



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL**

EMANUELA RIBEIRO MOURA

**EFEITO DO β -CARIOFILENO E ÁCIDO ELÁGICO NA CRIOPRESERVAÇÃO DE
SÊMEN OVINO**

Teresina
2023

EMANUELA RIBEIRO MOURA

EFEITO DO β -CARIOFILENO E ÁCIDO ELÁGICO NA CRIOPRESERVAÇÃO DE SÊMEN OVINO

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Universidade Federal do Piauí-UFPI, na área de concentração Sanidade e Reprodução animal, e linha de pesquisa Morfofisiologia, Fisiopatologia, Biotécnicas da Reprodução e Fisiopatologia do Estresse como requisito para a obtenção do título de Doutora em Ciência Animal.

Área de Concentração: Sanidade e Reprodução Animal.

Orientador: Prof. Dr. Amilton Paulo Raposo Costa

Coorientador: Prof. Dr. Antônio de Sousa Júnior

Teresina
2023

FICHA CATALOGRÁFICA
Universidade Federal do Piauí
Biblioteca Setorial CCA
Serviço de Representação da Informação

M929e Moura, Emanuela Ribeiro.
Efeito do β -cariofileno e ácido elágico na criopreservação de semen ovino / Emanuela Ribeiro Moura. -- 2023.
91 f.: il.

Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Piauí, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal - Teresina, 2023.

“Orientador: Prof. Dr. Amilton Paulo Raposo Costa.”

1. Carneiro. 2. Antioxidante. 3. Peroxidação. 4. Reprodução. I. Costa, Amilton Paulo Raposo. II. Título.

CDD 636.08926

Bibliotecário: Rafael Gomes de Sousa - CRB3/1163

EMANUELA RIBEIRO MOURA

EFEITO DO β -CARIOFILENO E ÁCIDO ELÁGICO NA CRIOPRESERVAÇÃO DE
SÊMEN OVINO

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Universidade Federal do Piauí para a obtenção do título de Doutora em Ciência Animal.

Área de Concentração: Sanidade e Reprodução Animal.

Orientador: Prof. Dr. Amilton Paulo Raposo Costa

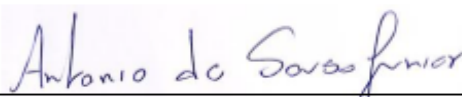
Coorientador: Prof. Dr. Antônio de Sousa Júnior

Tese aprovada em: 25/05/2020

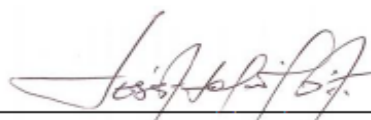
Banca Examinadora:



Prof. Dr. Amilton Paulo Raposo Costa (Presidente) / DMV/CCA/UFPI



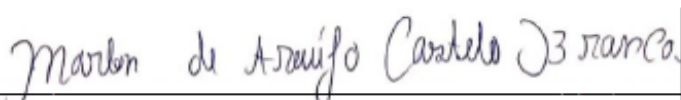
Prof. Dr. Antonio de Sousa Junior (Interno) / CTT/UFPI



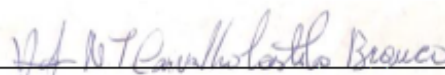
Prof. Dr. José Adalmir Torres de Souza (Interno) / DCCV/CCA/UFPI



Profa. Dra. Isolda Márcia Rocha do Nascimento (Interna) / CTT/UFPI



Prof. Dr. Marlon de Araújo Castelo Branco (Externo) / UNINOVAFAPI



Profa. Dra. Yndyra Nayan Teixeira Carvalho Castelo Branco (Externa) / UFS

*Dedico aos meus pais, Manoel
e Socorro, e ao meu esposo, Antônio
Pires, com todo amor e gratidão.*

AGRADECIMENTO

A Deus, o meu maior apoio, em especial, nos momentos de desânimo.

Aos meus pais, Manoel e Socorro, por todo amor, carinho e esforço investido na minha educação.

Aos meus irmãos, Jonathan e Gabriela, pelo afeto, apoio e companhia diária.

Ao meu noivo, Pires Júnior, por todo amor e que não mediu esforços para me auxiliar nessa etapa tão importante na minha profissão.

Ao meu orientador Prof. Dr. Amilton Paulo Raposo Costa, que me acompanha desde a graduação, quando dei os primeiros passos na pesquisa. Obrigada pela orientação, ensinamentos e por sanar minhas dúvidas.

Ao meu co-orientador Prof. Dr. Antônio de Sousa Júnior, do Colégio Técnico de Teresina – CTT-UFPI, por me acolher em seu laboratório, me repassar tão gentilmente seus conhecimentos e me ensinar a parte prática do projeto.

Ao Prof. Dr. José Adalmir Torres de Souza, pela disponibilização do Laboratório de Reprodução Animal –LBRA-UFPI.

À Prof^a. Dr^a Isolda Marcia Rocha do Nascimento, do Colégio Técnico de Teresina – CTT-UFPI, por ser sempre solícita e por ter ido comigo para Fortaleza me auxiliar na análise do CASA.

À Prof^a. Dr^a Yndyra Nayan Teixeira Carvalho Castelo Branco, da Universidade Federal do Sergipe, por sanar minhas dúvidas gentilmente quando solicitei.

Ao Prof. Dr. Marlon De Araújo Castelo Branco, do Centro Universitário Mauricio de Nassau (UNINASSAU), por me ensinar e me acompanhar nas análises das amostras.

À Prof^a Dra. Mariana Helena Chaves, do Departamento de Química da UFPI, por nos ceder tão gentilmente o ácido elágico, uma das substância-teste desta pesquisa.

Ao doutorando Marcimar, do Laboratório Tecnologia de Sêmen Caprino e Ovino da Universidade Estadual do Ceará, pelo auxílio na análise do CASA.

À Dra. Camila Ernanda, pelo seu apoio no protocolo de viabilidade celular e me auxiliar na estatística desse trabalho.

À doutoranda Ana Karolinne, por me ajudar com a análise de peroxidação lipídica.

Aos estagiários do Laboratório de Reprodução do Colégio Técnico de Teresina (CTT- UFPI), em especial Madalena, Marcos Vicente, Ednardo, Cárissom e Tacyane, pela grande ajuda com as coletas de sêmen e com manejo dos animais.

Às amigas queridas, Dra. Elis Rosélia, Dra. Camila Ernanda, Dra. Juliana e Dra. Julliet, que fizeram essa caminhada junto comigo e com quem compartilhei as alegrias e dificuldades deste trabalho. Crescemos juntas profissionalmente, mas também emocionalmente. Vocês foram essenciais, obrigada por fazerem parte dessa conquista!

Às colegas do Laboratório de Fisiologia Veterinária-UFPI, Dra. Daniele, doutoranda Jamilly, mestranda Ingrid, Dra. Moema, Dra. Tamnata e Dra. Marina, pelo apoio a essa pesquisa e também pelos momentos de descontração.

Aos professores do programa de Pós-graduação em Ciência Animal por contribuírem para meu aprendizado, compartilhando seus conhecimentos e experiências.

Aos funcionários do Laboratório de Fisiologia Veterinária-UFPI pelo apoio nessa pesquisa.

Aos funcionários e pós-graduandos do Laboratório de Reprodução Animal –LBRA-UFPI pelo apoio nesse projeto.

Às alunas de iniciação científica da UFPI, Nathyelle e Larissa pela ajuda na execução desse trabalho.

Aos funcionários do Centro de Ciência Agrárias por serem solícitos e acolhedores, me dando o suporte quando necessário.

Aos funcionários da secretaria do Programa de Pós-graduação em Ciência Animal -UFPI por todo auxílio durante esses seis anos de pós-graduação.

À Universidade Federal do Piauí pelo suporte de infraestrutura. Sou grata por esses doze anos.

Ao Colégio Técnico de Teresina (CTT- UFPI), pelo suporte de infraestrutura para criopreservação do sêmen.

Ao Laboratório de Biotecnologia da Reprodução Animal da Universidade Federal do Piauí (LBRA-UFPI) pelo suporte de infraestrutura para análises das amostras.

Ao Laboratório Tecnologia de Sêmen Caprino e Ovino da Universidade Estadual do Ceará (UECE), pelo suporte de infraestrutura para a análise do CASA.

À Capes pelo apoio financeiro.

Enfim, à toda minha família e amigos pela torcida!

*Que minha coragem seja maior
que meu medo e que minha força seja
tão grande quanto minha fé.*

Autor desconhecido

RESUMO

A criopreservação de sêmen oferece grandes vantagens para os programas de reprodução ovina, promovendo ganho genético. No entanto, a criopreservação causa crioinjúrias e reduz a qualidade espermática, devido principalmente ao excesso na produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) promovendo uma diminuição da motilidade espermática observada após o processo de descongelação. Isso se reflete nos baixos índices de fertilidade das fêmeas inseminadas com sêmen pós-descongelado quando comparados ao sêmen fresco. Porém, isso pode ser melhorado a partir de avanços nas biotécnicas reprodutivas e, principalmente, com as melhorias dos diluidores de preservação de sêmen. É importante pesquisas para avaliar os efeitos de novas substâncias antioxidantes para serem adicionados no diluidor convencional de criopreservação de sêmen, a fim de proteger as células espermáticas desse desequilíbrio na produção de espécies reativas de oxigênio (ERO). Pressupõe-se que o β -cariofileno (BC) e Ácido elágico (AE), ambos antioxidantes, podem contribuir para melhorar o desempenho reprodutivo de ovinos aumentando a viabilidade dos espermatozoides após o processo de criopreservação. Objetivou-se avaliar os efeitos dos antioxidantes (BC e AE) adicionados ao diluidor sobre a qualidade do sêmen de ovinos da raça Dorper após criopreservação. Foram utilizados seis carneiros da raça Dorper provenientes do Colégio Técnico de Teresina, Piauí, Brasil. O sêmen dos animais foi coletado uma vez por semana, durante 16 semanas. A coleta foi realizada com o auxílio de uma vagina artificial e uma fêmea em estro. As concentrações utilizadas neste estudo foram determinadas a partir da análise de viabilidade celular utilizando o teste de MTT. Foram formados os seguintes grupos experimentais: 1,0mM; 2,0mM e 3,0 mM de BC; e 0,5mM; 1,0mM; 2,0mM de AE, adicionados ao diluidor Tris-Gema. O diluidor Tris-Gema, sem adição das substâncias-teste, foi considerado como o grupo controle. O sêmen diluído foi envasado em palhetas e congelado em máquina TK 3000® e armazenadas em nitrogênio líquido. Após 15 dias de armazenamento, as amostras de sêmen foram descongeladas em banho-maria e foram feitos os testes *in vitro*. As amostras foram submetidas à análise espermática assistida por computador (Computer-assisted Sperm Analysis - CASA) para avaliar as características da cinética espermática pós-descongelação. A microscopia de epifluorescência foi utilizada para determinar a integridade acrossomal, integridade da membrana plasmática e potencial de membrana mitocondrial. Foi utilizada a microscopia de contraste de fase para avaliar a motilidade total e o vigor espermático no teste de termorresistência (TTR). Também, foi realizado o teste de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) a fim de verificar a reação de peroxidação lipídica. Concluiu-se que o β -cariofileno não melhorou a qualidade dos espermatozoides de carneiro após a criopreservação, embora tenha melhorado o potencial mitocondrial, na concentração 1,0mM, e atenuado o estresse oxidativo, na concentração de 2,0mM. O ácido elágico não melhorou a qualidade dos espermatozoides de carneiro após a criopreservação, conquanto tenha atenuado o estresse peroxidativo, nas concentrações de 0,5 e 1,0mM de AE.

Palavras-chave: Carneiro. Antioxidantes. Peroxidação. Reprodução.

ABSTRACT

Semen cryopreservation offers great advantages for sheep breeding programs, promoting genetic gain. However, cryopreservation causes cryoinjuries and reduces sperm quality, mainly due to the excess production of reactive oxygen species (ROS) promoting a decrease in sperm motility observed after the thawing process. This is reflected in the low fertility rates of females inseminated with post-thawed semen when compared to fresh semen. However, this can be improved from advances in reproductive biotechnologies and, mainly, with improvements in semen preservation extenders. It is important research to evaluate the effects of new antioxidant substances to be added in conventional semen cryopreservation extenders, in order to protect sperm cells from this imbalance in the production of reactive oxygen species (ROS). It is assumed that β -caryophyllene (BC) and Ellagic acid (EA), both antioxidants, can contribute to improve the reproductive performance of sheep by increasing sperm viability after the cryopreservation process. The objective was to evaluate the effects of antioxidants (BC and AE) added to the extender on the semen quality of Dorper sheep after cryopreservation. Six Dorper rams from the Technical College of Teresina, Piauí, Brazil were used. The animals' semen was collected once a week for 16 weeks. The collection was performed with the aid of an artificial vagina and a female in estrus. The concentrations used in this study were determined from cell viability analysis using the MTT test. The following experimental groups were formed: 1.0mM; 2.0mM and 3.0mM BC; and 0.5mM; 1.0mM; 2.0mM of EA, added to the Tris-Gema extender. The Tris-Gema extender, without the addition of test substances, was considered as the control group. The diluted semen was packed in straws and frozen in a TK 3000® machine and stored in liquid nitrogen. After 15 days of storage, the semen samples were thawed in a water bath and the in vitro tests were performed. The samples were submitted to computer-assisted sperm analysis (CASA) to evaluate the characteristics of post-thawing sperm kinetics. Epifluorescence microscopy was used to determine acrosomal integrity, plasma membrane integrity and mitochondrial membrane potential. Phase contrast microscopy was used to assess total motility and sperm vigor in the heat resistance test (TTR). Also, the test of thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) was performed in order to verify the lipid peroxidation reaction. It was concluded that β -caryophyllene did not improve the quality of ram spermatozoa after cryopreservation, although it improved mitochondrial potential at a concentration of 1.0mM and attenuated oxidative stress at a concentration of 2.0mM. Ellagic acid did not improve ram sperm quality after cryopreservation, although it attenuated peroxidative stress at concentrations of 0.5 and 1.0 mM AE.

Keywords: Sheep. Antioxidants. Peroxidation. Reproduction.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

CAPÍTULO I

- Figure 1-** Cell viability of post-thawed ovine spermatozoa at concentrations 0.7; 1.0; 1.5; 2.0 and 3.0 mM of β -caryophyllene (BC). Values are expressed as mean \pm standard deviation (SD).....48
- Figure 2-** Kinetic parameters of post-thawed ovine spermatozoa at the three studied concentrations 1.0; 2.0 and 3.0 mM of β -caryophyllene (BC). Values are expressed as mean \pm standard deviation (SD). a) Linear curvilinear velocity ($\mu\text{m/s}$); b) Straight-line velocity ($\mu\text{m/s}$); c) Average travel velocity ($\mu\text{m/s}$); d) Linearity (%); e) Rectilinearity (%); f) Oscillation (%); g) Lateral head displacement amplitude (μm); h) Tail beat frequency (Hz); and i) Hyperactivity (%). n=16.....48

CAPÍTULO II

- Figura 1-** Viabilidade celular dos espermatozoides ovino pós-descongelados nas concentrações 0,5; 1,0; 2,0; 3,0 e 4,0 mM de ácido elágico. Os valores são expressos como média \pm desvio padrão (DP).....66
- Figura 2-** Parâmetros de cinética dos espermatozoides ovino pós-descongelados nas concentrações 0,5; 1,0 e 2,0 mM de ácido elágico. Os valores são expressos como média \pm desvio padrão (DP). a) Velocidade em linha reta ($\mu\text{m/s}$); b) Velocidade curvilínea linear ($\mu\text{m/s}$); c) Velocidade média de percurso ($\mu\text{m/s}$); d) Linearidade (%); e) Retilinearidade (%); f) Oscilação (%); g) Amplitude de deslocamento lateral da cabeça (μm); h) Frequência de batimentos da cauda (Hz); e i) Hiperatividade (%)......66

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO I

Table 1-	Post-thaw kinetics of cryopreserved ovine spermatozoa at the concentrations 1.0; 2.0 and 3.0 mM of β -caryophyllene (BC). Total Motility (TM); Non progressive Motility (NPM); and Progressive Motility (PM).....	46
Table 2-	Plasma membrane integrity (MP), mitochondrial potential (MIT) and acrosomal integrity (AC) of post-thawed ovine spermatozoa at 1.0, 2.0 and 3.0 mM concentrations of β -caryophyllene (BC).....	46
Table 3-	Total motility (TM) and vigor (VG) of post-thawed ovine spermatozoa at concentrations; 1.0, 2.0 and 3.0 mM of β -caryophyllene (BC) submitted to the thermo-resistance test.....	47
Table 4-	Levels of thiobarbituric acid reactive substances (malondialdehyde - MDA) in post-thawed ovine semen at concentrations of 1.0, 2.0 and 3.0 mM of β -caryophyllene (BC).....	47

CAPÍTULO II

Tabela 1-	Cinética pós-descongelção de espermatozoides ovino criopreservado, nas três concentrações 0,5; 1,0; e 2,0mM de Ácido elágico (AE). Motilidade total (MT); Motilidade não progressiva (MNP); e Motilidade progressiva (MP)	64
Tabela 2-	Integridade de membrana plasmática (MP), potencial mitocondrial (MIT) e integridade acrossomal (AC) de espermatozoides ovino pós-descongelados nas concentrações 0,5; 1,0; e 2,0mM de Ácido elágico (AE)	64
Tabela 3-	Motilidade total (MT) e vigor (V) de espermatozoides ovino pós-descongelados nas concentrações 0,5; 1,0; e 2,0mM de Ácido elágico (AE) submetidos ao teste de termorresistência.....	65
Tabela 4-	Níveis de substâncias reativas do ácido tiobarbitúricos (malondialdeído - MDA) em sêmen de ovino pós-descongelado, nas concentrações 0,5; 1,0; e 2,0mM de Ácido elágico (AE)	65

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	13
2. REVISÃO DE LITERATURA	15
2.1 Sêmen e o espermatozoide	15
2.2 Criopreservação de sêmen	18
2.2.1 Crioinjúrias	19
2.2.2 Diluidores e Crioprotetores	20
2.3 Estresse oxidativo e espécies reativas de oxigênio (ERO)	21
2.4 Antioxidantes	23
2.4.1 β -cariofileno	24
2.4.2 Ácido elágico	28
3. ESTRUTURAÇÃO DA TESE	31
CAPÍTULO I*	32
Effect of β -caryophyllene on Sperm Cryopreservation	33
Abstract	33
Introduction	34
Methods	35
Results	41
Discussion	41
Conclusion	43
Referências	44
CAPÍTULO II*	50
Avaliação do Ácido Elágico na criopreservação de sêmen	51
Resumo	51
Introdução	52
Material e métodos	53
Resultados	59
Discussão	60
Referências	61
4. CONSIDERAÇÕES FINAIS	71
REFERÊNCIAS	72
ANEXO A- Certificado Comissão de ética no uso de animais	79
ANEXO B-Normas	80

1. INTRODUÇÃO

A ovinocultura no Brasil é uma alternativa de exploração pecuária que vem alcançando grande desenvolvimento, principalmente devido ao aumento da demanda de produção de carne (SOUZA et al., 2016). Os ovinos (*Ovis aries*) da raça Dorper surgiram em 1930 na África do Sul, do cruzamento das raças *Dorset Horn* e Cabeça Negra da Pérsia. Tem por suas características a rusticidade, alta adaptabilidade a temperaturas adversas, ótimo acabamento de carcaça e alta prolificidade. Em função dessas características, a raça foi introduzida no Brasil em 1998 e sua criação encontra-se em ascensão até os dias atuais (MADUREIRA et al., 2013). Essa raça apresenta alta taxa de desenvolvimento de carcaça com boa conformação, sendo muito utilizada em cruzamentos com ovelhas de raças adaptadas do Nordeste, tais como a Santa Inês, em virtude do seu porte e da velocidade de crescimento. Também já foi descrito que características genéticas da raça Dorper conferem maior resistência a parasitos gastrointestinais, o que torna essa raça de alto interesse para criação em regiões brasileiras caracterizadas por alta infestação com esses parasitos (SOUZA et al., 2016).

Segundo a produção pecuária de 2017, o Brasil apresenta um efetivo de rebanho de 17.976.367 cabeças ovinas, distribuídas por todo o território nacional (FAOSTAT, 2019). O aumento da demanda pelo consumo da carne ovina no Brasil, aliado à baixa oferta nacional, vem estimulando o desenvolvimento e fortalecimento da ovinocultura brasileira e incentivando um grande número de pesquisadores a desenvolver e adaptar condições de criação e técnicas que possibilitem um incremento na produtividade (SILVA, 2013).

As biotécnicas reprodutivas são técnicas que possibilitam esse incremento na produtividade e a criopreservação de sêmen, é uma das técnicas que possibilita o armazenamento do sêmen de animais de alto valor zootécnico por um longo período de tempo, favorecendo a capacidade reprodutiva do macho, mesmo após a morte. Além de permitir a redução de custos com a criação de reprodutores (SANTOS et al., 2015). Porém, a criopreservação afeta a membrana plasmática, principalmente a bicamada lipídica do espermatozoide e é necessária a adição de diluidores com os crioprotetores ao sêmen para reduzir os efeitos deletérios da criopreservação (SANTOS et al., 2014).

A congelação do sêmen consiste em submetê-lo a temperaturas reduzidas, inibindo de forma reversível o metabolismo celular. A manipulação dos espermatozoides com o intuito de preservá-los e utilizá-los por longos períodos, ocasiona danos à estrutura espermática,

comprometendo suas funções biológicas como a diminuição da capacidade respiratória, motilidade e integridade dos componentes estruturais. E os danos às membranas, causados pela criopreservação, afetam a capacitação e hiperativação espermática, assim como o processo de fertilização, o que pode ser observado que quando o mesmo número de espermatozoides é inseminado, a fertilidade do sêmen fresco é superior ao criopreservado. Esses eventos são provavelmente estimulados pelo acúmulo de produtos do metabolismo, que diminuem o transporte e a sobrevivência dos espermatozoides no trato genital feminino, como as espécies reativas ao oxigênio (ERO), que levam ao estresse oxidativo, influenciando a qualidade espermática (SANTOS et al. 2015).

A adição de diluidores é necessária para preservação seminal que contêm ingredientes básicos e aditivos que possibilitam a proteção dos espermatozoides, tais como substratos energéticos, tampões e componentes contra dano criogênico, permitindo a sobrevivência dessas células durante a diluição, o resfriamento e a criopreservação. Usualmente, os ingredientes de um diluidor variam desde componentes químicos puros a produtos de origem animal ou vegetal (CAVALCANTE et al., 2014).

A composição do meio diluidor utilizado para congelamento de sêmen diminui a concentração de antioxidantes endógenos, o que promove uma instabilidade entre antioxidantes e oxidantes gerando um estresse celular. Um meio diluidor com concentrações adequadas de substâncias que atuem como antioxidantes pode promover uma menor ação de ERO, pois essas substâncias seriam responsáveis por controlar estes radicais gerados pelo metabolismo das células (NASCIMENTO et al., 2016).

Por conseguinte, apesar dos avanços de biotécnicas reprodutivas, utilizando sêmen criopreservado, é importante ressaltar que cerca de 40 a 50% dos espermatozoides não sobrevivem à criopreservação (SANTOS et al., 2015). Então, embora o uso de diluidores convencionais, como o Tris-gema, possibilitou o aumento da produtividade, para exemplificar, um estudo, desenvolvido por La Falci e colaboradores (2011), corrobora que as taxas de parto, em ovelhas, para o sêmen refrigerado armazenado em 24, 48 e 72 horas foram de 45-50%, 25-30% e 15-20%, respectivamente, enquanto a taxa de parição para o sêmen fresco foi de 65-70%, ambos utilizando o método de inseminação artificial por via cervical. Portanto, a fecundidade diminui rapidamente quando o sêmen é criopreservado mesmo com uso de diluidores convencionais (LA FALCI et al., 2011).

Assim, para melhorar a qualidade pós-descongelamento seminal, é importante a ampliação dos conhecimentos relacionados aos procedimentos de criopreservação do sêmen, associada a estudos que evidenciem o grau de estresse oxidativo de amostras de sêmen desses reprodutores,

pós-criopreservação, com a finalidade de aumentar a capacidade fertilizante dessas células. Desse modo, é importante pesquisas para avaliar os efeitos de novas substâncias antioxidantes para serem adicionados no diluidor convencional de criopreservação de sêmen. Sendo assim, pressupõe-se que o β -cariofileno (BC) e Ácido elágico (AE), ambos antioxidantes, podem contribuir para melhorar o desempenho reprodutivo de ovinos aumentando a viabilidade dos espermatozoides após o processo de criopreservação.

Diante disso, objetivou-se avaliar os efeitos dos antioxidantes (β -cariofileno e Ácido elágico), adicionados ao diluidor, sobre a qualidade do sêmen de ovinos da raça Dorper após criopreservação.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Sêmen e o espermatozoide

O sêmen pode ser caracterizado como suspensão celular líquida que contém células reprodutivas masculinas altamente especializadas (espermatozoides) e também secreções dos órgãos acessórios do aparelho reprodutor masculino. O plasma seminal é constituído pela porção fluida dessa suspensão, que é liberada na ejaculação. Os espermatozoides são provenientes dos túbulos seminíferos localizados no interior dos testículos, os quais contêm uma série de complexas células germinativas em desenvolvimento, que dão origem aos espermatozoides, através de uma sequência de eventos denominada espermatogênese (CORANDIN, 2011).

O núcleo dessas células corresponde aproximadamente 35% do peso da célula espermática, sendo os ácidos nucléicos, proteínas e lipídeos os principais componentes químicos do espermatozóide, que ainda é repleto de substâncias inorgânicas, como fósforo, nitrogênio e enxofre (CORANDIN, 2011).

A principal função dos espermatozoides é a fertilização, envolvendo uma série de processos associados a múltiplos atributos celulares. Motilidade, atividade mitocondrial, integridade da membrana plasmática e um acrossoma intacto devem estar presentes (VAN TRAN et al., 2017), bem como padrões de turbilhão, vigor, equilíbrio osmótico e integridade dos peptídeos da membrana, os quais influenciam a qualidade dos espermatozoides para fertilização. O processo de criopreservação do sêmen é um dos fatores responsáveis pela diminuição da fertilidade, causada por alterações na qualidade da membrana espermática e nas estruturas celulares (CÂMARA et al., 2011). A composição lipídica da membrana plasmática

do esperma, uma estrutura altamente dinâmica que regula alterações extracelulares e facilita a fertilização, é o principal determinante da motilidade, sensibilidade a baixas temperaturas e viabilidade das células espermáticas. Os espermatozoides de várias espécies animais apresentam uma maior proporção de ácidos graxos poli-insaturados na camada fosfolipídica (MOTLAGH et al., 2014). A presença de ácidos graxos poli-insaturados pode aumentar a fluidez da membrana plasmática, proporcionando maior resistência à formação de cristais de gelo durante a criopreservação (SELVARAJU et al., 2012). Para contribuir com a fluidez e a flexibilidade das membranas espermáticas, os ácidos graxos poli-insaturados participam da reação acrossomal e também estão envolvidos na ancoragem dos receptores de membrana. Eles também aumentam a tolerabilidade da bicamada lipídica ao estresse causado pelo movimento constante dos flagelos (GHOLAMI et al. 2010). A membrana espermática da cabeça e cauda dos espermatozoides apresenta maior concentração de ácidos graxos poli-insaturados e isso está envolvido na capacitação espermática e na interação entre os espermatozoides e a superfície uterina (GHOLAMI et al., 2010) e oócitos (WONNACOTT et al., 2010). Por conseguinte, essas células são suscetíveis ao estresse oxidativo devido, principalmente, à ampla quantidade desses ácidos graxos poli-insaturados presentes nas suas membranas, mas também pela baixa concentração de enzimas antioxidantes no seu citoplasma.

