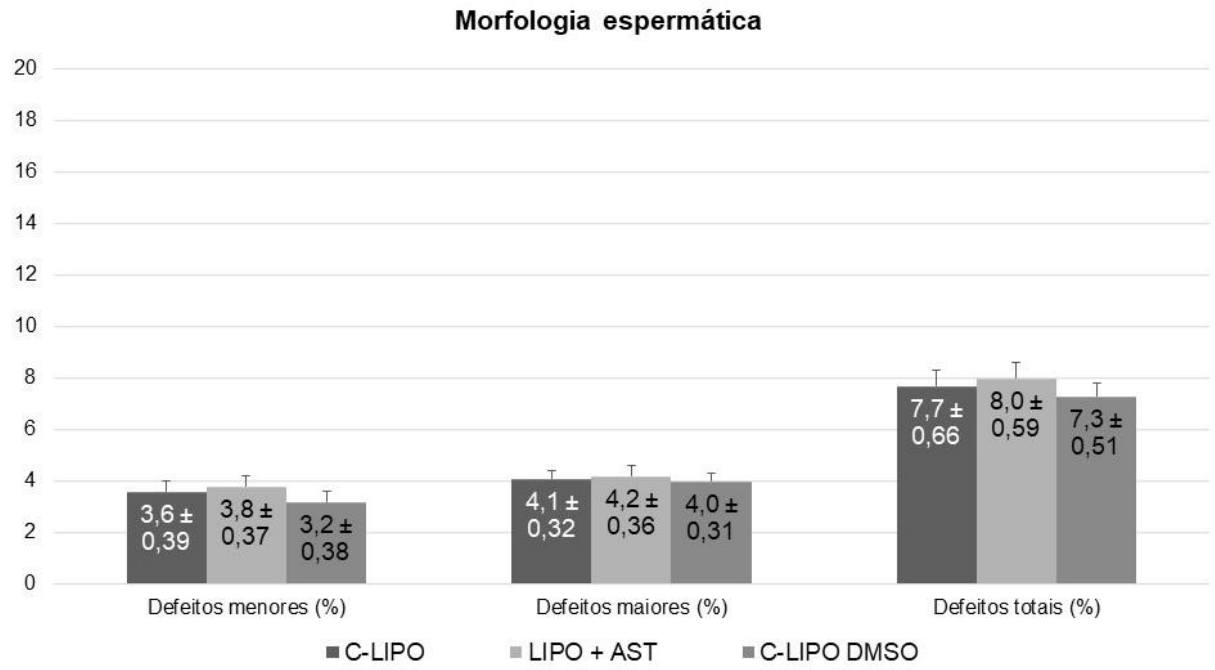

Figura 3. Médias ± erro padrão dos espermatozoides com defeitos menores, maiores e totais (%) dos diferentes grupos experimentais após a diluição do sêmen.

As médias ± erro padrão da % de defeitos menores, maiores e totais dos espermatozoides após a criopreservação, não diferiu entre os tratamentos e está demonstrada na Figura 4 (P = 0,42, 0,49 e 0,35).

