



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

FILIPE NUNES BARROS

**EFEITO DA ADIÇÃO DO ÁCIDO ARAQUIDÔNICO E DO ÁCIDO OLEICO AO
DILUIDOR TRIS-GEMA SOBRE A VIABILIDADE ESPERMÁTICA PÓS-
CONGELAÇÃO EM SÊMEN CAPRINO**

Teresina-PI

2021

FILIPPE NUNES BARROS

**EFEITO DA ADIÇÃO DO ÁCIDO ARAQUIDÔNICO E DO ÁCIDO OLEICO AO
DILUIDOR TRIS-GEMA SOBRE A VIABILIDADE ESPERMÁTICA PÓS-
CONGELAÇÃO EM SÊMEN CAPRINO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Universidade Federal do Piauí, como requisito para obtenção do título de Doutor em Ciência Animal.

Área de Concentração: Sanidade e Reprodução Animal.

Orientador: Prof. Dr. José Adalmir Torres de Souza

Coorientador: Prof. Dr. Antônio de Sousa Junior

Teresina-PI

2021

FICHA CATALOGRÁFICA
Universidade Federal do Piauí
Biblioteca Setorial do Centro de Ciências Agrárias
Serviço de Processos Técnicos

B277e Barros, Filipe Nunes.
Efeito da adição do ácido araquidônico e do ácido oleico ao diluidor TRIS-gema sobre a viabilidade espermática pós-congelação em sêmen caprino / Filipe Nunes Barros. -- 2021.
88 f. : il.

Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Piauí, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Teresina, 2021.

“Orientador: Prof. Dr. José Adalmir Torres de Souza.”

“Coorientador: Prof. Dr. Antônio de Sousa Junior.”

1. Caprinos. 2. Antioxidantes. 3. Ácidos graxos. 4. Criopreservação.
I. Souza, José Adalmir Torres de. II. Sousa Junior, Antônio de.
III. Título.

CDD 636.39

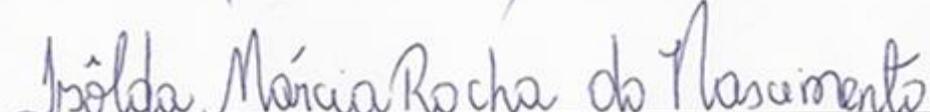
EFEITO DA ADIÇÃO DO ÁCIDO ARAQUIDÔNICO E DO ÁCIDO OLEICO
AO DILUIDOR TRIS-GEMA SOBRE A VIABILIDADE ESPERMÁTICA PÓS-
CONGELAÇÃO EM SÊMEN CAPRINO

FILIPE NUNES BARROS

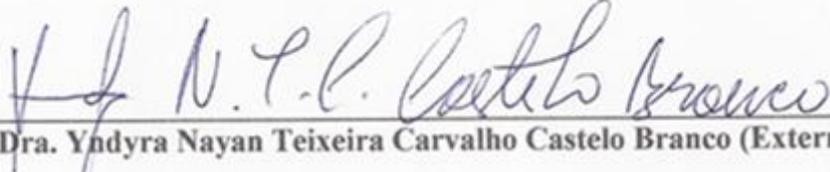
Tese aprovada em: 21/12/2020

Banca Examinadora:

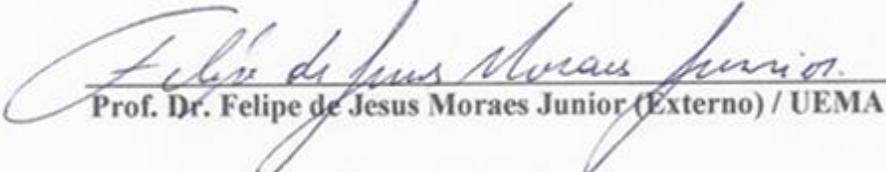

Prof. Dr. José Adalmir Torres de Souza (Presidente) / DCCV/CCA/UFPI


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


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


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


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


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

Dedico...

A minha família, Maria do Rosário de F. de S. Nunes, Simão Pedro Barros e Ana Patrícia Nunes Barros, pela força e incentivo de sempre. A minha namorada, Camila de Melo Feitosa, pelo apoio dado durante toda essa jornada. Essa vitória é nossa!

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, e acima de tudo, à DEUS, “*o pai de todos nós*”, por me proporcionar a vida, me permitir chegar até este momento de Vitória, me conceder uma família digna, pautada na confiança e no respeito. Obrigada meu DEUS, eu te agradeço por todas as conquistas, incluindo esta, e por tudo que tens feito em minha vida.

Agradeço aos meus pais, MARIA DO ROSÁRIO DE F. DE S. NUNES e SIMÃO PEDRO BARROS, por cada palavra proferida, por me incentivar a buscar meus objetivos, pelo apoio nos momentos de incertezas, pelos conselhos dados. São verdadeiros exemplos de pessoas dignas, justas e honestas. Nos momentos de dúvidas, sempre tive com quem contar. À minha irmã, ANA PATRÍCIA NUNES BARROS, por ser um exemplo de coragem e determinação. Aprendi com ela que disciplina e esforço sempre serão recompensados. Obrigado por estarem ao meu lado, pelo amor e carinho, pela força emanada.

À minha namorada, CAMILA DE MELO FEITOSA, pelo apoio durante essa jornada, pelo incentivo, por mostrar que o aprendizado é de suma importância para a vida, e que a determinação pode te fazer um vencedor.

Ao meu orientador, Prof. Dr. JOSÉ ADALMIR TORRES DE SOUZA, que me conduziu durante toda essa jornada. Obrigado por todos os ensinamentos e lições durante esses quase dez anos de pesquisa.

Ao meu coorientador, professor doutor ANTONIO DE SOUSA JÚNIOR, pessoa que sempre admirei pela sua história, por todos esses anos de amizade, conselhos, ensinamentos e colaboração.

As professoras doutoras, ISOLDA MÁRCIA ROCHA DO NASCIMENTO e YNDYRA NAYAN TEIXEIRA CARVALHO CASTELO BRANCO pela amizade, pelo apoio e colaboração nas decisões e nas pesquisas.

Ao proprietário, Sr. CLAUDIOMIRO DE BRITO e seu filho, ANTÔNIO VINÍCIUS, por disponibilizar os animais da Cabanha CBM, nos permitindo a realização do citado projeto e contribuindo à Ciência.

Aos doutores FELIPE BARÇANTE, MARLON DE ARAUJO, MISAEL DAS VIRGENS e WALLISON BRUNO, amigos de verdade, com quem sempre pude contar nos momentos de dificuldades, de necessidade e que estiveram presentes enfaticamente na realização deste projeto.

Aos meus amigos e companheiros de longa estrada, da graduação para vida, a equipe do LBRA: MICHELE CAVALCANTE, MARIA LUIZA, SERGIO HENRIQUE, MARCOS

CELESTINO, JONATHAN IAGO, ANNA MONALLYSA, JEFFERSON LUSTOSA, SÁVIO RUAN, FELIPE FERREIRA, DEYSE MASCARENHAS, ICARO TORRES, LUIZ HARLITON, LUANA EVANGELISTA, MICHERLENE LUSTOSA, LEOPOLDINA ALMEIDA, VIVIANY RODRIGUES e DAYANA NASCIMENTO pelos conselhos, pela amizade, e apoio.

À Dra. EMANUELA RIBEIRO, pela ajuda dispensada na fase de conclusão do doutorado.

À amiga e funcionária do LBRA, Dn. NOEMIA, “a chefe”, pelas conversas e gentilezas do dia-a-dia. Aos funcionários NARCISO e CLEO, sempre ajudando quando necessário.

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

À Universidade Federal do Piauí-UFPI, ao Centro de Ciências Agrárias e ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, que tornaram possível essa longa jornada, desde a graduação até este sonhado curso de doutorado.

Ao Laboratório de Biotecnologia de Reprodução Animal – LBRA, que possibilitou a execução e conclusão do projeto de maneira satisfatória, por meio do uso de seus equipamentos e instalações.