Milhares de reações enzimáticas catalisadas são definidos, coletivamente, de metabolismo, com o propósito definido de interagir entre si resultando em uma sequência sistemática de transformações de energia. No metabolismo espermático, os espermatozoides não sofrem divisão celular e também não apresentam características para a formação de componentes celulares. Assim, a produção de energia, ATP, é requerida para iniciar processos catabólicos através da via glicolítica. Os espermatozoides bovinos apresentam a via metabólica baseado na rota aeróbica no qual utilizam como substrato principal, a frutose, visto que essas células não conseguem de forma eficiente produzir ATP a partir da glicose posto que a quantidade das enzimas é reduzida inviabilizando a formação de frutose a partir de glicose, via glicolítica inicial. Isso posto, as células espermáticas utilizam diretamente a via *Embden-Meyerhof* em que o ATP é consumido durante o metabolismo da frutose e reconvertido durante o metabolismo das trioses (VASCONCELOS, 2009).

Posto isto, o metabolismo espermático como todas as células biológicas apresenta o metabolismo exógeno, através de substratos energéticos, que são transportados para dentro das células e são direcionadas, unicamente, para a via *Embden-Meyerhof*. As células espermáticas, não apresentam enzimas para atuar na via das pentoses, nem para o metabolismo do glicogênio, a captação de substrato, por via exógena, é feita por receptores de membrana denominados

GLUT1, GLUT2, GLUT3, GLUT4, GLUT5, que são distribuídos por toda membrana espermática. Os receptores GLUT3 e GLUT5 estão presentes na peça intermediária, o GLUT1 na peça principal e o GLUT2 na parte final da cauda e é caracterizado pela alta afinidade por frutose. O GLUT4 se expressa nas células germinativas, principalmente durante a espermatogênese. Quanto ao metabolismo endógeno, provavelmente, representado pela β -oxidação de ácidos graxos, provenientes de fosfolípidos, hipotetiza-se que seja, assim, limitado pela ação da enzima fosfolipase em razão a hidrólise, conversão de CoA-ester e transporte mitocondrial, todavia, estudos ainda estão sendo realizados para descrever melhor o metabolismo endógenos dos espermatozoides de ruminantes (VASCONCELOS, 2009).

Portanto, os espermatozoides são células que têm uma capacidade biossintética limitada. Assim, a sua funcionalidade é principalmente controlada por fatores externos que atuam através da superfície celular e dos componentes da membrana plasmática (MUIÑO-BLANCO; PÉREZ-PÉ; CEBRIÁN-PÉREZ, 2008).

Os espermatozoides de mamíferos, quando deixam os testículos, são incapazes de se ligar à zona pelúcida e fertilizar o óvulo. Para adquirir progressivamente motilidade e habilidade de fertilização é necessário ocorrer durante o trânsito epididimal e no trato reprodutivo feminino processos conhecidos como maturação epididimária e capacitação, respectivamente (MUIÑO-BLANCO; PÉREZ-PÉ; CEBRIÁN-PÉREZ, 2008).

O plasma seminal de mamífero é uma secreção complexo de íons inorgânicos, açúcares, sais orgânicos, lipídios, enzimas, prostaglandinas, proteínas e diversos outros fatores produzidos pelos testículos, epidídimo e glândulas sexuais acessórias (próstata, glândula vesicular, ampola e glândulas bulbouretrais) do macho (DRUART et al. 2013; SERNA et al, 2018). Essa secreção desempenha um papel importante na maturação final dos espermatozoides através de eventos hormonais, enzimáticos e modificadores de superfície e funciona como veículo para espermatozoides ejaculados. Essa mistura complexa difere entre as espécies, bem como entre os machos dentro da mesma espécie e contém uma variedade de componentes bioquímicos. Os componentes orgânicos do plasma seminal são essenciais para manter o metabolismo do esperma, e o pH, osmolaridade e as proteínas são os mais importantes contribuintes para a função espermática em mamíferos (MUIÑO-BLANCO; PÉREZ-PÉ; CEBRIÁN-PÉREZ, 2008; SERNA et al, 2018).

Em ovinos, a produção de espermatozoides e suas características são afetadas por vários fatores como o ambiente, idade e raça do animal, duração da luz do dia, umidade relativa e temperatura. O manejo adequado desses fatores tem recebido maior atenção nos últimos anos devido ao seu interesse em programas de inseminação artificial de espécies de interesse

comercial (MERT et al. 2009). O sêmen desses animais possui volume do ejaculado relativamente pequeno, variando de 0,5 a 2,0 mililitros (mL) e concentração espermática entre dois e cinco bilhões de espermatozoides por mL de ejaculado, sendo comum nessa espécie encontrar 90% de motilidade. Diferenças entre raças têm sido encontradas na maioria dos parâmetros seminais de ovinos, principalmente devido à variação no diâmetro testicular (MAIA et al., 2011). Por isso, há diferenças nas taxas reprodutivas devido as particularidades das raças e também individuais.

Devido à importância comercial dos ovinos, é necessário adotar programas adequados de reprodução, de modo que somente os animais com as melhores características sejam autorizados a acasalar ou a serem utilizados para as técnicas reprodutivas. O testículo, o espermatozoide e sua composição bioquímica são importantes para a determinação das variações entre os carneiros escolhidos para a reprodução. Além disso, o genótipo, a idade, a estação, a alimentação e as condições ambientais também devem ser avaliados e comparados para esse fim (MERT et al. 2009).

Sendo assim, nesses programas adequados de reprodução, cabe destacar que durante o processo de criopreservação, os espermatozoides são expostos a um alto nível de ERO produzidas durante os ciclos de congelamento e descongelamento, resultando em estresse oxidativo extremo e, portanto, deterioração da qualidade dos espermatozoides. A presença de alto teor de ácidos graxos poli-insaturados na membrana plasmática dos espermatozoides de carneiro é considerada um fator crucial que contribui para o estresse oxidativo (LONE et al., 2019).

No entanto, é importante ressaltar que um baixo nível de ERO produzido como resultado do metabolismo oxidativo é importante para desempenhar um papel nas cascatas intercelulares mediando a função espermática, como capacitação, reação acrossomal, hiperativação e fusão espermático-ovócito. Portanto, um bom equilíbrio deve ser mantido entre a produção e a neutralização de ROS, mas qualquer desequilíbrio pode levar ao início de altas taxas de peroxidação lipídica devido ao ataque de ERO em excesso em ácidos graxos poli-insaturados na membrana plasmática das células espermáticas, resultando em perda da integridade da membrana e consequente perda de motilidade durante o armazenamento prolongado (LONE et al., 2019).

2.2 Criopreservação de sêmen

A criopreservação é uma forma de preservar o germoplasma que tem aplicações na agricultura, aquicultura, biotecnologia e conservação de espécies ameaçadas. Na

agropecuária, a criopreservação de germoplasma é utilizada para a melhoria genética de espécies domésticas, para preservar raças raras, bem adaptadas às mudanças ambientais e em intercâmbios internacionais de germoplasma. Atualmente, a criopreservação do sêmen tem muitas aplicações biotecnológicas que pode ser usada para resolver problemas de infertilidade humana, doenças que ameaçam a vida, preservação de sêmen e DNA de espécies ameaçadas de extinção e conservação da biodiversidade. Foi demonstrado em carneiros que o sêmen congelado criopreservado durante 27 anos não afetou a fertilidade de maneira que o inviabilizasse, tornando possível a preservação dos recursos genéticos de raças nativas (BARBAS; MASCARENHAS, 2009).

A criopreservação de sêmen inclui diluição, crioproteção (adição de crioprotetores), resfriamento e congelação, armazenamento e descongelação. Todos esses processos têm a função de conservar o sêmen para usos posteriores, mas também têm o potencial de afetar a estrutura e a função do esperma (PADILHA et al., 2012).

O uso de criopreservação de sêmen e sua aplicação por meio de biotécnicas reprodutivas em ovinos tem sido um objetivo de longa data para pesquisadores e profissionais, mas relatos indicam uma elevada variabilidade dos resultados de fertilidade quando se utiliza sêmen criopreservado na IA convencional, como algumas raças produzem resultados bons e consistentes, enquanto outras apresentam um desempenho fraco. Melhorar a qualidade do esperma após a criopreservação pode ajudar a melhorar os resultados globais. No entanto, a qualidade do esperma é severamente afetada pelos atuais protocolos de criopreservação, que afetam a estrutura e a resiliência dos espermatozoides e tornam a melhoria destes protocolos uma prioridade (MATA-CAMPUZANO et al., 2015). Logo, a criopreservação do sêmen está sempre associada ao estresse oxidativo nos espermatozoides, devido à produção de ERO em excesso, que induzem danos bioquímicos e funcionais ao esperma (BAGHSHAHI et al., 2014).

2.2.1 Crioinjúrias

A criopreservação submete os espermatozoides a uma série de insultos físicos e químicos, como o ataque de radicais livres, o que diminui a viabilidade e a fertilidade dos espermatozoides. Eles são especialmente vulneráveis à peroxidação lipídica devido à abundância de ácidos graxos poli-insaturados na sua membrana plasmática (MATA-CAMPUZANO et al. 2015). Peroxidação lipídica é o processo através do qual as ERO atacam os ácidos graxos poli-insaturados dos fosfolípidos das membranas das células, desintegrando-as e permitindo a entrada dessas espécies nas estruturas intracelulares (DOBRAKOWSKI et al., 2016). Os efeitos prejudiciais resultam em redução da motilidade espermática, viabilidade,

integridade do acrossoma e potencial de fertilidade. Vários estudos têm implicado a peroxidação lipídica da membrana como causa da função defeituosa dos espermatozoides, especialmente nos espermatozoides de carneiros que contêm maiores quantidades de ácidos graxos poli-insaturados de cadeia longa (BAGHSHAHI et al., 2014). O sêmen que está na temperatura fisiológica passa para uma temperatura de congelação o que provoca um estresse substancial na membrana plasmática do esperma, resultando no rearranjo e desestabilização dos componentes da membrana e um influxo de cálcio. O grau em que esse dano da membrana é responsável pelos efeitos deletérios da criopreservação na motilidade do esperma ainda não está claro (PADILHA et al., 2012).

2.2.2 Diluidores e Crioprotetores

Para a criopreservação do sêmen, no ejaculado é necessário a adição de diluidores que contêm substratos energéticos, tampões e componentes contra dano criogênico. Desse modo, toda substância que ofereça, provisoriamente, energia, proteção aos danos ocasionados pela redução de temperatura e manutenção de ambiente favorável à sobrevivência da célula armazenada são denominados de crioprotetor. Com a finalidade de minimizar os danos causados às células durante o processo de criopreservação, diferentes substâncias foram avaliadas e mostraram-se bons crioprotetores (SILVA; GUERRA, 2011).

Assim, os crioprotetores empregados na congelação de sêmen das mais variadas espécies têm a finalidade de evitar o desenvolvimento de cristais grandes de gelo intracelular, reduzir o estresse osmótico por meio da reposição de água indispensável para manutenção do volume celular, interagir com íons e macromoléculas, reduzir o ponto de congelação da água, bem como servir de tampão para ajustes de possíveis alterações do potencial de hidrogênio – pH (SILVA; GUERRA, 2011).

Os diluentes mais utilizados para a diluição pré-congelação de sêmen de carneiro baseiam-se em Tris (tris(hidroximetil)aminometano), frutose, gema de ovo, lactose ou leite. Dois desses aditivos, a gema de ovo e o leite, são de origem animal, e preocupações têm sido levantadas nos últimos anos sobre seu potencial risco como veículos para patógenos causadores de doenças. Além disso, a qualidade do esperma congelado-descongelado também pode ser influenciada pelas diferenças de qualidade individuais inerentes à gema de ovo devido ao número de dias após a postura e ao período de armazenamento o que torna difícil analisar os efeitos benéficos de um diluidor específico (DEL VALLE et al., 2013). Ademais, foi relatado que os diluentes contendo gema de ovo podem ter efeitos prejudiciais na

viabilidade e na integridade do acrossoma de espermatozoides em algumas espécies (BAGHSHAHI et al., 2014).

No entanto, houve poucos aperfeiçoamentos nos componentes diluentes para congelar o sêmen de carneiro desde a incorporação rotineira de gema de ovo ou leite com glicerol como agentes para proteger os espermatozoides durante o resfriamento e o congelamento, respectivamente (DEL VALLE et al., 2013). Sendo assim, inúmeros esforços de pesquisa avaliam o efeito da adição ao diluidor de outras substâncias como os antioxidantes sintéticos e naturais no sêmen. Os antioxidantes neutralizam os radicais livres nas cadeias lipídicas contribuindo com um átomo de hidrogênio normalmente a partir de um grupo hidroxilo fenólico que, por sua vez, converte os grupos fenólicos em radicais livres estáveis que não iniciam ou propagam mais oxidação lipídica (BAGHSHAHI et al., 2014).

2.3 Estresse oxidativo e espécies reativas de oxigênio (ERO)

Os espermatozoides produzem uma baixa quantidade de ERO em condições fisiológicas normais que são essenciais para a capacitação, hiperativação, reação acrossômica e, finalmente, fusão com os oócitos. Em contrapartida, a produção excessiva de ERO durante o metabolismo do oxigênio inicia estresse oxidativo que eventualmente leva à morte do espermatozoide (NASEER et al., 2015).

O estresse oxidativo é um dano que leva à perda da integridade estrutural e funcional das membranas, aumentando a permeabilidade da membrana, perdas estruturais do DNA e morte celular (BANDAY et al., 2017).

Uma causa básica desse dano é a presença de alto conteúdo de ácidos graxos poli-insaturados na membrana plasmática dos espermatozoides. Esses compostos se ligam com oxigênio resultando na produção de ERO [peróxido de hidrogênio (H_2O_2), radical hidroxila ($OH\cdot$); radical superóxido ($O_2\cdot^-$) e óxido nítrico (NO)] (BANDAY et al., 2017). A principal fonte de ERO no plasma seminal é o metabolismo do espermatozoide. A ERO é essencial para as funções normais do esperma, tais como os mecanismos de transdução de sinal, incluindo a taxa de hiperativação e a capacidade dos espermatozoides de sofrer reação acrossômica. O desequilíbrio entre substâncias pró-oxidativas e antioxidantes no sêmen leva ao estresse oxidativo, resultando em distúrbios metabólicos e funcionais nas células germinativas masculinas. O mecanismo de lesão induzida por ERO aos espermatozoides inclui um ataque oxidativo nos lipídios da membrana do espermatozoide. ERO é capaz de iniciar uma cascata de peroxidação lipídica que é acelerada por íons de metais de transição como Fe^{2+} (DOBRAKOWSKI et al., 2016). As principais consequências irreversíveis da peroxidação

lipídica da membrana do esperma são: perda de motilidade, inibição da respiração, vazamento enzimático intracelular, dano ao DNA e incapacidade de penetrar no oócito (NASEER et al., 2015).

Os peróxidos são os mais perniciosos de todos os oxidantes metabólicos e são gerados continuamente por células submetidas ao metabolismo aeróbio. Entre os diferentes peróxidos, o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) é o que se forma nas quantidades mais elevadas. Essa molécula extremamente reativa, uma vez formada, pode mover-se em grande parte sem entraves através de diferentes compartimentos celulares e reage com muitas moléculas celulares. O H_2O_2 , livremente difusível, está implicado na alteração da homeostase de Ca^{2+} , o que aumenta ainda mais a atividade celular anormal, causando alterações na transdução de sinal e disfunção celular. A principal fonte de peróxidos, durante o armazenamento em espermatozoides de carneiros, é a desaminação ativa do aminoácido oxidase aromática libertada a partir de espermatozoides mortos e danificados (LA FALCI et al., 2011).

O processo de peroxidação lipídica consiste em três etapas: (1) iniciação, no qual as espécies reativas removem o hidrogênio alílico formando um radical alquila ($L\cdot$), que é estabilizado por um rearranjo molecular; (2) propagação, em que o radical $L\cdot$ reage com o oxigênio formando o radical alcoxila ($LO\cdot$) e, posteriormente, peroxila ($LOO\cdot$) e hidroperóxido lipídico ($LOOH$); (3) término, momento em que há destruição dos radicais formados originando produtos não radicalares (YIN; XU; PORTER, 2011). Uma grande variedade de produtos de oxidação é formada nesse processo, sendo os $LOOH$ os principais produtos primários. Entre os produtos secundários que podem ser formados durante a peroxidação lipídica, os mais estudados são o malondialdeído (MDA) e o 4-hidroxinonenal (4-HNE). Tanto o 4-HNE quanto o MDA são moléculas altamente reativas. MDA é um dialdeído capaz de reagir com aminas primárias em proteínas ou DNA para formar ligações cruzadas (GASCHLER; STOCKWELL, 2017).

O MDA é o produto mais conhecido da peroxidação lipídica, mas não é o mais importante. Existem muitos produtos, tais como dienos conjugados, bem como produtos de peroxidação secundária, incluindo aldeídos saturados e não saturados, cetonas, oxo- e hidroxiácidos além de hidrocarbonetos saturados e insaturados. Os aldeídos citotóxicos tais como MDA e 4-hidroxinonenal são formados através da degradação do hidroperóxido lipídico. O 4-hidroxinonenal causa disfunção celular grave, mesmo em concentrações picomolar (DOBRAKOWSKI et al., 2016).

É importante ressaltar, que o espermatozoide é protegido por um sistema antioxidante endógeno no plasma seminal, na membrana e no citoplasma, mas esse sistema é parcialmente removido e severamente alterado durante a diluição e criopreservação. Esse fato é o motivo da suplementação de diluidores antes da congelação (MATA-CAMPUZANO et al., 2015).

2.4 Antioxidantes

Antioxidantes são substâncias que retardam a velocidade da oxidação, através de um ou mais mecanismos, tais como inibição de radicais livres e complexação de metais, podendo agir diretamente na neutralização da ação dos radicais livres ou participar indiretamente de sistemas enzimáticos com essa função (BARROS, 2010).

O sistema antioxidante endógeno nos espermatozoides pode não ser suficiente na prevenção da peroxidação lipídica durante o processo de criopreservação do sêmen. Por isso, várias pesquisas têm sido feitas para enriquecer o sêmen através da adição de substâncias antioxidantes naturais ou sintéticas (HASHEM; ESLAMI, 2016).

O sêmen de carneiro é dotado de um robusto sistema de enzimas antioxidantes na forma de glutathiona reduzida (GSH), glutathiona peroxidase (GPX), catalase (CAT) e superóxido dismutase (SOD) para captar ERO (BANDAY et. al., 2017). SOD é a primeira linha enzimática de defesa antioxidante contra ânions superóxido e deve ser conjugada com CAT ou GPX para prevenir a ação do peróxido de hidrogênio, que é produzido na reação catalisada por SOD (DOBRAKOWSKI et al., 2016).

No organismo, a GPX é o antioxidante mais abundante. Ele desempenha um importante papel sinérgico na proteção de lipídios, proteínas e ácidos nucleicos contra lesões oxidativas. Funciona em uma tríade catalítica onipresente com catalase e superóxido dismutase, encontrada em praticamente todos os organismos aeróbios procarióticos e eucarióticos. A GPX é uma enzima antioxidante contendo selênio que reduz eficazmente peróxido de hidrogênio e peróxidos lipídicos para água e álcoois lipídicos, respectivamente, e por sua vez, oxida a glutathiona a dissulfureto de glutathiona. Na ausência de atividade GPX adequada ou níveis adequados de glutathiona, o peróxido de hidrogênio e os peróxidos lipídicos não são detoxificados e podem ser convertidos em radicais hidroxilo e radicais peróxido lipídico, respectivamente, por metais de transição (Fe^{2+}). CAT usa H_2O_2 como substrato e só funciona quando sua concentração é amplamente acima dos níveis fisiológicos como pode acontecer em respostas de estresse oxidativo. Em contraste, a GPX usa diferentes substratos além de H_2O_2 e funciona mesmo com pequenas variações de suas concentrações (LA FALCI et al., 2011).

Apesar disso, o sistema antioxidante endógeno não é capaz de eliminar o excesso de ERO gerado principalmente a partir de espermatozoides mortos levando a um desequilíbrio entre a produção e neutralização de ERO resultando em estresse oxidativo (BANDAY et al., 2017). Como os mecanismos internos de reparo nos espermatozoides são limitados e a contribuição dos antioxidantes do plasma seminal é menos efetiva devido à diluição do sêmen para armazenamento, é provável que um suprimento exógeno de antioxidantes seja importante para manter o potencial de fertilização (LA FALCI et al., 2011).

Para isso, a inclusão de um antioxidante adequado no diluidor de sêmen pode ser benéfica na redução do estresse oxidativo, protegendo assim os espermatozoides durante a congelação e descongelação (BANDAY et al., 2017).

Estudos estão sendo publicados com resultados promissores com uso de antioxidantes adicionados ao diluidor utilizados na criopreservação. Lone e colaboradores (2019) concluíram que a idebenona, um potente antioxidante, no nível de 10 μM melhorou a qualidade dos espermatozoides após a descongelação, suavizando o estresse peroxidativo, portanto, poderia ser considerado um aditivo antioxidante para a criopreservação do sêmen de carneiro. Ademais, Gungor e colaboradores (2019), concluíram que a suplementação com ácido gálico 2 mM aumentou a motilidade pós-descongelação, enquanto a suplementação com ácido carnósico 0,05 mM aumentou a função mitocondrial, para a criopreservação de sêmen ovino adicionados ao diluidor à base de Tris.

Sendo assim, presume-se que o β -cariofileno (BC) e Ácido elágico (AE), ambos antioxidantes, possam contribuir para aprimorar a performance reprodutiva de ovinos melhorando a viabilidade das células espermáticas após o processo de criopreservação.

2.4.1 β -cariofileno

O sesquiterpeno bicíclico natural, β -cariofileno (BC), está presente em um grande número de plantas em todo o mundo (FIDYT et al, 2016) e assim um componente de vários óleos essenciais (YAMAGUCHI; LEVY, 2016). O BC é um aditivo alimentar aprovado pela FDA (*Food and Drug Administration*) (VARGAS et al., 2017) também é frequentemente utilizado em cosméticos e componente do Sativex, uma droga aprovada em países europeus e no Canadá, medicamento à base de *Cannabis sativa*. No Brasil, foi registrado com o nome comercial Mevatyl® (HORVÁTH et al. 2012).

O BC é um fito-canabinoide que na natureza, ocorre principalmente como trans-cariofileno (E)-BC misturado com pequenas quantidades de seus isômeros, (Z) - β - cariofileno (iso-cariofileno) e α -húmumeno (α - cariofileno), bem como seu óxido de oxidação

derivado β -cariofileno (BCO). Ambos os compostos exibem baixa solubilidade em água, deste modo o meio aquoso tal como fluidos biológicos, impede a sua absorção para a célula. No entanto, foi demonstrado que tanto BC e BCO são capazes de interagir com bicamada lipídica artificial, o que sugere fortemente a sua elevada afinidade para a membrana celular. Os potenciais obstáculos associados com a fraca solubilidade destes sesquiterpenos em fluidos aquosos podem ser superados através da utilização do sistema de libertação de fármaco lipossômico, o que proporciona uma biodisponibilidade muito maior desses compostos e por isso garante a obtenção dos efeitos biológicos desejados (FIDYT et al., 2016).

De acordo com a base de dados de óleos essenciais EssOilDB, o BC como composto volátil de plantas é comumente encontrado em manjeriço (*Ocimum* spp.), Canela (*Cinnamomum* spp.), Pimenta preta *Piper nigrum* L.), cravo-da-índia (*Syzygium aromaticum*), Cannabis (*Cannabis sativa* L.), Lavanda (*Lavandula angustifolia*), Orégano (*Origanum vulgare* L.) e Alecrim (*Rosmarinus officinalis*) (FIDYT et al., 2016). O óleo de copaíba, um líquido transparente em que a cor varia do amarelo ao marrom claro obtido pela perfuração do tronco, é composto por sesquiterpenos e diterpenos verificado através da análise cromatográfica. O principal sesquiterpeno é o BC (YAMAGUCHI, 2012).

O BC possui efeitos anti-inflamatórios, pois é um agonista seletivo do receptor canabinóide do tipo 2 (CBR2) e exerce efeitos anti-inflamatórios canabimiméticos em animais (YAMAGUCHI; LEVY, 2016). Foi verificado a presença de receptores CBR1 e CBR2 em espermatozoides humanos. O CBR2 regula a motilidade do espermatozóide de uma forma mais diferente do CBR1 (AGIRREGOITIA et al. 2010).

O BC também possui efeitos antiespasmódico, antiviral, anestésico local (HORVÁTH et al. 2012), antimicrobianos e analgésicos (FIDYT et al, 2016) antifúngica (YAMAGUCHI, 2012). O BC inibiu eficazmente o edema da pata induzido por carragenina e atenuou a expressão do TNF- α e IL-1 β estimulada pelo LPS no sangue periférico. Foi demonstrado que melhora a colite induzida por dextrano sulfato de sódio e inibe as lesões da mucosa gástrica induzidas por agentes necrotizantes como o etanol absoluto e HCl 0,6 N (HORVÁTH et al. 2012).

Pesquisas mostraram outros efeitos biológicos do BC como atividade anticancerígena significativa, afetando o crescimento e proliferação de numerosas células cancerosas (FIDYT et al, 2016). Yamaguchi e Levy (2016) demonstraram que o BC estimulou a mineralização osteoblástica e suprimiu a adipogênese e a osteoclastogênese em estudo *in vitro*. Assim, o BC pode ser utilizado como um agente terapêutico para a prevenção e tratamento da osteoporose.

