

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL

YNDYRA NAYAN TEIXEIRA CARVALHO CASTELO BRANCO

EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO DOS ÁCIDOS OLÉICO E PALMÍTICO E DO
EUGENOL NA CRIOPRESERVAÇÃO DE SÊMEN BOVINO

TERESINA - PI

2018

YNDYRA NAYAN TEIXEIRA CARVALHO CASTELO BRANCO

EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO DOS ÁCIDOS OLÉICO E PALMÍTICO E DO
EUGENOL NA CRIOPRESERVAÇÃO DE SÊMEN BOVINO

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em
Ciência Animal da Universidade Federal do Piauí
(UFPI), na área de Sanidade e Reprodução Animal,
como requisito parcial para obtenção do Título de
Doutor em Ciência Animal.

Orientador: Prof. Dr. José Adalmir Torres de Souza

TERESINA-PI

2018

FICHA CATALOGRÁFICA
Universidade Federal do Piauí
Biblioteca Setorial do Centro de Ciências Agrárias
Serviço de Processamento Técnico

C348e Castelo Branco, Yndyra Nayan Teixeira Carvalho
Efeito da suplementação dos ácidos oléico e palmítico e do eugenol na criopreservação de sêmen bovino. / Yndyra Nayan Teixeira Carvalho Castelo Branco - 2018.
110 f.: il.

Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Piauí, Programa de Pós- Graduação em Ciência Animal, Teresina, 2018.
Orientação: Prf. Dr. José Adalmir Torres de Souza

1. Ácidos oleico 2. Ácidos palmítico 3. Bovino 4. Cinética espermática 5. Espécies reativas ao oxigênio 6. Espermatozoides 7. Eugenol I.Título.

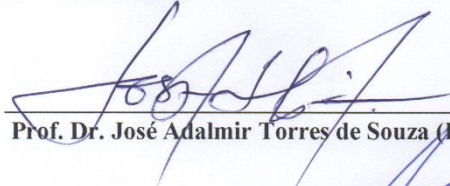
CDD 547.037

**EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO DOS ÁCIDOS OLÉICO E PALMÍTICO E DO
EUGENOL NA CRIOPRESERVAÇÃO DE SÊMEN BOVINO**

YNDYRA NAYAN TEIXEIRA CARVALHO

Tese aprovada em: 29/05/2018


Banca Examinadora:



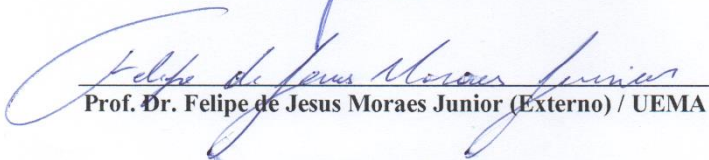
Prof. Dr. José Adalmir Torres de Souza (Presidente) / DCCV/CCA/UFPI



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



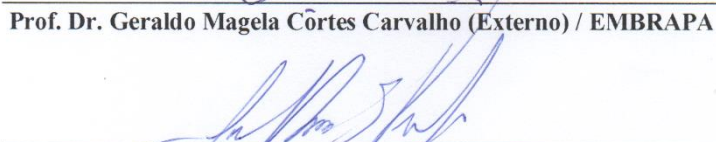
Prof. Dr. Francisco Cardoso Figueiredo (Interno) / CTT/UFPI



Prof. Dr. Felipe de Jesus Moraes Junior (Externo) / UEMA



Prof. Dr. Geraldo Magela Côrtes Carvalho (Externo) / EMBRAPA



Prof. Dr. José Ribamar de Souza Torres Júnior (Externo) / UFMA

Dedicatória

As minhas queridas mães, Maria do Socorro de Assis Teixeira e Olivania Maria Teixeira Carvalho, e ao meu maravilhoso esposo, Marlon de Araújo Castelo Branco, por me incentivar e acreditar que eu pudesse chegar além de um sonho.

Agradecimentos

Acima de tudo e de todos, sempre DEUS, que seja dada toda honra e glória, por está em todos os momentos presente em nossa existência e nos dá força para continuarmos na luta. Obrigada meu DEUS, eu te agradeço por tudo que tens feito em minha vida.

Agradeço às minhas amadas mães, MARIA DO SOCORRO DE ASSIS TEIXEIRA e OLIVANIA MARIA TEIXEIRA CARVALHO e ao meu querido irmão YTALLO RAFAEL TEIXEIRA ALBUQUERQUE, com os quais aprendi que na vida o medo é transformado em desejo, e o desejo em confiança. Aprendi que quando se quer conseguir algo, tem que dominar a razão e não a força. Aprendi que acima de tudo, o importante é querer. Obrigada por todo o amor, carinho, compreensão e incentivo, sem este amor não teria forças para lutar sempre.

Ao meu esposo dedicado, amoroso e companheiro de todas as horas, MARLON DE ARAÚJO CASTELO BRANCO, por me encorajar em grandes iniciativas, por inspirar confiança, pelo amor e cumplicidade, mas acima de tudo por simplesmente existir em minha vida.

Ao meu orientador, Prof. Dr. JOSÉ ADALMIR TORRES DE SOUZA, que com muita sabedoria me conduziu durante toda essa jornada. Obrigada pelas oportunidades, pela confiança e por todos os ensinamentos durante esses anos de pesquisa.

Aos professores FIGUEIREDO CARDOSO, JOSÉ FERREIRA NUNES, JOÃO BATISTA, LINDEMBERG, ANA AMÉLIA por me auxiliar a iniciar, e, por me assistir na finalização deste trabalho.

Ao proprietário, Sr. JOÃO NETO, pela disponibilidade dos animais da Fazenda Santa Luzia, e ao Dr. GERALDO MAGELA, curador do gado Curraleiro Pé-Duro, que nos permitiu acesso a raça para execução do nosso projeto.

Aos professores doutores, ISOLDA MÂRCIA ROHA DO NASCIMENTO, ANTONIO DE SOUSA JÚNIOR e FELIPE DE JESUS DE MORAES JÚNIOR, pela amizade, incentivo e colaboração.

Aos meus amigos e companheiros de longa estrada da graduação pra vida, a equipe LBRA, MICHERLENE LUSTOSA, LEOPOLDINA ALMEIDA, VIVIANY RODRIGUES, DAYANA NASCIMENTO, JEFFERSON LUSTOSA, FILIPE NUNES, LUIZ HARLITON, LUANA EVANGELISTA, FELIPE BARÇANTE, ANNA MONALLYSA, DEYSE MASCARENHAS, ICARO TORRES, CÍCERO SOARES, SÁVIO RUAN, MARCOS CELESTINO, FELIPE FERREIRA, e MICHELE CAVALCANTE, pelos conselhos, pela amizade, e apoio.

Uma muito obrigada ao Senhor GALDÊNCIO, Sr. NETO, colaboradores em dia de coleta.

À colaboração de velhos e novos amigos que fazemos ao longo desta jornada, TALITA CÂMARA, MARCIMAR, BRUNA(UECE), ANA MARIA e JOSÉ VICTOR (UFPI), SAMARA (UFT), SUZANA E RANIEL LUSTOSA.

À amiga e funcionária da UFPI Dn. NOEMIA, pelas conversas da tarde e a gentileza dos cafezinhos do dia-a-dia, e amizade do funcionário JAMES.

Aos amigos e colegas da pós-graduação, pela amizade, ajuda e convivência durante a pós.

À Universidade Federal do Piauí-UFPI, que instituiu no Centro de Ciências Agrárias o Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, possibilitando a realização deste curso de doutorado.

Ao Laboratório de Biotecnologia da Reprodução Animal – LBRA, que, através do uso de suas instalações e equipamentos, tornou possível a conclusão do experimento.

À Capes pela concessão de bolsa de estudo para realização do Curso.

E a todos, que de qualquer maneira colaboraram para a realização desse trabalho.

A todos, Muito Obrigada!

“Ainda que eu andasse pelo vale da sombra da morte, não temerei mal algum, por que tu estás comigo; a tua vara e o teu cajado me consolam”.
(Salmo 23:4)

“O gênio é experiência. Alguns parecem pensar que é um dom ou talento, mas é o fruto de longa experiência em muitas vidas. Algumas pessoas são almas mais antigas do que outras, e por isso sabem mais.”
(Thomas Edison)

SUMÁRIO

	Pág.
LISTA DE TABELAS	10
LISTA DE FIGURAS	11
LISTA DE ABREVIACÕES	12
RESUMO	13
ABSTRAT	14
1 INTRODUÇÃO.....	15
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	16
2.1 Bos taurus taurus x Bos taurus indicus.....	16
2.2 Estrutura espermática.....	18
2.2.1 <i>Membrana Plasmática.....</i>	<i>19</i>
2.2.2 <i>Cabeça.....</i>	<i>22</i>
2.2.3 <i>Colo.....</i>	<i>23</i>
2.2.4 <i>Flagelo.....</i>	<i>24</i>
2.3 Biologia redox e as espécies reativas.....	24
2.3.1 <i>ROS e os danos oxidativos.....</i>	<i>28</i>
2.4 Defesas antioxidantes.....	30
2.5 <i>Os Ácidos graxos.....</i>	<i>31</i>
2.6 <i>Eugenol.....</i>	<i>33</i>
2.7 Criopreservação seminal.....	35
2.8 Análises espermáticas.....	37
2.9. Referências Bibliográficas.....	39
3 CAPÍTULO I - Avaliação do sêmen criopreservado de duas diferentes raças bovina.....	54
4 CAPÍTULO II - Criopreservação de sêmen de touros: Efeito da suplementação de ácidos graxos ao meio diluidor sobre a viabilidade e fertilidade espermática.....	68
5 CAPÍTULO III- Atividade antioxidante do Eugenol na criopreservação do sêmen bovino.....	91
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	110

LISTA DE TABELAS

REVISÃO DE LITERATURA	Pág.
<p>Tabela 1 - Comprimento (μm), tamanho da cabeça, parte intermédia e peça principal de espermatozoide, nas diferentes espécies mamíferas, modificada de acordo com Pesch e Bergmann (2006)</p>	19
CAPÍTULO I	
<p>Tabela 1 - Parâmetros cinéticos do sêmen descongelado, avaliados pelo Sistema de Análise Computadorizada (CASA), das raças Nelore e Curraleiro Pé-Duro.....</p>	61
<p>Tabela 2 - Avaliação da morfologia espermática (%) de sêmen criopreservado em diluidor TRIS-gema, de duas diferentes raças.....</p>	61
CAPÍTULO II	
<p>Tabela 1 - Motilidade total e vigor pós-descongelamento de espermatozoides de touros, criopreservados em meio de congelação suplementado com diferentes concentrações de ácido oleico (50 μM e 100 μM) e ácido palmítico (50 μM e 100 μM), avaliados pelo teste de termo resistência (TTR).....</p>	77
<p>Tabela 2 - Parâmetros cinéticos (CASA) de espermatozoides criopreservados de bovinos com meio de congelação suplementado com diferentes concentrações de ácido oleico (50 μM e 100 μM) e ácido palmítico (50 μM e 100 μM).....</p>	79
<p>Tabela 3 - Integridade da membrana plasmática e Integridade acrossomal pós-descongelamento de espermatozoides de touros, criopreservados em meio de congelação suplementado com diferentes concentrações de ácido oleico (50 μM e 100 μM) e ácido palmítico (50 μM e 100 μM), avaliados pelo teste de termorresistência (TTR).....</p>	81
CAPÍTULO III	
<p>Tabela 1 - Motilidade total (%) e vigor (1 - 5) pós-descongelação de espermatozoides bovinos, criopreservados sobre a adição de diferentes concentrações (10 μM e 50 μM) de eugenol, avaliados pelo teste de termorresistência (TTR)....</p>	100
<p>Tabela 2 - Integridade da membrana plasmática, e Integridade da membrana acrossomal pós-descongelação de sêmen criopreservado de touros, sobre a adição de duas diferentes concentrações (10 μM e 50 μM) de eugenol.....</p>	101
<p>Tabela 3 - Parâmetros da cinética espermática e funcionalidade da membrana plasmática, na pós-descongelação de doses seminais bovinas diluídas em TRIS-gema e suplementada com diferentes concentrações (10 μM e 50μM) de eugenol.....</p>	102

LISTA DE FIGURAS

REVISÃO DE LITERATURA	Pág.
Figura 1 - Características gerais da cabeça do espermatozoide de rato e coelho. As principais regiões da cabeça dos espermatozoides é a região acrossômica e a região pós-cromossômica.....	20
Figura 2 - Cadeia de transporte de elétrons mitocondrial.....	26
CAPÍTULO I	
Figura 1 - Quantificação de MDA e GSH em sêmen pós-criopreservado de touros, de duas diferentes raças.....	62
Figura 2 - Taxa de fertilização <i>in vitro</i> de bovinos utilizando sêmen criopreservado em TRIS-gema, de duas diferentes raças (Nelore e CPD).....	62
CAPÍTULO II	
Figura 1 - Quantificação de MDA em sêmen pós-criopreservado de touros suplementados com diferentes concentrações de ácido oleico (50 µM e 100 µM) e ácido palmítico (50 µM e 100 µM).....	82
Figura 2 - Quantificação de GSH em sêmen pós-criopreservado de touros suplementados com diferentes concentrações de ácido oleico (50 µM e 100 µM) e ácido palmítico (50 µM e 100 µM).....	83
CAPÍTULO III	
Figura 1 - Quantificação da lipoperoxidação da membrana espermática (MDA) em sêmen pós-criopreservado de touros, suplementados com diferentes concentrações (10 µM e 50 µM) de eugenol.....	103
Figura 2 - Quantificação de GSH em sêmen pós-criopreservado de touros, suplementados com diferentes concentrações (10 µM e 50 µM) de eugenol	104
Figura 3 - Taxa de fertilização <i>in vitro</i> em bovinos utilizando sêmen criopreservado em TRIS-gema, suplementado com diferentes concentrações (10 µM e 50 M) de eugenol.....	104

LISTA DE ABREVIACÕES

µl – Microlitro

µM – Micromol

DIC – Diacetato de carboxifluoresceína

DNA – Ácido desoxirribonucleico

mtDNA – Ácido desoxirribonucleico mitocondrial

IP – Iodeto de propídio

JC-1 – Iodeto de tetraetilbenzimidazolil carbocianina

mL – Mililitro

MP – Membrana plasmática

°C – Graus Celsius

LPO – lipoperoxidação

GSH – Glutathiona reduzida

SOD – Peroxido dismutase

CAT – Catalase

CPD – Curraleiro Pé-Duro

GPx – Glutathiona-Peroxidase

AGPI – Ácidos graxos polinsaturados

VIG – Vigor

MOT – Motilidade total

MP – Motilidade progressiva

O⁻² - Ânio Superoxido

OH⁻ - Radical Hidroxila

HO⁻² – Hidroperoxila

H₂O₂ – Peróxido de Hidrogênio

% - Porcentagem

ROS – Espécies reativas ao oxigênio

RESUMO

Objetivou-se avaliar e comparar as características de qualidade de sêmen criopreservado das raças de touros, Nelore e Curraleiro Pé-Duro, como também os efeitos da suplementação de diferentes concentrações de ácido oleico (50 μ M e 100 μ M), ácido palmítico (50 μ M e 100 μ M), e eugenol (10 μ M e 50 μ M), no diluidor TRIS-gema para a criopreservação de espermatozoides Curraleiro Pé-Duro. Foram utilizados vinte ejaculados de quatro touros Curraleiro Pé-Duro, e vinte ejaculados de quatro touros Nelore, após as coletas o sêmen foi diluído em TRIS-Gema e separado de acordo com cada raça e seus respectivos tratamentos. Posteriormente as amostras foram envasadas em palhetas de 0,25ml e criopreservadas. As palhetas foram mantidas em equilíbrio por 60 minutos a 5°C, para então serem criopreservadas em protocolo padrão de criopreservação com uso da máquina TK 3000®, e armazenadas em botijão criogênico. Após 30 dias foram realizadas as análises pós-criopreservação. As avaliações espermáticas incluíram os testes de termorresistência, integridade e funcionalidade das membranas espermáticas, cinética espermática, morfologia, quantificação da lipoperoxidação espermática, quantificação de glutathiona reduzida (GSH), e teste de fertilidade in vitro. Observou-se que a raça Curraleiro Pé Duro apresentou melhores resultados para morfologia espermática e quantificação de MDA, enquanto que a raça Nelore obteve melhores taxas de fertilização. A suplementação de 100 μ M de ácido palmítico aumentou o percentual de linearidade e WOB dos gametas, no entanto reduziu a ALH. Foi observado redução na membrana acrossomal intacta no grupo controle, quando incubados a 180 minutos e comparados ao tempo de 60 minutos. O ácido palmítico a 50 μ M reduziu as membranas plasmática íntegras no tempo de 180 minutos comparado ao tempo 0 minutos. A quantidade de MDA foi menor nos tratamentos com ácido palmítico a 50 μ M e 100 μ M e ácido oleico 50 μ M, quando comparado ao grupo controle. A atividade da enzima Glutathiona reduzida (GSH) foi elevada em meio com ácido palmítico 50 μ M e 100 μ M e ácido oleico 100 μ M, quando comparados ao controle. Os diferentes tratamentos não influenciaram na taxa de clivagem. Quanto a suplementação de eugenol as concentrações de 50 μ M diferiu significativamente ($p < 0,05$) dos demais tratamentos, induzindo um aumento na quantificação de GSH, uma redução na determinação de MDA, um aumento no VSL, preservando a integridade das membranas plasmática e acrossomal. Em conclusão, o sêmen criopreservado da raça Curraleiro Pé Duro se mostrou viável ao processo de criopreservação, com baixas alterações morfológicas de peça intermediária e reduzido estresse oxidativo. A suplementação de 100 μ M de ácido palmítico ao diluidor TRIS-Gema, preservou a viabilidade do sêmen criopreservado de bovino, e o Eugenol foi eficiente em reduzir o estresse oxidativo espermático, além de preservar a integridade da membrana acrossomal ao longo do tempo de incubação, sem, no entanto, melhorar nenhum dos parâmetros cinéticos avaliados.

PALAVRAS- CHAVES: Ácidos oleico, Ácido palmítico, Bovino, Cinética espermática, Espécies reativas ao oxigênio, Espermatozoides, Eugenol.

ABSTRACT

The objective of this study was to evaluate and compare quality characteristics of cryopreserved bulls semen, Nelore and Curraleiro Pé-Duro breeds, and effects of different concentrations of oleic acid (50 μ M and 100 μ M), palmitic acid (50 μ M and 100 μ M), and eugenol (10 μ M and 50 μ M) supplementations, in TRIS-Gema extender of Curraleiro Pé-Duro sperm cryopreservation. Twenty ejaculates from four Curraleiro Pé-Duro bulls and twenty ejaculates from four Nelore bulls were used. After collection the semen was diluted in TRIS Gem and separated according to each breed and their respective treatments. Subsequently samples were filled into 0.25 ml straws and cryopreserved. The pellets were maintained in equilibrium at 5 °C for 60 minutes, to then be cryopreserved in standard cryopreservation protocol using TK 3000® machine, to then be stored in cryogenic cylinder. After 30 days post-cryopreservation analyzes were performed. Sperm evaluations included thermoresistance, integrity and functionality tests of spermatid membranes, spermatid kinetics, morphology, quantification of sperm lipoperoxidation, quantification of reduced glutathione (GSH), and in vitro fertility test. It was observed that CPD breed presented better results for sperm morphology and quantification of MDA, while Nelore breed obtained better fertilization rates. Palmitic acid supplementation of 100 μ M increased percentage of linearity and WOB of gametes, however it reduced HLA. Reduction in intact acrosome membrane presented in control group was observed when incubated at 180 minutes and compared when incubated at 60 minutes. Palmitic acid at 50 μ M reduced intact plasma membrane at 180 minutes compared to the time at 0 (zero) minutes. The amount of MDA was lower in treatments with 50 μ M and 100 μ M palmitic acid and 50 μ M oleic acid when compared to control group. Reduced Glutathione (GSH) activity was increased in medium with 50 μ M and 100 μ M palmitic acid and 100 μ M oleic acid when compared to control. Different treatments did not influence the rate of cleavage. As regards eugenol supplementation, concentrations of 50 μ M differed significantly ($P < 0.05$) from others treatments, inducing an increase in GSH quantification, a reduction in MDA determination, an increase in VSL, preserving plasma and acrosome membranes integrity. In conclusion, cryopreserved semen of Curraleiro Pé Duro breed proved viable to cryopreservation process, with low morphological alterations of intermediate part and reduced oxidative stress. The supplementation of 100 μ M palmitic acid to TRIS-Gema diluent preserved viability of cryopreserved bovine semen and Eugenol was efficient in reducing sperm oxidative stress and preserving the integrity of acrosomal membrane throughout incubation time, without, however, improving any of the kinetic parameters evaluated.

KEYWORDS: Oleic acids, Palmitic acid, Bovine, Sperm kinetics, Oxygen reactive species, sperm, Eugenol.

1 INTRODUÇÃO

A aplicação de tecnologias reprodutivas na bovinocultura tem proporcionado melhores resultados neste setor produtivo, permitindo que animais de alto valor genético produzam mais descendentes, uma vez que tais medidas possibilitam o aumento do diferencial de seleção, e a redução do intervalo entre gerações (NTEMKA, 2016; BALDASSARRE et al., 2004).

O emprego das biotécnicas como a inseminação artificial (IA), somada a um sistema apropriado para avaliação de touros (testes de progênie), oferece condições simples e eficiente na disseminação genética, inclusive na transposição de barreiras geográficas (BALDASSARRE et al., 2004). No entanto alguns fatores podem interferir nestes resultados, como por exemplo, a capacidade de fertilização do sêmen, devido as alterações na morfologia, na integridade e na funcionalidade espermática reduzindo os índices reprodutivos (SIKKA, 1996).

Com o emprego da IA, a utilização de sêmen criopreservado ficou cada vez mais rotineiro, diante das práticas de manejo e manipulação do sêmen, como também pela possibilidade de diversos métodos de criopreservação. Entretanto, esta técnica é capaz de induzir crioinjúrias seminais em touros provocando uma redução nas características *in vitro* e na fertilidade dos espermatozoides, devido aos danos nas membranas (ABAVISANI et al., 2013; YOSHIDA, 2000).

A membrana plasmática é uma estrutura altamente dinâmica que regula não apenas as trocas extracelulares, mas também o processo de fertilização (FLESH e GADELLA, 2000), e quando submetida ao decresce de temperatura na etapa de resfriamento do processo de criopreservação, suas propriedades físicas são alteradas (HAMMERSTEDT et al., 1990; WATSON, 1995; KANDELOUSI et al., 2013). Além disso, a criopreservação desencadeia um desequilíbrio no sistema redox, aumentando a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) fisiológica (BILODEAU et al., 2002), formadas a partir de reações ocorridas na presença de oxigênio (FERREIRA e MATSUBARA, 1997), em espermatozoides, morfológica ou funcionalmente anormais (AITKEN, 1995; BAUMBER et al., 2002).

Os espermatozoides e o plasma seminal possuem um sistema antioxidante composto por catalase (CAT), peróxido de glutatona (GPx) e superóxido dismutase (SOD) como os principais fatores enzimáticos antioxidantes (BILODEAU et al. 2000; MEISTER, 1994). No entanto, como consequência da produção desordenada das ROS nas membranas lipídicas espermáticas pode ocorrer o fenômeno de lipoperoxidação (LPO), caracterizado pela oxidação dos ácidos graxos poliinsaturados (AGPI) (DEVASAGAYAM; BOLOOR; RAMASARMA, 2003).

Neste contexto, o interesse por substâncias capazes de melhorar as defesas antioxidantes de sistemas biológicos bem como o combate a alta produção das ROS, é crescente. Assim Sampaio et al. (2015), observou que a adição de ácidos graxos poli-insaturados e/ou colesterol, e compostos naturais com potencial antioxidante, ou mesmo lipídios específicos é benéfica para espermatozoides, por conferir maior proteção durante o processo de criopreservação.

Os ácidos oléicos e palmíticos, e o composto eugenol, também tem sido reportado como substâncias de caráter antioxidativo. Marti et al. (2008) verificou que o ácido oléico aumentou a motilidade e a viabilidade espermática, após sua suplementação na criopreservação do sêmen ovino. Por sua vez o ácido palmítico e mirístico dentro dos fosfolípidos podem ser oxidados para produção de energia (SCOTT e DAWSON, 1968). De acordo com Gülçin, (2007) o eugenol inibiu a peroxidação lipídica apresentando atividade antioxidante poderosa na eliminação de radicais. No entanto, ainda não existem evidências e estudos relativos a atividade antioxidante do eugenol, na criopreservação espermática de touros.

Neste cenário, devido à necessidade de manutenção da viabilidade espermática é fundamental a ampliação dos conhecimentos relacionados aos procedimentos de criopreservação do sêmen, associada a estudos que evidenciem o grau de invasividade nas amostras de sêmen dos reprodutores bovinos, pós-criopreservação, com a finalidade de aumentar a capacidade fertilizante dessas células. Por conseguinte, o objetivo dessa pesquisa foi avaliar a adaptação do sêmen da raça Curraleiro Pé-Duro a protocolo padrão de criopreservação para a raça Nelore, além de avaliar os efeitos dos ácidos oléico, palmítico e eugenol no diluidor de criopreservação de espermatozoides bovino, sobre a qualidade seminal.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 *Bos taurus taurus* x *Bos taurus indicus*

Os bovinos são animais de grande porte, distribuídos em todos os continentes, descendentes de um único tronco filogenético, o qual deu origem ao *Bos primigenius*, que a partir de então originou todos os bovinos domésticos atuais (SANTIAGO, 1986).

As raças bovinas podem ser separadas em dois grupos principais, taurinos (*Bos taurus*) e zebuínos (*Bos indicus*), considerado por muitos autores como subespécies *Bos taurus taurus* e *Bos taurus indicus* (MEIRELLES et al., 1999).

Historicamente, os *Bos taurus taurus* a partir do gado ibérico foram introduzidos no continente americano nos primórdios da colonização, se naturalizando neste território,

garantindo o fornecimento de leite, carne, de locomoção e tração de veículos para a população local. Os primeiros registros de bovinos datam de 1524, se dispersando na América do Sul nos 40 anos seguintes. No Brasil, registrou-se o primeiro aparecimento bovino em 1534 (PRIMO, 1992).

Os registros das primeiras importações de Zebus para a América do Sul datam do século XIX e estão até o século XX, desta forma, acredita-se que cerca de 7 mil animais tenham sido trazidos por criadores brasileiros durante várias importações até a década de 1960, constituídos na maioria dos machos da sub-continência indiana. (MEIRELLES et al., 1999).

O gado Curraleiro Pé-Duro (*Bos taurus*), denominado pela sua comercialização a partir de “currais” (CARVALHO, 2015), é produto da seleção natural que ocorreu em vários ecossistemas, de cruzamento entre várias raças e populações que originaram as diferentes raças locais de gado encontradas atualmente no território nacional (FIORAVANTI et al., 2011). A perda da diversidade genética inicial, da concentração e a fixação das características específicas, remeteu a formação desta raça (MARIANTE e EGITO, 2002).

As raças localmente adaptadas apresentam riqueza alélica significativamente mais alta do que raças especializadas e zebuínas. No entanto o número extremamente reduzido de animais, especialmente o pequeno número de reprodutores, além da distância geográfica entre os rebanhos tornaram-se fatores limitantes para a troca de material genético e está levando a um processo de endogamia nos núcleos de conservação (EGITO, 2007).

O potencial da raça Curraleiro Pé-Duro para o turismo rural e o gastronômico, o uso em áreas de Reserva Particular de Patrimônio Natural (RPPN), além de uma opção pecuária para indígenas e quilombolas, traz novas perspectivas para as estratégias que visam à preservação e expansão da raça, através do uso das inovações e biotécnicas empregada em sua cadeia produtiva (FIORAVANTI et al., 2015).

Todavia concomitante ao desenvolvimento do gado taurino, o gado zebuínio despertou interesse em núcleos de criadores brasileiros, que ansiavam por modificações no tipo de gado existente aqui (SILVA, 1947). Portanto, o zebu brasileiro pode ser separado em duas grandes populações: animais puros de origem importada (POI) oriundos do acasalamento de machos e fêmeas zebuínas importadas da Índia, e animais puros de origem (PO), descendentes dos mesmos machos zebuínos importados, mas cruzados com fêmeas taurinas (MEIRELLES et al., 1999).

Os zebuínos neste aspecto se mostraram promissores, uma vez que historicamente estes evoluíram nos trópicos, apresentando resistência a altas temperaturas, a doenças tropicais, a grandes variações na disponibilidade dos nutrientes e ao alto desafio de parasitas internos e externos (FRISCH, 2004), e mesmo não possuindo um intervalo de gerações considerado curto,

responde bem às biotécnicas empregadas para o seu melhoramento genético (ASSIS, 2007).

Dentro desta perspectiva, o avanço nos sistemas de produção e o estudo sobre as espécies bovinas e suas condições reprodutivas, visam um aumento e melhoria na qualidade dos rebanhos, e na determinação dos aspectos qualitativos do sêmen, que constitui um processo crítico na tomada de decisões para a seleção de reprodutores. Partindo desta visão, tem se buscado resultados promissos, a partir de testes laboratoriais mais específicos com o objetivo de elucidar a funcionalidade espermática (RODRIGUES, 2009).

2.2 Estrutura espermática

Em meados do século XVII, os naturalistas da época que buscavam o entendimento do processo de reprodução animal, através de observações microscópicas puderam observar o gameta feminino e o gameta masculino, outrora chamado de "animalícula", pelo seu descobridor, o cientista Van Leeuwenhoek (PESCH e BERGMANN, 2006).

As discussões acerca dos gametas e do embrião fez com que surgissem duas correntes, a ovista e a espermista, ambas acreditavam que o embrião estava contido no ovo, porém os ovistas supunham que durante a cópula o sêmen despertaria o coração do embrião adormecido no ovo, dando início ao processo de desenvolvimento. Para os espermistas, durante a cópula, o embrião contido no espermatozoide entraria no ovo e passaria a receber estímulo e alimento para se desenvolver (COLUCCI, 2006).

Em 1824, autores como J.L. Prevost, J.B. Dumas, Oscar Hertwig e Herman Fol, descobriram que os espermatozoides eram agentes ativos da reprodução e observaram a penetração do espermatozoide no oócito e a união do núcleo destas células (COLUCCI, 2006).

Os estudos e as avaliações da morfologia espermática evoluíram ao longo dos anos, os diversos métodos e análises utilizadas para observação do sêmen foram fundamentais afim de determinar sua estrutura celular e os aspectos inerente a sua produção, sendo geralmente aceito que tais células são formadas no interior dos túbulos seminíferos dos testículos (PESCH e BERGMANN, 2006).

Os espermatozoides mamíferos são células alongadas, e são formados por uma uma cabeça contendo um núcleo achatado e de forma oval com a cromatina altamente condensada com a sua extremidade anterior recoberto pelo acrossoma, e uma cauda composta de colo e peças intermediária, principal e terminal, necessário para a motilidade celular (HAFEZ e HAFEZ, 2004).

Os espermatozoides bovinos apresentam cerca de 75 a 90 μm de comprimento, com a cabeça medindo cerca de 4,25 μm de largura, 9,15 de comprimento e 0,5 μm de espessura, recoberto pela membrana plasmática, constituída por proteínas e lipídios. (PESCH e BERGMANN, 2006).

Tabela 1. Comprimento (μm), tamanho da cabeça, parte intermédia e peça principal de espermatozoide, nas diferentes espécies mamíferas, modificada de acordo com Pesch e Bergmann (2006)

Espécies	Comprimento	Cabeça		Peça intermediária		Peça principal	
		Comprimento	Largura	Comprimento	Largura	Comprimento	Largura
Homem	50 – 60	3,4 – 4,6	1,5 – 2,8	3,5 – 5,0	0,8 – 0,6	44 – 50	0,5 – 0,4
Equino	60	5,0	2,4	8,0	0,5	30	0,49
Bovino	75 – 90	9,15	4,25	14,84	0,67	50	0,51
Caprino	50 – 60	8,5	4,25	10,0	-	30	-
Ovino	70 – 80	8,2	4,25	14,0	0,8	45	0,5

Os espermatozoides possuem estruturas as quais lhes permitem realizar as mais diversas funções para alcançarem o propósito de sua produção, a fertilização do oócito. Durante seu percurso no trato reprodutivo feminino, cada estrutura interage com o meio, desta forma as enzimas do acrossoma e suas membranas, serão essenciais para a fertilização oocitária, assim como a motilidade espermática, alcançada mediante a energia produzida pelo flagelo. Tais eventos serão necessários para a junção dos pronúcleos haploides, masculino e feminino, no processo de fertilização, acarretando na produção do zigoto, o qual por diante iniciará seu desenvolvimento. (KELLY e TRASLER, 2004).