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

Ao Laboratório de Estudos Funcionais e Moleculares em Fisiofarmacologia – LAFMOL, pelo suporte de infraestrutura para a análises de amostras.

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

E a todos, que de alguma forma contribuíram para esse sonho.

A todos, Muito Obrigada!

“Não fui eu que ordenei a você? Seja forte e corajoso! Não se apavore nem desanime, pois o Senhor, o seu Deus, estará com você por onde você andar”.
(Josué 1:9)

“O sucesso nasce do querer, da determinação e persistência em se chegar a um objetivo. Mesmo não atingindo o alvo, quem busca e vence obstáculos, no mínimo fará coisas admiráveis”.
(José de Alencar)

RESUMO

No intuito de maximizar a produtividade na espécie caprina, a criopreservação seminal se destaca dentre as biotécnicas reprodutivas. Aliado a este fato, é crescente o interesse por substâncias capazes de reduzir o estresse oxidativo provocado por essa biotécnica, aumentando, assim, a qualidade do sêmen caprino após a criopreservação. Portanto, objetivou-se avaliar a suplementação do ácido araquidônico e do ácido oleico ao diluidor TRIS-gema sobre a viabilidade espermática do sêmen caprino pós-criopreservação. Para tanto utilizou-se quatro caprinos da raça Anglo-nubiana, na qual foram coletadas seis amostras por animal, utilizando vagina artificial. Após análise dos ejaculados, foi feito o *pool*, diluído em TRIS-gema e dividido nos tratamentos: controle, 0,5 μM , 5 μM e 50 μM de ácido araquidônico e de ácido oleico. Após o processamento, as amostras foram criopreservadas, e posteriormente, realizaram-se as análises pós-criopreservação, incluindo a avaliação morfológica, teste de termorresistência, integridade das membranas plasmática e acrossomal, potencial mitocondrial, cinética espermática pelo CASA, quantificação da lipoperoxidação espermática e dos níveis de glutatona reduzida (GSH). Observou-se que as concentrações de ácido araquidônico e de ácido oleico mantiveram a qualidade morfológica dos espermatozoides caprinos após a criopreservação. Elas também não influenciaram no teste de termorresistência. No que se refere à manutenção da integridade da membrana espermática, acrossomal e do potencial mitocondrial, a concentração de 50 μM de ácido araquidônico foi prejudicial a todas elas, e a concentração de 50 μM de ácido oleico reduziu significativamente ($p < 0,05$) a integridade acrossomal. Os tratamentos com 0,5 μM de ácido araquidônico, e 0,5 μM e 5 μM de ácido oleico melhoraram a motilidade total do sêmen, diferindo ($p < 0,05$) dos tratamentos com 50 μM de ácido araquidônico e de ácido oleico, respectivamente. A quantificação do malondialdeído (MDA) não apresentou diferença ($p > 0,05$) entre os tratamentos. Já a concentração de glutatona reduzida foi superior no tratamento com 5 μM de ácido araquidônico, diferindo ($p < 0,05$) do controle. Os tratamentos com ácido oleico não influenciaram a concentração de GSH. Conclui-se que a suplementação de ácido araquidônico e de ácido oleico ao TRIS-gema preservou a qualidade morfológica dos espermatozoides, além de melhorar a motilidade total após a criopreservação. Ademais, o ácido araquidônico contribuiu para elevar atividade da enzima GSH durante a criopreservação, aumentando o potencial enzimático antioxidante.

Palavras-chave: Antioxidantes. Ácidos graxos. Criopreservação. Caprinos.

ABSTRACT

In order to maximize productivity in goat species, seminal cryopreservation stands out among reproductive biotechniques. Allied to this fact, there is a growing interest for substances capable of reducing the oxidative stress caused by this biotechnique, thus increasing the quality of goat semen after cryopreservation. Therefore, the objective was to evaluate the supplementation of arachidonic acid and oleic acid to TRIS-gem diluent on the sperm viability of goat semen after cryopreservation. Four Anglo-Nubian goats were used, in which six samples per animal were collected using an artificial vagina. After analysis of the ejaculates, the pool was made, diluted in TRIS-gem and divided into the treatments: control, 0.5 μM , 5 μM and 50 μM of arachidonic acid and oleic acid. After processing, the samples were cryopreserved, and subsequently, post-cryopreservation analyses were performed, including morphological evaluation, thermoresistance test, plasma membrane and acrosomal integrity, mitochondrial potential, sperm kinetics by CASA, quantification of sperm lipoperoxidation and reduced glutathione (GSH) levels. It was observed that the concentrations of arachidonic acid and oleic acid maintained the morphological quality of goat spermatozoa after cryopreservation. They also did not influence the heat resistance test. Regarding the maintenance of sperm membrane, acrosomal integrity and mitochondrial potential, the 50 μM concentration of arachidonic acid was detrimental to all of them, and the 50 μM concentration of oleic acid significantly ($p < 0.05$) reduced acrosomal integrity. Treatments with 0.5 μM of arachidonic acid, and 0.5 μM and 5 μM of oleic acid improved total semen motility, differing ($p < 0.05$) from treatments with 50 μM of arachidonic acid and oleic acid, respectively. The quantification of malondialdehyde (MDA) showed no difference ($p > 0.05$) between treatments. The concentration of reduced glutathione was higher in the treatment with 5 μM of arachidonic acid, differing ($p < 0.05$) from the control. Oleic acid treatments did not influence GSH concentration. It is concluded that supplementation of arachidonic acid and oleic acid to TRIS-gem preserved the morphological quality of spermatozoa, and improved total motility after cryopreservation. Furthermore, arachidonic acid contributed to elevate GSH enzyme activity during cryopreservation, increasing the enzymatic antioxidant potential.

Keywords: Antioxidants. Fatty acids. Cryopreservation. Goats.

LISTA DE FIGURAS

REVISÃO DE LITERATURA

- Figura 1 - Esquema da ação das sondas que são utilizadas em testes de integridade da membrana plasmática. Fonte: Silva e Gadella (2006)35
- Figura 2 - Esquema da ação das sondas fluorescentes nas membranas acrossomais externa (MAE) e interna (MAI). Fonte: adaptado de Silva e Gadella (2006)36

CAPÍTULO 1

- Figura 1 - Quantificação do MDA em sêmen caprino pós-criopreservado após suplementação do ácido araquidônico no diluidor 49
- Figura 2 - Quantificação da concentração de GSH em sêmen caprino pós-criopreservado após suplementação do ácido araquidônico no diluidor49

CAPÍTULO 2

- Figura 1 - Quantificação da lipoperoxidação da membrana espermática (MDA) em sêmen caprino pós-criopreservado após suplementação do ácido oleico no diluidor65
- Figura 2 - Quantificação da concentração de glutathiona reduzida (GSH) em sêmen caprino pós-criopreservado após suplementação do ácido oleico no diluidor66

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1

- Tabela 1 - Médias e desvios-padrão da morfologia dos espermatozoides caprinos pós-descongelados após suplementação do ácido araquidônico no diluidor.....46
- Tabela 2 - Médias e desvios-padrão da motilidade total e vigor pós-descongelação de espermatozoides caprinos após suplementação do ácido araquidônico no diluidor, submetidos ao teste de termorresistência (TTR)47
- Tabela 3 - Médias e desvios-padrão da integridade de membrana plasmática (MP), integridade acrossomal (AC) e potencial mitocondrial (MIT) dos espermatozoides caprinos pós-descongelados após suplementação do ácido araquidônico no diluidor48
- Tabela 4 - Médias e desvios-padrão dos parâmetros cinéticos (CASA) de espermatozoides caprinos criopreservados após suplementação do ácido araquidônico no diluidor48