Um estudo mostrou que o BC proporciona neuroproteção contra doença de Parkinson induzida pela rotenona e os efeitos neuroprotectores podem ser atribuídos às suas potentes atividades antioxidantes e anti-inflamatórias. BC além da atenuação de citocinas pró-inflamatórias e mediadores inflamatórios como COX-2 e iNOS, também restauraram enzimas antioxidantes e inibiram a peroxidação lipídica, bem como a depleção de glutatona (OJHA et al., 2016). Outro estudo *in vitro* demonstrou que os efeitos neuroprotectores do BC, em modelos de isquemias cerebrais, ocorrem através de reduções nos danos ao stress oxidativo e às citocinas inflamatórias que induzem a degradação da barreira hematoencefálica resultando subsequentemente numa redução da apoptose neuronal. Isso proporciona novas perspectivas para a aplicação de BC como um agente neuroprotetor (TIAN et al., 2016). Javed e colaboradores (2016) relataram que o BC reduz o estresse oxidativo na neurodegeneração dopaminérgica induzida por rotenona (ROT) por ativar os receptores canabinóides. O tratamento com BC de ratos com tratados ROT evitou a depleção de glutatona concomitante à redução da peroxidação lipídica e apresentou uma restauração significativa das atividades das enzimas antioxidantes superóxido dismutase e catalase. Com isso o BC pode ser uma molécula atraente para o tratamento da Doença de Parkinson.

Assim, a atividade neuroprotetora do BC tem sido associada principalmente à ativação seletiva dos receptores canabinóides do tipo 2 (CB2), inibição da ativação microglial e diminuição da inflamação (SANTOS et al. 2017). No entanto, esses autores sugerem que o BC ativa os receptores trka e induz a neuritogênese por um mecanismo independente do Fator de crescimento nervoso (NGF) ou dos receptores canabinóides.

Múltiplos outros estudos demonstraram o efeito antioxidante do BC (HARAGUCHI, 1996; KUBO, 1996; SINGH, 2006; VIANA et. al. 2015). Ele apresentou atividade antioxidante *in vitro* nas concentrações de 0,1; 0,3; 0,7; 1,5 e 3 mM sobre a inibição do radical ABTS, foram verificados os percentuais de inibição de 47,4; 56,5; 66,6; 70; 79,10%, respectivamente. O trolox, antioxidante de referência, inibiu 90% na maior concentração (MACHADO et al. 2015).

Em uma pesquisa, o BC apresentou uma baixa atividade citotóxica em células fibroblásticas normais na maior concentração testada, 500 µg / mL, causando a morte de cerca de 20% dos fibroblastos (SELESTINO NETA et al., 2017). Esses autores também verificaram uma baixa atividade antioxidante do BC, avaliada pelo método do sequestro do radical livre estável 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH) de acordo com a classificação proposta por Scherer e Godoy (2009). Por outro lado, Rodriguez e colaboradores (2012) relataram forte atividade antioxidante pelo óleo essencial de *Murraya paniculata*, no qual BC foi relatado como o principal constituinte. Os critérios utilizados por esses autores para classificar o poder de ação

do óleo essencial como forte não foram os mesmos que os utilizados por Selestino Neta e colaboradores (2017), o que pode ter causado a discrepância entre os resultados ou é possível que a boa ação antioxidante encontrada por Rodriguez e colaboradores (2012) é devido aos outros constituintes do óleo essencial de *M. paniculata* cultivada em Cuba.

Outros pesquisadores demonstraram que o BC tem efeito hipolipidêmico através da inibição da HMG-CoA redutase hepática, como o medicamento padrão sinvastatina, e essa inibição sugere um possível mecanismo de ação hipolipidêmica. Assim, esses resultados indicam que o BC pode ser utilizado no tratamento de doenças dislipidêmicas, pois exerce um efeito semelhante ao medicamento de referência, protegendo o fígado contra lesões lipídicas e melhorando o sistema de defesa antioxidante hepático, pois evitou o aumento nos níveis de espécies reativas de oxigênio (ROS) e substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) (BALDISSERA et al., 2017). Kamikubo e colaboradores (2016) demonstraram que o BC tem potencial eficácia na prevenção e melhoria da doença hepática gordurosa não alcoólica e seus distúrbios metabólicos associados. Pois ele é o principal supressor da acumulação lipídica e estimula a fosforilação da AMPK e da acetil-CoA carboxilase 1 (ACC1). Foi também evidenciado que o BC induz uma significativa *downregulation* de ácido graxo sintase (FAS) e *upregulation* da lipase de triglicerídeos de tecido adiposo (ATGL), respectivamente.

Os resultados de Pieri et al. (2016) mostraram que o BC tem atividade antimicrobiana contra a proliferação de bactérias formadoras de placas dentárias de cães, representando uma alternativa adequada ao uso de clorexidina na profilaxia e tratamento da doença periodontal de cães.

Num estudo de toxicidade subcrônica, a administração de óleo de BC por gavagem oral a ratos Wistar a dosagens de 0, 150, 450 ou 700 mg/kg/dia durante 90 dias, incluindo um período de recuperação de 21 dias, não produzem manifestações toxicológicas significativas. O estudo foi conduzido como parte de uma investigação para examinar a segurança do óleo BC para o seu uso proposto em produtos alimentares médicos (SCHMITT; LEVY; CARROLL, 2016). A toxicidade do BC foi avaliada em ratos e constatou-se que a dose letal oral (LD₅₀) para este composto é superior a 5000 mg / kg (FIDYT et al., 2016). A não capacidade genotóxica *in vivo* do BC em ratos foi descrito por Molina-Jasso, Álvarez-González e Madrigal-Bujaidar (2009).

Um estudo verificou que as pontas de cigarro têm um potencial genotoxicidade e o BC aparece como possível candidato adicional como descontaminante ambiental contra este resíduo perigoso (DI GIACOMO, MAZZANTI DI SOTTO, 2016).

Diante de diversos efeitos biológicos, a demanda por BC vem aumentando. A extração do BC de plantas e a síntese química foram sempre aceitas como as opções comuns para a produção BC em grande escala, contudo, ambos os métodos têm as suas próprias desvantagens: baixa concentração e pobres rendimentos de recuperação tornam o isolamento do BC das plantas tanto infundado quanto não-econômico. Por isso, Yang e Nie (2016) demonstraram uma nova via biossintética para BC por meio da conversão de ácido acético em BC utilizando uma *Escherichia coli* modificada.

2.4.2 Ácido elágico

O ácido elágico (AE) é um composto polifenólico pertencente a classe dos flavonóides (AE; C₁₄H₆O₈; Massa molecular: 302,202; 3,7,8-tetra-hidroxi [1] -benzopirano [5,4,3-cde] [1] benzopirano-5,10-diona) (ÇERIBAŞI et al., 2012) encontrado em numerosas frutas e vegetais como framboesas, morangos, nozes, sementes de longan (olho de dragão), caroço de manga e romã (CERIBAŞI et al., 2010). Essa substância tem recebido grande atenção devido à sua variedade de propriedades biológicas, tais como antioxidante, ações quimiopreventivas (GIRISH et al., 2014), modulador de receptor de estrogênio seletivo natural (TÜRK et al. 2010b), anticancerígeno, antiproliferativo, antimutagênio, antiaterogênico (induzindo a regressão de placas ateroscleróticas) (TÜRK et al., 2008) e antiapoptóticos (diminuem significativamente a frequência de apoptose) (TÜRK et al., 2011). Esse composto contém quatro grupos hidroxila e dois grupos lactona em que o grupo hidroxila é conhecido por aumentar atividade antioxidante e assim proteger as células contra os danos oxidativos na peroxidação lipídica (ÇERIBAŞI et al., 2012). O AE atua diretamente como um antioxidante ou ativando/induzindo sistemas celulares de enzimas antioxidantes (ATEŞŞAHIN et al., 2010).

Estudos recentes em ratos com ácido elágico sugeriram seus efeitos protetores contra a toxicidade reprodutiva induzida por vários fármacos anticancerígenos, como cisplatina e ciclofosfamida, pois essa substância melhorou significativamente os danos nos parâmetros espermáticos, equilíbrio oxidante/antioxidante e apoptose testicular induzida por esses quimioterápicos (TÜRK et al. 2010a; TÜRK et al., 2011). Çeribaşı et al. (2012) demonstraram que o AE tem efeitos protetores na peroxidação lipídica testicular e apoptose induzida por adriamicina, outro quimioterápico. Nesses trabalhos foi utilizado a posologia 2 mg kg⁻¹ por 8 semanas de AE. Um estudo utilizando o AE proporcionou proteção parcial nas doses de 10 e 25 mg/kg e proteção completa na dose 50 mg/kg no tratamento por 10 dias, contra lesões testiculares e espermatozoides induzidas pelo valproato de sódio, um anti-epiléptico de amplo espectro que causa alterações reversíveis nos espermatozoides prejudicando a motilidade,

morfologia espermática, contagem de espermatozoides e histoarquitetura dos testículos (GIRISH et al., 2014).

O efeito da suplementação dietética do AE em parâmetros de qualidade do sêmen em frangos foi pesquisado. Galos (raça *Dahlem Red*) com 28 semanas de idade receberam dietas contendo AE a 0,25; 50,00 ou 75,00 mg/kg durante 8 semanas. A suplementação com AE não teve efeito nos parâmetros brutos do sêmen. A proteína plasmática seminal e a peroxidação lipídica foram diferentes entre os grupos de tratamento. O grupo alimentado com 75 mg/kg de AE apresentou elevada peroxidação lipídica seminal no plasma e menor atividade sérica de superóxido dismutase. Por isso, a suplementação dietética de AE em frangos não teve efeito sobre as qualidades do sêmen bruto e aumentou da peroxidação lipídica no plasma seminal (MURUGESAN; RAO, 2013). Sendo assim a adição de AE na dieta de frangos não é benéfica em relação ao estresse oxidativo sob os parâmetros seminais, no entanto, pesquisas em ratos tiveram resultados satisfatórios. Essa divergência pode ser causa das diferentes vias de administração empregadas em ambas às pesquisas.

Omur et al. (2016) testaram amostras de sêmen de carneiros Merinos diluídas num extensor à base de Tris com AE (1,0; 2,0 4,0 mM). A adição de AE promoveu uma maior porcentagem de motilidade espermática e de integridade do acrossoma em comparação com o grupo de controle. Os tratamentos com 1,0 e 2,0 mM de AE levaram maior percentagem de integridade da membrana plasmática dos espermatozoides quando comparado com o grupo controle. O grupo de AE com 1mM proporcionou maior proteção quanto à atividade mitocondrial do espermatozoide quando comparado ao grupo controle. Dessa maneira, o AE protege os efeitos da criopreservação sobre os parâmetros do sêmen de carneiros Merinos.

Dentre outros efeitos biológicos do AE, um estudo demonstrou que a hipertensão, os níveis sanguíneos de nitrato/nitrito e atividade da fosfatase alcalina em ratos hipertensos foi reduzida pelo tratamento com AE nas doses 10 ou 30 mg/kg/dia por gavagem durante cinco semanas. Desse modo, o AE atenua a hipertensão, possivelmente melhorando a biodisponibilidade do óxido nítrico, que induz a produção de GMP (Guanosina Monofosfato Cíclico) no qual promove a vasodilatação. Além disso, o teor de cálcio e a hipertrofia nos tecidos vasculares durante a hipertensão foram atenuados pelo tratamento com AE (JORDÃO et al., 2017).

Outra pesquisa evidenciou os efeitos protetores do AE sobre disfunção renal após uma isquemia-reperfusão cerebral global (GCIR) induzida em ratos machos no qual administraram-se AE (100 mg/kg) oralmente durante 10 dias consecutivos. Os resultados indicam que GCIR prejudica algumas funções renais e AE, como um antioxidante, pode melhorar essas

funções. Assim, sugere-se a possível utilidade do AE em pacientes com Acidente Vascular Cerebral (NEJAD et al., 2017).

A produção de radicais livres ocorre por meio de reações que dependem da catálise de certas enzimas. Alguns metais, como o Ferro e Cobre, têm ação catalítica nas reações que levam a lesões oxidativas. As reações de Fenton e de Haber-Weiss são exemplos de processos que levam à formação de radicais livres ou, mais especificamente, espécies reativas de oxigênio (EROs). Há evidências de que o AE possui propriedades de eliminação de radicais livres e é capaz de formar complexos com íons metálicos. No entanto, a informação sobre uma possível ligação entre a formação de complexos ferro-AE e a sua interferência nas reações de Haber-Weiss/Fenton ainda não foi determinada. Assim, Dalvi e colaboradores (2017) revelaram que o AE pode prevenir a formação de radicais livres *in vitro* quando se forma um complexo com íons de ferro.

Outro estudo testou a capacidade antioxidante *in vitro* do AE e comprovou que essa substância possui propriedade de eliminação acentuada principalmente contra radicais superóxido, comparáveis e superiores aos antioxidantes naturais tradicionais, vitaminas E e C (PAVLOVA; ZOGRAFOV; SIMEONOVA, 2016).

Os antioxidantes têm efeitos protetores contra os danos neurológicos induzidos por radicais livres na doença de Parkinson (DP). Os níveis de malondialdeído (MDA), atividades da glutathiona peroxidase (GPx) e da superóxido dismutase (SOD), foram medidos nos tecidos estriados e do hipocampo após a administração de AE 50 mg/kg/ por gavagem em ratos. Foi observado uma redução nas atividades GPx ($P < 0,001$) e SOD ($P < 0,001$) enquanto aumentou significativamente os níveis de MDA ($P < 0,001$) em ratos lesionados com MFB. Os resultados mostraram que AE pode melhorar as deficiências motoras e desempenho eletrofisiológico em ratos MFB- lesionado via aumento dos conteúdos antioxidantes cerebrais. Portanto, a AE pode proteger o cérebro contra os danos neurológicos induzidos por radicais livres e pode ser benéfica no tratamento da DP (SARKAKI et al., 2016).

As atividades antileishmania, citotóxicas e imunomoduladoras do AE foram avaliadas por Alves e colaboradores (2017). O valor de 9,8 $\mu\text{g/mL}$ teve uma atividade antileishmania. A citotoxicidade contra macrófagos murinos BALB/c para AE foi de 23,8 $\mu\text{g/mL}$ (CC50). Curiosamente, o AE também reduziu significativamente a infecção e a infecciosidade dos macrófagos infectados por *Leishmania major* (EC50 0,9 $\mu\text{g/mL}$), com índice de seletividade superior a 20. Além disso, o AE induziu alta atividade imunomoduladora evidenciado pelo aumento da capacidade fagocítica, volume lisossômico, liberação de nitrito e cálcio intracelular [Ca^{2+}_i] em macrófagos.

3. ESTRUTURAÇÃO DA TESE

Este estudo encontra-se estruturado da seguinte forma: Resumo, Introdução e Revisão de Literatura, seguido de dois capítulos, de acordo com as normas do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal e o Manual de normalização de monografia, dissertação e tese / Universidade Federal do Piauí. Teresina: UFPI (2020). O capítulo I contém o artigo EFEITO DO β -CARIOFILENO NA CRIOPRESERVAÇÃO DE SÊMEN que foi submetido à revista ANIMAL REPRODUCTION de classificação A2 para área ZOOTECNIA / RECURSOS PESQUEIROS. O capítulo II contém o artigo AVALIAÇÃO DO ÁCIDO ELÁGICO NA CRIOPRESERVAÇÃO DE SÊMEN que será submetido à revista REPRODUCTION IN DOMESTIC ANIMALS de classificação A3 para área ZOOTECNIA / RECURSOS PESQUEIROS.

As normas de submissão dessas duas revistas estão em anexo e as normas para trabalhos acadêmicos da UFPI estão disponíveis no link <<http://ufpi.br/normas-de-trabalhos-academicos>>.

CAPÍTULO I*

*Apresentado segundo normas do periódico ANIMAL REPRODUCTION

Effect of β -caryophyllene on Sperm Cryopreservation

Emanuela Ribeiro Moura^{1*} (<https://orcid.org/0009-0005-0701-7686>), Marlon de Araújo Castelo Branco² (<https://orcid.org/0000-0002-8574-2104>), Yndyra Nayan Teixeira Carvalho Castelo Branco³ (<https://orcid.org/0000-0003-3114-515X>), José Adalmir Torres de Souza⁴ (<https://orcid.org/0000-0003-1346-1706>), Isolda Márcia Rocha do Nascimento⁵ (<https://orcid.org/0000-0003-1861-7263>), Marcimar Silva Sousa⁶ (<https://orcid.org/0000-0002-1543-0041>), Nathyelle Maria Sousa de Oliveira¹ (<https://orcid.org/0000-0002-5351-6647>), Marina Rebeca Soares Carneiro de Sousa¹ (<https://orcid.org/0000-0003-1700-1731>), Daniela Kunkel¹ (<https://orcid.org/0000-0003-0419-5936>), Camila Ernanda Sousa de Carvalho¹ (<https://orcid.org/0000-0002-6928-7527>), Maria Christina Sanches Muratori¹ (<https://orcid.org/0000-0002-4569-0995>), Antônio de Sousa Júnior⁵ (<https://orcid.org/0000-0002-3651-8093>), Amilton Paulo Raposo Costa¹ (<https://orcid.org/0000-0002-1966-913X>)

¹Department of Veterinary Morphophysiology/Federal University of Piauí, Teresina, Piauí, Brazil

²University of NASSAU, Teresina, Piauí, Brazil

³Campus do Sertão/ Federal University of Sergipe, Nossa Senhora da Glória, Sergipe, Brazil

⁴Department of Veterinary Clinic and Surgery/ Federal University of Piauí, Teresina, Piauí, Brazil

⁵Technical college of Teresina/Federal University of Piauí, Teresina, Piauí, Brazil

⁶Faculty of veterinary medicine/State University of Ceará, Fortaleza, Ceará, Brazil

* Corresponding author: Emanuela Ribeiro Moura, emanuelaribeiro89@hotmail.com, Zip Code 89803280.

Abstract

Reproductive biotechniques using cryopreserved semen still have limitations regarding the low rates of fertility. The objective was to evaluate the effect of β -caryophyllene (BC), added to the extender, on the quality of semen from Dorper rams after cryopreservation. Six sheep of the Dorper breed were used. The semen was collected through an artificial vagina once a week for 16 weeks. The concentrations used in this experiment were determined by means of the cell viability test (MTT test). The animals were divided into a control group and three BC treated groups at concentrations; 1.0 mM; 2.0mM and 3.0mM added to the Tris-gem diluent. The cryopreserved semen was stored in liquid nitrogen. After at least 15 days of storage, the semen samples were thawed and the following *in vitro* tests were performed: computer

34 assisted sperm analysis (CASA), acrosomal integrity analysis, plasma membrane integrity,
35 mitochondrial membrane potential and thermo-resistance test (TTR). In addition, the
36 thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) assay was performed. It was concluded that
37 although BC did not increase sperm motility, it improved mitochondrial potential and
38 attenuated oxidative stress in ram semen after cryopreservation.

39 **Keywords:** sheep, antioxidant, reproduction.

40 **Introduction**

41 The use of cryopreserved semen from rams with superior genetics in reproductive
42 biotechniques is one of the efficient biotechniques to promote the gain in productivity (Elsayed
43 et al., 2019; Jha et al. 2019). However, this procedure provides low fertility in ewes when
44 compared to the use of fresh semen because ovine sperm is extremely susceptible to low
45 temperatures. This susceptibility has been attributed to the high concentrations of
46 polyunsaturated fatty acids in the plasma membrane of sheep spermatozoa that make the cells
47 sensitive, in the presence of reactive oxygen species (ROS) as well as to cold shock (Allai et
48 al., 2018; Amini et al., 2019). Therefore, the efficiency of ram semen cryopreservation should
49 be improved by preventing oxidative stress.

50 It is noteworthy that a low level of ROS produced as a result of oxidative metabolism is
51 necessary to perform sperm functions such as capacitation, acrosomal reaction, hyperactivation
52 and sperm-ovocyte fusion. Therefore, a balance must be maintained between the production
53 and consumption of these ROS, as imbalance can lead to the onset of high rates of lipid
54 peroxidation due to excess amounts of ROS (Lone et al., 2019).

55 Post-thaw sperm viability still faces obstacles, such as excess ROS production, despite
56 scientific and technological advances. The main cause of decreased viability due to imbalance
57 in ERO levels are changes in ejaculate osmolarity and changes in sperm conformation during

58 freezing and thawing procedures, which lead to decreased post-thaw fertility rates (Batissaco et
59 al., 2020).

60 The positive advances obtained with reproductive biotechniques can be achieved
61 through improvements in semen cryopreservation diluents. In general, a suitable freezing
62 extender needs, among other requirements, a system to neutralize the toxic ROS products
63 produced by spermatozoa. (Bittencourt et al., 2013). Thus, it is assumed that the addition of a
64 potent antioxidant can contribute to improve the reproductive performance of sheep by
65 improving the viability of sperm cells after the cryopreservation process.

66 β -Caryophyllene (BC), a potent antioxidant, is a phytocannabinoid, abundantly found
67 in spices such as pepper, clover, cinnamon, and oregano. BC has been shown to exert
68 organoprotective effects against the deleterious effects of drugs, xenobiotics, or other chemical
69 toxicants on the liver, kidney, pancreas, intestine, and brain (Al-Tae et al., 2019). Various
70 biological activities have been attributed to this natural product, such as anti-inflammatory,
71 antibiotic, antioxidant, anticancer, and local anesthetic (Pant et al., 2014). We aimed to evaluate
72 the effect of β -caryophyllene, an antioxidant, added to the diluent on the quality of semen from
73 Dorper breed sheep after cryopreservation.

74 **Methods**

75 *Test Substance β -Caryophyllene*

76 The β -caryophyllene >80% purity, was obtained commercially from the company
77 Sigma-Aldrich (Saint Louis, Missouri, USA). From a standard Tris diluent (composed of 12.11
78 g Tris; 6.8 g citric acid; 2.5 g fructose; 2.5 g lactose; 1 mL gentamicin, 44 mg/mL; 68 mL
79 distilled water, 32 mL glycerol), Tris-egg yolk was prepared (composed of 60% distilled water;
80 20% egg yolk and 20% standard Tris diluent, osmolarity ~350 mOsm/kg
81 and pH 6.8). Based on the results of the cell viability test (MTT test), presented in Figure 1,
82 three concentrations of BC were selected and used in the other tests. Three experimental groups
83

84 were formed with the following concentrations of β -caryophyllene: 1.0mM; 2.0mM and 3.0
85 mM, added to the Tris-egg yolk diluent (Machado et al., 2015). The Tris-gem diluent, without
86 test substance, was considered as the control group.

87 *Animals*

88
89 Six sheep of the Dorper breed, 3 to 5 years old, from the from the Technical College of
90 Terezina, Piauí, Brazil (Latitude:-5.047851720557213, Longitude: -42.78303633983549), of
91 tropical Aw climate with dry season (Köppen-Geiger climate classification), and with body
92 condition score of 3 to 4, on a scale of 1 to 5. All animals have a proven fertility history and
93 were evaluated for general health, reproductive organ integrity and sperm quality. The animals
94 were fed with concentrate containing 22% crude protein [3/4 corn meal + 1/4 soybean meal]
95 and green forage, with 70% elephant grass (*Pennisetum purpureum* Schum). Mineralization
96 was incorporated into the feed, and water was provided *ad libitum*.

97 *Semen collection and initial evaluation*

98
99 Semen was collected once a week for eight weeks during the rainy season and another
100 eight weeks during the dry season, totaling 96 ejaculates. The collections were made with the
101 aid of a female in estrus, an artificial vagina and using a 15 mL graduated test tube, sterile and
102 properly protected with aluminum foil to prevent exposure of semen to light. The test tubes
103 with the six ejaculates were placed in a water bath at 37 °C and separately evaluated for color,
104 appearance, volume (mL), turbulence (0-5), total motility (%) and sperm vigor (1-5) under a
105 phase contrast microscope (Olympus optical Co., Ltd., Tokyo, Japan). Sperm concentration was
106 obtained in a Neubauer chamber, at a dilution of 1:400, in distilled water. Only ejaculates with
107 turbulence ≥ 3 ; total motility $\geq 80\%$; vigor ≥ 3 ; sperm concentration $\geq 3.5 \times 10^9$ sperm/mL and
108 sperm pathologies $\leq 20\%$ were used in this study. When approved, the samples from the six
109 ejaculates were mixed to form a *pool*, aiming to increase the semen volume and eliminate the
110 individual variability of the animals. After *pool* formation, it was divided in four aliquots, which

111 were kept at 37° in a water bath before the experimental procedures. The semen samples were
112 collected in the rainy and non-rainy season in order to minimize the environmental effect.

113 *Cryopreservation of semen*

114
115 The diluted semen was packed in 0.25 ml straws (50 X 10⁶ viable spermatozoa per
116 straw) and frozen in TK 3000® machine (TK Technology in Freezing Ltda, Uberaba, Brazil), at
117 the freezing curve -0,25° C/min, from 25° C to 5° C and -20° C/min, from 5° C to -120° C and,
118 after reaching -120° C, the straws were immersed in liquid nitrogen (-196° C) and stored in a
119 cylinder with liquid nitrogen. The equilibration time at 5°C was at least 30 minutes. After at
120 least 15 days of storage, the semen samples were thawed in a 37°C water bath for 30 seconds
121 and evaluated for cell viability, plasma membrane integrity, acrosome integrity, mitochondrial
122 function, post thaw kinetics and thermo-resistance test (TTR). In addition, the thiobarbituric
123 acid reactive substances (TBARS) test was performed to evaluate the lipid peroxidation
124 reaction.

125

126 *Cell viability test (MTT Test)*

127

128 Given the need to verify which concentrations are non-toxic for sheep spermatozoa,
129 the cell viability test was performed using β-caryophyllene at concentrations; 0.7; 1.0; 1.5; 2.0
130 and 3.0 mM (Machado et al., 2015). Cell viability was assessed using the MTT test (MTT
131 tetrazolium salt - [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide]), for which
132 semen was thawed in a 37°C water bath for 30 seconds. 20µL of semen was transferred to Elisa
133 plate containing 96 wells and 20µL of MTT solution was added to the wells containing the
134 samples and as well as to the negative control wells. The plate was kept in an incubator with
135 5% CO₂ at a temperature of 37°C for four hours. After this period, 70µL of 10% SDS (Sodium
136 dodecyl (laurel) sulfate solution) was added and the plate was again kept in the oven overnight
137 until reading was performed using a spectrophotometer at a wavelength of 570 nm (Souza,

138 2012). With regards to the results of this test, as demonstrated in Figure 1, the three
139 concentrations of BC that were used in the other tests were selected.

140

141 *Analysis of plasma membrane integrity*

142

143 To evaluate plasma membrane integrity, the double staining method was used with
144 carboxyfluorescein diacetate (DCF; Sigma-Aldrich®, St. Louis, MO, USA) and propidium
145 iodide (PI; Sigma-Aldrich®, St. Louis, MO, USA), modified by Coletto et al. (2002), in which
146 50- μ L aliquots of post-thawed semen were diluted in 150 μ L of TRIS solution (composed of
147 7.210g Tris, 4.048g citric acid, 2.976g fructose and 200 mL distilled water) containing 5 μ L of
148 DCF (0.46mg/mL in DMSO) and 20 μ L of IP (0.5mg/mL in PBS) and incubated for 10 minutes
149 at 38°C. A total of 200 spermatozoa were evaluated under an epifluorescence microscope
150 (Olympus optical Co., Ltd., Tokyo, Japan) at 400x magnification using DBP 580-630nm
151 emission filter and DBP 485/20nm excitation filter. Spermatozoa were classified as having a
152 intact membrane when stained green and a damaged membrane when stained red.