Durante o processo de formação espermática, o gameta masculino, sofre inicialmente mitose e posteriormente meiose. Esta última é crucial para o desenvolvimento dos espermatozoides. Esta fase é caracterizada por extensa remodelação das espermátides, pela formação do acrosoma, condensação nuclear, desenvolvimento flagelar e perda da maioria do citoplasma. Esses eventos resultam em uma célula altamente diferenciada em estrutura e função, totipotente ao desenvolvimento e capaz de penetrar no oócito (EDDY, 2006).

2.2.1 Membrana Plasmática

A membrana plasmática é uma estrutura fina, flexível, semipermeáveis aos solutos polares, que envolve todo o espermatozoide, dando sustentação as organelas e componentes

intracelulares, define os seus limites e mantém as diferenças entre o citosol e o ambiente extracelular (AMANN e GRAHAM, 1992; ALBERTS et al., 2004). A membrana possui proteínas específicas as quais facilitam o transporte de glicose e de frutose do meio extracelular para o espermatozoide (SCHURMANN et al., 2002).

O estudo sobre a organização e composição da membrana espermática varia entre as diferentes regiões da superfície do espermatozoide, levando ao entendimento de que a membrana plasmática é subdividida em domínios regionais, que refletem as funções de componentes superficiais e citoplasmáticos de espermatozoides (EDDY, 2006).

Na cabeça dos espermatozoides os principais domínios da membrana plasmática são: Acrosomal (cabeça anterior) e região pós acrosomal (cabeça posterior) (Fig. 1).

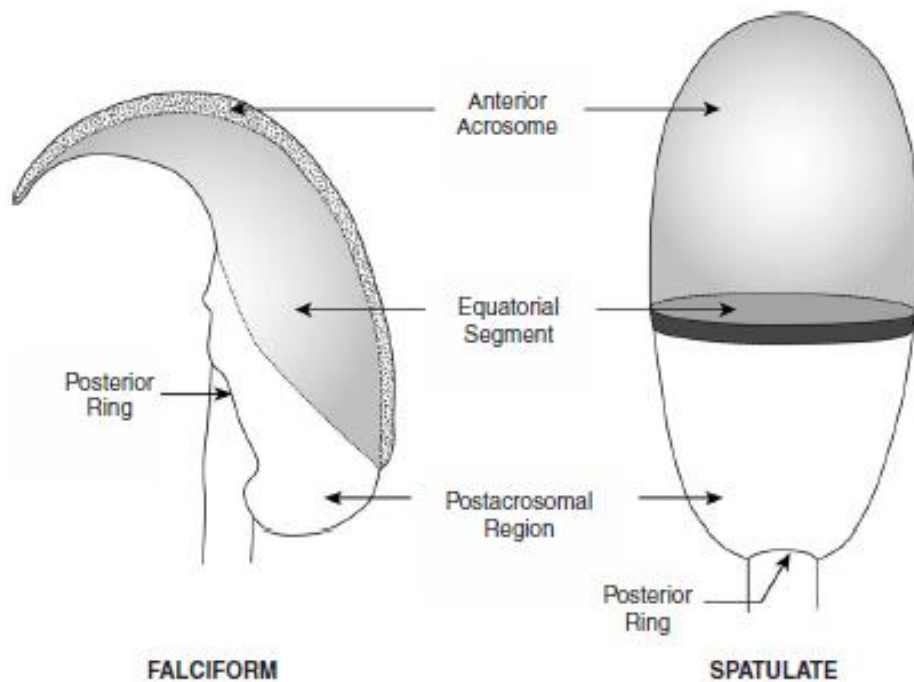


FIG. 1. Características gerais da cabeça do espermatozoide de rato e coelho. As principais regiões da cabeça dos espermatozoides é a região acrossômica e a região pós-cromossômica. A região acrossomal da cabeça do espermatozoide de camundongo em forma de falciforme tem um acrossoma anterior relativamente pequeno em comparação com a cabeça espermática de coelhos. No entanto, o segmento equatorial do espermatozoide de rato é mais expansivo do que a mesma região no espermatozoide de coelho. A região pós-acrossomal é aquela porção do cabeça de espermatozoide não coberta pelo acrossoma. O anel posterior define o limite entre o domínio pós-acrossomal da cabeça e a peça de conexão. Fonte: (EDDY, 2006)

A região acrosomal geralmente pode ser subdividida em: (a) domínio do segmento marginal (segmento apical, banda anterior, borda periférico) sobre a margem anterior do acrosoma, (b) domínio do segmento principal (domínio acrosomal anterior) sobre a maior parte

do acrosoma, e (c) domínio do segmento equatorial (domínio acrosomal posterior) sobre a parte posterior do acrosoma (BEARER, 1960).

As regiões acrossomal e pós-acrossomal é delimitada pelo anel subacrossomal. Por sua vez o anel posterior dividi a cabeça do flagelo espermático, protegendo os compartimentos citoplasmáticos das duas porções principais do espermatozoide (EDDY, 2006)

A membrana plasmática do flagelo é dividida em domínio da peça intermediária, domínio da peça principal e domínio da peça terminal (EDDY, 2006). Os domínios das peças, intermediária e principal são separados por um anel fibroso que é um componente do citoesqueleto flagelar e está intimamente ligado ao interior da superfície da membrana plasmática (TOSHIMORI, 1998).

A característica de mosaico fluído da membrana plasmática tem papel fundamental no equilíbrio das reações celulares e eventos que antecedem a fertilização. Estruturalmente a membrana plasmática é constituída por uma bicamada lipídica, com proteínas associadas, contendo moléculas de fosfolípidios polares, distribuídas assimetricamente, e propriedades anfipáticas, todas orientadas de maneira que a porção hidrofílica se dirige para a superfície da membrana, embora exista diferença considerável entre as espécies de mamíferos (COOPER, 1996).

Dentre algumas proteínas observadas na membrana plasmática, as proteínas do canal de cálcio, ex. CatSper1 e CatSper2, estão envolvidas na regulação da homeostase de cálcio necessária para várias funções espermáticas, apresentando alta tensão ativada na regulação da entrada de Cálcio (EDDY, 2006).

A composição lipídica da membrana plasmática apresenta grande quantidade de ácidos graxos poli-insaturados, especialmente dipoliinsaturados (fosfolípidos esterificado com dois ácidos graxos poli-insaturados), que é encontrado apenas no sêmen, retina e certas áreas do cérebro (LADHA, 1998).

Os ácidos graxos poliinsaturados auxiliam na fluidez e flexibilidade da membrana, de tal forma que a composição lipídica da membrana tem sido relacionada a suas funções específicas, porque promove a criação de microdomínios com fluidez diferente, fusogenicidade e características de permeabilidade, importante no processo de fertilização oocitária (MEIZEL e TURNER, 1983).

O padrão lipídico definitivo dos espermatozoides ejaculados é atingido apenas após a maturação epidídimica, isso por que durante este evento os espermatozoides sofrem diversos processos bioquímicos capaz de rearranjar a estrutura da bicamada lipídica, e em ruminantes

cumina com redução do conteúdo lipídico durante a maturação epididimária (AVELDAÑO, et al., 1992).

Os principais lipídios encontrados na membrana plasmática dos espermatozoides são assimétricos na sua distribuição nas duas faces da bicamada, na face externa encontra-se a esfingomiéline e fosfatidilcolina, já na face interna, região citoplasmática, encontram-se fosfatidiletanolamina, fosfatidilserina, fosfatidilinositol (LEHNINGER et al., 2000), os quais conferem à membrana maior fluidez. Entretanto esta característica será dependente da composição e da temperatura, uma vez que a mudança de estado líquido para gel em membranas com maior proporção de lipídios de cadeia insaturada ocorre em temperaturas menores. (ALBERTS et al., 1997).

A composição lipídica nas células espermáticas varia de espécie para espécie, sendo a plasmalogencolina o principal fosfoglicerídio dos espermatozoides de bovinos (SCOTT, 1973). O principal ácido graxo poliinsaturado dos fosfolipídios colina é o ácido docosa-hexaenoico (22:6), enquanto da fração fosfolipídica etanolamina o ácido linoleico (18:2) é o principal ácido graxo insaturado. Durante o remodelamento da maturação espermática ocorre aumento na proporção de ácidos graxos poli-insaturados dos espermatozoides, devendo ter efeito pronunciado nas propriedades físicas e químicas da membrana lipoproteica (VANDENHEUVEL, 1971). Assim, qualquer mudança que ocorra em cada fosfolipídio, ou na composição de seus ácidos graxos, altera a estrutura e a função da membrana dos espermatozoides (KHOSRO BEYGI e ZARGHAMI, 2007).

2.2.2 Cabeça

Os espermatozoides mamíferos possuem cabeça constituída de acrossoma e núcleo, contornado por quantidades moderadas dos componentes do citoesqueleto e do citoplasma. O núcleo é haploide, contendo somente um membro de cada par cromossômico, e a cromatina se torna altamente condensada durante a última fase da espermatogênese, (EDDY, 2006). O ácido desoxirribonucleico (DNA) condensado, e as histonas de ligação, são parcialmente substituídos durante a espermiogênese por protaminas.

O núcleo contém a cromatina condensada com a informação genética. A forma do núcleo é específica da espécie e geralmente é achatada dorso ventralmente; o contorno tende a ser oval ou falciforme (BEDFORD e CALVIN, 1974). No entanto na região do pescoço, há uma pequena área de cromatina não condensada, sendo possível transcrição, tradução e proteína-biossíntese (DADOUNE et al., 2004; MILLER et al., 2005).

O acrossoma origina-se do complexo de Golgi, durante a espermatogênese, e situa-se na cabeça espermática, como um tampão sobre o núcleo, se justapõem a extremidade anterior do núcleo e os componentes do citoesqueleto no espaço estreito entre o acrosoma e o núcleo e entre o acrosoma e a membrana plasmática, apresentando-se achatado no plano do eixo anterior-posterior do espermatozoide, simétrico ao núcleo (PESCH e BERGMANN 2006).

Os espermatozoides apresentam variações de especificidade e forma entre as espécies. Na cabeça o acrossoma se estrutura recobrimdo o seu primeiro dois terços. As suas membranas, interna e externa, se fundem em sua parte distal. (FAWCETT, 1970). Enzimas hidrolíticas como acrosina, hialuronidase e muitas outras hidrolases e esterases, estão presentes no acrosoma, sendo essenciais para a lise da zona pelúcida e penetração de corona radiata do oócito. Elas são liberadas durante a reação acrossômica quando a membrana exterior acrosomal se funde com a membrana plasmática (ROVAN, 2001)

O acrossoma pode ser subdividido em três diferentes segmentos: (a) a margem anterior que é o segmento apical, (b) o segmento de volta sobre a metade anterior que é denominado de principal segmento e (c) a porção caudal da tampa que é o segmento equatorial. A junção entre o segmento principal e o segmento equatorial é marcada por uma diminuição abrupta da espessura da capa acrossomal e um aumento considerável na densidade de seu conteúdo. Entre o acrossoma e o núcleo há um pequeno espaço sub acrossomal com conteúdos amorfos de baixa densidade, sua função é de ligar o acrossoma ou núcleo subjacente como uma camada adesiva (FAWCETT, 1970).

O acrossoma se conecta ao flagelo através da fossa de implantação da região da cabeça com a região flagelar, que serve como a fixação da cabeça para o “capítulo” da região flagelar. (PESCH e BERGMANN, 2006).

2.2.3. Colo

O colo espermático é um segmento que permite a conexão da cabeça com o flagelo, e está ligado anteriormente à placa basal, uma densa placa aderente ao exterior da membrana nuclear do envelope nuclear, e posteriormente às fibras densas externas do flagelo, apresentando aproximadamente 1µm de comprimento, variando também em relação a sua forma, que é alongado no eixo transversal da cabeça (EDDY, 2006; PESCH e BERGMAN, 2006).

O colo é composto por uma estrutura fibrosa densa e por colunas segmentadas. Em espermatozoides maduros observa-se centríolos na região proximal do colo, estando ausentes na região distal (PESCH e BERGMAN, 2006)

Os centríolos distais funcionam como base para o flagelo durante sua formação no início da espermiogênese. As proteínas fibrosas diferenciam-se em torno do centríolo nas espermátides, formando posteriormente duas colunas principais e cinco menores. Posteriormente as duas principais colunas serão divididas em dois, completando nove colunas de diâmetro semelhante, com nove fibras densas externas flagelo na junção do colo e da peça intermediária (PESCH e BERGMAN, 2006).

Estudos de fratura por congelamento indicam que a membrana do envelope nuclear que reveste a fossa de implantação contém uma população densa de grandes e regularmente partículas intramembranas espaçadas em torno de uma região livre de partículas centrais (EDDY, 2006).

Filamentos finos atravessando a estreita região entre o colo e a placa basal presumivelmente são responsáveis por anexar o capítulo do flagelo à placa basal da cabeça (STACKPOLE e DEVORKIN, 1974).

2.2.4 Flagelo

O flagelo se conecta com a cabeça espermática, sendo a parte mais longa do espermatozoide de mamíferos, estando envolvido com a motilidade celular. Morfologicamente o flagelo consiste em quatro segmentos distintos: a peça de ligação (pescoço) da cabeça com o flagelo, a peça intermediária, a peça principal e a peça da extremidade. Os principais componentes estruturais internamente ao flagelo são o axonema, a bainha mitocondrial, as fibras densas exteriores, e o revestimento fibroso, (ZAMBONI e STEFANINI, 1971), uma estrutura especializada do citoesqueleto (TURNER, 2006).

O flagelo dos espermatozoides mamíferos, apresenta formato cilindro e delgado, são compridos, com tamanho médio que varia de 50-100 μm de comprimento e 0,5 a 1 μm de diâmetro, e apresentam uma estrutura principal de 200 nm de diâmetro chamado de axonema (GIBBONS, 1981). Este é composto por 9 microtúbulos duplos de aproximadamente 20 nm de diâmetro que constitui a periferia de um cilindro cujo centro é ocupado por dois microtúbulos centrais, sendo todo o complexo denominado de 9 + 2 (GIBBONS, 1981).

Nos mamíferos observa-se a presença de componentes adicionais complementares ao axonema, esses componentes são denominados de fibras densas exteriores e os elementos de revestimento fibroso, que são adicionados em paralelo com os axonema durante o processo de espermatogênese (NICASTRO et al., 2006).

A bainha mitocondrial caracteriza a porção intermediária do flagelo espermático, medindo cerca de 5mm, e rodeia o complexo axonêmico e as nove fibras densas externas (PESCH e BERGMANN, 2006).

As mitocôndrias são organelas subcelulares eucarióticas com papéis fundamentais na síntese de ATP, morte celular programada, e envelhecimento (LILL e KISPAL, 2000). As mitocôndrias carregam o remanescente de um genoma de α -proteobacteriana (PESOLE et al., 2012). Esses genes codificam as subunidades centrais da cadeia de transporte de elétrons respiratórios, que gera ATP por meio da fosforilação oxidativa (Fig.2) (MITCHELL, 1961).

As mitocôndrias são organizadas em giros, geralmente organizadas em trípla hélices no espermatozoide de touro (EDDY, 2006). As mitocôndrias contêm seu próprio DNA (mtDNA), codificando apenas algumas proteínas mitocondriais, sintetizadas pelos ribossomos citosólicos e pós-translacionalmente transportados ou importados para dentro das mitocôndrias, onde eles são classificados para um dos quatro subcompartimentos mitocondriais. (VAN DER LAAN et al., 2010).

As mitocôndrias apresentam uma grande importância para o desempenho dos espermatozoides, uma vez que atuam nas vias metabólicas para a produção de ATP, essencial na cinética espermática, estabelecendo uma correlação positiva entre sobrevivência e o número de mitocôndrias. Espermatozoides com muitas mitocôndrias possuem maior capacidade de sobrevivência (ROVAN, 2001).

A relação produção/consumo energético mitocondrial versus função espermática apresenta diferenças entre as espécies influenciando sobre a produção, passagem e manipulação dos espermatozoides. Uma vez se estabelecendo a medição para processamento e armazenamento espermático, é possível estabelecer meios energéticos para maior viabilidade e longevidade para espermatozoides, reduzindo os danos espermáticos após o processo de criopreservação (MORAES e MEYERS, 2018).

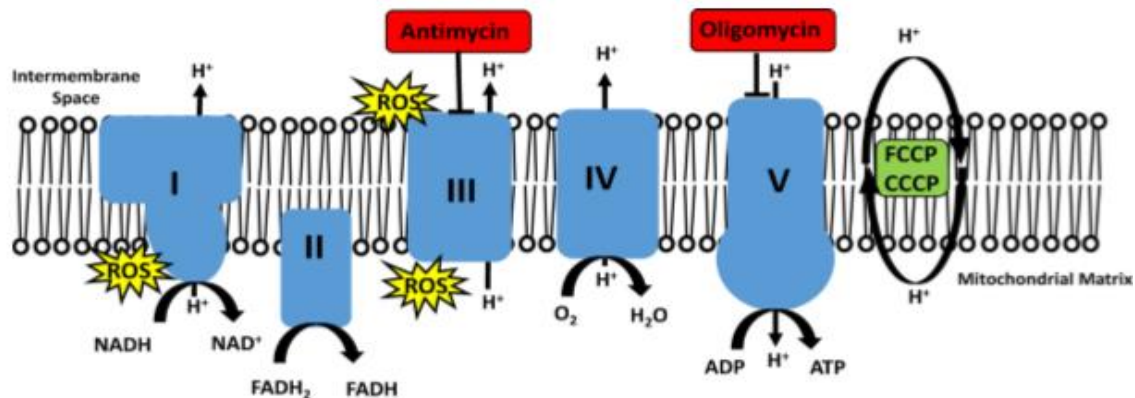


Fig. 2. Cadeia de transporte de elétrons mitocondrial. Os complexos I, III e IV bombeiam prótons para o espaço intermembranar, contribuindo para o gradiente de prótons. Os complexos I e III são as principais subunidades produtoras de ROS, com o superóxido sendo liberado na matriz de ambos os complexos, bem como o espaço intermembranar para o Complexo III. O oxigênio é reduzido a água no Complexo IV, que é o principal passo de consumo de oxigênio da respiração celular. O complexo V, ATP-Synthase, ocorre quando a síntese de ATP pela utilização da força motriz de prótons é criada através da membrana mitocondrial interna. A antimicina é um inibidor específico do Complexo III e a oligomicina é um inibidor da ATP-Sintase. FCCP e CCCP são ionóforos que separam o IMM para induzir a máxima respiração mitocondrial. (MORAES e MEYERS, 2018).

As mitocôndrias possuem dupla membrana: a membrana mitocondrial externa e a membrana mitocondrial interna, que são separadas por um espaço intermembranoso (MANNELLA, 2006). Na membrana mitocondrial externa os íons e a maioria dos metabólitos menores que 10kDa nas mitocôndrias apresentam transito livre entre o meio interno e externo devido a poros proteicos não específicos chamados porinas, presente na membrana (ORTEGA FERRUSOLA et al., 2010; NICHOLLS e FERGUSON, 2013). Na membrana mitocondrial interna, há produção de ATP via fosforilação oxidativa, além do controle do transporte de íons e metabólitos via transportadores, e do estress oxidativo da célula (NICHOLLS e FERGUSON, 2013).

2.3 Biologia redox e as Espécies Reativas

A necessidade de oxigênio (O_2) pelos animais, como insumo para produção eficiente de energia nas mitocôndrias, fez com eles fossem capazes de desenvolver defesas antioxidativas durante sua evolução, que combatessem as características tóxicas deste gás (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2006).

As cianobactérias em seu processo evolutivo começaram a produzir uma maior quantidade de O_2 através da fotossíntese, desta forma passaram a liberar quantidades

significativas de O_2 na atmosfera terrestre, a partir do momento que utilizavam dióxido de carbono e água, para obter glicose através da energia da luz solar (LANE, 2002).

Inicialmente, a maior parte deste O_2 foi consumida para a formação dos depósitos de óxido metálico que existem hoje em rochas e minérios. Posteriormente, o O_2 acumulou -se na atmosfera, de forma vantajosa, uma vez que o aumento do O_2 atmosférico levou à formação do ozônio (O_3), que pode ter ajudado os organismos a deixar o mar e colonizar a terra, e removeu o ferro ferroso (Fe^{2+}) dos ambientes aquosos formando complexos férricos insolúveis (LANE, 2002).

No entanto como foi possível os organismos fotossintéticos produzirem O_2 , sendo ele tóxico? e como as cianobactérias puderam evoluir a fotossíntese em um mundo preantioxidante? Algumas teorias são discutidas, e a tendência mais aceita acredita que provavelmente o Fotossistema II (PSII) tenha evoluído a partir de uma forma contendo manganês da enzima, capazes de catalisar a quebra de H_2O_2 catalase, sugerindo que os precursores evolutivos de PSII usaram H_2O_2 como um substrato e apenas mais tarde evoluiu o aumento da ferocidade química necessária para dividir a água (LANE, 2002 ; OLSON e BLANKENSHIP, 2004).

Hoje certamente sabe-se que o metabolismo oxidativo é um dos pilares da vida aeróbica e utilizar oxigênio em sistemas biológicos está associado à formação de espécies reativas (HALLIWELL, 2006).

Os Radicais livres ou espécies reativas, são qualquer espécie capaz de existência independente que contém um ou mais elétrons não emparelhados, que ocupa um orbital atômico ou molecular por si só. O radical livre mais simples é o hidrogênio, uma vez que um átomo de hidrogênio tem apenas um elétron (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2006).

Os radicais livres em sua maioria são derivados de O_2 , sendo chamados de espécies reativas de oxigênio (ROS) (FERREIRA; MATSUBARA, 1997). De modo geral, as ROS são moléculas que contêm um oxigênio num estado altamente reativo, com uma alta capacidade oxidativa (CARDOSO et al., 2006).

Os radicais livres são produzidos continuamente como parte da função normal das células. Entretanto, o excesso de produção de radicais livres provenientes de fontes endógenas ou exógenas podem acarretar desequilíbrio das funções orgânicas favorecendo ao desenvolvimento de muitas doenças (YOUNG e WOODSIDE, 2001).

A produção fisiológica das ROS ocorre de forma a permitir um equilíbrio na manutenção das funções orgânicas, no entanto desequilíbrios ocasionados por fatores adversos

estimula a formação e a ação maléfica das ROS, em uma variedade de fenômenos biológicos, desde mutação até processos inflamatórios (KHOEN e NYSKA, 2002).

As ROS são formadas pela redução incompleta do oxigênio molecular, que forma H₂O, originando intermediários reativos como: os radicais superóxido (O₂⁻), hidroperoxila (HO₂[°]) e hidroxila (OH[°]) e, o peróxido de hidrogênio (H₂O₂) (FERREIRA e MATSUBARA, 1997), as ROS tal como o H₂O₂ tem sido apontado como agente redutor da motilidade espermática em ratos, homem e touro (BILODEAU et al., 2002).

Os radicais superóxido (O₂⁻), derivam do oxigênio molecular, pela adição de um elétron, caracterizando-se pela pouca reatividade sem capacidade de penetrar as membranas lipídicas, atuando apenas no compartimento onde é produzido. Entretanto são formados em quase todas as células aeróbicas de forma espontânea, e contribuem para a formação de outras ROS, devido a seus efeitos tóxicos (VISHAL e GUPTA, 2005).

Os OH[°] possuem vida curta, tem alto poder radioativo e são os responsáveis pela oxidação de compostos orgânicos (TEIXEIRA e JARDIM, 2004). A sua produção leva a modificações e quebra na ligação das bases nitrogenadas, purinas e pirimidinas, além de também causar lipoperoxidação microsomal, mitocondrial e na membrana celular (VISHAL et al., 2005).

O H₂O₂ é um agente oxidante que tem a capacidade de atravessar membranas lipídicas e, apesar de ser lento, quando se liga ao Fe⁺⁺ nas reações de Fenton ou Haber-Weiss se torna altamente tóxico para as células (FERREIRA e MATSUBARA, 1997), gerando o OH[°], que é considerado o radical livre mais reativo em sistemas biológicos (FERREIRA e MATSUBARA, 1997), causando danos ao DNA e RNA, associado indiretamente com mutação e carcinogênese (VISHAL et al., 2005).

2.3.1 ROS e os danos oxidativos

As células geralmente funcionam em um estado reduzido, sendo necessário algum grau de oxidação localizada, isto por que inúmeros fatores de transcrição de genes requerem oxidação transitória para a sua função (ARUOMA e HALLIWELL, 1987), de modo que poucas quantidades de espécies reativas de oxigênio normalmente podem estimular a proliferação celular (GUTTERIDGE; ROWLEY; HALLIWELL, 1981).

Devido ao seu metabolismo aeróbico, os espermatozoides produzem espécies reativas de oxigênio (ROS) (Aitken, 1995). Podendo os ROS estimular a motilidade hiperativada e a fosforilação da tirosina em várias proteínas associadas à capacitação (de Lamirande et al., 1997). No entanto altos níveis de ROS gerados por leucócitos infiltrados ou espermatozoides

anormais podem sobrecarregar as defesas antioxidantes do plasma seminal, levando à peroxidação de ácidos graxos poliinsaturados de membrana plasmática (LP) e DNA (Aitken e Clarkson, 1987).

A geração das ROS pode ocorrer através de enzimas tais como, a óxido nítrico sintase (NOS) e nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH) oxidase. Podendo haver uma superprodução de ROS decorrente tanto da cadeia mitocondrial de transporte de elétrons, quanto da estimulação excessiva de NADPH, a qual resulta em estresse oxidativo, um processo nocivo que pode ser um importante mediador de danos nas estruturas celulares (VALKO et al., 2007).

O espermatozoide equino usa a NADPH como substrato para geração de superóxido (O_2^-) (SABEUR e BALL, 2006). No entanto, alguns autores, acreditam que uma oxidase, ainda não identificada, localizada na membrana, é a responsável pela produção de O_2^- no espermatozoide (LAMIRANDE e LAMOTHE, 2009).

As principais fontes de ROS no ejaculado são os espermatozoides, nos quais as células inviáveis são capazes de gerar maiores quantidades de espécies reativas. A atividade antioxidante desenvolvida pelas enzimas espermáticas pode estar limitada, devido estarem mais concentradas na peça intermediária, deixando grande parte da membrana que recobre a cabeça e a cauda menos protegida. Valorizando o plasma seminal na importância da proteção do espermatozoide contra os danos oxidativos gerado através do próprio espermatozoide e pelos fagócitos presentes no ejaculado (AITKEN, 1995).

As ROS geradas na cadeia respiratória do espermatozoide, em certa quantidade são necessárias para a função normal das células espermáticas. Quando a produção de ROS excede, o potencial antioxidante destas células pode ser esgotado e levar ao desenvolvimento do estresse oxidativo, que, quanto maior for à exposição dos espermatozoides a estas ROS maiores serão os danos, provocando lipoperoxidação da membrana celular, como também alteração da estrutura dos receptores de proteínas, enzimas, além de afetar a fragmentação do DNA espermático (FRACZEK e KURPISZ, 2005).

A geração de altas concentrações de espécies reativas de oxigênio no sêmen também é atribuída ao declínio no metabolismo de energia do espermatozoide, na motilidade e viabilidade espermática e à desnaturação do DNA em cavalos, touros, carneiros, bodes e homens. Além disso, a presença de lipídios altamente insaturados e uma pequena quantidade de citoplasma, tornando-os suscetíveis aos danos peroxidativos (BILODEAU et al., 2002; VERNET et al., 2004).

Os danos provocados pelas ROS são capazes de induzir a lipoperoxidação (LPO), que é uma deterioração oxidativa dos ácidos graxos polinsaturados (AGPI), formando uma série de produtos tóxicos. As membranas e organelas celulares (mitocôndria, lisossomos e peroxissomos) contêm grande quantidade de AGPI, os quais juntamente com as proteínas compõem os maiores constituintes biológicos de membranas (DEVASAGAYAM et al., 2003).

No entanto, se faz necessário a presença de AGPI nas membranas espermáticas, para uma melhor fluidez e conseqüente viabilidade celular, indispensável à fertilização (DE LAMIRANDE e GAGNON, 1993).

A todo momento, os AGPI sofrem danos, o que pode resultar na redução da motilidade espermática, presumivelmente por uma perda rápida de ATP intracelular, danificando o axonema, e as demais estruturas espermáticas (RAO e GANGADHARAN, 2008).

2.4 Defesas antioxidantes

Pressupondo que o aumento nos níveis de O_2 é crucial para a geração de ROS, é necessário buscar estratégias eficientes capazes de minimizar tais danos, uma vez lembrado, que nos animais a principal fonte de O_2 é, provavelmente, a cadeia transportadora de elétrons. Por sua vez a citocromo oxidase não libera ROS, uma vez que, recebe um elétron de cada uma das moléculas de citocromo c e transfere-os para uma molécula de O_2 , convertendo assim o O_2 molecular em duas moléculas de água (TURRENS, 2003).

A formação de 4-hidroxinonanal dentro de mitocôndrias parece ativar proteínas de desacoplamento, o que deve, em seguida, diminuir o potencial de membrana. As proteínas que se ligam aos íons metálicos (como transferrina, ferritinas e metalotioneínas), lhe conferindo formas diferenciadas, impedem a química de Fenton, além de apresentarem atividade catalítica, estando presente em quase todas as células eucariotas (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1990).

As células espermáticas possuem um sistema de defesa antioxidante enzimático e um não enzimático. O sistema enzimático é composto pelas enzimas: superóxido desmutase (SOD), catalase (CAT), peroxiredoxinas (Prx), glutathione (GSH), glutathione redutase (GR) e glutathione peroxidase (GPx). E a defesa não enzimática, corresponde um grande número de compostos de baixo peso molecular, incluindo as vitaminas C e E, diferentes compostos de selênio, ubiquinonas (coenzima Q), ácido úrico e ácido lipóico (NORDBERG e ARNÉR, 2001).

As defesas antioxidantes endógenas têm como função remover as ROS ou convertê-las em produtos intermediários não tóxicos. Existem várias evidências da atividade protetora dos componentes do sistema antioxidante (FERREIRA e MATSUBARA, 1997), como o combate

da LPO e do apoptose espermático, prevenção as lesões de reperfusão pós-isquemia de coração, rim, fígado e intestino, desempenhada por enzimas como, SOD e CAT (SHAN et al., 2009).

O complexo de SOD juntamente ao manganês (MnSOD) na matriz mitocondrial, e o SODs com cobre e zinco (CuZnSOD) no espaço intermembranar mitocondrial e nos de mais compartimento celular, são importantes para catalisar a dismutação do oxigênio (FRIDOVICH, 1995).

As superóxidos dismutases e redutases devem funcionar em conjunto com enzimas que removem H_2O_2 . As Catalases estão em nenhuma ou em baixa quantidade na mitocôndria, onde grande quantidade de O_2 é gerado (HALLIWELL E GUTTERIDGE, 2006). Os antioxidantes não enzimáticos agem como agente redutor - doador de elétrons, além de se ligarem a moléculas de O_2 que possam ser substrato para formação de ROS, ou seja, de forma geral atuam prevenindo ou minimizando os danos provocados pelas ROS (SILVA, 2010).

Os antioxidantes combatem as ROS em três níveis: prevenção, intercepção e reparação, com objetivo único de proteger as células contra a ofensa oxidativa (AGARWAL et al, 2008).