CAPÍTULO 2

- Tabela 1 - Médias e desvios-padrão da morfologia dos espermatozoides caprinos pós-descongelados após suplementação do ácido oleico no diluidor.....61
- Tabela 2 - Médias e desvios-padrão da motilidade total e vigor pós-descongelação de espermatozoides caprinos após suplementação do ácido oleico no diluidor, submetidos ao teste de termorresistência (TTR)63
- Tabela 3 - Médias e desvios-padrão da integridade de membrana plasmática (MP), integridade acrossomal (AC) e potencial mitocondrial (MIT) dos espermatozoides caprinos pós-descongelados após suplementação do ácido oleico no diluidor.....64
- Tabela 4 - Médias e desvios-padrão dos parâmetros cinéticos (CASA) de espermatozoides caprinos criopreservados após suplementação do ácido oleico no diluidor.....64

LISTA DE ABREVIATURAS

ALA	α -Linolênico
ALA	α -Lipoico
ALH	Deslocamento lateral de cabeça
ATP	Adenosina trifosfato
BCF-Hz	Frequência de batimento cruzado
CASA	Computer Assisted Sperm Analysis
CAT	Catalase
CH₂	Metileno
COOH	Carboxila
DCF	Diacetato de carboxifluoresceína
DHA	Ácido docosahexaenoico
DHLA	Ácido dihidrolipoico
DIC	Diacetato de carboxifluoresceína
DMSO	Dimetilsulfóxido
DPA	Docosapentaenoico
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
FITC-PNA	Isotiocianato de fluoresceína
GLA	γ -Linolênico
GPx	Glutathione peroxidase
GR	Glutathione reductase
GSH	Glutathione reduzida
H₂O₂	Peróxido de hidrogênio
HOST	Teste hiposmótico

IP	Iodeto de propídio
JC-1	Iodeto de tetraetilbenzimidazolil carbocianina
LIN	Linearidade
LPO	Lipoperoxidação
MDA	Malondialdeído
mOsm	Miliosmol
mOsm/L	Miliosmol por litro
MP	Motilidade progressiva
MT	Motilidade total
O₂-	Ânion superóxido
OH-	Radical hidroxila
PLA2	Fosfolipase A2
Prx	Peroxiredoxinas
PUFAs	Ácidos graxos poli-insaturados
ROO-	Radical peroxila
SOD	Superóxido desmutase
STR	Retilinearidade
TBA	Ácido tiobarbitúrico
VAP	Velocidade média do percurso
VCL	Velocidade curvilínea
VSL	Velocidade em linha reta
WOB	Oscilação

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	14
2.	REVISÃO DE LITERATURA	16
2.1	Caprinocultura	16
2.2	Sêmen caprino	17
2.3	Diluidores espermáticos	19
2.4	Biologia redox e as Espécies reativas	21
2.5	ROS e os danos oxidativos espermáticos	22
2.6	Antioxidantes.....	24
2.7	Ácidos Graxos.....	27
2.8	Criopreservação seminal.....	31
2.9	Análises espermáticas.....	33
3	CAPÍTULO I*	39
	SUPLEMENTAÇÃO DO DILUIDOR COM ÁCIDO ARAQUIDÔNICO SOBRE A VIABILIDADE ESPERMÁTICA CAPRINA PÓS-CRIOPRESERVAÇÃO .	40
4	CAPÍTULO II*.....	55
	AVALIAÇÃO DA SUPLEMENTAÇÃO DO ÁCIDO OLEICO AO DILUIDOR SOBRE A VIABILIDADE ESPERMÁTICA EM SÊMEN CAPRINO PÓS- CONGELAMENTO	56
5	CONCLUSÃO	72
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	73
	ANEXOS	86

1 INTRODUÇÃO

A caprinocultura no Nordeste brasileiro é uma das principais atividades econômicas e fonte de renda para o produtor rural, gerando diversos produtos, tais como carne, leite e pele. Corroborando com isso, o rebanho de caprinos do Brasil cresceu 16,1% entre 2006 e 2017, segundo o Censo Agropecuário do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), passando de 7,1 milhões de animais para 8,2 milhões neste período. O Estado do Piauí aparece com o segundo maior rebanho do país (1.847.952 animais), perdendo apenas para o Estado da Bahia (2.390.174 animais) (IBGE, 2017). No entanto, mesmo com esse crescimento expressivo, ainda predominam os sistemas de produção extensivos ou semi-intensivos, com pouca tecnificação, comprometendo o manejo geral e produtividade da caprinocultura (SANTOS *et al.*, 2014; FARIAS *et al.*, 2014).

Na tentativa de maximizar a produção e melhorar o custo-benefício, o aperfeiçoamento do manejo nutricional, sanitário e reprodutivo se faz necessário. Para tanto, métodos que promovam a longevidade dos gametas têm sido utilizados no intuito de reduzir ou interromper temporariamente o metabolismo através da refrigeração ou congelamento (O'BRIEN *et al.*, 2003), sendo que a criopreservação seminal fornece inúmeras vantagens, principalmente quando associadas com avaliação genética e programas de seleção. No entanto, o grande obstáculo relacionado com o uso desta biotecnologia reprodutiva em diferentes espécies são os danos causados ao espermatozoide durante os procedimentos de refrigeração, congelamento e descongelamento, reduzindo a viabilidade dessas células quando comparadas ao sêmen fresco (SALAMON; MAXWELL, 1995).

O processo de criopreservação é responsável por danificar as células espermáticas, provocando a redução da capacidade funcional dos espermatozoides, diminuição da capacidade de fertilização e morte celular (WATSON, 2000). Além do que, os espermatozoides são vulneráveis à peroxidação lipídica causada pelas espécies reativas de oxigênio (ROS), devido ao seu alto conteúdo de ácidos graxos poli-insaturados na membrana e à baixa capacidade antioxidante citoplasmática (DARBANDI *et al.*, 2019).

Essas ROS e os antioxidantes encontram-se em uma condição de equilíbrio (ANDRADE *et al.*, 2010), entretanto, quando ocorre o desequilíbrio entre as substâncias pró-oxidativas e os antioxidantes no sêmen, acaba por gerar o estresse oxidativo, resultando em distúrbios metabólicos e funcionais nas células germinativas masculinas (DOBRAKOWSKI *et al.*, 2017), como prejuízos na motilidade e na viabilidade espermática (VARNER *et al.*, 2015). Notadamente, as ROS geram danos à membrana plasmática (FOLCHINI *et al.*, 2012), ao

acrossoma e ao DNA celular (GUTHRIE; WELCH, 2012), bem como prejudicam o potencial de atividade mitocondrial e a capacidade fertilizante dos espermatozoides (AITKEN *et al.*, 2010; FOLCHINI *et al.*, 2012). Diante disso, diversos estudos experimentais e clínicos sobre a fisiopatologia do estresse oxidativo e seu impacto sobre a infertilidade têm demonstrado o papel benéfico de muitos antioxidantes em parâmetros espermáticos e as taxas de fertilidade (ZINI; AL-HATHAL, 2011).

Assim, após a realização de pesquisas, foi constatado o potencial antioxidante de alguns ácidos graxos, tornando-os uma alternativa para melhorar a resistência espermática aos danos oxidativos. Dentre eles, o ácido araquidônico, constituinte normal dos fosfolipídios das membranas, foi identificado no plasma seminal e está relacionado com motilidade espermática e indução de reação acrossomal (HOSSAIN, *et al.*, 2007). Esse ácido também está relacionado com a produção das prostaglandinas, acarretando o aumento do influxo de cálcio através da membrana espermática, resultando na fusão das membranas e na reação acrossômica (VIANA, 2018). Outro ácido graxo, o ácido oleico, um ácido graxo monoinsaturado n-9, também apresentou características de caráter antioxidativo, protegendo os espermatozoides contra o choque térmico e mantendo sua funcionalidade (GULAYA *et al.*, 2001). Também foi verificado, que o ácido oleico foi capaz de aumentar a motilidade e a viabilidade espermática durante a criopreservação do sêmen ovino (MARTI *et al.*, 2008). Portanto, o objetivo dessa pesquisa foi avaliar os efeitos da suplementação de diferentes concentrações (0,5 μM , 5 μM e 50 μM) do ácido araquidônico e do ácido oleico ao diluidor TRIS-gema sobre a viabilidade espermática de sêmen caprino pós-criopreservação.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Caprinocultura

Historicamente, a cerca de dez mil anos, a cabra foi o primeiro animal domesticado pelo homem capaz de produzir alimentos. Desde então, os caprinos acompanham a história da humanidade, conforme atestam os diversos relatos históricos, mitológicos e até mesmo bíblicos. Apesar disso, poucas vezes tiveram seu valor devidamente reconhecido (RIBEIRO, 1997).