153 *Analysis of acrosomal integrity*

154

155 To assess acrosome integrity, the fluorescein isothiocyanate dye conjugated to *Peanut*
156 *agglutinin* (FITC-PNA; Sigma-Aldrich®, St Louis, MO, USA) was used according to the
157 technique described by Roth et al. (1998), in which a 20 μ L aliquot of FITC-PNA stock solution
158 (1mg/mL) was thawed and added to 480 μ L of phosphate buffered solution (PBS Sigma-
159 Aldrich®, St Louis, MO, USA) to obtain the final concentration of 100 μ g/mL. Aliquots (20 μ L)
160 of this solution were placed on smears of slides containing spermatozoa, which were incubated
161 for 20 minutes in a humid chamber at 4°C in the absence of light. After incubation, the slides
162 were rinsed twice in chilled PBS (4°C) and placed for drying in the absence of light.
163 Immediately before evaluation, 5 μ L of UCD mounting medium (4.5mL glycerol, 0.5mL PBS,
164 5mg sodium azide, and 5mg p-phenylenediamine) was placed on the slide and covered with a

165 coverslip. 200 spermatozoa per slide were evaluated at 1000x magnification under immersion
166 oil in an epifluorescence microscope (Olympus optical Co., Ltd., Tokyo, Japan), using LP
167 515nm emission filter and BP 450-490nm for excitation. Spermatozoa were classified as having
168 an intact acrosome when the acrosomal region was stained with green fluorescence, or as having
169 a reacted acrosome when there was a green fluorescent band in the equatorial region of the
170 sperm head or no green fluorescence in the entire head region.

171 *Mitochondrial membrane potential analysis*

172
173 Mitochondrial function was determined by using a lipophilic cationic fluorochrome
174 JC-1 (Guthrie and Welch, 2006). Therefore, aliquots of 50 μ L of post-thawed semen were
175 diluted in 150 μ L of Tris containing 5 μ L of JC-1 (0.15mM in DMSO) and incubated for 10
176 minutes at 38°C. A total of 200 spermatozoa were evaluated under an epifluorescence
177 microscope (Olympus optical Co., Ltd., Tokyo, Japan) at 1000x magnification under immersion
178 oil, using LP 515nm emission filter and BP 450-490nm for excitation. Cells stained in orange
179 were classified with high mitochondrial membrane potential, and those stained in green were
180 classified with low membrane potential.

181 *Evaluation of sperm kinetics using integrated optical visual system*

182
183 Sperm kinetics were evaluated using a computer-assisted sperm analysis system
184 (Computer-assisted Sperm Analysis-CASA). The CASA consisted of a phase-contrast optical
185 microscopy system (Nikon TM H5505, Eclipse 50i, Japan), with stroboscopic illumination, and
186 a hot stage at 37°C, a video camera (Basler Vision Technologie TM A312FC, Ahrensburg,
187 Germany), and a computer with Class TM sperm analyzer software (Microoptics, SL, version
188 3.2.0, Barcelona, Spain). Sperm kinetic variables were evaluated after washing the samples in
189 Tris medium (v/v) subsequently incubated in a 37°C water bath for 5 minutes. The variables
190 evaluated were: progressive motility (MOP- μ m/s), curvilinear velocity (VCL - μ m/s), straight
191 line velocity (VSL - μ m/s), average path velocity (VAP- μ m/s), linearity (LIN - %), straightness

192 (STR-%), lateral head shift (ALH - μm), Wobble oscillation index (WOB - %), cross beat
193 frequency (BCF-Hz) and hyperactivity, for each sperm analyzed.

194 *Thermoresistance Test (TTR)*

195
196 The heat resistance test was performed according to Vianna et al. (2009), which
197 consisted in evaluating the longevity of spermatozoa from thawed semen samples, incubated in
198 a 37°C water bath for a period of 3 hours. The thawed samples were conditioned in 1.5 mL
199 microtubes and incubated at 37°C, subsequently, they were evaluated for total motility (TM -
200 %) and sperm vigor (1-5) by means of phase contrast microscopy (Olympus optical Co., Ltda.,
201 Tokyo, Japan) with attached hotplate, at 400x magnification, at 0, 60, 120 and 180 minutes post
202 thawing according to Colégio Brazilian college of Anima reproductionl (CBRA, 2013).

203 *Thiobarbituric Acid Reactive Substances (TBARS) levels, malondialdehyde (MDA)* 204 *concentrations*

205
206 MDA concentrations were determined by thiobarbituric acid reactive substance
207 production (TBARS) according to the method described by Ohkawa, Ohishi, and Yagi (1979)
208 with adaptations. Accordingly, 100 μL of post-thawed semen was added to 175 μL of 20%
209 acetic acid (pH 3.5) and 300 μL of 0.5% thiobarbituric acid. The mixture was then incubated in
210 a water bath for 45 minutes at 100°C and subsequently cooled in an ice bath for 15 minutes.
211 After this procedure, 25 μL of 8.1% sodium dodecyl sulfate (SDS) was added to the mixture
212 and centrifuged for 15 minutes at 12,000 rpm at 25°C. 200 μL of the supernatant was transferred
213 to 96-well plate where absorbance was read at wavelength of 532 nm. A calibration analytical
214 curve was prepared using MDA as standard at concentrations of 1.0, 5.0, 10.0, 25.0 and 50.0
215 nmol/mL. The samples were analyzed in duplicate, and the results expressed in nmol of MDA
216 per mL of sample.

217 *Statistical Analysis*

218
219 Cell viability test was performed in triplicate and TBARS production in duplicate. The
220 data were analyzed by ANOVA and the means were compared using the Tukey's test (5%

221 probability). Analyses were performed using Graph Pad Prism version 8 software (Graph Pad
222 Software, California, USA).

223 *Ethics in animal experimentation*

224
225 All experimental procedures were submitted for approval by the Ethics Committee on
226 Animal Use (CEUA) of the Federal University of Piauí (UFPI), approval number 405/17 and
227 certified (Appendix).

228 **Results**

229 The result of the kinetics of cryopreserved ovine spermatozoa post-thaw at 1.0, 2.0 and
230 3.0 mM of BC showed no statistically significant difference compared to the control group
231 (Table 1 and Figure 2).

232 The results of plasma membrane integrity and acrosomal integrity, at concentrations;
233 1.0, 2.0 and 3.0 mM of BC, also showed no statistically significant differences when compared
234 with the control group (Table 2). The concentration of 1.0 mM of BC demonstrated a
235 statistically significant difference, in which it showed a higher mitochondrial potential,
236 compared to the control group (Table 2).

237 Moreover, the results of total motility and vigor in the endurance test, for the
238 concentrations 1.0, 2.0 and 3.0 mM of BC, showed no statistically significant difference in
239 relation to the control group as shown in Table 3.

240 Regarding the levels of thiobarbituric acid reactive substances, the concentration of 2.0
241 mM BC showed a significantly lower concentration of MDA when compared to the control
242 group (Table 4).

243 **Discussion**

244 Sperm kinetics is an indicator of sperm quality. The motility dynamics offered by the
245 CASA system and traditional semen evaluations provide valuable information about semen

246 quality before and after freezing (Batissaco et al., 2020). But, the results observed in this study
247 showed no improvement in sperm motility with addition of BC to the diluent.

248 The analysis of plasma membrane integrity, acrosomal integrity and mitochondrial
249 potential parameters are important because they are closely linked to semen quality, as the
250 structural integrity of spermatozoa is necessary to maintain fertilization ability (Batissaco et al.,
251 2020). However, at the concentration of 1.0mM it promoted a higher percentage of
252 mitochondrial matrix integrity, when compared to the control group. Thus, the addition of BC
253 promoted an improvement in mitochondrial potential. The use of this antioxidant may be
254 associated with a possible protection of the mitochondrial membrane, which results in a higher
255 rate of oxidative phosphorylation and higher metabolic activity. This have a direct impact on
256 cell motility, since mitochondria are responsible for transforming and making energy available
257 for cell movement (Corandin, 2013).

258 However, the addition of BC did not promote significant effects on cell motility. Studies
259 have shown the importance of mitochondria for sperm functionality, as the main source of ATP
260 in cell homeostasis and motility.

261 The concentration of 2.0mM of BC was able to decrease the production of ROS, by
262 reducing lipid peroxidation, but this fact did not contribute to an improvement in sperm motility.
263 It is noteworthy that the lower the concentration of MDA, the lower its production in the
264 medium and, consequently, the lower the occurrence of lipid peroxidation. MDA is one of the
265 secondary products formed from the oxidation of lipids promoted by ROS. MDA is considered
266 a biomarker of lipid peroxidation, i.e. oxidative stress (Gaschler and Stockwell, 2017). The
267 correlation between lipid peroxidation and sperm motility was demonstrated by Najafi et al.
268 (2014). It can be inferred that other factors may contribute to sperm motility, besides
269 peroxidative stress reduction alone was insufficient in improving the motility of these cells.

270 **Conclusion**

271 It was concluded that although β -Caryophyllene did not increase sperm motility, it
272 improved mitochondrial potential and attenuated oxidative stress in ram semen after
273 cryopreservation.

274

275 **Thanks to**

276 To the Laboratory of Animal Reproduction Biotechnology of the Federal University of
277 Piauí (LBRA-UFPI), the Technical College of Teresina (CTT- UFPI) and the Laboratory of
278 Goat and Sheep Semen Technology of the State University of Ceará (UECE).

Referências

- Allai L, Benmoula A, Silva MM, Nasser B, El Amiri B. Supplementation of ram semen extender to improve seminal quality and fertility rate. **Animal Reproduction Science**. 2018; 192: 6-17. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2018.03.019>
- Al-Taee H, Azimullah S, Meeran MN, Almehiri MKA, Al Jasmi RA, Tariq S, Khan MAB, Adeghate E, Ojha S. β -caryophyllene, a dietary phytocannabinoid attenuates oxidative stress, inflammation, apoptosis and prevents structural alterations of the myocardium against doxorubicin-induced acute cardiotoxicity in rats: An in vitro and in vivo study. **European Journal of Pharmacology**, 2019; 858:172467. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2019.172467>.
- Amini S, Masoumi R, Rostami B, Shahir MH, Taghilou P, Arslan HO. Effects of supplementation of Tris-egg yolk extender with royal jelly on chilled and frozen-thawed ram semen characteristics. **Cryobiology**. 2019; 88:75-80. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2019.03.008>.
- Batissaco L, Arruda RP, Alves MBR, Torres MA, Lemes KM, Prado-Filho RR, Almeida TG, Andrade AFC, Celeghini ECC. Cholesterol-loaded cyclodextrin is efficient in preserving sperm quality of cryopreserved ram semen with low freezability. **Reproductive Biology**. 2020; 20 (1), 14-24. <https://doi.org/10.1016/j.repbio.2020.01.002>
- Bittencourt RF, Oba E, Ribeiro Filho ADL, Chalhoub M, Azevedo HC, Bicudo SD. Avanços na criopreservação do sêmen ovino I: diluidores e crioprotetores. **Ciência Animal Brasileira**. 2013; 14 (4):522-536. doi: 10.5216/cab.v14i4.22964.
- CBRA. Colégio Brasileiro de Reprodução Animal. **Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal**. 3rd ed. CBRA: Belo Horizonte; 2013. p.104.
- Coletto ZF, Guerra MMP, Batista AM. Avaliação do sêmen congelado de caprinos com drogas fluorescentes. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**. 2002; 24:101-104.
- Corandin, E. M. **Avaliação da cisteína adicionada ao meio diluente sobre espermatozoides ovinos mantidos fresco, refrigerado e congelado**. Universidade Federal de Goiás, dissertação (mestrado), 2013.
- Elsayed DH, El-Shamy AA, Abdelrazek HM, El-Badry DA. Effect of Genistein on Semen Quality, Antioxidant Capacity, Caspase-3 Expression and DNA Integrity in Cryopreserved Ram Spermatozoa. **Small Ruminant Research**. 2019; 177: 50-55. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2019.06.009>.
- Gaschler MM, Stockwell BR. Peroxidação lipídica na morte celular. **Comunicações de pesquisa bioquímica e biofísica**. 2017; 482 (3), 419-425. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2016.10.086>.
- Guthrie HD, Welch GR. Determination of intracellular reactive oxygen species and high mitochondrial membrane potential in Percoll-treated viable boar sperm using fluorescence-activated flow cytometry. **Journal of Animal Science**. 2006; 84. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2019.172467>.

Jha PK, Alam MGS, Mansur AA, Naher N, Islam T, Bhuiyan MU, Bari FY. Cryopreservation of Bangladeshi ram semen using different diluents and manual freezing techniques. **Cryobiology**. 2019; 89:35-41. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2019.06.001>

Machado KC, Araujo YC, Oliveira GLS, Freitas RM. Potencial antioxidante in vitro do beta-cariofileno. **Revista brasileira de biodiversidade e biotecnologia**. 2015.

Mehdipour M, Kia HD, Nazari M, Najafi A. Effect of lecithin nanoliposome or soybean lecithin supplemented by pomegranate extract on post-thaw flow cytometric, microscopic and oxidative parameters in ram semen. **Cryobiology**. 2017; 78,34-40. DOI: 10.1016 / j.cryobiol.2017.07.005.

Najafi A, Daghigh kia H, Mohammadi H, Najafi MH, Zanganeh Z, Sharafi M, Martinez-Pastor F, Adeldust H. Different concentrations of cysteamine and ergothioneine improve microscopic and oxidative parameters in ram semen frozen with a soybean lecithin extender. **Cryobiology**. 2014; 69, 68-73. DOI: 10.1016 / j.cryobiol.2014.05.004.

Ohkawa , H.,; Ohishi, N.,; Yagi, K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. **Analytical biochemistry**. 1979; 95 (2), 351-358. DOI: 10.1016 / 0003-2697 (79) 90738-3.

Pant A, Saikia SK, Shukla V, Asthana J, Akhoon BA, Pandey R. Beta-caryophyllene modulates expression of stress response genes and mediates longevity in *Caenorhabditis elegans*. **Experimental Gerontology**. 2014; 57:81-95. <https://doi.org/10.1016/j.exger.2014.05.007>.

Roth TL, Weiss RB, Buff JL. Heterologous in vitro fertilization and sperm capacitation in an endangered African antelope, the Scimitar-Horned Oryx (*Oryx dammah*). **Biology of Reproduction**. 1998; 58:475-482. DOI: 10.1095 / biolreprod58.2.475.

Souza MAF. **Comparação entre dois métodos para criopreservação de sêmen ovino** [dissertação]. Salvador: Universidade Federal da Bahia, Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia; 2012. Português.

Vianna FP, Papa FO, Zahn FS, Melo CM, Dell'Aqua Jr JA. Thermoresistance sperm tests are not predictive of potential fertility for cryopreserved bull sêmen. **Animal Reproduction Science**. 2009; 113:279-282. DOI: 10.1016 / j.anireprosci.2008.06.009.

Tabelas

Table 1- Post-thaw kinetics of cryopreserved ovine spermatozoa at the concentrations 1.0; 2.0 and 3.0 mM of β -caryophyllene (BC). Total Motility (TM); Non progressive Motility (NPM); and Progressive Motility (PM)

Treatments	TM	NPM	PM
Control	47,5 \pm 4,5	18,7 \pm 1,6	28,8 \pm 3,5
BC 1.0mM	39,8 \pm 3,8	17,2 \pm 1,4	24,1 \pm 2,6
BC 2.0mM	45,5 \pm 4,4	17,9 \pm 2,2	27,6 \pm 3,4
BC 3.0mM	41,4 \pm 4,6	18,4 \pm 2,0	23,1 \pm 3,4

Note: results expressed as mean and standard error of mean, n=16.

Table 2- Plasma membrane integrity (MP), mitochondrial potential (MIT) and acrosomal integrity (AC) of post-thawed ovine spermatozoa at 1.0, 2.0 and 3.0 mM concentrations of β -

Treatments	MP %	MIT %	AC %
Control	39,8 \pm 3,2	45,4 \pm 2,0	58,3 \pm 2,8
BC 1.0mM	45,7 \pm 4,2	54,4 \pm 1,5*	67,3 \pm 4,1
BC 2.0mM	43,3 \pm 4,6	44 \pm 4,2	53,2 \pm 3,5
BC 3.0mM	33,3 \pm 4,7	43,2 \pm 2,9	56,6 \pm 4,5

caryophyllene (BC)

Note: Results expressed as mean and standard error of mean, n=10.

Table 3- Total motility (TM) and vigor (VG) of post-thawed ovine spermatozoa at concentrations; 1.0, 2.0 and 3.0 mM of β -caryophyllene (BC) submitted to the thermo-resistance test

Parameters	Time (minutes)	Control	BC 1.0 mM	BC 2.0 mM	BC 3.0mM
TM (%)	0	34±1,6	41±2,8	40±2,6	35±2,2
VG (1-5)	0	3±0	3±0,1	3,1±0,1	2,9±0,1
TM (%)	60	35±1,7	39±2,8	36±2,2	35±1,7
VG (1-5)	60	3±0	3,2±0,1	3,2±0,1	3,0±0
TM (%)	120	26±2,2	31±2,3	32±2,5	26±2,7
VG (1-5)	120	2,9±0,1	2,9±0,1	2,8±0,2	2,8±0,1
TM (%)	180	26±2,2	31±2,3	32±2,5	26±2,7
VG (1-5)	180	2,5±0,2	2,8±0,2	2,8±0,1	2,5±0,2

Note: results expressed as mean and standard error of mean, n=10.

Table 4- Levels of thiobarbituric acid reactive substances (malondialdehyde -MDA) in post-thawed ovine semen at concentrations of 1.0, 2.0 and 3.0 mM of β -caryophyllene (BC)

Treatments	MDA concentration (nmol/L)
Control	45,6±4,3
BC 1.0mM	34±2,0
BC 2.0mM	28,5±1,4*
BC 3.0mM	28±2,7

Note: results expressed as mean and standard error of mean, n=10

Figures

Figure 1- Cell viability of post-thawed ovine spermatozoa at concentrations 0.7; 1.0; 1.5; 2.0 and 3.0 mM of β -caryophyllene (BC). Values are expressed as mean \pm standard deviation (SD)

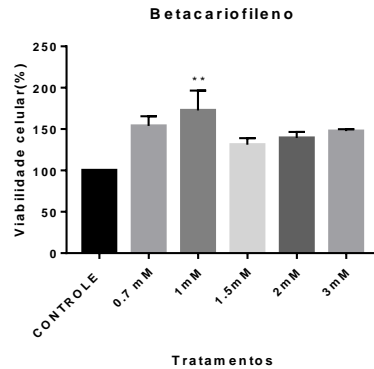
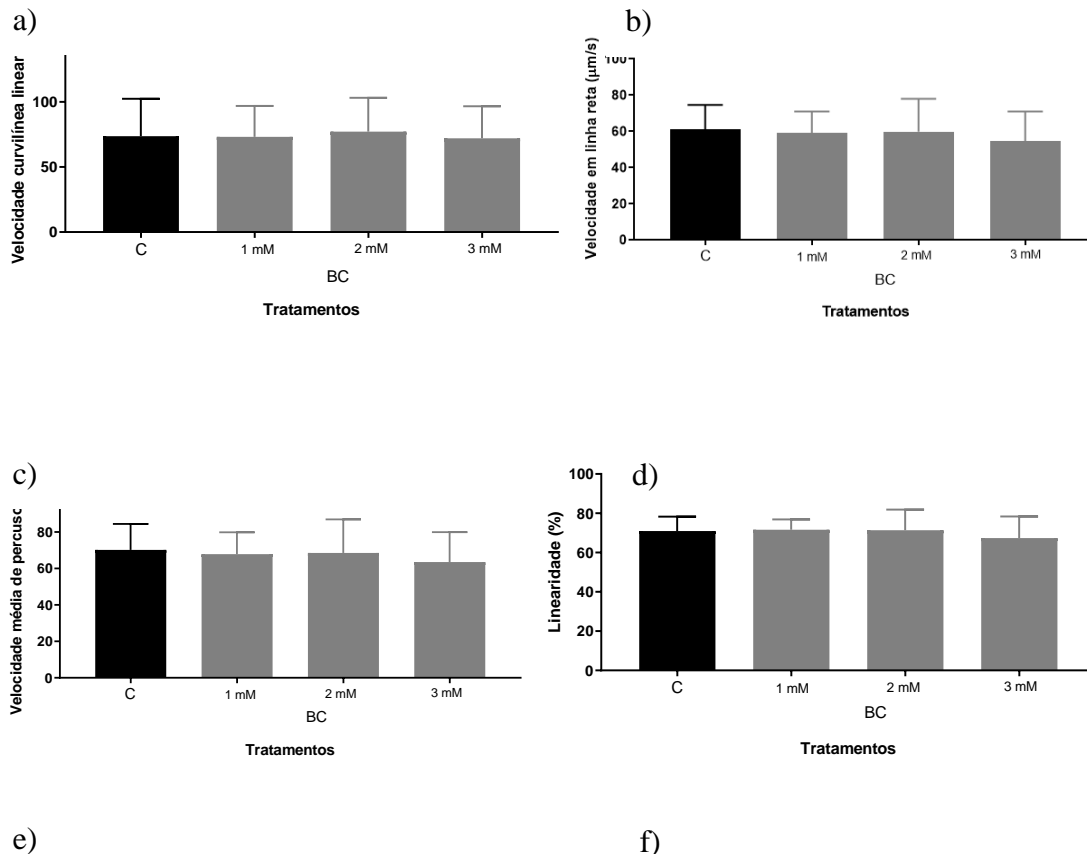
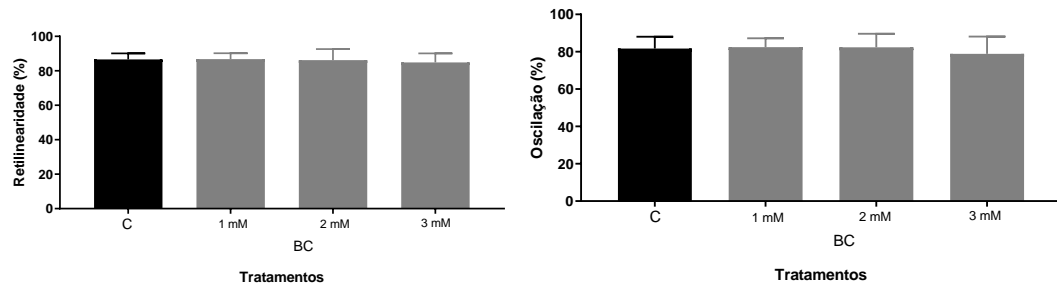
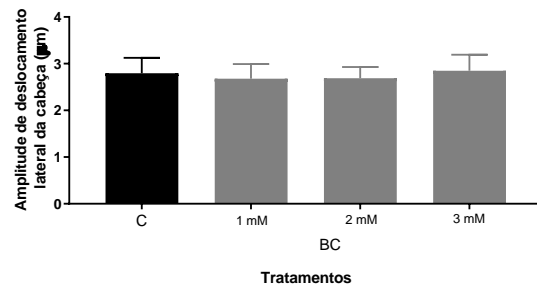


Figure 2- Kinetic parameters of post-thawed ovine spermatozoa at the three studied concentrations 1.0; 2.0 and 3.0 mM of β -caryophyllene (BC). Values are expressed as mean \pm standard deviation (SD). a) Linear curvilinear velocity ($\mu\text{m/s}$); b) Straight-line velocity ($\mu\text{m/s}$); c) Average travel velocity ($\mu\text{m/s}$); d) Linearity (%); e) Rectilinearity (%); f) Oscillation (%); g) Lateral head displacement amplitude (μm); h) Tail beat frequency (Hz); and i) Hyperactivity (%). n=16

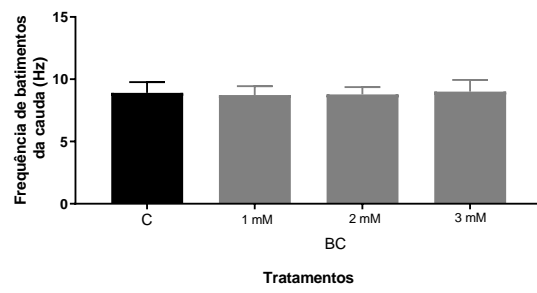




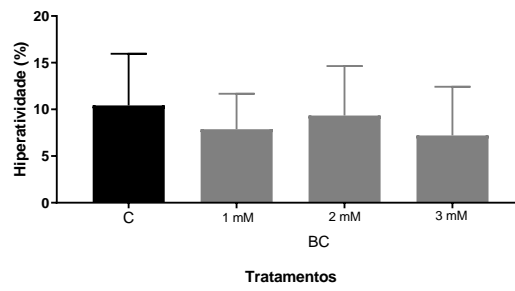
g)



h)



i)



CAPÍTULO II*

*Apresentado segundo normas do periódico REPRODUCTION IN DOMESTIC ANIMALS

Avaliação do Ácido Elágico na criopreservação de sêmen

Emanuela Ribeiro Moura^{1*} (<https://orcid.org/0009-0005-0701-7686>), Marlon de Araújo Castelo Branco² (<https://orcid.org/0000-0002-8574-2104>), Yndyra Nayan Teixeira Carvalho Castelo Branco³ (<https://orcid.org/0000-0003-3114-515X>), José Adalmir Torres de Souza⁴ (<https://orcid.org/0000-0003-1346-1706>), Isolda Márcia Rocha do Nascimento⁵ (<https://orcid.org/0000-0003-1861-7263>), Marcimar Silva Sousa⁶ (<https://orcid.org/0000-0002-1543-0041>), Nathyelle Maria Sousa de Oliveira¹ (<https://orcid.org/0000-0002-5351-6647>), Marina Rebeca Soares Carneiro de Sousa¹ (<https://orcid.org/0000-0003-1700-1731>), Daniela Kunkel¹ (<https://orcid.org/0000-0003-0419-5936>), Camila Ernanda Sousa de Carvalho¹ (<https://orcid.org/0000-0002-6928-7527>), Maria Christina Sanches Muratori¹ (<https://orcid.org/0000-0002-4569-0995>), Antônio de Sousa Júnior⁵ (<https://orcid.org/0000-0002-3651-8093>), Amilton Paulo Raposo Costa¹ (<https://orcid.org/0000-0002-1966-913X>)

¹Department of Veterinary Morphophysiology/Federal University of Piauí, Teresina, Piauí, Brazil

²University of NASSAU, Teresina, Piauí, Brazil

³Campus do Sertão/ Federal University of Sergipe, Nossa Senhora da Glória, Sergipe, Brazil

⁴Department of Veterinary Clinic and Surgery/ Federal University of Piauí, Teresina, Piauí, Brazil

⁵Technical college of Teresina/Federal University of Piauí, Teresina, Piauí, Brazil

⁶Faculty of veterinary medicine/State University of Ceará, Fortaleza, Ceará, Brazil

* Corresponding author: Emanuela Ribeiro Moura, emanuelaribeiro89@hotmail.com, Zip Code 89803280.