A atividade antioxidativa da melatonina, hormônio produzido pela glândula pineal, tem sido sugerida que esta seja um eficiente sequestrador de ROS. Alguns estudos relataram que a melatonina in vivo é cinco vezes mais efetiva que a vitamina E para detoxificar OH e duas vezes mais eficaz para neutralizar o radical peroxil ($LOO\bullet$) (REITER et al., 2002).

Com exceção da vitamina E (a-tocoferol), que é um antioxidante estrutural da membrana, a maior parte dos agentes antioxidantes encontra-se no meio intracelular (FERREIRA e MATSUBARA, 1997). Por sua vez a vitamina C proporciona proteção contra a oxidação descontrolada no meio aquoso da célula, devido ao seu alto poder redutor (JAYAPRAKASHA e PATIL, 2007).

A identificação de antioxidantes que sejam capazes de minimizar os danos às células espermáticas durante a criopreservação, é um processo que deve ser bastante estudado, isto porque há variações nas características do ejaculado nas diferentes espécies de acordo com as épocas do ano, além de sofrer influência da idade e da alimentação (CÂMARA e GUERRA, 2011).

2.5 Os ácidos graxos

Os ácidos graxos são moléculas compostas de uma cadeia de hidrocarboneto e um grupamento carboxila, classificados como saturados e insaturados. São formados por fosfolipídio, diglicerídeos e triglicerídeos sendo estes primeiros constituintes primários das

membranas biológicas (HAMES e HOOPER, 1997). Podendo também ser encontrados nas membranas espermáticas, os ácidos palmítico e esteárico (AITKEN e BAKER, 2006).

A composição de ácidos graxos dos espermatozoides tem se mostrado importante para a função espermática, uma vez que incorporados à membrana são importantes para a motilidade dos espermatozoides, a viabilidade espermática e o processo de fusão entre o espermatozoide e o oócito (LEWIS e MACCARRONE, 2009).

Em humanos os espermatozoides contêm alta quantidade de ácidos graxos poliinsaturados (PUFAs), com níveis especialmente altos de ácido docosahexaenóico (DHA, C22: 6 n-3). Estudos mostram que os AGPIs ômega-3 nos espermatozoides e, especialmente, o decosahexaenóico (DHA), modulam a concentração, morfologia e motilidade dos espermatozoides de forma positiva (MARTINEZ-SOTO et al., 2013).

O epidídimo é o órgão responsável pelo processo de maturação e remodelação da membrana espermática. Durante a remodelação, ocorre a absorção de glicoproteínas epididimárias e consumo de fosfolípidos da bicamada de membrana, além da translocação de proteínas e componentes lipídicos (JONES, 1997), necessários para que o espermatozoide adquira mobilidade progressiva e capacidade de fertilizar um oócito (GATTI et al., 2004).

Os ácidos graxos, em especial os fosfolípidos sofrem uma grande redução durante a fase epididimária, os espermatozoides bovinos chegam a perder metade dos seus principais fosfolípidos. Esta perda é necessária, uma vez que a retenção de ácidos graxos (saturados, monoinsaturados e poliinsaturados) indica a imaturidade e/ou defeito espermático (POULOS et al., 1973). Ahluwalia e Holman (1969) estudando a estrutura espermática, observaram que a cauda do espermatozoide mantém mais ácidos graxos poliinsaturados do tipo n-3 do que a cabeça espermática, enquanto que a cabeça possuía uma maior concentração de ácidos graxos poliinsaturados tipo n-6 que as caudas.

Os ácidos graxos ligados aos fosfolípidos nos espermatozoides bovinos também se alteraram durante a migração pelo epidídimo. A maioria das principais espécies de ácidos graxos, incluindo os ácidos palmítico, esteárico, oleico e araquidônico, diminuiu tanto em sua composição percentual quanto em sua concentração absoluta por espermatozoide (POULOS et al., 1973).

O ácido palmítico e o ácido esteárico foram identificadas como os ácidos graxos mais saturados presente no sêmen humano (KOPPERS et al., 2010). Altos níveis de ácidos graxos poliinsaturados tipo n-6, foram encontrados em homens inférteis, apresentando uma relação positiva com a diminuição da concentração espermática, da motilidade e maior contagem de células patológicas (SAFARINEJAD et al., 2010).

No plasma seminal os ácidos graxos docosahexaenóico (DHA), palmítico, oleico, linoleico, araquidônico, linolênico e esteárico (TAVILANI, 2006), conferem proteção aos espermatozoides contra choques térmicos e manutenção da motilidade espermática, desempenham importante papel na funcionalidade da célula, e conseqüentemente na capacidade de fertilização (GULAYA et al., 2001).

Segundo Pérez-Pé et al. (2001) a adição de ácido oleico-linoléico teve um efeito benéfico na preservação da viabilidade de espermatozoides ovinos. Takahashi et al. (2012) relataram que a adição de ácido graxos exógenos melhorou a motilidade de espermatozoides congelados e descongelados e a viabilidade do sêmen de touro.

Estima-se que mudanças na quantidade e composição de lipídios na membrana plasmática dos espermatozoides durante a maturação explique a sensibilidade observada no espermatozoide ejaculado. Essas alterações podem explicar a redução da fluidez da membrana de espermatozoides de touro, observada por espectroscopia de polarização de fluorescência (MANDAL; BADIYAKAR; CHAKRABARTY, 2014).

2.6 Eugenol

O eugenol(2-Methoxy-4-(2-propenyl)phenol,4-Allyl-2-methoxyphenol,4Allylguaiacol) é uma substância ativa que atua como depressor do sistema nervoso central, cuja concentração varia de 70 a 95% da composição total do óleo essencial do cravo-da-índia (*Syzygium aromaticum*), obtido pela destilação das folhas e flores (incluindo talos) desta árvore (ANDERSON et al., 1997).

Esse composto natural tem sido utilizado como anestésico alternativo para peixes. A sua utilização, nos reprodutores, tem por finalidade reduzir o estresse no manejo de peixes. Além de apresentar vantagens como, o acesso mais viável, face à dificuldade de obtenção dos químicos utilizados e economicamente compensatórios (PEREIRA et al., 2016).

O eugenol é um composto orgânico seguro e não-mutagênico e totalmente eliminado da corrente sanguínea e do tecido muscular de peixes em menos de dois dias após o seu uso (WOODY et al., 2002).

A utilização de anestésicos naturais ou sintéticos no manejo de peixes para a reprodução geram questionamentos na qualidade seminal, devido a interferência destes sobre os parâmetros de motilidade, cinética, morfologia, pH e osmolaridade (PEREIRA et al.,2016).

Pereira et al. (2016) avaliando a influência de 120 mg L⁻¹ de eugenol como anestésico natural sobre a qualidade do sêmen de Tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*), observou que

o eugenol reduz o percentual de motilidade, e aumentou a taxa de espermatozoide morfológicamente defeituoso, no entanto não interferiu no volume espermático ou no pH seminal.

O Eugenol é um dos principais componentes fenólicos do óleo essencial do cravo-da-índia (*Eugenia caryophyllata*), e vem demonstrando em vários testes biológicos, atividades anti-inflamatórias por inibição da atividade da enzima ciclooxygenase II, atividade analgésica devido a ligação seletiva no receptor de capsaicina, atividade antioxidante, e atividade antibacteriana contra microorganismos gram-positivos e gram-negativos (KALEMBA e KUNICKA, 2003).

O eugenol além de característica anestésica possui comprovada função antioxidante, anticarminativa, antiespasmódica, antisséptica e antimicrobiana (MYINT et al., 1996). Oya et al. (1997) estudando a ação de produtos naturais quanto a propriedade de sequestrar radicais livres, observaram que o eugenol apresentou maior capacidade para seqüestrar radicais livres, devido ao grupo hidroxil fenólico.

Pulla et al. (1992) demonstraram que o eugenol inibe a peroxidação lipídica induzida *in vitro*, possuindo habilidade em prevenir a oxidação de lipídios polinsaturados no fígado de ratos.

Nagababu et al.(2010) ao avaliar a atividade antioxidante do eugenol em estudos *in vitro* e *in vivo*, através da indução da peroxidação lipídica *in vitro* na mitocôndria por (Fe (II) -- ascorbato) ou (Fe (II) + H (2) O (2)), verificou que o eugenol inibiu completamente a peroxidação lipídica mediada por reagente de ferro e Fenton. Observando ainda que a atividade inibitória do eugenol foi cinco vezes superior à observada para o alfa-tocoferol e cerca de dez vezes menor do que a observada para o BHT.

No entanto, em altas concentrações, o eugenol tem efeitos adversos, incluindo reações inflamatórias e alérgicas, possivelmente devido à formação de radicais fenoxil e, posteriormente, de nove intermediários, através de sua atividade pró-oxidante (GÜLÇIN, 2011).

O eugenol é capaz de inibir significativamente o aumento da atividade da transaminase glutâmico oxalacética (TGO) e da necrose celular, sem, no entanto, proteger o retículo endoplasmático (ER) contra danos, conforme avaliado por sua falha em prevenir uma diminuição na atividade do citocromo p450 e da G-6-fosfatase (NAGABABU et al., 2010).

GÜLÇIN (2011), avaliando a atividade antioxidante do eugenol observou que este tem capacidade de redução do íon férrico (Fe³⁺) – através da doação de elétrons, demonstrando propriedades para neutralizar os radicais livres, formando produtos estáveis. Esse poder redutor

foi maior que os demais antioxidantes padrão utilizados, como o trolox, hidroxitolueno butilado (BHT), hidroxianisol butilado (BHA) e α -tocoferol.

O Eugenol inibe lesões oxidativas, cujo seu efeito na peroxidação lipídica ocorre através da atividade antioxidativa mediada por superóxido. Além disso, a inibição da xantina oxidase por eugenol foi relatada por (RAJAKUMAR e RAO, 1993).

A atividade antioxidante do eugenol está intimamente relacionada à sua capacidade de reduzir danos no DNA, mutagênese, carcinogênese e inibição de agentes patogênicos (ROGINSKY e LISSI, 2005).

2.7 Criopreservação do sêmen

Após a inseminação artificial (IA) realizada por Lazzaro Spallanzani em 1780, diversos pesquisadores sob os artifícios do avanço genético começaram a investigar a biologia e a morfologia dos espermatozoides, além da composição de diluidores e a criopreservação espermática (WALTERS, 2009).

No entanto foi a partir dos anos de 1930 e 1940, que os pesquisadores observaram que os espermatozoides sobreviviam sob congelamento em temperaturas abaixo de 160°C negativos (WALTERS, 2009). Mas criopreservar ainda era desafiador, uma vez que tal processo é capaz de alterar a estrutura celular e molecular (BENSON et al., 2012), mesmo possibilitando a utilização seminal por períodos prolongados, minimizando os riscos de transmissão de doenças sexualmente transmissíveis, além de favorecer a rápida difusão de material genético entre regiões, países e continentes (ARAV e SARAGUSTY, 2016).

Na década de 80 o Brasil, por meio da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, motivada pela perda de material genético de animais em extinção, incluiu a técnica de criopreservação em seu Programa de Pesquisa em Recursos Genéticos, tornando possível a criação de uma rede de conservação de recursos genéticos animais por meio do armazenamento de sêmen, de embriões e de oócitos em Bancos de Germoplasma (MARIANTE et al., 2011).

A descoberta de agentes crioprotetores permitiu a expansão dos programas de reprodução, através da criopreservação espermática, visando reduzir os custos associado com a manutenção de animais (BENSON et al., 2012).

O processo de criopreservação de sêmen submete as células a baixíssimas temperaturas, de forma controlada, visando preservar a sua função de fertilização oocitária. Durante tal processo o controle da temperatura é fundamental para a manutenção de uma proporção da viabilidade espermática. Além disso, sabe-se que os espermatozoides das mais variadas

espécies possuem diferentes graus de sensibilidade para manipulação experimental, choque térmico, criopreservação e alterações osmóticas (ALHAIDER e WATSON, 2009).

Com tais características, a criopreservação é uma biotécnica de grande importância para os programas de reprodução assistida, posto que fornece a disponibilidade de espermatozoides para o processo de fertilização, mesmo que o potencial de fertilidade destes, seja menor que o do sêmen resfriado ou a fresco, devido ao comprometimento na estrutura, função e bioquímica do espermatozoide, resultando em mudanças na composição lipídica da membrana plasmática e acrossomal, na motilidade e na viabilidade espermática (HOLT, 2011).

No entanto a criopreservação sofre influência de diversos fatores, como: qualidade seminal, manipulador, diluidor, crioprotetor, velocidade das taxas de resfriamento, pH, osmolaridade, produção de ROS, formação de cristais de gelo no meio intracelular devido a interação entre a célula e a água, que precisam ser ajustados para que o processo ocorra de forma eficiente. Por sua vez a descongelação envolve a reversão do processo, com conseqüente fluxo de água para o interior da célula podendo causar ruptura da membrana celular (HOLT, 2000). Logo, a curva de congelamento ideal deve ser suficientemente lenta para permitir que os espermatozoides se desidratem, e rápida o bastante para evitar que as células espermáticas fiquem expostas por muito tempo às elevadas concentrações de soluto (AZEVEDO et al., 2000).

As conseqüências da criopreservação implicam em choque térmico na célula espermática, resultando no decréscimo irreversível da motilidade espermática, acarretando na redução da taxa de glicólise, respiração celular e frutólise, aumento da degeneração do ácido desoxirribonucleico e liberação de material intracelular (WATSON, 2000). Tais implicações são reflexos do arrefecimento situado próximo de 0°C, do intervalo de temperatura de criopreservação e da temperatura criogênica (PESCH e BERGMANN, 2006).

A tensão nas células espermáticas, ocorrida na criopreservação, resultado da interação entre as células e a água surge através da cristalização do gelo, que expõe as células ao ambiente hiperosmótico, provocando retirada de água intracelular. Por sua vez a descongelação envolve a reversão do processo, com conseqüente fluxo de água para o interior da célula que poderá causar ruptura da membrana celular (HOLT, 2000). Desta forma, a quantidade de água presente na matriz afetar a estabilidade oxidativa dos lipídios da membrana (BERSET e CUVELIER, 1996), de maneira que a degradação oxidativa dos ácidos graxos insaturados pode ocorrer por várias vias, em função do meio e dos agentes catalisadores.

A oxidação lipídica pode ocorrer por catálise enzimática, através da lipoxigenase. Esta enzima atua sobre os ácidos graxos poli-insaturados (e.g. ácidos linoleico e linolênico, e seus ésteres), catalisando a adição de oxigênio à cadeia hidrocarbonada poliinsaturada, com

formação de peróxidos e hidroperóxidos com duplas ligações conjugadas, os quais podem envolver-se em diferentes reações degradativas (HALLIWELL et al., 1995).

Os crioprotetores são fundamentais na criopreservação, uma vez que são capazes de prevenir danos à parede da célula durante a congelação, reduzindo a concentração eletrolítica a temperaturas abaixo do ponto de congelação (LOVELOCK e POLGE, 1954). Ainda auxiliando o processo Rovay (2006), em seus estudos, observou que o resfriamento não linear antes da congelação, proporcionou motilidade total e percentagem de células vivas maior que quando submetido ao resfriamento linear.

É importante ter ciência das relações das técnicas de criopreservação e a velocidade de redução da temperatura durante a congelação. O tipo de curva utilizado na congelação influencia diretamente o grau de lesão celular (MOORE et al., 2006).

2.8 Análises espermáticas

Após o processo de congelação/descongelação as análises seminais são necessárias fontes de confirmação da qualidade do material armazenado, de tal forma que o uso destas técnicas *in vitro e in vivo*, visam estimar o potencial de fertilidade do macho, através das avaliações a partir da funcionalidade, integridade e viabilidade espermática (Kuçuk et al., 2014).

Através do teste de termorrestência é possível observar o decréscimo na curva linear nos valores de motilidade e vigor com a progressão do tempo de incubação durante o teste de exaustão, acreditando-se muitas vezes, que este decréscimo ocorre por conta do maior consumo de suas substâncias nutritivas nos primeiros períodos do teste, além das perdas de componentes intracelulares ou de lesões estruturais na cauda dos espermatozoides, diminuindo sua viabilidade durante as duas primeiras horas (BARROS et al., 2013).

Outro teste que pode compor o leque de avaliações é a análise de sêmen por auxílio de computador (CASA), a qual permite uma automatização das análises com maior objetividade e rapidez, utilizando o sistema automatizado para visualizar, digitalizar e analisar imagens sucessivas dos espermatozoides, fornecendo informação acurada, precisa e significativa do movimento individual de cada espermatozoide (Amann e Katz, 2004). Os parâmetros comumente obtidos através de analisadores de sêmen computadorizados são: velocidade do percurso curvilíneo (VCL), velocidade do percurso médio (VAP), velocidade em linha reta (VSL), retilinearidade (STR), linearidade (LIN), oscilação (WOB), frequência de batimento cruzado (BCF), e deslocamento lateral da cabeça (ALH) (Verstegen et al., 2002).

A integridade das membranas e a estabilidade de seu aspecto semipermeável são pré-requisitos para a viabilidade do espermatozoide. A membrana plasmática é extremamente sensível as crioinjúrias, caracterizada pela presença de uma bicamada lipídica de ácidos graxos poliinsaturados, tornando-se instável a ação das ROS. A sua integridade, assim como a da membrana acrossomal, apresenta uma relação positiva com a fecundação, sendo a membrana plasmática responsável pela manutenção da homeostase celular, que pode ser alterada pelo processo de criopreservação (PEÑA et al., 2005).

Assim, se a membrana plasmática está intacta, mas funcionalmente instável, os espermatozoides não são capazes de interagir com o ambiente do trato genital feminino e, conseqüentemente, fertilizar o oócito (RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, 2007). Portanto, para avaliar a integridade da membrana plasmática e acrossomal, são utilizados sondas com afinidade variadas, como: Hoechst 33258, YoPro-1, Iodeto de Propídeo (IP), Etídio Homodimérico-1, ToPro-3, Diacetato de carboxifluoresceína (DCF), isotiocianato de fluoresceína conjugado a aglutinina do *Pisum sativum* - FITC-PSA e 5,5',6,6'- tetracloro-1,1',3,3' iodeto de tetraetilbenzimidazol carbocianina - JC-1, dentre outras (ANDRADE et al., 2007).

A avaliação da peroxidação dos lipídios da membrana plasmática dos espermatozoides, induzido pelo estress sofrido pela célula, possivelmente pelo processo de criopreservação, pode ser determinado pelo método espectrofotométrico dos TBARS (substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico), descrito por Buege e Aust (1978), baseando-se na quantificação do complexo formado pela reação de duas moléculas de ácido tiobarbitúrico com uma de malonaldeído (MDA), formando um cromógeno de coloração rósea, quantificado num comprimento de onda de 532 nm. Ainda sobre avaliação do estress celular pode-se mensurar, a produção de ânio superóxido (O_2^-), e de peróxido de hidrogênio, além de se determinar a concentração de glutatona, e a atividade da catalase.

O potencial de fertilização de uma amostra de sêmen pode ser obtido pela análise das características seminais correlacionando os resultados com a técnica de FIV, desta forma, Nascimento et al. (2015) ao utilizar a PIV como método de avaliação da fertilidade espermática, observou o efeito inerente ao touro, no sêmen, sobre a fertilização in vitro de oócitos bovinos, apresentando diferenças significativas entre touros da mesma raça e em partidas do mesmo touro, tanto na taxa de fertilização quanto na taxa de sobrevivência embrionária.

2.9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ABAVISANI, A.; ARSHAMI, J.; NASERIAN, A.A.; KANDELOUSI, M.A.S.; AZIZZADEH, M. Qualidade de sêmen resfriado ou congelado-descongelado bovino após a adição de suplementação de ácidos graxos ômega-3 ao extensor. **International Journal of Fertility & Sterility**, v.7, p.161-168, 2013.
2. AGARWAL, A.; COCUZZA, M.; ABDELRAZIK, H.; SHARMA, R. Oxidative stress measurement in patients with male or female factor infertility. **Handbook of Chemiluminescent Methods in Oxidative Stress Assessment**, p.195-218, 2008.
3. AHLUWALIA, B.; HOLMAN, R.T. The fatty acid composition of lipids of bull, boar, rabbit and human sêmen. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.18, p.431-437, 1969.
4. AITKEN, R.J. Free radicals, lipid peroxidation and sperm function. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 7, p. 659-668, 1995.
5. AITKEN, R.J. Radicais livres, peroxidação lipídica e função espermática. **Reproduction, Fertility and Development**, v.7, p.659 – 668, 1995.
6. AITKEN, R.J.; CLARKSON, J.S. Base celular da função de esperma defeituosa e sua associação com a gênese de espécies reativas de oxigênio por espermatozoides humanos . **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 81, p.459 – 469, 1987.
7. AITKEN. R.J.; BAKER, M.A. Oxidative stress, sperm survival and fertility control. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 250, n.1-2, p.66-9,2006.
8. ALBERTS, B.; BRAY, D.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS K, WATSON J. **Biologia Molecular da Célula**. 3.ed. Porto Alegre: Artes Médicas, p. 506, 1997.
9. ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; KEITH, R.; WALTER, P. Organização interna da célula: Estrutura da membrana. In: **Biologia Molecular da Célula**. 4 ed. Porto Alegre: Artmed, 2004. Cap. 10, p.583-595.

10. ALHAIDER, A.K.; WATSON, P.F. Cryopreservation of dog semen: The effects of Equex STM paste on plasma membrane fluidity and the control of intracellular free calcium. **Animal Reproduction Science**, v.110, p.147-161, 2009.
11. AMANN, R. P.; GRAHAM, J. K. Spermatozoal function. In: McKINNON, A. O.; VOSS, J. L. **Equine Reproduction**. Philadelphia: Lea e Febiger. Cap. 80, p.717-718, 1992.
12. ANDERSON, W.G.; MCKINLEY, R.S.; COLAVECCHIA, M. The use of clove oil as an anesthetic for rainbow trout and its effects on swimming performance. **North American Journal of Fisheries Management**, v. 17, n. 2, p. 301-307, 1997.
13. ANDRADE, A. F. C.; ARRUDA, R. P.; CELEGHINI, E. C. C.; NASCIMENTO, J.; MARTINS, S. M. M. K.; RAPHAEL, C.F.; MORETTI, A. S. Fluorescent stain method for the simultaneous determination of mitochondrial potential and integrity of plasma and acrosomal membranes in boar sperm. **Reproduction in Domestic Animals**, v.42, p.190-194, 2007.
14. ARAV, A.; SARAGUSTY, J. Directional freezing of sperm and associated derived technologies. **Animal Reproduction Science**, v.169, p.6-13, 2016.
15. ARUOMA, O.I.; HALLIWELL, B. Superoxide-dependent and ascorbate-dependent formation of hydroxyl radicals from hydrogen peroxide in the presence of iron. **Biochemical Journal**, v. 241, p. 273-8, 1987.
16. ASSIS, R.E.F. 2007. **Evolução da espécie Bos taurus e formação das Raças Zebuínas (Bos taurus indicus) com ênfase na Raça Nelore**. Monografia (Especialização) – Faculdades Associadas de Uberaba - FAZU, Uberaba, 2007.
17. AVELDAÑO, M. I.; ROTSTEIN, N. P.; VERMOUTH, N. T. Lipid remodelling during epididymal maturation of rat spermatozoa. Enrichment in plasmenylcholines containing long-chain polyenoic fatty acids of the n-9 series. **Biochemical Journal**, v. 283, n. 1, p. 235-241, 1992.
18. AZEVEDO, H.C.; MACHADO, R.; SIMPLÍCIO, A.A.; SOARES, A.T. Características do sêmen caprino congelado: influência do tipo de palheta e concentração espermática. **Revista Científica Rural**, v.5, n.2, p. 148-157, 2000.

19. BALDASSARRE, H. Tecnologias avançadas de reprodução assistida (ART) em caprinos. **Journal of the American College of Radiology**, v.82-83, p255–266, 2004.
20. BARROS, M.H.C.; SHIOMI, H.H.; AMORIM, L.S.; SIQUEIRA, J.B.; PINHO, R.O.; LIMA, D.M.A.; LOPES, P.S.; GUIMARÃES, S.E.F.; GUIMARÃES, J. D. Viabilidade espermática do sêmen congelado de suínos da raça piau avaliada pelo teste de termorresistência. **Acta Veterinaria Brasilica**, v.7, n.2, p. 164-170, 2013.
21. BAUMBER, J.; VO, A.; SABEUR, K.; BALL, B.A. Generation of reactive oxygen species by equine neutrophils and their effect on motility of equine spermatozoa. **Theriogenology**, v. 57, p.1025-1033, 2002.
22. BEARER, E. L.; FRIEND, D. S. Morphology of mammalian sperm membranes during differentiation, maturation, and capacitation. **Journal Electron Microscopy Technique**, v.16, p. 281 297, 1960.
23. BEDFORD, J.; CALVIN, H. The occurrence and the possible functional significance of -S-S- crosslinked sperm heads, with particular reference to eutherian mammals. **Journal Experimental Zoology**, v.188, p.137-55, 1974.
24. BENSON, J.D.; WOODS, E.J.; WALTERS, E.M.; CRITSER, J.K. The cryobiology of spermatozoa. **Theriogenology**, v.78, p. 1682–1699, 2012.
25. BERSET, C.; CUVELIER, M.E. **Sciences des Aliments**, v. 16, p.219, 1996.
26. BILODEAU, J.F.; BLANCHTTE, S.; N. CORMIER, N. M.A. SIRARD, Reactive oxygen species-mediated loss of bovine sperm motility in egg yolk Tris extender: protection by pyruvate, metal chelators and bovine liver or oviductal fluid catalase. **Theriogenology**, v.57, p.1105-1122, 2002.
27. BILODEAU, J.F.; CHATTERJEE, S.; SIRARD, M.A.; GAGNON, C. Níveis de defesas antioxidantes são diminuídos em espermatozóides bovinos após um ciclo de congelamento e descongelamento. **Molecular Reproduction and Development**, v.55, n.3, p.282–288, 2000.

28. BUEGE, J.A.; AUST, S.D. Microsomal Lipid Peroxidation. **Methods in Enzymology**, v.52, p.302-10,1978.
29. CARDOSO, L. M. Espécies reativas de oxigênio no controle neurovegetativo da pressão arterial. **In: SIMPÓSIO BRASILEIRO DE FISIOLOGIA CARDIOVASCULAR**, Anais... Ribeirão Preto - SP (Medicina), v.39. n.1. p. 77-88, jan./mar, 2006.
30. CARVALHO, G.M.C. **Curraleiro pé-duro: Germoplasma estratégico do Brasil**. Brasília, DF: 1ª Ed. Embrapa, 2015.
31. CÂMARA, D.R.; GUERRA, M.M.P. Refrigeração e criopreservação do sêmen ovino: danos inerentes à técnica e influência da suplementação do meio com antioxidantes sobre a qualidade espermática. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.35, n.1, p.33-40, 2011.
32. COOPER, G. M. **The cell: a molecular approach**. Washington: ASM Press, p.673, 1996.
33. DADOUNE, J.P.; SIFFROI, J.P.; ALFONSI, M.F.; Transcription in haploid male germ cells. **International Review of Cytology**, v. 237, p.1–56, 2004.
34. DE LAMIRANDE, E.; GAGNON, C. Human sperm hyperactivation and capacitation as parts of an oxidative process. **Free Radical Biology and Medicine**, v.14, p.255-265,1993.
35. DE LAMIRANDE, E.; JIANG, H.; ZINI, A.; KODAMA, H.; GAGNON, C. Espécies reativas de oxigênio e fisiologia espermática. **Reviews of Reproduction**, v.2, p.48 – 54, 1997.
36. DE LAMIRANDE, E.; LAMONTHE, G. Reactive oxygen-induced reactive oxygen formation during human sperm capacitation. **Free Radical Biology and Medicine**, v.46, p.502-510, 2009.
37. DEVASAGAYAM, T.P.A.; BOLOOR, K.K.; RAMSARMA, T.Methods for estimating lipid peroxidation: An analysis of merits and demerits. **Indian Journal of Biochemistry & Biophysics**, v.40, p.300-308, 2003.

38. EDDY, E. M. The spermatozoon. **In: Neill JD. (Ed.). Knobil and Neill's physiology of reproduction. New York: Elsevier, v.1, p.3-54, 2006.**
39. EGITO, A.A. 2007. **Diversidade genética, ancestralidade individual e miscigenação nas raças bovinas no Brasil com base em microssatélites e haplótipos de DNA mitocondrial: subsídios para a conservação.** Tese de Doutorado, Instituto de Ciência Biológica, Universidade de Brasília.
40. FAWCETT, D.W. A comparative view of sperm ultrastructure. **Biology of Reproduction**, v.2, p.90–127, 1970.
41. FERREIRA, A.L.A.; MATSUBARA, L.S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v.43, n.1, p.1-16, 1997.
42. FIORAVANTI, M. C. S.; MOURA, M. I.; SILVA, M. C.; CARVALHO, G. M. C. Valoração econômica para raças locais: bovinos Curraleiro Pé-Duro. **In: I Simpósio Internacional de Raças Nativas**, Teresina, PI, 2015.
43. FIORAVANTI, M.C.S.; JULIANO, R.S.; COSTA, G.L.; ABUD, L.J.; CARDOSO, V.S.; CARPIO, M.G.; COSTA, M.F.O. Conservación del bovino Curraleiro: cuantificación del censo y caracterización de los criadores. **Animal Genetic Resources**, v.48, p.109–116, 2011.
44. FRACZEK, M.; KURPISZ, M. O sistema redox no sémen humano e danos peroxidativa de espermatozóides. **Postepy Hig Med Dosw (Online)**, v.59, p. 523-34, 2005.
45. FRIDOVICH, I. Superoxide radical and superoxide dismutases. **Annual Review of Biochemistry**, v.64, p.97-112,1995.
46. FRISCH, J. E. **Manual Sistema Frisch**. Trad. André Bruzzi Corrêa. [S.l.]: Alta Genetics do Brasil, 2004.
47. GANGWAR, C.; SAXENA, A.; PATEL, A.; SINGH,S.P.; YADAV, S.; KUMAR, R.; SINGH, V. Efeito da suplementação reduzida de glutatona em crioinjurias

- espermáticos induzidos por criopreservação em sêmen de touros Murrah. **Ciência da Reprodução Animal**, v.192, p.171-178, 2018.
48. GATTI, J.L.; CASTELLA, S.; DACHEUX, F.; ECROYD, H.; MÉTAYER, S.; THIMON, V.; DACHEUX, J.L. Post-testicular sperm environment and fertility, **Animal Reproduction Science, Manchester** , v. 82–83, p. 321–339, 2004.
49. GIBBONS, I. R. Cilia and flagella of eukaryotes. **The Journal of Cell Biology**, v. 91, p.107–124, 1981.
50. GULAYA, N.M.; GOVSEVA, N. M.; GORPYNCHENKO, I. I.; MARGITICH, V.; KLIMASHEVSKY, V. M.; BOYKO, M. I. Phospholipid composition of human sperm and seminal plasma in relation to sperm fertility. **Archives of Andrology**, v.46, n.3, p.169 – 75, 2001.
51. GÜLÇİN, I. Antioxidant Activity of Eugenol: A Structure-Activity Relationship Study. **Journal of medicinal food**, v.14, n.9, p.975-85, 2011.
52. GULÇİN, I.; ELMASTAS, M.; ABOUL-ENEIN, H. Y. Determination of antioxidant and radical scavenging activity of basil (*Ocimum basilicum* L. family Lamiaceae) assayed by different methodologies. **Phytother**. 2007.
53. GUTTERIDGE, J.M.; ROWLEY, D.A.; HALLIWELL, B. Superoxide dependent formation of hydroxyl radicals in the presence of iron salts. **Biochemical Journal**, v.199, p. 263-5, 1981.
54. HAFEZ, E.S.E.; HAFEZ, B. *Reprodução Animal*. São Paulo, Brasil Manole, 7ed, 2004.
55. HALLIWELL, B. Espécies reativas e antioxidantes. Redox Biology é um tema fundamental da vida aeróbica. **Plant Physiology**, v. 141, p. 312 – 322, 2006.
56. HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. **Radicais livres em biologia e medicina**, Ed 4. Clarendon Press, Oxford, 2006.
57. HALLIWELL, B.; MURCIA, M. A.; CHIRICO, S.; ARUOMA, O. I. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, v.35, p.7, 1995.

58. HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. The antioxidants of human extracellular fluids. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 280, p.1–8, 1990.
59. HAMES, B. AND N. HOOPER. Instant notes in biochemistry. **Biochemical education**, v.25, p.253–254, 1997.
60. HAMMERSTEDT, R.H.; GRAHAM, J.K.; NOLAN, J.P. Cryopreservation of mammalian sperm: what we ask them to survive. **Journal of Andrology**, v.11, p. 73-88, 1990.
61. HOLT, W.V. Fundamental aspects of sperm cryobiology: the importance of species and individual differences. **Theriogenology**, v. 53, p. 47-58, 2000.
62. HOLT, W.V. Mecanismos de armazenamento de espermatozoides no reproductivetrato feminino: uma comparação interespecífica. **Reproduction in Domestic Animals**, v.46, p.68-74, 2011.
63. JAYAPRAKASHA, G.K.; PATIL, B.S. In vitro evaluation of the antioxidant activities in fruit extracts from citron and blood orange. **Food Chemistry**, v. 101, n. 1, p. 410- 418, 2007.
64. JONES, R. Plasma membrane structure and remodelling during sperm maturation in the epididymis. **Journal of reproduction and fertility**. Supplement, v.53, p.73–84,1997.
65. KALEMBA, D.; KUNICKA, A. Antibacterial and antifungal properties of essential oils. **Current Medicinal Chemistry**, v.10, p.813–829, 2003.
66. KANDELOUSI, M.S.; ARSHAMI, J.; NASERIAN, A.; ABAVISANI, A. Os efeitos da adição de ácidos graxos ômega-3, 6, 9 sobre a qualidade de esperma bovino resfriado e congelado-descongelado. **Abra o veterinário**. J., v.3, p.47-52,2013.
67. KELLY, T. L. J. e TRASLER, J. M. Reproductive epigenetics. **Clin. Genet**. 65, 247–260, 2004.
68. KHOSRO, B.; ZARGHAMIN. Fatty acid composition of human spermatozoa and seminal plasma levels of stress biomarkers in subfertile males. **Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids**, v.77, p.117, 2007.

69. KOHEN, R.; NYSKA, A. Oxidation of biological systems: oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions, and methods for their quantification. **Toxicology Pathology**, v.30, p.620-650, 2002.
70. KOPPERS, A.J.;GARG, M.L.; AITKEN, R.J. Stimulation of mitochondrial reactive oxygen species production by unesterified, unsaturated fatty acids in defective human spermatozoa. **Free radical biology and medicine**, v.48, p.112–119, 2010.
71. KUCUK, N.; AKSOY, M.; UCAN, U.; AHMAD, E.; NASEER, Z.; CEYLAN, A.; SERIN, I. Comparison of two different cryopreservation protocols for freezing goat sêmen. **Cryobiology**, v.68, p.327–331, 2014.
72. LADHA, S. Lipid heterogeneity and membrane fluidity in a highly polarized cell, the mammalian spermatozoon. **The Journal of Membrane Biology**, vol. 165, no. 1, pp. 1–10, 1998.
73. LANE, N. 2002. **O oxigênio, a molécula que fez o mundo**. Oxford University Press, Oxford.
74. LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de Bioquímica**. 2.ed. São Paulo: Sarvier, 2000. 838p.
75. LEWIS, S. E.; MACCARRONE, M. Endocannabinoids, sperm biology and human fertility. **Pharmacological Research** : The Official Journal of the Italian Pharmacological Society, v.60, n.2, p.126–31, 2009.
76. LILL, R.; KISPAL, G. Maturation of cellular Fe-S proteins: an essential function of mitochondria. **Trends in Biochemical Sciences**, v.25:p.352–356, 2000.
77. LOVELOCK, J. E.; POLGE, C. The immobilization of spermatozoa by freezing and thawing and the roectiveaction of glycerol. **Biochemical Journal**, n.58, p.618-622, 1954.
78. MANDAL, R.; BADIYAKAR, D.;CHAKRABARTY, J. Role of membrane lipid fatty acids in sperm cryopreservation. **Advances in Andrology**, 2014.

79. MANNELLA, C.A., Structure and dynamics of the mitochondrial inner membrane cristae. **BBA Molecular Cell Research**, v. 1763, p.542–548, 2006.
80. MARIANTE, A.S. e EGITO, A.A. Animal genetic resources in Brazil: result of five centuries of natural selection. **Theriogenology**, v.57, p.223–235, 2002.
81. MARIANTE, A.S.; ALBUQUERQUE, M.S.M.; RAMOS, A.F. Criopreservação de recursos genéticos animais brasileiros. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v.35, n.2, p.64-68, 2011.
82. MARTI, E.; MARTI, J. I.; MUIÑO-BLANCO, T.; CEBRIÁN-PÉREZ, J. A. Effect of the cryopreservation process on the activity and immunolocalization of antioxidant enzymes in ram spermatozoa. **Journal of Andrology**, Philadelphia, v. 29, n. 4, p. 459-467, 2008.
83. MARTÍNEZ-SOTO, J.; LANDERAS, J.; GADEA, J. Spermatozoa and seminal plasma 643 fatty acids as predictors of cryopreservation success. **Andrology**, v.1, p.365–375, 2013.
84. MEIRELLES, F.V.; ROSA, A.J.M.; LOBO, R.B.; GARCIA, J.M.; SMITH, L.C.; DUARTE, F.A.M. Is the American Zebu really *Bos indicus*? **Genetics and Molecular Biology**, v.22, p.543-546, 1999.
85. MEISTER, A. Glutathione, ascorbate and cellular protection. **Cancer Research**, v.54, p.1969s-1975, 1994.
86. MEIZEL, S.; TURNER, K. O. Stimulation of an exocytotic event, the hamster sperm acrosome reaction, by cis-unsaturated fatty acids. **FEBS Letters**, vol. 161, no. 2, pp. 315–318, 1983.
87. MILLER, D.; OSTERMEIER, G.C.; KRAWETZ, S.A. The controversy, potential and roles of spermatozoal RNA. **Trends in Molecular Medicine**, v.11, p.156–163, 2005.
88. MITCHELL, P. Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemi-osmotic type of mechanism. **Nature**, v.191, p.144–148, 1961.

89. MOORE, A.I.; SQUIRES, E.L.; BRUEMMER, J.E.; GRAHAM, J.K. Effect of cooling rate and cryoprotectant on the cryosurvival of equine spermatozoa. **Journal of Equine Veterinary Science**, v.26, n.5, p.215-218, 2006.
90. MORAES, C.R.; MEYERS, S. The sperm mitochondrion: Organelle of many functions. **Animal Reproduction Science**, 2018.
91. MYINT, S. et al. Temperature-dependent diffusion coefficient of soluble substances during ethanol extraction of clove. **Journal American Oil Chemical Society**. v. 73, p. 603-610, 1996.
92. NAGABABU, E.; RIFKIND, J.M.; BOINDALA, S.; NAKKA, L. Avaliação da atividade antioxidante do eugenol in vitro e in vivo. **Methods in Molecular Biology**, v.610,p.165-80, 2010.
93. NASCIMENTO, P.S.; CHAVES, M.S.; SANTOS FILHO, A.S.; GUIDO, S.I.; GUERRA, M.M.P.; BARTOLOMEU, C.C. produção animal produção in vitro de embriões utilizando-se sêmen sexado de touros 5/8. **Ciência Animal Brasileira**, v.16,n.3, p.358-368,2015.
94. NICASTRO, D.; SCHWARTZ, C.; PIERSON, J.; GAUDETTE, R.; PORTER, M. E.; MCINTOSH, J. R. The molecular architecture of axonemes revealed by cryoelectron tomography. **Science**, v. 313, p. 944–948, 2006.
95. NICHOLLS, D.G., FERGUSON, S.J., 2013. **Bioenergetics**, fourth ed. Academic Press, San Diego.
96. NORDBERG, J.; ARNÉR, E.S.J. Reactive oxygen species, antioxidants and the mammalian thioredoxin system. **Free Radical Biology & Medicine**, v.31, n.11, p.1287-1312, 2001.
97. NTEMKA, A.; TSOUSIS, G.; BROZOS, C.; KIOSSIS, E.; BOSCOS, C.M.; TSAKMAKIDIS, I.A. Breed differences of bull frozen-thawed sêmen. **Reproduction in Domestic Animals**, v.51, p. 945–952, 2016.
98. OLSON, J.M.; BLANKENSHIP, R.E. Pensando na evolução da fotossíntese. **Photosynthesis Research**, v.80, p.373-386, 2004.

99. ORTEGA FERRUSOLA, C.; GONZÁLEZ FERNÁNDEZ, L.; SALAZAR SANDOVAL, C.; MACÍAS GARCÍA, B.; RODRÍGUEZ MARTÍNEZ, H.; TAPIA, J.A.; PEÑA, F.J. Inhibition of the mitochondrial permeability transition pore reduces “apoptosis like” changes during cryopreservation of stallion spermatozoa. **Theriogenology**, v.74, p.458–465, 2010.
100. OYA, T.; OSAWA, T.; KAWAKISHI, S. Spice constituents scavenging free radicals and inhibiting pentosidine formation in a model system. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**. v. 61, n. 2, p.263-266, 1997.
101. PEÑA, F.J.; SARAVIA, F.; JOHANNISSON, A.; WALLGREN, M.; MARTÍNEZ RODRÍGUEZ, H. Um método novo e simples para avaliar as alterações da membrana iníicio em congelados e descongelados espermatozoides javali. **International Journal of Andrology**, v. 28, p.107-114, 2005.
102. PEREIRA, P.N.B.; SILVA, A.C.; TEIXEIRA, E.G.; WLADIMIR RONALD LOBO FARIAS, W.R.L. Efeito do anestésico eugenol na qualidade espermática do sêmen de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*). **Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal**. v.10, n.3, p. 415 – 435, 2016.
103. PÉREZ-PÉ, R.; CEBRIÁN-PÉREZ, J. A. AND MUIÑO-BLANCO, T. Semen plasma proteins prevent cold-shock membrane damage to ram spermatozoa. **Theriogenology**, v.56, p.425-434, 2001.
104. PESCH, S.; BERGMAN, M. Structure of mammalian spermatozoa in respect to viability, Fertility and Cryopreservation. **Micron**, v.37, p. 597-612, 2006.
105. PESOLE G, et al. The neglected genome. **EMBO Reports**. 2012;13:473–474.
106. POULOS, A., A. DARIN-BENNETT AND I. WHITE. The phospholipid-bound fatty acids and aldehydes of mammalian spermatozoa. Comparative biochemistry and physiology Part B: **Comparative biochemistry**, v.46, p.541–549, 1973.
107. PRIMO, A. T. El ganado bovino ibérico en las Americas: 500 años despues. **Archivos de Zootecnia**, v. 41, p. 421-432, 1992.

108. PULLA REDDY, A. C., LOKESH, B. R. Studies on spice principles as antioxidants in the inhibition of lipid peroxidation of rat liver microsomes. **Molecular Cellular Biochemical**. v. 111, n. 1/2, p. 117-124, 1992.
109. RAJAKUMAR, D.V.; RAO, M.V. Dehydrozingerone and isoeugenol as inhibitors of lipid peroxidation and as free radical scavengers. **Biochemical Pharmacology**, v.46, p.2067–2072,1993.
110. RAO, M.V.; GANGADHARAN, B. Antioxidative potential of melatonin against mercury induced intoxication in spermatozoa in vitro. **Toxicology In Vitro**, v.22, n.4, p. 935-942, 2008.
111. REITER, R.J.; TAN, D.X.; BURKHARD, S. Reactive oxygen and nitrogen species and cellular and organismal decline: amelioration with melatonin. **Mechanisms of Ageing and Development**, v.123, p.1007-1019, 2002.
112. RODRIGUES, M. P. 2009. **Perfil oxidativo e avaliação funcional de sêmen criopreservado de touros (*Bos taurus taurus* e *Bos taurus indicus*) criados em clima tropical**. Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. 2009.
113. ROGINSKY, V.; LISSI, E.A.; Review of methods to determine chainbreaking antioxidant activity in food. **Food Chemistry**, v.92,p.235-254,2005.
114. ROVAN, E. **Biochemistry sperm**. W. Busch, A. Holzmann (Eds.), Veterinary Medicine Neurology, Physiology and Pathology of reproduction in males Animals, Schattauer, Stuttgart, p. 23-54, 2001.
115. ROVAY, H. **Efeito de diferentes curvas de resfriamento, tempos de equilíbrio e crioprotetores permeáveis no congelamento de espermatozoides de caprinos**. 2006. 56 f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2006.

116. SABEUR, K.; BALL, B.A. Detection of superoxide anion generation by equine spermatozoa. **American journal of Veterinary Research**, v.67, p.701-706, 2006.
117. SAFARINEJAD, M.R.; HOSSEINI, S.Y.; DADKHAH, F.; ALI ASGARI, M. Relationship of omega-3 and omega-6 fatty acids with semen characteristics, and antioxidant status of seminal plasma: A comparison between fertile and infertile men. **Clinical Nutrition**, v.29, p.100–105, 2010.
118. SAMPAIO, B.F.B.; BENDER, E.S.C.; COSTA-E-SILVA, E.V.; ZÚCCARI, C.E.S.N. Effect of oleic-linoleic acid and β -sitosterol to freezing extender of bulls and stallions semen. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 36, n. 3, p. 1369-1384, 2015.
119. SANTIAGO, A. A. **O zebu na Índia, no Brasil e no Mundo**. Campinas: Instituto Campineiro de Ensino Agrícola, 1986. 744 p.
120. SCHURMANN, A.; AXER, H.; SCHEEPERS, A.; DOEGE, H.; JOOST, H. G. GLUT 8 facilitative glucose transport is predominantly bound to the mature sperm acrosomal region. **Cell and Tissue Research**, v. 307, p. 237-242, 2002.
121. SCOTT, T. W. Lipid metabolism of spermatozoa. **Journal of Reproduction & Fertility**, v.18, p.65-76, 1973.
122. SCOTT, T.W., DAWSON, R.M. Metabolism of phospholipids by spermatozoa and seminal plasma. **Biochemical Journal**. v. 108, p. 457–463, 1968.
123. SHAN, X.; AW, T.; JONES, D.P. Glutathione-dependent protection against oxidative injury. **Pharmacology & Therapeutics**, v.47, p.61-71, 1990.
124. SIKKA, S. C. Oxidative stress and role of antioxidants in normal and abnormal sperm function. **Frontiers in Bioscience**, v.1, p.78–86, 1996.
125. SILVA, A. B. **O Zebu na Índia e no Brasil**. Rio de Janeiro: [sn], 1947.
126. SILVA, C.M.B. Efeito da melatonina em espermatozoides de equino. 2010. 72p. **Tese (Doutorado)**, Universidade Técnica de Lisboa, 2010.

127. STACKPOLE, C. W., AND DEVORKIN, D. Membrane organization in mouse spermatozoa revealed by freeze-etching. **Journal of Ultrastructure Research**, v.49, p.167–187, 1974.
128. TAKAHASHI, T.; ITOH, R.; NISHINOMIYA, H.; KATOH, M.; MANABE, N. Effect of linoleic acid albumin in a dilution solution and long-term equilibration for freezing of bovine spermatozoa with poor freezability. **Reproduction in Domestic Animals**, Berlin, v. 47, n. 1, p. 92-97, 2012.
129. TAVILANI, H.; DOOSTI, M.; ABDI, K.; VAISIRAYGANI, A.; JOSHAGHANI, H.R. Decreased polyunsaturated and increased saturated fatty acid concentration in spermatozoa from asthenozoospermic males as compared with normozoospermic males. **Andrologia**, v.38, p.173 – 178,2006.
130. TEIXEIRA, C.P.A.B.; JARDIM, W.F. **Processos Oxidativos Avançados**. Campinas - SP. Agosto, 2004.
131. TOSHIMORI, K. Maturation of mammalian spermatozoa: modifications of the acrosome and plasma membrane leading to fertilization. **Cell and Tissue Research**, v. 293, p. 177–187, 1998.
132. TURNER, R.M. Moving to the beat: a review of mammalian sperm motility regulation. **Reproduction Fertility and Development**, v.18, n. 2, p. 25-38, 2006.
133. TURRENS, J.F. Mitochondrial formation of reactive oxygen species. **The Journal of Physiology**, v.552, p.335-344, 2003.
134. VALKO, M.; LEIBFRITZ, D.; MONCOL, J.; CRONIN, M.T.D.; MAZUR, M.; TELSER, J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 39, P.44–84, 2007.
135. VAN DER LAAN, M.; HUTU, D.P.; REHLING, P. On the mechanism of preprotein import by the mitochondrial presequence translocase. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1803 , p. 732 – 739, 2010.

136. VANDENHEUVEL, FA. Structure of membranes and role of lipids therein. **Advances in Lipid Research**, v.9, p.161-248, 1971.
137. VERNET, P.; AITKEN, R.J.; DREVET, J.R. Antioxidant strategies in the epididymis. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v.216, p.31-39, 2004.
138. VERSTEGEN, J.; IGUER-OUADA, M.; ONCLIN, K. Computer assisted semen analyzers in andrology research and veterinary practice. **Theriogenology**, v.57, p.149-179, 2002.
139. VISHAL, T.; GUPTA, B.M.; TANDON, R. Free radicals/ reactive oxygen species. *JK-Practitioner*, v. 12, n.3, p.143-148, 2005.
140. WALTERS, E.M. The history of sperm cryopreservation. **In: PACEY, A. A.; TOMLINSON, M. J.** (Ed.). Sperm banking; theory and practice. Cambridge: Cambridge University Press, 2009.
141. WATSON, P.F. Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function. **Reproduction Fertility and Development**, v.7, p.871–891, 1995.
142. WATSON, P.F. The causes of reduced fertility with cryopreserved. **Animal Reproduction Science**, v. 60–61. p.481–492, 2000.
143. WOODY, C.A.; NELSON, J.; RAMSTAD, K. Clove oil as an anaesthetic for adult sockeye salmon: field trails. **Journal Fish Biology**, v. 60, n. 2, p. 340-347, 2002.
144. YOSHIDA, M. Conservação de espermatozoides: status atual e novas tendências. **Animal Reproduction Science**, v.60–61, p.349–355, 2000.
145. YOUNG, I.; WOODSIDE, J. Antioxidants in health and disease. **Journal of Clinical Pathology**, v.3, n.54, p.176-186, 2001.
146. ZAMBONI, L.; STEFANINI, M. The fine structure of the neck of mammalian spermatozoa. **The Anatomical Record**. v.169, p. 155–172, 1971.

3 CAPITULO I

*Artigo elaborado conforme as normas do periódico Journal of Applied Animal
Research (ISSN: 0971-2119, Impact factor 0.426).
Qualis B1 em Zootecnia/ Recursos Pesqueiros*

42 mais facilmente. Contudo, alguns entraves puderam ser identificados no uso de sêmen
43 criopreservado, como o menor potencial de fertilização de espermatozoides descongelados
44 (Miller, 2008; Abavisani et al., 2013), resultando no decréscimo irreversível da motilidade
45 espermática, na redução da taxa de glicólise, respiração celular e frutólise, aumento da
46 degeneração do ácido desoxirribonucleico e liberação de material intracelular (Watson, 2000).
47 Desta forma a manipulação adequada do sêmen é essencial para manter o desempenho
48 reprodutivo ideal (Sharlip et al., 2002).

49 A avaliação da fertilidade animal *in vitro* e *in vivo* pressupõe um conjunto de análises,
50 que, integradas, são suficientes para estimar a potencial fertilidade do macho, a partir da
51 funcionalidade, integridade e viabilidade espermática para seu emprego em programas de IA
52 (Ntemka et al., 2016; Kuçuk et al., 2014).

53 Testes como o de termorresistência estimam ao longo de sua avaliação o decréscimo na
54 curva linear nos valores de motilidade e vigor (Barros et al., 2013). A análise espermática
55 assistida por computador (CASA) por sua vez, apresenta formas mais objetivas e rápidas
56 utilizando o sistema automatizado para visualizar, digitalizar e analisar imagens sucessivas dos
57 espermatozoides, através de parâmetros como, velocidade do percurso curvilíneo (VCL),
58 velocidade do percurso médio (VAP), velocidade em linha reta (VSL), retilinearidade (STR),
59 linearidade (LIN), oscilação (WOB), frequência de batimento cruzado (BCF), e deslocamento
60 lateral da cabeça (ALH) (Verstegen et al., 2002; Amann e Katz, 2004). A avaliação da
61 peroxidação dos lipídios da membrana plasmática dos espermatozoides, induzido pelo estresse
62 sofrido pela célula, possivelmente pelo processo de criopreservação, e o potencial de
63 fertilização de uma amostra de sêmen são métodos de avaliação da fertilidade espermática
64 (Buege e Aust, 1978; Nascimento et al., 2015)

65 Dentro desta perspectiva, o avanço nos sistemas de produção e o estudo sobre as espécies
66 bovinas e suas condições reprodutivas, são fatores que interferem na determinação dos aspectos
67 qualitativos do sêmen, que constitui um processo crítico na tomada de decisões para a seleção
68 de reprodutores (RODRIGUES, 2009). Deste modo, o presente estudo teve por objetivo avaliar
69 e comparar características de qualidade de sêmen criopreservado das raças de touros, Nelore e
70 Curraleiro Pé-Duro (CPD), por meio dos testes de cinética espermática, morfologia,
71 quantificação da lipoperoxidação espermática, quantificação de glutatona reduzida (GSH), e
72 teste de fertilidade *in vitro*.

73

74

75

76 **Material e métodos**

77

78 *Comitê de Ética*

79 O estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da
80 EMBRAPA MEIO NORTE, sob o protocolo de 001/2016.

81

82 *Animais*

83 Foram utilizados quatro touros da raça Curraleiro Pé-Duro (CPD), provenientes da
84 Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – EMBRAPA Meio Norte localizada na cidade
85 de Campo Maior, Piauí, Brasil e quatro touros da raça Nelore, provenientes da Fazenda Santa
86 Luzia localizada na cidade de Elesbão Veloso, Piauí, Brasil. Os touros foram mantidos sob
87 regime extensivo, em pastejo de gramíneas nativas, com água e sal mineral ad libitum nas
88 fazendas as quais estavam alojados, e avaliados quanto à normalidade dos parâmetros
89 andrológicos antes do estudo, de acordo com as recomendações do Colégio Brasileiro de
90 Reprodução Animal (motilidade em massa: ≥ 3 ; motilidade espermática: ≥ 60 %; concentração:
91 350 milhões de espermatozoides / mL; número total de espermatozoides no ejaculado: 3 a 5
92 bilhões; espermatozoides morfolologicamente normais: ≥ 70 %; defeitos maiores de
93 espermatozoides: ≤ 10 %; defeitos menores de espermatozoides: ≤ 20 %; : ≤ 5 %; defeitos
94 individuais menores: ≤ 10 %) (CBRA, 2013).

95

96 *Coleta de sêmen*

97 Foram coletados cinco ejaculados por touro, com um eletroejaculador (Biocon ®
98 Soluções para Biotecnologia, Uberaba, Brasil), totalizando 40 ejaculados. Após a coleta, cada
99 ejaculado foi diluído com Tris-Gema (3,605 g de Tris; 2,024 g de ácido cítrico; 1,488g de
100 frutose; 25 MG de gentamicina; 50.000 UI de penicilina; 100 ml de água destilada; 20% de
101 gema de ovo e 5% de glicerol, com osmolaridade de 350 mOsm/kg e pH 6,8).

102

103 *Criopreservação do sêmen*

104 Imediatamente após a coleta e processamento, as amostras de sêmen foram envasadas
105 em palhetas de 0,25 mL, à temperatura ambiente, para uma concentração final de $20 \times$
106 10^6 espermatozoides viáveis / palheta, e então foram congeladas em máquina TK 3000® (TK
107 Tecnologia em congelação Ltda., Uberaba, Brasil), ajustada para uma taxa de resfriamento de
108 $-0,5$ ° C / min da temperatura ambiente (25 ° C) até que a temperatura de 5 ° C fosse
109 atingida. Após estabilização a 5 ° C por 1 hora, o congelamento foi realizado a -20 ° C / min

110 até atingir uma temperatura de -120°C , quando as palhetas foram colocadas diretamente em
111 nitrogênio líquido (-196°C), e armazenadas até o tempo de análise pós-criopreservação. A
112 descongelação ocorreu em banho-maria a 37°C por 30 segundos, para avaliação quanto à
113 motilidade total e vigor no teste de termo resistência (TTR), cinética espermática, integridade
114 da membrana plasmática e acrossomal, quantificação da lipoperoxidação da membrana
115 espermática, e determinação da concentração de glutathiona reduzida, conforme descrito a
116 diante.

117

118 *Cinética espermática*

119 A cinemática espermática foi avaliada por meio de um Sistema de Análises de
120 espermatozoide Computadorizado (CASA). O CASA consistiu de um sistema de microscopia
121 óptica de contraste de fase (Nikon TM H5505, Eclipse 50i, Japão), com iluminação
122 estroboscópica, e uma fase quente a 37°C , uma câmera de vídeo (Basler Visão Tecnologia TM
123 A312FC, Ahrensburg, Alemanha) e um PC com o analisador de sêmen Classe TM software
124 (Microptics, SL, versão 3.2.0, Barcelona, Espanha). As variáveis avaliadas foram: motilidade
125 progressiva (MOP-- $\mu\text{m/s}$), velocidade curvilínea (VCL - $\mu\text{m/s}$), velocidade em linha reta (VSL
126 - $\mu\text{m/s}$), velocidade média do percurso (VAP- $\mu\text{m/s}$), linearidade (LIN - %), retilinearidade
127 (STR-%), deslocamento lateral de cabeça (ALH - μm), oscilação (WOB - %) e frequência de
128 batimento cruzado (BCF-Hz), para cada espermatozoide analisado.

129

130 *Avaliação morfológica*

131 A morfologia foi estimada em cada amostra de sêmen descongelado, pelo método de
132 câmara úmida, avaliados 200 espermatozoides por observação microscópica (1000x), na qual a
133 porcentagem das diversas alterações morfológicas foi agrupada e classificada em
134 espermatozoides normais, espermatozoides com defeitos de cabeça, espermatozoides com
135 defeitos de peça intermediária e espermatozoides com defeitos de cauda (Marques e Mendes,
136 2017).

137

138 *Quantificação da lipoperoxidação da membrana espermática*

139 A taxa de peroxidação lipídica dos espermatozoides foi estimada pela medida do nível
140 de malonaldeído (MDA), utilizando o ácido tiobarbitúrico (TBA), baseado no método descrito
141 por Buege e Aust (1978). Os níveis de malonaldeído foram medidos após a suplementação de
142 500 μL de sêmen pós-criopreservado, mais Tampão Tris-ácido cítrico, pH 7,4, adicionado a
143 1mL do reagente TBA (15% de ácido tricloroacético; 0,25N de ácido clorídrico e 0,375% de

144 ácido tiobarbitúrico) e 1% (v/v) de BHT 50mM. A mistura foi tratada em água fervente (100 °
145 C) durante 15 min. Posteriormente as amostras foram resfriadas, e centrifugadas a 1.200g por
146 15 min. O sobrenadante foi removido e a absorbância foi medida a 532 nm em
147 espectrofotômetro UV-VIS (Perkin Elmer - Lambda). A concentração de MDA foi determinada
148 pela curva de calibração feita diariamente com malonaldeído (MDA) como padrão, nas
149 concentrações de 1 a 20mmol. O MDA produzido foi expresso em μmol de TBARS/mL de
150 diluidor.

151

152 *Método da determinação dos níveis de glutathiona reduzida (GSH)*

153 A determinação da concentração de GSH foi baseada na reação de Ellman (5,5'-ditiobis
154 (ácido 2-nitrobenzoico), conforme algumas modificações da técnica descrita por Khan et al.
155 (2011). Em um tubo contendo tampão EDTA pH 5,4, foram adicionados 400 μL de sêmen,
156 acrescidos de 320 μL de água destilada, mais 80 μL de ácido tricloroacético a 50%. O material
157 foi agitado e centrifugado a 3000 rpm por 15 minutos. Em seguida, foram recolhidos 400 μL
158 do sobrenadante e acrescido de 800 μL de tampão Tris-HCl 0,4 M, pH 8,9 e mais 20 μL de
159 DTNB 0,01 M; após 1 minuto de reação, foi feita a leitura em espectrofotômetro em 412 nm.
160 A concentração foi expressa em $\mu\text{M/mL}$. Para a curva padrão da glutathiona foram feitas
161 soluções de glutathiona a 6,66; 13,33; 26,66; 40; 53,33 e 66 μM .

162

163 *Teste de fertilidade in vitro*

164 Os complexos *cumulus-oócitos* (CCOs) foram coletados por aspiração folicular de ovários
165 obtidos de um matadouro local. Foram considerados adequados para o *cultivo in vitro* os
166 oócitos com três ou mais camadas de células do cumulus compactas, grau I e II, com citoplasma
167 homogêneo ou apresentando pequenas irregularidades (Leibfried e First, 1979). Os CCOs
168 selecionados foram submetidos à maturação *in vitro* em meio TCM-199 acrescido de 2,4 mM
169 de NaHCO_3 ; 2,2 mg/mL de piruvato de sódio; 5 $\mu\text{g/mL}$ de LH; 5 $\mu\text{g/mL}$ de FSH; 100 ng/ μl de
170 eGF; 1 $\mu\text{g/mL}$ de estradiol; 50 μM de cisteína; 10% de SFB e 1% de gentamicina, por 24 horas,
171 em estufa incubadora à 38,5°C com 5% de CO_2 e 95% de umidade. Após a maturação, todos
172 os oócitos foram fertilizados com sêmen criopreservado, das duas diferentes raças, em meio
173 base TRIS, preparado segundo a técnica de gradiente de Percoll.

174 A fertilização *in vitro* foi realizada em gotas de 100 μl de meio Fert-Talp acrescido de
175 10 $\mu\text{g/ml}$ de heparina, cobertas com óleo mineral, com concentração espermática de 1×10^6
176 espermatozoides vivos/ml, co-incubados em atmosfera de 5% de CO_2 , a 38,5 °C por 22 horas.
177 Para a avaliação da taxa de fertilidade, os presumíveis zigotos foram submetidos ao cultivo *in*

178 *in vitro* em estufa com atmosfera de 5% de CO₂, a 38,5 °C. Após 48 horas de cultivo os
179 presumíveis zigotos foram avaliados quanto a taxa de clivagem.

180

181 *Delineamento e Análise estatística*

182 O delineamento experimental foi em bloco ao acaso, com duas raças, Nelore e
183 Curraleiro Pé-Duro, oito blocos (animais), cinco repetições (coletas). As variáveis de cinética
184 espermática, morfologia espermática, foram submetidas a análise de variância (ANOVA)
185 utilizando-se o procedimento modelos lineares gerais (Proc GLM) e para comparação de média
186 foi utilizado o teste Tukey, na probabilidade de 5%. As análises foram executadas através do
187 programa Statistical Analysis System (SAS Institute Inc, 2013).

188 A taxa de clivagem foi avaliada pelo teste de Qui-quadrado a 5% de probabilidade de
189 erro. A quantificação da glutatona reduzida e de malonaldeído foi submetida a Análise de
190 Variância (ANOVA), seguido de Tukey como post hoc teste, na probabilidade de 5%. As
191 análises foram realizadas por meio do software GraphPad Prism 6.01 (GraphPad Software,
192 EUA, 2012).

193

194 **Resultados**

195 Os parâmetros cinéticos pós-descongelamento de espermatozoides criopreservados das
196 raças Nelore e Curraleiro Pé-Duro estão apresentados na Tab 1. Verificando-se que após a
197 descongelamento a 37°C, o BCF (frequência de batimento da cauda) foi significativamente
198 ($p < 0,05$) maior para a raça Curraleiro Pé-Duro quando comparado a raça Nelore, não diferindo
199 estatisticamente ($p > 0,05$) para os parâmetros de MT, MP, VCL, CSL, VAP, LIN, STR, WOB
200 e ALH.

