



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS, AMBIENTAIS E BIOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL**

**ÁCIDO ASCÓRBICO E RESVERATROL NO DILUIDOR PARA  
CRIOPRESERVAÇÃO DE SÊMEN CAPRINO**

**LINDOMAR SOUSA BRITO**

**CRUZ DAS ALMAS – BAHIA  
AGOSTO - 2014**

# **ÁCIDO ASCÓRBICO E RESVERATROL NO DILUIDOR PARA CRIOPRESERVAÇÃO DE SÊMEN CAPRINO**

**LINDOMAR SOUSA BRITO**

Médico Veterinário

Universidade Federal da Bahia, 2011.2

Dissertação submetida ao Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia e, como requisito parcial para obtenção do Grau de Mestre em Ciência Animal.

Orientadora: Profa. Dra. Larissa Pires Barbosa

Co-Orientador: Prof. Dr. Alexandre Moraes Pinheiro

**CRUZ DAS ALMAS - BAHIA**

**AGOSTO – 2014**

## FICHA CATALOGRÁFICA

B862a Brito, Lindomar Sousa.  
Ácido ascórbico e resveratrol no diluidor para  
criopreservação de sêmen caprino / Lindomar Sousa Brito.\_  
Cruz das Almas, BA, 2014.

109f.; il.

Orientadora: Larissa Pires Barbosa.  
Coorientador: Alexandre Moraes Pinheiro.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do  
Recôncavo da Bahia, Centro de Ciências Agrárias,  
Ambientais e Biológicas.

1.Caprino – Produção animal. 2.Caprino – Criopreservação  
de órgãos, tecidos etc.

3.Sêmen – Análise. I.Universidade Federal do Recôncavo  
da Bahia, Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e  
Biológicas. II.Título.

CDD: 636.089

Ficha elaborada pela Biblioteca Universitária de Cruz das Almas - UFRB.

**CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS, AMBIENTAIS E BIOLÓGICAS**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL**  
**CURSO DE MESTRADO**

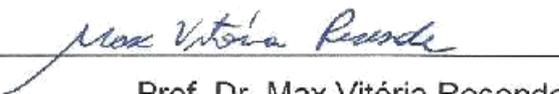
**COMISSÃO EXAMINADORA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE**  
**LINDOMAR SOUSA BRITO**



Profa. Dra. Larissa Pires Barbosa  
Universidade Federal do Recôncavo da Bahia  
(Orientadora)



Profa. Dra. Evani Souza de Oliveira Strada  
Universidade Federal do Recôncavo da Bahia



Prof. Dr. Max Vitória Resende  
Universidade Salvador

**CRUZ DAS ALMAS-BAHIA**  
**AGOSTO - 2014**

## **DEDICATÓRIA**

### **À DEUS**

*Pela energia que me dar força, saúde, paz, alegrias e confiança naquilo que procuro fazer com amor.*

*“Tudo posso naquele que me fortalece”*

*Filipenses 4:13.*

### **AOS MEUS PAIS,**

*Antonio Alves de Brito e*

*Maria Aparecida Sousa Brito,*

*Pelos ensinamentos, carinho, confiança, fé, incentivo, amor.*

*E, sobretudo pela educação, a maior herança que vocês me deram.*

**AMO VOCÊS!!!**

*"Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de água no mar. Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota."*

*Madre Teresa de Calcutá*

*"Eu tentei 99 vezes e falhei, mas na centésima tentativa eu consegui, nunca desista de seus objetivos mesmo que esses pareçam impossíveis, a próxima tentativa pode ser a vitoriosa."*

*Albert Einstein*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à Deus, por todas as coisas maravilhosas que me foram concedidas, contribuindo de maneira imensurável para minha formação profissional e pessoal.

À todos os meus familiares, que sempre estiveram ao meu lado, apoiado, dando força, incentivo durante essa árdua caminhada, principalmente meus pais, Antônio Brito e Aparecida Sousa, pessoas incríveis, exemplos de vida.

À minha orientadora, profa. Dra. Larissa Pires Barbosa pela dedicação, confiança, paciência, presteza, e que não mediu esforços no momento em que a escolhi para encarar esse desafio, principalmente, por não ser um projeto financiado, não sabendo ela, que esse era o mais “dócil” dos radicais.

Ao meu co-orientador, Prof. Dr. Alexandre Pinheiro, o grande mestre da bioquímica, que disponibilizou o laboratório para o preparo das soluções, e, sobretudo, por estar sempre à disposição para ajudar a desvendar as fórmulas estequiométricas, especialmente, aquelas envolvidas na busca dos “doutores da apoptose”.

Aos colegas, hoje grandes amigos que pude construir durante esse mestrado: Caline, Wiliam (Will), Reuber, Ronival, Daniel, Márcio (Big), Nariane, meus parceiros nas coletas de sêmen para a realização do experimento, portanto, essa vitória também é de vocês. Muito obrigado meus amigos!

Aos grandes mestres, Drs. Marcílio Nichi e Leandro Rodello, que apesar de não conhecê-los pessoalmente, foram de uma grande humildade e gentileza ao responder meus e-mails, contribuindo para o saneamento de algumas duvidas, bem como, com material de apoio, além de disponibilizar o espaço das suas respectivas universidades para realização de futuros trabalhos.

Ao Prof. Dr. Max Vitória Resende, pelas ideias, conversas, sugestões, pela doação do meio diluidor, além de vir *in loco* realizar o resfriamento e

congelamento piloto, contribuições fundamentais para o sucesso deste trabalho, e aos professores: Dra. Fabiana, Dr. Tadeu, Dra. Camila e a doutoranda Rosileia que colaboraram enormemente nas análises estatísticas.

Ao meu orientador do curso de pós-graduação, especialização em Produção de Bovinos, professor Dr. Ossival Lolato Ribeiro, exemplo de profissional, dedicação pura, paranaense do pé roxo, e, sobretudo pelo grande amigo que és. Sair em pleno carnaval de Salvador e vir para Cruz das Almas ajudar nas análises do experimento merece ser reverenciado, merece uma coleção de Insana.

À grande zootecnista, minha amiga Emellinne Ingrid, sempre precisa nos tempos de TTR, também parceira no carnaval de 2014, juntamente com o nosso mestre Yoda, motivo de muitas gargalhadas.

Ao irmão Nivaldo Barreto, parceria, grande amigo, sempre a disposição para ajudar, contribuindo para o nosso aprendizado de cada dia, especialmente, nos últimos dias dessa empreitada.

Aos amigos (as) George William, Gisele Caroline, Carlos Henrique, Fabiano e Somácio, que apesar de não terem participado diretamente, tiveram presentes no meu dia a dia, principalmente, nas conversas reflexivas.

Aos colegas de trabalho, ex-chefes Valério, Adilson e Victor sempre flexíveis com os meus horários de trabalho, permitindo conciliar trabalho – Universidade, e os demais colegas; Cláudia Lopes, Miriam, Franklin, Maria José e Jiriane, que sempre compreenderam e compensaram as minhas ausências.

Aos demais professores, funcionários, seguranças, coordenadores, e todos aqueles (as), que de alguma forma colaboraram para execução deste trabalho e não foram supracitadas, que a ausência nunca signifique o esquecimento.

Meus sinceros agradecimentos a todos vocês!!!

## SUMÁRIO

Página

**LISTA DE TABELAS**

**LISTA DE FIGURAS**

**LISTA DE ABREVIATURA E SÍMBOLOS**

**RESUMO**

**ABSTRACT**

**INTRODUÇÃO** ..... 18

**REVISÃO DE LITERATURA** ..... 20

**REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS** ..... 32

### **Capítulo 1**

**ÁCIDO ASCÓRBICO NO DILUIDOR PARA CRIOPRESERVAÇÃO DE SÊMEN CAPRINO**..... 43

### **Capítulo 2**

**RESVERATROL NO DILUIDOR PARA CRIOPRESERVAÇÃO DE SÊMEN CAPRINO** ..... 63

**CONSIDERAÇÕES FINAIS** ..... 82

## LISTA DE FIGURAS

### REVISÃO DE LITERATURA

### Página

- Figura 1:** Reação de formação do ânion radical superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ) e sua dismutação em peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), na presença de superóxido dismutase (SOD), e, posteriormente em água ( $H_2O$ ) e oxigênio molecular ( $O_2$ ), na presença de catalase (CAT) e glutathione peroxidase (GSP-Px)..... 23
- Figura 2:** Esquema demonstrando a coloração de espermatozoides com corante *Fast Green* e do Rosa bengala..... 31

## LISTA DE TABELAS

### CAPÍTULO 1

Página

#### Ácido ascórbico no diluidor para criopreservação de sêmen caprino

- Tabela 1:** Motilidade espermática progressiva e vigor espermático pós-diluição, pós-resfriamento e pós-descongelamento de sêmen diluído com meio acrescido de ácido ascórbico..... 52
- Tabela 2:** Integridade acrossomal e HOST de sêmen caprino criopreservado com diluidor acrescido de ácido ascórbico..... 54
- Tabela 3:** Motilidade espermática progressiva (%) e vigor do sêmen caprino descongelado em meio diluidor contendo ácido ascórbico e submetido ao teste de termorresistência..... 56

## LISTA DE TABELAS

### CAPÍTULO 2

Página

#### Resveratrol no diluidor para criopreservação de sêmen caprino

- Tabela 1:** Motilidade espermática progressiva e vigor espermático pós-diluição, pós-resfriamento e pós-descongelamento de sêmen diluído com meio acrescido de resveratrol..... 72
- Tabela 2:** Integridade acrossomal e HOST de sêmen caprino criopreservado com diluidor acrescido de resveratrol..... 73
- Tabela 3:** Motilidade espermática progressiva (%) e vigor do sêmen caprino descongelado em meio diluidor contendo resveratrol e submetido ao teste de termorresistência..... 76

## LISTA DE FIGURAS

### CAPÍTULO 1

Página

#### Ácido ascórbico no diluidor para criopreservação de sêmen caprino

- Figura 1:** Caixa térmica utilizada durante a etapa de resfriamento do sêmen..... 50
- Figura 2:** Percentagem de acrossomos intactos de sêmen diluído com meio acrescido com níveis de ácido ascórbico pós-descongelamento..... 55

## LISTA DE FIGURAS

### CAPÍTULO 2

Página

#### Resveratrol no diluidor para criopreservação de sêmen caprino

- Figura 1:** Caixa térmica utilizada durante a etapa de resfriamento do sêmen..... 70
- Figura 2:** Valores das equações de regressão de sêmen diluído com meio acrescido de resveratrol pós-descongelamento. a) motilidade progressiva, b) vigor espermático..... 73
- Figura 3:** Percentagem de espermatozoides com membrana plasmática intactas de sêmen diluído com meio acrescido com níveis de resveratrol pós-descongelamento..... 74
- Figura 4:** Motilidade espermática progressiva (%) e vigor do sêmen caprino descongelado em meio diluidor contendo resveratrol e submetido ao teste de termorresistência..... 77

## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

ATP	Adenosina trifosfato
AMP	Adenosina monofosfato
ANOVA	Análise de variância
$O_2^{\cdot-}$	Ânion radical superóxido
CAT	Catalase
CBRA	Colégio Brasileiro de Reprodução Animal
HOST	Hypoosmotic Swelling Test (Teste Hiposmótico)
EDTA	Ethylenediamine tetraacetic acid
EYCE	Enzima coaguladora da gema-de-ovo
ROS	Espécie reativa ao oxigênio
GSH-Px	Glutathiona peroxidase
g	Grama
IA	Inseminação artificial
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
$\mu$ L	Microlitro
mg	Miligramas
mL	Mililitro
mOsm	Miliosmóis
$O_2$	Molécula de oxigênio
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzido
LPO	Peroxidação lipídica
$H_2O_2$	Peróxido de hidrogênio
PRDx	Peroxirredoxina
pH	Potencial Hidrogênio-iônico
%	Porcentagem
PKA	Proteína quinase
$OH^{\cdot}$	Radical hidroxila
SAS	Statistical Analysis System
SOD	Superóxido dismutase
TTR	Teste de termorresistência
T	Tratamento
TRIS	Tris-hidroximetil aminometano

# ÁCIDO ASCÓRBICO E RESVERATROL NO DILUIDOR PARA CRIOPRESERVAÇÃO DE SÊMEN CAPRINO

**Autor:** Lindomar Sousa Brito

**Orientadora:** Dra. Larissa Pires Barbosa

**RESUMO:** Objetivou-se determinar o melhor nível de inclusão dos antioxidantes ácido ascórbico e resveratrol em meio diluidor TRIS–Gema para criopreservação de sêmen caprino. Foram coletados, por meio de vagina artificial, cinco ejaculados de três animais da raça Anglo Nubiana, com dois a três anos de idade, com condição corporal média igual a  $3\pm 0,3$  (Escala de 1 a 5); clinicamente sadios, apto para reprodução. O sêmen de cada animal foi dividido em quatro alíquotas de 200 $\mu$ L, compondo quatro tratamentos: experimento 1: sem adição de ácido ascórbico no diluidor TRIS-Gema (controle) e com 0,0528; 0,1056 e 0,1584mg/mL de ácido ascórbico no diluidor TRIS-Gema; experimento 2: sem adição de resveratrol no diluidor TRIS-Gema e com 0,04; 0,08 e 0,12mg/mL de resveratrol no diluidor TRIS-Gema. Foram avaliadas as características físicas do sêmen imediatamente após a coleta, após a diluição, resfriamento e descongelamento. Após o descongelamento, as amostras seminais foram incubadas e avaliadas quanto à integridade de membrana (HOST) e acrossomal e termorresistência lento (TTR). Os dados foram submetidos à análise de regressão a 5% de probabilidade. Houve efeito quadrático com a inclusão do ácido ascórbico para a variável integridade acrossomal, apresentando um nível ótimo de 0,1006mg/mL de ácido ascórbico para uma integridade acrossomal de 61,58% ( $P<0,05$ ). Houve comportamento linear decrescente para motilidade espermática progressiva e vigor espermático pós-descongelamento, assim como nos 120 minutos do TTR com a inclusão de resveratrol ( $P<0,05$ ). Houve efeito quadrático para integridade de membrana (HOST) com o acréscimo de resveratrol do diluidor, apresentando um nível máximo ótimo de 0,039mg/mL de resveratrol para uma integridade de membrana plasmática de 52,55% ( $P<0,05$ ). Conclui-se que os antioxidantes estudados pode ser uma alternativa na composição dos diluidores seminais de caprinos.

**Palavras chave:** Antioxidantes, espécies reativas ao oxigênio, estresse oxidativo

# ASCORBIC ACID AND RESVERATROL IN EXTENDER FOR CRYOPRESERVATION OF GOAT SEMEN

**Author:** Lindomar Sousa Brito

**Orientated by:** Dra. Larissa Pires Barbosa

**ABSTRACT:** Objective was to determine the optimum level of inclusion of ascorbic acid and antioxidants resveratrol in TRIS extenders–egg yolk for cryopreservation of goat semen. Were collected by artificial vagina, five ejaculates of three Anglo Nubian goats, with two to three years of age, with average body condition score equal to  $3 \pm 0.3$  (range 1 to 5); clinically healthy, fit to reproduction. Semen from each animal was divided into four aliquots of 200 $\mu$ L, composing four treatments: experiment 1: no addition of ascorbic acid in TRIS-egg yolk (control) and 0.0528; 0.1056 and 0.1584 mg / mL of ascorbic acid in TRIS-egg yolk; Experiment 2: without addition of resveratrol in TRIS- egg yolk and 0.04; 0.08 and 0.12 mg/mL of resveratrol in TRIS-egg yolk. Physical semen characteristics were evaluated immediately after collection, after dilution, cooling and thawing. After thawing, the semen samples were incubated and evaluated for membrane integrity (HOST) and acrosome and slow thermoresistance (TTR). Data were subjected to regression analysis at 5% probability. There was a quadratic effect with the addition of ascorbic acid to the acrosome integrity variable, presenting a great peak of 0.1006 mg/mL ascorbic acid for acrosome integrity of 61.58% ( $P < 0.05$ ). There was linear decrease and progressive force sperm post-thaw sperm motility, as well as in 120 minutes of TTR with the inclusion of resveratrol ( $P < 0.05$ ). Quadratic effects for membrane integrity (HOST) with the addition of resveratrol in seminal extender, with a great peak of 0.039 mg/mL of resveratrol for a plasma membrane integrity of 52.55% ( $P < 0.05$ ). It is concluded that the antioxidants used can be an alternative in the composition of seminal extenders goats.

**Keywords:** Antioxidants, reactive oxygen species, oxidative stress.

## INTRODUÇÃO

A inseminação artificial (IA) é uma biotécnica importante para a espécie caprina, uma vez que viabiliza os programas de melhoramento genético, sobretudo por otimizar a utilização de sêmen de animais de elevada capacidade produtiva e reprodutiva, despertando assim grande interesse por criadores profissionalizados.

Nesse aspecto, a criopreservação seminal é uma técnica importante para a produção de caprinos, por possibilitar a coleta e armazenamento seminal, para uso posterior, o que permite aumentar o número de cabras a serem inseminadas com o sêmen de um mesmo reprodutor. Além disso, o sêmen criopreservado pode ser armazenado em nitrogênio líquido por tempo indeterminado, o que facilita o transporte para zonas distantes com maior facilidade, reduz os custos com a aquisição e manutenção de reprodutores (Konyali et al., 2013), bem como, minimiza a possibilidade de introdução e transmissão de doenças sexualmente transmissíveis nos rebanhos (Traldi, 1994), e, é mais uma garantia na preservação do material genético em casos de acidentes ou até mesmo de morte de animais geneticamente superiores.

O primeiro relato de sucesso da criopreservação seminal nas espécies domésticas se deu em meados do século passado, produzido por Polge et al. (1949). Embora, haja inúmeras pesquisas direcionadas à criopreservação seminal dos animais domésticos, sabe-se que é um processo complexo que envolve múltiplos fatores, portanto, para garantir o sucesso da criopreservação é necessário ter o conhecimento não somente do meio diluidor e do crioprotetor apropriado, das taxas de diluição, curva de resfriamento, mas também do conhecimento da própria fisiologia espermática da espécie, que é fundamental para manter o máximo de espermatozoides viáveis após a descongelação, e, por conseguinte, a obtenção de altas taxas de fertilidade (Purdy, 2006; Kulaksiz et al., 2010; Telhado et al., 2012).

Desta forma, a conservação dos espermatozoides pelo frio, particularmente em estado criopreservado, ocasiona danos ultraestruturais, químicos e funcionais nas membranas espermáticas, determinando redução na motilidade, na viabilidade, transporte espermático e na capacidade de fertilização (Salamon e Maxwell, 2000; Konyali et al., 2013). Aliado a isso, o estresse oxidativo contribui para geração desses danos, devido à geração de espécies reativas ao oxigênio (ROS), potencializado pelos espermatozoides mortos e oxigênio atmosférico, os quais estão envolvidos com os danos causados à membrana plasmática e ao DNA dos espermatozoides (Bucak et al., 2009; Tuncer et al., 2013; Küçük et al., 2014), em condições hipotérmicas de estocagem (Maxwell e Watson, 1996; Küçük et al., 2014).

Diante deste contexto, dispor-se de uma substância capaz de determinar menor estresse oxidativo e danos às células espermáticas, por conseguinte maior capacidade fecundante facultaria a elaboração de um meio diluidor mais eficaz para espécie caprina. Desta forma, objetivou-se determinar o melhor nível de inclusão de ácido ascórbico e resveratrol no meio diluidor, por meio da qualidade física e morfológica de amostras de sêmen criopreservado de caprinos da raça Anglo Nubiana.

## REVISÃO DE LITERATURA

### Membrana Espermática

A membrana plasmática envolve todo o espermatozoide e por meio da sua característica semipermeável, juntamente com suas organelas e componentes intracelulares, mantém o gradiente químico de íons e outros componentes solúveis (Silva e Gadella, 2006).

Apel-Paz et al. (2003) afirmaram que as células espermáticas possuem muitas características físicas e funcionais que as distinguem da maioria das células somáticas, o que é fundamental para que os espermatozoides possam se adaptar aos mais variados ambientes do trato genital masculino e feminino. Um exemplo chave dessa distinção é uma fração elevada de ácidos graxos poliinsaturados de cadeia longa, em especial o docosapentaenóico (22:5) e docosaexanóico (22:6) (Ladha, 1998; Flesch e Gadella, 2000).

Segundo Schürmann et al. (2002), as proteínas específicas da membrana plasmática permitem a livre movimentação dos componentes celulares, bem como o transporte de substratos como a glicose e frutose para o interior da célula espermática, utilizados como fonte de energia para manter as funções metabólicas (Mukai e Okuno, 2004), além de proteger a célula contra o estresse oxidativo, como as proteínas, clusterin (CLU), glutaciona peroxidase-5 (GPx5) e peroxirredoxina-5 (PRDx5) (Saadi et al., 2013).

Desse modo, o transporte de substratos como fonte de energia, essencial no movimento flagelar dos espermatozoides é fornecida através da respiração mitocondrial e da glicólise, sendo a via glicolítica responsável por aproximadamente 90% do ATP (adenosina trifosfato) produzido, que é quebrada pela adenosina trifosfatase, durante o metabolismo aeróbico (Marin et al., 2003; Silva e Gadella, 2006), o que evidencia a importância desses monossacarídeos na produção de ATP (Mukai e Okuno, 2004). Isso demonstra a importância de manter a membrana plasmática do espermatozoide funcionalmente intacta, a fim

de permitir o transporte seletivo de moléculas e possibilitar as reações necessárias à fertilização (Silva e Gadella, 2006).

De acordo, o modelo proposto por Singer e Nicholson (1972), a membrana espermática é igual ao modelo biológico organizado em um mosaico fluído, formado por duas camadas de fosfolipídios, no qual balsas lipídicas “*lipid rafts*” e proteínas difundem-se livremente dentro de uma bicamada. Contudo, atualmente é aceito que a organização dos lipídios na membrana plasmática é muito mais complexa, sendo arranjados em um mosaico de domínios (Ladha, 1998). Tal como acontece com as células somáticas, a organização da membrana espermática é uma mistura heterogênea de lipídios, esteróis, fosfolipídios, glicolipídios, proteínas e glicoproteínas e, que são distribuídos de forma assimétrica entre os folhetos interno e externo da membrana (Apel-Paz et al., 2003).

Amann e Graham (1993) afirmam que os lipídios são responsáveis pela integridade estrutural, às proteínas são as principais responsáveis pela ocorrência da maioria dos processos dinâmicos e os carboidratos desempenham importante papel nas interações entre as células. Haja vista a existência de inúmeros carboidratos na superfície extracelular da membrana plasmática que são ligados a proteínas (glicoproteínas) ou lipídios específicos que são coletivamente conhecidos como glicocálices (Flesch e Gadella, 2000). Gadella et al. (2001) postularam que os glicocálices possuem papel fundamental na interação espermatozoide-oócito, devido a sua importância na adesão inicial.

Apesar de existir uma considerável variação entre as diferentes espécies, as células espermáticas de mamíferos possuem alto teor de ácidos graxos insaturados (Aboagla e Maeda, 2011), em geral, a membrana plasmática dos espermatozoides é constituída por aproximadamente 70% de fosfolipídios, 25% de lipídios neutros (colesterol) e 5% de glicolipídios, de modo que o conteúdo de colesterol da membrana plasmática é o fator mais variável, pois está diretamente relacionada com a taxa de capacitação, sendo retirado da mesma durante esse processo (Flesch e Gadella, 2000; Companyó et al., 2007).

De acordo com Buffone et al. (2009), essas mudanças na membrana envolve a fosforilação da proteína tirosina, desencadeando uma cascata de transdução de sinal e hiperativação celular, que resulta no aumento do movimento espermático, de modo que o espermatozoide ligue a zona pelúcida e ocorra a

reação acrossômica com total capacidade de fertilizar. Contudo, a presença de ácidos graxos poliinsaturados na membrana espermática desses animais torna a célula altamente susceptível a peroxidação lipídica (LPO), resultante da produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), e, por conseguinte, a perda na integridade morfológica da membrana, bem como alteração da função celular, da motilidade espermática, levando o espermatozoide a indução da apoptose (Gandini et al., 2000; Bucak et al., 2010).