O rebanho de caprinos do Brasil cresceu 16,1% entre 2006 e 2017, segundo o Censo Agropecuário do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE). Em todo o país, o número de animais passou de 7,1 milhões para 8,2 milhões neste período, no qual o Estado do Piauí aparece com o segundo maior rebanho do país (1.847.952 animais), perdendo apenas para o Estado da Bahia (2.390.174 animais) (IBGE, 2017). Neste contexto, considerando que 93,2% do rebanho caprino nacional se concentra na Região Nordeste (IBGE, 2017), fica evidente a importância econômica da caprinocultura nessa região.

A caprinocultura constitui uma das principais fontes de renda para pequenos e médios produtores no Brasil, representando uma das mais importantes atividades para subsistência de diversos modelos de criação familiar predominantes, principalmente, na região Nordeste do país (VIEIRA *et al.*, 2016). Por falta de estruturação da cadeia produtiva, a criação de caprinos no Brasil utiliza predominantemente sistemas extensivos ou semi-intensivos de produção, que em geral possuem baixo grau de tecnificação, que compromete o manejo geral, sanitário, reprodutivo e nutricional da caprinocultura brasileira (SANTOS *et al.*, 2014; FARIAS *et al.*, 2014). E devido a essa baixa tecnificação nos sistemas de produção, estratégias básicas para otimização da capacidade reprodutiva como correta escrituração zootécnica, adoção de regime de estação de monta e uso das biotécnicas reprodutivas não são empregadas em larga escala, o que determina uma baixa eficiência e produtividade da caprinocultura no Brasil. (SIQUEIRA *et al.*, 2009).

A demanda por produtos caprinos tende a aumentar, devido à globalização da economia e incentivos à produção. Assim, sistemas de produção intensivos tornam-se necessários, exigindo o uso de raças especializadas para corte ou para leite (TORK, 2018).

No Nordeste brasileiro, grande parte do rebanho caprino é composto por animais de raças nativas ou sem raça definida, de baixa produção, sendo indicada a implantação de programas de melhoramento genético para a melhoria dessas raças. Posto que, a aptidão produtiva e a rentabilidade de um rebanho dependem diretamente do seu desempenho

reprodutivo (MACHADO *et al.*, 2000; TORR, 2018). Criadores vêm aperfeiçoando suas atividades, visando não só a produção de carne, leite e pele, mas também se dedicando à produção de animais geneticamente superiores para reprodução, incluindo atividades como colheita de sêmen ou transferência de embriões (NOGUEIRA *et al.*, 2010; TORR, 2018).

A espécie caprina, com sua adaptabilidade climática e nutricional, produz carne de aceitabilidade universal, considerada uma carne magra, apresentando-se desta forma como uma fonte proteica com um grande potencial a ser explorado (COSTA *et al.*, 2008). Já a produção de leite, cresceu nas últimas décadas devido um aumento no consumo de leite e seus derivados (principalmente queijos), tanto pelas suas características nutricionais como pela sua excelente digestibilidade, resultando em alimentos de excepcional valor nutritivo. Aliado a estes, existe o fato de que o leite caprino é muito procurado para a alimentação de lactentes e crianças que apresentam intolerância ao leite bovino (PRATA *et al.*, 1998).

Na Região Nordeste, sabendo-se que a maioria dos sistemas de produção são pouco tecnificados, a produção torna-se inviável para atender as exigências do mercado consumidor em termos de regularidade, qualidade e preço dos produtos cárneos, gerando um desequilíbrio entre a oferta e procura e, conseqüentemente, oscilações de preços. Portanto, é necessária uma visão sistêmica, com enfoque de cadeia produtiva, onde todos os elos dessa cadeia atuem de maneira coordenada, se contrapondo a uma visão mais conservadora, para que esta atividade seja consolidada lucrativamente no agronegócio brasileiro. Esse enfoque sistêmico deve englobar estratégias ao longo de toda a cadeia produtiva, atendendo os padrões de exigidos pelo mercado por meio da regularização da oferta, do preço, da qualidade da carne e expansão de novos produtos derivados (SOUSA, 2007; TORR, 2018).

2.2 Sêmen Caprino

O sêmen é uma suspensão celular líquida composta pelas células espermáticas e por secreções dos órgãos acessórios do sistema reprodutor masculino. As células espermáticas são produzidas nos túbulos seminíferos, localizados no interior dos testículos, os quais contêm uma grande quantidade de células germinativas em desenvolvimento, que darão origem aos espermatozoides por meio da espermatogênese (HAFEZ; HAFEZ, 2004). Os espermatozoides são divididos morfológicamente em cabeça e cauda (flagelo). A cabeça é constituída pelo núcleo, acrossoma e por um grupo de elementos citosólicos, e divide-se em região acrossomal, segmento equatorial e região pós-acrossomal. Já o flagelo, pode ser subdividido em peça intermediária, principal e final (VARNER *et al.*, 2015). Ele é composto pelo axonema, por

fibras densas exteriores, pela bainha fibrosa e pelas mitocôndrias, dispostas de modo helicoidal. As mitocôndrias estão localizadas exclusivamente na peça intermediária e são responsáveis pela geração de grande parte da energia necessária para a movimentação dos espermatozoides (BRITO, 2007). Toda a célula espermática é coberta por uma única membrana plasmática, que é composta por uma dupla camada lipoproteica, com características bioquímicas que variam de acordo com a espécie animal (AZEVEDO, 2006). Os espermatozoides caprinos apresentam cerca de 50 a 60 μm de comprimento, com a cabeça medindo cerca de 4,25 μm de largura e 8,5 μm de comprimento, recoberto pela membrana plasmática, constituída por proteínas e lipídios (PESCH; BERGMANN, 2006).

Já o plasma seminal, a porção fluida dessa suspensão, é produzido pelas glândulas acessórias no momento da ejaculação (HAFEZ; HAFEZ, 2004), sendo responsável por auxiliar o transporte espermático pelas vias genitais masculinas durante a ejaculação e fornecer um meio tamponado e rico em nutrientes essenciais para a sobrevivência espermática no trato reprodutivo feminino (SOARES, 2016).

A composição do sêmen citada acima pode variar entre as espécies, o volume e a concentração de espermatozoides no ejaculado variam com a anatomia, como o tamanho do testículo, e atividade reprodutiva ou frequência de ejaculações. Além das variações individuais, fatores como idade, condições climáticas e nutrição podem afetar a quantidade e qualidade do sêmen (MAIA, 2010).

Assim, para obter resultados satisfatórios na criopreservação do sêmen caprino é essencial o conhecimento das especificidades do sêmen dessa espécie. (PURDY, 2006; GUERRA *et al.*, 2009). Algumas destas especificidades do sêmen caprino podem limitar o uso de diluentes ricos em fosfolipídios, como aqueles à base de leite ou de gema de ovo. Essa limitação ocorre devido uma interação deletéria entre os componentes lipídicos dos diluidores de sêmen e as enzimas contidas no plasma seminal destes animais (SIMPLÍCIO; MACHADO, 1989). Logo, a composição enzimática do sêmen e dos diluentes seminais na espécie caprina é de grande relevância durante a criopreservação seminal desta espécie.

Em relação as enzimas produzidas nas glândulas bulbouretrais dos caprinos, inicialmente, estas foram identificadas e classificadas como enzimas coaguladoras de gema de ovo (EYCE) e fração proteica da secreção bulbouretral do caprino (SBU- III), que interagem com o diluidor à base de leite. Posteriormente, descobriu-se que essas duas enzimas possuíam a mesma estrutura molecular, sendo classificada como fosfolipase A (LEBOEUF *et. al.*, 2000).