201

202

203

204

205

206

207

208

209

210

211

212

213 **Tabela 1** - Parâmetros cinéticos do sêmen descongelado, avaliados pelo Sistema de Análise
 214 Computadorizada (CASA), das raças Nelore e Curraleiro Pé-Duro
 215

Parâmetros de motilidade	N	Nelore	Curraleiro Pé-Duro
<i>MT</i>	40	33,48 ± 14.32	38.70 ± 22.72
<i>MP</i>	40	19,04 ± 7.93	24.44 ± 13.75
<i>VCL</i>	40	57,99 ± 17.06	61,35 ± 15.57
<i>VSL</i>	40	23,84 ± 7.95	26,19 ± 8.11
<i>VAP</i>	40	33,08 ± 9.34	35,57 ± 9.51
<i>LIN</i>	40	40,82 ± 5.56	42,21 ± 3.83
<i>STR</i>	40	70,91 ± 6.81	72,87 ± 4.41
<i>WOB</i>	40	57,48 ± 4.52	57,83 ± 2.23
<i>ALH</i>	40	3,63 ± 0.85	3,69 ± 0.44
<i>BCF</i>	40	8,92 ± 2.56 ^b	10,92 ± 1.52 ^a
<i>HIPER</i>	40	4,57 ± 4.36	5,45 ± 6.68

216 Os valores são expressos como média ± desvio padrão (DP)

217 **MP** - Motilidade progressiva; **VCL** – velocidade curvilínea; **VSL** - velocidade em linha reta; **VAP** – velocidade
 218 média de percurso; **LIN** - linearidade; **STR** - retilinearidade; **WOB** – Oscilação; **ALH** - Amplitude de
 219 deslocamento lateral da cabeça e **BCF** - frequência de batimentos de cauda.

220 Valores de média com letras diferentes na mesma linha indicam diferenças significativas (p<0,05) pelo teste
 221 de Tukey.

222

223

224 Para os resultados de morfologia espermática (Tab 2), observou-se que a porcentagem
 225 de espermatozoides com defeitos de peça intermediária diferiu significativamente (p<0,05)
 226 entre as raças, apresentando-se maior para a raça Nelore.

227

228 **Tabela 2** - Avaliação da morfologia espermática (%) de sêmen criopreservado em diluidor
 229 TRIS-gema, de duas diferentes raças

230

Raças	N	Normais	Defeitos		
			Defeito de cabeça (%)	Defeito de peça intermediária (%)	Defeito de cauda (%)
<i>Nelore</i>	40	85,00 ± 10.96	0,95 ± 1.14	2,90 ± 2.65 ^a	11,20 ± 9.66
<i>Curraleiro Pé Duro</i>	40	86,40 ± 6.99	2,20 ± 4.16	1,30 ± 1.17 ^b	10,10 ± 6.28

231 Os valores são expressos como média ± desvio padrão (DP)

232 Valores de média com letras diferentes na mesma coluna indicam diferenças significativas (P <0,05) pelo teste de
 233 Tukey.

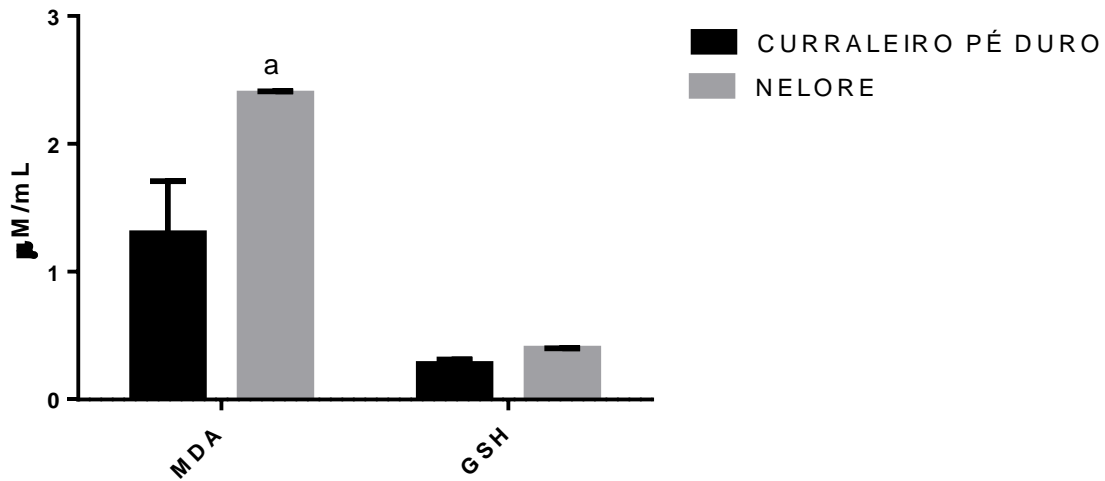
234 Fonte: Marques e Mendes, 2017.

235

236

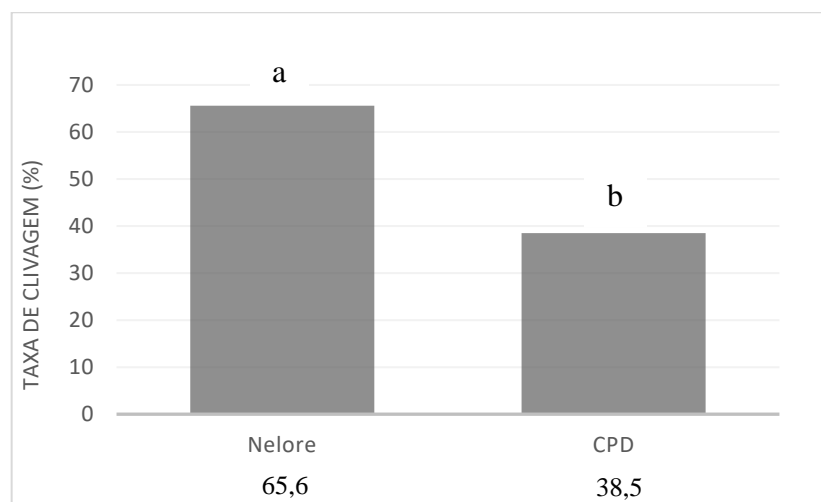
237 Neste estudo, observou-se que houve diferença significativa (p<0,05) para a
 238 determinação de malonaldeído entre as raças, verificando-se um aumento na produção de
 239 malonaldeído para a Nelore, quando comparada à Curraleiro Pé Duro. O mesmo não pode se

240 observar para a quantificação de glutathiona reduzida - GSH, que não demonstrou diferença
 241 significativa ($p > 0,05$) entre as duas raças.



242 **Figura 1** - Quantificação de MDA e GSH em sêmen pós-criopreservado de touros, de duas
 243 diferentes raças. MDA: Malonaldeído. GSH: Glutathiona reduzida. CN CPD: Controle
 244 Curraleiro Pé-Duro. CN Nelore: Controle Nelore. Os valores representam a média \pm D.P.M. As
 245 diferenças entre os grupos foram determinadas por Análise de Variância (ANOVA two-way),
 246 seguido de Sidak como post hoc teste, ($p < 0,05$).

247
 248
 249 Na Fig.2 são apresentados os dados de fertilização *in vitro* utilizando sêmen
 250 criopreservado das raças Nelore e Curraleiro Pé Duro. Com base na taxa de clivagem observou-
 251 se que a fertilização *in vitro* foi maior na raça Nelore, diferindo estatisticamente ($p < 0,05$) da
 252 raça Curraleiro Pé Duro, o qual apresentou menores resultados.
 253



254 **Figura 2** – Taxa de fertilização *in vitro* de oócitos bovinos utilizando o sêmen criopreservado
 255 das raças Nelore e Curraleiro Pé Duro.
 256
 257

258

259 **Discussão**

260

261

262

263

264

265

266

A avaliação da cinética espermática realizada através do CASA tem permitido maior objetividade e precisão nas avaliações, desta forma é caracterizada como importante análise na determinação da qualidade seminal, realizando avaliações múltiplas e repetidas, e seus efeitos estão relacionados a fertilidade espermática (Guardieiro, 2013). O presente estudo observou para os dados de cinética espermática diferença estatística ($p < 0,05$) quanto ao parâmetro de BCF, apresentando-se maior na raça Curraleiro Pé Duro, em comparação a Nelore.

267

268

269

270

271

Em estudos realizados em touro Angus, em que as características seminais foram analisadas por meio do CASA, observou-se que os parâmetros de motilidade total e progressiva, BCF (após 2 horas de incubação térmica do sêmen) e porcentagem de células em movimento rápido, foram importantes parâmetros para estimar a fertilidade dos touros (Oliveira et al., 2013).

272

273

274

275

276

Farrell et al. (1998), verificaram que a motilidade associada a velocidade estão altamente correlacionadas com a fertilidade de touros. Ntemka et al. (2016) ao comparar as características espermática entre cinco raças, observaram que as características cinéticas, como LIN, STR e WOB, foram significativamente menores nas raças Azul Belga (BB), e Blonde d'Aquitaine (BA).

277

278

279

280

281

282

Os parâmetros de VAP, VSL, BCF, STR e LIN, em touros, são indicadores de uma alta correlação com a fertilidade *in vivo* (Farrell et al., 1998). No entanto neste estudo, ao se avaliar a fertilização através da taxa de clivagem de embriões bovinos, observou que o BCF sozinho não foi parâmetro suficiente para aumentar as taxas de fertilização *in vitro* da raça Curraleiro Pé Duro, correlacionando - se negativamente, uma vez que os demais parâmetros não diferiram entre as raças em estudo.

283

284

285

286

287

Ntemka et al (2016) estudando as características espermática entre cinco raças observou um maior percentual de espermatozoides normais na raça Holandesa, em comparação a menores percentual nas raças Limousin e Azul Belga. Para os defeitos de cabeça a raça Azul Belga apresentou maiores porcentagem de defeitos, e para cauda a raça Holandesa apresentou menores taxas.

288

289

290

291

292

As alterações morfologias do sêmen são importantes indicadores da redução da fertilidade nas diversas espécies animais (Saacke, 2008), sendo facilmente correlacionável ao aumento na taxa de espermatozoides defeituosos com uma alta produção de ROS. Neste estudou observou-se um aumento na porcentagem de espermatozoides com defeitos de peça intermediária para a raça Nelore em relação a Curraleiro Pé Duro.

293 O aumento na porcentagem de defeitos de peça intermediária pode ser resultado do
294 processo de criopreservação e da alta produção de MDA, observado na raça Nelore, o que levou
295 a modificações patofisiológicas nos espermatozoides. Os danos provocados pelas ROS podem
296 induzir a alterações na integridade da membrana mitocondrial ocorrendo a depleção do ATP
297 intracelular e insuficiente fosforilação da proteína do axonema. Mas mesmo diante desta
298 sequência de possíveis eventos, a taxa de fertilização *in vitro* na raça Nelore foi maior que a do
299 Curraleiro Pé Duro, não apresentando uma correlação entre estes parâmetros.

300 A criopreservação através das alterações térmicas e osmóticas, atua sobre as células
301 espermáticas induzindo a geração de espécies reativas ao oxigênio (ROS), resultando em danos
302 morfológicos e funcionais das membranas espermática, e comprometendo a motilidade dos
303 espermatozoides, a integridade da membrana e o potencial de fertilização (Hu et al., 2010).

304 O sistema antioxidante do sêmen compreende diferentes substâncias como taurina,
305 glutathione em forma reduzida, glutathione peroxidase, catalase e superóxido dismutase para
306 prevenir danos oxidativos. No entanto o espermatozoide devido ao tamanho do seu citoplasma,
307 apresenta capacidade antioxidante reduzida (Sariözkan et al., 2009). O equilíbrio entre a
308 atividade antioxidante e geração de substâncias oxidativas é fundamental para eventos, como a
309 capacitação e reação acrossômica dos espermatozoides (O'Flaherty et al., 1999).

310 Neste estudo observou-se que os espermatozoides criopreservados da raça Nelore
311 produziram mais MDA, quando comparados aos da raça Curraleiro Pé Duro. A presença ou a
312 adição de ácidos graxos poliinsaturados ao diluidor podem melhorar os parâmetros de
313 motilidade total e progressiva e a viabilidade do sêmen pós-descongelamento, em animais *Bos*
314 *taurus*, como foi observado na raça Pardo Suíço (Monique, 2013). Assim, acredita-se que a raça
315 Curraleiro Pé Duro possua no plasma seminal um sistema redox equilibrado, com
316 concentrações de ácidos graxos poliinsaturados nos espermatozoides, em níveis necessários
317 para manter a taxa de peroxidação lipídica baixa. Alguns autores verificaram que o efeito
318 positivo, representado pela baixa produção de MDA, ocorra devido a maiores porcentagens de
319 ácido docosahexaenóico (DHA, n-3) e da proporção de n-3/n-6 nos espermatozoides, antes e
320 após a criopreservação. Técnicas como a cromatografia gasosa, podem ser úteis na
321 determinação das concentrações de ácidos graxos na célula.

322 A diferença estatística observada no teste de TBARS neste estudo, deve-se também a
323 interação de frutose, fonte de energia do espermatozoide bovino e presente na solução
324 crioprotetora, com o ácido tiobarbitúrico (TBA) diminuindo as concentrações de MDA no
325 sêmen da raça Curraleiro Pé Duro, quando comparado ao Nelore (Rodrigues, 2009).

326 Rodrigues et al. (2008) ao estudarem os níveis de MDA em amostras seminais frescas
327 (espontâneo) e criopreservadas (induzido) colhidas de bovinos da raça Simental e Nelore
328 durante o verão, observaram um aumento no nível de peroxidação lipídica nas amostras frescas
329 nos touros simentais (845 ng/106 espermatozóides VS 497 ng/106 espermatozóides, $p < 0,05$).

330 Se a composição lipídica da membrana plasmática é a maior determinante da motilidade,
331 sensibilidade à criopreservação, viabilidade espermática e a capacidade de fusão dos gametas,
332 induzindo modificações da taxa de fertilidade, desta forma alterações nas concentrações destes
333 podem induzir peroxidação lipídica, com conseqüente aumento na produção de MDA. Isso
334 demonstra que os antioxidantes podem ser utilizados para exercer efeito de proteção na
335 membrana dos espermatozoides criopreservados, reduzindo a suscetibilidade à oxidação,
336 preservando a atividade metabólica e viabilidade celular (Monique, 2013).

337 A capacidade de fertilização do sêmen neste estudo foi observada através dos dados de
338 clivagem, utilizando-se sêmen das raças Nelore e Curraleiro Pé Duro, para fertilização de
339 oócitos de fêmeas mestiças zebuínas, fator que pode ter influenciado nos resultados obtidos,
340 uma vez que alguns trabalhos evidenciam que a raça da fêmea e do touro influenciam nas taxas
341 de clivagem e de blastocisto na produção *in vitro* (PIV) de embriões bovinos (Blondin, et al.,
342 2009).

343 Alguns estudos sugerem que as taxas de clivagem e de blastocisto de fêmeas *Bos taurus*
344 são comparáveis às taxas obtidas com fêmeas *Bos indicus*, relacionando os resultados mais à
345 qualidade oocitária, do que ao fator racial (Pontes et al., 2010), contrário ao observado nesta
346 pesquisa, que verificou uma diferença significativa na taxa de fertilização *in vitro* em função
347 das raças, com um aumento desta taxa no grupo fertilizado com sêmen Nelore.

348 Nabhan et al. (2011), ao avaliarem a produção *in vitro* de embriões em diferentes
349 combinações, raça da doadora de oócitos x raça do touro, observaram que nos embriões
350 Holandês x Gir, a taxa de clivagem foi inferior à das demais combinações estudadas, e a
351 combinação Nelore x Nelore proporcionou os melhores resultados.

352 Nascimento et al.(2015), ao estudarem o efeito do sêmen sexado e convencional na
353 fertilização *in vitro* de touros 5/8 girolando, observaram o efeito inerente ao touro, no sêmen,
354 sobre a fertilização *in vitro* de oócitos bovinos, que apresentou diferenças significativas entre
355 touros da mesma raça e em partidas do mesmo touro, tanto na taxa de fertilização *in vitro* quanto
356 na taxa de sobrevivência embrionária, reafirmando que o fator touro tem importância
357 determinante quanto à capacidade de fertilização, bem como quanto à capacidade de
358 crescimento dos embriões clivados até mórula e seu posterior desenvolvimento até o estágio de
359 blastocisto.

360 Ward et al. (2001) em seus estudos observaram que o sêmen é o componente da
361 fertilização *in vitro*, determinante das primeiras clivagens, demonstrando que o sêmen é
362 indispensável para o desenvolvimento do embrião. Este efeito foi demonstrado apartir da
363 cinética do início do desenvolvimento embrionário medido pelo tempo da primeira clivagem
364 que variou entre diferentes touros, e essas diferenças poderam ser usadas para discriminar
365 touros de alta e baixa fertilidade.

366

367 **Conclusão**

368 Em conclusão, o sêmen criopreservado da raça Curraleiro Pé Duro se mostrou viável ao
369 processo de criopreservação, com baixas alterações morfológicas de peça intermediária e
370 reduzido estresse oxidativo.

371

372 **Referências**

- 373 Abavisani A, Arshami j, Naserian AA, Kandelousi MAS, Azizzadeh M. 2013. Qualidade de
374 sêmen resfriado ou congelado-descongelado bovino após a adição de suplementação de
375 ácidos graxos ômega-3 ao extensor. *International Journal of Fertility & Sterility*. 7:161-
376 168.
- 377 Agarwal A, Prabakaran AS, Said TM. 2005. Prevention of oxidative stress injury to sperm.
378 *Journal of Andrology, Lawrence*. 26:654-660.
- 379 Amann R, Katz DF. 2004. Reflections on CASA after 25 years. *J Androl*, v.25, p.317-325.
- 380 Barros MHC, Shiomi HH, Amorim LS, Siqueira JB, Pinho RO, Lima DMA, Lopes PS,
381 Guimarães SEF, Guimarães JD. 2013. Viabilidade espermática do sêmen congelado de
382 suínos da raça piau avaliada pelo teste de termorresistência. *Acta Veterinaria*
383 *Brasilica*.7.(2):164-170.
- 384 Blondin P, Beaulieu M, Fournier V, Morin N, Crawford L, Madan P, King WA. 2009. Analysis
385 of bovine sexed sperm for IVF from sorting to the embryo. *Theriogenology*. 1(1):30-38.
- 386 Buege JA, Aust S.D. 1978. Microsomal Lipid Peroxidation. *Methods in Enzymology*. 52:302-
387 10.
- 388 Farrell, PB, Presicce, GA, Brockett, CC e Foote, RH. 1998. Quantificação de características
389 espermáticas de touros medidas por análise de esperma assistida por computador (CASA)
390 e a relação com a fertilidade. *Teriogenologia* . 49 : 871-879
- 391 Guardieiro, MM. 2013. Viabilidade seminal pré e pós-criopreservação em touros
392 suplementados com gordura protegida e/ou antioxidantes, 2013.Tese (Doutorado) -
393 Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”.
- 394 Hu JH, Zan LS, Zhao XL, Li QW, Jiang ZL, Li YK et al. 2010. Efeitos da suplementação de
395 trealose sobre a qualidade do sêmen e variáveis de estresse oxidativo em sêmen bovino
396 congelado-descongelado. *Journal of Animal Science*.88 : 1657–1662.
- 397 Kastelic JP, Thundathil JC. 2008. Breeding soundness evaluation and semen analysis for
398 predicting bull fertility. *Reprod Domest Anim*. 43 Suppl 2:368-73.
- 399 Khan H, Khan MF, Jan SU, Ullah N. 2011. Effect of aluminium metal on glutathione (GSH)
400 level in plasma and cytosolic fraction of human blood. *Pakistan Journal of*
401 *Pharmaceutical Sciences*. 24,(1):13-18.

- 402 Kucuk N, Aksoy M, Ucan U, Ahmad E, Naseer Z, Ceylan A, Serin I. 2014. Comparison of two
403 different cryopreservation protocols for freezing goat sêmen. *Cryobiology*. 68:327–331.
- 404 Marques, M.; Mendes, R. *Espermocitologia*. Brasília, Curso de Farmácia Uni-Anhanguera.
- 405 Nabhan T, Satrapa RA, Simões RAL, Silva CF, Razza EM, Puelker R, Trinca LA, Barros, CM.
406 2011. Influência da raça do touro (*Bos indicus* x *Bos taurus*) na tolerância ao estresse
407 térmico calórico de embriões bovinos produzidos in vitro. *Brazilian Journal of Veterinary*
408 *Research and Animal Science*.48:332-335.
- 409 Nascimento PS, Chaves MS, Santos filho AS, Guido SI, Guerra MMP, Bartolomeu CC. 2015.
410 produção animal produção in vitro de embriões utilizando-se sêmen sexado de touros 5/8.
411 *Ciência Animal Brasileira*.16,(3):358-368.
- 412 Ntemka A, Tsousis G, brozos C, kiosis E, Boscós CM, Tsakmakidis IA. 2016. Breed
413 differences of bull frozen-thawed sêmen. *Reproduction in Domestic Animals*. 51:945–
414 952.
- 415 O'Flaherty, CM, Beorlegui, NB, Beconi, MT. 1999. Exigências de espécies reativas de oxigênio
416 para capacitação de espermatozoides bovinos e reação acrossômica. *Teriogenologia* .
417 52:289–301.
- 418 Oliveira LZ, Arruda RP, Andrade AFC, Celeghini ECC, Reeb PD, Martins JPN, Santos RMS,
419 Beletti, ME, Peres RFG, Monteiro FM, Lima VFMH. 2013. Assessment of in vitro sperm
420 characteristics and their importance in the prediction of conception rate in a bovine
421 timedAI program. *Animal Reproduction Science*, Amsterdam, v. 137, p. 145-155.
- 422 Pontes JHF, Nonato-junior I, Sanches BV, Ereno-junior JC, Uvo S. 2011. Ovum pick up, in
423 vitro embryo production, and pregnancy rates from a large-scale commercial program
424 using Nellore cattle (*Bos indicus*) donors. *Theriogenology*.75:1640-1646.
- 425 Rodrigues MP, Nichi M, Perez EGA, Cardoso PBS, Viana CHC, Barros PMH, Barnabe RC,
426 Barnabe VH. 2008. Sperm oxidative status and seminal quality in *Bos taurus taurus* and
427 *Bos taurus indicus* bulls under tropical conditions. *Reproduction in Domestic*
428 *Animals*.43,(3):161. 16 th International Congress of Animal Reproduction, 2008.
- 429 Rodrigues MP. 2009. Perfil oxidativo e avaliação funcional de sêmen criopreservado de touros
430 (*Bos taurus taurus* e *Bos taurus indicus*) criados em clima tropical. Dissertação
431 (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia.
- 432 Saacke RG. 2008. Insemination related factors affecting fertilization in estroussynchronized
433 cattle. *Proceedings, Applied Reproductive Strategies in Beef Cattle*. 15-16.
- 434 Sariözkan S, Bucak MN, Tuncer PB, Ulutaş PA, Bilgen, A. 2009. A influência de cisteína e
435 taurina nos parâmetros de estresse oxidativo-microscópico e capacidade de fertilização
436 do sêmen de touros após a criopreservação. *Criobiologia*.58 : 134–138.
- 437 Sharlip ID, Jarow JP, Belker AM et al. 2002 Best practice policies for male infertility. *Fertility*
438 *and Sterility* 77, 873–882
- 439 Verstegen J, Iguer-ouada M, Onclin K. 2002. Computer assisted semen analyzers in andrology
440 research and veterinary practice. *Theriogenology*. 57:149-179.
- 441 Watson PF. 2000. The causes of reduced fertility with cryopreserved. *Animal Reproduction*
442 *Science*. 60–61:481–492.
- 443

4 CAPITULO II

Artigo elaborado conforme as normas do periódico Andrologia

(ISSN: 1439-0272, Impact factor 1.458).

Qualis B1 em Zootecnia/ Recursos Pesqueiros

1 **Efeito da suplementação dos ácidos oleico e palmítico na criopreservação sêmen bovino**

2
3 **Y. N. T. C. Castelo Branco^{1*} | J. A. T. Sousa¹**

4
5 ¹Laboratório de Biotecnologia e Reprodução Animal – LBRA, Universidade Federal do Piauí
6 – UFPI, Socopo, Cep - 64049-550, Teresina, Piauí, Brasil.

7 * Correspondence

8 Email: yndyranayan1@hotmail.com

9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50

51 **Resumo**

52

53 Objetivou-se avaliar os efeitos da suplementação dos ácidos oleico e ácido palmítico ao diluidor
54 de criopreservação de sêmen bovino. Foram utilizados vinte ejaculados de quatro bovinos
55 Curraleiro Pé-Duro. Após as coletas o sêmen foi diluído em TRIS-Gema e suplementado ou
56 não com ácido oleico (50 μ M, 100 μ M) e ácido palmítico (50 μ M, 100 μ M). Os espermatozoides
57 criopreservados foram submetidos à análise pós-descongelamento, de motilidade total e o vigor
58 espermático no teste de termorresistência (TTR), nos tempos de 0, 60, 120 e 180 minutos,
59 integridade da membrana plasmática, integridade acrossomal, cinética espermática,
60 lipoperoxidação da membrana espermática e determinação dos níveis de glutathiona reduzida
61 (GSH). A suplementação de 100 μ M de ácido palmítico aumentou o percentual de linearidade
62 e WOB dos gametas, no entanto reduziu a ALH. Houve redução na membrana acrossomal
63 intacta no grupo controle, quando incubados a 180 minutos e comparados ao tempo de 60
64 minutos. Ácido palmítico 50 μ M reduziu membrana plasmática íntegras no tempo de 180
65 minutos comparado ao tempo 0 minutos. A quantidade de MDA foi menor nos tratamentos
66 ácido palmítico 50 μ M e 100 μ M e ácido oleico 50 μ M, quando comparado ao grupo controle.
67 A atividade da enzima Glutathiona reduzida (GSH) foi elevada em meio com ácido palmítico 50
68 μ M e 100 μ M e ácido oleico 100 μ M, quando comparados ao controle. Em conclusão, a
69 suplementação de 100 μ M de ácido palmítico ao diluidor TRIS-Gema, preservou a viabilidade
70 do sêmen criopreservado de bovino.

71

72 **Palavras-chaves:** Ácidos graxos, Ácido palmítico, Ácido oleico, Criopreservação, ROS,
73 Touro.

74

75 **1 | INTRODUÇÃO**

76 A inseminação artificial (IA) juntamente associada a criopreservação, tem papel
77 fundamental na disseminação mais ampla de germoplasma de animais de alto valor
78 genético. No entanto, apesar das vantagens proporcionada pela criopreservação, esta biotécnica
79 causa efeitos deletérios aos espermatozoides, incluindo a indução prematura da reação
80 acrossômica, perda de motilidade, redução na integridade do DNA, danos na membrana
81 plasmática, acrossomal e mitocondrial, prejudicando assim a fertilidade (Morrell e Mayer,
82 2017).

83 Em bovinos o principal constituinte espermático afetado pelo processo de
84 criopreservação é a membrana plasmática, sobretudo devido à alteração na composição lipídica,
85 com perda de fosfolipídios totais, podendo ser atribuída essa perda a reações de peroxidação
86 lipídica induzida por substâncias reativas de oxigênio (ROS) (Buhr et al., 1994).

87 A membrana plasmática dos espermatozoides bovinos é rica em ácidos graxos, os quais
88 tem a função de fornecer energia e regular proteínas plasmáticas (Shevchenko & Simons, 2010),
89 contudo, durante o congelamento e descongelamento esses ácidos graxos são reduzidos
90 (Medeiros et al., 2002).

91 O Alto teor de ácidos graxos poliinsaturados na membrana plasmática de
92 espermatozoides é necessário para conferir uma maior fluidez e uma alta resistência ao choque
93 a frio, no entanto, devido à presença de muitas ligações duplas, esses ácidos tornam-se
94 susceptíveis à peroxidação lipídica (Giraud et al., 2000). Em contraste, os ácidos graxos
95 saturados são menos vulneráveis a peroxidação do que ácidos graxos insaturados (Rael et
96 al., 2004). Tem-se conhecimento de que ácidos graxos saturados são mais ativamente
97 incorporados aos lipídios dos espermatozoides de bovinos (Neill e Mestres, 1972).

98 Recentemente, Zadeh Hashem et al. (2017) relataram que a suplementação de ácido
99 oleico, aumentou a viabilidade, a integridade da membrana plasmática, a capacidade
100 antioxidante total e a enzima superóxido dismutase (SOD) e diminuiu as quantidades de
101 malonaldeído e óxido nítrico durante o armazenamento de espermatozoides a 4 °C durante 72
102 horas. E Kiernan et al. (2013) observaram que o ácido palmítico, suplementado ao diluidor a
103 base de citrato, melhorou a motilidade e viabilidade espermática de touro durante a
104 refrigeração por 7 dias.

105 Diante das considerações, a incorporação de ácidos graxos saturados e monossaturados
106 em fosfolipídios de membrana plasmática pode aumentar a saturação e reduzir as chances de
107 peroxidação lipídica, compensando assim os danos do processo de criopreservação, neste
108 sentido, este estudo, objetivou-se avaliar os efeitos da suplementação dos ácidos oleico e ácido
109 palmítico ao diluidor de criopreservação de sêmen bovino, avaliados por meio de importantes
110 parâmetros de qualidade espermática pós-descongelamento: Motilidade e vigor no teste de
111 termo resistência (TTR), integridade da membrana plasmática, integridade acrossomal, cinética

112 espermática, lipoperoxidação da membrana espermática, determinação dos níveis de glutathione
113 reduzida (GSH) e produção in vitro de embriões – PIV.

114

115 **2 | MATERIAL E MÉTODOS**

116 **2.1 | Comitê de ética**

117 O estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da
118 EMBRAPA MEIO NORTE, sob o protocolo de 001/2016.

119 **2.2 | Animais**

120 Foram utilizados 04 touros da raça Curraleiro Pé-Duro (*Bos taurus taurus*), provenientes
121 da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – EMBRAPA Meio Norte localizada na cidade
122 de Campo Maior, Piauí, Brasil. Os touros foram mantidos sob regime extensivo, em pastejo de
123 gramíneas nativas, com água e sal mineral ad libitum e avaliados quanto à normalidade dos
124 parâmetros andrológicos antes do estudo, de acordo com as recomendações do Colégio
125 Brasileiro de Reprodução Animal (motilidade em massa: ≥ 3 ; motilidade espermática: ≥ 60 %;
126 concentração: 350 milhões de espermatozoides / mL; número total de espermatozoides no
127 ejaculado: 3 a 5 bilhões; espermatozoides morfologicamente normais: ≥ 70 %; defeitos maiores
128 de espermatozoides: ≤ 10 %; defeitos menores de espermatozoides: ≤ 20 %; : ≤ 5 %; defeitos
129 individuais menores: ≤ 10 %) (CBRA, 2013).

130 **2.3 | Coleta de sêmen**

131 Foram coletados cinco ejaculado por touro, com um eletroejaculador (Biocon ®
132 Soluções para Biotecnologia, Uberaba, Brasil), totalizando 20 ejaculados. Após a coleta, cada
133 ejaculado foi diluído com Tris-Gema (3,605 g de Tris; 2,024 g de ácido cítrico; 1,488g de
134 frutose; 25 MG de gentamicina; 50.000 UI de penicilina; 100 ml de água destilada; 20% de
135 gema de ovo e 5% de glicerol, com osmolaridade de 350 mOsm/kg e pH 6,8), e dividido
136 igualmente em cinco alíquotas: Controle (Tris-Gema sem adição de ácido oleico e palmítico,

137 Sigma-Aldrich®, St. Louis, MO, USA), Tris-Gema + 50 µM de ácido oleico; Tris-Gema + 100
138 µM de ácido oleico; Tris-Gema + 50 µM de ácido palmítico e Tris-Gema + 100 µM de ácido
139 palmítico.