Por conseguinte, a manutenção da integridade das membranas (plasmática e acrossomal) é fundamental para a manutenção da motilidade e viabilidade do espermatozoide no trato genital da fêmea e de sua capacidade de atingir o oócito (Verstegen et al., 2002; Silva e Gadella, 2006), uma vez que são células totalmente diferenciadas, sem qualquer possibilidade de reparação caso sejam danificadas, exigindo um ambiente seguro, para ser capaz de sobreviver ao longo de um período de duração de horas a dias (Rodriguez-Martinez, 2007). Contudo, é necessário que a célula espermática disponha de uma boa atividade mitocondrial favorável a produção de energia (Leite et al., 2010), assim como motilidade progressiva e funcionalidade das proteínas relacionadas ao processo de fertilização (Rasul et al., 2001; Leite et al., 2010; Rodrigues et al., 2013).

### **Metabolismo Oxidativo**

A produção de espécies reativas ao oxigênio (ROS) pelas células espermáticas ocorre de forma natural. As ROS são moléculas eletronicamente instáveis, portanto, altamente reativas, tais como os ânions superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e hidroxila ( $OH^{\cdot}$ ). Esses compostos podem exercer a função de agentes oxidantes, ao receber elétrons, ou de agentes redutores, ao doar elétrons (Atessahin et al., 2008).

A produção de radicais derivados do oxigênio exerce função fundamental na fertilidade do macho. Em condições fisiológicas, os espermatozoides produzem quantidades controladas de ROS, com o objetivo de induzir a capacitação espermática e a reação acrossomal (O'flaherty et al., 2003; Peris et al., 2007), ao passo que a produção excessiva desses radicais é prejudicial à célula, pois leva a uma perda de motilidade e enzimas intracelulares, além de causar lesões ao DNA espermático e mitocondrial, de modo que a produção de ATP e NADPH sejam afetadas (Rivlin et al., 2004; Valença e Guerra, 2007; Sicherle et al., 2011).

Por outro lado, o acasalamento com o uso do sêmen *in natura*, sem manipulação, a produção de ROS está em equilíbrio com os mecanismos de defesa antioxidante do organismo, constituído por glutathiona reduzida (GSH), a glutathiona peroxidase (GSH-Px), catalase (CAT) e superóxido dismutase (SOD) (Marti et al., 2007), bem como os compostos não enzimáticos como: ácido ascórbico, alfa-tocoferol, albumina, a taurina e hipotaurina (Sicherle et al., 2011).

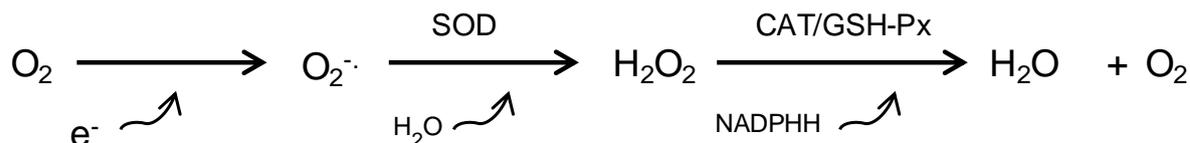


Figura 1. Reação de formação do ânion radical superóxido ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ) e sua dismutação em peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), na presença de superóxido dismutase (SOD), e, posteriormente em água ( $\text{H}_2\text{O}$ ) e oxigênio molecular ( $\text{O}_2$ ), na presença de catalase (CAT) e glutathiona peroxidase (GSP-Px).

No entanto, os sistemas naturais de defesa antioxidante são limitados, além disso, a manipulação durante o processo de criopreservação cria condições favoráveis à produção e ação descontrolada das ROS resultando em estresse oxidativo, que é prejudicial para os espermatozoides, em especial, para a funcionalidade da membrana, uma vez que pode causar lesões de acrossoma e diminuir viabilidade espermática (Moretti et al., 2012).

Sabe-se que o mecanismo de defesa antioxidante a partir do plasma seminal, é pouco eficaz, portanto, tem se optado pela adição de fontes exógenas de antioxidante no meio diluidor (Câmara et al., 2011; Memon et al., 2012), com o objetivo de manter o potencial de fertilização do espermatozoide durante o processo de criopreservação. Visto que, os níveis inadequados de GPx, compromete a ausência de sua atividade, um vez que não há redução do peróxido de hidrogênio e peróxido de lipídios, de modo que sejam convertidos em radicais hidroxilo e peróxido de lipídios pelo  $\text{Fe}^{2+}$ , respectivamente (La Falci et al., 2011).

Vários estudos têm sido realizados para prevenir o estresse oxidativo do sêmen caprino, durante a criopreservação, com a suplementação com antioxidantes nos meios diluidores (Atessahin et al., 2008; Bucak et al., 2009; Memon et al., 2011; Najjian et al., 2013). Apesar dos resultados serem promissores, o uso de antioxidantes nos meios de criopreservação de sêmen

caprino não é comum, uma vez que há pouca repetibilidade de dados, e seu uso na criopreservação ainda são conflitantes. Isso pode ser devido às diferenças de susceptibilidade a peroxidação lipídica entre espécies, raças, a variação individual e composição de plasma seminal (Memon et al., 2012).

Gadea et al. (2013), demonstraram que o sêmen de bodes é sensível a ação das ROS, em especial ao peróxido de hidrogênio. Em virtude disso, diversas pesquisas têm sido direcionadas com o propósito de verificar o efeito da terapia com substâncias antioxidantes no diluidor seminal de diferentes espécies na viabilidade destes gametas por meio da prevenção ou redução do processo peroxidativo.

Nesse contexto, podem ser destacados entre as substâncias não enzimáticas redutoras de ROS, o ácido ascórbico, estudado no plasma seminal de várias espécies, incluindo ovinos (Kheradmand et al., 2006; Peixoto et al., 2008), caprinos (Castilho et al., 2009; Memon et al., 2012), bovinos (Hu et al., 2010; Asadpour et al., 2011) e o resveratrol, um composto polifenólico (Stojanovic et al., 2001) não flavonoide (Degáspari e Waszczyński, 2004), testado no sêmen de ovino (Sarlós et al., 2002; Silva et al., 2012) e humanos (Ourique et al., 2013).

O ácido ascórbico, em virtude de suas propriedades redutoras, pode desempenhar importante papel na absorção e na neutralização das ROS, uma vez que a motilidade, integridade de membrana plasmática, integridade de acrossoma, morfologia e viabilidade espermática são mantidas em espermatozoides criopreservados em meio diluidor acrescido do antioxidante (Memon et al., 2012). Além disso, o ácido ascórbico é facilmente solúvel em água, sendo eficaz na eliminação das ROS presente no meio aquoso, reduzindo o efeito peroxidativo do  $H_2O_2$  ao DNA, proteínas e lipídios da célula espermática e, por conseguinte, reduz os efeitos deletérios da criopreservação (Donnelly et al., 1999; Martínez-Páramo et al., 2012).

Por outro lado, a adição de ácido ascórbico (0,5; 1 e 2 mg/mL) promove efeito negativo na integridade do acrossoma de espermatozoides ovinos diluídos em meio diluidor a base de Tris-Gema (Sönmez e Demirci, 2004). Peixoto et al. (2008) demonstraram que concentrações inferiores desta substância antioxidante (600 $\mu$ M/L) no meio diluidor não resultaram em efeito significativo para o percentual de células com acrossomas íntegros em relação ao grupo controle.

Por sua vez, o trans-resveratrol possui atividade antioxidante mais intensa do que o ácido ascórbico conferindo maior proteção ao DNA espermático (Stojanovic et al., 2001; Yan et al., 2012), além de possuir menor toxicidade à célula (Juan et al., 2005). Deste modo, os compostos polifenólicos atuam não apenas como captadores de ROS, mas também como quelatos de metais, participando tanto da etapa de iniciação, bem como da propagação do processo oxidativo (Degáspari e Waszczynskyj, 2004), assim, controla a liberação de cálcio intracelular, e, dessa forma evita capacitação prematura dos espermatozoides durante a criopreservação (Liu et al., 2005).

Em contrapartida, Silva et al. (2012) não observaram melhoria significativa dos parâmetros espermáticos pós-descongelamento, em amostras de sêmen ovino tratadas com diferentes concentrações (5, 10, 15 e 20 µg/mL) de resveratrol.

### **Diluidores Para Criopreservação Seminal**

O uso de meios diluidores durante o processamento do sêmen tem como finalidade principal aumentar o volume, favorecer a proteção aos espermatozoides contra o choque térmico, promover a estabilização da membrana plasmática, de forma que preserve a motilidade e capacidade fecundante, bem como disponibilizar fontes de energia para a célula (Sousa et al., 2010; Vidal et al., 2013).

Nesse sentido, diversos meios têm sido desenvolvidos para armazenamento de sêmen caprino, com a finalidade de proporcionar as células espermáticas melhor proteção durante a criopreservação (Bispo et al., 2011; Vidal et al., 2013; Salmani et al., 2014). Tem sido relatado que a baixa fertilidade do sêmen refrigerado e congelado é atribuída aos danos irreversíveis causados às células durante o processo de resfriamento, congelamento e descongelamento (Maxwell e Watson, 1996; Byrne et al., 2000; Salamon e Maxwell, 2000; Chaveiro et al., 2006).

Um bom diluidor para conservação seminal deve proporcionar ao espermatozoide, além de nutrientes como fontes de energia, reduzir os efeitos deletérios com as mudanças de pH, agindo como um meio tampão, manter a pressão osmótica adequada, inibir o crescimento bacteriano, proteger as células espermáticas durante resfriamento, congelamento e descongelamento, assim

como, ausência de toxicidade, preparação simples e baixo custo (Futino et al., 2010; Vidal et al., 2013).

Os meios diluidores comumente utilizados para resfriamento e criopreservação de sêmen da maioria dos mamíferos são à base de produtos de origem animal, como por exemplo, a gema de ovo e / ou leite, de forma que os tornam preferível a outros diluentes por possuírem componentes ativos que ajuda manter a viabilidade espermática, como as lipoproteínas de baixa densidade (LDLs), fosfatidilcolina (lecitina), dentre outros compostos (Watson, 1981; Fukui et al., 2008; Forouzanfar et al., 2010; Vidal et al., 2013), além de sua fácil disponibilidade (Bathgate et al., 2006).

Segundo Chakrabarty et al. (2007), os lipídios presentes na gema de ovo vão interagir com os lipídios da membrana plasmática do espermatozoide, com isso regula a entrada de  $Ca^{2+}$  e oxigênio e, mantêm a integridade ultra estrutural durante o choque térmico, ao prevenir a peroxidação lipídica da membrana, preservando a motilidade espermática (Watson, 2000; Vidal et al., 2013; Crespilho, et al., 2014), protegendo-a durante o processo de criopreservação (Salamon e Maxwell, 2000).

Contudo, o sêmen caprino apresenta particularidades que o diferenciam do de outras espécies, sendo a mais importante à síntese e secreção de enzimas como a Enzima Coaguladora da Gema de Ovo (EYCE), uma fosfolipase A, pelas glândulas bulbo uretrais liberadas no plasma seminal, que em contato com a gema de ovo do diluidor e, na presença do cálcio, atua como catalisadora e hidrolisa a lecitina da gema em lisolecitina e ácidos graxos, substâncias tóxicas aos espermatozoides (Roy, 1957; Leboeuf et al., 2000; Bispo et al., 2011). De acordo com os mesmos, o processo de hidrolise promove uma atividade fusogênica na membrana dos espermatozoides, induzindo a reação acrossômica e a descondensação da cromatina.

A fim de evitar a presença e crescimento de microrganismos durante o processo de manipulação do sêmen, é adicionado ao meio diluidor substâncias antimicrobianas. Dentre estas, os antibióticos gentamicina, estreptomicina, penicilina ou associações estreptomicina/penicilina estão entre os mais utilizados em diferentes espécies, entretanto, diversos estudos revelam que a gentamicina é o antibiótico que apresenta melhor efetividade, na redução da carga bacteriana

durante o processamento (Bousseau et al., 1998; Aurich e Spergser, 2007; Price et al., 2008; Moustacas et al., 2010).

### **Avaliações Seminais Pós-Descongelamento**

A avaliação da qualidade do sêmen tem o objetivo de estimar a capacidade potencial fecundante da amostra de sêmen (seja fresco, refrigerado ou congelado), para que o espermatozoide seja considerado qualitativamente viável e potencialmente fértil é necessário que esta célula esteja morfológica e metabolicamente perfeita, portanto, um teste complementar ao exame clínico do macho (Rodriguez-Martinez, 2006; Mocé e Graham, 2008).

Durante cada um dos passos do processo de resfriamento, congelamento e descongelamento, seja na adição de diluentes ou na recuperação, as células estão sujeitas a numerosos fatores de agressão (Salamon e Maxwell, 2000; Medeiros et al., 2002). Assim, vários métodos de análise seminal têm sido desenvolvidos para avaliar os parâmetros funcionais do espermatozoide de modo a relacionar parâmetros seminais com a fertilidade (Papadopoulos et al., 2005; Mocé e Graham, 2008; Tsakmakidis, 2010).

A avaliação do sêmen, utilizando testes laboratoriais é de suma importância para a indústria da inseminação artificial, por permitir o fornecimento de produtos de qualidade aos clientes e potencializar a utilização do material biológico. Assim, torna-se possível estimar a capacidade fertilizante dos espermatozoides através de ensaios *in vitro*, da mesma forma que possa identificar e selecionar ou descartar amostras de sêmen de má qualidade (Mocé e Graham, 2008). Contudo, é importante lembrar que nenhum teste isoladamente é capaz de determinar a fertilidade de um ejaculado, mas o exame de várias características pode prever o potencial de fertilidade dos espermatozoides (Siqueira et al., 2007).

Nesse aspecto, a motilidade espermática progressiva é uma estimativa visual da porcentagem de espermatozoides com atividade cinética, porém os movimentos dos espermatozoides não obedecem a um padrão único, pois há células que deslocam para frente (movimento progressivo), outras em circunferência (movimento circular) ou, ainda, podem apenas se limitar a oscilar no campo microscópico (movimento oscilatório ou local) (Salviano e Souza, 2008). Portanto, quando o percentual de espermatozoides móveis é superior aos de gametas com motilidade progressiva, este parâmetro deve ser expresso

separadamente, como motilidade total e motilidade progressiva, seguindo as recomendações do Manual de Procedimentos de Exame Andrológico do Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA, 2013).

Diante disso, a motilidade progressiva em uma amostra de sêmen tem sido reconhecida por muito tempo como a característica mais importante na avaliação da fertilidade do macho, pois, é a responsável pelo transporte do espermatozoide ao longo do genital feminino (Verstegen et al., 2002; Mocé e Graham, 2008; Contri et al., 2010), requisito básico para que ocorra a fertilização (Schober et al., 2007).

A motilidade e vigor espermático são testes mais comuns realizados rotineiramente para avaliar a viabilidade dos espermatozoides (Foote, 2003), visto que pode ser executada mais rapidamente, antes e depois do processamento em laboratório e a porcentagem de espermatozoides móveis tem uma boa correlação com a fertilidade (Siqueira et al., 2007).

Segundo o CBRA (2013), para que uma amostra do sêmen caprino criopreservado seja considerada dentro do padrão, é necessário apresentar motilidade progressiva maior ou igual a 30% e vigor maior ou igual a dois no pós-congelamento. Sendo, um dos parâmetros essenciais para a fertilidade, pois fornece informações importantes sobre o estado de energia dos espermatozoides (Quintero-Moreno et al., 2004). Além disso, facilita a passagem pelo trato genital até atingir a junção útero-tubárica, ao contrário dos espermatozoides com motilidade comprometida, que são incapazes de superar as barreiras do sistema genital feminino, portanto, quanto maior a motilidade progressiva, mais chance terão em alcançar a ampola das tubas uterinas (Muiño et al., 2008).

Enquanto que o teste de termo resistência lento (TTR) proposto por Dimitropoulos (1967) para avaliação da fertilidade potencial de partidas de sêmen criopreservado de bovino, outrora, adaptado para as demais espécies, consiste na incubação de uma amostra de sêmen descongelado em banho-maria por um tempo pré-estabelecido sob determinada temperatura e avaliando-se a motilidade progressiva e o vigor espermático. Segundo o manual de andrologia do CBRA (2013), o sêmen caprino congelado é considerado apto se a amostra apresentar pelo menos 30% dos espermatozoides com motilidade progressiva e vigor maior ou igual a dois, portanto, não é aconselhável o uso de amostras de sêmen com valores inferiores a esses após duas horas de incubação ao 37°C.

As condições de incubação variam de acordo a espécie e com o tipo de processamento de sêmen a testar (fresco, resfriado ou congelado), mas em caprinos e ovinos, o sêmen é descongelado em banho maria a 37°C durante 30 segundos, acondicionados em microtubos de polietileno também em banho maria a 37°C, e posteriormente avaliado quanto aos parâmetros de motilidade espermática progressiva e vigor espermático, seguindo os parâmetros do CBRA (2013), supondo a mesma condição de que estes estariam no trato genital feminino (37-38 °C), a sobrevivência dos espermatozoides incubados *in vitro* por longa duração pode predizer a habilidade do espermatozoide em fecundar o oócito (Santos et al., 2006), portanto, o TTR é um teste importante que avalia a longevidade dos espermatozoides após o resfriamento ou descongelação (Siqueira et al., 2007).

No tocante a integridade funcional da membrana plasmática, o teste hiposmótico HOST – “Hypoosmotic Swelling Test” – proposto por Jeyendran et al. (1984), avalia a integridade funcional da membrana plasmática dos espermatozoides, sendo, um teste complementar importante na avaliação *in vitro* do sêmen refrigerado e/ou criopreservado, característica indispensável para os diversos eventos fisiológicos que ocorrem durante a fertilização (capacitação, reação acrossômica e fusão dos espermatozoides com o oócito) (Siqueira et al., 2007), uma vez que tanto a criopreservação quanto o resfriamento podem levar a efeitos deletérios sobre a membrana (Melo et al., 2005).

Quando expostos as soluções hiposmótica, a célula espermática aumenta de volume com o influxo de fluidos, principalmente na região da cauda, para estabelecer o equilíbrio osmótico de fluidos entre os compartimentos intra e extracelular do espermatozoide (Rota et al., 2000; Siqueira et al., 2007). O inchaço provoca alterações no tamanho e forma das células, caso haja integridade das membranas a cauda se dobra ou se enrola que pode ser avaliada através de um microscópio de contraste de fase (Jeyendran et al., 1984; Cabrita et al., 1999).

Assim, os espermatozoides intumescidos ou HO + (reativos ao HO) são classificados como de membrana plasmática intacta, ou seja, bioquimicamente ativa, onde o transporte pode ser considerado um sinal de integridade e funcionalidade da membrana plasmática, cuja atividade funcional pode ser mais

um indicador da habilidade fertilizante do espermatozoide (Jeyendran et al., 1984; Rota et al., 2000).

O teste hiposmótico utilizado primeiramente para avaliar espermatozoides humanos (Jeyendran et al., 1984), foi adaptado posteriormente por diversos autores para avaliar a membrana das células espermáticas em várias espécies de animais domésticos: caprina (Bittencourt et al., 2005; Oliveira et al., 2013), ovino (Vásquez et al., 2013) suína (Pérez-Llano et al., 2001), canina (Dobranić et al., 2005), bovina (Pérez et al., 1997; Brito et al., 2003; Bacinoglu et al., 2008), coelhos (Amorim et al., 2009) e equina (Neild et al., 1999; Melo et al., 2005; Mansour, 2009). Além de predizer a vitalidade e de fácil interpretação da integridade e elasticidade da membrana espermática (Jeyendran et al., 1984), espera-se que, quanto mais espermatozoides preservarem esta característica melhor será a qualidade do sêmen (Nie e Wenzel, 2001).

Do mesmo modo a integridade do acrossoma é essencial para determinar a capacidade fecundante de uma amostra de sêmen, de forma que garanta a manutenção das enzimas hidrolíticas, importantes no momento da reação acrossômica. Pois, tem sido demonstrado que reprodutores com bons parâmetros de motilidade espermática, apresentaram baixa capacidade de fertilização, que pode ser indicativo de alterações na região acrossômica (Lessard et al., 2011), o que demonstra haver correlação positiva entre a porcentagem de acrossomas intactos e a fertilidade.

Em ovinos, foi observado ainda que as enzimas antioxidantes se distribuem por diversas regiões do espermatozoide, caracterizando a existência de subpopulações espermáticas de acordo com o padrão de distribuição delas, onde se observou que a SOD se encontra nas regiões acrossomal, pós-acrossomal e no flagelo, enquanto a GSH-Px está localizada nas regiões pós-acrossomal e apical da cabeça, e a GR se distribui ao longo do flagelo. Todavia, o processo de congelação-descongelação induz a uma mudança considerável na distribuição destas enzimas nas células espermáticas (Marti et al., 2008).

Nesse sentido, é salutar a realização de testes *in vitro* como a avaliação da integridade acrossomal com o objetivo de prever a fertilidade do macho. Dessa forma, considera-se que o acrossomo esteja íntegro quando a região acrossomal de coloração lilás é levemente mais escura que a região pós-acrossomal, ao

passo que o acrossomo não íntegro, a região acrossomal de coloração rosa, está levemente mais clara que a região pós-acrossomal (Figura 2).

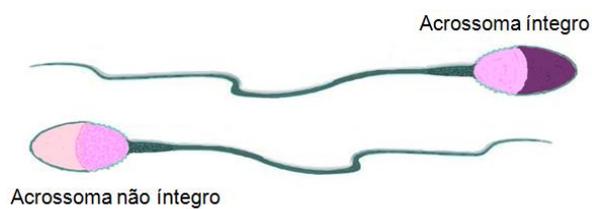


Figura 2: Esquema demonstrando a coloração de espermatozoides com corante *Fast Green* e do Rosa bengala.

Diante disso, pesquisadores desenvolveram um mecanismo fácil, que pode ser visualizado com o uso da microscopia de luz, pelo método da coloração com corante *Fast Green* e do Rosa bengala (Pope et al., 1991).

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABOAGLA, E.M.E, & MAEDA, T. Arbutin's suppression of cryodamage in goat sperm and its mechanism of cryoprotection. **Theriogenology**, v 76, n. 3, p. 538 - 546, 2011.

AMANN, R.P.; GRAHAM, J.K. **Spermatozoal function**. In: MCKINNON, A.O.; VOSS, J.L. Equine Reproduction, 1<sup>a</sup> ed. Philadelphia: Lea & Febiger, 1993, p.715 - 745.

AMORIM, E.A.M.; TORRES, C.A.A.; GRAHAM, J.K.; AMORIM, L.S.; SANTOS, L.V.L. The hypoosmotic swelling test in fresh rabbit spermatozoa. **Animal Reproduction Science**, v. 111, p. 338 - 343, 2009.

APEL-PAZ, M.; VANDERLICK, T.K.; CHANDRA, N.; DONCEL, G.F. A hierarchy of lipid constructs for the sperm plasma membrane. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 309, p. 724 - 732, 2003.

ASADPOUR, R.; JAFARI, R.; TAYEFI-NASRABADI, H. Influence of added vitamin C and vitamin E on frozen-thawed bovine sperm cryopreserved in citrate and Tris-based extenders. **Veterinary Research Forum**, v. 2, p. 37 - 44, 2011.

ATESSAHIN, A.; BUCAK, M.N.; TUNCER, P.B.; KIZIL, M. Effects of anti-oxidant additives on microscopic and oxidative parameters of Angora goat semen following the freeze–thawing process. **Small Ruminant Research**, v. 77, p. 38 - 44, 2008.

AURICH, C.; SPERGSER, J. Influence of bacteria and gentamicin on cooled-stored stallion spermatozoa. **Theriogenology**, v. 67, p. 912 - 918, 2007.

BACINOGLU, S.; TAS, M.; CIRIT, U.; OZDAS, O.B.; AK, K. The potential fertility estimation capacity of the hypoosmotic swelling test, the thermal stress test. **Animal Reproduction Science**, v. 104, p. 38 - 46, 2008.

BATHGATE, R.; MAXWELL, W.M.C.; EVANS, G. Studies on the effects of supplementing boar semen cryopreservation media with different avian egg yolk types on in vitro post-thaw sperm quality. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 41, 68 - 73, 2006.

BISPO, C.A.S.; PUGLIESI, G.; GALVAO, P.; RODRIGUES, M.T.; KER, P.G.; FILGUEIRAS, B.; CARVALHO, G.R. Effect of low and high egg yolk concentrations in the semen extender for goat semen cryopreservation. **Small Ruminant Research**, v. 100, p. 54 - 58, 2011.