Na presença de cálcio, a enzima fosfolipase A atua como catalisadora e hidrolisa a lecitina da gema de ovo em ácidos graxos e lisolecitina. Esta reação de hidrólise promove uma

atividade fusogênica na membrana dos espermatozoides, induzindo a reação acrossômica e a descondensação da cromatina (CASTELO *et al.*, 2008), e desta forma, associada aos componentes dos diluentes comumente utilizados na criopreservação, há a produção de substâncias tóxicas para a célula espermática (SANTIAGO-MORENO *et al.*, 2017). Além do que, o processo de criopreservação seminal, particularmente no estado criopreservado, também causa danos na ultraestrutura, bioquímica e função espermáticas, reduzindo-se a motilidade, a viabilidade e o posterior transporte no trato genital feminino (SILVA *et al.*, 2006).

Uma alternativa para evitar a interação deletéria entre os componentes dos diluidores e o plasma seminal do caprino, pode ser o uso de protocolos de criopreservação que removam o plasma seminal através da centrifugação (PURDY, 2006; TORR, 2018). No entanto, a centrifugação pode ser prejudicial, pois durante esse processo, forças mecânicas empregadas sob as células espermáticas diminuem a motilidade, danificam a membrana e podem causar a morte celular (PURDY, 2006; CAMPANHOLI *et al.*, 2017). Além do que, trabalhos relatam resultados positivos para congelamento do sêmen caprino sem utilizar o processo de lavagem (AZERÊDO *et al.*, 2001).

2.3 Diluidores espermáticos

A interação entre os espermatozoides e o meio diluidor é um fator imprescindível para a preservação da capacidade fecundante desta célula (MANJUNATH *et al.*, 2002). Os meios diluidores para criopreservação de sêmen são normalmente constituídos por açúcares (como a glicose e frutose, que servem como fonte de energia aos espermatozoides, além de auxiliar na manutenção da pressão osmótica), crioprotetores não penetrantes (como a gema de ovo ou leite, que atuam protegendo extracelularmente), crioprotetores penetrantes (como o glicerol, que atua protegendo a célula, reduzindo o ponto de congelamento da água), substância tampão e sais (como o Tris e citrato de sódio, para manter o potencial Hidrogeniônico do meio - pH), e antibióticos (penicilina e estreptomicina, que atuam inibindo o crescimento microbiano) (PURDY, 2006). Além desses componentes, substâncias antioxidantes podem ser adicionadas aos meios diluidores para diminuir os danos causados pelo estresse oxidativo na criopreservação do sêmen (GUERRA *et al.*, 2004).

A diluição do sêmen é imprescindível antes da criopreservação, pois os diluidores têm a finalidade de proteger os espermatozoides, fornecendo condições mínimas de sobrevivência no trato reprodutivo da fêmea para a fertilização. A proteção oferecida durante as fases de desidratação, de congelamento e a estabilização da bicamada lipídica dependem das substâncias

que compõem o diluidor. Além disso, componentes de origem animal e vegetal dos diluidores podem oferecer riscos de contaminação, sendo uma possível fonte de endotoxinas capazes de afetar a viabilidade e a fertilidade dos espermatozoides (BOUSSEAU *et al.*, 1998).

Um dos componentes dos diluidores são os crioprotetores, substâncias que fornecem temporariamente energia, proteção aos danos ocasionados pela redução de temperatura e manutenção de ambiente favorável à sobrevivência da célula armazenada (PURDY, 2006). Eles são classificados como extracelulares ou não penetrantes, os quais são representados por macromoléculas com peso molecular elevado, tais como açúcares complexos como a rafinose e trealose, lipoproteínas da gema do ovo, água de coco, proteínas do leite e alguns aminoácidos, que atuam por meio de efeito osmótico, induzindo a saída de água do interior da célula e prevenindo a formação de cristais de gelo no meio intracelular. Também são classificados como intracelulares ou penetrantes como o glicerol, o etilenoglicol, o DMSO, a acetamida, a lactamida, a dimetilformamida, e a dimetilacetamida (SILVA; GUERRA, 2011). Estes possuem estruturas que lhes permitem fazer ligações de hidrogênio com a molécula de água, diminuindo o tamanho e a formação dos cristais de gelo, reduzindo a concentração de soluto nos meios extra e intracelulares (DALIMATA; GRAHAM, 1997), levando ao aumento da viscosidade da solução de congelação, e conseqüentemente, reduzindo o ponto de congelação da mesma. Além disso, os agentes crioprotetores penetrantes também agem prevenindo a exposição do material a altas concentrações de eletrólitos, através da ligação aos próprios eletrólitos ou pela substituição parcial pela água (CASTRO *et al.*, 2011).

No entanto, o sêmen caprino apresenta uma maior sensibilidade ao choque térmico, as variações de pH e a pressão osmótica pela composição do diluidor (DEKA; RAO, 1987). Logo, visando a proteção espermática, o diluidor ideal precisa ser composto por substâncias que não sejam tóxicas à célula espermática, apresentar uma osmolaridade adequada (entre 425 e 525 mOsm), ter poder nutritivo e tampões eficazes, conter estabilizadores de membrana, possuir o pH entre 6 e 8 para proporcionar aos espermatozoides um ambiente que garanta sua funcionalidade, além de ter um baixo custo e ser de fácil preparo (CONCANNON; BATTISTA, 1989; PURDY, 2006; MAIA, 2010).

Diversas pesquisas vêm sendo desenvolvidas visando a manutenção da integridade do espermatozoide na criopreservação, onde evidencia-se a importância dos antioxidantes na proteção celular durante os procedimentos de manipulação espermática e redução da temperatura, a fim de reduzir as crioinjúrias ocasionadas pelo estresse oxidativo (SILVA; GUERRA, 2011; TORR, 2018).

2.4 Biologia redox e as Espécies reativas

A demanda de oxigênio (O_2) pelos animais, como insumo para produção efetiva de energia nas mitocôndrias, fez com eles fossem capazes de desenvolver defesas antioxidativas durante sua evolução, que combatessem as características tóxicas deste gás (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2006). Sabe-se que o metabolismo oxidativo é um dos pilares da vida aeróbica e a utilização de O_2 em sistemas biológicos está associado à formação de espécies reativas (HALLIWELL, 2006).

A princípio, um radical livre é qualquer átomo, molécula ou íon que possui um ou mais elétrons livres na sua órbita externa. São moléculas altamente instáveis, com meia-vida curta, quimicamente muito reativas e, por apresentarem esses elétrons desemparelhados na última camada, costumam se ligar a outro elétron em busca da estabilidade, independente de ser uma molécula, uma célula ou tecido orgânico. Os compostos tornam-se oxidados ao doar um elétron, e tornam-se reduzidos ao receberem um elétron, e esse tipo de reação é chamada de oxiredução (FERREIRA; MATSUBARA, 1997).

O início da produção de radicais livres nas mitocôndrias ocorre através do metabolismo oxidativo. No processo de geração de energia pode ocorrer a perda de prótons, que serão usados para a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) ou para as espécies reativas de nitrogênio. Outras substâncias reativas também podem ser formadas, no entanto podem não ser consideradas radicais livres por não terem elétrons desemparelhados na última camada (SILVA, 2006).

Devido à sua estrutura eletrônica, o oxigênio, principal oxidante em virtude do metabolismo aeróbico, tende a receber um elétron de cada vez, o que acarreta na formação de compostos intermediários altamente reativos (ROS). Assim, as ROS são todos os radicais e não radicais derivados do oxigênio. O primeiro composto obtido é o radical superóxido (O_2^-), formado quando o O_2 sofre a redução univalente isoladamente. Esse radical é pouco reativo e, portanto, não é altamente citotóxico (BURNAUGH et. al., 2007).