140 **2. 4 | Criopreservação do sêmen**

141 Imediatamente após a coleta e processamento, as amostras de sêmen dos cinco
142 tratamentos foram envasadas em palhetas de 0,25 mL, à temperatura ambiente, para uma
143 concentração final de 20×10^6 espermatozóides viáveis / palheta, e então foram congeladas em
144 máquina TK 3000® (TK Tecnologia em congelação Ltda., Uberaba, Brasil), ajustada para uma
145 taxa de resfriamento de $-0,5 \text{ }^\circ\text{C} / \text{min}$ da temperatura ambiente ($25 \text{ }^\circ\text{C}$) até que a temperatura
146 de $5 \text{ }^\circ\text{C}$ fosse atingida. Após estabilização a $5 \text{ }^\circ\text{C}$ por 1 hora, o congelamento foi realizado a -
147 $20 \text{ }^\circ\text{C} / \text{min}$ até atingir uma temperatura de $-120 \text{ }^\circ\text{C}$, quando as palhetas foram colocadas
148 diretamente em nitrogênio líquido ($-196 \text{ }^\circ\text{C}$), e armazenadas até o tempo de análise pós-
149 criopreservação. A descongelação ocorreu em banho-maria a 37°C por 30 segundos, para
150 avaliação quanto à motilidade total e vigor no teste de termo resistência (TTR), cinética
151 espermática, integridade da membrana plasmática e acrossomal, quantificação da
152 lipoperoxidação da membrana espermática, e determinação da concentração de glutathione
153 reduzida, conforme descrito a diante.

154 **2.5 | Teste de termorresistência (TTR)**

155 O teste de termorresistência foi realizado de acordo Viana et al. (2009), o qual consistiu
156 em verificar a longevidade das amostras de sêmen descongeladas. Uma alíquota de $10\mu\text{l}$ de
157 sêmen descongelado foi incubada a $37 \text{ }^\circ\text{C}$ em banho-maria, e avaliada quanto à motilidade total
158 e o vigor espermático por meio de microscopia de contraste de fase (Olympus optical Co., Ltda.,
159 Tóquio, Japão) com placa aquecedora acoplada, aumento de 400x, nos tempos 0, 60, 120 e 180
160 minutos.

161

162 **2. 6 | Avaliação da cinética espermática**

163 A cinemática espermática foi avaliada por meio de um Sistema de Análises de
164 espermatozoide Computadorizado (CASA). O CASA consistiu de um sistema de microscopia
165 óptica de contraste de fase (Nikon TM H5505, Eclipse 50i, Japão), com iluminação
166 estroboscópica, e uma fase quente a 37°C, uma câmera de vídeo (Basler Visão Tecnologie TM
167 A312FC, Ahrensburg, Alemanha) e um PC com o analisador de esperma Classe TM software
168 (Microptics, SL, versão 3.2.0, Barcelona, Espanha). As variáveis avaliadas foram: motilidade
169 progressiva (MOP-- $\mu\text{m/s}$), velocidade curvilinear (VCL - $\mu\text{m/s}$), velocidade em linha reta (VSL
170 - $\mu\text{m/s}$), velocidade média do percurso (VAP- $\mu\text{m/s}$), linearidade (LIN - %), retilinearidade
171 (STR-%), deslocamento lateral de cabeça (ALH - μm), Wobble (WOB - %) e frequência de
172 batimento cruzado (BCF-Hz), para cada espermatozoide analisado.

173 **2. 7 | Analise da integridade da membrana plasmática**

174 Para avaliação da integridade da membrana plasmática, utilizou-se o método de
175 coloração dupla com diacetato de carboxifluoresceína (DCF; Sigma-Aldrich®, St. Louis, MO,
176 USA) e iodeto de propídio (IP; Sigma-Aldrich®, St. Louis, MO, USA), modificado por Coletto
177 et al. (2002), em que alíquotas de 50 μL de sêmen pós descongelado foram diluídas em 150 μL
178 de Tris, 5 μL de DCF e 20 μL de IP e incubadas por 10 min a 37°C. Foram avaliados 200
179 espermatozoides em microscópio de epifluorescência (400x; Olympus optical Co., Ltda.,
180 Tóquio, Japão), usando-se filtro de emissão DBP 580- 630nm e excitação DBP 485/20nm.

181 **2. 8 | Analise da integridade acrossomal**

182 Para avaliação da integridade da membrana acrossomal, utilizou-se o corante
183 isotiocianato de fluoresceína conjugado a Peanut agglutinin (FITC-PNA; Sigma-Aldrich®, St
184 Louis, MO, USA), de acordo com a técnica descrita por Roth et al. (1998), em que alíquotas de
185 20 μL de FITC-PNA foram colocadas sobre esfregaços de lâminas contendo espermatozoides,
186 as quais foram incubadas por 20 minutos em câmara úmida a 4°C, na ausência de luz. Após

187 incubação, as lâminas foram enxaguadas duas vezes em PBS refrigerado (4°C) e colocadas para
188 secagem na ausência de luz. Imediatamente antes da avaliação, 5µL de meio de montagem UCD
189 foram colocados sobre a lâmina e cobertos com lamínula. Foram avaliados 200
190 espermatozoides em microscópio de epifluorescência (400x; Olympus optical Co., Ltda.,
191 Tóquio, Japão), e a integridade expressa em porcentagem.

192 **2. 9 | Quantificação da lipoperoxidação da membrana espermática**

193 A taxa de peroxidação lipídica dos espermatozoides foi estimada pela medida do nível
194 de malonalialdeído (MDA), utilizando o ácido tiobarbitúrico (TBA), baseado no método
195 descrito por Buege & Aust (1978). Os níveis de malonalialdeído foram medidos após a
196 suplementação de 500 µL de sêmen pós-criopreservado, mais Tampão Tris-ácido cítrico, pH
197 7.4, adicionado a 1mL do reagente TBA (15% de ácido tricloroacético; 0,25N de ácido
198 clorídrico e 0,375% de ácido tiobarbitúrico) e 1% (v/v) de BHT 50mM. A mistura foi tratada
199 em água fervente (100 ° C) durante 15 min. Posteriormente as amostras foram resfriadas, e
200 centrifugadas 1.200g por 15 min. O sobrenadante foi removido e a absorbância foi medida a
201 535 nm em espectrofotômetro UV-VIS (Perkin Elmer - Lambda 25). A concentração de MDA
202 foi determinada pela curva de calibração feita diariamente com malonaldeído (MDA) como
203 padrão, nas concentrações de 1 a 20mmol. O MDA produzido foi expresso em µmol de
204 TBARS/ml de diluidor.

205 **2. 10 | Determinação dos níveis de glutathiona reduzida (GSH)**

206 A determinação da concentração de GSH foi baseada na reação de Ellman (5,5'-ditiobis
207 (ácido 2-nitrobenzoico), conforme algumas modificações da técnica descrita por Khan et al.
208 (2011). Em um tubo contendo tampão EDTA pH 5,4, foram adicionados 400 µL de sêmen,
209 acrescidos de 320 µL de água destilada, mais 80 µL de ácido tricloroacético a 50%. O material
210 foi agitado e centrifugado a 3000 rpm por 15 minutos. Em seguida, foram recolhidos 400 µL
211 do sobrenadante e acrescido de 800 µL de tampão Tris-HCl 0,4 M, pH 8,9 e mais 20 µL de

212 DTNB 0,01 M; após 1 minuto de reação, foi feita a leitura em espectrofotômetro em 412 nm.
213 A concentração foi expressa em $\mu\text{M}/\text{ml}$. Para a curva padrão da glutathiona foram feitas soluções
214 de glutathiona a 6,66; 13,33; 26,66; 40; 53,33 e 66 μM .

215 **2.11 | Delineamento e Análise Estatística**

216 O delineamento experimental foi em bloco ao acaso, com cinco tratamentos, quatro
217 blocos (animais) e cinco repetições (coletas). As variáveis motilidade e vigor no teste de
218 termorresistência (TTR), integridade da membrana plasmática, integridade acrossomal e
219 cinética espermática pós-descongelção, foram submetidas a análise de variância (ANOVA)
220 utilizando-se o procedimento modelos lineares gerais (Proc GLM) e para comparação de média
221 foi utilizado o teste Student-Newman-Keuls, na probabilidade de 5%. As análises foram
222 executadas através do programa Statistical Analysis System (SAS Institute Inc, 2013).

223 A quantificação da glutathiona reduzida e de malonaldeído foi submetida a Análise de
224 Variância (ANOVA), seguido de Tukey como post hoc teste, na probabilidade de 5%. As
225 análises foram realizadas por meio do software GraphPad Prism 6.01 (GraphPad Software,
226 EUA, 2012).

227

228 **3 | RESULTADOS**

229 No teste de termorresistência (TTR) espermática a 37°C nos tempos de 0, 60, 120 e 180
230 minutos, observou-se que para os parâmetros de motilidade e vigor não houve diferença
231 estatística entre os tratamentos e o controle quando adicionados diferentes concentração de
232 ácido oleico (50 μM e 100 μM) e ácido palmítico (50 μM e 100 μM) ao diluidor de
233 criopreservação de sêmen bovino (Tab. 1; $p>0,05$).

234

235 **Tabela 1.** Motilidade total e vigor pós-descongelamento de espermatozoides de touros, criopreservados em meio de congelação
 236 suplementado com diferentes concentrações de ácido oleico (50 μ M e 100 μ M) e ácido palmítico (50 μ M e 100 μ M), avaliados pelo
 237 teste de termo resistência (TTR)

Parâmetros	Tempo (minutos)	Controle	Oleico		Palmítico	
			50 μ M	100 μ M	50 μ M	100 μ M
Motilidade (%)	0	36.50 \pm 8.75	35.0 \pm 11.47	36.50 \pm 10.89	34.50 \pm 12.34	38.00 \pm 11.96
Vigor (1-5)	0	2.70 \pm 0.65	2.60 \pm 0.68	2.55 \pm 0.75	2.70 \pm 0.65	2.80 \pm 0.52
Motilidade (%)	60	23.50 \pm 12.15	23.25 \pm 13.79	23.50 \pm 12.98	21.25 \pm 12.12	21.50 \pm 3.77
Vigor (1-5)	60	1.90 \pm 0.85	1.95 \pm 0.94	1.95 \pm 0.88	1.85 \pm 0.93	1.95 \pm 0.99
Motilidade (%)	120	7.50 \pm 6.58	7.00 \pm 6.36	5.25 \pm 5.95	6.31 \pm 7.42	5.23 \pm 6.97
Vigor (1-5)	120	0.80 \pm 0.69	0.75 \pm 0.63	0.55 \pm 0.60	0.57 \pm 0.60	0.52 \pm 0.67
Motilidade (%)	180	2.750 \pm 5.49	3.25 \pm 5.44	2.75 \pm 4.12	3.14 \pm 4.57	3.14 \pm 4.57
Vigor (1-5)	180	0.30 \pm 0.57	0.40 \pm 0.59	0.35 \pm 0.48	0.38 \pm 0.49	0.38 \pm 0.49

238 Os valores são expressos como média \pm desvio padrão (DP)

239 Valores de média com letras minúsculas diferentes na mesma coluna indicam diferenças significativas entre os tempos para motilidade
 240 ($p > 0,05$) pelo teste Student-Newman-Keuls.

241 Valores de média com letras maiúsculas diferentes na mesma coluna indicam diferenças significativas entre os tempos para vigor
 242 ($p > 0,05$) pelo teste Student-Newman-Keuls.

243 Os parâmetros cinéticos, pós-descongelamento, de espermatozoides
244 criopreservados com diferentes concentrações de ácido oleico (50 μM e 100 μM) e
245 ácido palmítico (50 μM e 100 μM), mostram que não houve diferença estatística
246 (Tab. 2; $p>0,05$) entre os tratamentos estudados para as variáveis MT, MP, VCL,
247 VSL, VAP, STR, BCF, ALH e HIPER. Além disso, a concentração de 100 μM de
248 ácido palmítico aumentou o percentual de linearidade dos gametas (Tab. 2; $p<0,05$),
249 quando comparada ao tratamento de 50 μM de ácido palmítico. Da mesma forma,
250 foi observado que espermatozoides criopreservados na concentração de 100 μM de
251 ácido palmítico apresentaram valores de WOB superiores (Tab. 2; $p<0,05$) ao
252 tratamento de 50 μM de ácido palmítico, não diferindo dos demais tratamentos.

253

254

255

256

257

258

259

260

261 **Tabela 2.** Parâmetros cinéticos (CASA) de espermatozoides criopreservados de bovinos com meio de congelação suplementado com diferentes
 262 concentrações de ácido oleico (50 µM e 100 µM) e ácido palmítico (50 µM e 100 µM)

Parâmetros de motilidade	Controle	Ácido oleico		Ácido Palmítico	
		50µM	100µM	50µM	100µM
MT	38.70 ± 22.72	40.29 ± 19.77	38.80 ± 21.69	34.25 ± 20.78	33.87 ± 13.38
MP	24.44 ± 13.75	25.72 ± 12.79	25.52 ± 13.80	22.60 ± 12.45	23.33 ± 9.71
VCL	71.35 ± 15.57	71.11 ± 15.99	73.86 ± 18.47	71.29 ± 16.53	70.63 ± 15.26
VSL	36.19 ± 8.11	36.75 ± 8.80	37.84 ± 10.82	36.26 ± 9.99	39.20 ± 9.47
VAP	45.57 ± 9.51	45.74 ± 9.66	47.00 ± 11.41	44.79 ± 10.84	46.92 ± 10.50
LIN	52.21 ± 3.83 ^{ab}	52.88 ± 5.00 ^{ab}	52.14 ± 7.15 ^{ab}	51.69 ± 6.67 ^b	57.21 ± 7.40 ^a
STR	82.87 ± 4.41	83.31 ± 7.21	82.86 ± 10.71	83.71 ± 6.78	87.81 ± 6.75
WOB	67.83 ± 2.23 ^{ab}	68.45 ± 2.48 ^{ab}	67.65 ± 2.84 ^{ab}	66.25 ± 4.96 ^b	70.31 ± 5.17 ^a
ALH	13.69 ± 0.44	13.62 ± 0.63	13.34 ± 1.10	13.45 ± 0.87	13.07 ± 0.65
BCF	20.92 ± 1.52	20.11 ± 2.52	19.97 ± 3.68	20.24 ± 2.55	20.69 ± 2.77
HIPER	15.45 ± 6.68	17.39 ± 7.06	17.85 ± 8.81	14.93 ± 5.57	15.24 ± 4.24

263 Os valores são expressos como média ± desvio padrão (DP)

264 **MP** - Motilidade progressiva; **VCL** – velocidade curvilínea; **VSL** - velocidade em linha reta; **VAP** – velocidade média de percurso; **LIN** - linearidade; **STR** - retilinearidade;

265 **WOB** – Oscilação; **ALH** - Amplitude de deslocamento lateral da cabeça e **BCF** - frequência de batimentos de cauda.

266 Valores de média com letras minúsculas diferentes na mesma linha indicam diferenças significativas (p<0,05) pelo teste Student-Newman-Keuls.

267

268 A adição de diferentes concentrações de ácido oleico (50 μ M e 100 μ M) e
269 ácido palmítico (50 μ M e 100 μ M) não demonstrou incremento no percentual de
270 células com membranas plasmática e acrossomal intactas e na estabilidade das
271 membranas quando os tratamentos foram comparados ao grupo controle nos
272 diferentes tempos (0, 60, 120 e 180 minutos) do teste de termo resistência (TTR)
273 espermática a 37°C (Tab. 3; $p>0,05$).

274

275

276

277

278

279

280

281

282

283

284 **Tabela 3.** Integridade da membrana plasmática e Integridade acrossomal pós-descongelamento de espermatozoides de touros,
 285 criopreservados em meio de congelação suplementado com diferentes concentrações de ácido oleico (50 μ M e 100 μ M) e ácido palmítico
 286 (50 μ M e 100 μ M), avaliados pelo teste de termo resistência (TTR)

Parâmetros	Tempo (minutos)	Controle	Oleico		Palmítico	
			50 μ M	100 μ M	50 μ M	100 μ M
<i>M. Plasmática</i>	0	51.90 \pm 19.72	51.20 \pm 23.10	53.45 \pm 18.08	54.85 \pm 20.43	53.70 \pm 19.75
<i>M. Acrossomal</i>	0	55.15 \pm 19.72 ^{AB}	61.05 \pm 24.42 ^A	53.75 \pm 33.07 ^A	62.90 \pm 25.57 ^A	56.15 \pm 27.54 ^A
<i>M. Plasmática</i>	60	52.05 \pm 16.88 ^a	47.45 \pm 21.73 ^a	48.05 \pm 26.59 ^a	49.35 \pm 18.96 ^{ab}	50.20 \pm 22.31 ^a
<i>M. Acrossomal</i>	60	67.55 \pm 22.45	63.40 \pm 21.76	54.60 \pm 25.66	61.95 \pm 20.21	60.60 \pm 23.30
<i>M. Plasmática</i>	120	46.70 \pm 19.25 ^a	43.65 \pm 23.39 ^a	47.10 \pm 26.87 ^a	47.00 \pm 22.43 ^{ab}	49.71 \pm 20.90 ^a
<i>M. Acrossomal</i>	120	53.10 \pm 20.41 ^{AB}	53.60 \pm 26.87 ^A	48.55 \pm 25.05 ^A	58.73 \pm 21.07 ^A	53.09 \pm 19.19 ^A
<i>M. Plasmática</i>	180	42.85 \pm 19.01 ^a	41.65 \pm 21.65 ^a	40.45 \pm 21.68 ^a	40.00 \pm 21.88 ^b	43.85 \pm 19.32 ^a
<i>M. Acrossomal</i>	180	48.35 \pm 23.22 ^B	57.25 \pm 23.63 ^A	49.15 \pm 24.27 ^A	48.94 \pm 24.32 ^A	54.14 \pm 21.12 ^A

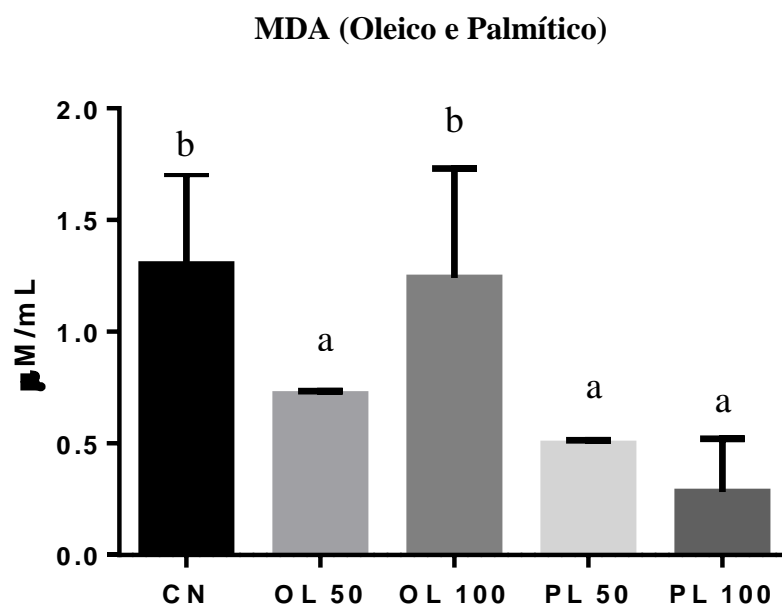
287 Os valores são expressos como média \pm desvio padrão (DP)

288 Valores de média com letras minúsculas diferentes na mesma coluna indicam diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os tempos para
 289 membrana plasmática, pelo teste de Student-Newman-Keuls.

290 Valores de média com letras maiúsculas diferentes na mesma coluna indicam diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os tempos para
 291 membrana acrossomal, pelo teste de Student-Newman-Keuls.

292 Para a produção de malonaldeído (MDA), foi observado uma redução nas
293 concentrações de MDA quando os espermatozoides foram criopreservados em meio
294 suplementado com ácido palmítico 50 μM e 100 μM e ácido oleico 50 μM , quando
295 comparado ao grupo controle e ao tratamento oleico 100 μM (Fig. 1; $p < 0,05$). A atividade
296 da enzima Glutathiona reduzida (GSH) foi elevada quando os espermatozoides foram
297 criopreservados em meio suplementado com ácido palmítico 50 μM e 100 μM e ácido
298 oleico 100 μM , quando comparados ao controle e ao tratamento oleico 100 μM (Fig. 2;
299 $p < 0,05$).

300
301



302

303 **Figura 1** - Quantificação de MDA em sêmen pós-criopreservado de touros
304 suplementados com diferentes concentrações de ácido oleico (50 μM e 100 μM) e ácido
305 palmítico (50 μM e 100 μM). **MDA**: Malondialdeído. **CN**: Controle. **OL50**: Ácido Oleico
306 50 μM . **OL100**: Ácido Oleico 100 μM . **PL50**: Ácido Palmítico 50 μM . **PL100**: Ácido
307 Palmítico 100 μM . As diferenças entre os grupos foram determinadas por Análise de
308 Variância (ANOVA), seguido de Tukey como post hoc teste, ($p < 0,05$).

309

310

311

312

313

314

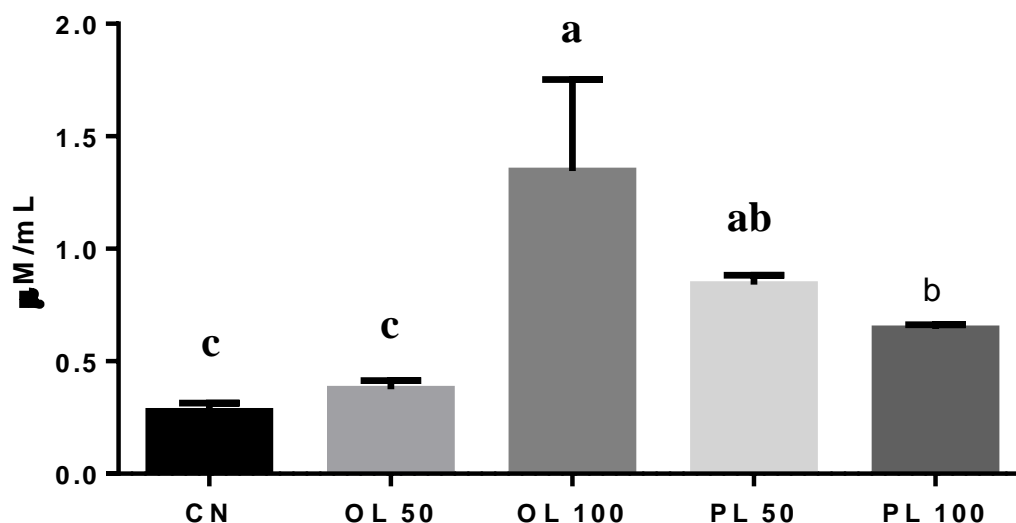
315

316

317

318
319

GSH (oleico e palmítico)



320
321
322
323
324
325
326
327
328
329
330
331
332

Figura 2 - Quantificação de GSH em sêmen pós-criopreservado de touros suplementados com diferentes concentrações de ácido oleico (50 μ M e 100 μ M) e ácido palmítico (50 μ M e 100 μ M). **GSH**: Glutathiona reduzida. **CN**: Controle. **OL50**: Ácido Oléico 50 μ M. **OL100**: Ácido Oléico 100 μ M. **PL50**: Ácido Palmítico 50 μ M. **PL100**: Ácido Palmítico 100 μ M. Os valores representam a média \pm D.P.M. As diferenças entre os grupos foram determinadas por Análise de Variância (ANOVA), seguido de Tukey como post hoc teste ($p < 0,05$).

4 | DISCUSSÃO

333
334
335
336
337
338
339
340
341

O presente estudo amplia o conhecimento sobre os efeitos da suplementação de diferentes ácidos graxos (ácido oleico e ácido palmítico) ao meio diluidor de criopreservação de sêmen bovino. Os resultados obtidos demonstram que tanto o grupo controle quanto a adição de diferentes concentrações de ácido oleico (50 μ M e 100 μ M) e ácido palmítico (50 μ M e 100 μ M) provocou redução do percentual de espermatozoides com motilidade total e vigor quando incubados a 37°C durante 180 minutos, essa redução nos valores de motilidade e vigor podem ser explicados devido a um maior consumo de suas substâncias nutritivas nos primeiros períodos do teste, além das perdas de componentes intracelulares ou de lesões estruturais na cauda dos espermatozoides,

342 diminuindo sua viabilidade em função da redução do ATP produzido durante as duas
343 primeiras horas (Barros et al., 2013).

344 O teste de termo resistência (TTR) tem por objetivo selecionar amostras de sêmen
345 mais resistentes a lesões latentes ao calor e maximizar as chances de sobrevivência
346 espermática dentro do trato reprodutivo feminino. No entanto não existe uma correlação
347 positiva entre qualidade de espermatozoides ao final da TTR e fertilidade, Viana et al.
348 (2009) mostrou em seu estudo que espermatozoides com taxa de motilidade de 0% ao
349 final de 5 horas de incubação a 38°C apresentaram taxa de prenhes de 66% na IATF.

350 As diferentes concentrações de ácido palmítico e ácido oleico demonstraram não
351 interferir nos valores de motilidade e vigor nos diferentes tempos da TTR, nossos
352 resultados são contrários aos resultados encontrados por Kiernan et al. (2013), no qual
353 relataram que a adição de ácido α -linolênico (ALA) (10 e 100 μ M), ácido palmítico (100
354 μ M) e ácido oleico (OA) (10 e 100 mM) em diluidores a base de citrato, com e sem gema
355 de ovo, melhorou a motilidade progressiva, motilidade linear e a viabilidade de
356 espermatozoides de touro refrigerados por 7 dias. Além disso, 5 ng / mL de ALA também
357 melhoraram as características citológicas de espermatozoides descongelados. No entanto
358 os tratamentos estabilizaram a redução da motilidade a partir de 120 minutos.
359 Possivelmente, houve boa preservação da fluidez das membranas e/ou estabilização dos
360 elementos proteicos na matriz lipídica da bicamada.

361 Quanto a cinética espermática, foi observado que, os espermatozoides tratados
362 com 100 μ M de ácido palmítico aumentaram a linearidade, quando esse grupo foi
363 comparado ao controle e aos demais tratamentos. Além disso, os valores de WOB foram
364 superiores para o tratamento 100 μ M de ácido palmítico quando comparado ao tratamento
365 ácido palmítico 50 μ M. Embora a linearidade e a WOB possuam alta correlação com a
366 fertilidade, quando associado à redução dos valores de ALH, como observado no presente

367 estudo, pode-se sugerir o desenvolvimento de um padrão cinético de espermatozoides
368 com baixa capacidade de penetração na zona pelúcida do óvulo, prejudicando assim o
369 processo de fertilização (Verstegen et al., 2002).

370 Além de seu papel nas propriedades físicas da membrana plasmática, os ácidos
371 graxos têm uma variedade de bioatividades, como expressão e regulação gênica de
372 proteínas (Darios et al., 2007). A qualidade espermática tem sido associada a uma alta
373 concentração de ácidos graxos de cadeia longa, em particular, o ácido palmítico e o ácido
374 oleico, componentes essenciais da membrana plasmática para flexão do flagelo
375 espermático, aumentado assim a motilidade espermática (Tavilan et al., 2007).
376 Provavelmente se tivéssemos aumentado o tempo de estabilização do sêmen no processo
377 de resfriamento, poderíamos ter tido maiores valores de motilidade e vigor, em função do
378 tempo necessário para que esses ácidos graxos interagissem com a membrana plasmática.

379 No presente estudo, não foi observado diferenças significativas entre os grupos
380 experimentais em relação à integridade acrossômica e integridade da membrana
381 plasmática no teste de termorresistencia, o que sugere que a presença de ácido palmítico
382 e ácido oleico, nas concentrações utilizadas, não melhoram os parâmetros de qualidade
383 estrutural de espermatozoides criopreservados de touro, isso pode ser explicado pela falta
384 de incorporação eficaz de ácido palmítico e ácido oleico na membrana do espermatozoide.
385 Os ácidos graxos, podem ser transportados através da membrana plasmática, uma vez que
386 eles atravessam a membrana externa e ao entrar no núcleo hidrofóbico, são protonados,
387 permitindo-lhes a partição no folheto interno (Ejaz et al., 2014). Outra explicação pode
388 ser uma redução na quantidade de ácidos graxos saturados ou absorvido passivamente
389 ligado à membrana plasmática, o que aumenta a proporção de ácidos graxos poli-
390 insaturados (Maldjian et al. 2005).

391 Nossos achados também indicam que, houve uma redução na integridade da
392 membrana plasmática de espermatozoides criopreservados na concentração de 50 μM de
393 ácido palmítico e incubados por 180 minutos a 37 °C, quando comparado ao tempo 0
394 minutos do teste de termorresistência, demonstrando assim que essa concentração pode ser
395 prejudicial a sobrevivência dos espermatozoides no trato reprodutivo feminino.

396 Takahashi et al. (2012) relataram que o ácido palmítico e o ácido linoleico
397 adicionados ao meio diluidor de sêmen a base de citrato aumentou a motilidade e
398 viabilidade de espermatozoides de touros no processo de criopreservação. No entanto, os
399 resultados do presente estudo não corroboram com Abavisani et al. (2013)
400 e Sheikholeslami Kandelousi et al. (2013) que relataram uma diminuição da motilidade,
401 morfologia e viabilidade espermática em sêmen de touros criopreservados em meio
402 diluidor contendo ácidos graxos.

403 Os espermatozoides têm menor capacidade antioxidante e não podem neutralizar
404 os efeitos prejudiciais das espécies reativas do oxigênio (ROS) e a lipoperoxidação
405 lipídica (LPO) durante o processo de criopreservação. Por este motivo, o uso de
406 antioxidantes no meio diluidor de sêmen é obrigatório para reduzir os efeitos nocivos da
407 LPO durante a criopreservação. O uso das concentrações de 50 μM e 100 μM de ácido
408 palmítico demonstraram ser mais eficazes em reduzir os níveis de MDA, assim como
409 também foram capazes de aumentar a atividade da enzima GSH, enzima essa que atua
410 diretamente como antioxidante (Bilodeau et al., 2001) e pode melhorar
411 a qualidade do sêmen protegendo as pontes dissulfeto e assim, manter a estrutura nuclear
412 do espermatozoide (Yeste et al., 2012).

413 Os resultados desse experimento, mostraram que a suplementação do meio
414 diluidor com 100 μM de ácido oleico foi capaz de aumentar proporcionalmente tanto os
415 níveis de MDA quanto da atividade de GSH, resultados semelhantes foram encontrados

416 por Strzezek e al. (2004), que ao suplementar suínos com dieta rica em ácidos graxos,
417 observou um aumento na enzima superóxido desmutase, concomitante com a produção
418 de MDA. Assim, o aumento na peroxidação lipídica, pode ser compensado pela ação dos
419 antioxidantes. Koppers et al. (2010) observaram uma relação positiva de
420 astenozoospermia para a presença de ácido palmítico e esteárico no sêmen humano,
421 observando ainda que quanto maior a presença de ácidos graxos insaturados menor o grau
422 de astenozoospermia. Em contrário observaram que quanto maior a quantidade de ácidos
423 graxos insaturados, mais sensíveis aos ataques de espécies reativas de oxigênio, estresse
424 oxidativo e peroxidação lipídica ficaram os espermatozoides.

425

426 5 | CONCLUSÃO

427 Em conclusão, a suplementação de 100 µM de ácido palmítico ao diluidor TRIS-
428 Gema, preservou a viabilidade do sêmen criopreservado de bovino.

429

430 5 | REFERÊNCIAS

431 Abavisani, A., Arshami, J., Naserian, A. A., Sheikholeslami Kandelousi, M. A.,
432 Azizzadeh, M. (2013). Quality of Bovine Chilled or Frozen-Thawed Semen after
433 Addition of Omega-3 Fatty Acids Supplementation to Extender. *Int. J. Fertil. Steril.*,
434 7(3), 161-168.

435 Agarwal, A., Said, T. M.; Bedaiwy, M. A. et al. (2006). Oxidative stress in an assisted
436 reproductive techniques setting. *Fertil. Steril.*, 86, 503–512,

437 Bailey J.L., Bilodeau, J.F., & Cormier, N. (2000). Cryopreservation of semen in domestic
438 animals: a damaging and enabling phenomenon. *J Androl.*, 21, 1-7.

439 Barros, M.H.C., Shiomi, H.H., Amorim, L.S., Siqueira, J.B., Pinho, R.O., Lima, D.M.A.,
440 Lopes, P.S., Guimarães S.E.F., & Guimarães, J. D. (2013). Viabilidade espermática do
441 sêmen congelado de suínos da raça piau avaliada pelo teste de termorresistência. *Acta*
442 *Veterinaria Brasilica*, 7(2), 164 – 170.