BITTENCOURT, R.F.; FILHO, A.L.R.; SANTOS, A.D.F.; CHALHOUB, M.; ALVES, S.G.G.A.; VASCONCELOS, M.F.; LEANDRO, E.E.S.; GUIMARÃES, J.D. Utilização do teste hiposmótico para avaliar a eficácia de diferentes protocolos de criopreservação do sêmen caprino. **Ciência Animal Brasileira**, v. 6, n. 3, p. 213 - 218, 2005.

BOUSSEAU, S.; BRILLARD, J.P.; MARGUANT-LE, G.B.; GUERIN, B.; CAMUS, A.; LECHAT, M. Comparison of bacteriological qualities of various egg yolk sources and the in vitro and in vivo fertilizing potential of bovine semen frozen in egg yolk or lecithin based diluents. **Theriogenology**, v. 50, p. 699 - 700, 1998.

BRITO, L.F.C.; ALBERT, D.B.; SYLVIE, B.G.; PAUL, L.P.; JOHN, P.K. Comparison of methods to evaluate the plasmalemma of bovine sperm and their relationship with in vitro fertilization rate. **Theriogenology**, v. 60, p. 1539 - 1551, 2003.

BUCAK, M.N.; SARIÖZKAN, S.; TUNCER, P.B.; ULUTAŞ, P.A.; AKÇADAĞ, H.I. Effect of antioxidants on microscopic semen parameters, lipid peroxidation and antioxidant activities in Angora goat semen following cryopreservation. **Small Ruminant Research**, v. 81, n. 2, p. 90 - 95, 2009a.

BUCAK, M.N.; TUNCER, P.B.; SARIOZKAN, S.; ULUTAS, P.A.; COYAN, K.; BASPINAR, N.; OZKALP, B. Effects of hypotaurine, cysteamine and aminoacids solution on post-thaw microscopic and oxidative stress parameters of Angora goat semen. **Research in Veterinary Science**, v. 87, p. 468–72, 2009b.

BUCAK, M.N.; SARIÖZKAN, S.; TUNCER, P.B.; SAKIN, F.; ATESSAHIN, A.; KULAKSIZ, R.; ÇEVİK, M. The effect of antioxidants on post-thawed Angora goat (*Capra hircus ancyrensis*) sperm parameters, lipid peroxidation and antioxidant activities. **Small Ruminant Research**, v. 89, p. 24 - 30, 2010.

BUFFONE M.G.; DONCEL, G.F.; CALAMERA, J.C.; VERSTRAETEN, S.V. Capacitation-associated changes in membrane fluidity in asthenozoospermic human spermatozoa. **International Journal of Andrology**, v. 32, p. 360 - 75, 2009.

BYRNE, G.P.; LONERGAN, P.; WADE, M.; DUFFY, P.; DONOVAN, A.; HANRAHAN, J.P.; BOLAND, M.P. Effect of freezing rate of ram spermatozoa on subsequent fertility in vivo and in vitro. **Animal Reproduction Science**, v. 62, 265 - 275, 2000.

CABRITA, E.; ALVAREZ, R.; ANEL, E.; HERR´AEZ, M.P. The hypoosmotic swelling test performed with Counter: a method to assay functional integrity of sperm membrane in rainbow trout. **Animal Reproduction Science**, v. 55, p. 279 - 287, 1999.

CÂMARA, D.R.; SILVA, S.V.; ALMEIDA, F.C.; NUNES, J.F.; GUERRA, M.M.P. Effects of antioxidants and duration of pre-freezing equilibration on frozen-thawed ram semen. **Theriogenology**, v. 76, p. 342 - 350, 2011.

CASTILHO, E.F.; GUIMARÃES, J.D.; MARTINS, L.F.; PINHO, R.O.; GUIMARÃES, S.E.F.; ESPECHIT, C.J.B. Uso de própolis e ácido ascórbico na criopreservação do sêmen caprino. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 38, p. 2335 - 2345, 2009.

CHAKRABARTY, J.; BANERJEE, D.; PAL, D.; DE, J.; GHOSH, A.; MAJUMDER, G.C. Shedding off specific constituents from sperm cell membrane during cryopreservation. **Cryobiology**, v. 54, p. 27 - 35, 2007.

CHAVEIRO, A.; MACHADO, L.; FRIJTERS, A.; ENGEL, B.; WOELDERS, H. Improvement of parameters of freezing protocol for bull sperm using two osmotic supports. **Theriogenology**, v. 65, p. 1875 - 1890, 2006.

COMPANYÓ, M.; IBORRA, A.; VILLAVERDE, J.; MARTÍNEZ, P.; MORROS, A. Membrane fluidity changes in goat sperm induced by cholesterol depletion using beta-cyclodextrin. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1768, p. 2246 - 2255, 2007.

CONTRI, A.; VALORZ, C.; FAUSTINI, M.; WEGHER, L.; CARLUCCIO, A. Effect of semen preparation on casa motility results in cryopreserved bull spermatozoa. **Theriogenology**, v. 74, p. 424 - 435, 2010.

CRESPILHO, A.M.; NICHI, M.; GUASTI, P.N.; FREITAS-DELL'AQUA, C.P.; SÁ FILHO, M.F.; MAZIERO, R.R.; DELL'AQUA JR, J.A.; PAPA, F. O. Sperm fertility and viability following 48 h of refrigeration: Evaluation of different extenders for the preservation of bull semen in liquid state. **Animal Reproduction Science**, v. 146, p. 126 - 133, 2014.

DEGÁSPARI, C.H.; WASZCZYNSKYJ, N. Propriedades antioxidantes de compostos fenólicos. **Visão Acadêmica**, v. 5, n. 1, p. 33 - 40, 2004.

DIMITROPOULOS, R. La signification du test de la thermorésistance dans l'appréciation de la valeur fécondant du sperma congelé. **Animal Medicine Veterinary**, v. 4, p. 215 - 224, 1967.

DOBRANIĆ, T.; SAMARDŽIJA, M.; CERGOLJ, M.; PRVANOVIĆ, N. Determination of membrane integrity on dogs sperm. **Veterinarski Arhiv**, v. 75, p. 23 - 30, 2005.

DONNELLY, E.T.; McCLURE, N.; LEWIS, S.E.M. The effect of ascorbate and – tocopherol supplementation in vitro on DNA integrity and hydrogen peroxide-induced DNA damage in human spermatozoa. **Environmental Mutagenesis Society**, v. 14, n. 5, p. 505 - 511, 1999.

FLESCHE, F.M.; GADELLA, B.M. Dynamics of the mammalian sperm plasma membrane in the process of fertilization. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1469, p. 197 - 235, 2000.

FOOTE, R.H. Fertility estimation: a review of past experience and future prospects. **Animal Reproduction Science**, v.75, p.119 - 139, 2003.

FOROUZANFAR, M.; SHARAFI, M.; HOSSEINI, S.M.; OSTADHOSSEINI, S.; HAJIAN, M.; HOSSEINI, L.; ABEDI P.; NILI, N.; RAHMANI, H.R.; NASR-ESFAHANI, M.H.; In vitro comparison of egg yolk-based and soybean lecithin-based extenders for cryopreservation of ram semen. **Theriogenology**, v. 73, p. 480 - 487, 2010.

FUKUI, Y.; KOHNO, H.; TOGARI, T.; HIWASA, M.; OKABE, K. Fertility after artificial insemination using a soybean-based extender in sheep. **Journal of Reproduction and Development**, v. 54, p. 286 - 289, 2008.

FUTINO, D.O.; MENDES, M.C.D.; MATOS, W.N.L.; MONDADORI, R.G.; LUCCI, C.M. Glycerol, Methyl-Formamide and Dimethyl-Formamide in Canine Semen Cryopreservation. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 45, p. 214 - 220, 2010.

GADELLA, B.M.; RATHI, R.; BROUWERS, J.F.H.M.; STOUT, T.A.E.; COLENBRANDER, B. Capacitation and the acrossome reaction in equine sperm. **Animal Reproduction Science**, v. 68, p. 249 - 265, 2001.

GADEA, J.; GUMBAO, D.; GÓMEZ-GIMÉNEZ, B.; GARDÓN, J. C. Supplementation of the thawing medium with reduced glutathione improves function of frozen-thawed goat spermatozoa. **Reproductive biology**, v. 13, n. 1, p. 24 - 33, 2013.

GANDINI, L.; LOMBARDO, F.; PAOLI, D.; CAPONECCHIA, L.; FAMILIARI, G.; VERLENGIA, C.; DONDERO, F.; LENZI, A. Study of apoptotic DNA fragmentation in human spermatozoa. **Human Reproduction**, v.15 n.4, p.830 - 839, 2000.

HENRY, M.; NEVES, J.P; JOBIM, M.I.M. **Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal**. 3<sup>a</sup> ed. Belo Horizonte: Colégio Brasileiro de Reprodução Animal, 2013, 104p.

HU, J.H.; TIAN, W.Q.; ZHAO, X.L.; ZAN, L.S.; WANG, H.; LI, Q.W.; XIN, Y.P. The cryoprotective effects of ascorbic acid supplementation on bovine semen quality. **Animal Reproduction Science**, 121, 72 - 77, 2010.

JEYENDRAN, R.S.; VAN DER VEN, H.H., PEREZ-PELAEZ, M.; CRABO, B.G.; ZANEVELD, L.J.D. Development of an assay to assess the functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to other semen characteristics. **Journal Reproduction Fertility**, v. 70, p. 219 - 228, 1984.

JUAN, M.E.; GONZÁLES-PONS, E.; MUNUERA, T.; BALLESTER, J.; RODRÍGUEZ-GIL, J.E.; PLANAS, J.M. Trans-resveratrol, a natural antioxidant from grapes, increases sperm output in health rats. **J Nutri**, v. 135, p. 757 - 60, 2005.

KHERADMAND, A.; BABAEI, H.; ABSHNAS, J. Comparative evaluation of the effect of antioxidants on the chilled stored ram semen. **Iranian Journal of Veterinary Research**, v. 7, p. 40 - 45, 2006.

KONYALI, C.; TOMÁS, C.; BLANCH, E.; GÓMEZ, E.A; GRAHAM, J.K; MOCE, E. Optimizing conditions for treating goat semen with cholesterol-loaded cyclodextrins prior to freezing to improve cryosurvival. **Cryobiology**, v 67, n. 2, p. 124 - 131, 2013.

KÜÇÜK, N.; AKSOY, M.; UÇAN, U.; AHMAD, E.; NASEER, Z.; CEYLAN, A.; SERIN, I. Comparison of two different cryopreservation protocols for freezing goat semen. **Cryobiology**, v. 68, p. 327 - 331, 2014.

KULAKSIZ, R.; CEBI, Ç.; AKÇAY, E.; DASKIN, A. O efeito protetor da gema de ovo de diferentes espécies de aves durante a criopreservação de sêmen ovino Karayaka. **Small Ruminant Research**, v. 88, n. 1, p. 12 - 15, 2010.

LADHA, S. Lipid Heterogeneity and Membrane Fluidity in a Highly Polarized Cell, the Mammalian Spermatozoon. **The Journal of Membrane Biology**, v. 165, p. 1 - 10, 1998.

LA FALCI, V.S.N.; YRJO-KOSKINEN, A.E.; FAZELI, A.; HOLT, W.V.; WATSON, P. F. Antioxidant combinations are no more beneficial than individual components in combating ram sperm oxidative stress during storage at 5° C. **Animal Reproduction Science**, v. 129, p. 180 - 187, 2011.

LEBOEUF, B.; RESTALL, B.; SALAMON, S. Production and storage of goat semen for artificial insemination. **Animal Reproduction Science**, v. 62, p. 113 - 141, 2000.

LEITE, T.G.; VALE-FILHO, V.R.; ARRUDA, R.P.; ANDRADE, A.F.C.; EMERICK, L.L.; ZAFFALON, F.G.; MARTINS, J.A.M.; ANDRADE, V.J. y. Effects of extender and equilibration time on post-thaw motility and membrane integrity of cryopreserved Gyr bull semen evaluated by CASA and flow cytometry. **Animal Reproduction Science**, v. 120, p. 31 - 38, 2010.

LESSARD, C.; SIQUEIRA, L.G.; D'AMOURS, O.; SULLIVAN, R.; LECLERC, P.; PALMER, C. Infertility in a beef bull due to a failure in the capacitation process. **Theriogenology**, v. 76, p. 891 - 899, 2011.

LIU, Z.; ZHANG, L.P.; MA, H-J.; WANG, C.; LI, M.; WANG, Q-S. Resveratrol reduces intracellular free calcium concentration in rat ventricular myocytes. **Acta Physiol Sin**, v. 57, p. 599 - 604, 2005.

MANSOUR, M. M. Modification of Hypo-Osmotic Swelling Test to Evaluate the Integrity of Stallion Sperm Plasma Membrane. **Global Veterinaria**, v. 3, n. 4, p. 302 - 307, 2009.

MARIN, S.; CHIANG, K.; BASSILIAN, S.; LEE, W.N.; BOROS, L.G; FERNANDEZ-NOVELL, J.M; CENTELLES, J.J.; MEDRANO, A.; RODRIGUEZ-GIL, J.E.; CASCANTE, M. Metabolic strategy of boar spermatozoa revealed by a metabolomic characterization. **Federation of European Biochemical Societies**, v. 554, p. 342 - 346, 2003.

MARTI, E.; MARA, L.; MARTI, J. I.; MUIÑO-BLANCO, T.; CEBRIAN-PÉREZ, J. A. Seasonal variations in antioxidant enzyme activity in ram seminal plasma. **Theriogenology**, v. 67, p. 1446 - 1454, 2007.

MARTÍNEZ-PÁRAMO, S.; DIOGO, P.; DINIS, M.T.; HERRÁEZ, M.P.; SARASQUETE, C.; CABRITA, E. Incorporation of ascorbic acid and  $\alpha$ -tocopherol to the extender media to enhance antioxidant system of cryopreserved sea bass sperm. **Theriogenology**, v. 77, p. 1129 - 1136, 2012.

MAXWELL, W.M.C.; WATSON, P.F. Recent progress in the preservation of ram semen. **Animal Reproduction Science**, v. 42, p. 55 - 65, 1996.

MEDEIROS, C.M.O.; FORELL, F.; OLIVEIRA, A.T.D.; RODRIGUES, J.L. Current Status of Sperm Cryopreservation: Why isn't it Better? **Theriogenology**, v. 57, p. 327 - 344, 2002.

MELO, M.I.V.; HENRY, M.; BEKER, A.R.C.L. Teste hiposmótico para avaliação da viabilidade do sêmen eqüino resfriado com diferentes diluidores. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 57, n. 6, p. 757 - 763, 2005.

MEMON, A.A.; WAHID, H.; ROSNINA, Y.; GOH, Y.M.; EBRAHIMI, M.; NADIA, F. M.; AUDREY, G. Effect of butylated hydroxytoluene on cryopreservation of Boer goat semen in Tris egg yolk extender. **Animal Reproduction Science**, v. 129, p. 44 - 49, 2011.

MEMON, A.A.; WAHID, H.; ROSNINA, Y.; GOH, Y.M.; EBRAHIMI, M.; NADIA, F.M. Effect of antioxidants on post thaw microscopic, oxidative stress parameter and fertility of Boer goat spermatozoa in Tris egg yolk glycerol extender, **Animal Reproduction Science**, v. 136, p. 55–60, 2012.

MOCÉ, E.; GRAHAM, J.K. In vitro evaluation of sperm quality. **Animal Reproduction Science**, v. 105, p. 104 - 118, 2008.

MOUSTACAS, V.S.; XAVIER, M.N.; CARVALHO-JÚNIOR, C.A.; COSTA, E.A.; HENRY, M.; SANTOS, R.L. Effect of extender supplementation with various antimicrobial agents on viability of *Brucella ovis* and *Actinobacillus seminis* in cryopreserved ovine semen, **Theriogenology**, v. 74, p. 1476 - 1481, 2010.

MORETTI, E.; MAZZI, L.; TERZUOLI, G.; BONECHI, C.; ACOPONI, I.F.; MARTINI, S.; ROSSI, C.; COLLODEL, G. Effect of quercetin, rutin, naringenin and epicatechin on lipid peroxidation induced in human sperm. **Reproductive Toxicology**, v. 34, p. 651 - 657, 2012.

MUKAI, C.; OKUNO, M. Glycolysis plays a major role for adenosine triphosphate supplementation in mouse sperm flagellar movement. **Biology of Reproduction**, v. 71, p. 540 - 547, 2004.

MUIÑO, R.; RIVERA, M.M.; RIGAU, T.; RODRIGUEZ-GIL, J.E.; PENA, A.I. Effect of different thawing rates on post-thaw sperm viability, kinematic parameters and

motile sperm subpopulations structure of bull semen. **Animal Reproduction Science**, v. 109, p. 50 - 64, 2008.

NAIJIAN, H.R.; KOHRAM, H.; SHAHNEH, A.Z.; SHARAFI, M. Effects of various concentrations of BSA on microscopic and oxidative parameters of Mahabadi goat semen following the freeze–thaw process. **Small Ruminant Research**, v. 113, p. 371 - 375, 2013.

NEILD, D.; CHAVES, G.; FLORES, M.; MORA, N.; BECONI, M.; AGIIERO, A. Hypoosmotic Test in Equine Spermatozoa. **Theriogenology**, v. 51, p. 721 - 727, 1999.

NIE, G.J.; WENZEL, J.G.W. Adaptation of the hypoosmotic test to assess functional integrity of stallion spermatozoal plasma membranes. **Theriogenology**, v. 55, p. 1005 - 1018, 2001.

O'FLAHERTY, C.; BEORLEGUI, N.; BECONI, M.T. Participation of superoxide anion in the capacitation of cryopreserved bovine sperm. **International Journal of Andrology**, v. 26, p. 109 - 114, 2003.

OLIVEIRA, I.R.S.; ALVES, H.M.; CASTELO, T.S.; BEZERRA, F.S.B.; BEZERRA, A.C.D.; SILVA, A.R. Correlações entre o teste hiposmótico e a avaliação clássica do sêmen de caprinos. **Ciência Animal Brasileira**, v. 14, n. 2, p. 216 - 221, 2013.

OURIQUE, G.M.; FINAMOT, I.A.; SACCOL, E.M.H.; RIFFEL, A.P.K.; PES, T.S.; UTIERREZ, K.; GONCALVES, P.B.D.; BAIDISSEROTTO, B.; PAVANATO, M.A. BARRETO, K.P. Resveratrol improves sperm motility, prevents lipid peroxidation and enhances antioxidant defences in the testes of hyperthyroid rats. **Reprod Toxicol**, v. 27, p. 31 - 39, 2013.

PAPADOPOULOS, S.; HANRAHAN, J.P.; DONOVAN, A.; DUFFY, P.; BOLAND, M.P.; LONERGAN, P. In vitro fertilization as a predictor of fertility from cervical insemination in sheep. **Theriogenology**, v. 63, p. 150 - 159, 2005.

PEIXOTO, A.L.V.A.; MONTEIRO Jr, P.L.J.; CÂMARA, D.R.; VALENÇA, R.M.B.; SILVA, K.M.G.; GUERRA, M.M.P. Efeito do tempo de incubação pós-descongelamento sobre a viabilidade de espermatozoides ovinos criopreservados com tris-gema suplementado com vitamina C e Trolox. **Ciência Veterinária nos Trópicos**, v.11, n.1, p.16 - 24, 2008.

PÉREZ, L.J.; VALCARCEL, A.; HERAS, M.A.L.; BALDASSARRE, H. Comparative study of four techniques for evaluation of sperm quality in ovine and bovine frozen-thawed samples. **Reproduction in Domestic Animals**, V. 32, p. 157 - 160, 1997.

PÉREZ-LLANO, B.; LORENZO, J.L.; YENES, P.; TREJO, A.; GARCIA-CASADO, P.A. A short hypoosmotic swelling test for the prediction of boar sperm fertility. **Theriogenology**, v. 56, p. 387 - 398, 2001.

PERIS, S.I.; BILODEAU, J.F.; DUFOUR, M. Impact of Cryopreservation and reactive oxygen species on DNA integrity, lipid peroxidation, and functional

parameters in ram sperm. **Molecular Reproduction and Development**, 74, 878 - 892, 2007.

POLGE, C.; SMITH, A.U.; PARKES, A.S. Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures. **Nature**, v.164, p. 666, 1949.

POPE, C.E.; ZHANG, Y.Z.; DRESSER, B.L. A simple staining method for valuating acrosomal status of cat spermatozoa. **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, v. 22, n. 1, p. 87 - 95, 1991.

PRICE, S.; AURICH, J.; DAVIES-MOREL, M.; AURICH, C. Effects of oxygen exposure and Gentamicin Stallion semen stored at 5 and 15 °C. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 43, p. 261 - 266, 2008.

PURDY, P.H. The post-thaw quality of ram sperm held for 0 to 48 h at 5°C prior to cryopreservation. **Animal Reproduction Science**, v. 93, p. 114 - 123, 2006.

QUINTERO-MORENO, A.; RIGAU, T.; RODRIGUEZ-GIL, J.E. Regression analyses and motile sperm subpopulation structure study as improving tools in boar semen quality analysis. **Theriogenology**, v. 61, p. 673 - 690, 2004.

RASUL, Z.; AHMAD, N.; ANZAR, M. Changes in Motion Characteristics, Plasma Membrane Integrity, and Acrosome Morphology During Cryopreservation of Buffalo Spermatozoa. **Journal of Andrology**, v. 22, n. 2, p. 278 - 283, 2001.

RIVLIN, J.; MENDEL, J.; RUBINSTEIN, S.; ETKOVITZ, N.; BREITBART, H. Role of hydrogen peroxide in sperm capacitation and acrosome reaction. **Biol. Reprod.**, Nova York, v. 70, p. 518 - 522 , 2004.

RODRIGUES, M.A.M.; SOUZA, C.E.A.; MARTINS, J.A.M.; REGO, J.P.; OLIVEIRA, J.T.A.; DOMONT, G.B.; NOGUEIRA, F.C.; MOURA, A.A. Seminal plasma proteins and their relationship with sperm motility in Santa Ines rams. **Small Ruminant Research**, v. 109, p. 94 - 100, 2013.

RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Can we increase the estimated value of semen assessment? **Reproduction in Domestic Animals**, v. 41 (Suppl 2), p. 2 - 10, 2006.

RODRIGUEZ-MARTINEZ, H.; Role of the oviduct in sperm capacitation. **Theriogenology**, v. 68, p. 138 - 146, 2007.

ROY, A. Egg yolk coagulating enzyme in the semen and Cowper's gland of goat. **Nature**, v. 159, p. 318 - 319, 1957.

ROTA, A.; PENZO, N.; VINCENTI, L.; MANTOVANI, R. Hypoosmotic swelling (HOS) as a screening assay for testing in vitro fertility of bovine spermatozoa. **Theriogenology**, v. 53, p.1415 - 1420, 2000.

SAADI, S.H.A.; RIEMSDIJK, V.E.; DANCE, A.L.; RAJAMANICKAM, G.D.; KASTELIC, J.P.; THUNDATHIL, J.C. Proteins associated with critical sperm

functions and sperm head shape are differentially expressed in morphologically abnormal bovine sperm induced by scrotal insulation. **Journal of Proteomics**, vol. 26, n. 82, p. 64 - 80, 2013.

SALMANI, H.; TOWHIDI, A.; ZHANDI, M.; BAHREINI, M.; SHARAFI, M. In vitro assessment of soybean lecithin and egg yolk based diluents for cryopreservation of goat semen. **Cryobiology**, v. 68, p. 276 - 280, 2014.

SALVIANO, M.B.; SOUZA, J.A.T. Avaliação andrológica e tecnologia do sêmen caprino. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 32, n. 3, p. 159 - 167, 2008.

SALAMON, S.; MAXWELL, W.M.C. Storage of ram semen. **Animal Reproduction Science**, v. 62, p. 77 - 111, 2000.

SANTOS, A. D. F.; TORRES, C. A. A.; FONSECA, J. F.; BORGES, Á. M.; GUIMARÃES, J. D.; DA COSTA, E. P.; ROVAY, H. Uso de testes complementares para avaliação do congelamento do sêmen de bodes submetidos ao manejo de fotoperíodo artificial. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 35, n.5, p. 1934 - 1942, 2006.