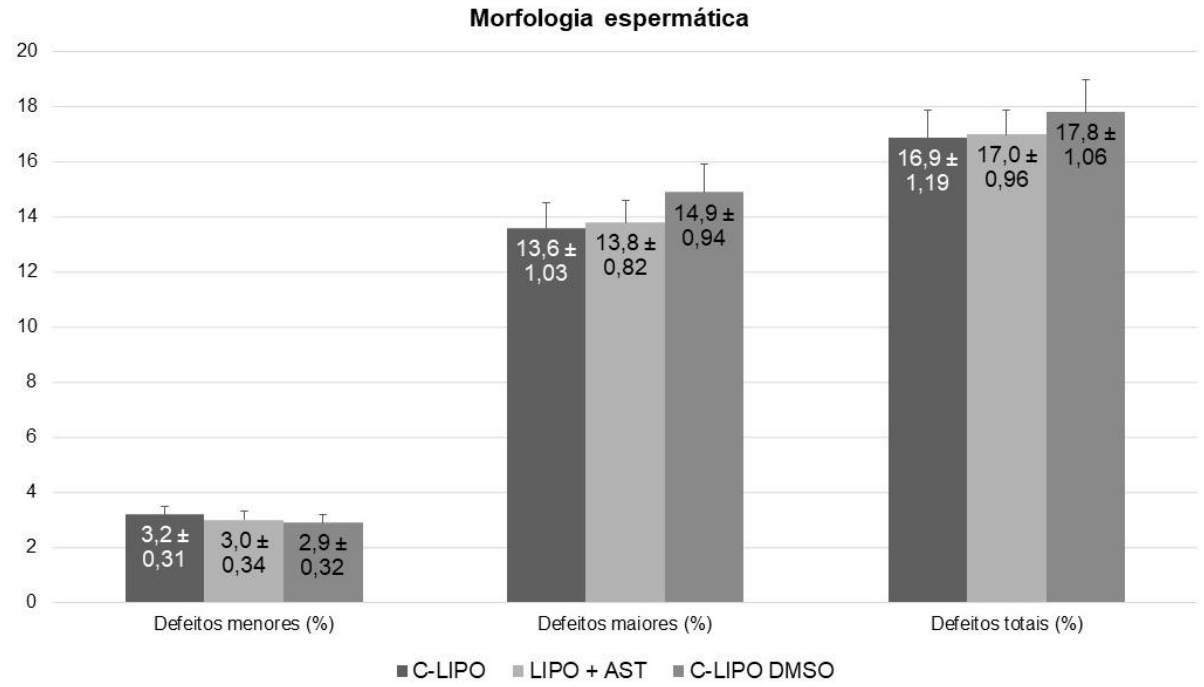

Figura 4. Médias ± erro padrão dos espermatozoides com defeitos menores, maiores e totais (%) dos diferentes grupos experimentais, após a criopreservação do sêmen.

As médias ± erro padrão da integridade das membranas plasmática e acrossomal, potencial de membrana mitocondrial e estresse oxidativo estão demonstradas na Figura 5. A suplementação com astaxantina não promoveu melhor preservação dos espermatozoides que os demais grupos na integridade de membrana plasmática (Figura 5A; P = 0,65), integridade de membrana acrossomal (Figura 5B; P = 0,52), integridade de membrana plasmática e acrossomal (Figura 5C; P = 0,84), alto potencial de membrana mitocondrial (Figura 5D; P = 0,40) ou estresse oxidativo (Figura 5E; P = 0,18).