443 Bilodeau, J. F., Blanchette, S., Gagnon, C., & Siarrd, M. A. (2001). Thiols prevents loss
444 of sperm motility mediated by H₂O₂ in cryopreserved bull semen. *Theriogenology*, 56,
445 275 – 286.

- 446 Buege, J.A.; & Aust, S.D. (1978). Microsomal Lipid Peroxidation. *Methods in*
447 *Enzymology*, 52, 302-10.
- 448 Buhr, M. M., Curtis, E. F., & Kakuda, N. S. (1994). Composition and behavior of head
449 membrane lipids of fresh and cryopreserved boar sperm. *Cryobiology*, 31, 224–38.
- 450 CBRA. Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (2013). ‘Manual para exame
451 andrológico e avaliação de sêmen animal’. (CBRA: Belo Horizonte).
- 452 Coletto, Z. F., Guerra, M.M.P., Batista, A. M. (2002). Avaliação do sêmen congelado de
453 caprinos com drogas fluorescentes. *Rev. Bras. Med. Vet.*, 24, 101-104.
- 454 Crowe, J.H., Hoekstra, F.A., Crowe, L.M. et al. (1989). Measured lipid phase transitions
455 in intact cells with Fourier transform infrared spectroscopy. *Cryobiology*, 26, 76-84.
- 456 Darios, F., Connell, E., & Davletov, B. (2007). Phospholipases and fatty acid signaling
457 in exocytosis. *J Physiol*, 585, 699 – 704.
- 458 Du Plessis, S. S., Makker, K., Desai, N. R. (2008). Agarwal. Impact of oxidative stress
459 on IVF. *Exp. Rev. Obstet. Gynecol.*, 3, 539–554.
- 460 Ejaz, R., Ansari, M. S., Rakha, B. A., Ullah, N., Husna, A. U., & Akhter, S. (2014).
461 Arachidonic acid in Extender improves the post-thawing parameters of cryopreserved
462 Nili-Ravi buffalo Semen. *Reproduction in domestic animals*, 49, 122-125.
- 463 El-Sharawy, M.E. (2005). The effect of organic and inorganic sources of zinc
464 supplementation on fresh and frozen rams semen. (MSc Thesis Fac of Agric)Tanta Univ.
- 465 Florman, H.M., & First, N.L. (1998). The regulation of acrosomal exocytosis. Sperm
466 capacitation is required for the induction of acrosome reactions by the bovine zona
467 pellucida in vitro. *Dev Biol.*, 128, 453–463.
- 468 Giraud, M.N., Motta, C., Boucher, D., & Grizard, G. (2002). The fluidity of the membrane
469 predicts the result of cryopreservation of human spermatozoa. *Hum Reprod.*, 15,
470 2160 – 2164.
- 471 Hammerstedt, R.H., Grahan, J.K., & Nolan, J. P. (1990). Cryopreservation of mammalian
472 sperm: what we ask them to survive. *J Androl.*, 11, 73–88.
- 473 Khan, H., Khan, M. F., Jan, S. U., & Ullah, N. (2011). Effect of aluminium metal on
474 glutathione (GSH) level in plasma and cytosolic fraction of human blood. *Pakistan*
475 *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 24, 13-18.
- 476 Kiernan, M., Fahey, A. G., & Fair, S. (2013). The effect of the in vitro supplementation
477 of exogenous long-chain fatty acids on bovine sperm cell function. *Reprod. Fertil. Dev.*
478 25, 947-954.
- 479 Kiernan, M., Fahey, A.G., & Fair, S. (2013). The effect of in vitro supplementation of
480 long chain exogenous fatty acids on the function of bovine spermatozoa. *Reprod Fertil*
481 *Dev.*, 25, 947 – 954.

- 482 Maldjian, A., Pizzi, F., Gliozzi, T., Cerolini, S., Penny, P., & Noble, R. (2005). Changes
483 in sperm quality and lipid composition during cryopreservation of swine
484 semen. *Theriogenology*, 63, 411 - 421.
- 485 Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA). Manual para exame andrológico e
486 avaliação do sêmen animal. Terceira edição. CBRA , Belo Horizonte ; 2013.
- 487 Medeiros, C.M.O., Forell, F., Oliveira, A.T.D., & Rodrigues, J.L. (2002). Current
488 Situation of Sperm Cryopreservation: Why Not Better? *Theriogenology*, 57, 327-344.
- 489 Morrell, J. M., & Mayer, I. (2017). Reproduction biotechnologies in germplasm banking
490 of livestock species: a review. *Zygote*, 25, 545–557.
- 491 Neill, A.R., & Mestres, C.J. (1972). Metabolism of fatty acids by bovine spermatozoa.
492 *Biochem J.*, 127, 375 – 385.
- 493 Oldenhof, H., Gojowsky, M., Wang, S. et al. (2013). Osmotic stress and membrane phase
494 changes during freezing of stallion spermatozoa: mode of action of cryoprotectants. *Biol*
495 *Reprod.*, 68, 1-11.
- 496 Pereira, R. M., Baptista, M. C., Vasques, M. I., Horta, A. E. M., Portugal, P. V., Bessa,
497 R. J. B., Chagas e Silva, J., Silva Pereira, M., & Marques, C. C. (2007). Cryosurvival of
498 bovine blastocysts is enhanced by culture with trans-10 cis-12 conjugated linoleic acid
499 (10t,12c CLA). *Anim Reprod Sci.*, 98(3-4), 293-301.
- 500 Rael, L.T., Thomas, G.W., Craun, M.L. et al. (2004). Lipid peroxidation and
501 thiobarbituric acid assay: standardization of the assay when using saturated and
502 unsaturated fatty acids. *J Biochem. Mol. Biol.*, 37, 749 – 752.
- 503 Roth, T. L., Weiss, R. B., & Buff, J. L. (1998). Heterologous in vitro fertilization and
504 sperm capacitation in an endangered African antelope, the Scimitar-Horned Oryx (*Oryx*
505 *dammah*). *Biol Reprod.*, 58, 475-482.
- 506 Safarinejad, M.R., Hosseini, S.Y., Dadkhah, F., & Ali, A.M. (2010). Relationship of
507 omega-3 and omega-6 fatty acids with semen characteristics, and anti-oxidant status of
508 seminal plasma: a comparison between fertile and infertile men. *Clin Nutr.*, 29, 100–105.
- 509 Sheikholeslami Kandelousi, M. A., Arshami J., Naserian, A. A., Abavisani, A. (2013).
510 The effect of the addition of omega-3, 6, 9 fatty acids on the quality of refrigerated and
511 frozen and thawed bovine spermatozoa. *Open Vet J.*, 3(1), 47-52.
- 512 Shevchenko, A., & Simons, K. (2010). Lipidomics: coming to grip with lipid diversity.
513 *Nat. Rev. Mol. Biol.*, 11, 593-598.

- 514 Takahashi, T., Itoh, R., Nishinomiya, H., Katoh, M., Manabe, N. (2012). Effect of linoleic
515 acid albumin in a dilution solution and long-term equilibration of freezing of spermatozoa
516 with poor freezing bovine. *Reprod Domest Anim.*, 47(1), 92-77.
- 517 Tartaglione, C.M., & Ritta, M.N. (2004). Prognostic value of spermatological parameters
518 as predictors of *in vitro* fertility of frozen-thawed bull semen. *Theriogenology*, 62, 145–
519 1252.
- 520 Tavilani, H., Doosti, M., Nourmohammadi I., Mahjub H., Vaisiraygani A., S. Salimi, et
521 al. (2007). Lipid composition of spermatozoa in normozoospermia and
522 asthenozoospermia males. *Prostag Leukotr Ess*, 77, 45 – 50.
- 523 Tavilani, H., Goodarzi, M.T., Doosti, M. et al. (2008). Relationship between seminal
524 antioxidant enzymes and the composition of phospholipids and fatty acids of
525 spermatozoa. *Reprod. Biomed. Online*, 16, 649 – 656.
- 526 Ting-xi H., Hua-bin, Z., Wei-jun, S., Hai-sheng, H., Xue-ming, Z., Wei-hua, D., &
527 Zong-li, W. (2016). Pretreatment with sperm glutathione improves the development of
528 IVF embryos by increasing the viability and antioxidant capacity of bull semen classified
529 and not classified by sex. *J. Integ. Agric.*, 15, 2326 – 2335
- 530 Verstegen, J., Iguer-Ouada, M., & Onclin, K. (2002). Computer assisted semen analyzers
531 in andrology research and veterinary practice. *Theriogenology*, 57, 149-179.
- 532 Vianna, F.P., Papa, F.O., Zahn, F.S., Melo, C.M., & Dell'Aqua Jr, J. A. (2009).
533 Thermoresistance sperm tests are not predictive of potential fertility for cryopreserved
534 bull semen. *Animal Reproduction Science*, 113, 279–282.
- 535 Yeste, M., Flores, E., Estrada, E., Bonet, S., Rigau, T., & Rodríguez-Gil, J. E. (20013).
536 Reduced glutathione and procaine hydrochloride protect the nucleoprotein structure of
537 boar spermatozoa during freeze-thawing by stabilising disulfide bonds. *Reprod Fertil*
538 *Dev.*, 25(7), 1036-50.
- 539 Zadeh Hashem, E., Haddad, R., & Eslami, M. (2017). Evaluation of ram semen
540 enrichment with oleic acid on different spermatozoa parameters during low temperature
541 liquid storage. *Small Ruminant Research*, 150, 30-39.

5 CAPITULO III

*Artigo elaborado conforme as normas *Reproduction in Domestic Animals**

(ISSN 0936 - 6768, Impact factor 0.13)

Qualis B1 em Zootecnia/ Recursos Pesqueiros

1 **Atividade antioxidante do Eugenol na criopreservação do sêmen bovino**
2 *Antioxidant activity of Eugenol in cryopreservation of bovine sêmen*

3
4
5 **Yndyra Nayan Teixeira Carvalho Castelo Branco¹ | José Adalmir Torres de Sousa¹**

6
7 ¹Universidade Federal do Piauí, Laboratório de Biotecnologia e Reprodução Animal –
8 LBRA, Universidade Federal do Piauí – UFPI, Socopo, Cep - 64049-550, Teresina, Piauí,
9 Brasil.

10
11 Correspondence

12 Yndyra Castelo Branco

13 Email: yndyranayan1@hotmail.com

14
15
16 **Resumo**

17
18 Objetivou-se avaliar os efeitos da suplementação de eugenol ao diluidor de criopreservação
19 de sêmen bovino. Foram utilizados vinte ejaculados de quatro bovinos Curraleiro Pé-Duro.
20 Após as coletas o sêmen foi diluído em TRIS-Gema e suplementado ou não com eugenol
21 (10 μ M, 50 μ M). Os espermatozoides criopreservados foram submetidos à análise pós-
22 descongelamento, da motilidade total e o vigor espermático no teste de termorresistência
23 (TTR), integridade da membrana plasmática, integridade acrossomal, funcionalidade da
24 membrana espermática (HOST), cinética espermática, quantificação da lipoperoxidação
25 espermática, quantificação de GSH e teste de fertilização in vitro (FIV). O TTR reduziu
26 motilidade total e vigor para o grupo controle e todos os tratamentos. A suplementação de
27 eugenol não melhorou a cinética espermática. Houve redução na membrana acrossomal
28 intacta no grupo controle, quando incubados a 180 minutos e comparados ao tempo de 60
29 minutos. A quantidade de MDA foi menor no tratamento de 50 μ M de eugenol, quando
30 comparado ao grupo controle e ao tratamento de 10 μ M de eugenol. A atividade da enzima
31 Glutathiona reduzida (GSH) foi elevada em meio com 10 μ M e 50 μ M eugenol, quando
32 comparados ao controle. Em conclusão, a suplementação de Eugenol foi eficiente em
33 reduzir o estresse oxidativo espermático, além de preservar a integridade da membrana
34 acrossomal ao longo do tempo de incubação, no entanto não melhorou nenhum dos
35 parâmetros cinéticos avaliados.

36
37 **Palavras-chaves:** Curraleiro Pé-Duro, membrana plasmática, espécies reativas ao oxigênio,
38 glutathiona reduzida.

39
40
41 **1 | INTRODUÇÃO**

42 Os avanços biotecnológicos na reprodução animal refletem em um maior êxito na
43 produção e no melhoramento genético dos animais, capaz de maximizar a eficiência
44 reprodutiva. Neste aspecto, a criopreservação tem sido amplamente utilizada, devido aos
45 seus benefícios sobre o melhoramento genético de animais de produção, a otimização da
46 criação e exploração de macho através de programas de inseminação artificial (IA), e a
47 conservação de material genético de animais em vias de extinção, agindo sobre o

48 armazenamento do sêmen por prazo indefinido, através da congelação, em processo hábil
49 para interromper o metabolismo espermático (Lema, 2011; Morrell e Mayer, 2017).
50 Entretanto o processo de criopreservação induz a geração de espécies reativas ao oxigênio
51 (ROS), o qual é responsável por danificar os espermatozoides de mamíferos, provocando
52 alterações da motilidade, danos ao DNA e as membranas espermáticas (Simon et al. 2013)
53 e conseqüentemente redução na fertilização oocitária (Griveau e Le Lannou, 1997).

54 Uma forma de equilibrar a ação das ROS sobre as células espermáticas ocorre por
55 meio da ação das defesas antioxidantes endógenas presente no plasma seminal, que agem
56 removendo as ROS, ou a partir delas formando produtos intermediários não tóxicos (Reiter,
57 1998). Assim, existem várias evidências da atividade protetora dos componentes do sistema
58 antioxidante, como o combate a lipoperoxidação (LPO) e a apoptose espermática,
59 desempenhada por enzimas como, superóxido desmutase (SOD), catalase (CAT) (Ferreira e
60 Matsubara, 1997), Glutathione peroxidase (GSH) e Glutathione reduzida (GR), sendo esta
61 última capaz de alterar a suscetibilidade espermática sob as condições de criopreservação
62 (Gangwar et al., 2018).

63 Desta maneira, se as ROS visam o conteúdo lipídico da membrana celular,
64 conseqüentemente os danos estruturais da membrana, resultam em maior permeabilidade e
65 fluidez da membrana espermática (Banday et al., 2017), mesmo no sêmen com maior
66 viabilidade pós-descongelação (Cerolini et al., 2000).

67 No entanto, as crioinjúrias podem ser reduzidas pela adição de antioxidantes ao meio
68 diluidor durante a criopreservação, melhorando os parâmetros pós-descongelação de
69 motilidade e fertilização in vitro (Malo et al. 2010; Castelo Branco et al., 2017).

70 Em estudos sobre peroxidação lipídica Castelo Branco et al. (2017) observou que o
71 óleo essencial de limão (*Citrus limon*), foi eficiente na redução da LPO espermática. Outros
72 compostos, como o eugenol (4-alil-2-metoxifenol), um metoxifenol com uma cadeia curta
73 de hidrocarbonetos, e principal componente (80% –95%) fenólicos do óleo de cravo
74 (*Eugenia caryophyllata*), tem demonstrado atividade protetora sobre as células.

75 O eugenol por muito tempo foi utilizado como especiaria devido ao seu forte odor,
76 e como anti-séptico dentário devido ao seu efeito detergente, contudo atualmente vem sendo
77 estudado e evolutivamente ao progresso das pesquisas demonstra apresentar diversas
78 propriedades biológicas, inclusive atividade antioxidativa. Em estudos para estimar a
79 capacidade do eugenol em atuar como antioxidante observou-se um poder redutor efetivo
80 deste composto na capacidade de eliminação de radicais livres, demonstrado pela redução

81 de ferricianeto de potássio e cúprico (Cu^{2+}) e por métodos de redução quando comparados
82 com a-Tocoferol, BHT e BHA (Gülçin, 2011).

83 No entanto, ainda não existem evidências e estudos relativos ao eugenol (*Eugenia*
84 *caryophyllata*), na criopreservação espermática. Neste sentido o objetivo deste trabalho, foi
85 investigar os efeitos do eugenol na criopreservação espermática de touros, avaliado através
86 de importantes parâmetros de integridade, funcionalidade e produção de ROS no sêmen pós-
87 criopreservação.

88

89 **2 | MATERIAL E MÉTODOS**

90 **2.1 | Ética em experimentação animal**

91 O estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da
92 EMBRAPA MEIO NORTE, sob o protocolo de 001/2016.

93 **2.2 | Diluidores experimentais**

94 O diluidor Tris-Gema constituído a partir de 3,605 g de Tris; 2,024 g de ácido cítrico;
95 1,488g de frutose; 25 MG de gentamicina; 50.000 UI de penicilina; 100 mL de água
96 destilada; 20% de gema de ovo e 5% de glicerol, com osmolaridade de 350 mOsm/kg e pH
97 6,8, foi utilizado para diluição e congelamento do sêmen. Três diluidores experimentais
98 diferentes foram preparados na seguinte disposição: Controle, 10 μM e 50 μM de eugenol,
99 adicionados ao diluidor Tris-Gema.

100 **2.3 | Animais**

101 Foram utilizados 04 touros da raça Curraleiro Pé-Duro (*Bos taurus taurus*),
102 provenientes da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – EMBRAPA Meio Norte
103 localizada na cidade de Campo Maior, Piauí, Brasil. Os touros foram mantidos sob regime
104 extensivo, em pastejo de gramíneas nativas, com água e sal mineral ad libitum e avaliados
105 quanto à normalidade dos parâmetros andrológicos antes do estudo, de acordo com as
106 recomendações do Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (motilidade em massa: ≥ 3 ;
107 motilidade espermática: $\geq 60\%$; concentração: 350 milhões de espermatozoides / mL;
108 número total de espermatozoides no ejaculado: 3 a 5 bilhões; espermatozoides
109 morfolologicamente normais: $\geq 70\%$; defeitos maiores de espermatozoides: $\leq 10\%$; defeitos
110 menores de espermatozoides: $\leq 20\%$; : $\leq 5\%$; defeitos individuais menores: $\leq 10\%$) (CBRA,
111 2013).

112 **2.4 | Coleta de sêmen e avaliação inicial**

113 Foram coletados cinco ejaculado por touro, com um eletroejaculador (Biocon ®
114 Soluções para Biotecnologia, Uberaba, Brasil), totalizando 20 ejaculados. Após a coleta,

115 cada ejaculado foi diluído com Tris-Gema (3,605 g de Tris; 2,024 g de ácido cítrico; 1,488g
116 de frutose; 25 MG de gentamicina; 50.000 UI de penicilina; 100 ml de água destilada; 20%
117 de gema de ovo e 5% de glicerol, com osmolaridade de 350 mOsm/kg e pH 6,8), e dividido
118 igualmente em três alíquotas: Controle (Tris-Gema sem adição de eugenol, Sigma-Aldrich®,
119 St. Louis, MO, USA), Tris-Gema + 10 µM de eugenol; Tris-Gema + 50 µM de eugenol.

120 **2.5 | Criopreservação do sêmen**

121 Imediatamente após a coleta e processamento, as amostras de sêmen dos cinco
122 tratamentos foram envasadas em palhetas de 0,25 mL, à temperatura ambiente, para uma
123 concentração final de 20×10^6 espermatozoides viáveis / palheta, e então foram congeladas
124 em máquina TK 3000® (TK Tecnologia em congelação Ltda., Uberaba, Brasil), ajustada
125 para uma taxa de resfriamento de $-0,5 \text{ }^\circ\text{C} / \text{min}$ da temperatura ambiente ($25 \text{ }^\circ\text{C}$) até que a
126 temperatura de $5 \text{ }^\circ\text{C}$ fosse atingida. Após estabilização a $5 \text{ }^\circ\text{C}$ por 1 hora, o congelamento
127 foi realizado a $-20 \text{ }^\circ\text{C} / \text{min}$ até atingir uma temperatura de $-120 \text{ }^\circ\text{C}$, quando as palhetas
128 foram colocadas diretamente em nitrogênio líquido ($-196 \text{ }^\circ\text{C}$), e armazenadas até o tempo
129 de análise pós-criopreservação. A descongelação ocorreu em banho-maria a 37°C por 30
130 segundos, para avaliação quanto à motilidade total e vigor no teste de termo resistência
131 (TTR), cinética espermática, integridade da membrana plasmática e acrossomal,
132 funcionalidade da membrana plasmática, cinética espermática, quantificação da
133 lipoperoxidação da membrana espermática, determinação da concentração de glutathione
134 reduzida e teste de fertilidade *in vitro*, conforme descrito a diante.

135 **2.6 | Teste de termorresistência (TTR)**

136 O teste de termorresistência foi realizado de acordo Viana et al. (2009), o qual
137 consistiu em verificar a longevidade das amostras de sêmen descongeladas. Uma alíquota de
138 10µl de sêmen descongelado foi incubada a $37 \text{ }^\circ\text{C}$ em banho-maria, e avaliada quanto à
139 motilidade total e o vigor espermático por meio de microscopia de contraste de fase
140 (Olympus optical Co., Ltda., Tóquio, Japão) com placa aquecedora acoplada, aumento de
141 400x, nos tempos 0, 60, 120 e 180 minutos.

142 **2.7 | Avaliação da cinética espermática**

143 A cinemática espermática foi avaliada por meio de um Sistema de Análises de
144 espermatozoide Computadorizado (CASA). O CASA consistiu de um sistema de
145 microscopia óptica de contraste de fase (Nikon TM H5505, Eclipse 50i, Japão), com
146 iluminação estroboscópica, e uma fase quente a 37°C , uma câmera de vídeo (Basler Visão
147 Technologie TM A312FC, Ahrensburg, Alemanha) e um PC com o analisador de esperma
148 Classe TM software (Microptics, SL, versão 3.2.0, Barcelona, Espanha). As variáveis

149 avaliadas foram: motilidade progressiva (MOP-- $\mu\text{m/s}$), velocidade curvilinear (VCL -
150 $\mu\text{m/s}$), velocidade em linha reta (VSL - $\mu\text{m/s}$), velocidade média do percurso (VAP- $\mu\text{m/s}$),
151 linearidade (LIN - %), retilinearidade (STR-%), deslocamento lateral de cabeça (ALH - μm),
152 Wobble (WOB - %) e frequência de batimento cruzado (BCF-Hz), para cada espermatozoide
153 analisado.

154 **2.8 | Análise da integridade da membrana plasmática**

155 Para avaliação da integridade da membrana plasmática, utilizou-se o método de
156 coloração dupla com diacetato de carboxifluoresceína (DCF; Sigma-Aldrich®, St. Louis,
157 MO, USA) e iodeto de propídio (IP; Sigma-Aldrich®, St. Louis, MO, USA), modificado por
158 Coletto et al. (2002), em que alíquotas de 50 μL de sêmen pós descongelado foram diluídas
159 em 150 μL de Tris, 5 μL de DCF e 20 μL de IP e incubadas por 10 min a 37°C. Foram avaliados
160 200 espermatozoides em microscópio de epifluorescência (400x; Olympus optical Co.,
161 Ltda., Tóquio, Japão), usando-se filtro de emissão DBP 580- 630nm e excitação DBP
162 485/20nm.

163 **2.9 | Análise da integridade acrossomal**

164 Para avaliação da integridade da membrana acrossomal, utilizou-se o corante
165 isotiocianato de fluoresceína conjugado a Peanut agglutinin (FITC-PNA; Sigma-Aldrich®,
166 St Louis, MO, USA), de acordo com a técnica descrita por Roth et al. (1998), em que
167 alíquotas de 20 μL de FITC-PNA foram colocadas sobre esfregaços de lâminas contendo
168 espermatozoides, as quais foram incubadas por 20 minutos em câmara úmida a 4°C, na
169 ausência de luz. Após incubação, as lâminas foram enxaguadas duas vezes em PBS
170 refrigerado (4°C) e colocadas para secagem na ausência de luz. Imediatamente antes da
171 avaliação, 5 μL de meio de montagem UCD foram colocados sobre a lâmina e cobertos com
172 lamínula. Foram avaliados 200 espermatozoides em microscópio de epifluorescência (400x;
173 Olympus optical Co., Ltda., Tóquio, Japão), e a integridade expressa em porcentagem.

174 **2.10 | Teste de funcionalidade da membrana espermática pós-criopreservação**

175 A funcionalidade da membrana espermática foi avaliada por meio do teste
176 hiposmótico (HOST) a partir de uma alíquota de 10 μL de sêmen pós - criopreservado
177 adicionada a 1000 μL de solução hiposmótica constituída de citratotrisódico – frutose,
178 obedecendo a uma concentração de 150 mOsm/L, conforme Fonseca et al. (2005) e
179 incubados em Banho – Maria a 37°C, durante 60 minutos. Após este período, as amostras
180 foram analisadas em microscopia de contraste de fase, sob aumento de 400 vezes e contagem
181 de 100 células. As células foram classificadas quanto à presença ou não de cauda dobrada,
182 segundo descrito por Kumi-Diaka (1993).

183 **2.12 | Quantificação da lipoperoxidação da membrana espermática**

184 A taxa de peroxidação lipídica dos espermatozoides foi estimada pela medida do
185 nível de malonaldeído (MDA), utilizando o ácido tiobarbitúrico (TBA), baseado no
186 método descrito por Buege e Aust (1978). Os níveis de malonaldeído foram medidos após
187 a suplementação de 500 µL de sêmen pós-criopreservado, mais Tampão Tris-ácido cítrico,
188 pH 7.4, adicionado a 1mL do reagente TBA (15% de ácido tricloroacético; 0,25N de ácido
189 clorídrico e 0,375% de ácido tiobarbitúrico) e 1% (v/v) de BHT 50mM. A mistura foi tratada
190 em água fervente (100 ° C) durante 15 min. Posteriormente as amostras foram resfriadas, e
191 centrifugadas 1.200g por 15 min. O sobrenadante foi removido e a absorbância foi medida
192 a 535 nm em espectrofotômetro UV-VIS (Perkin Elmer - Lambda 25). A concentração de
193 MDA foi determinada pela curva de calibração feita diariamente com malonaldeído (MDA)
194 como padrão, nas concentrações de 1 a 20mmol. O MDA produzido foi expresso em µmol
195 de TBARS/ml de diluidor.

196 **2.13 | Método da determinação dos níveis de glutathiona reduzida (GSH)**

197 A determinação da concentração de GSH foi baseada na reação de Ellman (5,5'-
198 ditiobis (ácido 2-nitrobenzoico), conforme algumas modificações da técnica descrita por
199 Khan et al. (2011). Em um tubo contendo tampão EDTA pH 5,4, foram adicionados 400 µL
200 de sêmen, acrescidos de 320 µL de água destilada, mais 80 µL de ácido tricloroacético a
201 50%. O material foi agitado e centrifugado a 3000 rpm por 15 minutos. Em seguida, foram
202 recolhidos 400 µL do sobrenadante e acrescido de 800 µL de tampão Tris-HCl 0,4 M, pH
203 8,9 e mais 20 µL de DTNB 0,01 M; após 1 minuto de reação, foi feita a leitura em
204 espectrofotômetro em 412 nm. A concentração foi expressa em µM/mL. Para a curva padrão
205 da glutathiona foram feitas soluções de glutathiona a 6,66; 13,33; 26,66; 40; 53,33 e 66 µM.

206 **2.14 | Teste de fertilidade in vitro**

207 Os complexos *cumulus-oócitos* (CCOs) foram coletados por aspiração folicular de
208 ovários obtidos de um matadouro local. Foram considerados adequados para o *cultivo in*
209 *vitro* os oócitos com três ou mais camadas de células do cumulus compactas, grau I e II, com
210 citoplasma homogêneo ou apresentando pequenas irregularidades (Leibfried e First, 1979).
211 Os CCOs selecionados foram submetidos à maturação *in vitro* em meio TCM-199 acrescido
212 de 2,4 mM de NaHCO₃; 2,2 mg/mL de piruvato de sódio; 5 µg/mL de LH; 5 µg/mL de FSH;
213 100 ng/µl de eGF; 1 µg/mL de estradiol; 50 µM de cisteína; 10% de SFB e 1% de
214 gentamicina, por 24 horas, em estufa incubadora à 38,5°C com 5% de CO₂ e 95% de
215 umidade. Após a maturação, todos os oócitos foram fertilizados com sêmen criopreservado,

216 das duas diferentes raças, em meio base TRIS, preparado segundo a técnica de gradiente de
217 Percoll.

218 A fertilização *in vitro* foi realizada em gotas de 100µl de meio Fert-Talp acrescido de
219 10µg/ml de heparina, cobertas com óleo mineral, com concentração espermática de 1×10^6
220 espermatozoides vivos/ml, co-incubados em atmosfera de 5% de CO₂, a 38,5 °C por 22
221 horas. Para a avaliação da taxa de fertilidade, os presumíveis zigotos foram submetidos ao
222 cultivo *in vitro* em estufa com atmosfera de 5% de CO₂, a 38,5 °C. Após 48 horas de cultivo
223 os presumíveis zigotos foram avaliados quanto a taxa de clivagem.

224 **2.15 | Delineamento e Análise estatística**

225 O delineamento experimental foi em bloco ao acaso, com três tratamentos, quatro
226 blocos (animais) e cinco repetições (coletas). As variáveis motilidade e vigor no teste de
227 termorresistência (TTR), integridade da membrana plasmática, integridade acrossomal e
228 cinética espermática pós-descongelção, foram submetidas a análise de variância (ANOVA)
229 utilizando-se o procedimento modelos lineares gerais (Proc GLM) e para comparação de
230 média foi utilizado o teste Student-Newman-Keuls, na probabilidade de 5%. As análises
231 foram executadas através do programa Statistical Analysis System (SAS Institute Inc, 2013).

232 A taxa de clivagem foi avaliada pelo teste de Qui-quadrado a 5% de probabilidade
233 de erro. A quantificação da glutathiona reduzida e de malonaldeído foi submetida a Análise
234 de Variância (ANOVA), seguido de Tukey como post hoc teste, na probabilidade de 5%. As
235 análises foram realizadas por meio do software GraphPad Prism 6.01 (GraphPad Software,
236 EUA, 2012).

237

238 **3 | RESULTADOS**

239 As alterações dos parâmetros de motilidade e vigor de espermatozoides bovinos após
240 a criopreservação em diferentes concentrações: controle, (10µM e 50µM) de eugenol, em
241 tempo progressivo, 0, 60, 120 e 180 minutos, de incubação à 37°C, são mostrados na Tabela
242 1. Em geral, o sêmen apresentou valores significativamente menores de motilidade e vigor
243 espermático após a descongelção e progressivamente decrescentes ao longo tempo. Embora
244 os espermatozoides dos tratamentos e do controle, apresentassem valores significativamente
245 maiores após a descongelção, o tempo de incubação reduziu a porcentagem de
246 espermatozoides com motilidade total, no entanto ao observar os tempos 120 e 180 minutos
247 para este parâmetro, não se identificou diferenças significativas ($P > 0,05$), entre os grupos
248 em estudo. Para vigor, observou-se que o controle e os tratamentos obtiveram um decréscimo
249 em função do tempo, contudo para os tratamentos (10µM e 50µM) de eugenol, nos tempos

250 de 120 e 180 minutos não foram observadas diferenças significativas ($P < 0,05$), após o
251 estresse térmico.

252 **Tabela 1** - Motilidade total (%) e vigor (1 - 5) pós-descongelação de espermatozoides bovinos, criopreservados sobre a adição de diferentes
 253 concentrações (10 μ M e 50 μ M) de eugenol, avaliados pelo teste de termo resistência (TTR)

Tratamentos	N	0 minutos		60 minutos		120 minutos		180 minutos	
		Motilidade	Vigor	Motilidade	Vigor	Motilidade	Vigor	Motilidade	Vigor
Controle	20	46.50 + 8.75 ^a	2.70 + 0.65 ^A	33.50 + 12.15 ^b	1.90 + 0.85 ^B	17.50 + 6.58 ^c	0.80 + 0.69 ^C	12.75 + 5.49 ^c	0.30 + 0.57 ^D
10 μM	20	50.50 + 11.90 ^a	2.90 + 0.44 ^A	32.50 + 11.06 ^b	2.05 + 0.75 ^B	15.75 + 6.74 ^c	0.60 + 0.68 ^C	12.80 + 4.40 ^c	0.35 + 0.48 ^C
50 μM	20	48.00 + 11.05 ^a	2.75 + 0.44 ^A	32.50 + 12.82 ^b	1.95 + 0.88 ^B	15.75 + 6.54 ^c	0.65 + 0.67 ^C	12.80 + 4.40 ^c	0.35 + 0.48 ^C

254 Valores de média com letras minúsculas diferentes na mesma linha indicam diferenças significativas entre os tempos para motilidade ($p < 0,05$) pelo teste de Student-Newman-
 255 Keuls.