SARLÓS, P.; MOLNÁR, A.; KÓKAI, M.; GÁBOR, G.; RÁTKY, J. Comparative evaluation of the effect of antioxidants in the conservation of ram semen. **Acta Veterinaria Hungarica**, v. 50, p. 235 - 245, 2002.

SCHOBBER, D.; AURICH, C.; NOHL, H.; GILLE, L. Influence of cryopreservation on mitochondrial functions in equine spermatozoa. **Theriogenology**, v. 68, p. 745 - 754, 2007.

SCHÜRMAN, A.; AXER, H.; SCHEEPERS, A.; DOEGE, H.; JOOST, H.G. The glucose transport facilitator GLUT8 is predominantly associated with the acrosomal region of mature spermatozoa. **Cell Tissue Res**, v. 307, p. 237 - 242, 2002.

SICHERLE, C.C.; MAIA, M.S.; BICUDO, S.D.; RODELLO, L.; GALLEGU, I.C. Lipid peroxidation and generation of hydrogen peroxide in frozen-thawed ram semen supplemented with catalase or Trolox. **Small Ruminant Research**, v. 95, p. 144 - 149, 2011.

SILVA, P.F.N.; GADELLA, B.M. Detection of damage in mammalian sperm cells. **Theriogenology**, v. 65, p. 958 - 978, 2006.

SILVA, E.C.B.; CAJUEIRO, J.F.P.; SILVA, S.V.; SOARES, P.C.; GUERRA, M.M.P. Effect of antioxidants resveratrol and quercetin on in vitro viability of frozen ram sperm. **Theriogenology**, v. 77, p. 1722 - 1726, 2012.

SINGER, S.J.; NICHOLSON, G.L. The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. **Science**, v. 175, p. 720 - 731, 1972.

SIQUEIRA, J.B.; GUIMARÃES, J.D.; COSTA, E.P.; HENRY, M.; TORRES, C.A.A.; SILVA, M.V.G.B.; SILVEIRA, T.S. Relação da taxa de gestação com sêmen bovino congelado e testes de avaliação espermática *in vitro*. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 36, n.2, p. 387 - 395, 2007.

SOUSA, B. P. A.; ANDRADE, J. C. O.; WISCHRAL, A.; GUERRA, M. M. P. Viabilidade *in vitro* de células espermáticas ovinas submetidas a diferentes diluentes e a refrigeração. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 62, n. 3, p. 528 - 535, 2010.

STOJANOVIĆ, S.; SPRINZ, H.; BREDE, O. Efficiency and mechanism of the antioxidant action of trans-resveratrol and its analogues in the radical liposome oxidation. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 391, n. 1, p. 79 - 89, 2001.

TELHADO, D.J.; BOWLEY, S.; PREÇO, L.L.; MATSAS, D.J. Comparison of two commercial extenders for cryopreservation of goat semen without sperm washing. **Theriogenology**, v. 77, p. 412 - 420, 2012.

TRALDI, A.S. **Tópicos em reprodução e inseminação artificial em caprinos**. In: Manual Técnico. São Paulo, 1994. 54p.

TSAKMAKIDIS, I.A. Ram semen evaluation: Development and efficiency of modern techniques. **Small Ruminant Research**, v. 92, p. 126 - 130, 2010.

TUNCER, P.B.; TAŞDEMİR, U.; BÜYÜKLEBLEBICI, S.; ÖZGÜRTAŞ, T.; COŞKUN, E.; EROL, H.; AYDIN, F.N.; GÜRÇAN, İ.S. Effects of different doses of trehalose supplementation in egg yolk extender in frozen-thawed Angora buck semen. **Small Ruminant Research**, v. 113, n. 2, p. 383 - 389, 2013.

VALENÇA, R.M.B; GUERRA, M.M.P. Espécies Reativas ao Oxigênio (ROS) e a utilização de antioxidantes na criopreservação do sêmen suíno. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 31, p. 47 - 53, 2007.

VÁSQUEZ, J.; FLORENTINI, E.A.; CAMARGO, L.A.; GONZALES, J.; VALDIVIA, M. Hypoosmotic swelling test in epididymal ram (*Ovis aries*) spermatozoa. **Livestock Science**, v. 157, p. 618 - 622, 2013.

VERSTEGEN, J.; IGUER OUADA, M.; ONCLIN, K. Computer assisted semen analyzers in andrology research and veterinary practice. **Theriogenology**, v. 57, p. 149 - 179, 2002.

VIDAL, A.H.; BATISTA, A.M.; DA SILVA, E.C.B.; GOMES, W.A.; PELINCA, M.A.; SILVA, S.V.; GUERRA, M.M.P. Soybean lecithin-based extender as an alternative for goat sperm cryopreservation. **Small Ruminant Research**, v. 109, p. 47 - 51, 2013.

WATSON, P.F. The roles of lipid and protein in the protection of ram spermatozoa at 5°C by egg-yolk lipoprotein. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 62, p. 483 - 492, 1981.

WATSON, P.F. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. **Animal Reproduction Science**, v. 60 - 61, p. 481 - 492, 2000.

YAN, Y.; YANG, J-Y.; MOU, Y-H.; WANG, L-H.; ZHOU, Y-N.; WU, C-F. Differences in the activities of resveratrol and ascorbic acid in protection of ethanol-induced oxidative DNA damage in human peripheral lymphocytes. **Food and Chemical Toxicology**, v. 50, p. 168 - 174, 2012.

## CAPÍTULO 1

### ÁCIDO ASCÓRBICO NO DILUIDOR PARA CRIOPRESERVAÇÃO DE SÊMEN CAPRINO<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Artigo a ser submetido ao comitê editorial do periódico científico Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia.

## Ácido ascórbico no diluidor para criopreservação de sêmen caprino

*Ascorbic acid in extender for cryopreservation of goat semen*

Lindomar Sousa Brito<sup>1,\*</sup>, Larissa Pires Barbosa<sup>1</sup>, Alexandre Moraes Pinheiro<sup>1</sup>, William Moraes Machado<sup>1</sup>, Reuber de Carvalho Cardoso<sup>1</sup>, Ronival Dias Lima de Jesus<sup>1</sup>, Caline Santana da França<sup>1</sup>, Max Vitoria Resende<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Cruz das Almas – Bahia.

<sup>2</sup>Universidade Salvador - UNIFACS, Salvador – Bahia.

\*Autor para correspondência. E-mail: lindomar.britto@gmail.com

### RESUMO

Objetivou-se determinar o melhor nível de inclusão de ácido ascórbico em meio diluidor TRIS-Gema para criopreservação de sêmen caprino. Foram coletados, por meio de vagina artificial, cinco ejaculados de três bodes da raça Anglo Nubiana, com dois a três anos de idade, com condição corporal média igual a  $3 \pm 0,3$ , clinicamente saudáveis, aptos para reprodução. O sêmen de cada animal foi dividido em quatro alíquotas de 200  $\mu$ L, compondo quatro tratamentos: sem adição de ácido ascórbico no diluidor TRIS-Gema (controle) e com 0,0528; 0,1056 e 0,1584 mg/mL de ácido ascórbico no diluidor TRIS-Gema. Foram avaliadas as características físicas (motilidade espermática progressiva e vigor espermático) do sêmen imediatamente após coleta, pós-diluição, pós-resfriamento e descongelamento. Após o descongelamento, as amostras seminais foram incubadas e avaliadas quanto à integridade de membrana (HOST), integridade acrossomal e pelo teste de termorresistência lento (TTR). Os dados foram submetidos à Análise de Regressão a 5% de probabilidade. Não houve diferença para a motilidade progressiva e vigor espermático na pós-diluição, pós-resfriamento e pós-descongelamento, assim como para os testes complementares HOST e TTR no pós-descongelamento ( $P > 0,05$ ). Houve comportamento quadrático com a inclusão do ácido ascórbico para integridade acrossomal (61,58%), com nível ótimo de 0,1006 mg/mL de ácido ascórbico ( $P < 0,05$ ). A inclusão de ácido ascórbico foi eficaz na manutenção da viabilidade

espermática, em especial, a integridade acrossomal durante o processo de criopreservação até o nível de 0,1006mg/mL, podendo ser uma alternativa na composição dos diluidores seminais de caprinos.

**Palavras-chave:** Antioxidantes, espermatozoide, estresse oxidativo, TRIS-gema.

## ABSTRACT

This study aimed to determine the optimal inclusion level of ascorbic acid in TRIS extenders-egg yolk for cryopreservation of goat semen. Were collected by artificial vagina, five ejaculates of three Anglo Nubian goats, with two to three years of age, with average body condition equal to  $3\pm 0.3$ , clinically healthy, fit to reproduction. Semen from each animal was divided into four aliquots of 200 $\mu$ L, composing four treatments: no addition of ascorbic acid in TRIS-egg yolk (control) and 0.0528; 0.1056 and 0.1584mg/mL of ascorbic acid in TRIS-egg yolk. Physical semen characteristics (sperm progressive motility and sperm vigor) were evaluated immediately after collection, after dilution, cooling and thawing. After thawing, the semen samples were incubated and evaluated for membrane integrity (HOST) and acrosome and slow thermoresistance (TTR). Data were subjected to regression analysis at 5% probability. There was no difference for progressive motility and sperm vigor in post-dilution, post-cooling and after thawing, as well as additional tests HOST and TTR in post-thaw ( $P>0.05$ ). There was a quadratic effect with the addition of ascorbic acid to the acrosome integrity parameter, presenting a great maximum level of 0.1006mg/mL ascorbic acid for acrosome integrity of 61.58% ( $P<0.05$ ). The addition of ascorbic acid were effective in maintaining sperm viability, in particular, acrosome integrity during the cryopreservation process until the level of 0.1006mg/mL, may be an alternative composition of seminal extenders goats.

**Keywords:** Antioxidants, sperm, oxidative stress, TRIS-egg yolk

## INTRODUÇÃO

A criopreservação de sêmen caprino é uma área da reprodução animal que viabiliza o uso da inseminação artificial (IA) como uma biotécnica muito importante nos programas de melhoramento genético. Em contrapartida, a resposta dos espermatozoides durante a criopreservação varia entre machos da mesma espécie, assim como em diferentes espécies. Em geral, os espermatozoides de pequenos ruminantes, são mais sensíveis à criopreservação em comparação com outras espécies (Küçük *et al.*, 2014).

Além disso, o choque térmico é normalmente associado ao estresse oxidativo devido à geração de espécies reativas ao oxigênio (ROS), pelos espermatozoides mortos e oxigênio atmosférico, de modo que há um desequilíbrio entre o efeito protetor antioxidante e a produção de ROS, os quais estão envolvidos com os danos causados à membrana plasmática e ao DNA espermático (Bucak *et al.*, 2009). Embora, as ROS em baixo nível tenha funções essenciais, como a capacitação e reação acrossômica (Peris *et al.*, 2007), o plasma seminal dispõe de antioxidantes enzimáticos tais como a superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathiona peroxidase (GSH-Px). No entanto, esta capacidade antioxidante pode ser insuficiente e afetar a congelabilidade seminal (Hu *et al.*, 2010).

Nesse aspecto, o uso de meios diluidores, associados ou não a substâncias antioxidantes, durante o processamento do sêmen, tem como finalidade principal prolongar o período de armazenamento do sêmen, preservar a motilidade e integridade acrossomal, reduzir o grau de danos celulares, bem como aumentar o volume e disponibilizar fontes de energia para a célula, de forma que preserve a viabilidade e capacidade de fertilização dos espermatozoides (Sarlós *et al.*, 2002; Maia *et al.*, 2010; Vidal *et al.*, 2013).

Existe forte evidência de que o uso de antioxidantes no diluidor seminal melhora efetivamente a eficácia contra o dano peroxidativo, visto que o aumento da geração de ROS diminuiu as defesas antioxidantes. Nesse sentido, pesquisadores têm testado diversas substâncias antioxidantes no diluidor

seminal, tais como o ácido ascórbico, estudado em várias espécies, incluindo ovinos (Kheradmand *et al.*, 2006; Peixoto *et al.*, 2008), caprinos (Castilho *et al.*, 2009; Memon *et al.*, 2012), bovinos (Hu *et al.*, 2010; Asadpour *et al.*, 2011).

Desse modo, objetivou-se determinar o melhor nível de inclusão de ácido ascórbico no meio diluidor TRIS-Gema para criopreservação de sêmen caprino.

## MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido no Setor de Caprinocultura do Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, localizada na cidade de Cruz das Almas-BA, no paralelo de 12°39'54", latitude Sul e meridiano de 39°04'44", longitude Oeste, no período entre fevereiro e março de 2014. O município está localizado a uma altitude de 225,87m, em região de clima subúmido do tipo Am, segundo a tipologia climática de Köppen, com precipitação e temperatura anual média de 1.200mm e 24,5°C, respectivamente (Estação Agrometeorológica da Embrapa Mandioca e Fruticultura/INMET, 2014). O projeto de pesquisa foi submetido à avaliação do comitê de ética da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia sendo aprovado com o número do processo 23007.005461/2014-18.

Foram utilizados três bodes adultos da raça Anglo Nubiana, entre dois e três anos de idade, com condição corporal média igual a  $3 \pm 0,3$  (Escala de 1 a 5), segundo a metodologia de Cezar e Sousa (2006), clinicamente sadios, aptos para reprodução, segundo o preconizado pelo Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA, 2013). Os animais foram mantidos em regime semi-intensivo de produção, com acesso à pastagem de *Brachiaria (Brachiaria decumbens)*, suplementado com concentrado protéico (800g/animal/dia - Nutrividas®), sal mineral e água *ad libitum*.

As coletas de sêmen foram realizadas na frequência de duas vezes por semana, pelo método de vagina artificial, na presença de uma cabra em estro como manequim, totalizando cinco coletas viáveis por animal. Após as coletas os

ejaculados foram encaminhados ao laboratório e acondicionados em banho-maria a 32°C e submetidos ao exame, quanto aos aspectos físicos e morfológicos.

Avaliou-se o volume do ejaculado (mL); aspecto seminal; turbilhonamento (0 a 5), vigor espermático (0 a 5); motilidade espermática progressiva (0 a 100%) e concentração espermática (milhões de espermatozoides por mL), determinada em câmara de Neubauer (diluição 1:400 em formol salina tamponada).

Uma alíquota de 10µL foi utilizada para avaliação da morfologia espermática pelo método de câmara úmida, e, foram contadas 200 células espermáticas no total em microscopia de contraste de fase. Apenas as amostras que atenderam ao padrão mínimo preconizado pelo CBRA (2013), que para caprinos a percentagem referencia para espermatozoides normais é, em média, maior ou igual a 80%, foram encaminhadas à criopreservação. Após análise, o ejaculado de cada animal foi dividido em quatro alíquotas de 200µL e diluído em meio diluidor TRIS – Gema (Resende e Weitze, 1987), compondo quatro tratamentos, sem adição de ácido ascórbico no diluidor TRIS-Gema (controle) e com 0,0528; 0,1056 e 0,1584mg/mL de ácido ascórbico, concentrações, determinada segundo a metodologia proposta por Peixoto *et al.* (2008).

Após a diluição, realizou-se o processo de criopreservação, composto de duas etapas, sendo a primeira etapa à curva positiva, onde os tubos contendo o sêmen de todos os tratamentos foram colocados em canecas de alumínio, contendo 300mL de água a 32°C e submetidos a uma curva de resfriamento de -0,2°C/min em um sistema de refrigeração, composto por uma caixa térmica (Figura 1), com as seguintes dimensões: 360mm x 265mm x 240mm de comprimento, largura e altura, respectivamente, preenchida por cubos de gelo para atingirem o equilíbrio a 5°C, durante 3 horas. Enquanto que a segunda etapa referente à curva negativa, em duas fases, sendo que na primeira às palhetas (0,25 mL), seladas com massa de modelar atóxica, ficaram em vapor de nitrogênio durante 15 minutos, e, a segunda, as palhetas foram imersas em nitrogênio líquido, e em seguida colocadas em raques devidamente identificadas e armazenadas em botijão criogênico a -196°C.



Fig. 1. Caixa térmica utilizada durante a etapa de resfriamento do sêmen.

Antes e após a curva de resfriamento, a motilidade espermática progressiva e o vigor espermático de cada grupo foram avaliados. Após a criopreservação duas palhetas de cada tratamento foram descongeladas em banho-maria (37°C, 30 segundos) e submetidas à avaliação, quanto às características de motilidade espermática progressiva, vigor espermático e teste de termorresistência lento (TTR); teste hiposmótico (HOST) e integridade acrossomal (POPE). Todas as avaliações seguiram as recomendações do CBRA (2013), Bittencourt *et al.* (2005), Pope *et al.* (1991), respectivamente.

A integridade da membrana plasmática foi avaliada utilizando-se o HOST. Assim, 30µL foram coletados de cada grupo congelado e colocados em microtubos de polipropileno de 1,5mL contendo 300µL de solução hiposmótica, composta por frutose (0,9g), citrato de sódio (0,49g) e água destilada (100mL), previamente aquecida por 5 minutos em banho-maria a 37°C (Revell e Mrode,

1994; Rota *et al.*, 2000). Após adição as amostras foram mantidas em banho-maria a 37°C durante uma hora. Em seguida uma gota da fração sêmen/solução foi colocada entre lâmina e lamínula para contagem de 100 espermatozoides em microscopia de contraste de fase com um aumento de 40 vezes.

As células foram classificadas quanto à presença ou não de cauda dobrada ou enrolada e o resultado foi determinado em percentagem, efetuando-se o cálculo pela fórmula: HIPO (%) = (% de alterações na região da cauda após teste HIPO) – (% de alterações na região da cauda dos espermatozoides antes do teste HIPO) (Revell e Mrode, 1994).

Uma palheta de cada tratamento foi descongelada e submetida ao TTR. Assim, 200µL foram coletados de cada tratamento e transferidos para microtubos de polipropileno de 1,5mL e então permaneceram em banho-maria a 37°C durante duas horas, de modo que, nos tempos 0; 5; 30; 60 e 120 minutos, foram avaliados a motilidade progressiva e o vigor espermático por meio de microscopia de contraste de fase, segundo o estabelecido pelo CBRA (2013).

Com o intuito de avaliar os possíveis danos causados a membrana acrossomal durante o processo de criopreservação, utilizou-se o método da coloração simples de Pope, que é composta do corante *Fast Green* e do Rosa Bengala, proposta por Pope *et al.* (1991). Para tal, uma alíquota de 10µL de sêmen de cada tratamento foi adicionada em 10µL do corante simples de Pope e incubada por 70 segundos. Em seguida, foram feitos esfregaços em lâminas de microscopia, com auxílio de uma lamínula e avaliado em microscópio de luz (1.000 vezes) com contraste de fase. Foram contadas 100 células por lâmina e classificadas como: Acrossomo íntegro: região acrossomal de coloração lilás, levemente mais escura que a região pós-acrossomal; Acrossomo não íntegro: região acrossomal de coloração rosa, levemente mais clara que a região pós-acrossomal.

O delineamento experimental utilizado foi o Inteiramente Casualizado, com quatro tratamentos e quinze repetições. Para análise estatística dos resultados utilizou-se o comando PROC GLM (do programa estatístico SAS 9.1®), adotando-

se o nível de significância de 5%. Contrastes polinomiais foram utilizados para se determinar o efeito linear e quadrático dos tratamentos.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Não houve diferença ( $P>0,05$ ) entre os tratamentos quanto à motilidade espermática progressiva e vigor espermático do sêmen pós-diluição, pós-resfriamento e pós-descongelamento (Tab. 1). Para todas as características estudadas, os valores encontravam-se acima dos limites mínimos preconizados pelo CBRA (2013), sendo recomendando para motilidade progressiva maior ou igual a 30% e vigor espermático maior ou igual a dois no pós-congelamento, fato que demonstra a manutenção da viabilidade espermática mesmo na ausência de ácido ascórbico.

Tab. 1. Motilidade espermática progressiva e vigor espermático pós-diluição, pós-resfriamento e pós-descongelamento de sêmen diluído com meio acrescido de ácido ascórbico

Item	Níveis de inclusão (mg/mL)				EPM <sup>1</sup>	Significância	
	0	0,0528	0,1056	0,1584		Lin <sup>2</sup>	Quad <sup>3</sup>
Motilidade (%)							
Pós-Diluição	90,3	90,3	89,7	90,0	0,82	0,653	0,840
Pós-Resfriamento	84,3	82,0	83,0	84,3	0,02	0,895	0,279
Pós-Descongelamento	72,7	71,7	73,3	73,0	1,65	0,752	0,860
Vigor (0 a 5)							
Pós-Diluição	4,9	5,0	5,0	5,0	0,10	0,185	0,322
Pós-Resfriamento	4,6	4,6	4,6	4,7	1,87	0,551	0,739
Pós-Descongelamento	4,3	4,1	4,3	4,2	0,10	0,765	0,739

<sup>1</sup> Erro Padrão da Média (%), <sup>2</sup> Significância para efeito linear, <sup>3</sup> Significância para efeito quadrático. Os dados foram analisados por Regressão a 5% de probabilidade.

A inclusão de ácido ascórbico no meio diluidor até o nível de 0,1584mg/mL não melhorou a motilidade espermática progressiva e o vigor espermático acima dos valores do tratamento controle. Isso pode ser devido às concentrações de antioxidante utilizadas estarem abaixo das necessárias para manter o sistema antioxidativo eficiente e, por conseguinte, não melhorando o combate ao dano oxidativo.

Memon *et al.* (2012) reportaram que a adição de 8,5mg/mL de ácido ascórbico no diluidor seminal mostraram uma melhoria significativa na motilidade progressiva e mantiveram a viabilidade espermática do sêmen de caprinos criopreservados. Enquanto que em ovinos a inclusão de 0,1056mg/mL de ácido ascórbico no diluidor seminal Tris-Gema não resultaram em uma melhoria significativa na motilidade progressiva e vigor espermático do sêmen no pós-descongelamento (Peixoto *et al.*, 2008).

Não obstante, Hu *et al.* (2010) demonstraram que a inclusão de ácido ascórbico em até 4,5 mg/mL resultaram num aumento significativo da motilidade espermática progressiva, ao passo que concentrações mais elevada (até 8,5 mg/mL), conferiram numa taxa menor de motilidade dos espermatozoides de bovino. Resultados divergentes com o uso de antioxidantes são comuns, que por sua vez podem estar relacionados ao tipo de antioxidante, ao meio diluidor, à concentração do antioxidante, à espécie animal (Sikka, 2004; Satorre *et al.*, 2007), assim como, à formulação do diluidor, dentre outros fatores.

Não houve efeito da inclusão de ácido ascórbico no diluidor de sêmen caprino na integridade de membrana plasmática ( $P>0,05$ ) (Tab. 2). Baseado nos resultados médios de motilidade e vigor esperava-se haver uma maior proporção de células com membrana íntegra nos tratamentos com diluidor com ácido ascórbico. Este comportamento corrobora com o pressuposto de que as lesões da membrana podem não estar associadas à perda da motilidade espermática (Lin *et al.*, 1998). É possível inferir, a partir destas diferenças, que a cinética espermática não depende exclusivamente do transporte de elementos através da membrana, e sim de outros mecanismos bioquímicos.

Diante desse contexto, vale destacar a importância em avaliar a integridade da membrana espermática, visto que a criopreservação confere danos irreversíveis aos espermatozoides. Estas injúrias causadas aos espermatozóides se devem, principalmente, ao choque térmico, a exposição ao oxigênio durante a manipulação do sêmen, estresse osmótico, toxicidade dos crioprotetores, formação e dissolução dos cristais no ambiente extracelular (Watson, 2000).

Além disso, concentrações elevadas de ácido ascórbico pode alterar as características da membrana plasmática dos espermatozoides e reduzir a peroxidação lipídica (LPO) ao ponto de afetar a sua fluidez (Hu *et al.*, 2010). Por outro lado, a presença do antioxidante em baixas quantidades contribui para a produção fisiológica de ROS, que são essenciais para as alterações nas membranas no momento da capacitação (De Lamirande *et al.*, 1997).

Wright *et al.* (2014) afirmaram que a LPO ocorre quando as ligações duplas de ácidos graxos poli-insaturado são atacadas pelas ROS, criando um radical peróxido lipídico. Assim, há uma propagação para as moléculas de ácidos graxos vizinhas, reação em cadeia, causando sérios danos às membranas lipídicas (Mylonas e Kouretas, 1999).