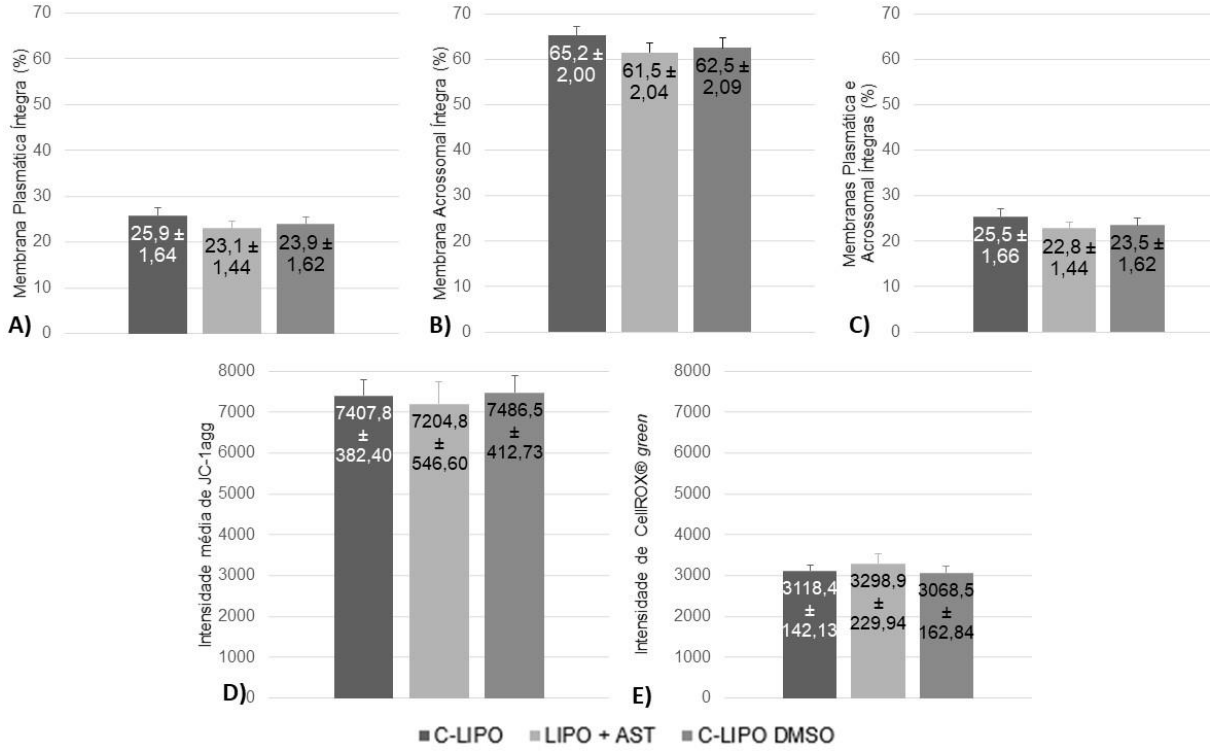

Figura 5. Médias ± erro padrão dos percentuais de espermatozoides com integridade de membranas plasmática e acrossomal, e da intensidade de fluorescência associada ao potencial de membrana mitocondrial e estresse oxidativo. **A)** Membrana plasmática íntegra (%); **B)** Membrana acrossomal íntegra (%); **C)** Membrana plasmática e acrossomal íntegras (%); **D)** Intensidade média da sonda JC-1agg, indicando alto potencial de membrana mitocondrial; **E)** Mediana da intensidade de fluorescência da sonda *CellROX® green*, indicativa de estresse oxidativo.

4. Discussão

Neste estudo foi avaliada, de maneira inédita, a adição do antioxidante astaxantina a dois diferentes diluidores comerciais de criopreservação de sêmen à base de gema de ovo e de lipossomas sobre as características de motilidade espermática, integridade de membranas plasmática e acrossomal, potencial de membrana mitocondrial e estresse oxidativo.

No experimento 1, de forma inesperada, nas características em que as células do grupo GEMA + AST foi superior ou inferior aos espermatozoides do grupo C-GEMA, os resultados foram semelhantes ao grupo C-GEMA DMSO. Conforme foi demonstrado no estudo de Basioura e colaboradores [23] era esperado que esse grupo se comportasse de maneira semelhante ao grupo C-GEMA, por serem dois

grupos controle-negativo. Isto significa que os efeitos observados não foram propiciados pela astaxantina, ressaltando a importância de um segundo grupo controle negativo para isolar o efeito do componente a ser estudado.

O DMSO é um produto químico derivado da lignina, classificado como uma substância polar e solvente penetrante [24], motivo pelo qual foi utilizado nesse estudo. Ele é também classificado como um crioprotetor intracelular, substância que apresenta capacidade de atravessar a membrana plasmática do espermatozoide, atuando nos meios intra e extracelular [25, 26]. Entretanto, por ter sido utilizado na concentração de 0,009%, não acreditamos que ele possa ter atuado como um crioprotetor neste estudo.

Até o momento foi encontrado somente um estudo que avaliou a suplementação de astaxantina em sêmen bovino [14]. Os pesquisadores utilizaram um diluidor formulado à base de lecitina de soja (Andromed®), e verificaram que a suplementação com 0,5 µM de astaxantina propiciou melhor índice de motilidade progressiva e menor concentração de malondialdeído, metabólito derivado do estresse oxidativo, não corroborando os resultados encontrados em nossa pesquisa.

Uma vez que a adição de astaxantina aos meios comerciais gerou resultado positivo no trabalho de Farzan e colaboradores [14], negativo quando utilizamos o diluidor à base de gema de ovo ou nulo quando utilizamos o diluidor à base de lipossomas, há indícios de que a composição do diluidor possivelmente influencie a célula espermática a requerer ou não a suplementação com o antioxidante astaxantina.