Continuamente, os radicais livres são produzidos como parte do metabolismo normal das células, como subprodutos da respiração e da síntese de estruturas mais complexas. A presença destas ROS é necessária de forma equilibrada, pois algumas delas exercem papel fundamental na viabilidade espermática e na fertilização, como os radicais O_2^- e H_2O_2 (MAIA; BICUDO, 2009) que são essenciais nos mecanismos de capacitação espermática, hiperativação, reação acrossomal e fusão do espermatozoide ao ovócito (NASEER et al., 2015).

Entretanto, o aumento dessas reações oxidativas, como a peroxidação lipídica, é capaz de causar prejuízos na motilidade e na viabilidade espermática (AITKEN *et al.*, 2014; VARNER *et al.*, 2015). Especificamente, elas geram danos à membrana plasmática (FOLCHINI *et al.*, 2012), ao acrossoma e ao DNA da célula (COMHAIRE *et al.*, 1999; GUTHRIE; WELCH, 2012), bem como prejudicam o potencial de atividade mitocondrial e a capacidade fertilizante dos espermatozoides (AITKEN *et al.*, 2010; FOLCHINI *et al.*, 2012).

As principais ROS relacionadas com problemas nas células espermáticas são: peróxido de hidrogênio (H_2O_2), ânion superóxido (O_2^-), radical peroxila (ROO^-) e radical hidroxila (OH) (SIKKA, 1996; REITER *et al.*, 2013). O ânion superóxido (O_2^-) é derivado do oxigênio molecular, pela adição de um elétron, caracterizando-se pela pouca reatividade. Sem capacidade de penetrar nas membranas lipídicas, ele atua apenas no compartimento onde é produzido. Entretanto, esses ânions 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 *et al.*, 2005).

O radical hidroxila (OH^-) é formado pela reação de Fenton a partir do H_2O_2 , catalisado por íons metálicos como Fe^{2+} ou Cu^+ geralmente ligados a proteínas ou outras moléculas (NORDBERG; ARNÉR, 2001). Eles possuem vida curta, alto poder reativo e são responsáveis pela oxidação de compostos orgânicos (TEIXEIRA; JARDIM, 2004). A sua produção acaba gerando modificações e quebra nas ligações das bases nitrogenadas, purinas e pirimidinas, além de causar lipoperoxidação acrossomal, mitocondrial e na membrana celular (VISHAL *et al.*, 2005).

O H_2O_2 é um oxidante que possui a capacidade de atravessar membranas lipídicas e, embora seja lento, quando se liga ao Fe^{++} nas reações de Fenton ou Haber-Weiss se torna altamente tóxico para as células, gerando o OH^- , que é considerado o radical livre mais reativo em sistemas biológicos (FERREIRA; MATSUBARA, 1997), causando danos ao DNA e RNA, associado indiretamente com mutação e carcinogênese (VISHAL *et al.*, 2005).

De acordo com Varner *et al.* (2015), no momento em que as células espermáticas são submetidas ao armazenamento, a presença das ROS gera danos irreversíveis causados pelo estresse oxidativo, relacionados com a redução extracelular de antioxidantes que protegeriam essa célula da ação dos radicais livres. Esse estresse oxidativo causa aumento da permeabilidade da membrana, perda da integridade estrutural e funcional das membranas, perdas estruturais do DNA e morte celular (BANDAY *et al.*, 2017).

2.5 ROS e os danos oxidativos espermáticos

Os espermatozoides produzem espécies reativas de oxigênio em certas quantidades, decorrentes do metabolismo aeróbico (AITKEN, 1995; FRACZEK; KURPISZ, 2005). Eles são os principais produtores das ROS no ejaculado, nas quais as células inviáveis/anormais podem produzir quantidades maiores de espécies reativas de oxigênio. As enzimas espermáticas têm sua atividade antioxidante limitada pois estão mais concentradas na peça intermediária, deixando grande parte da membrana que recobre a cabeça e a cauda menos protegida. Deste modo, o plasma seminal ganha importância na proteção do espermatozoide contra os danos oxidativos gerados através do próprio espermatozoide e pelos fagócitos presentes no ejaculado (AITKEN, 1995).

A queda do metabolismo energético das células espermáticas, da motilidade, da viabilidade espermática e a desnaturação do DNA em cavalos, touros, carneiros, bodes e homens induz a elevação das concentrações de espécies reativas de oxigênio no sêmen. Somado com a pequena quantidade de citoplasma e a presença de lipídios altamente insaturados, os espermatozoides acabam se tornando suscetíveis aos danos peroxidativos (BILODEAU *et al.*, 2002; VERNET *et al.*, 2004).

Quando a produção de ROS aumenta, o potencial antioxidante das células espermáticas pode esgotar gerando um estresse oxidativo. Logo, quanto maior for à exposição destas células as ROS, maiores serão os danos, provocando lipoperoxidação (LPO) das membranas espermáticas, alteração da estrutura dos receptores de proteínas, enzimas, além de afetar a fragmentação do DNA espermático (FRACZEK; KURPISZ, 2005).

A lipoperoxidação (LPO) é a deterioração oxidativa dos ácidos graxos poli-insaturados (PUFAs), formando uma série de produtos tóxicos. As membranas e organelas celulares, como mitocôndria, lisossomos e peroxissomos, possuem grande quantidade de PUFAs, que compõem os maiores constituintes biológicos das membranas, juntamente com as proteínas (DEVASAGAYAM *et al.*, 2003). Esses PUFAs contêm duas ou mais duplas ligações carbono-carbono ($H_2C=CH_2$), que se tornam excelentes alvos para o ataque de radicais livres (NORDBERG; ARNÉR, 2001). Então, a lipoperoxidação ocorre quando essas duplas ligações dos PUFAs são atacadas pelas ROS, criando um radical peróxido lipídico, causando sérios danos às membranas lipídicas. (WRIGHT *et al.*, 2014).

As lesões causadas pelas ROS nas células espermáticas ocorrem por meio do ataque oxidativo aos lipídios da membrana espermática. As ROS são capazes de iniciar uma cascata de peroxidação lipídica, sendo acelerada por íons de metais de transição como Fe^{2+} (DOBRAKOWSKI *et al.*, 2017). Dentre as alterações irreversíveis da peroxidação lipídica na

membrana do espermatozoide as principais são a perda da motilidade, inibição da respiração, vazamento enzimático intracelular, dano ao DNA e incapacidade de penetrar no oócito (NASEER *et al.*, 2015).

A LPO é constituída de três etapas: a primeira é a iniciação, na qual as ROS removem o hidrogênio alílico formando um radical alquila (L-), que é estabilizado por um rearranjo molecular; a segunda é a propagação, em que o radical L- reage com o oxigênio formando o radical alcoxila (LO-) e, posteriormente, a peroxila (LOO-) e hidroperóxido lipídico (LOOH); e o terceiro é o término, quando há destruição dos radicais formados originando produtos não radicalares (YIN *et al.*, 2011). Inúmeros produtos da oxidação são formados nesse processo, no qual o principal produto primário é o LOOH. Em relação aos produtos secundários que podem ser formados durante a peroxidação lipídica, o malondialdeído (MDA) e o 4-hidroxinonenal (4-HNE) são os mais pesquisados. Estes dois são moléculas altamente reativas, sendo o primeiro um dialdeído capaz de reagir com aminas primárias em proteínas ou DNA para formar ligações cruzadas (GASCHLER; STOCKWELL, 2017).

O tempo todo, os PUFAs das membranas celulares sofrem danos, resultando na diminuição da motilidade espermática, possivelmente, devido à perda rápida de ATP intracelular, danificando o axonema, e as demais estruturas espermáticas (RAO; GANGADHARAN, 2008).

Portanto, de acordo com MAIA (2006), faz-se evidente a correlação entre a lipoperoxidação do sêmen e a motilidade e morfologia espermática, podendo ser controlada ou mesmo revertida pela ação dos antioxidantes, adicionando-os aos meios diluidores, com intuito de preservar o equilíbrio entre agentes oxidantes e antioxidantes.