Tab. 2. Integridade acrossomal e HOST de sêmen caprino criopreservado com diluidor acrescido de ácido ascórbico

Item	Níveis de inclusão (mg/mL)				EPM <sup>1</sup>	Significância	
	0	0,0528	0,1056	0,1584		Lin <sup>2</sup>	Quad <sup>3</sup>
HOST (%)	50,6	53,9	52,8	52,1	2,81	0,823	0,578
Int. Acrossomal (%)	50,0	60,2	60,4	58,3	3,51	0,053	0,034
Equações de regressão							
Int. Acrossomal	$*\hat{Y} = -1106x^2 + 222,54x + 50,383$ ( $R^2 = 0,9513$ )						

<sup>1</sup>Erro Padrão da Média (%), <sup>2</sup>Significância para efeito linear, <sup>3</sup>Significância para efeito quadrático. Os dados foram avaliados por meio de Regressão a 5% de probabilidade.

Houve efeito quadrático negativo com a inclusão do ácido ascórbico para a variável integridade acrossomal, em função do aumento de antioxidante no diluidor, apresentando um nível ótimo de 0,1006mg/mL de ácido ascórbico para uma integridade acrossomal de 61,58% ( $P < 0,05$ ) (Tab. 2 e Fig. 2).

Nesse aspecto, a inclusão de ácido ascórbico no diluidor seminal manteve a viabilidade espermática até o nível de 0,1006mg/mL, possivelmente em virtude da redução dos efeitos deletérios de ROS, visto que houve uma maior percentagem de espermatozoides com membrana acrossomal íntegra.

Estes mecanismos estão relacionados com o aumento da ação antioxidante, que além de atuar de forma natural no controle da ação das ROS, sua presença

auxilia vários outros mecanismos, incluindo a redução da LPO durante o processo de criopreservação e, assim, protegem a membrana acrossomal (Knight *et al.*, 1993, Hu *et al.*, 2010). Isso ocorre porque o ácido ascórbico atua na proteção do DNA espermático, mais precisamente no citocromo P-450, fato que impede a destruição da membrana por pseudo-substratos oxidativos e oxigênio (Fraga *et al.*, 1991; Branco *et al.*, 2010), evidenciando a alta eficiência do antioxidante na contenção dos danos oxidativos provocados pela criopreservação do sêmen de caprinos.

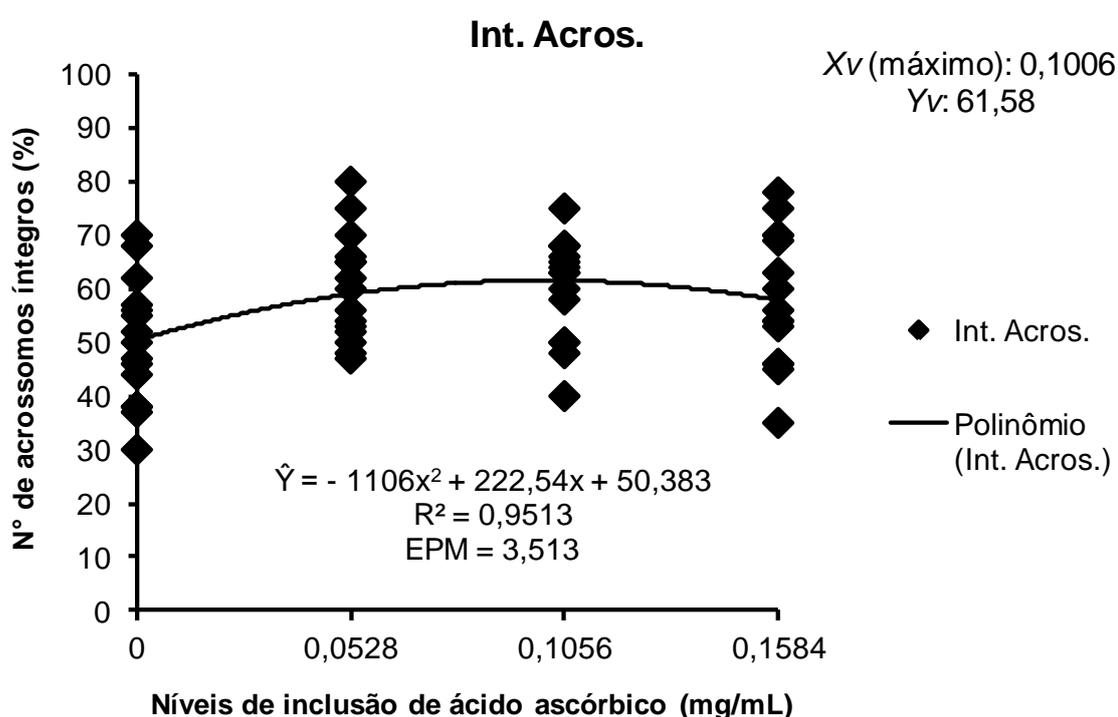


Fig. 2. Percentagem de acrossomos intactos de sêmen diluído com meio acrescido com níveis de ácido ascórbico pós-descongelamento.

É importante considerar que assim como as células somáticas, os espermatozoides produzem pequenas quantidades de ROS como um subproduto da cadeia de transferência de elétrons na mitocôndria (Koppers *et al.*, 2008). Isso corrobora para uma maior quantidade de ROS na célula, conseqüentemente, mais danos ao DNA mitocondrial, indicando que quanto mais células com mitocôndria sem atividade, menor a produção de ATP e fornecimento de energia para a motilidade espermática, sendo uma das possíveis causas de infertilidade em machos (Shamsi *et al.*, 2008). Por esse motivo, é importante que o acrossomo

esteja íntegro, um pré-requisito essencial para a ligação do espermatozoide à zona pelúcida e para a reação acrossomal subsequente (Verstegen *et al.*, 2002).

Para o TTR foram avaliados os efeitos: dia das coletas, animal utilizado e tempo de TTR. Verificou-se que os animais utilizados no experimento não influenciaram nas variáveis motilidade e vigor ( $P>0,05$ ), bem como no dia das coletas. Em todos os tratamentos não houve diferença ( $P>0,05$ ) no percentual para motilidade espermática progressiva, assim como para o vigor espermático ao final dos 120 minutos do TTR (Tab. 3).

Tab. 3. Motilidade espermática progressiva (%) e vigor espermático do sêmen caprino descongelado em meio diluidor contendo ácido ascórbico e submetido ao teste de termorresistência

Item	Níveis de inclusão (mg/mL)				EPM <sup>1</sup>	Significância	
	0	0,0528	0,1056	0,1584		Lin <sup>2</sup>	Quad <sup>3</sup>
Motilidade (%)							
0 min	73,7	72,3	74,0	73,7			
5 min	72,3	70,7	72,7	72,3			
30 min	67,7	65,3	69,0	67,3	2,490	0,572	0,711
60 min	62,0	59,0	64,7	62,0			
120 min	47,0	45,3	48,0	49,3			
Vigor							
0 min	4,3	4,1	4,3	4,2			
5 min	4,3	4,1	4,2	4,2			
30 min	4,0	4,0	4,2	4,0	0,118	0,896	0,964
60 min	3,7	3,7	3,8	3,7			
120 min	3,1	3,0	3,0	3,1			

<sup>1</sup>Erro Padrão da Média (%), <sup>2</sup>Significância para efeito linear, <sup>3</sup>Significância para efeito quadrático. Os dados foram analisados por Regressão a 5% de probabilidade.

Apesar de não ter observado significância para essas variáveis, é importante considerar que o comportamento durante o teste de termorresistência (TTR) foi semelhante para ambas, sendo altas nas primeiras horas do teste, diminuindo nas horas intermediárias e, posteriormente, estabilizando em baixos valores nas horas finais do teste (Kumar, 2000). Isso ocorre porque as reservas energéticas vão se esgotando, em virtude do metabolismo celular estar elevado, assim, há um aumento considerável de espermatozoides mortos, e, por conseguinte maior

produção de ROS, conseqüentemente mais danos peroxidativos, e assim, menor viabilidade espermática.

Maxwell e Watson (1996) afirmam que a geração de espécies reativas ao oxigênio é consequência normal do metabolismo oxidativo, e, possivelmente devem estar associadas nos danos aos espermatozoides em condições hipotérmicas de estocagem. Além disso, diversos fatores podem atuar sobre as células espermáticas, tais como, alterações na composição, pH, temperatura e osmolaridade do meio que as circunda, podem provocar alterações irreversíveis em suas membranas (Watson, 2000).

Nagy *et al.* (2004) confirmaram que o percentual de espermatozoides vivos de touros com acrossoma intacto diminuiu ligeiramente, quando foram incubados a 37°C por um período de 4 h para avaliar alterações na membrana plasmática e acrossomal, de modo que os espermatozoides mortos com acrossoma intacto diminuiu de 37,4% para 17,4%, ao passo que os espermatozoides mortos com acrossoma danificado aumentou de 18% para 35%. Portanto, esse processo é fundamental para predizermos a longevidade e resistência espermática ao estresse térmico durante a passagem pelo trato genital da fêmea, etapa essencial antes da penetração nas células do *cumulus* e na zona pelúcida.

## CONCLUSÃO

De acordo com os resultados apresentados, pode se inferir que os níveis do antioxidante ácido ascórbico estudado neste experimento, mantiveram os parâmetros seminais *in vitro* no pós-descongelamento, com destaque para a integridade acrossomal, pois apresentou melhor resultado que o tratamento controle em todos os níveis testados, apresentando um nível máximo ótimo de 0,1006mg/mL.

## REFERÊNCIAS

- ASADPOUR, R.; JAFARI, R.; TAYEFI-NASRABADI, H. Influence of added vitamin C and vitamin E on frozen-thawed bovine sperm cryopreserved in citrate and Tris-based extenders. *Veterinary Research Forum*, v. 2, p. 37-44, 2011.
- BITTENCOURT, R.F.; FILHO, A.L.R.; SANTOS, A.D.F. et al. Utilização do teste hiposmótico para avaliar a eficácia de diferentes protocolos de criopreservação do sêmen caprino. *Ciências Animal Brasileira*, v. 6, n. 3, p. 213 - 218, 2005.
- BRANCO, C.S.; GARCEZ, M.E.; PASQUALOTTO, F.F. et al. Resveratrol and ascorbic acid prevent DNA damage induced by cryopreservation in human semen. *Cryobiology*, v. 60, p. 235-237, 2010.
- BUCAK, M.N.; TUNCER, P.B.; SARIOZKAN, S. et al. Effects of hypotaurine, cysteamine and aminoacids solution on post-thaw microscopic and oxidative stress parameters of Angora goat semen. *Research in Veterinary Science*, v. 87, p. 468–72, 2009.
- CASTILHO, E.F.; GUIMARÃES, J.D.; MARTINS, L.F. et al. Uso de própolis e ácido ascórbico na criopreservação do sêmen caprino. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v. 38, p. 2335–2345, 2009.
- CÉZAR, M.F.; SOUZA, W.H. Avaliação e utilização da condição corporal como ferramenta de melhoria da reprodução e produção de ovinos e caprinos de corte. *Anais de Simpósios da 43ª Reunião Anual da SBZ, João Pessoa – PB*, v. 35, p. 649-678, 2006.
- DE LAMIRANDE, E.; JIANG, H.; ZINI, A.; KODAMA, H. et al. Reactive oxygen species and sperm physiology. *Rev. Reprod.* v. 2, p. 48–54, 1997.
- FRAGA, G.G.; MOTCHNIK, P.A.; SHIGENAGA, M.K. et al. Ascorbic acid protects against endogenous oxidative DNA damage in human sperm. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States*, v. 88, p. 11003-11006, 1991.

HENRY, M.; NEVES, J.P.; JOBIM, M.I.M. Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal. 3. ed. Belo Horizonte: Colégio Brasileiro de Reprodução Animal, 2013, 104p.

HU, J.H.; TIAN, W.Q.; ZHAO, X.L. et al. The cryoprotective effects of ascorbic acid supplementation on bovine semen quality. *Animal Reproduction Science*, v. 121, 72–77, 2010.

INMET. Instituto Nacional de Meteorologia (INMET). 2014. Estação Meteorológica de Observação de Superfície Automática. Disponível em: <<http://www.inmet.gov.br/portal/index.php?r=estacoes/estacoesAutomaticas>>. Acesso em: 01 maio de 2014.

KHERADMAND, A.; BABAEI, H.; ABSHNAS, J. Comparative evaluation of the effect of antioxidants on the chilled stored ram semen. *Iranian Journal of Veterinary Research*, v. 7, p. 40-45, 2006.

KNIGHT, J.A., BLAYLOCK, R.C., SEARLES, D.A. The effect of vitamins C and E on lipid peroxidation in stored erythrocytes. *Ann. Clin. Lab. Sci.* v. 23, p. 51–56, 1993.

KOPPERS, A.J.; DE IULIIS, G.N.; FINNIE, J.M. et al. Significance of mitochondrial reactive oxygen species in the generation of oxidative stress in spermatozoa. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* v. 93, p. 3199–3207, 2008.

KÜÇÜK, N.; AKSOY, M.; UÇAN, U. et al. Comparison of two different cryopreservation protocols for freezing goat semen. *Cryobiology*, v. 68, p. 327–331, 2014.

KUMAR, S. Cellular damages during cryopreservation and assessment of in vitro fertilizing capacity of spermatozoa. *Indian Veterinary Medical Journal*, v. 24, p. 1-6, 2000.

LIN, M.; MORSHEDI, M.; SRISOMBUT, C. et al. Plasma membrane integrity of cryopreserved human sperm: an investigation of the results of hypoosmotic swelling test, the water test, and cosin-Y staining. *Fertility and Sterility*, v.70, p.1148-1155, 1998.

MAIA, M.S.; BICUDO, S.D.; SICHERLE, C.C. et al. Lipid peroxidation and generation of hydrogen peroxide in frozen-thawed ram semen cryopreserved in extenders with antioxidants. *Animal Reproduction Science*. v. 122, p. 118–123, 2010.

MAXWELL, W.M.C.; WATSON, P.F. Recent progress in the preservation of ram semen. *Animal Reproduction Science*, v. 42, n.1-4, p. 55-65, 1996.

MEMON, A.A.; WAHID, H.; ROSNINA, Y. et al. Effect of antioxidants on post thaw microscopic, oxidative stress parameter and fertility of Boer goat spermatozoa in Tris egg yolk glycerol extender, *Animal Reproduction Science*, v. 136, p. 55–60, 2012.

NAGY, S.; HALLAP, T.; JOHANNISSON, A.; MARTINEZ-RODRIGUEZ, H. Changes in plasma membrane and acrosome integrity of frozen-thawed bovine spermatozoa during a 4 h incubation as measured by multicolor flow cytometry. *Anim. Reprod. Sci.* v. 80, p. 225–235, 2004.

MYLONAS, C.; KOURETAS, D. Lipid peroxidation and tissue damage. *In Vivo*, v. 13, p. 295–309, 1999.

PEIXOTO, A.L.V.A.; MONTEIRO Jr, P.L.J.; CÂMARA, D.R. et al. Efeito do tempo de incubação pós-descongelamento sobre a viabilidade de espermatozoides ovinos criopreservados com tris-gema suplementado com vitamina C e Trolox. *Ciência Veterinária nos Trópicos*, v.11, n.1, p. 16-24, 2008.

PERIS, S.I.; BILODEAU, J.F.; DUFOUR, M. Impact of Cryopreservation and reactive oxygen species on DNA integrity, lipid peroxidation, and functional

parameters in ram sperm. *Molecular Reproduction and Development*, 74, 878–892, 2007.

POPE, C.E.; ZHANG, Y.Z.; DRESSER, B.L. A simple staining method for valuating acrosomal status of cat spermatozoa. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, v. 22, n. 1, p. 87-95, 1991.

REVELL, S.G.; MRODE, R.A. An osmotic resistance test for bovine semen. *Animal Reproduction Science*, v. 36, p. 77 - 86, 1994.

RESENDE, J.; WEITZE, K.F. Congelamento de sêmen de caprino com diluente tris modificado. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 24, 1987, Brasília. Anais... Brasília: Sociedade Brasileira de Zootecnia, 1987, p. 381.

ROTA, A.; PENZO, N.; VINCENTI, L.; MANTOVANI, R. Hypoosmotic swelling (HOS) as a screening assay for testing in vitro fertility of bovine spermatozoa. *Theriogenology*, v. 53, p.1415 - 1420, 2000.

SARLÓS, P.; MOLNÁR, A.; KÓKAI, M. et al. Comparative evaluation of the effect of antioxidants in the conservation of ram semen. *Acta Veterinaria Hungarica*, 50(2), 235-245, 2002.

SAS. THE STATISTICAL ANALYZE SYSTEMS FOR WINDOWS Versão 8. Cary: SAS. 1999-2001.

SATORRE, M.M.; BREININGER, E.; BECONI, M.T.; BEORLEGUI, N.B.  $\alpha$ -Tocopherol modifies tyrosine phosphorylation and capacitationlike state of cryopreserved porcine sperm. *Theriogenology*, v. 68, p. 958–965, 2007.

SHAMSI, M.B.; KUMAR, R.; BHATT, A. et al. Mitochondrial DNA Mutations in etiopathogenesis of male infertility. *Indian J. Urol.* v. 24, p. 150–154, 2008a.

SIKKA, S.C. Role of oxidative stress and antioxidants in andrology and assisted reproductive technology. *J. Androl.* v. 25, p. 5–18, 2004.

VERSTEGEN, J.; IGUER-OUADA, M.; ONCLIN, K. Computer assisted semen analyzer in andrology research and veterinary practice. *Theriogenology*, v. 57, p. 149-179, 2002.

VIDAL, A.H.; BATISTA, A.M.; DA SILVA, E.C.B. et al. Soybean lecithin-based extender as an alternative for goat sperm cryopreservation. *Small Ruminant Research*, v. 109, p. 47–51, 2013.

WATSON, P.F. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Animal Reproduction Science*, v. 60 - 61, p. 481 - 492, 2000.

WRIGHT, C.; MILNE, S.; LEESON, H. Sperm DNA damage caused by oxidative stress: modifiable clinical, lifestyle and nutritional factors in male infertility. *Reproductive BioMedicine Online*, v. 28, p. 684–703, 2014.

## **CAPÍTULO 2**

### **RESVERATROL NO DILUIDOR PARA CRIOPRESERVAÇÃO DE SÊMEN CAPRINO<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Artigo a ser submetido ao comitê editorial do periódico científico Animal Reproduction Science.

## Resveratrol no diluidor para criopreservação de sêmen caprino

### *Resveratrol in extender for cryopreservation of goat semen*

L.S. Brito<sup>a,\*</sup>, L.P. Barbosa<sup>b</sup>, M.V. Resende<sup>c</sup>, A.M. Pinheiro<sup>a</sup>, W.M. Machado<sup>a</sup>, R.C. Cardoso<sup>a</sup>, R.D.L. Jesus<sup>a</sup>, C.S. França<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas, Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Rua Rui Barbosa, 710, Cruz das Almas, Bahia, Brasil, 44380-000.

<sup>b</sup>Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas, Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Rua Rui Barbosa, 710, Cruz das Almas, Bahia, Brasil, 44380-000.

<sup>c</sup>Campus Prof. Barros, Universidade Salvador, Av. Luís Viana Filho, 3100, Paralela, Salvador, Bahia, Brasil, 41720-200.

\*Autor para correspondência. Tel.: +550719231-2338.

*Endereço de e-mail:* lindomar.britto@gmail.com (L.S. Brito).

### RESUMO

Objetivou-se determinar o melhor nível de inclusão de resveratrol em meio diluidor TRIS–Gema para criopreservação de sêmen caprino. Foram coletados, por meio de vagina artificial, cinco ejaculados de três bodes da raça Anglo Nubiana, com dois a três anos de idade, com condição corporal média igual a  $3\pm 0,3$ ; clinicamente saudáveis, aptos para reprodução. O sêmen de cada animal foi dividido em quatro alíquotas de 200 $\mu$ L, compondo quatro tratamentos: sem adição de resveratrol no diluidor TRIS-Gema (controle) e com 0,04; 0,08 e 0,12mg/mL de resveratrol no diluidor TRIS-Gema. Foram avaliadas as características físicas (motilidade espermática progressiva e vigor espermático) do sêmen imediatamente após coleta, pós-diluição, pós-resfriamento e descongelamento. Após o descongelamento, as amostras seminais foram incubadas e avaliadas quanto à integridade de membrana (HOST) e acrossomal e termorresistência lento (TTR). Os dados foram submetidos à análise de regressão a 5% de probabilidade. Não houve diferença para a motilidade progressiva e vigor

espermático na pós-diluição e pós-resfriamento, bem como para o teste complementar integridade acrossomal ( $P>0,05$ ), enquanto que os parâmetros motilidade e vigor reduziram linearmente no pós-descongelamento, assim como nos 120 minutos do TTR ( $P<0,05$ ). Houve efeito quadrático com a inclusão de resveratrol para HOST, apresentando um nível ótimo de 0,039mg/mL de resveratrol para uma integridade de membrana plasmática de 52,55% ( $P<0,05$ ). Conclui-se que a inclusão de resveratrol foi eficaz na manutenção da viabilidade espermática, em especial, a integridade de membrana plasmática durante o processo de criopreservação até o nível de 0,039mg/mL, podendo ser uma alternativa na composição dos diluidores seminais de caprinos.

**Palavras-chave:** Antioxidantes, espermatozoides, estresse oxidativo, polifenóis.

## ABSTRACT

This study aimed to determine the optimal inclusion level of resveratrol in TRIS extenders-egg yolk for cryopreservation of goat semen. Were collected by artificial vagina, five ejaculates of three Anglo Nubian goats, with two to three years of age, with average body condition equal to  $3 \pm 0.3$ , clinically healthy, fit to reproduction. Semen from each animal was divided into four aliquots of 200 $\mu$ L, composing four treatments: no addition of resveratrol in TRIS-egg yolk (control) and 0.04; 0.08 and 0.12mg/mL of resveratrol in TRIS-egg yolk. Physical semen characteristics (sperm progressive motility and sperm vigor) were evaluated immediately after collection, after dilution, cooling and thawing. After thawing, the semen samples were incubated and evaluated for membrane integrity (HOST) and acrosome and slow thermoresistance (TTR). Data were subjected to regression analysis at 5% probability. There was no difference in sperm motility and progressive effect on the post-dilution and post-cooling and for the supplementary acrosome integrity test ( $P > 0.05$ ), while motility parameters and force linearly decreased post-thaw, and as TTR in the 120 minutes ( $P < 0.05$ ). Increased quadratically with the addition of resveratrol to HOST, an optimum maximum level of 0.039mg/mL resveratrol for a plasma membrane integrity of 52.55% ( $P < 0.05$ ). We conclude that inclusion of resveratrol was effective in maintaining sperm viability, in particular plasm membrane integrity during the cryopreservation process until the level of 0.039mg/mL could be an alternative in the composition of the seminal extenders goats.

**Keywords:** Antioxidants, sperm, oxidative stress, polyphenols.

## Introdução

O uso do sêmen criopreservado tem se tornado fundamental para a prática de inseminação artificial e disseminação do material genético, além de limitar a propagação de doenças sexualmente transmissíveis. Entretanto, o choque térmico, é conhecido por ser o maior responsável pelos danos deletérios aos espermatozoides (Bucak et al., 2009). Níveis elevados de espécies reativas ao oxigênio (ROS), tais como peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e ânion radical superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), resultante do aumento da respiração mitocondrial, são produzidos durante o processo de criopreservação (Sicherle et al., 2011).

Apesar dos benefícios da produção fisiológica de ROS para desencadear os eventos bioquímicos da capacitação e reação acrossômica (Peris et al., 2007), o desequilíbrio entre as espécies reativas e as defesas antioxidantes nas células leva ao estresse oxidativo, o que pode ser responsável pela redução da motilidade espermática, peroxidação lipídica (LPO) e fragmentação do DNA observada após o descongelamento do sêmen (Santiani et al., 2014). Além disso, há evidências de que os danos causados ao DNA espermático estejam associados à peroxidação lipídica da membrana plasmática (Chen et al., 1997). Embora, espermatozoides com a integridade de DNA comprometida sejam capazes de fertilizar os oócitos como espermatozoides normais, os embriões produzidos poderia ter um desenvolvimento anormal (Agarwal e Allamaneni, 2004).