As substâncias contidas nos diluidores podem promover efeitos diferentes na célula espermática, principalmente em fatores relacionados à motilidade como a membrana plasmática e estruturas flagelares, envolvidos com a função mitocondrial [27]. Sendo assim, além da justificativa acima, outra hipótese para nossos resultados é um possível antagonismo entre os antioxidantes presentes nas fórmulas comerciais, cujo tipo de molécula e quantidades não são especificadas, e a dose de astaxantina utilizada no presente estudo. Cabe ressaltar que o diluidor à base de lecitina de soja, que apresentou efeito positivo na célula espermática, ao ser suplementada com astaxantina por Farzan e colaboradores [14], também contém antioxidante em sua formulação.

Não verificamos em nosso trabalho o efeito protetor da astaxantina contra o estresse oxidativo na dose utilizada, no entanto, é possível que o ajuste da mesma possa causar benefícios, conforme evidenciado por Ispada e colaboradores [28] em estudo com suplementação deste antioxidante na maturação *in vitro (*MIV). Estes autores verificaram que concentrações acima de 100 µM reduziram a porcentagem de embriões clivados que atingiram o estágio de blastocisto. Posteriormente reduziram as concentrações para 0, 12,5, 25, 50 e 50.000 nM para avaliar o efeito do choque térmico na MIV. Apesar do choque térmico ter causado aumento na produção de espécies reativas de oxigênio nos oócitos, as concentrações de 12,5 e 25 nM de astaxantina impediram que isso ocorresse. Dessa forma, apesar de ser outro tipo de célula, uma possível alternativa seria testar doses ainda mais reduzidas e avaliar se ocorre algum efeito positivo na célula espermática.

No experimento 1, as células espermáticas criopreservadas com astaxantina apresentaram maior porcentagem de defeitos menores. Entretanto, acreditamos que esse aumento ocorreu ao acaso, devido a ser um baixo número de células avaliadas e não decorrente de alguma interação das moléculas de astaxantina e DMSO com os espermatozoides.

Apesar de não ter realizado a comparação entre os diluidores, pode-se inferir que possivelmente eles atuem de formas distintas, pois diferente do experimento 1, no experimento 2 não foi encontrada nenhuma diferença entre os tratamentos. Com isso, ressaltamos a importância desse estudo para a ciência, principalmente para demonstrar que a suplementação com antioxidantes pode agir de maneira única para cada diluidor comercial, talvez pela sua viscosidade ou composição. Supomos que esse seja um motivo que dificulta a repetibilidade de resultados de estudos envolvendo antioxidantes [12, 14 e 29].

Mais estudos são necessários utilizando a astaxantina para avaliar o impacto nas características espermáticas. Indicamos que ao utilizar algum solvente, sejam realizadas avaliações para identificar possível atuação sobre o tratamento. Além disso, sugerimos que após a obtenção de resultados favoráveis na criopreservação, as doses de sêmen sejam utilizadas em fertilização *in vitro* e, posteriormente, *in vivo*, e assim avaliar se a taxa de prenhez também é beneficiada.

5. Conclusão

Conclui-se que a astaxantina, na concentração utilizada, quando adicionada aos diluidores comerciais à base de gema de ovo ou lipossomas não reduz o estresse oxidativo e, portanto, não preserva a motilidade espermática e o potencial de membrana mitocondrial, rejeitando a hipótese inicial do presente estudo.

Agradecimentos

À equipe do Laboratório de Morfofisiologia Molecular e Desenvolvimento (LMMD/ZMVs) sobretudo aos Coordenadores/Responsáveis Flávio Vieira Meireles, Felipe Perecin e Fabiana Fernandes Bressan, assim como à Especialista de Laboratório Cibele Maria Prado, pela colaboração com este estudo e pela disponibilização do citômetro de fluxo.

Às empresas Botupharma® e Reprodux® pela doação dos diluidores comerciais.

Aos funcionários do Departamento de Reprodução Animal: Márcio Donizete De Carli, João Carlos Pinto de Campos e José Maria Bernardi, pelo auxílio com os touros.