Estando ciente que os espermatozoides são protegidos por um sistema antioxidante endógeno presente no plasma seminal, na membrana e no citoplasma, durante a diluição e a criopreservação esse sistema é alterado ou parcialmente removido. Por isso realiza-se a suplementação dos diluidores antes da congelação (MATA-CAMPUZANO *et al.*, 2015).

2.6 Antioxidantes

Os antioxidantes são substâncias que retardam a velocidade da oxidação, por meio de mecanismos, tais como inibição de radicais livres (SILVA *et al.*, 2009). Os mecanismos antioxidantes presentes em quase todos os tecidos e suas secreções, em condições normais, tem a função de inibir a produção elevada de radicais livres (BALL *et al.*, 2001).

Pesquisas demonstram que os níveis dos antioxidantes presentes tanto na célula quanto no plasma seminal sofrem redução durante a criopreservação. Isso fortalece a evidência de que uma das causas da diminuição da qualidade do sêmen após criopreservação, está ligada ao estresse oxidativo, e que a adição de antioxidantes aos meios de refrigeração e congelação de sêmen ajuda na proteção espermática contra os danos induzidos pelos radicais livres sobre a sua motilidade, viabilidade, produção de energia e integridade do DNA, bem como a interromper a reação em cadeia da peroxidação dos lipídios das membranas espermáticas, em diversas espécies de animais (MAIA; BICUDO, 2009).

Os espermatozoides dependem da proteção dos antioxidantes que estão presentes na própria célula e no plasma seminal. Entretanto, no processo de criopreservação é realizada a diluição do sêmen, e no caso dos caprinos, a alternativa de remoção do plasma seminal gera um desequilíbrio entre oxidantes e antioxidantes (BILODEAU *et al.*, 2000). Logo, a suplementação de substâncias antioxidantes ao diluidor do sêmen caprino é realizada no intuito de melhorar a qualidade seminal e prevenir ou reduzir o estresse oxidativo (SILVA *et al.*, 2006).

Os espermatozoides apresentam 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 redutase (GR) e glutathione peroxidase (GPx). E o sistema não enzimático corresponde a um grande número de compostos de baixo peso molecular, incluindo glutathione reduzida (GSH), as vitaminas C e E, diferentes compostos de selênio, ubiquinonas (coenzima Q), ácido úrico e ácido lipoico (NORDBERG; ARNÉR, 2001).

As defesas antioxidantes enzimáticas atuam removendo as ROS ou convertendo-as em produtos intermediários não tóxicos. Inúmeras evidências da atividade protetora dos componentes do sistema antioxidante foram observadas (FERREIRA; MATSUBARA, 1997), como o combate da LPO e da apoptose espermática, prevenção das lesões de reperfusão pós-ísquemia de coração, rim, fígado e intestino, desempenhada por enzimas como o SOD e CAT (SHAN *et al.*, 1990).

A primeira linha enzimática de defesa antioxidante contra ânions superóxido é o complexo SOD, devendo ser conjugado com CAT ou GPX para prevenir a ação do peróxido de hidrogênio, que é produzido na reação catalisada pela SOD (DOBRAKOWSKI *et al.*, 2017). As superóxidos dismutases e as redutases precisam agir juntamente com enzimas que removem H_2O_2 . As CAT estão em nenhuma ou em baixa quantidade na mitocôndria, onde grande quantidade de oxigênio é produzido (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2006).

A GR é um antioxidante tripeptídeo, que age juntamente com o α -tocoferol e com o ácido ascórbico, sendo fundamental para mantê-los na forma reduzida. Atua como cofator

enzimático, tendo importância na reação catalisada pela glutatona peroxidase (FUNAHASHI; SANO, 2005), e também na neutralização do ânion superóxido (SILVA *et al.*, 2013).

A GPx é uma enzima selênio dependente, encontrada nos espermatozoides de mamíferos (CÁRDENAS; PEDRAZA, 2006), e faz parte da estrutura da cápsula mitocondrial da peça intermediária e no flagelo dos espermatozoides (IZQUIERDO *et al.*, 2009). É considerado um dos principais sistemas de defesa antioxidante, podendo agir com outros peróxidos que não o H₂O₂ (SILVA *et al.*, 2013).

Devido a possibilidade do sistema antioxidante endógeno das células espermáticas ser insuficiente para prevenir a peroxidação lipídica durante a criopreservação seminal, pesquisas têm sido realizadas com o propósito de enriquecer o sêmen através da adição de substâncias antioxidantes naturais ou sintéticas (HASHEM; ESLAMI, 2018).

Os antioxidantes não enzimáticos agem como agente redutor - doador de elétrons, além de se ligarem a moléculas de O₂ que possam ser substrato para formação de ROS, ou seja, de forma geral atuam prevenindo ou minimizando os danos provocados pelas ROS (SILVA, 2010). Dentre os antioxidantes envolvidos diretamente na reprodução, merecem destaque a glutatona reduzida (GSH); o ácido ascórbico (vitamina C), o tocoferol (vitamina E) e o ácido α -lipoico (ANDRADE *et al.*, 2010).

A GSH está presente em todo organismo animal; não apenas em células somáticas, mas em gametas também. A proteção contra o dano oxidativo conferida pela GSH se deve ao seu grupamento sulfidrila (SH); pode estar em duas formas: a reduzida e a oxidada (GSSG). A ação protetora da GSH é facilitada pelas interações com enzimas associadas tais como a glutatona redutase e a glutatona peroxidase (LUBERDA, 2005). No mesmo sentido, AITKEN *et al.* (1993) cita que o principal antioxidante não enzimático é a GSH e sua função está relacionada às suas interações com outros sistemas (por exemplo, a superóxido dismutase) como mecanismo profilático às ROS. A GSH extracelular previne peroxidação lipídica das membranas celulares dos gametas, através da remoção do excesso de ROS no meio para inseminação (BOQUEST *et al.*, 1999).

Outro ácido com função antioxidante é o ácido ascórbico, também conhecido como vitamina C (uma vitamina hidrossolúvel). Ele tem capacidade de reduzir a quantidade de ROS, prevenindo a formação de hidroperóxido de lipídios nas lipoproteínas plasmáticas, protegendo a célula dos danos oxidativos (ÁLVAREZ *et al.*, 2006). O sêmen caprino criopreservado na presença desta vitamina apresentou incremento na motilidade, na integridade de membrana plasmática, integridade de acrossoma, morfologia e viabilidade dos espermatozoides de acordo com Memon *et al.* (2013).

O tocoferol (vitamina E) é considerado o principal antioxidante lipossolúvel responsável por proteger os PUFA's contra a peroxidação. Seu efeito decorre da sua capacidade em prevenir a LPO e reduzir a produção de malondialdeído, o que é possível pelo fato de atuar como quelante das ROS produzidas durante a lipoperoxidação (SILVA; GUERRA, 2012).

O ácido α -lipoico (ALA) é um antioxidante natural conhecido por suas complexas propriedades antioxidantes (GHIBU *et al.*, 2009). Esse ácido pode ser fornecido por meio da dieta ou pela síntese mitocondrial. É rapidamente absorvido e transportado para o compartimento intracelular, sendo reduzido a ácido dihidrolipoico (DHLA). Este processo produz dois grupos tiol livres, que são responsáveis pelo efeito antioxidante superior da forma reduzida (DHLA) em comparação com a forma oxidada (GHIBU *et al.*, 2009).

Para esse fim, a suplementação de um antioxidante apropriado ao diluidor pode ser benéfica, reduzindo o estresse oxidativo, e por conseguinte, protegendo os espermatozoides durante o processo de criopreservação e descongelação (BANDAY *et al.*, 2017).

2.7 Ácidos Graxos

Os lipídios são compostos insolúveis em água, substâncias orgânicas oleosas ou gordurosas com diversas estruturas, extraídas das células e tecidos por solventes não polares (BLIGH; DYER, 1959; LEHNINGER; COX, 2011).