Diante desse contexto, acredita-se que o uso de fontes externas de substâncias antioxidantes no diluidor seminal neutralize a ação das ROS e mantém a viabilidade seminal. Nesse sentido, pesquisadores têm testado diversas substâncias antioxidantes no meio diluidor, tais como o resveratrol (3,5,4'-trihidroxiestilbeno), um composto polifenólico não flavonoide, encontrado principalmente em uvas e vinhos, estudado na espécie humana (Garcez et al., 2010), caprina (Stojanovic et al., 2001) e ovina (Sarlós et al., 2002; Silva et al., 2012), na prevenção de danos a membrana plasmática e ao DNA induzidos pela criopreservação dos espermatozoides .

Não obstante, os resultados ainda são inconsistentes, e, como a viabilidade, congelabilidade do sêmen e capacidade antioxidante varia entre machos, objetivou-se avaliar e comparar *in vitro* o melhor nível de inclusão de resveratrol

no meio diluidor, por meio da qualidade física e morfológica de amostras de sêmen criopreservado de reprodutores caprinos da raça Anglo Nubiana.

### Material e Métodos

O experimento foi conduzido no setor de caprinocultura do Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, localizada na cidade de Cruz das Almas-BA, nas coordenadas geográficas de paralelo 12°39'54", latitude Sul, e de meridiano 39°04'44", longitude Oeste, no período entre janeiro e fevereiro de 2014. O município está localizado a uma altitude de 225,87 metros, em região de clima subúmido do tipo Am, segundo a tipologia climática de Köppen, com precipitação e temperatura anual média de 1.200mm e 24,5°C, respectivamente (Estação Agrometeorológica da Embrapa Mandioca e Fruticultura/INMET, 2014). O projeto de pesquisa foi submetido à avaliação do comitê de ética da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia sendo aprovado com o número do processo 23007.005461/2014-18.

Foram utilizados três bodes adultos da raça Anglo Nubiana, entre dois e três anos de idade, com condição corporal média igual a  $3 \pm 0,3$  (Escala de 1 a 5), de acordo com a metodologia indicada por Cezar e Sousa (2006), clinicamente saudáveis, apto para reprodução, segundo o preconizado pelo Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA, 2013). Os animais foram mantidos em regime semi-intensivo de produção, com acesso à pastagem de *Brachiaria* (*Brachiaria decumbens*), suplementado com concentrado proteico (800g/animal/dia - Nutrividas®), sal mineral e água *ad libitum*.

As coletas de sêmen foram realizadas na frequência de duas vezes por semana, pelo método de vagina artificial, na presença de uma cabra em estro como manequim, totalizando cinco coletas viáveis por animal. Os ejaculados foram protegidos de luz solar com papel laminado e imediatamente após a coleta, o sêmen foi encaminhado ao laboratório e colocado em banho-maria à temperatura de 32°C e submetidos ao exame, quanto aos aspectos físicos e morfológicos.

Avaliou-se o volume do ejaculado (mL); aspecto seminal; turbilhonamento e vigor espermático (0 a 5); motilidade espermática progressiva (0 a 100%) e

concentração espermática (milhões de espermatozoides por mL), determinada em Câmara de Neubauer (diluição 1:400 em formol salina tamponada). Uma alíquota de 10µL foi utilizada para avaliação da morfologia espermática pelo método de câmara úmida, e, foram contadas 200 células espermáticas no total em microscopia de contraste de fase. Apenas as amostras que atenderam ao padrão mínimo preconizado pelo CBRA (2013), que para caprinos a percentagem referencia para espermatozoides normais é, em média, maior ou igual a 80%, foram encaminhadas à criopreservação.

Após análise, o ejaculado de cada animal foi dividido em quatro alíquotas de 200µL e diluído em meio diluidor TRIS – Gema (Resende e Weitze, 1987), compondo quatro tratamentos, sem adição de resveratrol no diluidor TRIS-Gema (controle) e com 0,04; 0,08 e 0,12mg/mL de resveratrol, concentrações, determinada segundo a metodologia proposta por Silva et al. (2012).

Após a diluição, realizou-se o processo de criopreservação, composto de duas etapas, sendo a primeira etapa à curva positiva, onde os tubos contendo o sêmen de todos os tratamentos foram colocados em canecas de alumínio, contendo 300mL de água à 32°C e submetidos a uma curva de resfriamento de -0,2°C/min em um sistema de refrigeração, composto por uma caixa térmica (Figura 1), com as seguintes dimensões: 360mm x 265mm x 240mm de comprimento, largura e altura, respectivamente, preenchida por cubos de gelo para atingirem o equilíbrio a 5°C, durante 3 horas. Enquanto que a segunda etapa referente à curva negativa, em duas fases, sendo que na primeira às palhetas (0,25 mL), seladas com massa de modelar atóxica, ficaram em vapor de nitrogênio durante 15 minutos, e, a segunda, as palhetas foram imersas em nitrogênio líquido, e em seguida colocadas em raques devidamente identificadas e armazenadas em botijão criogênico a -196°C.

Antes e após a curva de resfriamento, a motilidade espermática progressiva e o vigor espermático de cada grupo foram avaliados. Após a criopreservação duas palhetas de cada tratamento foram descongeladas em banho-maria (37°C, 30 segundos) e submetidas à avaliação, quanto às características de motilidade espermática progressiva, vigor espermático e teste de termorresistência lento (TTR); teste hiposmótico (HOST) e integridade acrossomal (POPE). Todas as avaliações seguiram as recomendações do CBRA (2013), Bittencourt et al. (2005), Pope et al. (1991), respectivamente.

A integridade da membrana plasmática foi avaliada utilizando-se o teste hiposmótico (HOST), assim 30 $\mu$ L foram coletados de cada grupo congelado e colocados em microtubos de polipropileno de 1,5mL contendo 300 $\mu$ L de solução hiposmótica, composta por frutose (0,9g), citrato de sódio (0,49g) e água destilada (100mL), previamente aquecida por 5 minutos em banho-maria a 37°C (Revell e Mrode, 1994; Rota et al., 2000). Após adição as amostras foram mantidas em banho-maria a 37°C durante uma hora. Em seguida uma gota da fração sêmen/solução foi colocada entre lâmina e lamínula para contagem de 100 espermatozoides em microscopia de contraste de fase com um aumento de 40 vezes.



Figura 1. Caixa térmica utilizada durante a etapa de resfriamento do sêmen.

As células foram classificadas quanto à presença ou não de cauda dobrada ou enrolada e o resultado foi determinado em porcentagem, efetuando-se o cálculo pela fórmula:  $HIPO (\%) = (\% \text{ de alterações na região da cauda após teste})$

HIPO) – (% de alterações na região da cauda dos espermatozoides antes do teste HIPO) (Revell e Mrode, 1994).

Uma palheta de cada tratamento foi descongelada e submetida ao TTR. Assim 200 $\mu$ L foram coletados de cada tratamento e transferidos para microtubos de polipropileno de 1,5mL e então permaneceram em banho-maria a 37°C durante duas horas, de modo que, nos tempos 0, 5, 30, 60 e 120 minutos, foram avaliados a motilidade progressiva e o vigor espermático por meio de microscopia de contraste de fase, segundo o estabelecido pelo CBRA (2013).

Com o intuito de avaliar os possíveis danos causados a membrana acrossomal durante o processo de criopreservação, utilizou-se o método da coloração simples de Pope, que é composta do corante *Fast Green* e do Rosa Bengala, proposta por Pope et al. (1991). Para tal, uma alíquota de 10 $\mu$ L de sêmen de cada tratamento foi adicionada em 10 $\mu$ L do corante simples de Pope e incubada por 70 segundos. Em seguida, foram feitos esfregaços em lâminas de microscopia, com auxílio de uma lamínula e avaliado em microscópio de luz (1000 vezes) com contraste de fase. Foram contadas 100 células por lâmina e classificadas como: Acrossomo íntegro: região acrossomal de coloração lilás, levemente mais escura que a região pós-acrossomal; Acrossomo não íntegro: região acrossomal de coloração rosa, levemente mais clara que a região pós-acrossomal.

O delineamento experimental utilizado foi o Inteiramente Casualizado, com quatro tratamentos e quinze repetições. Para análise estatística dos resultados utilizou-se o comando PROC GLM (do programa estatístico SAS 9.1®), adotando-se o nível de significância de 5%. Contrastes polinomiais foram utilizados para se determinar o efeito linear e quadrático dos tratamentos.

## **Resultados e Discussão**

A inclusão de resveratrol no meio diluidor não promoveu efeito na motilidade espermática progressiva e vigor espermático do sêmen pós-diluição e pós-resfriamento ( $P>0,05$ ) (Tabela 4). No entanto, houve comportamento linear decrescente no pós-descongelamento ( $P>0,05$ ) (Tabela 4 e Figura 4), sendo incapaz de preservar esses parâmetros em todos os níveis testados.

Este resultado corrobora ao apresentado por Collodel et al. (2011), que investigaram a citotoxicidade do resveratrol no espermatozoide humano e em células germinativas de ratos, e concluíram que a motilidade espermática progressiva aumentou até 3,0mg/mL, sendo capaz de atuar como agente limpador de ROS, ao passo que a partir de 22,824mg/mL é totalmente letal para as células espermáticas, de modo que a DL 50 para essas espécies foram de 11,412mg/mL.

Tabela 1. Motilidade espermática progressiva e vigor espermático pós-diluição, pós-resfriamento e pós-descongelamento de sêmen diluído com meio acrescido de resveratrol

Item	Níveis de inclusão (mg/mL)				EPM <sup>1</sup>	Significância	
	0	0,04	0,08	0,12		Lin <sup>2</sup>	Quad <sup>3</sup>
Motilidade (%)							
Pré-Resfriamento	89,5	89,0	88,7	88,3	0,77	0,260	0,898
Pós-Resfriamento	81,0	82,0	80,3	78,3	0,05	0,112	0,268
Pós-Descongelamento	69,0	70,7	66,7	62,3	1,33	0,017	0,176
Vigor							
Pré-Resfriamento	4,9	5,0	4,9	4,9	0,13	0,433	0,725
Pós-Resfriamento	4,3	4,3	4,2	4,2	2,15	0,382	0,695
Pós-Descongelamento	4,0	4,0	3,8	3,7	0,08	0,022	0,529
Equações de regressão							
Motilidade Pós-Descongelamento	$*\hat{Y} = -60x + 70,767$ ( $R^2 = 0,7343$ )						
Vigor Pós-Descongelamento	$*\hat{Y} = -1,9744x + 3,9826$ ( $R^2 = 0,9732$ )						

<sup>1</sup>Erro Padrão da Média (%), <sup>2</sup>Significância para efeito linear, <sup>3</sup>Significância para efeito quadrático.

\*Os dados foram analisados por Regressão a 5% de probabilidade.

Embora mais estudos sejam necessários, pode se inferir que as concentrações utilizadas nesse experimento estejam acima dos limites aceitáveis para essa espécie, corroborando para com os dados encontrados neste estudo. Entretanto, os valores de todas as características estudadas apresentaram-se acima dos limites mínimos preconizados pelo CBRA (2013) para sêmen pós-descongelamento, sendo recomendando para motilidade progressiva maior ou igual a 30% e vigor espermático maior ou igual a dois no pós-congelamento, fato que demonstra a manutenção da viabilidade espermática mesmo na presença de resveratrol.

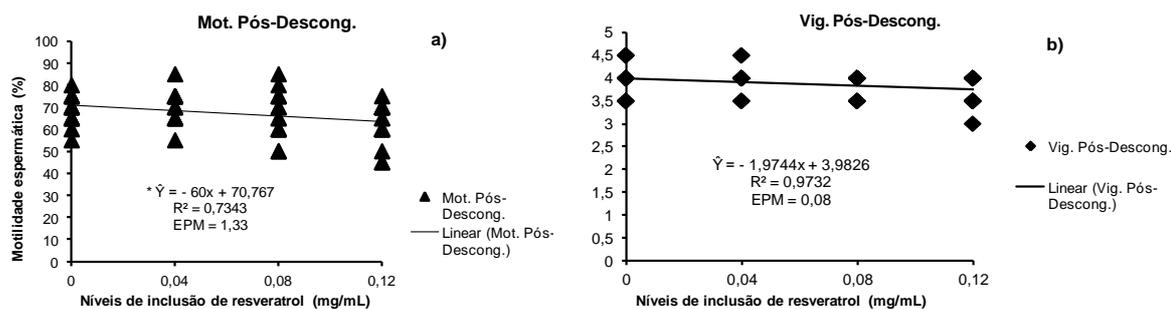


Figura 2. Valores das equações de regressão de sêmen diluído com meio acrescido de resveratrol pós-descongelamento. a) motilidade progressiva, b) vigor espermático.

Para amostras de sêmen criopreservado com resveratrol, não houve diferença ( $P > 0,05$ ) entre os tratamentos quanto à integridade acrossomal. Contudo, houve comportamento quadrático para integridade de membrana plasmática (HOST), que apresentou um nível ótimo de 0,039mg/mL de resveratrol para um HOST de 52,55% ( $P < 0,05$ ) (Tabela 5 e Figura 5), em função da inclusão do antioxidante. Silva et al. (2012) relataram que a inclusão de 0,005 a 0,02mg/mL de resveratrol do diluidor TRIS-Gema não resultaram em melhores valores de motilidade e vigor espermático, assim como de integridade acrossomal e integridade de membrana plasmática dos espermatozoides de carneiro no pós-descongelamento.

Tabela 2. Integridade acrossomal e HOST de sêmen caprino criopreservado com diluidor acrescido de resveratrol

Item	Níveis de inclusão (mg/mL)				EPM <sup>1</sup>	Significância	
	0	0,04	0,08	0,12		Lin <sup>2</sup>	Quad <sup>3</sup>
Int. Agrossomal (%)	42,0	47,4	42,2	38,2	3,41	0,271	0,165
HOST (%)	47,9	55,9	45,5	39,1	3,33	0,020	0,041
Equações de regressão							
HOST	$\hat{Y} = -2250x^2 + 177,67x + 49,04$ ( $R^2 = 0,8305$ )						

<sup>1</sup>Erro Padrão da Média (%), <sup>2</sup>Significância para efeito linear, <sup>3</sup>Significância para efeito quadrático.

\*Os dados foram analisados por Regressão a 5% de probabilidade.

Estes mecanismos de detoxificação de ROS estão relacionados à capacidade de o agente antioxidante em controlar os ânions superóxido e nitrito, ligando a um radical peróxido e/ou  $\text{OH}^-$ , ao doar o elétron de hidrogênio a partir de seus grupos hidroxila (Kasdallah-Grissa et al., 2007). A presença de resveratrol pode, ainda, reduzir a peroxidação lipídica (LPO), pois, além de atuar diretamente

no controle das ROS, modula a defesa antioxidante enzimática, por exemplo, ao prevenir a redução das atividades da SOD, CAT e GPx (Ourique et al., 2013).

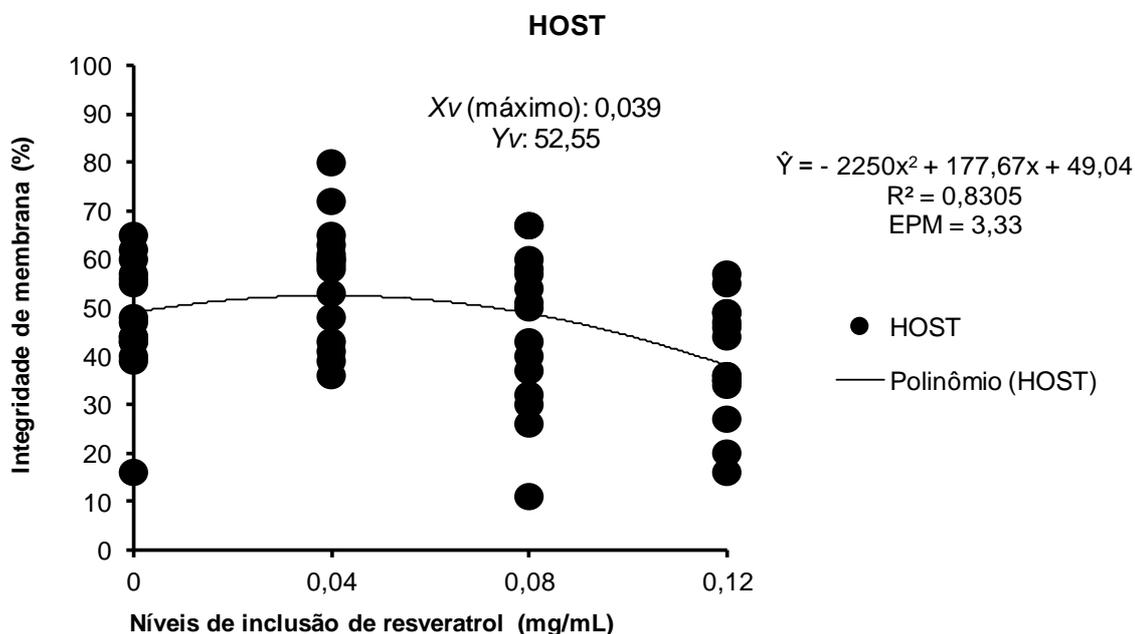


Figura 3. Percentagem de espermatozoides com membrana plasmática intactas de sêmen diluído com meio acrescido com níveis de resveratrol pós-descongelamento.

O resveratrol é descrito como um potente antioxidante por atuar impedindo a formação de ROS por duas vias; sistemas enzimáticos e não enzimáticos, especialmente, a NADPH-oxidase, dependente de NADH oxidoreductase (Delmas et al., 2005), localizadas na membrana plasmática e mitocondrial dos espermatozoides (Guerra et al., 2004; Nickel et al., 2014), evidenciando a eficiência do antioxidante na contenção dos danos oxidativos provocados pela criopreservação do sêmen de caprinos. Além disso, os polifenóis por serem moléculas anfipáticas podem ser facilmente incorporados na bicamada lipídica da membrana espermática, por sua vez impede a formação de radicais lipídicos e mantém a integridade da membrana, bem como o equilíbrio iônico das células (Sarlós et al., 2002; Garcez et al., 2010).

No entanto, como a ação antioxidante do resveratrol ocorre diminuindo a atividade das enzimas que desempenham um papel na produção de ROS ou aumentando a atividade das enzimas que metabolizam ROS, como a superóxido dismutase (SOD) (Carrizzo et al., 2013), o composto por sua vez, podem ter comportamento tanto como um antioxidante ou pró-oxidante, visto que a SOD é a

responsável pela conversão de  $O_2^{\cdot -}$  em  $H_2O_2$ , portanto, presumi-se que este último esteja diretamente relacionado a citotoxicidade ocasionada pela acumulação de resveratrol a nível mitocondrial (Sassi et al., 2014), pois a saturação das atividades de CAT e GPx pode levar a uma disponibilidade de excesso de  $H_2O_2$ , que por sua vez gera  $OH^{\cdot}$ , resultando na iniciação e propagação de LPO (Schmatz et al., 2012).

Diante desse contexto, vale destacar a importância em avaliar a integridade da membrana espermática, pois as injúrias causadas ao espermatozoide, principalmente, as relacionadas ao choque térmico, assim como pela exposição ao oxigênio durante a manipulação do sêmen, o estresse osmótico, a toxicidade dos crioprotetores, e, a formação e dissolução dos cristais no ambiente extracelular, conferem danos irreversíveis aos espermatozoides (Watson, 2000).

Segundo Kao et al. (2008), uma das consequências mais importantes de espermatozoides defeituosos é o estresse oxidativo, pois são células produtoras de ROS, e, a partir dessas pode induzir a LPO, bem como a fragmentação do DNA das células viáveis, o que pode contribuir para redução da cinética espermática (Ourique et al., 2013).

Além disso, a criopreservação pode induzir danos axonemais e mitocondrial, resultando na queda da motilidade espermática, pois o axonema presente na peça intermediária do espermatozoide é composto por fibras densas externas, que por sua vez são cobertas por mitocôndrias, organelas precursoras de energia (ATP), responsáveis pelo movimento espermático (Memon et al., 2012), assim, quanto mais células com mitocôndria sem atividade, menor a produção de ATP e fornecimento de energia para a motilidade espermática, sendo uma das possíveis causas de infertilidade em machos (Shamsi et al., 2008).

Embora tenha sido capaz de preservar a integridade da membrana plasmática, possivelmente ao evitar o dano oxidativo de lipídios, o resveratrol, não foi efetivo em prevenir a perda de motilidade e vigor espermático no pós-descongelamento. Esse comportamento pode estar associado à ação do antioxidante, por ser um inibidor específico da COX-1, uma enzima envolvida na síntese das prostaglandinas série-2, que são positivamente correlacionadas com a motilidade do espermatozoide (Kennedy et al., 2003).

Observou-se comportamento linear negativo ( $P < 0,05$ ) para o percentual de motilidade espermática progressiva, assim como para o vigor espermático ao final dos 120 minutos do TTR (Tabela 6 e Figura 6).

Tabela 3. Motilidade espermática progressiva (%) e vigor do sêmen caprino descongelado em meio diluidor contendo resveratrol e submetido ao teste de termorresistência

Item	Níveis de inclusão (mg/mL)				EPM <sup>1</sup>	Significância	
	0	0,04	0,08	0,12		Lin <sup>2</sup>	Quad <sup>3</sup>
Motilidade (%)							
0 min	69,0	71,7	68,0	64,7			
5 min	66,3	69,7	65,7	63,0			
30 min	62,0	65,3	60,0	58,0	2,510	0,043	0,183
60 min	59,7	61,7	56,0	51,7			
120 min	45,0	50,3	40,7	39,3			
Vigor							
0 min	4,0	4,1	3,9	3,8			
5 min	3,8	3,9	3,7	3,7			
30 min	3,7	3,8	3,6	3,5	0,089	0,005	0,441
60 min	3,6	3,6	3,4	3,2			
120 min	3,1	3,3	2,8	2,9			
Equações de regressão							
Motilidade Pós-Descongelamento				$*\hat{Y} = - 52,167x + 62,516$ ( $R^2 = 0,57$ )			
Vigor Pós-Descongelamento				$*\hat{Y} = - 2,4167x + 3,7267$ ( $R^2 = 0,73$ )			

<sup>1</sup>Erro Padrão da Média (%), <sup>2</sup>Significância para efeito linear, <sup>3</sup>Significância para efeito quadrático.

\*Os dados foram avaliados por meio de Regressão a 5% de probabilidade.

De acordo com Purdy (2006), a criopreservação do sêmen promove redução da motilidade e danos letais aos espermatozoides. Assim, a resistência espermática, por sua vez é reduzida, e, quando estes são submetidos ao estresse do TTR, o comprometimento celular é mais bem evidenciado. Adicionalmente, o percentual de espermatozoides mortos cresce à medida que vai se esgotando as reservas energéticas, de modo que há uma maior produção de ROS, e, por conseguinte mais danos peroxidativos e menor viabilidade espermática.

Em estudos recentes Xiang et al. (2014), verificaram a atividade biológica observada no vinho tinto e no resveratrol isoladamente, e concluíram que o potencial antioxidante se dar em virtude do grupo de polifenóis presente no vinho, e não apenas ao resveratrol. Diante desse pressuposto, é importante resaltar que

serão necessários mais estudos para estabelecer concentrações ideais e efetivamente determinar seu potencial antioxidante, pois neste estudo, foi observado que essa substância apresenta comportamento controverso, visto que doses baixas melhoram a sobrevivência celular, ao passo que doses elevadas aumentam a morte dos espermatozoides.

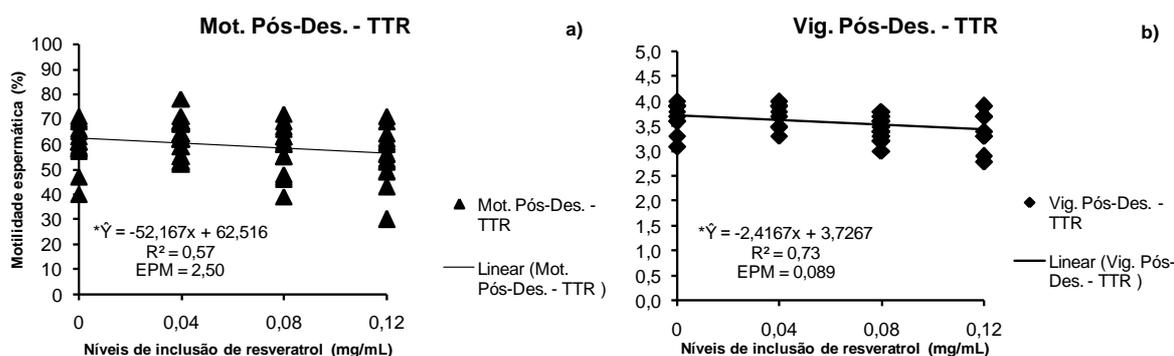


Figura 4. Valores das equações de regressão de sêmen diluído com meio acrescido de resveratrol pós-descongelamento submetidos ao teste de termorresistência. a) motilidade progressiva, b) vigor espermático.