Resumo

A utilização de sêmen criopreservado, como uma biotécnica reprodutiva, ainda possui entraves quanto as baixas taxas de fertilidade. Objetivou-se avaliar o efeito do Ácido elágico suplementado ao diluidor sobre a qualidade do sêmen de ovinos da raça Dorper após criopreservação. Foram utilizados seis carneiros da raça Dorper. O sêmen dos animais foi coletado uma vez por semana, durante 16 semanas, por meio da vagina artificial. As concentrações utilizadas neste experimento foram determinadas a partir do teste de viabilidade celular (Teste de MTT). Foram formados os seguintes grupos experimentais: 0,5 mM; 1,0 mM; 2,0 mM de AE , adicionados ao diluidor Tris-Gema. O diluidor Tris-Gema, sem adição das substâncias-teste, foi considerado como o grupo controle. O sêmen criopreservado foi armazenado em nitrogênio líquido. Após 15 dias de armazenamento, as amostras de sêmen foram descongeladas e foram feitos os testes *in vitro*: análise espermática assistida por computador (CASA), análise da integridade acrossomal, integridade da membrana plasmática, potencial de membrana mitocondrial e de termorresistência (TTR). Foi realizado, também, o teste de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) com a finalidade de verificar a reação de peroxidação lipídica. Concluiu-se que o ácido elágico não melhorou a qualidade dos espermatozoides de carneiro após a criopreservação, conquanto tenha atenuado o estresse peroxidativo, nas concentrações de 0,5 e 1,0mM de AE .

Palavras-chave: carneiro, antioxidante, peroxidação, CASA

Introdução

A criopreservação de sêmen é um método prático para armazenar espermatozoide e amplificar as características reprodutivas e produtivas escolhidas (Amini et al., 2019). No entanto, os espermatozoides de ovinos são extremamente sensíveis à criopreservação comparada à de outras espécies (Luna-Orozco et al., 2019).

As biotecnologias reprodutivas, que utilizam sêmen criopreservado, fornecem baixa fertilidade em ovelhas pois geralmente, não mais que 50% das células espermáticas sobrevivem à criopreservação, proporcionando baixas taxas de fertilidade (Amini et al., 2019; Galarza et al., 2019). Pode ocorrer danos nas organelas e membranas espermáticas e assim reduzir a eficiência biológica, além da morte celular (Galarza et al., 2019). que se deve a produção de espécies reativas de oxigênio (ERO), em excesso, como uma consequência fisiológica do metabolismo oxidativo em desequilíbrio dos espermatozoides. No entanto, uma baixa concentração de ERO tem um papel importante nas funções espermáticas dos mamíferos, como capacitação, reação acrossomal e estabilização da cápsula mitocondrial. É essencial um equilíbrio entre a produção de ERO e presença de antioxidantes para não haver um aumento das taxas de peroxidação lipídica e conseqüentemente à perda de motilidade (Allai et al., 2018).

Ainda não foi padronizado o processo de congelação e descongelação para evitar danos bioquímicos e estruturais nos espermatozoides produzidos por mudanças de temperatura, estresse osmótico e formação de cristais de gelo, que causam uma diminuição na viabilidade, motilidade, integridade do DNA e estresse oxidativo (Luna-Orozco et al., 2019). Esses processos diminuem a atividade antioxidante e expõem o sêmen ao estresse oxidativo com a síntese excessiva de ERO. A adição de antioxidantes ao diluente do sêmen de carneiro é primordial para neutralizar esses ERO, em excesso, de modo que restabeleça uma alta taxa de fertilidade para sêmen criopreservado (Elsayed et al., 2019).

O ácido elágico (AE) é um dos principais compostos fenólicos e exibe atividade antioxidante forte, anti-inflamatória, proteção hepática e antitumoral (Zheng et al., 2019). O AE está presente em uma variedade de frutas, como a romã, assim como em nozes. Esse composto protege o sistema reprodutor masculino através do combate ao estresse oxidativo e inflamação por meio da supressão de citocinas pró-inflamatórias e apoptose (Guvvala et al., 2019). Objetivou-se avaliar o efeito do ácido elágico, um antioxidante, adicionado ao diluidor sobre a qualidade do sêmen de ovinos da raça Dorper após criopreservação.

Material e métodos

Substância teste

O ácido elágico 97% de pureza, foi obtido comercialmente da empresa Alfa Aesar (AE hidratado 12% de água, Estados Unidos).

A partir do diluidor Tris-mãe (12,11 g de Tris; 6,8 g de ácido cítrico; 2,5g de frutose; 2,5g de lactose; 1 ml de gentamicina, 44mg/mL; 68 mL de água destilada, 32 mL de glicerol) foi preparado o Tris-gema (60% de água destilada; 20% de gema de ovo e 20% do diluidor Tris-mãe, osmolaridade de ~350 mOsm/kg e pH 6,8). A partir dos resultados do teste de viabilidade celular (teste de MTT), apresentado na Figura 1, foram selecionadas três concentrações de BC que foram utilizadas nos demais testes. Sendo assim, foram formados três grupos experimentais com as seguintes concentrações, adicionados ao diluidor Tris-Gema: 0,5 mM; 1,0 mM; 2,0 mM de AE (Omur et al.2016). O diluidor Tris-Gema, sem adição da substância-teste, foi considerado como o grupo controle.

Animais

Foram utilizados seis carneiros da raça Dorper, 3 a 5 anos de idade, provenientes da fazenda Pampulha, município de José de Freitas, Piauí, Brasil (Latitude: -4.75309, Longitude: -42.5767; 4° 45' 11" Sul, 42° 34' 36" Oeste), de clima tropical com estação seca (classificação climática de Köppen-Geiger) e com escore de condição corporal de 3 a 4, na

escala 1 a 5. Todos os animais têm um histórico de fertilidade comprovado e foi feita a avaliação quanto à saúde geral, à integridade dos órgãos reprodutivos e à qualidade espermática. Os animais eram alimentados com concentrado contendo 22% de proteína bruta [3/4 de farelo de milho + 1/4 de farelo de soja] e forragem verde, com 70% de capim-elefante (*Pennisetum purpureum* Schum). A mineralização foi incorporada à ração, e água foi fornecida *ad libitum*.

Coleta de sêmen e avaliação inicial

As coletas de sêmen foram feitas uma vez por semana, durante oito semanas no período chuvoso e mais oito semanas no período não chuvoso, totalizando 48 ejaculados no período chuvoso e mais 48 ejaculados no período não-chuvoso. Para a coleta, foi utilizado uma fêmea em estro, a vagina artificial e um tubo de ensaio graduado de 15 mL, estéril e devidamente protegido com uma folha de papel alumínio para evitar a exposição do sêmen à luz. Os seis ejaculados foram colocados em banho Maria a 37 °C e avaliados separadamente quando cor, aspecto, volume (mL), turbilhonamento (0-5), motilidade total (%) e vigor espermático (1-5), em microscópio de contraste de fase (Olympus optical Co., Ltda., Tóquio, Japão). A concentração espermática foi obtida em câmara de Neubauer, na diluição de 1:400, em água destilada. Apenas ejaculados com turbilhonamento ≥ 3 ; motilidade total $\geq 80\%$; vigor ≥ 3 ; concentração espermática $\geq 3,5 \times 10^9$ espermatozoides/mL e patologias espermáticas $\leq 20\%$ foram utilizados nesse estudo. Quando aprovadas, amostras dos seis ejaculados foram misturados para formação de um *pool*, objetivando a aumentar o volume do sêmen e eliminar a variabilidade individual entre as amostras estudadas. Logo após a formação do *pool*, ele foi dividido em quatro alíquotas, mantidas a 37° em Banho Maria antes dos procedimentos experimentais. As amostras de sêmen foram coletadas no período chuvoso e período não chuvoso a fim de diminuir o efeito ambiental.

Criopreservação do sêmen

O sêmen diluído foi envasado em palheta de 0,25mL (50×10^6 espermatozoides viáveis por palheta) e congelado em maquina TK 3000® (TK Tecnologia em congelação Ltda, Uberaba, Brasil), na curva de congelação $-0,25^\circ \text{C}/\text{min}$, de 25°C a 5°C e $-20^\circ \text{C}/\text{min}$, de 5°C a -120°C e, após atingir -120°C , as palhetas foram mergulhadas em nitrogênio líquido (-196°C) e armazenadas em botijão com nitrogênio líquido. O tempo de equilíbrio na temperatura de 5°C foi de, no mínimo, 30 minutos. Após no mínimo 15 dias de armazenamento, as amostras de sêmen foram descongeladas em banho-maria a 37°C por 30 segundos e avaliadas quanto à viabilidade celular, integridade da membrana plasmática, integridade do acrossoma, função mitocondrial, cinética espermática, teste termorresistência (TTR). Além disso, foi realizado o teste de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) a fim de verificar a reação de peroxidação lipídica.

Teste de viabilidade celular (teste do MTT)

Diante da necessidade de verificar quais concentrações não tóxicas para espermatozoides de ovino foi feito o teste de viabilidade celular utilizando as concentrações 0,5; 1; 2; 3 e 4 mM de ácido elágico (OMUR et. al.2016). A viabilidade celular foi avaliada utilizando-se o teste do MTT (sal de tetrazólio MTT - brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio]), para isso o sêmen foi descongelado em banho Maria a 37°C por 30 segundos. Então, $20\mu\text{L}$ foram transferidas para placa de Elisa contendo 96 poços e foram adicionados $20\mu\text{L}$ de solução de MTT nos poços que continham as amostras e foi adicionado também no poço branco (controle negativo). A placa permaneceu em estufa com 5% de CO_2 , a uma temperatura de 37°C durante quatro horas. Após este período foram adicionados $70\mu\text{L}$ de SDS 10% (Solução de dodecil (laurel) sulfato de sódio) e a placa foi novamente mantida em estufa “overnight” até a realização da leitura em espectrofotômetro com um comprimento de

onda de 570 nm (Souza, 2012). Então, a partir dos resultados desse teste, expresso na Figura 1, foram selecionadas as três concentrações do AE que foram utilizadas nos demais testes.

Análise da integridade da membrana plasmática

Para avaliação da integridade da membrana plasmática, foi utilizado o método de coloração dupla com diacetato de carboxifluoresceína (DCF; Sigma-Aldrich®, St. Louis, MO, USA) e iodeto de propídio (IP; Sigma-Aldrich®, St. Louis, MO, USA), modificado por Coletto et al., (2002), em que alíquotas de 50µL de sêmen pós descongelado foram diluídas em 150µL de Tris (7,210 g de Tris, 4,048 g de ácido cítrico, 2,976g de frutose, 200 mL de água destilada) contendo 5µL de DCF (0,46mg/mL em DMSO) e 20µL de IP (0,5mg/mL em PBS) e incubadas por 10 minutos a 38°C. Um total de 200 espermatozoides foi avaliado em microscópio de epifluorescência (Olympus optical Co., Ltda., Tóquio, Japão), com aumento de 400x, usando-se filtro de emissão DBP 580-630nm e excitação DBP 485/20nm. Os espermatozoides foram classificados em membrana intacta quando se apresentaram corados em verde e com membrana danificada quando corados em vermelho.

Análise da integridade acrossomal

Para avaliação da integridade do acrossoma, foi utilizado o corante isotiocianato de fluoresceína conjugado a *Peanut agglutinin* (aglutinina de amendoim) (FITC-PNA; Sigma-Aldrich®, St Louis, MO, USA), de acordo com a técnica descrita por Roth et al. (1998), em que uma alíquota de 20µL da solução estoque de FITC-PNA (1mg/mL) foi descongelada e adicionada a 480µL de solução de fosfato tamponada (PBS Sigma-Aldrich®, St Louis, MO, USA) para obter a concentração final de 100µg/mL. Alíquotas (20µL) desta solução foram colocadas sobre esfregaços de lâminas contendo espermatozoides, as quais foram incubadas por 20 minutos em câmara úmida a 4°C, na ausência de luz. Após incubação, as lâminas foram enxaguadas duas vezes em PBS refrigerado (4°C) e colocadas para secagem na ausência de luz. Imediatamente antes da avaliação, 5µL de meio de montagem UCD (4,5mL de glicerol, 0,5mL

de PBS, 5mg de azida sódica e 5mg de p-fenilenodiamina) foram colocados sobre a lâmina e cobertos com lamínula. Foram avaliados 200 espermatozoides por lâmina, com aumento de 1000x, sob óleo de imersão, em microscópio de epifluorescência (Olympus optical Co., Ltda., Tóquio, Japão), usando-se filtro de emissão LP 515nm e BP 450-490nm para excitação. Os espermatozoides foram classificados como portadores de acrossomas intactos, quando apresentaram a região acrossomal corada com fluorescência verde, ou com acrossoma reagido, quando apresentaram uma faixa verde fluorescente na região equatorial da cabeça espermática ou não apresentaram fluorescência verde em toda região da cabeça.

Análise do potencial de membrana mitocondrial

A função mitocondrial foi determinada pela utilização de um fluorocromo catiônico lipofílico JC-1 (Guthrie e Welch, 2006). Para tanto, alíquotas de 50µL de sêmen pós-descongelado foram diluídas em 150µL de Tris contendo 5µL de JC-1 (0,15mM em DMSO) e incubadas por 10 minutos a 38°C. Um total de 200 espermatozoides foi avaliado em microscópio de epifluorescência (Olympus optical Co., Ltda., Tóquio, Japão), com aumento de 1000x, sob óleo de imersão, usando-se filtro de emissão LP 515nm e BP 450-490nm para excitação. As células coradas em laranja foram classificadas com alto potencial de membrana mitocondrial e aquelas coradas em verde foram classificadas com baixo potencial de membrana.

Avaliação da cinética espermática usando sistema visual óptico integrado

A cinética espermática foi avaliada por meio de um sistema analisador de espermatozoide auxiliado por computador (Computer-assisted Sperm Analysis - CASA). O CASA consisti de um sistema de microscopia óptica de contraste de fase (Nikon TM H5505, Eclipse 50i, Japão), com iluminação estroboscópica, e uma fase quente a 37°C, uma câmera de vídeo (Basler Visão Technologie TM A312FC, Ahrensburg, Alemanha) e um computador com o analisador de esperma Classe TM software (Microptics, SL, versão 3.2.0, Barcelona, Espanha). As variáveis cinéticas dos espermatozoides foram avaliadas após a lavagem das amostras em

meio Tris (v/v) posteriormente incubados num banho-maria a 37°C durante 5 minutos. As variáveis avaliadas foram: motilidade progressiva (MOP- $\mu\text{m/s}$), velocidade curvilínea (VCL - $\mu\text{m/s}$), velocidade em linha reta (VSL - $\mu\text{m/s}$), velocidade média do percurso (VAP- $\mu\text{m/s}$), linearidade (LIN - %), retilinearidade (STR-%), deslocamento lateral de cabeça (ALH - μm), índice de oscilação Wobble (WOB - %) e frequência de batimento cruzado (BCF-Hz) e Hiperatividade para cada espermatozoide analisado.

Teste de Termorresistência (TTR)

O teste de termorresistência foi realizado de acordo com Vianna et al. (2009), no qual consisti em avaliar a longevidade dos espermatozoides das amostras de sêmen descongeladas, incubado em banho-maria a 37°C por um período de 3 horas. As amostras descongeladas foram acondicionadas em microtubos de 1,5 mL e incubadas a 37°C, posteriormente, foram avaliadas quanto à motilidade total (MT - %) e o vigor (1-5) espermático por meio de microscopia de contraste de fase (Olympus optical Co., Ltda., Tóquio, Japão) com placa aquecedora acoplada, com aumento de 400x, nos tempos 0, 60, 120 e 180 minutos pós-descongelação de acordo com Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA, 2013).

Níveis de Substâncias Reativas de Ácido Tiobarbitúrico (TBARS), concentrações de malondialdeído (MDA)

As concentrações de MDA foram determinadas pela produção de substância reativas do ácido tiobarbitúrico (TBARS), de acordo com o método descrito por Ohkawa, Ohishi e Yagi (1979) com adaptações. Para isso, 100 μL de sêmen pós-descongelado foram adicionados a 175 μL de ácido acético a 20% (pH 3,5) e 300 μL de ácido tiobarbitúrico 0,5%. Em seguida, a mistura foi incubada em banho-maria por 45 minutos a 100°C e posteriormente resfriada em banho de gelo durante 15 minutos. Após esse procedimento, adicionou-se à mistura 25 μL de dodecil sulfato de sódio (SDS) 8,1%, centrifugando por 15 minutos a 12.000 rpm a 25°C. Transferiu-se 200 μL do sobrenadante para placa de 96 poços onde foi realizada leitura no

comprimento de onda de 532 nm. Uma curva analítica de calibração foi preparada utilizando MDA como padrão, em concentrações de 1, 5, 10, 25 e 50 nmol/mL. As amostras foram analisadas em duplicata sendo os resultados expressos em nmol de MDA por mL de amostra.

Análise estatística

O teste de viabilidade celular foi realizado em triplicado e a produção de TBARS em duplicata. Os dados foram analisados pela ANOVA e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey (5% de probabilidade). As análises foram executadas através do programa Graph Pad Prism versão 8 (Graph Pad Software, California, Estados Unidos).

Ética em experimentação animal

Os procedimentos foram submetidos para aprovação pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal do Piauí (UFPI), registrado com o número 405/17 e certificado (Anexo).

Resultados

Em relação a cinética dos espermatozoides, as concentrações 0,5; 1,0; e 2,0mM de AE se revelaram com desempenho inferior com diferença significativa em relação ao grupo controle (Tabela 1 e Figura 2). Os resultados de integridade de membrana plasmática e integridade acrossomal, nas concentrações 1,0 e 2,0 mM de AE, obtiveram um menor percentual com diferença estatística significativa em relação ao grupo controle, assim como para potencial mitocondrial, contudo nas três concentrações testadas (0,5; 1,0 e 2,0 mM de AE) (Tabela 2).

Os resultados de motilidade total (MT) e vigor (VG) no teste de termorresistência, nas três concentrações de AE de (0,5; 1,0 e 2,0 mM), apresentaram desempenho menor com diferença significativa em relação ao grupo controle (Tabela 3).

Em relação aos níveis de substâncias reativas do ácido tiobarbitúrico, nas concentrações de AE 0,5 e 1,0mM, foram constatadas diferença estatística significativa, nas quais apresentaram uma menor concentração de MDA, em relação ao grupo controle (Tabela 4).

Discussão

O AE afetou principalmente a cinética espermática, cujos valores diminuíram significativamente em relação ao grupo controle. Esse efeito deletério da interação do AE com o sêmen está relacionado a concentração de AE utilizada, pois em diferentes concentrações, a cinética espermática das amostras foi menor nas concentrações maiores. Portanto, é possível que o aumento da disponibilidade de AE tenham contribuído para esses resultados. Assim, a hipótese de Omur et al. (2016), que o AE protege os espermatozoides dos efeitos da criopreservação, não parece confirmada nesse estudo. No entanto, deve-se enfatizar que Omur et al. (2016) realizaram um processo de congelação e descongelação com AE de origem diferente deste estudo. Isso pode influenciar devido as diferenças na solubilidade e disponibilidade de AE de origens diversas. Ademais, diferenças entre raças têm sido encontradas na maioria dos parâmetros seminais de ovinos, principalmente devido à variação no diâmetro testicular (Maia et al., 2011). Por isso, há diferenças nas taxas reprodutivas devido as particularidades das raças e também individuais.

Portanto, a motilidade espermática é regulada, pelo menos parcialmente, no nível ejaculado por alterações na composição plasmática seminal (Green et al., 2020) e a adição do AE pode ter provocado alterações que foram prejudiciais a membrana plasmática, acrossoma e mitocôndrias, evidenciadas nas menores porcentagens de integridade desses parâmetros quando comparadas com o grupo controle.

O MDA é um dos produtos secundários formados a partir da oxidação de lipídeos promovido pelas ERO. Sendo assim, a concentração de MDA é um indicativo de quanto estresse peroxidativo ocorreu no meio, isto posto, a sua baixa concentração corresponde a sua

menor produção no meio. Por isso, o MDA é considerado um biomarcador de peroxidação lipídica, ou seja, de estresse oxidativo. As concentrações de 0,5 e 1,0mM de AE atenuaram a produção de ERO, no entanto, isso não colaborou para um melhor desempenho na motilidade espermática. Desse modo, infere-se que outras variáveis contribuíram para desempenho inferior da motilidade das células espermáticas, (Gaschler e Stockwell, 2017).

Concluiu-se que o ácido elágico não melhorou a qualidade dos espermatozoides de carneiro após a criopreservação, conquanto tenha atenuado o estresse peroxidativo, nas concentrações de 0,5 e 1,0mM de AE.

Agradecimento

Ao Laboratório de Biotecnologia da Reprodução Animal da Universidade Federal do Piauí (LBRA-UFPI), ao Colégio Técnico de Teresina (CTT- UFPI) e ao Laboratório Tecnologia de Sêmen Caprino e Ovino da Universidade Estadual do Ceará (UECE).

Referências

- Allai L., Benmoula A., Silva M. M., Nasser B., El Amiri B. (2018). Supplementation of ram semen extender to improve seminal quality and fertility rate. **Animal Reproduction Science**, 192, 6-17. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2018.03.019>.
- Amini, S., Masoumi, R., Rostami, B., Shahir, M. H., Taghilou, P., Arslan, H. O. (2019). Effects of supplementation of Tris-egg yolk extender with royal jelly on chilled and frozen-thawed ram semen characteristics. **Cryobiology**, 88, 75-80. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2019.03.008>.
- CBRA. (2013). Colégio Brasileiro de Reprodução Animal. **Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal** (3ªed.). CBRA: Belo Horizonte, 2013. p.104.
- Coletto, Z. F., Guerra, M. M. P., Batista, A. M. (2002). Avaliação do sêmen congelado de caprinos com drogas fluorescentes. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, 24, 101-104.
- Elsayed, D. H, El-Shamy, A. A., Abdelrazek, H. M., El-Badry, D. A. (2019). Effect of Genistein on Semen Quality, Antioxidant Capacity, Caspase-3 Expression and DNA Integrity in Cryopreserved Ram Spermatozoa. **Small Ruminant Research**, 177, 50-55. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2019.06.009>.

Galarza, D. A., López-Sebastián, A., Woelders, H., Blesbois, E., Santiago-Moreno, J. (2019). Two-step accelerating freezing protocol yields a better motility, membranes and DNA integrities of thawed ram sperm than three-steps freezing protocols. **Cryobiology**, 91, 84-89. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2019.10.007>.

Gaschler, M.M., Stockwell, B.R. (2017). Peroxidação lipídica na morte celular. *Comunicações de pesquisa bioquímica e biofísica*, 482 (3), 419-425. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2016.10.086>.

Green, C., Rickard, J. P., de Graaf, S. P., & Crean, A. J. (2020). From One Ejaculate to Another: Transference of Sperm Traits via Seminal Plasma Supplementation in the Ram. *Biology*, 9(2), 33. doi: 10.3390/biology9020033.

Guthrie, H.D, Welch, G.R. (2006). Determination of intracellular reactive oxygen species and high mitochondrial membrane potential in Percoll-treated viable boar sperm using fluorescence-activated flow cytometry. **Journal of Animal Science**, 84, 2089-2100. <https://doi.org/10.2527/jas.2005-766>.

Guvvala, P. R., Ravindra, J. P., Selvaraju, S., Arangasamy, A., Venkata, K. M. (2019). Ellagic and ferulic acids protect arsenic-induced male reproductive toxicity via regulating Nfe212, Ppargc1a and StAR expressions in testis. **Toxicology**, 413, 1-12. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2018.11.012>.

Luna-Orozco, J. R., González-Ramos, M. A., Calderón-Leyva, G., Gaytán-Alemán, L. R., Arellano-Rodríguez, F., Ángel-García, O., Véliz-Deras, F.G. (2019). Comparison of different diluents based on liposomes and egg yolk for ram semen cooling and cryopreservation. **Iranian Journal of Veterinary Research**, 20(2), 126–130.

Maia, M. S.; Medeiros, I. M.; Lima. C. A. C. (2011). Características reprodutivas de carneiros no Nordeste do Brasil: parâmetros seminais. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, 35 (2), 175-179.

Ohkawa, H.; Ohishi, N.; Yagi, K. (1979). Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. **Analytical biochemistry**, 95 (2), 351-358. doi: 10.1016 / 0003-2697 (79) 90738-3.

Omur, A., Cuyan, K., Ozturk, C., Gungor, S., Bucak, M. (2014). The effects of curcumin, ellagic acid and methionine on post-thawed Merino rams sperm parameters (759.1). **The FASEB Journal**, 28 (1), 759-601.

Roth, T. L., Weiss, R. B., Buff, J. L. (1998). Heterologous in vitro fertilization and sperm capacitation in an endangered African antelope, the Scimitar-Horned Oryx (*Oryx dammah*). **Biology of Reproduction**, 58, 475-482. doi: 10.1095 / biolreprod58.2.475.

Souza, M. A. F. (2012). **Comparação entre dois métodos para criopreservação de sêmen ovino**, 2012. 87 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal da Bahia, Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia, Salvador, 2012.

Vianna, F. P., Papa, F. O., Zahn, F.S., Melo, C.M., Dell'aqua JR., J. A. (2009). Thermoresistance sperm tests are not predictive of potential fertility for cryopreserved bull sêmen. **Animal Reproduction Science**, 113, 279-282. doi: 10.1016 / j.anireprosci.2008.06.009

Zheng, D., Lv, C., Sun, X., Wang, J., Zhao, Z. (2019). Preparation of a supersaturatable self-microemulsion as drug delivery system for ellagic acid and evaluation of its antioxidant activities. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, 53, 01209. <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2019.101209>

Tabela 1- Cinética pós-descongelção de espermatozoides ovino criopreservado, nas três concentrações 0,5; 1,0; e 2,0mM, de Ácido elágico (AE). Motilidade total (MT); Motilidade não progressiva (MNP); e Motilidade progressiva (MP)

Tratamentos	MT	MNP	MP
Controle	47,5±4,5	18,7±1,6	28,8±3,5
AE 0,5mM	22,5±3,4*	8,9±1,3*	13,6±2,3*
AE 1,0mM	7,8±1,5*	4,1±0,7*	3,7±0,9*
AE 2,0mM	4,8±3,1*	3,6±2,2*	1,2±0,9*

Nota: resultados expressos em média e erro padrão médio, n=16.