Referências

[1] Ugur MR, Abdelrahman AS, Evans HC, Gilmore AA, Hitit M, Arifiantini RI, et al. Advances in cryopreservation of bull sperm. Front Vet Sci 2019; 6:1-15.

[2] Bailey JL, Bilodeau JF, Cormier N. Semen cryopreservation in domestic animals: a damaging and capacitating phenomenon. J Androl 2000**;** 21:1-7.

[3] Watson PF. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. Anim Reprod Sci 2000; 60:481–11.

[4] Layek SS, Mohanty TK, Kumaresan A, Parks JE. Cryopreservation of bull semen: Evolution from egg yolk based to soybean based extenders. Anim Reprod Sci 2016; 172:1-9.

[5] Batellier FVMF, Vidament M, Fauquant J, Duchamp G, Arnaud G, Yvon JM, et al. Advances in cooled semen technology. Anim Reprod Sci 2001; 68:181-9.

[6] Silva SV, Guerra MMP. [Cryopreservation effects on sperm cells and alternatives for crioinjury reduction]. Rev Bras Reprod Anim 2011; 35:370-14.

[7] Miguel-Jimenez S, Del Alamo MMR, Álvarez-Rodríguez M, Hidalgo CO, Peña AI, Muiño R, et al. In vitro assessment of egg yolk-, soya bean lecithin-and liposome-based extenders for cryopreservation of dairy bull semen. Anim Reprod Sci 2020; 215:1-12.

[8] Silva LO, Nogueira MMB, Soares LO, Silva AJS, Cruz Júnior EF, Silva VJA, et al. [Sperm kinetics after thawing of cryopreserved bovine semen in a diluter containing soy lecithin]. In: 55ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia, 28º Congresso Brasileiro de Zootecnia. Construindo saberes, formando pessoas e transformando a produção animal, Goiania, 2018; 1-5.

[9] Naz S, Umair M, Iqbal S. Comparison of Tris egg yolk-based, Triladyl® and Optixell® extender on post-thaw quality, Kinematics and in vivo fertility of Nili Ravi Buffalo (Bubalus bubalis) bull spermatozoa. Andrologia 2018; 50:1-6.

[10] Lima-Verde IB, Johannisson A, Ntallaris T, Al-Essawe E, Al-Kass Z, Nongbua T, et al. Effect of freezing bull semen in two non-egg yolk extenders on post-thaw sperm quality. Reprod Domest Anim 2018; 53:127-9.

[11] Fleisch A, Malama E, Witschi U, Leiding C, Siuda M, Janett F, et al. Effects of an extension of the equilibration period up to 96 hours on the characteristics of cryopreserved bull semen. Theriogenology 2017; 89:255-7.

[12] Basioura A, Tsakmakidis IA, Martinez EA, Roca J, Li J, Molina MF, et al. Effect of astaxanthin in extenders on sperm quality and functional variables of frozen-thawed boar semen. Anim Reproduc Sci 2020; 218:1-10.

[13] Goto S, Kogure K, Abe K, Kimata Y, Kitaham K, Yamashita E, et al. Efficient radical trapping at the surface and inside the phospholipid membrane is responsible for highly potent antiperoxidative activity of the carotenoid astaxanthin. Biochim Biophys Acta Biomembr 2001; 1512:251-258.

[14] Farzan M, Chamani M, Varnaseri H. The antioxidant effect of astaxanthin on quantitative and qualitative parameters of bull sperm. Indian J Foundam Appl Life Sci 2014; 4:425-430.

[15] Arruda RP. [Evaluation of effects of extenders and cryoprotectants on eqüine spermatozoa using epifluorescence microscopy, flow cytometry and computer-assisted sperm analyses of motility (CASA) and morphometry (ASMA)]. Tese (Livre

Docência) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, São Paulo. 2001; 121f.

[16] Blom E. The ultrastructure of some characteristic sperm defect and a proposal for a new classification of bull spermiogram. Nord Vet Med 1973; 25:383-4.

[17] Bavister BD, Leibfried ML, Lieberman G. Development of preimplantation embryos of the golden hamster in a defined culture medium. Biol Reprod 1983; 28:235-12.