Foram avaliados os efeitos: dia das coletas, animal utilizado e tempo de TTR. Verificou-se que os animais utilizados no experimento não influenciaram nas variáveis motilidade e vigor ( $P > 0,05$ ), ao passo que para o dia da coleta foi verificado apenas efeito significativo para a variável vigor ( $P < 0,05$ ).

Essas diferenças, possivelmente, podem estar associadas ao fator clima, pois ao decorrer do experimento o ambiente em que os animais ficaram a temperatura variou de 25°C a 32°C, com e sem ocorrência de chuvas. Isso ocorre porque fatores climáticos que incluem temperatura, umidade, radiação e vento, podem comprometer a eficiência reprodutiva, pois o estresse térmico afeta negativamente a espermatogênese, de modo que a concentração de sêmen, número de espermatozoides com motilidade e células por ejaculado são mais baixos no verão do que no inverno e primavera (Mathevon et al., 1998).

## Conclusão

O resveratrol foi incapaz de evitar a perda da motilidade espermática progressiva e o vigor espermático no pós-descongelamento, no entanto, os resultados demonstraram que antioxidante impediu a perda da integridade de

membrana plasmática, prevenindo lipoperoxidação, sendo superior ao tratamento controle até o nível de 0,04mg/mL, apresentando um nível máximo ótimo de 0,039mg/mL de resveratrol.

### Referências

- Agarwal, A., Allamaneni, S.S.R., 2004. The effect of sperm DNA damage on assisted reproduction outcomes, a review, *Minerva Ginecol.* 56, 235–245.
- Bittencourt, R.F., Filho, A.L.R., Santos, A.D.F., Chalhoub, M., Alves, S. G.G.A., Vasconcelos, M.F., Leandro, E.E.S., Guimarães, J.D., 2005. Utilização do teste hiposmótico para avaliar a eficácia de diferentes protocolos de criopreservação do sêmen caprino. *Ciências Animal Brasileira.* 6, 3, 213–218.
- Bucak, M.N., Tuncer, P.B., Sariozkan, S., Ulutas, P.A., Coyan, K., Baspinar, N., Ozkalp, B., 2009. Effects of hypotaurine, cysteamine and aminoacids solution on post-thaw microscopic and oxidative stress parameters of Angora goat semen. *Research in Veterinary Science.* 87, 468–72.
- Cézar, M.F., Souza, W.H., 2006. Avaliação e utilização da condição corporal como ferramenta de melhoria da reprodução e produção de ovinos e caprinos de corte. *Anais... 43ª Reunião Anual da SBZ, João Pessoa–PB.* 35, 649–678.
- Chen, C.S, Chao, H.T, Pan, R.L, Wei, Y., 1997. Hydroxyl radicals induce decline in motility and increase in lipid peroxidation and DNA modification in human sperm. *Biochem Mol Biol Int.* 43, 291–303.
- Collodel, G., Federico, M.G., Geminiani, M., Martini, S., Bonechi, C., Rossi, C., Figura, N., Moretti, E., 2011. Effect of trans-resveratrol on induced oxidative stress in human sperm and in rat germinal cells. *Reproductive Toxicology.* 31, 239–246.
- Carrizzo, A., Forte, M., Damato, A., Trimarco, V., Salzano, F., Bartolo, M., Maciag, A., Puca, A.A., Vecchione, C., 2013. Antioxidant effects of resveratrol in cardiovascular, cerebral and metabolic diseases. *Food and Chemical Toxicology.* 61, 215–226.
- Delmas, D., Jannin, B., Latruffe, N., 2005. Resveratrol: natural properties against atherosclerosis, associated proinflammatory effects and aging. *Molecular Nutrition & Food Research.* 49, 377–95.

- Garcez, M.E., Branco, C.S., Lara, L.V., Pasqualotto, F.F., Salvador, M., 2010. Effects of resveratrol supplementation on cryopreservation medium of human semen. *Fertil Steril*. 94, 2118–2121.
- Guerra, M.M.P., Evans, G., Maxwell, W.M.C., 2004. Papel de oxidantes e anti-oxidantes na andrologia [role of oxidants and antioxidants in andrology]. *Rev Bras Reprod Anim*. 28,187–95.
- Henry, M., Neves, J.P., Jobim, M.I.M., 2013. Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal. 3ª ed., Belo Horizonte: Colégio Brasileiro de Reprodução Animal, 104p.
- INMET. Instituto Nacional de Meteorologia (INMET). 2014. Estação Meteorológica de Observação de Superfície Automática. Disponível em: < <http://www.inmet.gov.br/portal/index.php?r=estacoes/estacoesAutomaticas> >. Acesso em: 01 maio de 2014.
- Kao, S.H., Chao, H.T., Chen, H.W., Hwang, T.I.S., Liao, T.L., Wei, Y.H., 2008. Increase of oxidative stress in human sperm with lower motility. *Fertility and Sterility*. 89, 1183–1190.
- Kasdallah-Grissa, A., Mornagui, B., Aouani, E., Hammami, M., May, ME., Gharbi, N., Kamoun, A., El-Fazaâ, S., 2007. Resveratrol, a red wine polyphenol, attenuates ethanol-induced oxidative stress in rat liver. *Life Sciences*. 80, 1033–1039.
- Kennedy, J.H., Korn, N., Thurston, R.J., 2003. Prostaglandins levels in seminal plasma and sperm extracts of the domestic turkey, and the effects of cyclooxygenase inhibitors on sperm mobility. *Reprod Biol Endocrinol*. 74, 1 - 7.
- Mathevon, M., Buhr, M.M., Dekkers, J.C.M., 1998. Environmental, management, and genetic factors affecting semen production in Holstein bulls. *J. Dairy Sci*. 81, 3321–3330.
- Memon, A.A., Wahid, H., Rosnina, Y., Goh, Y.M., Ebrahimi, M., Nadia, F., 2012. Effect of antioxidants on post thaw microscopic, oxidative stress parameter and fertility of Boer goat spermatozoa in Tris egg yolk glycerol extender. *Animal Reproduction Science*. 136, 55–60.
- Nickel, A., Kohlhaas, M., Maack, C., 2014. Mitochondrial reactive oxygen species production and elimination. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 73, 26–33.

- Ourique, G.M., Finamor, I.A., Saccol, E.M.H., Riffel, A.P.K., Pês, TS., Gutierrez, K., Gonçalves, P.B.D., Baldisserotto, B., Pavanato, M.A, Barreto, K.P., 2013. Resveratrol improves sperm motility, prevents lipid peroxidation and enhances antioxidant defences in the testes of hyperthyroid rats. *Reproductive Toxicology*. 37, 31–39.
- Peris, S.I.; Bilodeau, J.F., Dufour, M., 2007. Impact of Cryopreservation and reactive oxygen species on DNA integrity, lipid peroxidation, and functional parameters in ram sperm. *Molecular Reproduction and Development*. 74, 878–892.
- Pope, C.E., Zhang, Y.Z., Dresser, B.L., 1991. A simple staining method for valuating acrosomal status of cat spermatozoa. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*. 22, 1, 87–95.
- Purdy, P.H., 2006. A review on goat sperm cryopreservation. *Small Ruminant Research*. 63, 215–225.
- Revell, S.G., Mrode, R.A., 1994. An osmotic resistance test for bovine semen. *Animal Reproduction Science*. 36, 77–86.
- Resende, J., Weitze, K.F., 1987. Congelamento de sêmen de caprino com diluente tris modificado. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 24, 1987, Anais... Sociedade Brasileira de Zootecnia, Brasília. p. 381.
- Rota, A., Penzo, N., Vincenti, L., Mantovani, R., 2000. Hypoosmotic swelling (HOS) as a screening assay for testing in vitro fertility of bovine spermatozoa. *Theriogenology*. 53, 1415–1420.
- Santiani, A., Evangelista, S., Sepúlveda, N., Risopatrón, J., Villegas, J., Sánchez, R., 2014. Addition of superoxide dismutase mimics during cooling process prevents oxidative stress and improves semen quality parameters in frozen/thawed ram spermatozoa. *Theriogenology*. 82, 884–889.
- Statistical Analysis System Institute Inc., 1999. SASSTAT Programme. SAS Institute Inc., Versão 8, Cary, NC.
- Sassi, N., Mattarei, A., Azzolini, M., Szabo', I., Paradisi, C., Zoratti, M., Biasutto, L., 2014. Cytotoxicity of mitochondria-targeted resveratrol derivatives: Interactions with respiratory chain complexes and ATP synthase. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1837, 1781–1789.

- Sarlós, P., Molnár, A., Kókai, M., Gábor, G., Rátky, J., 2002. Comparative evaluation of the effect of antioxidants in the conservation of ram semen. *Acta Veterinaria Hungarica*. 50, 235–245.
- Shamsi, M.B.; Kumar, R.; Bhatt, A., Bamezai, R.N.K., Kumar, R., Gupta, N.P., Das, T.K., Dada, R., 2008. Mitochondrial DNA Mutations in etiopathogenesis of male infertility. *Indian J. Urol.* 24, 150–154.
- Sicherle, C.C.; Maia, M.S.; Bicudo, S.D.; Rodello, L.; Gallego, I.C., 2011. Lipid peroxidation and generation of hydrogen peroxide in frozen-thawed ram semen supplemented with catalase or Trolox. *Small Ruminant Research*. 95, 144–149.
- Silva, E.C.B., Cajueiro, J.F.P., Silva, S.V., Soares, P.C., Guerra, M.M.P., 2012. Effect of antioxidants resveratrol and quercetin on in vitro viability of frozen ram sperm. *Theriogenology*. 77, 1722–1726.
- Schmatz, R., Perreira, L.B., Stefanello, N., Mazzanti, C., Spanevello, R., Gutierrez, J., Bagatini, M., Martins, C.C., Abdalla, F.H., Serres, J.D.S., Zanini, D., Vieira, J.M., Cardoso, A.M., Schetinger, M.R., Morsch, V.M., 2012. Effects of resveratrol on biomarkers of oxidative stress and on the activity of delta aminolevulinic acid dehydratase in liver and kidney of streptozotocin-induced diabetic rats. *Biochimie*. 94, 374–383.
- Stojanović, S., Sprinz, H., Brede, O., 2001. Efficiency and mechanism of the antioxidant action of trans-resveratrol and its analogues in the radical liposome oxidation. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 391, 1, 79–89.
- Watson, P.F., 2000. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Animal Reproduction Science*. 60–61, 481–492.
- Xiang, L., Xiao, L., Wang, Y., Li, H., Huang, Z., He, X., 2014. Health benefits of wine: Don't expect resveratrol too much. *Food Chemistry*. 156, 258–263.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

O uso de ácido ascórbico como substância antioxidante no diluidor seminal, além de manter os parâmetros seminais *in vitro* no pós-descongelamento, demonstrou-se eficaz em preservar a integridade acrossomal, que foi superior ao tratamento controle em todos os níveis testados, apresentando um nível máximo ótimo de 0,1006mg/mL.

Apesar da redução na motilidade espermática progressiva e vigor espermático no pós-descongelamento, o resveratrol foi capaz de minimizar os danos peroxidativos até o nível de 0,04mg/mL, pois manteve a integridade de membrana plasmática.

Mesmo sendo preliminares, os resultados indicam que há uma diferença de susceptibilidade da célula espermática a ação antioxidante do resveratrol. Entretanto, são necessários mais estudos com outras doses, com o objetivo de compreender melhor os mecanismos moleculares de atuação do antioxidante nos parâmetros seminais na espécie caprina, incluído a fertilidade *in vivo*.

**ANEXOS**

## ANEXO A

Normas para publicação no periódico científico no Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia

### **Normas para preparação de trabalhos científicos para publicação no Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**

#### **INSTRUÇÕES AOS AUTORES**

**Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**

*(Brazilian Journal of Veterinary and Animal Sciences)*

#### **Política Editorial**

O periódico *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia (Brazilian Journal of Veterinary and Animal Science)*, ISSN 0102-0935 (impresso) e 1678-4162 (on-line), é editado pela FEPMVZ Editora, CNPJ: 16.629.388/0001-24, e destina-se à publicação de artigos científicos sobre temas de medicina veterinária, zootecnia, tecnologia e inspeção de produtos de origem animal, aquacultura e áreas afins.

Os artigos encaminhados para publicação são submetidos à aprovação do Corpo Editorial, com assessoria de especialistas da área (relatores). Os artigos cujos textos necessitarem de revisões ou correções será devolvido aos autores. Os aceitos para publicação tornam-se propriedade do Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia (ABMVZ) citado como *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* Os autores são responsáveis pelos conceitos e informações neles contidos. São imprescindíveis originalidade, ineditismo e destinação exclusiva ao ABMVZ.

#### **Reprodução de artigos publicados**

A reprodução de qualquer artigo publicado é permitida desde que seja

corretamente referenciado. Não é permitido o uso comercial dos resultados.

A submissão e tramitação dos artigos são feita exclusivamente on-line, no endereço eletrônico <[www.abmvz.org.br](http://www.abmvz.org.br)>.

Não serão fornecidas separatas. Os artigos encontram-se disponíveis nos endereços [www.scielo.br/abmvz](http://www.scielo.br/abmvz) ou [www.abmvz.org.br](http://www.abmvz.org.br).

### **Orientação para tramitação de artigos**

- f* Toda a tramitação dos artigos é feita exclusivamente pelo Sistema de publicação online do ABMVZ no endereço [www.abmvz.org.br](http://www.abmvz.org.br).
- f* Apenas o autor responsável pelo artigo deverá preencher a ficha de submissão, sendo necessário o cadastro do mesmo no Sistema.
- f* Toda comunicação entre os diversos atores do processo de avaliação e publicação (autores, revisores e editores) será feita exclusivamente de forma eletrônica pelo Sistema, sendo o autor responsável pelo artigo informado, automaticamente, por e-mail, sobre qualquer mudança de status do artigo.
- f* A submissão só se completa quando anexado o texto do artigo em Word e em pdf no campo apropriado.
- f* Fotografias, desenhos e gravuras devem ser inseridas no texto e também enviadas, em separado, em arquivo com extensão jpg em alta qualidade (mínimo 300dpi), zipado, inserido no campo próprio.
  
- f* Tabelas e gráficos não se enquadram no campo de arquivo zipado, devendo ser inseridas no corpo do artigo.
- f* É de exclusiva responsabilidade de quem submete o artigo certificar-se de que cada um dos autores tenha conhecimento e concorde com a inclusão de seu nome no mesmo submetido.
  
- f* O ABMVZ comunicará via eletrônica a cada autor, a sua participação no artigo. Caso, pelo menos um dos autores não concorde com sua participação como autor, o artigo será recusado.

## **Tipos de artigos aceitos para publicação:**

### ***f* Artigo científico**

É o relato completo de um trabalho experimental. Baseia-se na premissa de que os resultados são posteriores ao planejamento da pesquisa.

Seções do texto: Título (português e inglês), Autores e Filiação, Resumo, Abstract, Introdução, Material e Métodos, Resultados, Discussão (ou Resultados e Discussão), Conclusões, Agradecimentos (quando houver) e Referências.

O número de páginas não deve exceder a 15, incluindo tabelas e figuras. O número de Referências não deve exceder a 30.

## **Preparação dos textos para publicação**

Os artigos devem ser redigidos em português ou inglês, na forma impessoal. Para ortografia em inglês recomenda-se o *Webster's Third New International Dictionary*. Para ortografia em português adota-se o *Vocabulário Ortográfico da Língua Portuguesa*, da Academia Brasileira de Letras.

## **Formatação do texto**

*f* O texto deve ser apresentado em Microsoft Word, em formato A4, com margem 3 cm (superior, inferior, direita e esquerda), em fonte Times New Roman tamanho 12 e em espaçamento entrelinhas 1,5, em todas as páginas, com linhas numeradas.

*f* Não usar rodapé. Referências a empresas e produtos, por exemplo, devem vir, obrigatoriamente, entre parêntesis no corpo do texto na seguinte ordem: nome do produto, substância, empresa e país.

## **Seções de um artigo**

*f* **Título.** Em português e em inglês. Deve contemplar a essência do artigo e não ultrapassar 150 dígitos.

*f* **Autores e Filiação.** Os nomes dos autores são colocados abaixo do título, com identificação da instituição a que pertencem. O autor para correspondência e seu e-mail devem ser indicados com asterisco.

**Nota:**

1. O texto do artigo em Word deve conter o nome dos autores e filiação.
2. O texto do artigo em pdf não deve conter o nome dos autores e filiação.

*f* **Resumo e Abstract.** Deve ser o mesmo apresentado no cadastro contendo até 2000 dígitos incluindo os espaços, em um só parágrafo. Não repetir o título e incluir os principais resultados numéricos, citando-os sem explicá-los, quando for o caso. Cada frase deve conter uma informação. Atenção especial às conclusões.

*f* **Palavras-chave e Keywords.** No máximo cinco.

*f* **Introdução.** Explanação concisa, na qual são estabelecidos brevemente o problema, sua pertinência e relevância e os objetivos do trabalho. Devem conter poucas referências, suficientes para balizá-la.

*f* **Material e Métodos.** Citar o desenho experimental, o material envolvido, a descrição dos métodos usados ou referenciar corretamente os métodos já publicados. Não usar subtítulos. Nos trabalhos que envolvam animais e organismos geneticamente modificados deverá constar, obrigatoriamente, o número do protocolo de aprovação do Comitê de Bioética e/ou de Biossegurança, quando for o caso.

*f* **Resultados.** Apresentar clara e objetivamente os resultados encontrados.

*f* **Tabela.** Conjunto de dados alfanuméricos ordenados em linhas e colunas. Usar linhas horizontais na separação dos cabeçalhos e no final da tabela. A

legenda recebe inicialmente a palavra Tabela, seguida pelo número de ordem em algarismo arábico e é referida no texto como Tab., mesmo quando se referir a várias tabelas. Pode ser apresentada em espaçamento simples e fonte de tamanho menor que 12 (menor tamanho aceito é 8).

*f* **Figura.** Qualquer ilustração que apresente linhas e pontos: desenho, fotografia, gráfico, fluxograma, esquema, etc. A legenda recebe inicialmente a palavra Figura, seguida do número de ordem em algarismo arábico e é referida no texto como Fig., mesmo se referir a mais de uma figura. As fotografias e desenhos com alta qualidade em formato jpg, devem ser também enviadas, em um arquivo zipado, no campo próprio de submissão.

**Nota:**

Toda tabela e/ou figura que já tenha sido publicada deve conter, abaixo da legenda, informação sobre a fonte (autor, autorização de uso, data) e a correspondente referência deve figurar nas Referências.

As tabelas e figuras devem preferencialmente, ser inseridas no texto no parágrafo seguinte à sua primeira citação.

Discussão. Discutir somente os resultados obtidos no trabalho. (Obs.: As seções Resultados e Discussão poderão ser apresentadas em conjunto a juízo do autor, sem prejudicar qualquer das partes).

Conclusões. As conclusões devem apoiar-se nos resultados da pesquisa executada.

Agradecimentos. Não obrigatório. Devem ser concisamente expressados.

Referências. As referências devem ser relacionadas em ordem alfabética. Evitar referenciar livros e teses. Dar preferência a artigos publicados em revistas

nacionais e internacionais, indexadas. São adotadas as normas ABNT/NBR-6023 de 2002, adaptadas conforme exemplos:

### Como referenciar:

#### 1. Citações no texto

Citações no texto deverão ser feitas de acordo com ABNT/NBR 10520 de 2002. A indicação da fonte entre parênteses sucede à citação para evitar interrupção na sequência do texto, conforme exemplos:

autoria única: (Silva, 1971) ou Silva (1971); (Anuário..., 1987/88) ou Anuário... (1987/88).

dois autores: (Lopes e Moreno, 1974) ou Lopes e Moreno (1974)

mais de dois autores: (Ferguson *et al.*, 1979) ou Ferguson *et al.* (1979) 9 mais de um artigo citado: Dunne (1967); Silva (1971); Ferguson *et al.*

(1979) ou (Dunne, 1967; Silva, 1971; Ferguson *et al.*, 1979), sempre em ordem cronológica ascendente e alfabética de autores para artigos do mesmo ano.

Citação de citação. Todo esforço deve ser empreendido para se consultar o documento original. Em situações excepcionais pode-se reproduzir a informação já citada por outros autores. No texto, citar o sobrenome do autor do documento não consultado com o ano de publicação, seguido da expressão citado por e o sobrenome do autor e ano do documento consultado. Nas Referências, deve-se incluir apenas a fonte consultada.

Comunicação pessoal. Não fazem parte das Referências. Na citação coloca-se o sobrenome do autor, a data da comunicação, nome da Instituição à qual o autor é vinculado.

2. **Periódicos** (até 4 autores, citar todos. Acima de 4 autores citar 3 autores et al.): ANUÁRIO ESTATÍSTICO DO BRASIL. v.48, p.351, 1987-88.

FERGUSON, J.A.; REEVES, W.C.; HARDY, J.L. Studies on immunity to alphaviruses in foals. Am. J. Vet. Res., v.40, p.5-10, 1979.

HOLENWEGER, J.A.; TAGLE, R.; WASERMAN, A. *et al.* Anestesia general del canino. *Not. Med. Vet.*, n.1, p.13-20, 1984.

3. **Publicação avulsa** (até 4 autores, citar todos. Acima de 4 autores citar 3 autores et al.):

DUNNE, H.W. (Ed). *Enfermedades del cerdo*. México: UTEHA, 1967. 981p.

LOPES, C.A.M.; MORENO, G. Aspectos bacteriológicos de ostras, mariscos e mexilhões. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, 14., 1974, São Paulo. *Anais...* São Paulo: [s.n.] 1974. p.97. (Resumo).

MORRIL, C.C. Infecciones por clostridios. In: DUNNE, H.W. (Ed). *Enfermedades del cerdo*. México: UTEHA, 1967. p.400-415.

NUTRIENT requirements of swine. 6.ed. Washington: National Academy of Sciences, 1968. 69p.

SOUZA, C.F.A. Produtividade, qualidade e rendimentos de carcaça e de carne em bovinos de corte. 1999. 44f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

4. **Documentos eletrônicos** (até 4 autores, citar todos. Acima de 4 autores citar 3 autores et al.):

QUALITY food from animals for a global market. Washington: Association of American Veterinary Medical College, 1995. Disponível em: <<http://www.org/critca16.htm>>. Acessado em: 27 abr. 2000.

JONHNSON, T. Indigenous people are now more combative, organized. *Miami Herald*, 1994. Disponível em: <<http://www.summit.fiu.edu/MiamiHerld-Summit-RelatedArticles/>>. Acessado em: 5 dez. 1994.

**Nota:**

Artigos que não estejam rigorosamente dentro das normas acima não serão aceitos para avaliação.

O Sistema reconhece, automaticamente, como “Desistência do Autor” artigos em diligência ou “Aguardando diligência do autor”, que não tenha sido respondido no prazo dado pelo Sistema.

**Taxas de submissão e de publicação:**

Taxa de submissão. A taxa de submissão de R\$30,00 deverá ser paga por meio de boleto bancário emitido pelo sistema eletrônico de submissão de artigos. Ao solicitar o boleto bancário, o autor informará os dados para emissão da nota fiscal. Somente artigos com taxa paga de submissão serão avaliados. Caso a taxa não seja quitada em até 30 dias será considerado como desistência do autor.

Taxa de publicação. A taxa de publicação de R\$70,00, por página impressa em preto e R\$220,00 por página impressa em cores será cobrada do autor indicado para correspondência, por ocasião da prova final do artigo. A taxa de publicação deverá ser paga por meio de boleto bancário emitido pelo sistema eletrônico de submissão de artigos. Ao solicitar o boleto bancário, o autor informará os dados para emissão da nota fiscal.