256 Valores de média com letras maiúsculas diferentes na mesma linha indicam diferenças significativas entre os tempos para vigor ($p < 0,05$) pelo teste de Student-Newman-Keuls.

257

258

259 Os resultados da avaliação de integridade da membrana plasmática (MP) e integridade da membrana acrossomal (MA) do sêmen
 260 descongelado de touros, criopreservados sob adição de diferentes concentrações de eugenol, e avaliados por sondas fluorescentes, estão apresentados
 261 na tabela 2. As porcentagens desta avaliação mostraram que não houve diferença estatística ($p > 0,05$) entre os tratamentos trabalhados para o
 262 parâmetro de MP, como também não diferiram ($p > 0,05$) ao longo do tempo de incubação, assim tanto o controle quanto as diferentes concentrações
 263 (10 μ M e 50 μ M) de eugenol, foram capazes de manter a integridade da MP. Já para a avaliação de MA observou-se diferença estatística ($p < 0,05$)
 264 entre os tempos e os tratamentos. A porcentagem de espermatozoides com membranas acrossomal intacta no controle, foi maior ao tempo de 60
 265 minutos, diferindo somente para o tempo de 180 minutos. Para o mesmo parâmetro o eugenol em suas diferentes concentrações não diferiu com a
 266 progressão do tempo de incubação, mantendo a integridade da MA.

267

268

269 **Tabela 2** - Integridade da membrana plasmática, e Integridade da membrana acrossomal pós-descongelamento de sêmen criopreservado de touros,
 270 sobre a adição de duas diferentes concentrações (10 µM e 50 µM) de eugenol

Tratamentos	N	0 minutos		60 minutos		120 minutos		180 minutos	
		<i>M. Plasmática</i>	<i>M. Acrossomal</i>	<i>M. Plasmática</i>	<i>M. Acrossomal</i>	<i>M. Plasmática</i>	<i>M. Acrossomal</i>	<i>M. Plasmática</i>	<i>M. Acrossomal</i>
0 µM	20	51.90 ± 19.72 ^a	55.15 ± 25.52 ^{AB}	52.05 ± 16.88 ^a	67.55 ± 22.45 ^A	46.70 ± 19.25 ^a	53.10 ± 20.41 ^{AB}	42.85 ± 19.01 ^a	48.35 ± 23.22 ^B
10 µM	20	50.55 ± 21.95 ^a	58.05 ± 23.71 ^A	47.40 ± 22.05 ^a	58.45 ± 23.88 ^A	47.60 ± 23.87 ^a	49.40 ± 28.37 ^A	40.65 ± 19.92 ^a	55.65 ± 24.44 ^A
50 µM	20	51.80 ± 24.66 ^a	51.50 ± 28.91 ^A	42.60 ± 22.53 ^a	62.60 ± 24.60 ^A	43.15 ± 22.00 ^a	56.65 ± 23.38 ^A	40.60 ± 21.47 ^a	46.95 ± 21.82 ^A

271 Os valores são expressos como média ± desvio padrão (DP)

272 Valores de média com letras minúsculas diferentes na mesma linha indicam diferenças significativas (p<0,05) para membrana plasmática, pelo teste de Student-Newman-Keuls.

273 Valores de média com letras maiúsculas diferentes na mesma linha indicam diferenças significativas (p<0,05) para membrana acrossomal, pelo teste de Student-Newman-Keuls.

274

275

276 As mudanças dos indicadores cinéticos e da funcionalidade da membrana plasmática do sêmen bovino pós-descongelamento, avaliado por
 277 meio da análise computadorizada - CASA e pelo teste hiposmótico (HOST%) respectivamente, encontram-se dispostos na Tabela 3. Na qual as
 278 diferentes concentrações de eugenol não afetaram os parâmetros de cinética espermática, e funcionalidade da membrana plasmática, exceto para
 279 VSL, VAP e WOB.

280 Após a descongelamento, a VSL foi significativamente maior (p<0,05) no tratamento Eugenol – 50 µM, do que no controle e no tratamento
 281 Eugenol – 10µM. Para WOB não houve diferença (p>0,05) entre os tratamentos Eugenol – 10 µM e Eugenol – 50 µM, no entanto para o mesmo
 282 parâmetro o tratamento Eugenol – 50 µM, mostrou-se significativamente maior (p<0,05), quando em comparação ao controle. Em relação ao VAP
 283 o controle foi estatisticamente maior (p<0,05) que o tratamento Eugenol – 50 µM, contudo não diferindo do tratamento Eugenol – 10 µM.

284

285

286 **Tabela 3** - Parâmetros da cinética espermática e funcionalidade da membrana plasmática, na pós-descongelção de doses seminais bovinas
 287 diluídas em TRIS-gema e suplementada com diferentes concentrações (10 μ M e 50 μ M) de eugenol

Parâmetros de motilidade	N	Tratamentos		
		Controle	Eugenol 10 μ M	Eugenol 50 μ M
<i>MT</i>	20	38.20 \pm 22.77	37.30 \pm 22.93	41.20 \pm 20.55
<i>MP</i>	20	15.00 \pm 2.53	15.70 \pm 3.65	17.75 \pm 8.52
<i>VCL</i>	20	13.85 \pm 13.70	13.35 \pm 13.35	13.05 \pm 11.31
<i>VSL</i>	20	8.45 \pm 10.02	10.50 \pm 14.26	23.15 \pm 26.19
<i>VAP</i>	20	59.35 \pm 17.93	52.55 \pm 25.14	43.00 \pm 29.87
<i>LIN</i>	20	6.70 \pm 5.74	8.45 \pm 8.43	12.15 \pm 10.63
<i>STR</i>	20	25.65 \pm 8.67	22.00 \pm 11.17	19.35 \pm 13.49
<i>WOB</i>	20	6.85 \pm 7.19	12.05 \pm 13.65	16.30 \pm 14.70
<i>ALH</i>	20	34.75 \pm 11.04	16.05 \pm 16.65	25.90 \pm 17.01
<i>BCF</i>	20	10.80 \pm 14.26	18.60 \pm 19.89	18.20 \pm 18.71
<i>HOST (%)</i>	20	45.10 \pm 14.75	37.20 \pm 13.88	35.60 \pm 15.54

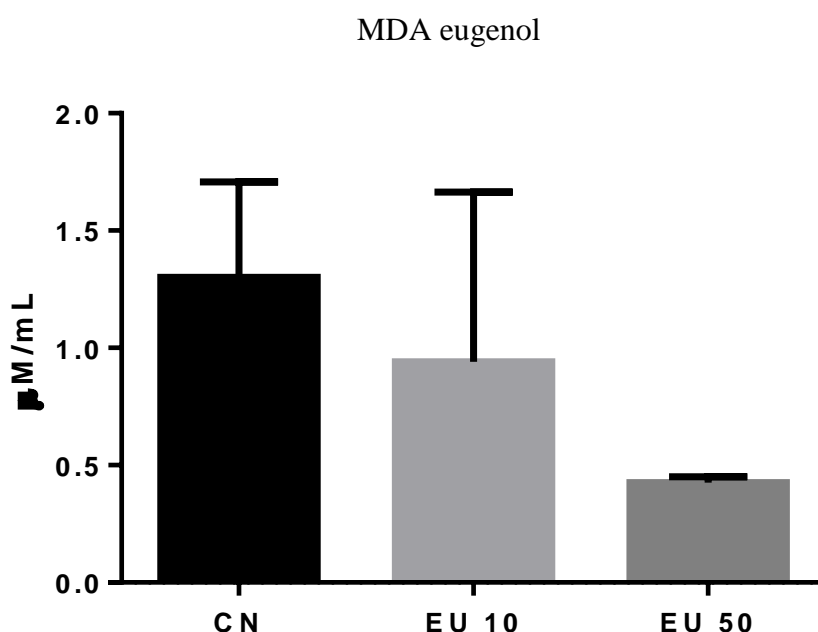
288 Os valores são expressos como média \pm desvio padrão (DP)

289 **MP** - motilidade progressiva; **VCL** – velocidade curvilínea; **VSL** - velocidade em linha reta; **VAP** – velocidade média de percurso; **LIN** - linearidade; **STR** -
 290 retilinearidade; **WOB** – Oscilação; **ALH** - Amplitude de deslocamento lateral da cabeça e **BCF** - frequência de batimentos de cauda.

291 Valores de média com letras minúsculas diferentes na mesma linha indicam diferenças significativas (P <0,05) pelo teste de Student-Newman-Keuls.

292 Os resultados da quantificação da lipoperoxidação da membrana espermática
293 (MDA) e da quantificação de GSH do sêmen descongelado de touros estão apresentados
294 nas Figuras 1 e 2. A inclusão de eugenol no sêmen não induziu a alterações no padrão
295 de absorvância de MDA, entre os tratamentos estudados, não havendo diferença
296 significativas ($p < 0,05$) entre as amostras. No entanto para a quantificação de GSH
297 observou-se que os tratamentos Eugenol - $10\mu\text{M}$ e Eugenol - $50\mu\text{M}$ não diferiram
298 ($p < 0,05$) entre si, alcançando valores maiores que o controle.

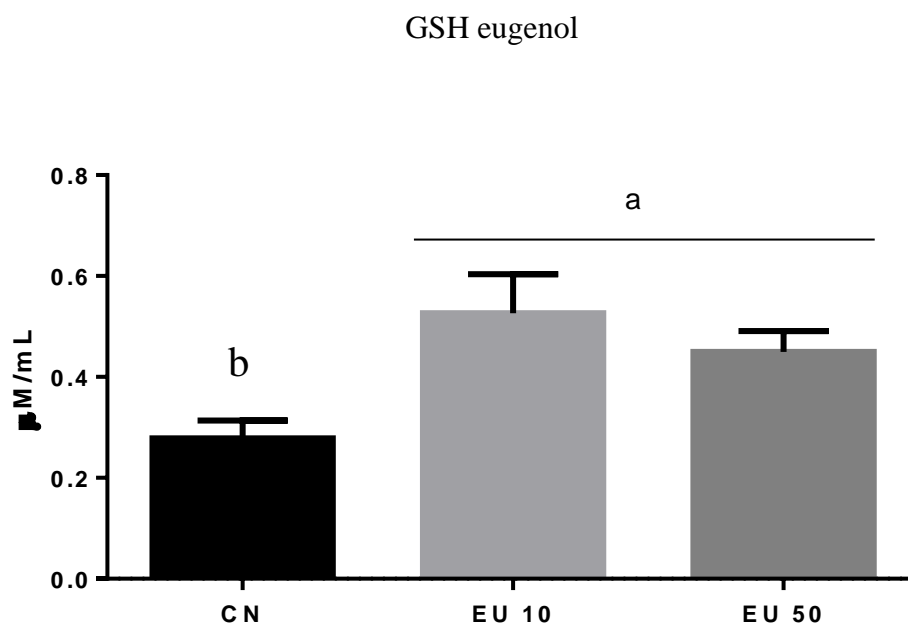
299
300
301



302
303
304
305
306
307
308
309
310
311
312
313
314
315
316
317
318
319
320

Figura 1 - Quantificação da lipoperoxidação da membrana espermática (MDA) em sêmen pós-criopreservado de touros, suplementados com diferentes concentrações ($10\mu\text{M}$ e $50\mu\text{M}$) de eugenol. MDA: Malondialdeído. CN: Controle. EU10: Eugenol $10\mu\text{M}$. EU50: Eugenol $50\mu\text{M}$. Os valores representam a média \pm D.P.M. Não foram observadas diferenças entre os grupos utilizando Análise de Variância (ANOVA), seguido de Tukey como post hoc teste, $p < 0,05$.

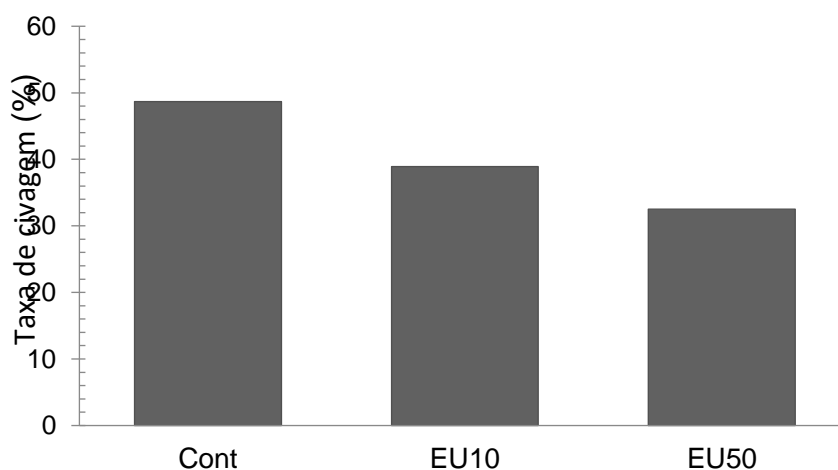
321
322
323



324 **Figura 2** - Quantificação de GSH em sêmen pós-criopreservado de touros, suplementados
325 com diferentes concentrações (10 µM e 50 µM) de eugenol. GSH: Glutathiona reduzida.
326 CN: controle. EU10: Eugenol 10µM. EU50: Eugenol 50µM. Os valores representam a
327 média ± D.P.M. As diferenças entre os grupos foram determinadas por Análise de
328 Variância (ANOVA), seguido de Tukey como post hoc teste, $p < 0,05$.

330
331
332
333
334
335

Não houve diferença significativa (Fig. 3; $p > 0,05$) na taxa de fertilização *in vitro*
com espermatozoides criopreservados em meio de congelação suplementado com
diferentes concentrações de eugenol (10 µM e 50 µM).



336
337
338
339
340

Figura 3 – Taxa de fertilização *in vitro*, utilizando sêmen bovino criopreservado em
TRIS-gema, suplementado com diferentes concentrações (10, 50 µM) de eugenol. **Cont.**
– Controle; **E10** – 10 µM de eugenol, **E50** – 50 µM de eugenol.

341 4 | DISCUSSÃO

342

343 A criopreservação de sêmen é uma técnica eficiente na conservação de material
344 genético. Entretanto sempre induz, mesmo que em proporções variadas, danos na membrana
345 plasmática dos espermatozoides, liberando fosfolipídios no meio circundante durante o
346 choque térmico e tornando-se transiente por causa das transições de fase lipídica (Watson,
347 1995). Danos à membrana pode interferir na motilidade espermática, que é uma das
348 características mais importantes associadas à capacidade de fertilização dos
349 espermatozoides, pois é essencial para o seu transporte através do trato reprodutivo
350 feminino. Neste estudo, em relação à porcentagem de espermatozoides progressivos,
351 observou-se que houve interação entre a qualidade espermática e o tempo, o qual reduziu os
352 parâmetros de motilidade total, e vigor espermático ao longo do teste de termo-resistência.
353 Consistentes com as observações de Barros et al. (2013), que verificaram uma redução
354 progressiva nos valores de motilidade e vigor com o aumento do tempo de incubação, sendo
355 possível, assim atribuir a este decréscimo, um aumento no consumo de substâncias nutritivas
356 nos primeiros períodos do teste, além das perdas de componentes intracelulares ou de lesões
357 estruturais na cauda dos espermatozoides, como também alteração na disponibilidade de
358 nucleotídeos cíclicos, envolvidos com a fosforilação oxidativa e com a motilidade
359 espermática, diminuindo sua viabilidade durante as duas primeiras horas. Contrário aos
360 estudos de Kiernan et al. (2013), neste experimento os tratamentos não interferiram sobre a
361 motilidade, mantendo - se estatisticamente igual ao controle ao longo de três horas (Kiernan
362 et al., 2013).

363 Os resultados deste trabalho mostraram que o eugenol não foi eficiente em aumentar
364 nenhum dos parâmetros cinéticos.

365 Sabe-se que os parâmetros de VAP, VSL, VCL e ALH em alguns estudos têm sido
366 correlacionados com a taxa de fertilização, de forma que esta correlação é positivamente
367 maior quando a taxa de fertilização oocitária for $\geq 50\%$ (Michos et al., 2013). A avaliação
368 pelo CASA permite análises mais precisas na mensuração da capacidade de fertilização do
369 sêmen criopreservado de touros (Ntemka et al., 2016).

370 Observou-se neste estudo que o eugenol não melhorou o percentual de membrana
371 plasmática, quando comparado ao controle, no entanto os grupos em estudo preservaram a
372 integridade da MP ao longo do tempo, e as concentrações de 10 e 50 μ M de eugenol
373 preservaram na progressão do tempo a integridade da MA. Gangwar et al. (2018), ao

374 verificarem a ação da glutathione reduzida (GSH) ao diluidor de criopreservação espermática,
375 observaram que esta aumentou a motilidade e o percentual de acrossomas intacto.

376 As membranas plasmática e acrossomal apresentam grande importância para os
377 processos de capacitação espermática e reação acrossomal, essenciais à fertilização, sendo a
378 membrana plasmática responsável pela manutenção da homeostase celular (Campanholi et
379 al., 2017). Nagy et al. (2004) estudaram a resistência de espermatozoides a incubação a 37
380 °C por um período de 4 h, e assim verificaram que após este tempo os espermatozoides
381 apresentaram alterações nas membranas plasmática e acrossomal, observando que a
382 população de espermatozoides vivo com acrossoma intacto, e espermatozoides mortos com
383 acrossoma intacto diminuiu ligeiramente, enquanto os espermatozoides mortos com
384 acrossoma danificado aumentou, sendo ainda observado, um aumento da exocitose
385 acrossomal.

386 A produção de ROS induzida pelo processo de criopreservação, compromete a
387 funcionalidade e a integridade das membranas espermáticas. No entanto a capacidade
388 antioxidativa do sêmen desempenhada por substâncias endógenas é capaz de minimizar a
389 ação estressante sobre os espermatozoides, contudo a relação entre a produção e eliminação
390 de ROS determina a severidade do dano celular, e não apenas a presença ou ausência de
391 antioxidantes no sêmen (Sariözkan et al., 2009; Campanholi et al., 2017).

392 Devido à inabilidade dos espermatozoides em sintetizar componentes de membrana
393 e baixa capacidade antioxidante, os espermatozoides tornam-se mais suscetíveis a danos por
394 ROS (Jones e Mann, 1977). As fases de criopreservação, incluindo diluição, resfriamento,
395 equilíbrio e congelamento, enfraquecem a atividade antioxidante seminal natural (Shahzad
396 et al., 2016). Neste experimento, a quantificação da lipoperoxidação da membrana
397 espermática, através do MDA não diferiu entre os diferentes tratamentos em estudo,
398 correlacionando negativamente com a redução da motilidade total e vigor observado ao
399 longo do tempo de incubação do sêmen descongelado, pela termo resistência a 37°C.
400 Corroborando com o presente trabalho, Liu et al. (2014), estudando as ROS observou a
401 atividade da SOD, CAT, GSH e MDA no sêmen criopreservado, sob a adição de 100 mM
402 trealose e 50 mM taurina, verificando que não foram significativamente diferentes do
403 controle. Da mesma forma, Bucak et al. (2007) demonstraram que o conteúdo de SOD,
404 CAT e GSH em espermatozoides de carneiros não se alterou significativamente ($p > 0,05$)
405 entre espermatozoides congelados e descongelados, no controle ou sob a adição de
406 antioxidante.

407 A glutathiona reduzida (GSH) , foi quantificada no presente estudo, e observou-se que
408 os tratamentos de eugenol diferiram significativamente ($p < 0,05$) em relação ao controle,
409 aumentando a taxa de GSH no sêmen descongelado (Gangwar et al.,2018). A glutathiona está
410 presente no plasma seminal e tem uma propriedade antioxidante potente, mas após a diluição
411 do sêmen ela se dilui e a propriedade antioxidante seminal é reduzida. O mecanismo exato
412 do GSH na regulação do potencial transmembrana mitocondrial é desconhecido até o
413 momento, no entanto sabe-se que o GSH pode melhorar a qualidade do sêmen protegendo
414 as pontes dissulfeto e assim, manter a estrutura nuclear do espermatozoide (Yeste et al.,
415 2012).

416 O Eugenol apresenta efeitos antioxidante protetores da célula, e refletiu tal ação sobre
417 o aumento na produção de GSH. O eugenol supostamente protege a célula dos danos
418 oxidativo mediado por superóxido.

419 A taxa de fertilização neste estudo não diferiu entre os tratamentos e o controle.
420 Estudos recentes demonstraram que muitas proteínas presentes no plasma seminal bovino
421 desempenham um papel importante nos processos de maturação, proteção, capacitação,
422 reação acrossômica e fertilização espermática (Juyena e Stelletta, 2012). No entanto, os
423 efeitos antioxidativos do eugenol não refletiram sobre a taxa de fertilização.

424 **5 | CONCLUSÃO**

425 A suplementação de Eugenol foi eficiente em reduzir o estresse oxidativo
426 espermático, além de preservar a integridade da membrana acrossomal ao longo do tempo
427 de incubação, no entanto não melhorou nenhum dos parâmetros cinéticos avaliados.

428

429 **REFERÊNCIAS**

430

- 431 Banday, MN, Lone, F.A, Rasool, F, Rashid, M, Shikari, A (2017) Use of antioxidants reduce
432 lipid peroxidation and improve quality of crossbred ram sperm during its
433 cryopreservation. *Cryobiology*.74, 25-30.
- 434 Bucak, M.N.; Atessahin, A.; Varisli, O.; Yuge, A.; Tekin, N.; Akçay, A. The influence of
435 trehalose, taurine, cysteamine and hyaluronan on ram semen Microscopic and
436 oxidative stress parameters afer freeze-thawing process. *Theriogenology*, v.67, n.15,
437 p.1060-1067, 2007.
- 438 Buege, J.A.; Aust, S.D. Microsomal Lipid Peroxidation. *Methods in Enzymology*, v.52,
439 p.302-10,1978.
- 440 Campanholi, S.P.; Monteiro, F.M.; Dias, E.A.R.D.; Mercadante, M.E.Z.; Paz,
441 C.C.P.; Dell'aqua Junior, J.A.; Papa, F.O.; Dell'aqua, C.P.F.; Vantini, R.; Garcia,
442 J.M. Efeito da remoção do plasma seminal antes da criopreservação de sêmen bovino

- 443 obtido por eletroejaculação na qualidade do sêmen e fertilidade in vitro.
444 *Theriogenology*, v.89, p.114–121,2017.
- 445 Castelo Branco, MA, Carvalho, YNT, Moraes Júnior, FJ, Barros, FN, Barçante, FPS,
446 Carvalho, GMC, Evangelista, LSM, Silva, ALA, Sousa Filho, MA, Sousa,
447 JAT(2017). Plasminogen activator inhibitor 1 and antipain preserve acrosome
448 integrity of bovine spermatozoa during cryopreservation. *Arquivo Brasileiro de*
449 *Medicina Veterinária e Zootecnia*. 69,5, 1114-1124.
- 450 CBRA. Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (2013). ‘Manual para exame andrológico
451 e avaliação de sêmen animal’. (CBRA: Belo Horizonte)
- 452 Cerolini, S, Maldjian, A, Surai, P, Noble, R (2000). Viability susceptibility to peroxidation
453 and fatty acid composition of boar semen during liquid storage. *Anim. Reprod. Sci.*
454 58, 99–111.
- 455 Coletto, Z. F., Guerra, M. M. P., and Batista, A. M. (2002). Avaliação do sêmen 489
456 congelado de caprinos com drogas fluorescentes. *Rev. Bras. Med. Vet.* 24, 101-104.
- 457 Ferreira, A. L. A.; Matsubara, L. S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema
458 de defesa e estresse oxidativo. *Revista da Associação Medica Brasileira*, v.43, n.1,
459 p.61-68, 1997.
- 460 Fonseca, J. F.; Torres, C. A. A.; Maffili, V. V; Borges, A. M.; Santos, A. D. F.; Rodrigues,
461 M. T.; Oliveira, R. F. M. The hypoosmotic swelling test in
462 fresh goat spermatozoa. *Animal Reproduction*, v. 2, p. 139-144, 2005.
- 463 Gangwar, C.; Saxena, A.; Patel, A.; Singh, S.P.; Yadav, S.; Kumar, R.; Singh, V. Efeito da
464 suplementação reduzida de glutathione em crioinjuriados espermatócitos induzidos por
465 criopreservação em sêmen de touros Murrah. *Ciência da Reprodução Animal*, v.192,
466 p.171-178, 2018.
- 467 Griveau, JF, Le Lannou, D(1997). Reactive oxygen species and human 511 spermatozoa:
468 physiology and pathology. *International Journal of Andrology*. 20, 61–9
- 469 Gulçin, I, Elmastas, M, Aboul-enein, H,Y (2007) Determination of antioxidant and radical
470 scavenging activity of basil (*Ocimum basilicum* L. family Lamiaceae) assayed by
471 different methodologies. *Phytother*.
- 472 Jones, R. and Mann, T., 1977b. Damage to ram spermatozoa by peroxidation of endogenous
473 phospholipids. *J. Reprod. Fertil.*, 50: 261--268.
- 474 Juyena, N.; Stelletta, C. Seminal plasma: an essential attribute to spermatozoa. *J Androl*, v.33,
475 p.536-51. 2012.
- 476 Khan H, Khan MF, Jan SU, Ullah N. 2011. Effect of aluminium metal on glutathione (GSH)
477 level in plasma and cytosolic fraction of human blood. *Pakistan Journal of*
478 *Pharmaceutical Sciences*. 24,(1):13-18.
- 479 Kiernan, M, Fahey, A, Fair, S (2013). The effect of the in vitro supplementation of exogenous
480 long-chain fatty acids on bovine sperm cell function. *Reproduction, fertility and*
481 *development*, 25, 947–954
- 482 Kim ts, Kang BY, Cho D, Kim SH. 2003. Induction of interleukin – 12 production in mouse
483 macrophages by berberine, a benzodioxoloquinoline alkaloid, deviates CD4+ T
484 cells from a Th2 to a Th1 response. *Imunology*.109:407-414.
- 485 Kumi-diaka, J. Subjecting canine semen to the hypo-osmotic test. *Theriogenology*, v. 39, p.
486 1279-1289, 1993.
- 487 Lemma, A (2011). Effect of Cryopreservation on Sperm Quality and Fertility, *Artificial*
488 *Insemination in Farm Animals*, Dr. Milad Manafi (Ed.).

- 489 Liu Q, Wang X, Wang W, Zhang X, Xu S, Ma D, Xiao Z, Xiao Y. Effect of the addition of
490 six antioxidants on sperm motility, membrane integrity and mitochondrial function
491 in red seabream (*Pagrus major*) sperm cryopreservation. *Fish Physiol Biochem.* 2015
492 Apr;41(2):413-22.
- 493 Barros, M.H.C.; Shiomi, H.H.; Amorim, L.S.; Siqueira, J.B.; Pinho, R.O.; Lima, D.M.A.;
494 Lopes, P.S.; Guimarães, S.E.F.; Guimarães, J. D. Viabilidade espermática do sêmen
495 congelado de suínos da raça piau avaliada pelo teste de termorresistência. *Acta*
496 *Veterinaria Brasilica* 7 (2) (2013) 164 – 170
- 497 Malo, C, Gil, L, Gonzalez, N, Martinez, F, Cano, R, de Blas, I, Espinosa, E (2010). Anti-
498 oxidant supplementation improves boar sperm characteristics and fertility after
499 cryopreservation: comparison between cysteine and rosemary (*Rosmarinus*
500 *officinalis*). *Cryobiology* 61, 142–147.
- 501 Michos IA, Basioura AG, Boscós CM, Tsakmakidis IA. 2013. Proper use and impact of
502 ‘Computer Assisted Semen Analysis’ technique on sêmen evaluation of farm animals.
503 *Journal of the Hellenic Veterinary Medical Society*, 64:267-274.
- 504 Morrell JM, Mayer I. 2017 Reproduction biotechnologies in germplasm banking of livestock
505 species: a review. *Zygote*.25(5):545-557.
- 506 Nagy A, Polichronopoulos T, Gaspard A, Solti L, Cseh S. 2015 Correlation between bull
507 fertility and sperm cell velocity parameters generated by computer-assisted sêmen
508 analysis. *Acta Veterinaria Hungarica*. 63:370-381.
- 509 Nagy, S., Hallap, T., Johannisson, A., Martinez-Rodriguez, H., 2004. Changes in plasma
510 membrane and acrosome integrity of frozen-thawed bovine spermatozoa during a 4
511 h incubation as measured by multicolor flow cytometry. *Anim. Reprod. Sci.* 80, 225–
512 235.
- 513 Ntemka, A.; Tsousis, G.; Brozos, C.; Kiossis, E.; Boscós, C.M.; Tsakmakidis, I.A. Breed
514 differences of bull frozen-thawed sêmen. *Reproduction in Domestic Animals*, v.51,
515 p.945–952, 2016
- 516 Reiter, RJ (1998). Oxidative damage in the central nervous system: protection by melatonin.
517 *Progress in Neurobiology*, v.56, p.359-384.
- 518 Roth, T.L., Weiss, R.B., and Buff, J.L. (1998). Heterologous in vitro fertilization and
519 sperm capacitation in an endangered African antelope, the Scimitar-Horned Oryx
520 (*Oryx 569 dammah*). *Biol. Reprod.* 58, 475-482.
- 521 Sariözkan, S., Bucak, MN, Tuncer, PB, Ulutaş, PA e Bilgen, A. A influência de cisteína e
522 taurina nos parâmetros de estresse oxidativo-microscópico e capacidade de
523 fertilização do sêmen de touros após a
524 criopreservação. *Criobiologia* . 2009 ; 58 : 134–138.
- 525 Shahzad K, Bock F, Al-Dabet MM, Gadi I, Nazir S, Wang H,⁴Kohli S, Ranjan S, Mertens
526 PR, Nawroth PP, Isermann B. Stabilization of endogenous Nrf2 by minocycline
527 protects against Nlrp3-inflammasome induced diabetic nephropathy. *Sci Rep.* 2016;
528 6: 34228.
- 529 Simon, L, Proutski, I, Stevenson, M, Jennings, D, McManus, J, Lutton, D, Lewis, SEM
530 (2013). Sperm DNA damage has a negative association with live-birth rates after IVF,
531 *Reprod. Bio. Med. Online.* 26, 68–78
- 532 Watson, P.F. Desenvolvimentos e conceitos recentes na criopreservação de espermatozoides
533 e na avaliação de sua função pós-descongelamento. *Reprod Fertil*
534 *Dev* . 1995 ; 7 : 871–891).
- 535 Yeste, M.; Castillo-martín, M.; Bonet, S.; Briz, M.D. Direct binding of boar ejaculate and
536 epididymal spermatozoa to porcine epididymal epithelial cells is also needed to
537 maintain sperm survival in in vitro co-culture. *Anim Reprod Sci*, v.131, p.181-193.
538 2012.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O estudo sobre os danos oxidativos que comprometem a funcionalidade e a integridade das células espermáticas ainda percorrerá longos caminhos, diversos são os mecanismos que precisam ser elucidados. É necessário um entendimento minucioso sobre o material genético celular e a atividade enzimática a cerca da manutenção e proteção das células.

A busca por substâncias com atividade antioxidante por muitas vezes extrapola o entendimento sobre os princípios da criopreservação, da bioquímica e da fisiologia espermática. Os padrões de qualidade do sêmen pós-criopreservado de touros são diferentes, alterando-se entre indivíduos de uma mesma raça, como também entre indivíduos de raças diferentes. A cerca disto buscamos conhecimento que nos norteasse e nos proporcionasse um melhor direcionamento, o que de fato foi importante na obtenção destes resultados, no entanto muito ainda devemos entender e investigar sobre o assunto.