Tabela 2- Integridade de membrana plasmática (MP), potencial mitocondrial (MIT) e integridade acrossomal (AC) de espermatozoides ovino pós-descongelados nas concentrações 0,5; 1,0; e 2,0mM, de Ácido elágico (AE)

Tratamentos	MP %	MIT %	AC %
Controle	39,8± 3,2	45,4 ± 2,0	58,3 ± 2,8
AE 0,5mM	27,8±6,1	17,3 ±3,1**	44,3 ±5,0
AE 1,0mM	10,9±2,5**	7,3 ±1,8***	30,1 ±3,1**
AE 2,0mM	3,7±1,0****	3,1 ±0,6***	15,3 ±1,3***

Nota: resultados expressos em média e erro padrão médio, n=10.

Tabela 3- Motilidade total (MT) e vigor (V) de espermatozoides ovino pós-descongelados nas concentrações 0,5; 1,0; e 2,0mM, de Ácido elágico (AE) submetidos ao teste de termorresistência

Parâmetros	Tempo	Controle	AE		
			0,5 mM	1,0 mM	2,0 mM
MT (%)	0	34±1,6	24±2,2	11±1,0*	5±1,7*
V (%)	0	3±0	2,4±0,2	1,1±0,1*	0,5±0,2*
MT (%)	60	35±1,7	24±1,6*	11±1,0*	1±1*
V (%)	60	3±0	2,5±0,2	1,1±0,1*	0,1±0,1*
MT (%)	120	26±2,2	19±1,8*	11±1,0*	0±0*
V (%)	120	2,9±0,1	1,9±0,2*	1,2±0,2*	0±0*
MT (%)	180	26±2,2	17± 2,1	8±1,3*	0±0*
V (%)	180	2,5±0,2	1,8±0,2	0,7±0,1*	0±0*

Nota: resultados expressos em média e erro padrão médio, n=10.

Tabela 4- Níveis de substâncias reativas do ácido tiobarbitúrico (malondialdeído -MDA) em sêmen de ovino pós-descongelado, nas concentrações 0,5; 1,0; e 2,0mM, de Ácido elágico (AE)

Tratamentos	Concentração de MDA (nmol/L)
Controle	45,6±4,3
AE 0,5mM	29,0 ±3,0*
AE 1,0mM	29,1 ±1,3*
AE 2,0mM	29,8 ±3,2

Nota: resultados expressos em média e erro padrão médio, n=10

Figura 1-Viabilidade celular dos espermatozoides ovino pós-descongelados nas concentrações 0,5; 1,0; 2,0; 3,0 e 4,0 mM de ácido elágico. Os valores são expressos como média \pm desvio padrão (DP)

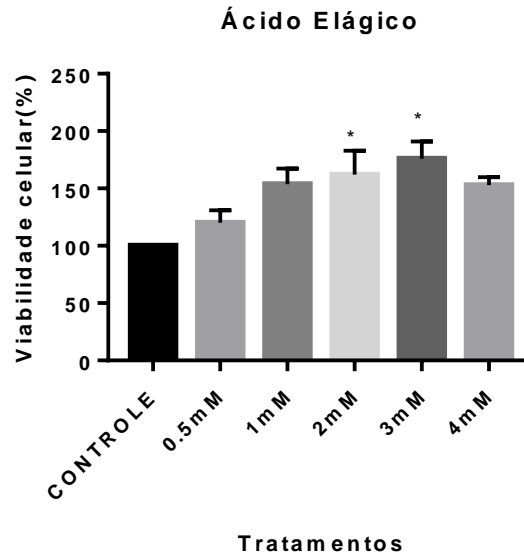
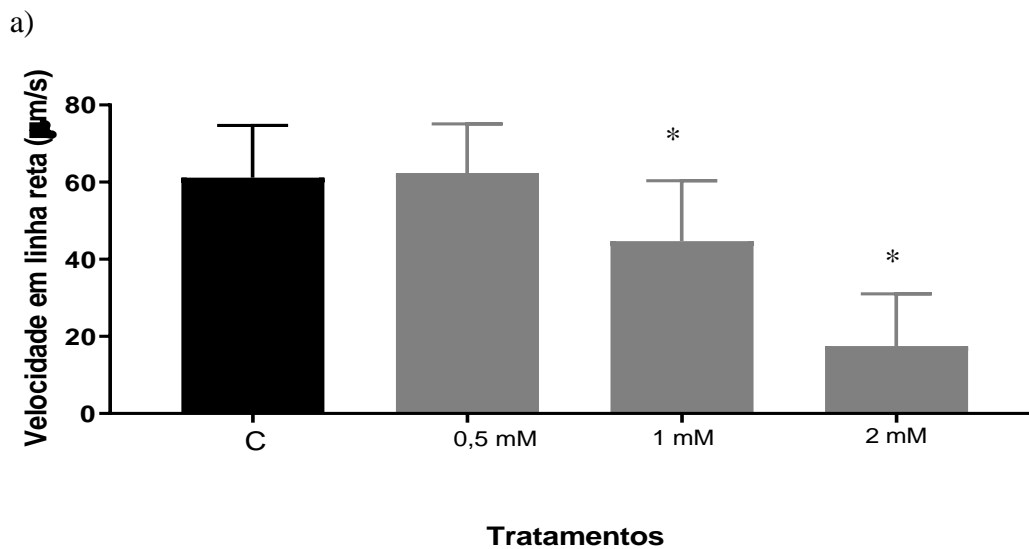
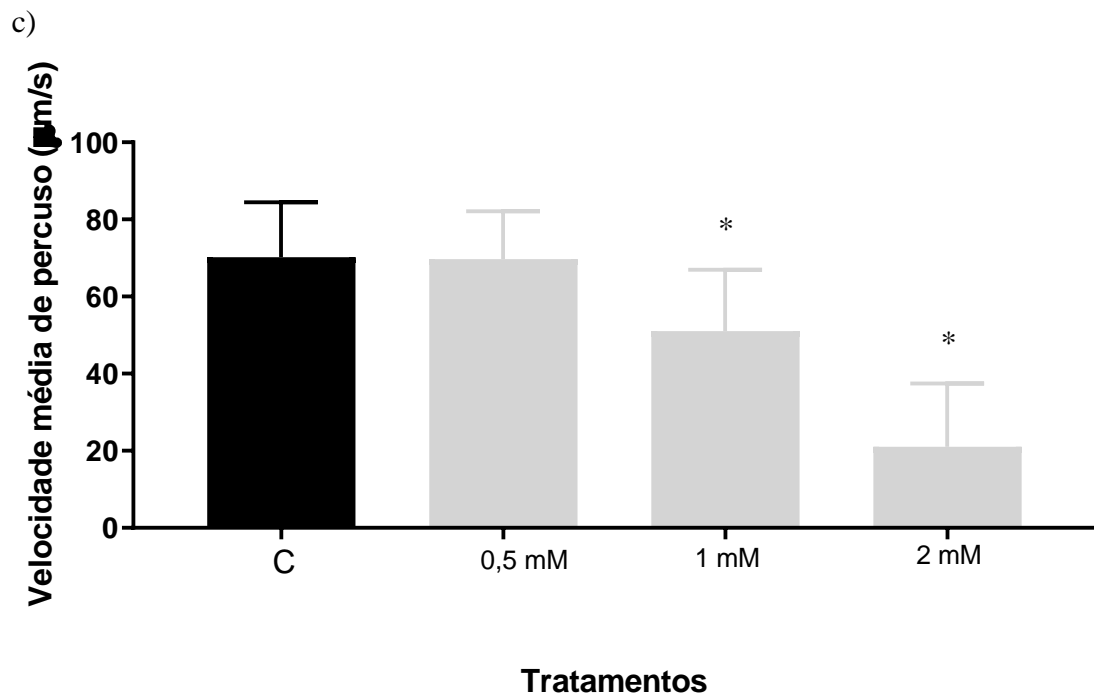
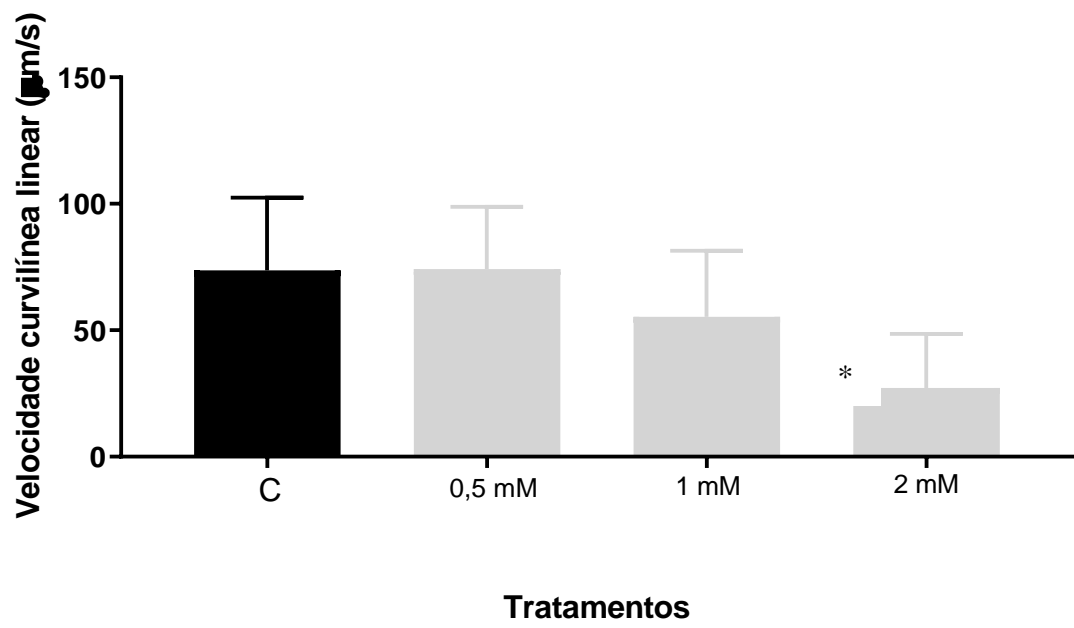
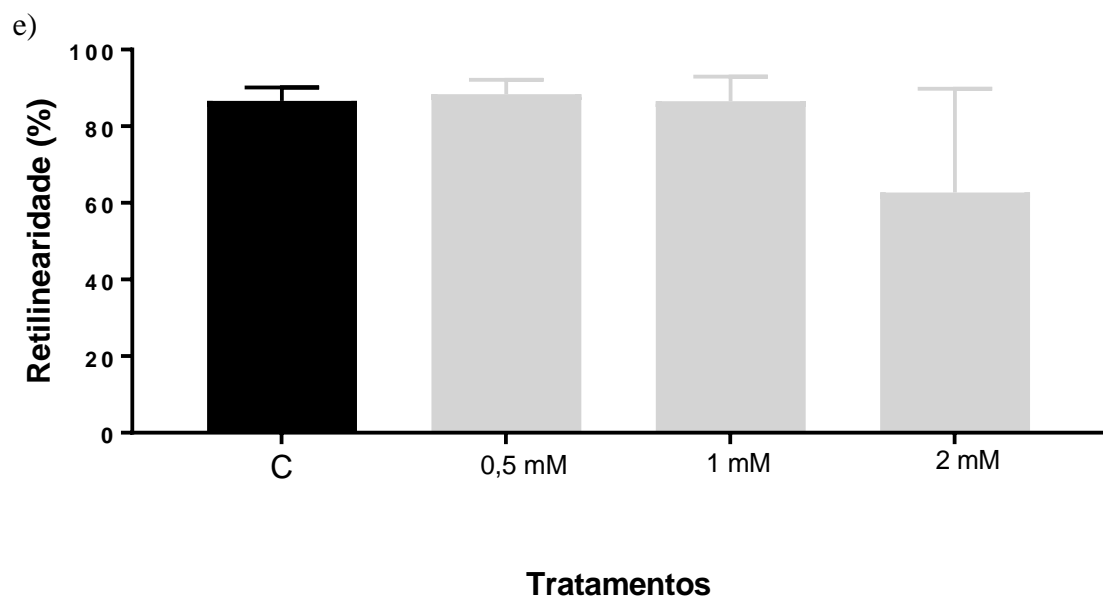
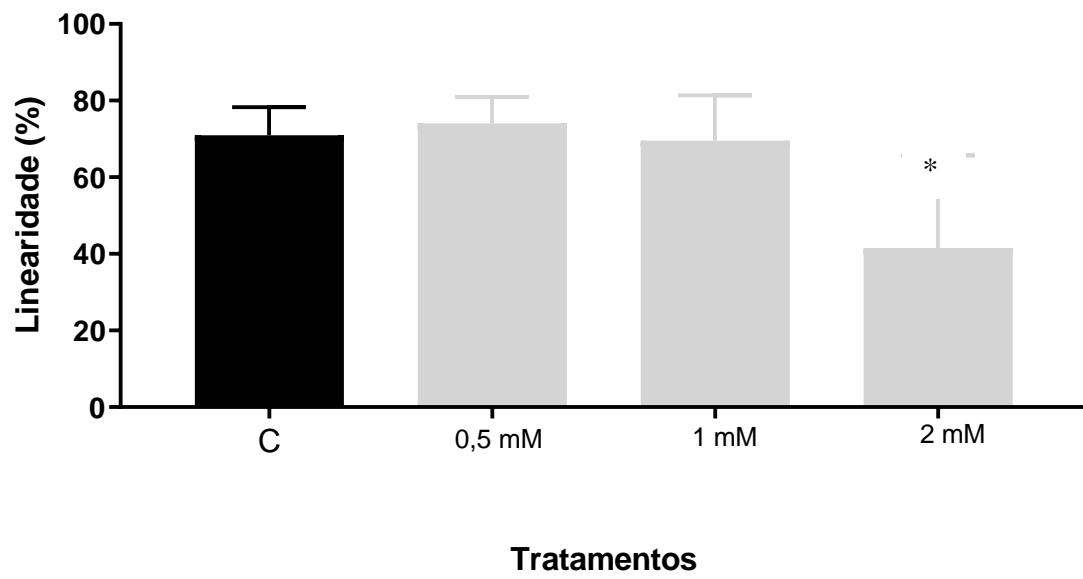


Figura 2-Parâmetros de cinética dos espermatozoides ovino pós-descongelados nas concentrações 0,5; 1,0 e 2,0 mM de ácido elágico. Os valores são expressos como média \pm desvio padrão (DP). a) Velocidade em linha reta ($\mu\text{m/s}$); b) Velocidade curvilínea linear ($\mu\text{m/s}$); c) Velocidade média de percurso ($\mu\text{m/s}$); d) Linearidade (%); e) Retilinearidade (%); f) Oscilação (%); g) Amplitude de deslocamento lateral da cabeça (μm); h) Frequência de batimentos da cauda (Hz); e i) Hiperatividade (%)

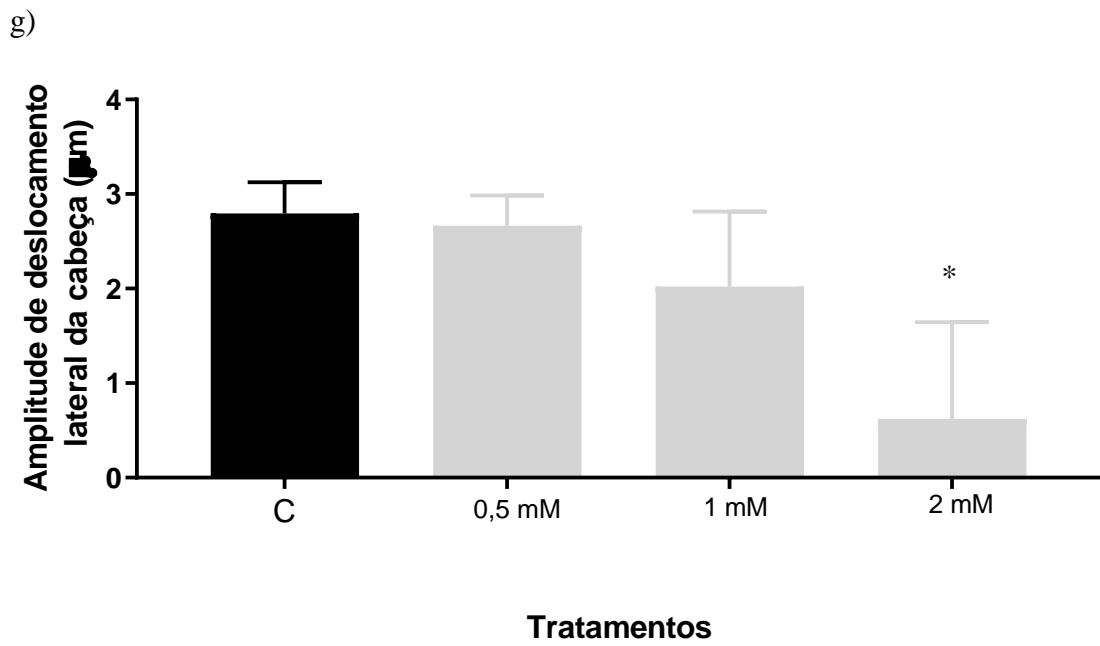
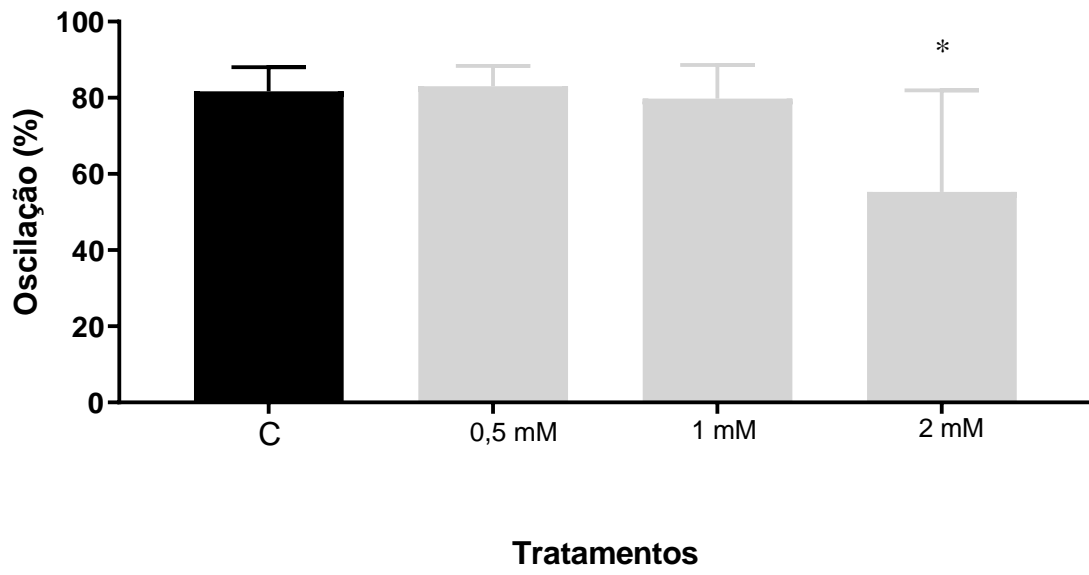




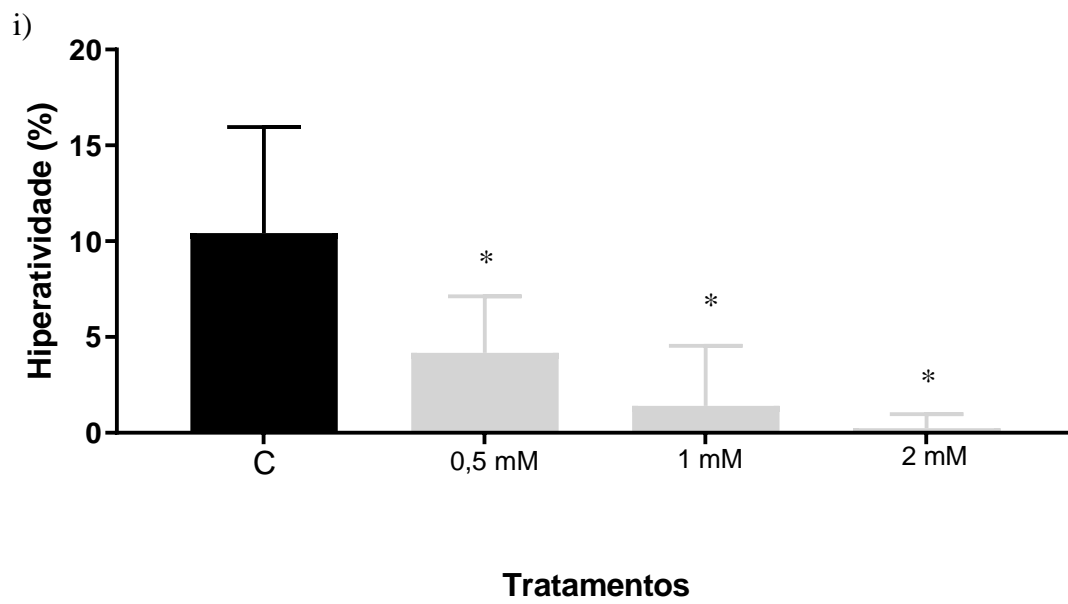
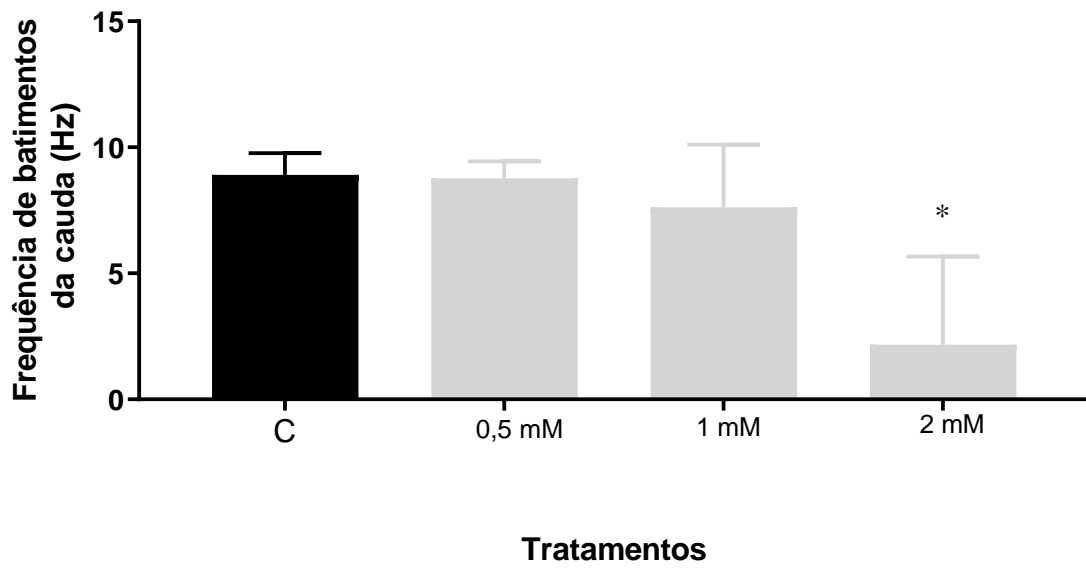
d)



f)



h)



4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O β -cariofileno não aumentou a motilidade espermática mas melhorou o potencial mitocondrial e atenuou o estresse oxidativo no sêmen ovino após a criopreservação. O ácido elágico não melhorou a qualidade dos espermatozoides de carneiro após a criopreservação, conquanto tenha atenuado o estresse peroxidativo, nas concentrações de 0,5 e 1,0mM de AE.

REFERÊNCIAS

- AGIRREGOITIA, E., CARRACEDO, A., SUBIRÁN, N., VALDIVIA, A., AGIRREGOITIA, N., PERALTA, L., VELACO, G., IRAZUSTA, J. (2010). The CB 2 cannabinoid receptor regulates human sperm cell motility. **Fertility and sterility**, v.93, n.5, p.1378-1387, 2010.
- ALVES, M. M. M.; BRITO, L. M.; SOUZA, A. C.; QUEIROZ, B. C. S. H.; CARVALHO, T. P.; BATISTA, J. F.; GONÇALVES, J.C.R.; MENDONÇA, I.L. de; LIRA, S.R.S.; CHAVES, M.H.; GONÇALVES, J.C.R.; CARNEIRO, S.M.P.; ARCANJO, D.D.R.; CARVALHO, F.A.A. Gallic and ellagic acids: two natural immunomodulator compounds solve infection of macrophages by *Leishmania major*. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, p. 1-11, 2017.
- ATEŞŞAHİN, A.; TÜRK, G.; YILMAZ, S.; SÖNMEZ, M.; SAKIN, F.; ÇERİBASİ, A. O. (2010). Modulatory effects of lycopene and ellagic acid on reproductive dysfunction induced by polychlorinated biphenyl (Aroclor 1254) in male rats. **Basic & clinical pharmacology & toxicology**, v.106, n.6, p.479-489, 2010.
- BAGHSHAHI, H., RIASI, A., MAHDAVI, A. H., SHIRAZI, A. (2014). Antioxidant effects of clove bud (*Syzygium aromaticum*) extract used with different extenders on ram spermatozoa during cryopreservation. **Cryobiology**, v.69, n.3, p. 482-487, 2014.
- BALDISSERA, M. D., SOUZA, C. F., GRANDO, T. H., DOLESKI, P. H., BOLIGON, A. A., STEFANI, L. M., & MONTEIRO, S. G. (2017). Hypolipidemic effect of β -caryophyllene to treat hyperlipidemic rats. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, v. 390, n.2, p. 215-223, 2017.
- BANDAY, M. N., LONE, F. A., RASOOL, F., RASHID, M., SHIKARI, A. (2017). Use of antioxidants reduce lipid peroxidation and improve quality of crossbred ram sperm during its cryopreservation. **Cryobiology**. v. 74. p. 25-30, 2017.
- BARBAS, J. P., MASCARENHAS, R. D. (2009). Cryopreservation of domestic animal sperm cells. **Cell and tissue banking**, v.10, n.1, p.49-62, 2009.
- BARROS, M.S. R. M. **Avaliação *in vitro* do sêmen caprino criopreservado em diluente acrescido de superóxido dismutase catalase em diferentes concentrações**, Tese (Doutorado), Universidade Federal Rural de Pernambuco. Recife, 69f., 2010.
- 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.341- 350, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2011.02.013>
- CAVALCANTE, J. M. M., BRASIL, O. O., DE MELLO SALGUEIRO, C. C., SALMITO-VANDERLEY, C. S. B., NUNES, J. F. (2014). Criopreservação do sêmen ovino em meio

diluyente à base de água de coco em pó (ACP-102c). **Ciência Animal Brasileira**, v.15, n.3, p. 344-353, 2014.