[18] Díaz R, Torres MA, Paz E, Quiñones J, Bravo S, Farías JG, et al. Dietary inclusion of fish oil changes the semen lipid composition but does not improve the post-thaw semen quality of ram spermatozoa. Anim Reprod Sci 2017; 183:132–10.

[19] Pavaneli APP, Recuero S, Chaves BR, Garcia-Bonavila E, Llavanera M, PinartE, et al. The presence of seminal plasma during liquid storage of pig spermatozoa at 17ºC modulates their ability to elicit in vitro capacitation and trigger acrosomal exocytosis. Int J Mol Sci 2020; 21:4520-22.

[20] Castro LS, de Assis PM, Siqueira AF, Hamilton TR, Mendes CM, Losano JD, et al. Sperm oxidative stress is detrimental to embryo development: A dose-dependent study model and a new and more sensitive oxidative status evaluation. Oxid Med Cell Longev 2016; 2016:1-12.

[21] Passarelli MS, Pavaneli APP, Ravagnani GM, Martins MP, Pedrosa AC, Martins SMMK, et al. Effects of different equilibration times at 5 ºC on boar sperm cryotolerance. Anim Reprod Sci 2020; 219:1-9.

[22] Torres MA, Rigo VHB, Leal DF, Pavaneli APP, Muro BBD, Losano JDA, et al. The use of resveratrol decreases liquid-extend boar semen fertility, even in concentrations that do not alter semen quality. Res Vet Sci 2021; 136:360–8.

[23] Basioura A, Boscos CM, Parrilla I, Tsousis G, Tsakmakidis IA. Effect of astaxanthin on the quality of boar sperm stored at 17°C, incubated at 37°C or under in vitro conditions. Reprod Domest Anim 2018; 53:463-8.

[24] Kligman AM. Topical Pharmacology and Toxicology of Dimethyl Sulfoxide - Part 1. JAMA 1965; 193:796-9.

[25] Bittencourt RF, Oba E, Ribeiro Filho ADL, Chalhoub M, Azevedo HC, Bicudo SD. [Advances in cryopreservation of ram semen I: extenders and cryoprotectans]. Ciên Anim Bras 2013; 14:522-14.

[26] Oliveira GC, Oliveira BMM, Celeghini ECC, Fernandes CB, Mattos CB. [Cryopreservation of equine semen: a review]. Rev Bras Reprod Anim 2013; 37:23-5.

[27] Celeghini ECC, Arruda RP, de Andrade AFC, Nascimento J, Raphael CF, Rodrigues PHM. Effects that bovine sperm cryopreservation using two different extenders has on sperm membranes and chromatin. Anim Reprod Sci 2008; 104:119-12.

[28] Ispada J, Rodrigues TA, Risolia PHB, Lima RS, Gonçalves DR, Rettori D, et al. Astaxanthin counteracts the effects of heat shock on the maturation of bovine oocytes. Reprod Fertil Dev 2018; 30:1169-10.

[29] Fang YI, Zhong R, Chen L, Feng C, Sun H, Zhou D. Effects of astaxanthin supplementation on the sperm quality and antioxidant capacity of ram semen during liquid storage. Small Ruminant Res 2015; 130:178-4.

APÊNDICE

651

Apêndice A: *Set up* Bovino
Aparelho Hamilton Thorne Research Motility Analysis
(HTM-IVOS, Versão 12.3, Hamilton Thorn Research, USA)

Característica	Ajuste
Número de imagens adquiridas	30
Taxa de aquisição das imagens	60 Hz
Contraste mínimo da célula	80
Tamanho mínimo da célula	5 pixels
Contraste para células imóveis	15
Retilinearidade (STR), limiar	60%
Valor de corte de VAP para células lentas	30,0 µm/s
VAP mínimo para células progressivas	40,0 µm/s
Tamanho da célula	6 pixels
Intensidade da célula	75
Tamanho da cabeça estática	0,32 a 2,96
Intensidade da cabeça estática	0,66 a 1,70
Alongamento estático	8 a 97
Aumento	1,75
Frequência de vídeo	60
Intensidade de iluminação	2203
Temperatura	37°C