**Recursos e diligências:**

No caso de o autor encaminhar resposta a diligências solicitadas pelo ABMVZ, ou documento de recurso, o mesmo deverá constar como a(s) primeira(s) página(s) do texto do artigo somente na versão em Word.

No caso de artigo não aceito, se o autor julgar pertinente encaminhar recurso, o mesmo deve ser feito pelo e-mail [abmvz.artigo@abmvz.org.br](mailto:abmvz.artigo@abmvz.org.br).

**ANEXO B**

Normas para publicação no periódico científico na animal reproduction science

**Normas para preparação de trabalhos científicos para publicação na animal  
reproduction science**

**ANIMAL REPRODUCTION SCIENCE**

An International Journal

**AUTHOR INFORMATION PACK**

2013: 1.581 © Thomson Reuters Journal Citation Reports 2014

**GUIDE FOR AUTHORS****INTRODUCTION****Types of Paper**

1. Original Research Papers (Regular Papers)
2. Review Articles

Original Research Papers should report the results of research that comprises one or a series of experiments. The paper should contribute to increasing our understanding of the biology and/or manipulation of reproduction in animals. The material should not have been previously published elsewhere, except in a preliminary form.

Review Articles should cover subjects falling within the scope of the journal which are of active current interest. They may be submitted or invited. Invited reviews will normally be solicited by the Review's Editor, but suggestions for appropriate review topics may be sent to:

K.L. Macmillan University of Melbourne Veterinary Clinical Centre 250 Princess Highway  
VIC 3030 Werribee, Australia k.macmillan@unimelb.edu.au

## Contact details for submission

Authors should send queries concerning the submission process or journal procedures to AuthorSupport@elsevier.com. Authors can check the status of their manuscript within the review procedure using Elsevier Editorial System.

## BEFORE YOU BEGIN

### Ethics in publishing

For information on Ethics in publishing and Ethical guidelines for journal publication see <http://www.elsevier.com/publishingethics> and <http://www.elsevier.com/journal-authors/ethics>.

If the work involves the use of animals or human subjects, the author should ensure the work described has been carried out in accordance with The Code of Ethics of the World Medical Association (Declaration of Helsinki) for experiments involving humans.

<http://www.wma.net/en/30publications/10policies/b3/index.html>; EU Directive 2010/63/EU for animal experiments

[http://ec.europa.eu/environment/chemicals/lab\\_animals/legislation\\_en.htm](http://ec.europa.eu/environment/chemicals/lab_animals/legislation_en.htm);

Uniform Requirements for manuscripts submitted to Biomedical journals <http://www.icmje.org>. Authors should include a statement in the manuscript that informed consent was obtained for experimentation with human subjects. The privacy rights of human subjects must always be observed.

Unnecessary cruelty in animal experimentation is not acceptable to the Editors of Animal Reproduction Science.

### Conflict of interest

All authors must disclose any financial and personal relationships with other people or organizations that could inappropriately influence (bias) their work. Examples of potential conflicts of interest include employment, consultancies, stock ownership, honoraria, paid expert testimony, patent applications/registrations, and grants or other funding.

See also <http://www.elsevier.com/conflictsofinterest>. Further information and an example of a Conflict of Interest form can be found at:

[http://help.elsevier.com/app/answers/detail/a\\_id/286/p/7923](http://help.elsevier.com/app/answers/detail/a_id/286/p/7923).

### **Submission declaration**

Submission of an article implies that the work described has not been published previously (except in the form of an abstract or as part of a published lecture or academic thesis or as an electronic preprint, see <http://www.elsevier.com/postingpolicy>), that it is not under consideration for publication elsewhere, that its publication is approved by all authors and tacitly or explicitly by the responsible authorities where the work was carried out, and that, if accepted, it will not be published elsewhere including electronically in the same form, in English or in any other language, without the written consent of the copyright-holder.

### **Authorship**

All authors should have made substantial contributions to all of the following: (1) the conception and design of the study, or acquisition of data, or analysis and interpretation of data, (2) drafting the article or revising it critically for important intellectual content, (3) final approval of the version to be submitted.

### **Changes to authorship**

This policy concerns the addition, deletion, or rearrangement of author names in the authorship of accepted manuscripts:

Before the accepted manuscript is published in an online issue: Requests to add or remove an author, or to rearrange the author names, must be sent to the Journal Manager from the corresponding author of the accepted manuscript and must include: (a) the reason the name should be added or removed, or the author names rearranged and (b) written confirmation (e-mail, fax, letter) from all authors that they agree with the addition, removal or rearrangement. In the case of addition or removal of authors, this includes confirmation from the author being added or removed. Requests that are not sent by the corresponding author will be forwarded by the Journal Manager to the corresponding author, who must follow

the procedure as described above. Note that: (1) Journal Managers will inform the Journal Editors of any such requests and (2) publication of the accepted manuscript in an online issue is suspended until authorship has been agreed.

After the accepted manuscript is published in an online issue: Any requests to add, delete, or rearrange author names in an article published in an online issue will follow the same policies as noted above and result in a corrigendum.

### Copyright

This journal offers authors a choice in publishing their research: Open access and Subscription.

#### **For subscription articles**

Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete a 'Journal Publishing Agreement' (for more information on this and copyright, see <http://www.elsevier.com/copyright>). An e-mail will be sent to the corresponding author confirming receipt of the manuscript together with a 'Journal Publishing Agreement' form or a link to the online version of this agreement.

Subscribers may reproduce tables of contents or prepare lists of articles including abstracts for internal circulation within their institutions. Permission of the Publisher is required for resale or distribution outside the institution and for all other derivative works, including compilations and translations (please consult <http://www.elsevier.com/permissions>). If excerpts from other copyrighted works are included, the author(s) must obtain written permission from the copyright owners and credit the source(s) in the article. Elsevier has preprinted forms for use by authors in these cases: please consult <http://www.elsevier.com/permissions>.

#### **For open access articles**

Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete an 'Exclusive License Agreement' (for more information see <http://www.elsevier.com/OAauthoragreement>).

Permitted reuse of open access articles is determined by the author's choice of user license (see <http://www.elsevier.com/openaccesslicenses>).

**Retained author rights**

As an author you (or your employer or institution) retain certain rights. For more information on author rights for:

Subscription articles please see <http://www.elsevier.com/journal-authors/author-rights-and-responsibilities>.

Open access articles please see <http://www.elsevier.com/OAauthoragreement>.

**Role of the funding source**

You are requested to identify who provided financial support for the conduct of the research and/or preparation of the article and to briefly describe the role of the sponsor(s), if any, in study design; in the collection, analysis and interpretation of data; in the writing of the report; and in the decision to submit the article for publication. If the funding source(s) had no such involvement then this should be stated.

**Funding body agreements and policies**

Elsevier has established agreements and developed policies to allow authors whose articles appear in journals published by Elsevier, to comply with potential manuscript archiving requirements as specified as conditions of their grant awards. To learn more about existing agreements and policies please visit <http://www.elsevier.com/fundingbodies>.

**Open access**

This journal offers authors a choice in publishing their research:

**Open access**

Articles are freely available to both subscribers and the wider public with permitted reuse

A open access publication fee is payable by authors or their research funder

**Subscription**

Articles are made available to subscribers as well as developing countries and patient groups through our access programs (<http://www.elsevier.com/access>)

**No open access publication fee**

All articles published open access will be immediately and permanently free for everyone to read and download. Permitted reuse is defined by your choice of one of the following Creative Commons user licenses:

Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike (CC BY-NC-SA): for non-commercial purposes, lets others distribute and copy the article, to create extracts, abstracts and other revised versions, adaptations or derivative works of or from an article (such as a translation), to include in a collective work (such as an anthology), to text and data mine the article, as long as they credit the author(s), do not represent the author as endorsing their adaptation of the article, do not modify the article in such a way as to damage the author's honor or reputation, and license their new adaptations or creations under identical terms (CC BY-NC-SA).

Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs (CC BY-NC-ND): for non-commercial purposes, lets others distribute and copy the article, and to include in a collective work (such as an anthology), as long as they credit the author(s) and provided they do not alter or modify the article.

Elsevier has established agreements with funding bodies, <http://www.elsevier.com/fundingbodies>. This ensures authors can comply with funding body open access requirements, including specific user licenses, such as CC BY. Some authors may also be reimbursed for associated publication fees. If you need to comply with your funding body policy, you can apply for the CC BY license after your manuscript is accepted for publication.

To provide open access, this journal has a publication fee which needs to be met by the authors or their research funders for each article published open access.

Your publication choice will have no effect on the peer review process or acceptance of submitted articles.

The publication fee for this journal is \$2500, excluding taxes. Learn more about Elsevier's pricing policy: <http://www.elsevier.com/openaccesspricing>.

**Language (usage and editing services)**

Please write your text in good english (American or British usage is accepted, but not a mixture of These). Authors who feel english Their language manuscript may

require editing to Eliminate possible grammatical or spelling errors and to conform to correct scientific english may wish to use the english Language Editing service available from Elsevier's WebShop (<http://webshop.elsevier.com/languageediting/>) or visit our customer support site (<http://support.elsevier.com>) for more information.

### **Submission**

Submission to this journal proceeds totally online and you will be guided stepwise through the creation and uploading of your files. The system automatically converts source files to a single PDF file of the article, which is used in the peer-review process. Please note that even though manuscript source files are converted to PDF files at submission for the review process, these source files are needed for further processing after acceptance. All correspondence, including notification of the Editor's decision and requests for revision, takes place by e-mail removing the need for a paper trail.

### **Submit your article**

Please submit your article via <http://ees.elsevier.com/anirep>.

### **Referees**

Please submit the names and institutional e-mail addresses of several potential referees. For more details, visit our Support site. Note that the editor retains the sole right to decide whether or not the suggested reviewers are used.

## **PREPARATION**

### **Article structure**

Manuscripts should have numbered lines with wide margins and double spacing throughout, i.e. also for abstracts, footnotes and references. Every page of the manuscript, including the title page, references, tables, etc., should be numbered. However, in the text no reference should be made to page numbers; if necessary, one may refer to sections. Avoid excessive usage of italics to emphasize part of the text.

**Introduction**

State the objectives of the work and provide an adequate background, avoiding a detailed literature survey or a summary of the results.

The introduction "sets the scene" for your work. Do not over-reference statements; two or three key references should suffice unless each adds something specific. The introduction should not normally be more than 500 words (approximately two manuscript pages).

**Material and methods**

Provide sufficient detail to allow the work to be reproduced. Methods already published should be indicated by a reference: only relevant modifications should be described.

**Results**

Results should be clear and concise.

**Discussion**

This should explore the significance of the results of the work, not repeat them. A combined Results and Discussion section is often appropriate. Avoid extensive citations and discussion of published literature.

**Conclusions**

The main conclusions of the study may be presented in a short Conclusions section, which may stand alone or form a subsection of a Discussion or Results and Discussion section.

**Essential title page information**

- Title. Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible.
- Author names and affiliations. Where the family name may be ambiguous (e.g., a double name), please indicate this clearly. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lower-case superscript letter immediately after the author's name and in front of the appropriate address. Provide the full postal address of each

affiliation, including the country name and, if available, the e-mail address of each author.

- Corresponding author. Clearly indicate who will handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. Ensure that phone numbers (with country and area code) are provided in addition to the e-mail address and the complete postal address. Contact details must be kept up to date by the corresponding author.
- Present/permanent address. If an author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a 'Present address' (or 'Permanent address') may be indicated as a footnote to that author's name. The address at which the author actually did the work must be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes.

### **Abstract**

A concise and factual abstract is required of not more than 250 words. The abstract should state briefly the purpose of the research, the principal results and major conclusions. An abstract is often presented separately from the article, so it must be able to stand alone. For this reason, References should be avoided, but if essential, then cite the author(s) and year(s). Also, non-standard or uncommon abbreviations should be avoided, but if essential they must be defined at their first mention in the abstract itself.

### **Graphical abstract**

A Graphical abstract is optional and should summarize the contents of the article in a concise, pictorial form designed to capture the attention of a wide readership online. Authors must provide images that clearly represent the work described in the article. Graphical abstracts should be submitted as a separate file in the online submission system. Image size: Please provide an image with a minimum of 531 × 1328 pixels (h × w) or proportionally more. The image should be readable at a size of 5 × 13 cm using a regular screen resolution of 96 dpi. Preferred file types: TIFF, EPS, PDF or MS Office files. See <http://www.elsevier.com/graphicalabstracts> for examples.

Authors can make use of Elsevier's Illustration and Enhancement service to ensure the best presentation of their images also in accordance with all technical requirements: Illustration Service.

### **Highlights**

Highlights are mandatory for this journal. They consist of a short collection of bullet points that convey the core findings of the article and should be submitted in a separate file in the online submission system. Please use 'Highlights' in the file name and include 3 to 5 bullet points (maximum 85 characters, including spaces, per bullet point). See <http://www.elsevier.com/highlights> for examples.

### **Keywords**

Immediately after the abstract, provide a maximum of 6 keywords, using American spelling and avoiding general and plural terms and multiple concepts (avoid, for example, 'and', 'of'). Be sparing with abbreviations: only abbreviations firmly established in the field may be eligible. These keywords will be used for indexing purposes.

### **Acknowledgements**

Collate acknowledgements in a separate section at the end of the article before the references and do not, therefore, include them on the title page, as a footnote to the title or otherwise. List here those individuals who provided help during the research (e.g., providing language help, writing assistance or proof reading the article, etc.).

Authors and editors are, by general agreement, obliged to accept the rules governing biological nomenclature, as laid down in the International Code of Botanical Nomenclature, the International Code of Nomenclature of Bacteria, and the International Code of Zoological Nomenclature.

All biotica (crops, plants, insects, birds, mammals, etc.) should be identified by their scientific names when the English term is first used, with the exception of common domestic animals.

All biocides and other organic compounds must be identified by their Geneva names when first used in the text. Active ingredients of all formulations should be likewise identified.

### **Nomenclature and units**

Follow internationally accepted rules and conventions: use the international system of units (SI). If other quantities are mentioned, give their equivalent in SI. You are urged to consult IUB: Biochemical Nomenclature and Related Documents: <http://www.chem.qmw.ac.uk/iubmb/> for further information.

### **Math formulae**

Present simple formulae in the line of normal text where possible and use the solidus (/) instead of a horizontal line for small fractional terms, e.g., X/Y. In principle, variables are to be presented in italics. Powers of e are often more conveniently denoted by exp. Number consecutively any equations that have to be displayed separately from the text (if referred to explicitly in the text).

### **Footnotes**

Footnotes should be used sparingly. Number them consecutively throughout the article, using superscript Arabic numbers. Many wordprocessors build footnotes into the text, and this feature may be used. Should this not be the case, indicate the position of footnotes in the text and present the footnotes themselves separately at the end of the article. Do not include footnotes in the Reference list.

### **Table footnotes**

Indicate each footnote in a table with a superscript lowercase letter.

### **Artwork**

Electronic artwork General points

- Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork.
- Embed the used fonts if the application provides that option.
- Aim to use the following fonts in your illustrations: Arial, Courier, Times New Roman, Symbol, or use fonts that look similar.
- Number the illustrations according to their sequence in the text.
- Use a logical naming convention for your artwork files.
- Provide captions to illustrations separately.
- Size the illustrations close to the desired dimensions of the printed version.
- Submit each illustration as a separate file.

A detailed guide on electronic artwork is available on our website:  
<http://www.elsevier.com/artworkinstructions>

You are urged to visit this site; some excerpts from the detailed information are given here.

### **Formats**

If your electronic artwork is created in a Microsoft Office application (Word, PowerPoint, Excel) then please supply 'as is' in the native document format.

Regardless of the application used other than Microsoft Office, when your electronic artwork is finalized, please 'Save as' or convert the images to one of the following formats (note the resolution requirements for line drawings, halftones, and line/halftone combinations given below):

EPS (or PDF): Vector drawings, embed all used fonts.

TIFF (or JPEG): Color or grayscale photographs (halftones), keep to a minimum of 300 dpi.

TIFF (or JPEG): Bitmapped (pure black & white pixels) line drawings, keep to a minimum of 1000 dpi. TIFF (or JPEG): Combinations bitmapped line/half-tone (color or grayscale), keep to a minimum of 500 dpi.

### **Please do not:**

- Supply files that are optimized for screen use (e.g., GIF, BMP, PICT, WPG); these typically have a low number of pixels and limited set of colors;
- Supply files that are too low in resolution;
- Submit graphics that are disproportionately large for the content.

### **Color artwork**

Please make sure that artwork files are in an acceptable format (TIFF (or JPEG), EPS (or PDF), or MS Office files) and with the correct resolution. If, together with your accepted article, you submit usable color figures then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in color on the Web (e.g., ScienceDirect and other sites) regardless of whether or not these illustrations are reproduced in color in the printed version. For color reproduction in print, you will receive information regarding the costs from Elsevier after receipt of your accepted article. Please indicate your preference for color: in print or on the Web only. For

further information on the preparation of electronic artwork, please see <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

Please note: Because of technical complications which can arise by converting color figures to 'gray scale' (for the printed version should you not opt for color in print) please submit in addition usable black and white versions of all the color illustrations.

### **Tables**

Number tables consecutively in accordance with their appearance in the text. Place footnotes to tables below the table body and indicate them with superscript lowercase letters. Avoid vertical rules. Be sparing in the use of tables and ensure that the data presented in tables do not duplicate results described elsewhere in the article.

### **Web references**

As a minimum, the full URL should be given and the date when the reference was last accessed. Any further information, if known (DOI, author names, dates, reference to a source publication, etc.), should also be given. Web references can be listed separately (e.g., after the reference list) under a different heading if desired, or can be included in the reference list.

### **Reference style**

Text: All citations in the text should refer to:

1. Single author: the author's name (without initials, unless there is ambiguity) and the year of publication;
2. Two authors: both authors' names and the year of publication;
3. Three or more authors: first author's name followed by 'et al.' and the year of publication. Citations may be made directly (or parenthetically). Groups of references should be listed first alphabetically, then chronologically.

Examples: 'as demonstrated (Allan, 2000a, 2000b, 1999; Allan and Jones, 1999). Kramer et al. (2010) have recently shown ....'

List: References should be arranged first alphabetically and then further sorted chronologically if necessary. More than one reference from the same author(s) in

the same year must be identified by the letters 'a', 'b', 'c', etc., placed after the year of publication.

Examples:

**Reference to a journal publication:**

Van der Geer, J., Hanraads, J.A.J., Lupton, R.A., 2010. The art of writing a scientific article. *J. Sci. Commun.* 163, 51–59.

**Reference to a book:**

Strunk Jr., W., White, E.B., 2000. *The Elements of Style*, fourth ed. Longman, New York. Reference to a chapter in an edited book:

Mettam, G.R., Adams, L.B., 2009. How to prepare an electronic version of your article, in: Jones, B.S., Smith, R.Z. (Eds.), *Introduction to the Electronic Age*. E-Publishing Inc., New York, pp. 281–304.

**Video data**

Elsevier accepts video material and animation sequences to support and enhance your scientific research. Authors who have video or animation files that they wish to submit with their article are strongly encouraged to include links to these within the body of the article. This can be done in the same way as a figure or table by referring to the video or animation content and noting in the body text where it should be placed. All submitted files should be properly labeled so that they directly relate to the video file's content. In order to ensure that your video or animation material is directly usable, please provide the files in one of our recommended file formats with a preferred maximum size of 50 MB. Video and animation files supplied will be published online in the electronic version of your article in Elsevier Web products, including ScienceDirect: <http://www.sciencedirect.com>. Please supply 'stills' with your files: you can choose any frame from the video or animation or make a separate image. These will be used instead of standard icons and will personalize the link to your video data. For more detailed instructions please visit our video instruction pages at <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>. Note: since video and animation cannot be embedded in the print version of the journal, please provide text for both

the electronic and the print version for the portions of the article that refer to this content.

### **AudioSlides**

The journal encourages authors to create an AudioSlides presentation with their published article. AudioSlides are brief, webinar-style presentations that are shown next to the online article on ScienceDirect. This gives authors the opportunity to summarize their research in their own words and to help readers understand what the paper is about. More information and examples are available at <http://www.elsevier.com/audioslides>. Authors of this journal will automatically receive an invitation e-mail to create an AudioSlides presentation after acceptance of their paper.

### **Supplementary data**

Elsevier accepts electronic supplementary material to support and enhance your scientific research. Supplementary files offer the author additional possibilities to publish supporting applications, high-resolution images, background datasets, sound clips and more. Supplementary files supplied will be published online alongside the electronic version of your article in Elsevier Web products, including ScienceDirect: <http://www.sciencedirect.com>. In order to ensure that your submitted material is directly usable, please provide the data in one of our recommended file formats. Authors should submit the material in electronic format together with the article and supply a concise and descriptive caption for each file. For more detailed instructions please visit our artwork instruction pages at <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

### **Submission checklist**

The following list will be useful during the final checking of an article prior to sending it to the journal for review. Please consult this Guide for Authors for further details of any item.

Ensure that the following items are present:

One author has been designated as the corresponding author with contact details:

- E-mail address
- Full postal address

- Phone numbers

All Have Been Necessary files uploaded, and contain:

- Keywords
- All figure captions
- All tables (including title, description, footnotes) Further considerations
- Manuscript Has Been 'spell-checked' and 'grammar-checked'

All necessary files have been uploaded, and contain:

- Keywords
- All figure captions
- All tables (including title, description, footnotes) Further considerations
- Manuscript has been 'spell-checked' and 'grammar-checked'
- References are in the correct format for this journal
- All references mentioned in the Reference list are cited in the text, and vice versa
- Permission has been obtained for use of copyrighted material from other sources (including the Web)
- Color figures are clearly marked as being intended for color reproduction on the Web (free of charge) and in print, or to be reproduced in color on the Web (free of charge) and in black-and-white in print
- If only color on the Web is required, black-and-white versions of the figures are also supplied for printing purposes

For any further information please visit our customer support site at <http://support.elsevier.com>.

## **AFTER ACCEPTANCE**

### **Use of the Digital Object Identifier**

The Digital Object Identifier (DOI) may be used to cite and link to electronic documents. The DOI consists of a unique alpha-numeric character string which is assigned to a document by the publisher upon the initial electronic publication. The assigned DOI never changes. Therefore, it is an ideal medium for citing a document, particularly 'Articles in press' because they have not yet received their full bibliographic information. Example of a correctly given DOI (in URL format; here an article in the journal Physics Letters B):

<http://dx.doi.org/10.1016/j.physletb.2010.09.059>

When you use a DOI to create links to documents on the web, the DOIs are guaranteed never to change.

### **Online proof correction**

Corresponding authors will receive an e-mail with a link to our online proofing system, allowing annotation and correction of proofs online. The environment is similar to MS Word: in addition to editing text, you can also comment on figures/tables and answer questions from the Copy Editor. Web-based proofing provides a faster and less error-prone process by allowing you to directly type your corrections, eliminating the potential introduction of errors.

If preferred, you can still choose to annotate and upload your edits on the PDF version. All instructions for proofing will be given in the e-mail we send to authors, including alternative methods to the online version and PDF.

We will do everything possible to get your article published quickly and accurately - please upload all of your corrections within 48 hours. It is important to ensure that all corrections are sent back to us in one communication. Please check carefully before replying, as inclusion of any subsequent corrections cannot be guaranteed. Proofreading is solely your responsibility. Note that Elsevier may proceed with the publication of your article if no response is received.

### **Offprints**

The corresponding author, at no cost, will be provided with a personalized link providing 50 days free Access to the final published version of the article on ScienceDirect. This link can also be used for sharing via email and social networks. For an extra charge, paper offprints can be ordered via the offprint order form which is sent once the article is accepted for publication. Both corresponding and co-authors may order offprints at any time via Elsevier's WebShop (<http://webshop.elsevier.com/myarticleservices/offprints>). Authors requiring printed copies of multiple articles may use Elsevier WebShop's 'Create Your Own Book' service to collate multiple articles within a single cover (<http://webshop.elsevier.com/myarticleservices/booklets>).

**AUTHOR INQUIRIES**

You can track your submitted article at

[http://help.elsevier.com/app/answers/detail/a\\_id/89/p/8045/](http://help.elsevier.com/app/answers/detail/a_id/89/p/8045/). You can track your accepted article at <http://www.elsevier.com/trackarticle>. You are also welcome to contact Customer Support via <http://support.elsevier.com>.

© Copyright 2014 Elsevier | <http://www.elsevier.com>