ÇERİBAŞI, A. O., SAKIN, F., TÜRK, G., SÖNMEZ, M., & ATEŞŞAHİN, A. (2012). Impact of ellagic acid on adriamycin-induced testicular histopathological lesions, apoptosis, lipid peroxidation and sperm damages. **Experimental and toxicologic pathology**, v.64, n.7, p. 717-724, 2012.

CORANDIN, E. M. (2011). **Sêmen refrigerado e congelado para inseminação artificial em ovinos**. Ciência Animal da Escola de Veterinária, UFG, Goiânia, p. 3-24. 2011.

DALVI, L. T., MOREIRA, D. C., ANDRADE, R., GINANI, J., ALONSO, A., HERMES-LIMA, M. (2017). Ellagic acid inhibits iron-mediated free radical formation. **Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v.173, 910-917, 2017.

DEL VALLE, I., SOUTER, A., MAXWELL, W. M. C., MUIÑO-BLANCO, T., CEBRIÁN-PÉREZ, J. A. (2013). Function of ram spermatozoa frozen in diluents supplemented with casein and vegetable oils. **Animal reproduction science**, v.138, n.3, p. 213-219, 2013.

DI GIACOMO, S., MAZZANTI, G., DI SOTTO, A. (2016). Mutagenicity of cigarette butt waste in the bacterial reverse mutation assay: The protective effects of β -caryophyllene and β -caryophyllene oxide. **Environmental toxicology**, v.31, n. 11, p. 1319-1328, 2016.

DOBRAKOWSKI, M., KASPERCZYK, S., HORAK, S., CHYRA-JACH, D., BIRKNER, E., KASPERCZYK, A. (2017). Oxidative stress and motility impairment in the semen of fertile males, **Andrologia**, 2017.

DRUART, X., RICKARD, J. P., MACTIER, S., KOHNKE, P. L., KERSHAW-YOUNG, C. M., BATHGATE, R., GIBB, Z.; CROSSETT, B. TSIKIS, G.; LABAS, V.; HARICHAUX, V.; GRUPEN, C.G. (2013). Proteomic characterization and cross species comparison of mammalian seminal plasma. **Journal of proteomics**, v.91, p.13-22, 2013.

FAOSTAT. **Food and Agriculture Organization of the United Nations. Production sheep by country. 2019** Disponível em < <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QA/visualize>>. Acesso em outubro de 2019.

FIDYT, K., FIEDOROWICZ, A., STRZĄDAŁA, L., SZUMNY, A. (2016). β -caryophyllene and β -caryophyllene oxide—natural compounds of anticancer and analgesic properties. **Cancer Medicine**, v. 5, n.10, p.3007-3017, 2016.

GASCHLER, M. M. ; STOCKWELL, B. R. Peroxidação lipídica na morte celular. **Comunicações de pesquisa bioquímica e biofísica** , v. 482, n. 3, p. 419-425, 2017.

GHOLAMI, H.; CHAMANI, M.; TOWHIDI, A.; FAZELI, M.H. Effect of feeding a docosahexaenoic acid-enriched nutraceutical on the quality of fresh and frozen-thawed semen in Holstein bulls. **Theriogenology**, v.74, p.1548–1558, 2010.
<https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2010.06.025>

- GIRISH, C., SHWETA, O., RAJ, V., BALAKRISHNAN, S., & G'BOY VARGHESE, R. (2014). Ellagic acid modulates sodium valproate induced reproductive toxicity in male Wistar rats. **Indian Journal of Physiology and Pharmacology** Indian J. Physiol Pharmacol, v. 58, n.4, p. 416-422, 2014.
- GUNGOR, S., INANC, M. E., OZTURK, C., KORKMAZ, F., BASTAN, I., CIL, B., KASTELIC, J. P. (2019). Gallic and carnosic acids improve quality of frozen-thawed ram spermatozoa. **Andrologia**, v. 51, n. 10, p. e13393, 2019.
- HARAGUCHI, H., SAITO, T., ISHIKAWA, H., SANCHEZ, Y., OGURA, T., & KUBO, I. (1996). Inhibition of lipid peroxidation by sesquiterpenoid in *Heterotheca inuloides*. **Journal of pharmacy and pharmacology**, v.48, n.4, p. 441-443, 1996.
- HASHEM, E. Z., ESLAMI, M. Kinetin improves motility, viability and antioxidative parameters of ram semen during storage at refrigerator temperature. **Cell and Tissue Banking**, p.1-15, 2016.
- HORVÁTH, B., MUKHOPADHYAY, P., KECHRID, M., PATEL, V., TANCHIAN, G., WINK, D. A., GERTSCH, J., PACHER, P. (2012). β -Caryophyllene ameliorates cisplatin-induced nephrotoxicity in a cannabinoid 2 receptor-dependent manner. **Free Radical Biology and Medicine**, v.52, n.8, p. 1325-1333, 2012.
- JAVED, H., AZIMULLAH, S., HAQUE, M. E., OJHA, S. K. (2016). Cannabinoid Type 2 (CB2) Receptors Activation Protects against Oxidative Stress and Neuroinflammation Associated Dopaminergic Neurodegeneration in Rotenone Model of Parkinson's Disease. **Frontiers in Neuroscience**, v.10, 2016.
- JORDÃO, J. B. R., PORTO, H. K. P., LOPES, F. M., BATISTA, A. C., ROCHA, M. L. (2017). Protective Effects of Ellagic Acid on Cardiovascular Injuries Caused by Hypertension in Rats. **Planta Medica**. 2017.
- KAMIKUBO, R., KAI, K., TSUJI-NAITO, K., AKAGAWA, M. (2016). β -Caryophyllene attenuates palmitate-induced lipid accumulation through AMPK signaling by activating CB2 receptor in human HepG2 hepatocytes. **Molecular nutrition & food research**, v.60, n.10, p. 2228-2242. 2016.
- KUBO, I., CHAUDHURI, S. K., KUBO, Y., SANCHEZ, Y., OGURA, T., SAITO, T., ISHIKAWA H.; HARAGUCHI, H. (1996). Cytotoxic and antioxidative sesquiterpenoids from *Heterotheca inuloides*. **Planta Medica**, v.62, n.05, p.427-430, 1996.
- LA FALCI, V. S. N., YRJÖ-KOSKINEN, A. E., FAZELI, A., HOLT, W. V., WATSON, P. F. (2011). 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, n.3, p.180-187, 2011.
- LONE, F. A., NAIKOO, M., KHATUN, A., SHAH, R. A., PAMPORI, Z. A., KHAN, H. M., AHANGER, A. A. (2019). Idebenone improves quality of ram sperm by mitigating oxidative stress during cryopreservation. **Cryobiology**, v.90, p. 15-20.

- MACHADO, K. C., ARAUJO, Y.C, OLIVEIRA, G.L.S., FREITAS, R.M. Potencial antioxidante in vitro do beta-cariofileno. **Revista brasileira de biodiversidade e biotecnologia**. 2015.
- MADUREIRA, K. M., GOMES, V., BARCELOS, B., ZANI, B. H., COSTA, C. R., BENESI, F. J. (2013). Parâmetros hematológicos e bioquímicos de ovinos da raça Dorper. **Ciências Agrárias**, v. 34, n. 2, p. 811-816, 2013.
- MAIA, M. S.; MEDEIROS, I. M.; LIMA, C. A. C. Características reprodutivas de carneiros no Nordeste do Brasil: parâmetros seminais. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 35, n. 2, p. 175-179, 2011.
- MATA-CAMPUZANO, M., ÁLVAREZ-RODRÍGUEZ, M., ÁLVAREZ, M., TAMAYO-CANUL, J., ANEL, L., DE PAZ, P., MARTÍNEZ-PASTOR, F. (2015). Post-thawing quality and incubation resilience of cryopreserved ram spermatozoa are affected by antioxidant supplementation and choice of extender. **Theriogenology**, v.83, n.4, p. 520-528, 2015.
- MERT, H., KARAKUS, K., YILMAZ, A., AYGUN, T., MERT, N., APAYDIN, B., SEYHAN, E. (2009). Effects of genotype on testis, semen quality, and mineral composition of semen in various ram breeds. **Biological trace element research**. v.132, n.1-3, p. 93-102, 2009.
- MOTLAGH, M.K.; SHARAFI, M.; ZHANDI, M.; MOHAMMADI- SANGCHESHMEH, A.; SHAKERI, M.; SOLEIMANI, M.; ZEINOALDINI, S. Antioxidant effect of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L) extract in soybean lecithin-based semen extender following freeze-thawing process of ram sperm. **Cryobiology**, v.69, p.217-222, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2014.07.007>
- MOLINA-JASSO, D.; ÁLVAREZ-GONZÁLEZ, I.; MADRIGAL-BUJAI DAR, E. (2009). Clastogenicity of beta-caryophyllene in mouse. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v.32, n.3, p. 520-522, 2009.
- MUIÑO-BLANCO, T., PÉREZ-PÉ, R., CEBRIÁN-PÉREZ, J. A. (2008). Seminal plasma proteins and sperm resistance to stress. **Reproduction in domestic animals**, v.43, n.4, p.18-31, 2008.
- MURUGESAN, S., RAO, S. R. (2013). Effect of dietary ellagic acid supplementation on semen quality parameters in chickens. **Animal Production Science**, v.55, n.1, p.107-112, 2013.
- NASCIMENTO, A. L. C., SANTOS, A. D. F., AZEVEDO, H. C., DUARTE, C. L., DE OLIVEIRA, V. S. (2016). Atividade antioxidante do extrato aquoso de noni em diluente para congelamento de sêmen ovino. **Boletim de Indústria Animal**, v.73, n.1, p. 68-74, 2016.
- NASEER, Z., AHMAD, E., AKSOY, M., KÜÇÜK, N., SERIN, I., CEYLAN, A., BOYACIOĞLU, M.; KUM, C. (2015). Protective effect of cholesterol-loaded cyclodextrin pretreatment against hydrogen peroxide induced oxidative damage in ram sperm. **Cryobiology**, v.71, n.1, p. 18-23, 2015.
- NEJAD, K. H, GHARIB-NASERI, M. K., SARKAKI, A., DIANAT, M., BADA VI, M., FARBOOD, Y. (2017). Effects of ellagic acid pretreatment on renal functions disturbances

induced by global cerebral ischemic-reperfusion in rat. **Iranian Journal of Basic Medical Sciences**, v.20, n.1, p.75-82, 2017.

OJHA, S., JAVED, H., AZIMULLAH, S., HAQUE, M. E. (2016). β -Caryophyllene, a phytocannabinoid attenuates oxidative stress, neuroinflammation, glial activation, and salvages dopaminergic neurons in a rat model of Parkinson disease. **Molecular and cellular biochemistry**, v.418, n.1, p.59-70, 2016.

OMUR, A., COYAN, K., OZTURK, C., GUNGOR, S., BUCAK, M. (2014). The effects of curcumin, ellagic acid and methionine on post-thawed Merino rams sperm parameters (759.1). **The FASEB Journal**, v.28, n.1, p.759-601, 2014.

PADILHA, R. T., MAGALHÃES-PADILHA, D. M., CAVALCANTE, M. M., ALMEIDA, A. P., HAAG, K. T., GASTAL, M. O., NUNES, J.F; RODRIGUES, A.P.R.; FIGUEIREDO, J.R; OLIVEIRA, M. A. L. (2012). Effect of insulin-like growth factor-I on some quality traits and fertility of cryopreserved ovine semen. **Theriogenology**, v.78, n.4, p. 907-913, 2012.

PAVLOVA, E. L., ZOGRAFOV, N. N., SIMEONOVA, L. S. (2016). Comparative study on the antioxidant capacities of synthetic influenza inhibitors and ellagic acid in model systems. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v.83, p. 755-762. 2016.

PIERI, F. A., DE CASTRO SOUZA, M. C., VERMELHO, L. L. R., VERMELHO, M. L. R., PERCIANO, P. G., VARGAS, F. S., BORGES, A.P.; VEIGA-JUNIOR, V.F.; MOREIRA, M. A. S. (2016). Use of β -caryophyllene to combat bacterial dental plaque formation in dogs. **BMC Veterinary Research**, v.12, n.1, p. 216, 2016.

RODRIGUEZ, E. J., RAMIS-RAMOS, G., HEYDEN, Y. V., SIMO-ALFONSO, E. F., LERMA-GARCÍA, M. J., SAUCEDO-HERNÁNDEZ, Y., MONTEAGUDO, U., MORALES, Y., HOLGADO, B.; HERRERO-MARTÍNEZ, J. M. (2012). Chemical composition, antioxidant properties and antimicrobial activity of the essential oil of *Murraya paniculata* leaves from the mountains of Central Cuba. **Natural product communications**, v.7, n.11, p. 1527-1530, 2012.

SANTOS, I., JÚNIOR, J. N., KOZICKI, L., WEISS, R.BINSFELD, L. (2014). Influência do tempo da coleta à diluição sobre a viabilidade do sêmen ovino descongelado. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, v.23, n.1, p. 1-13, 2014.

SANTOS, N. A. G., MARTINS, N. M., SISTI, F. M., FERNANDES, L. S., FERREIRA, R. S., DE FREITAS, O., SANTOS, A. C. (2017). The cannabinoid beta-caryophyllene (BCP) induces neuritogenesis in PC12 cells by a cannabinoid-receptor-independent mechanism. **Chemico-Biological Interactions**, v.261, p.86-95, 2017.

SANTOS, V.S., SANTOS, A. D. F., OLIVEIRA, D. A., NASCIMENTO, A. L. C.; SANTOS, E. M. (2015). Adição da polpa liofilizada do Noni em diluente para congelamento de sêmen sobre a integridade da membrana plasmática de espermatozoides ovinos. **Scientia Plena**, v.11, n.4, 2015.

SARKAKI, A., FARBOOD, Y., DOLATSHAHI, M., MANSOURI, S. M. T., KHODADADI, A. (2016). Neuroprotective Effects of Ellagic Acid in a Rat Model of Parkinson's Disease. **Acta Medica Iranica**, v.54, n.8, p.494-502, 2016.

SCHERER, R.; GODOY, H.T. Antioxidant activity index (AAI) by the 2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl method. **Food Chemistry**. v.112, n.3, p. 654-658, 2009.

SCHMITT, D., LEVY, R., CARROLL, B. (2016). Toxicological Evaluation of β -Caryophyllene Oil: Subchronic Toxicity in Rats. *International Journal of Toxicology*, v.35, n.5, p.558-567, 2016.

SELESTINO NETA, M. C., VITTORAZZI, C., GUIMARÃES, A. C., MARTINS, J. D. L., FRONZA, M., ENDRINGER, D. C., SCHERER, R. (2017). Effects of β -caryophyllene and *Murraya paniculata* essential oil in the murine hepatoma cells and in the bacteria and fungi 24-h time-kill curve studies. **Pharmaceutical Biology**, v.55, n.1, p.190-197. 2017.

SELVARAJU, S.; RAJU, P.; RAO, S.B.; RAGHA VENDRA, S.; NANDI, S.; DINESHKU - MAR, D.; THAYAKUMAR, A.; PARTHI - PAN, S.; RAVINDRA, J.P. Evaluation of maize grain and polyunsaturated fatty acid (PUFA) as energy sources for breeding rams based on hormonal, sperm functional parameters and fertility. **Reproduction, Fertility and Development**, v.24, p.669-678, 2012. <https://doi.org/10.1071/rd11229>

SERNA, M. C., CARDOZO, J., LOMBANA, H. A. G., PÉREZ, J. A. C., BLANCO, M. T. M. Sperm quality and seminal plasma proteins in three sheep breeds under high altitude and tropical conditions. **Spanish journal of agricultural research**, v.16, n.2, p.10, 2018.

SILVA, J.C. **Criopreservação de sêmen ovino com diferentes concentrações espermáticas associado ou não com ácido ascórbico**. Universidade Federal de Viçosa. Dissertação (Tese), Universidade Federal de Viçosa. Minas Gerais, 66f., 2013.

SILVA, S. V.; GUERRA, M. M. P. Efeitos da criopreservação sobre as células espermáticas e alternativas para redução das crioinjúrias. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 35, n. 4, p. 370-384, 2011.

SINGH, G., MARIMUTHU, P., DE HELUANI, C. S., CATALAN, C. A. (2006). Antioxidant and biocidal activities of *Carum nigrum* (seed) essential oil, oleoresin, and their selected components. **Journal of agricultural and food chemistry**, v.54, n.1, p. 174-181, 2006.



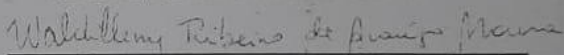
SOUZA, B. C., SENA, L. S., LOUREIRO, D., RAYNAL, J. T., SOUSA, T. J., BASTOS, B. L., PORTELA, R. W. (2016). Determinação de valores de referência séricos para os eletrólitos magnésio, cloretos, cálcio e fósforo em ovinos das raças Dorper e Santa Inês. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.36, n.3, p.167-173, 2016.

TIAN, X., PENG, J., ZHONG, J., YANG, M., PANG, J., LOU, J., LI, M., AN, R., ZHANG, Q., Xu L¹ DONG, Z. β -Caryophyllene protects in vitro neurovascular unit against oxygen-glucose deprivation and re-oxygenation-induced injury. **Journal of Neurochemistry**, v.139, n.5, p. 757-768, 2016.

TÜRK, G., ATEŞŞAHİN, A., SÖNMEZ, M., ÇERİBAŞI, A. O., YÜCE, A. (2008). Improvement of cisplatin-induced injuries to sperm quality, the oxidant-antioxidant system, and the histologic structure of the rat testis by ellagic acid. **Fertility and sterility**, v.89, n.5, p. 1474-1481, 2008.

- TÜRK, G., ÇERİBAŞI, A. O., ŞAHNA, E., ATEŞŞAHİN, A. (2011). Lycopene and ellagic acid prevent testicular apoptosis induced by cisplatin. **Phytomedicine**, v.18, n. 5, p. 356-361, 2011.
- TÜRK, G., ÇERİBAŞI, A. O., SAKIN, F., SÖNMEZ, M., ATEŞŞAHİN, A. (2010). Antiperoxidative and anti-apoptotic effects of lycopene and ellagic acid on cyclophosphamide-induced testicular lipid peroxidation nad apoptosis. **Reproduction, Fertility and Development**, v.22, n.4, p. 587-596, 2010a.
- TÜRK, G., SÖNMEZ, M., ÇERİBAŞI, A. O., YÜCE, A., ATEŞŞAHİN, A. (2010). Attenuation of cyclosporine A-induced testicular and spermatozoal damages associated with oxidative stress by ellagic acid. **International immunopharmacology**, v.10, n. 2, p.177-182, 2010b.
- VAN TRAN, L.; MALLA, B.A.; KUMAR, S.; TYAGI, A.K. Polyunsaturated fatty acids in male ruminant reproduction – a review. **Asian-Australasian Journal of Animal Sciences**, v.30, p.622-637, 2017. <https://doi.org/10.5713/ajas.15.1034>.
- VARGA, Z. V., MATYAS, C., ERDELYI, K., CINAR, R., NIERI, D., CHICCA, A., NEMETH, B.T., PALOCZI, J., LAJTOS, T., COREY, L., HASKO, G., GAO, B., KUNOS, G., GERTSCH, J., PACHER, P. (2017). β -Caryophyllene protects against alcoholic steatohepatitis by attenuating inflammation and metabolic dysregulation in mice. **British Journal of Pharmacology**. 2017.
- VASCONCELOS, A. B. **Bioquímica do sêmen**. Congresso Brasileiro de Reprodução Animal, 18, 2009, Belo Horizonte, MG. Anais. 2009.
- VIANA, P. H. A; SILVA, A. O.; MACHADO, K. C.; FREITAS, R. M. Avaliação antioxidante do β -cariofileno: prospecção tecnológica. **Revista Brasileira de biodiversidade e biotecnologia**. 2015.
- WONNACOTT, K.R.; KWONG, W.Y.; HUGHES, J.; SALTER, A.M.; LEA, R.G.; GARNSWORTHY, P.C.; SINCLAIR, K.D. Dietary omega-3 and -6 polyunsaturated fatty acids affect the composition and development of sheep granulosa cells, oocytes and embryos. **Reproduction** , v.139, p.57-69, 2010. <https://doi.org/10.1530/rep-09-0219>.
- YAMAGUCHI, M. H.; GARCIA, R.F. Óleo de copaíba e suas propriedades medicinais: Revisão bibliográfica. **Revista Saúde e pesquisa**, v.5, n.1, p. 137-156, 2012.
- YAMAGUCHI, M., LEVY, R. M. (2016). β -Caryophyllene promotes osteoblastic mineralization, and suppresses osteoclastogenesis and adipogenesis in mouse bone marrow cultures in vitro. **Experimental and Therapeutic Medicine**, v.12, n.6, p. 3602-3606, 2016.
- YANG, J., NIE, Q. (2016). Engineering Escherichia coli to convert acetic acid to β -caryophyllene. **Microbial cell factories**, v.15, n.1, p. 74, 2016.
- YIN, H.; XU, L.; PORTER, N. A. Free radical lipid peroxidation: mechanisms and analysis. **Chemical Reviews**, v. 111, n. 10, p. 5944–5972, 2011.

ANEXO A- Certificado Comissão de ética no uso de animais

	MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ PRÓ-REITORIA DE PESQUISA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS	
<small>Campus Universitário Ministro Petrônio Portela, Bairro Ininga, Teresina, Piauí, Brasil; CEP: 64049-550 Telefone (86) 3215-5734 _e-mail: ceepi@ufpi.edu.br</small>		
CERTIFICADO		
<p>Certificamos que a proposta intitulada "<i>Efeito do β-cariofileno e ácido elágico na criopreservação de sêmen ovino da raça dorper</i>", registrada nº 405/17, sob a responsabilidade do Prof. Dr. AMILTON PAULO RAPOSO COSTA do Departamento de Morfofisiologia Veterinária/CCA/UFPI que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de Pesquisa Científica- encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi Aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFPI) da Universidade Federal do Piauí, em Reunião na presente data 08/02/2018.</p>		
Finalidade	<input type="checkbox"/> Ensino <input checked="" type="checkbox"/> Pesquisa Científica	
Vigência da Autorização	Março/2018 à Julho/ 2019	
Espécie/Linhagem/raça	Ovino/ Dorper	
Nº de Animais	7	
Peso/ Idade	50 kg/ 3-5 anos	
Sexo	06 Machos e 01 Fêmea	
Origem	Fazenda-Pampulha, José de Freitas, Piauí, Brasil.	
Teresina, 08 de Fevereiro de 2018.  <hr style="width: 30%; margin: auto;"/> Profa. Dra. Waldileny Ribeiro de Araújo Moura Coordenador em Exercício da CEUA/UFPI		

ANEXO B-Normas

Normas da ANIMAL REPRODUCTION

O arquivo principal do documento deve ser formatado usando o Microsoft Word © 2010 ou mais recente. As páginas devem ser definidas no tamanho A4 (21,0 x 29,7), com margens de 3 cm, usando a fonte Times New Roman tamanho 12, sem formatação desnecessária, espaço duplo, com linhas e páginas numeradas. Seções e títulos de subseções devem usar os Estilos de Título internos.

O documento principal deve ser estruturado conforme descrito nas seguintes seções:

1. Página de rosto

A primeira página do manuscrito deve incluir as seguintes informações.

Tipo de artigo

Indique o mesmo tipo de artigo selecionado no sistema de envio: Artigo de pesquisa básica, Artigo de biotecnologia, Artigo de pesquisa aplicada ou Artigo de revisão.

Título em execução

Não mais que 50 letras, incluindo espaços.

Título do manuscrito

O título deve ser sucinto, mas incluir o desenho do estudo e as principais conclusões.

As palavras do título devem estar em negrito, com apenas a primeira letra da primeira palavra em maiúsculas.

Linha de autoria

Os nomes completos de todos os autores devem ser listados abaixo do título. Siga cada nome com algarismos arábicos sobrescritos para indicar suas afiliações e inclua o URL do ORCID de todos os autores entre parênteses. Um asterisco (*) deve ser usado para indicar o autor correspondente.

Afiliações

As afiliações dos autores devem ser listadas abaixo dos nomes dos autores, usando os mesmos números árabes sobrescritos usados na assinatura. A lista de afiliação deve incluir apenas instituições nas quais cada autor realmente realizou o trabalho relacionado ao artigo.

Os nomes das instituições devem ser escritos em seu idioma original ou em inglês quando não estiverem em alfabeto romano.

Nome da instituição no seu idioma de origem, departamento, cidade, estado, país

O nome do autor correspondente, o email e o endereço postal devem ser listados após as afiliações e identificados com um asterisco (*).

Exemplo:

* Correspondência: Nome Completo do Autor, correspondendo@author.email.com , endereço postal completo.

2. Resumo

O objetivo do trabalho deve ser clara e brevemente declarado e incluir os métodos e conclusões resumidas. Limite de número de palavras: 300 palavras.

3. Palavras-chave

As palavras-chave devem ser listadas após o resumo. Máximo de cinco palavras-chave.

4. Introdução

Esta seção deve fornecer informações básicas que levem à hipótese testada. Deve terminar com uma breve declaração dos objetivos do trabalho.

5. Métodos

Os métodos devem incluir o desenho do estudo, tipo de material envolvido, número de animais por grupo, uma descrição clara de todos os métodos utilizados e / ou referências claras aos métodos publicados, e o tipo de análise utilizada.

As informações sobre o registro e a aprovação do comitê de ética devem ser inseridas no final desta seção, incluindo uma descrição completa dos dados e do local onde o experimento foi realizado e as autorizações necessárias para obter o tecido animal ou animal obtido.

6. Resultados

Os principais resultados encontrados devem ser declarados de forma clara e objetiva. Esta seção pode ser dividida em subseções com cabeçalhos informativos e curtos.

7. Discussão

Esta seção pode ser dividida em subseções com cabeçalhos informativos e curtos. A discussão deve ser focada nos resultados encontrados. Recomenda-se que as principais conclusões apoiadas pelos dados da pesquisa sejam declaradas como um último parágrafo.

8. Conclusão

As principais conclusões apoiadas pelos dados e discussão da pesquisa devem ser declaradas de maneira clara e objetiva.

9. Agradecimentos

Os colaboradores que não atenderem aos critérios de autoria estabelecidos em nossas políticas devem ser mencionados nesta seção se tiverem concedido sua permissão.

10. Referências

A seção de referências deve começar em uma nova página e seguir o estilo Vancouver, conforme descrito a seguir.

Todas as referências devem ser citadas e a correção de todas as informações é de responsabilidade do autor.

11. Tabelas

Um conjunto de dados alfanuméricos organizados em linhas e colunas. Todas as tabelas devem ser incluídas no final do manuscrito, cada uma em uma página separada. As tabelas devem ser o mais simples possível, e somente linhas horizontais devem ser usadas na parte superior e inferior da tabela. As células da tabela nunca devem ser divididas com linhas diagonais. As legendas da tabela devem precedê-la e começar com a palavra "Tabela" seguida do seu número em algarismos arábicos. As tabelas devem ser citadas no texto como Tabela 1, Tabela 2, etc., na ordem em que são incluídas. Todas as abreviações ou anotações devem ser explicadas nas notas de rodapé; se necessário, os símbolos devem ser usados para incluir as explicações (*, †, ‡, §, etc.).

12. Figuras e legendas das figuras

Qualquer ilustração que contenha desenhos de linhas, fotografias, gráficos, esquemas, fluxogramas etc. deve ser citada como figuras. Cada figura deve ser identificada e enviada em um arquivo separado de alta resolução, garantindo que o menor texto seja perfeitamente legível. A lista de legendas das figuras deve começar em uma nova página no final do manuscrito. As figuras devem ser citadas na ordem numérica em que estão listadas; por exemplo,

Fig. 1, Fig. 2, Figs. 1-2, etc.

Quando necessário, os autores são responsáveis por obter a autorização adequada para usar imagens, fotos e ilustrações de outras fontes, de acordo com o proprietário original dos direitos autorais, e incluir a citação adequada.

Referências e estilo de citação

A seção de referências deve seguir o estilo Vancouver. Uma pequena amostra das referências bibliográficas mais usadas é incluída adiante. Uma lista extensa com muitos mais exemplos e detalhes está disponível em

http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html .

Todas as referências devem ser citadas e a correção de todas as informações é de responsabilidade do autor.

As referências devem ser listadas primeiro em ordem alfabética, depois por ano usando letras minúsculas para diferenciar as referências dos mesmos autores e ano.

Use “no prelo” somente quando a aceitação formal tiver sido concedida.

Citações de texto

Todas as referências devem ser citadas usando o estilo Data do Autor, conforme mostrado nos seguintes exemplos:

1. autor único: (Ginther, 1992) ou Ginther (1992).
2. dois autores: (Varley e Foxcroft, 1990) ou Varley e Foxcroft (1990).
3. mais de dois autores: (Quintero et al., 2000) ou Quintero et al. (2000)
4. mais de um artigo citado: (Varley e Foxcroft, 1990; Ginther, 1992; Gastal et al., 1999a, b; Quintero et al., 2000) ou Varley e Foxcroft (1990); Ginther (1992); Gastal et al. (1999a, b); Quintero et al. (2000), sempre citado em ordem cronológica crescente.

Lista de amostra de estilo de referência

Para ARTIGOS EM REVISTA:

Gastal EL, Gastal MO, Ginther JO. Assunção experimental de dominância por um folículo menor e alterações hormonais associadas nas éguas. *Biol Reprod.* 1999a; 61 (3): 724-30. <http://dx.doi.org/10.1095/biolreprod61.3.724>. PMID: 10456850.

Gastal EL, Donadeu FX, Gastal MO, Ginther OJ. Alterações ecotexturais na parede folicular durante o desvio folicular em éguas. *Theriogenology.* 1999b; 52 (5): 803-14. [http://dx.doi.org/10.1016/S0093-691X\(99\)00173-9](http://dx.doi.org/10.1016/S0093-691X(99)00173-9). PMID: 10735121.

Hess RA, Carnes K. O papel do estrogênio nos testículos e no trato reprodutivo masculino: uma revisão e comparação de espécies. *Anim Reprod.* 2004; 1: 5-30.

Sartori R, Souza AH, Guenther JN, Caraviello DZ, Geiger LN, Schenk JL, Wiltbank MC. Taxa de fertilização e qualidade embrionária em novilhas da raça Holandesa superovuladas, inseminadas artificialmente com espermatozoides classificados ou não. *Anim Reprod.* 2004; 1: 86-90.

Varley MA, Foxcroft GR. Endocrinologia de porcas em lactação e desmamadas. *J Reprod Fertil Suppl.* 1990; 40: 47-61. PMID: 2192052.

Para LIVROS, DISSERTAÇÕES E CONFERÊNCIAS:

Basrur PK, Kochhar HS. Anormalidades sexuais herdadas em cabras. In: Youngquist RS, Threlfall WR, editores. *Terapia atual em animais de grande porte.* Filadélfia: WB Saunders; 1997. p. 590-4.

JO Ginther. *Biologia reprodutiva da égua: aspectos básicos e aplicados.* 2nd ed. Cross Plains: Publicação de Equiserviços; 1992. p. 105-72.

Leal MC. *Análise morfométrica e funcional do teste e eficiência espermatogênica em Saguís Callithrix penicillata (Primates: Callitrichidae) [dissertação].* Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais; 2004. Português.

Quintero B, Porter M, Sharp D, Cleaver B, Diaz T. Efeito da estação nas concentrações de LH e dinâmica do pulso de LH em éguas localizadas nos trópicos. In: Resumos do 14º Congresso Internacional de Reprodução Animal; 2000 2-6 de julho; Estocolmo, Suécia. Estocolmo: ICAR; 2000. p. 290

Para DOCUMENTOS ELETRÔNICOS:

CD-ROM:

Anderson SC, Poulsen KB. Atlas eletrônico de hematologia de Anderson [CD-ROM]. 2ª versão. Filadélfia: Lippincott Williams & Wilkins; 2002. 1 CD-ROM: colorido, 4 3/4 pol.

Artigo de revista na Internet:

Abood S. Iniciativa de melhoria da qualidade em casas de repouso: a ANA atua como consultora. Am J Nurs [serial na Internet]. 2002 Jun [cited 2019 Jul 25]; 102 (6): [about 3 p.].

Disponível em:
https://journals.lww.com/ajnonline/Abstract/2002/06000/Quality_Improvement_Initiative_in_Nursing_Homes.31.aspx.

Monografia na Internet:

Foley KM, Gelband H, editores. Melhorando os cuidados paliativos para o câncer [monogra_a na Internet]. Washington: National Academy Press; 2001 [cited 2019 Jul 25]. Disponível em: <http://www.nap.edu/books/0309074029/html/>.

Página inicial / site:

Cancer Pain [homepage na Internet]. Nova York: American Cancer Society; 2019 [citado 2019 jul 25]. Disponível em: <https://www.cancer.org/treatment/treatments-and-side-effects/physical-side-effects/pain.html>.

Parte de uma página inicial / site:

AMA [homepage na Internet]. Chicago: American Medical Association; 1995-2019. O que é uma morte saudável? 6 etapas no caminho para os médicos saberem; 2019 22 de julho [cited 2019 Jul 25]; [cerca de 2 telas]. Disponível em: <https://www.ama-assn.org/delivering-care/ethics/what-s-healthy-dying-6-steps-pathdoctors-know>.

Banco de dados aberto na Internet:

Quem é certi_cado [banco de dados na Internet]. Alexandria (VA): Conselho Americano de Cirurgia Plástica Facial e Reconstructiva; 2019 [citado 2019 jul 25]. Disponível em: https://www.abfprs.org/certi_ed/disclaimer.

Banco de dados fechado na Internet:

Jablonski S. Síndromes múltiplas de anomalia congênita on-line, retardo mental (MCA / MR) [banco de dados na Internet]. Bethesda (MD): Biblioteca Nacional de Medicina; 2001

[citado em 12 ago 2002]. Disponível em:
http://www.nlm.nih.gov/mesh/jablonski/syndrome_title.html.

Parte de um banco de dados na Internet:

Navegador MeSH [banco de dados na Internet]. Bethesda (MD): Biblioteca Nacional de Medicina; 2002.

Meta-análise; ID exclusivo: D015201; [citado em 10/06/2003]; [cerca de 3 telas].
Disponível em: <http://www.nlm.nih.gov/mesh/MBrowser.html>.

Para TRABALHOS NÃO PUBLICADOS:

Deve ser mencionado apenas no texto, e não na lista de referências.

Normas da REPRODUCTION IN DOMESTIC ANIMALS

Seções

1. Submissão
2. Objetivos e escopo
3. Categorias e requisitos do manuscrito
4. Preparando sua submissão
5. Políticas editoriais e considerações éticas
6. Licenciamento do autor
7. Processo de publicação após a aceitação
8. Pós-publicação
9. Detalhes de contato do escritório editorial

PROCESSO DE SUBMISSÃO E REVISÃO POR PARES

Obrigado pelo seu interesse em Reprodução em Animais Domésticos . Novas submissões devem ser feitas através do portal de submissão de intercâmbio de pesquisa submit.wiley.com/journal/RDA Caso seu manuscrito prossiga para o estágio de revisão, você será direcionado para fazer suas revisões através do mesmo portal de submissão. Você pode verificar o status do seu envio a qualquer momento acessando o site submit.wiley.com e clicando no botão "Meus envios". Para obter ajuda técnica com o sistema de envio, consulte nossas perguntas frequentes ou entre em contato com submithelp@wiley.com

Aguardamos sua apresentação.

Proteção de Dados e Privacidade

Ao enviar um manuscrito ou revisar para esta publicação, seu nome, endereço de e-mail, afiliação institucional e outros detalhes de contato que a publicação possa exigir serão usados para as operações regulares da publicação, incluindo, quando necessário, compartilhamento com o editora (Wiley) e parceiros para produção e publicação. A publicação e o editor reconhecem a importância de proteger as informações pessoais coletadas dos usuários na operação desses serviços e adotam práticas para garantir que sejam tomadas medidas para manter a segurança, integridade e privacidade dos dados pessoais coletados e processados . Você pode saber mais em <https://authorservices.wiley.com/statements/data-protection-policy.html> .

Política de pré-impressão

Reprodução em Animais Domésticos considerará para revisão artigos previamente disponíveis como preprints. Os autores também podem postar a versão enviada de um manuscrito em um servidor de pré-impressão a qualquer momento. Solicita-se aos autores que atualizem todas as versões de pré-publicação com um link para o artigo final publicado.

OBJETIVOS E ESCOPO

Reprodução em Animais Domésticos é uma revista internacional que publica artigos originais e significativos sobre reprodução em animais domésticos, animais de laboratório e vida selvagem, com atenção especial à pesquisa básica, aplicada e clínica. A reprodução é considerada em um contexto amplo, com seu forte núcleo disciplinar e comparativo. A revista, portanto, abrange obstetrícia, neonatologia e saúde do úbere, e recebe contribuições nessas áreas. O escopo da revista se aplica a veterinários, criadores e biólogos, além de ser de interesse para praticantes de medicina humana. A Reprodução em Animais Domésticos é o órgão oficial da Sociedade Europeia de Reprodução de Animais Domésticos (ESDAR), da Sociedade Europeia de Veterinária para a Reprodução de Pequenos Animais (EVSSAR) e da Sociedade Espanhola de Reprodução Animal (AERA). Incentivamos o envio de resultados tópicos para publicação como artigos originais, revisões (mini-revisões ou artigos críticos) ou comunicações

curtas (incluindo relatos de casos e notas técnicas). Observe que a Reprodução em Animais Domésticos publica apenas artigos bem escritos de alta qualidade científica e significado para o avanço do campo da reprodução, apesar de serem cientificamente sólidos ou adequadamente executados ou escritos. Artigos de destaque ou resenhas devem abordar informações conhecidas ou abordar questões polêmicas em uma área específica dos campos acima mencionados que compõem o escopo da revista, com o objetivo de fundamentar futuras pesquisas inovadoras. A revista publica apenas comunicações preliminares ONLINE de resultados que são de interesse atual e extremo. Autores interessados em elaborar uma resenha, um artigo especial, ou um artigo de ponto de vista, são convidados a discutir o assunto com o Editor-Chefe. Esse contato preliminar com o Editor-Chefe também é aconselhável quando assuntos relacionados a Patentes são incluídos em qualquer manuscrito. Todos os artigos são submetidos a uma revisão completa por pares por pelo menos dois pareceristas ad hoc. Comunicações curtas estarão sujeitas a arbitragem acelerada, mas muito rigorosa. O idioma de publicação é o inglês.

3. CATEGORIAS E REQUISITOS DO MANUSCRITO

A Reprodução em Animais Domésticos publica vários tipos de artigos diferentes, incluindo:

Artigos Originais – 5.000 palavras, incluindo figuras, tabelas e referências

Artigos de Revisão – 5.000 palavras, incluindo figuras, tabelas e referências.

Short Communications – 1.800 palavras incluindo figuras, tabelas e referências. Comunicações curtas estarão sujeitas a arbitragem acelerada, mas muito rigorosa.

Cartas ao Editor – os comentários devem limitar-se ao conteúdo do artigo e os autores do artigo referido terão a oportunidade de responder. Se os autores não quiserem fornecer uma resposta, ou não fornecerem uma resposta dentro de 30 dias, uma nota de rodapé do Editor será adicionada à Carta ao Editor publicada para observar isso (por exemplo, “Os autores de [título do artigo publicado anteriormente] não ofereceu comentários”).

Todos os manuscritos devem estar em espaço duplo com tamanho de fonte de 12 pontos ou maior.

Qualquer autor que esteja preocupado com o fato de seus manuscritos excederem os limites recomendados de páginas deve entrar em contato com o Escritório Editorial antes da submissão para discutir as opções. Estes serão avaliados caso a caso em consulta com o autor e o Editor, e a decisão do Editor será final.

PREPARANDO SUA SUBMISSÃO

Arquivo de Texto Principal

Os manuscritos podem ser carregados como um único documento (contendo o texto principal, tabelas e figuras) ou com figuras e tabelas fornecidas como arquivos separados. Caso seu manuscrito chegue à fase de revisão, as figuras e tabelas devem ser fornecidas em arquivos separados. O arquivo principal do manuscrito pode ser submetido em formato Microsoft Word (.doc ou.docx) Seu arquivo de documento principal deve incluir:

Um título informativo curto contendo as principais palavras-chave. O título não deve conter abreviaturas

Os nomes completos dos autores com filiação institucional onde o trabalho foi realizado, com nota de rodapé para o endereço atual do autor, se diferente de onde o trabalho foi realizado;

Reconhecimentos;

Abstrato

Palavras-chave;

Corpo principal formatado

Referências;

Tabelas (cada tabela completa com título e notas de rodapé);

Figuras: As legendas das figuras devem ser adicionadas abaixo de cada imagem individual durante o upload E como uma lista completa no texto.

Estilo de referência

Esta revista usa o estilo de referência da American Psychological Association (APA). Revise suas diretrizes de estilo de referência antes do envio.

Pontos gerais de estilo

Os links a seguir fornecem conselhos gerais sobre formatação e estilo.

- **Abreviações:** Em geral, os termos não devem ser abreviados, a menos que sejam usados repetidamente e a abreviação seja útil para o leitor. Inicialmente, use a palavra por extenso, seguida da abreviatura entre parênteses. Depois disso, use apenas a abreviação.
- **Unidades de medida:** As medidas devem ser dadas em unidades SI ou derivadas do SI. Visite o site do Bureau International des Poids et Mesures (BIPM) em <http://www.bipm.fr> para obter mais informações sobre as unidades do SI.
- **Nomes Comerciais:** As substâncias químicas devem ser referidas apenas pelo nome genérico. Nomes comerciais não devem ser usados. Os medicamentos devem ser referidos por seus nomes genéricos. Se medicamentos proprietários foram usados no estudo, refira-se a eles pelo nome genérico, mencionando o nome comercial e o nome e localização do fabricante, entre parênteses.

Apoio à preparação do artigo

Wiley Editing Services oferece ajuda especializada com edição em inglês, bem como tradução, formatação de manuscrito, ilustração de figura, formatação de figura e design gráfico de resumo - para que você possa enviar seu manuscrito com confiança.

Além disso, confira nossos recursos para Preparar seu artigo para obter orientações gerais sobre como escrever e preparar seu manuscrito

5. POLÍTICAS EDITORIAIS E CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

Revisão Editorial e Aceitação

O critério de aceitação para todos os artigos é a qualidade e originalidade da pesquisa e sua importância para nossos leitores. Exceto onde indicado de outra forma, os manuscritos são revisados por pares simples-cegos. Os artigos só serão enviados para revisão se o Editor-Chefe determinar que o artigo atende aos requisitos apropriados de qualidade e relevância. A política da Wiley sobre confidencialidade do processo de revisão..

Compartilhamento de dados e acessibilidade de dados

Reprodução em Animais Domésticos reconhece os muitos benefícios de arquivar dados de pesquisa. A revista espera que você archive todos os dados dos quais seus resultados publicados são derivados em um repositório público. O repositório que você escolher deve oferecer preservação garantida (consulte o registro de repositórios de dados de pesquisa em <https://www.re3data.org/>) e deve ajudá-lo a torná-lo localizável, acessível, interoperável e reutilizável, de acordo com o FAIR Princípios de dados (<https://www.force11.org/group/fairgroup/fairprinciples>). Todos os manuscritos aceitos são obrigados a publicar uma declaração de disponibilidade de dados para confirmar a presença ou ausência de dados compartilhados. Se você compartilhou dados, esta declaração descreverá como os dados podem ser acessados e incluirá um identificador persistente (por exemplo, um DOI para os dados ou um número de acesso) do repositório onde você compartilhou os dados. Os autores serão obrigados a confirmar a adesão à política. Se você não puder compartilhar os dados descritos em seu manuscrito, por exemplo, por motivos legais ou éticos, ou não pretender compartilhar os dados, deverá fornecer a declaração de disponibilidade de dados apropriada. Reprodução em Animais Domésticos observa que o compartilhamento de dados FAIR permite o acesso a dados compartilhados sob restrições (por exemplo, para proteger informações confidenciais ou proprietárias), mas observa que os princípios FAIR incentivam você a compartilhar dados de maneiras tão abertas quanto possível (mas que podem ser tão fechadas

quanto necessário). Exemplos de declarações estão disponíveis aqui . Se publicadas, todas as declarações serão colocadas no cabeçalho do seu manuscrito.

Citação de dados

Por favor, cite também os dados que você compartilhou, como você citaria outras fontes às quais seu artigo se refere, em sua seção de referências. Você deve seguir o formato para suas citações de dados estabelecido na Declaração Conjunta de Princípios de Citação de Dados, <https://www.force11.org/datacitationprinciples> :

[conjunto de dados] Autores; Ano; Título do conjunto de dados; Repositório ou arquivo de dados; Versão (se houver); Identificador persistente (por exemplo, DOI)

Ética

Uma declaração descrevendo explicitamente o histórico ético deste estudo e qualquer aprovação do comitê de ética institucional ou nacional deve ser incluída no manuscrito.

Estudos humanos e assuntos

Para manuscritos relatando estudos médicos envolvendo participantes humanos, exigimos uma declaração identificando o comitê de ética que aprovou o estudo e que o estudo está em conformidade com os padrões reconhecidos, por exemplo: Declaração de Helsinque ; Política Federal dos EUA para a Proteção de Seres Humanos ; ou Diretrizes da Agência Europeia de Medicamentos para Boas Práticas Clínicas .

As imagens e informações de participantes individuais só serão publicadas quando os autores obtiverem o consentimento livre e informado prévio do indivíduo. Os autores não precisam fornecer uma cópia do formulário de consentimento ao editor, no entanto, ao assinar a licença do autor para publicar, os autores devem confirmar que o consentimento foi obtido. A Wiley tem disponível um formulário padrão de consentimento do paciente .

estudos animais

Uma declaração indicando que o protocolo e os procedimentos empregados foram revisados e aprovados eticamente, e o nome do órgão que deu a aprovação, deve ser incluída na seção Métodos do manuscrito. Incentivamos os autores a aderirem aos padrões de relatórios de pesquisas com animais, por exemplo, as diretrizes de relatórios ARRIVE para relatórios de projeto de estudo e análise estatística; Procedimentos experimentais; animais experimentais e alojamento e criação. Os autores também devem declarar se os experimentos foram realizados de acordo com as diretrizes e regulamentos institucionais e nacionais relevantes para o cuidado e uso de animais de laboratório:

- Os autores dos EUA devem citar a conformidade com o Guia do Conselho Nacional de Pesquisa dos EUA para o Cuidado e Uso de Animais de Laboratório , a Política do Serviço de Saúde Pública dos EUA sobre Cuidado e Uso Humanitário de Animais de Laboratório e Guia para o Cuidado e Uso de Animais de Laboratório .
- Os autores do Reino Unido devem estar em conformidade com a legislação do Reino Unido sob os regulamentos de alteração de 1986 do Animals (Scientific Procedures) Act (SI 2012/3039) .
- Os autores europeus fora do Reino Unido devem estar em conformidade com a Diretiva 2010/63/EU.

Nomes de espécies

Na primeira utilização no título, resumo e texto, o nome vulgar da espécie deve ser seguido do nome científico (gênero, espécie e autoridade) entre parênteses. No entanto, para espécies bem conhecidas, os nomes científicos podem ser omitidos dos títulos dos artigos. Se nenhum nome comum existir em inglês, o nome científico deve ser usado apenas.

Nomenclatura Genética

Variantes de sequência devem ser descritas no texto e nas tabelas usando designações de DNA e proteínas sempre que apropriado. A nomenclatura da variante de sequência deve seguir as

diretrizes atuais do HGVS; consulte <http://varnomen.hgvs.org/> , onde são fornecidos exemplos de nomenclatura aceitável.

Dados de sequência de nucleotídeos

Os dados da sequência de nucleotídeos podem ser enviados em formato eletrônico para qualquer um dos três principais bancos de dados colaborativos: DDBJ, EMBL ou GenBank. Só é necessário enviar para um banco de dados, pois os dados são trocados entre DDBJ, EMBL e GenBank diariamente. A redação sugerida para se referir às informações do número de acesso é: 'Estes dados de sequência foram enviados aos bancos de dados DDBJ/EMBL/GenBank sob o número de acesso U12345'. Os endereços são os seguintes:

Banco de dados de DNA do Japão (DDBJ) <http://www.ddbj.nig.ac.jp>

Submissões de sequências de nucleotídeos EMBL <http://www.ebi.ac.uk>

GenBank <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>

Dados de Sequência de Proteína

Os dados da sequência de proteínas devem ser enviados para um dos seguintes repositórios:

- Protein Information Resource (PIR): pir.georgetown.edu
- SWISS-PROT: expasy.ch/sprot/sprot-top

Conflito de interesses

Reprodução em Animais Domésticos exige que todos os autores divulguem quaisquer fontes potenciais de conflito de interesse. Qualquer interesse ou relacionamento, financeiro ou outro que possa ser percebido como influenciando a objetividade de um autor, é considerado uma fonte potencial de conflito de interesses. Estes devem ser divulgados quando diretamente relevantes ou diretamente relacionados ao trabalho que os autores descrevem em seu manuscrito. Fontes potenciais de conflito de interesses incluem, mas não estão limitadas a, propriedade de patentes ou ações, participação no conselho de administração de uma empresa, participação em um conselho ou comitê consultivo de uma empresa e consultoria ou recebimento de honorários de palestrante de uma empresa. A existência de um conflito de interesses não impede a publicação. Se os autores não tiverem nenhum conflito de interesse a declarar, eles também devem declarar isso no momento da submissão. É responsabilidade do autor correspondente revisar esta política com todos os autores e divulgar coletivamente com a submissão TODAS as relações comerciais e outras pertinentes. A declaração de Conflito de Interesses deve ser incluída no arquivo de texto principal do seu envio.

Financiamento

Os autores devem listar todas as fontes de financiamento na seção Agradecimentos. Os autores são responsáveis pela precisão de sua designação de financiador. Em caso de dúvida, verifique o Open Funder Registry para obter a nomenclatura correta: <http://www.crossref.org/fundingdata/registry.html>

Autoria

A lista de autores deve ilustrar com precisão quem contribuiu para o trabalho e como. Todos aqueles listados como autores devem se qualificar para autoria de acordo com os seguintes critérios:

- 1) Ter feito contribuições substanciais para a concepção e projeto, ou aquisição de dados, ou análise e interpretação de dados;
- 2) Esteve envolvido na redação do manuscrito ou revisando-o criticamente quanto ao conteúdo intelectual importante;
- 3) Dada a aprovação final da versão a ser publicada. Cada autor deve ter participado suficientemente do trabalho para assumir responsabilidade pública por partes apropriadas do conteúdo; e

4) Concordou em ser responsável por todos os aspectos do trabalho, garantindo que questões relacionadas à precisão ou integridade de qualquer parte do trabalho sejam adequadamente investigadas e resolvidas.

Contribuições de qualquer pessoa que não atenda aos critérios de autoria devem ser listadas, com permissão do colaborador, em uma seção de Agradecimentos (por exemplo, para reconhecer contribuições de pessoas que forneceram ajuda técnica, coleta de dados, assistência na redação, obtenção de financiamento, ou um chefe de departamento que forneceu suporte geral). Antes de enviar o artigo, todos os autores devem concordar com a ordem em que seus nomes serão listados no manuscrito.

Opções adicionais de autoria

Primeira autoria conjunta ou autoria sênior: No caso de primeira autoria conjunta, uma nota de rodapé deve ser adicionada à lista de autores, por exemplo, 'X e Y devem ser considerados primeiro autor conjunto' ou 'X e Y devem ser considerados autor sênior conjunto'.

ORCID

Como parte de nosso compromisso de apoiar os autores em todas as etapas do processo de publicação, Reprodução em Animais Domésticos exige que o autor do envio (somente) forneça um ORCID iD ao enviar um manuscrito. Isso leva cerca de 2 minutos para ser concluído.

Encontre mais informações .

Ética na Publicação

Esta revista é membro do Comitê de Ética na Publicação (COPE). Observe que esta revista usa o software CrossCheck da iThenticate para detectar instâncias de texto sobreposto e semelhante em manuscritos enviados. Leia nossas 10 principais dicas de ética editorial para autores aqui . As diretrizes de ética de publicação da Wiley podem ser encontradas em <https://authorservices.wiley.com/ethics-guidelines/index.html>

LICENCIAMENTO DO AUTOR

Se o seu artigo for aceito, o autor identificado como o autor correspondente formal receberá um e-mail solicitando que ele faça login no Author Services, onde, por meio do Wiley Author Licensing Service (WALS), ele será solicitado a preencher um contrato de licença de direitos autorais em nome de todos os autores do artigo.

Os autores podem optar por publicar sob os termos do acordo de direitos autorais padrão da revista, ou Acesso Aberto sob os termos de uma Licença Creative Commons.

Informações gerais sobre licenciamento e direitos autorais estão disponíveis aqui . Para revisar as opções de Licença Creative Commons oferecidas em Acesso Aberto, clique aqui . (Observe que certos financiadores determinam que um determinado tipo de licença CC deve ser usado; para verificar isso, clique aqui.)

Definições e políticas de autoarquivamento. Observe que o acordo de direitos autorais padrão da revista permite o auto-arquivo de diferentes versões do artigo sob condições específicas. Clique aqui para obter informações mais detalhadas sobre definições e políticas de autoarquivamento.

Taxas de Acesso Aberto: Se você optar por publicar usando o Acesso Aberto, será cobrada uma taxa. Uma lista de taxas de publicação de artigos para revistas Wiley está disponível aqui

Acesso aberto do financiador: clique aqui para obter mais informações sobre a conformidade da Wiley com as políticas específicas de acesso aberto do financiador.