Os ácidos graxos (AG), unidades básicas de constituição de um lipídio, são moléculas compostas de uma cadeia de hidrocarboneto e um grupamento carboxila, classificados como saturados e insaturados. Os saturados são aqueles que não possuem duplas ligações na cadeia hidrocarbonada e os insaturados exibem uma (monoinsaturados) ou mais (poli-insaturados) duplas ligações, podendo estar ligados a diferentes classes lipídicas (PARKS; LYNCH, 1992; LEHNINGER; COX, 2011).

A membrana espermática é rica em ácidos graxos poli-insaturados (PUFA's), tornando-a mais suscetível ao estresse oxidativo, devido às suas ligações duplas serem mais facilmente clivadas pelas ROS (NICHII *et al.*, 2007). No entanto, durante a criopreservação, os ácidos graxos estão relacionados com a proteção da membrana espermática, podendo melhorar a capacidade fecundante dos espermatozoides (AGARWAL *et al.*, 2006).

A presença de ácidos graxos na membrana espermática mostrou-se importante para a função espermática, pois ao serem incorporados à membrana contribuem diretamente para a motilidade dos espermatozoides, a viabilidade espermática, para o processo de fusão entre o espermatozoide e o oócito (LEWIS; MACCARRONE, 2009), e possibilita a capacidade de

fertilização das células espermáticas dos mamíferos (LECEWICZ *et al.*, 2018). As PUFA's proporcionam às células espermáticas a fluidez necessária para permitir uma maior mobilidade. Ademais, uma maior quantidade de PUFA's torna os espermatozoides mais resistentes à criopreservação. No entanto, esta característica faz com que o espermatozoide seja o alvo preferencial da peroxidação lipídica (LECEWICZ *et al.*, 2018; LONE *et al.*, 2018).

Além disso, a existência dos ácidos graxos nas membranas aumenta a capacidade dos espermatozoides resistirem ao processo de criopreservação (LUCIO *et al.*, 2017; NICHI, 2009) além de auxiliar na hiperativação espermática e nos eventos subsequentes da fecundação (ESPINOSA-CERVANTES; CÓRDOVA-IZQUIERDO, 2018; NICHI, 2009; TUFARELLI *et al.*, 2018).

Os radicais livres agem mais nos ácidos graxos poli-insaturados que nos saturados, pois são formados por cadeias de átomos de carbono ligados a hidrogênio com um grupo carboxila terminal (COOH). As ROS têm preferência pelas ligações adjacente à dupla ligação, as de carbono-hidrogênio no grupo metileno (CH₂), iniciando assim, uma reação de peroxidação lipídica em cadeia. Caso isso não seja interrompido, causará a perda da permeabilidade da membrana, danificando a célula e prejudicando a função espermática (AITKEN; KRAUSZ, 2001). Como consequência, seletividade iônica da membrana é perdida, liberando o conteúdo das organelas e levando a formação de produtos citotóxicos que poderão acarretar na morte celular (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1999).

Os PUFA's são assimilados nas células por difusão passiva, através da bicamada lipídica e/ou transporte facilitado de proteínas, mediada pela glicoproteína CD36, abundante nas células de Sertoli. Os lipídios estão presentes na formação das membranas das células germinativas e têm papel fundamental nas funções das células de Sertoli (RATO *et al.*, 2014).

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). Supõe-se que as alterações na quantidade e na composição de lipídios da membrana plasmática dos espermatozoides durante a maturação explique a sensibilidade dos espermatozoides ejaculados (MANDAL *et al.*, 2014). Os fosfolípidos são os que sofrem a maior redução durante a fase epididimária, sendo esta perda necessária, pois a retenção desses ácidos graxos (saturados, monoinsaturados e poli-insaturados) indicam a imaturidade e/ou defeito espermático. Os principais ácidos graxos, como o ácido palmítico, esteárico, oleico e

araquidônico, diminuem tanto em sua composição percentual quanto em sua concentração absoluta por espermatozoide (POULOS *et al.*, 1973).

Os PUFAs são classificados ainda quanto à localização da primeira insaturação a partir do terminal metil. Existem os PUFAs da Série n-3, que contém uma ligação dupla entre o terceiro e o quarto carbono a partir da extremidade da cadeia com o grupo metil. O carbono do grupo metil é chamado de ω e pela posição da ligação dupla entre terceiro e o quarto carbono são classificados como ácidos graxos ômega-3 (ω -3), como o α -linolênico (ALA) e o docosahexaenoico (DHA) (LEHNINGER; COX, 2011).

A outra família são os PUFAs da Série n-6, que contém uma ligação dupla entre o sexto e sétimo carbono a partir da extremidade da cadeia com o grupo metil. São classificados como PUFAs ômega-6 (ω -6) e como exemplos temos o linoleico, γ -linolênico e o araquidônico (LEHNINGER; COX, 2011).

Ácido linoleico (C18:2n6) e γ -linolênico (GLA): o C18:2n6 e o GLA são ácidos graxos essenciais, devido à incapacidade enzimática para sintetizá-los, necessitando uma outra via para sua obtenção (BLESBOIS *et al.*, 1997). São encontrados em óleos vegetais e de sementes e são utilizados como precursores do ácido araquidônico, que participa da formação do docosapentaenoico (DPA), uma biomolécula constituinte das membranas das organelas celulares (CAMPBELL; FARRELL, 2007).

A biossíntese ocorre a partir do ácido linoleico (18:2n-6) utilizando uma via análoga e o mesmo sistema enzimático do ALA. A enzima Δ 6-dessaturase age na dessaturação do ácido linoleico, introduzindo uma dupla ligação na posição 6 e transformando-o em GLA (cis-6,9,12-18:3). Em seguida, a cadeia carbônica deste ácido graxo é alongada pela enzima elongase, até a estrutura de 20:3n-6 (cis-8,11,14-20:3), sendo subsequentemente convertido em ácido araquidônico (cis-5,8,11,14-20:4) pela Δ 5-dessaturase e alongado a 22:4n-6 (cis-5,8,11,14-22:4) no retículo endoplasmático (CAMPBELL; FARRELL, 2007).

O Ácido araquidônico (C20:4n6) é composto por 20 átomos de carbono e quatro ligações duplas, sendo derivado do ácido linoleico. Um ácido série n-6, o C20:4n6 é encontrado nos fosfolipídios ou lipídios da membrana celular, caracterizado por moléculas complexas constituídas pelo glicerol que interliga um grupo fosfato e dois ácidos graxos, sendo considerado um dos constituintes dos fosfolipídios (CAMPBELL; FARRELL, 2007).

Caso ocorra a precisão da síntese de moléculas complexas, a partir do controle hormonal da espermatogênese, há uma modulação de vias de sinalização intracelular, ou seja, ocorre uma liberação de cálcio (Ca^{2+}) do retículo endoplasmático e uma fosforilação da fosfolipase A2 (PLA2). Dependendo das concentrações de Ca^{2+} intracelular, a PLA2 atua clivando ligações

entre o fosfolipídio e o ácido araquidônico, desagregando-o da membrana plasmática e disponibilizando-o para que lipoxigenases possam incorporar o oxigênio molecular produzindo prostaglandinas (PG). Estas são mediadores lipídicos que tem sua concentração influenciada, também, pela quantidade de hormônios, como o folículo estimulante (FSH), com função de estimular os espermátocitos primários a se dividirem, originando os espermátocitos secundários. (SURAI *et al.*, 2000; GLEW, 2010).

Pesquisas mostraram que tanto a fosfolipase A2 como o ácido araquidônico desempenham papel importante na reação de acrossoma. Segundo Hafez e Hafez (2004), a reação do acrossoma envolve a fusão da membrana plasmática do espermatozoide com a membrana externa do acrossoma, liberando enzimas hidrolíticas como a acrosina e a hialuronidase, que resultam na penetração do óvulo. Como descrito, a PLA2 participa da síntese de ácido araquidônico quando ativada pela progesterona, pelo Ca^{2+} e pela proteína kinase C. O ácido araquidônico que é convertido em prostaglandina, induz o influxo de Ca^{2+} através da membrana espermática provocando a fusão das membranas e conseqüentemente, a reação acrossômica (JOBIM *et al.*, 2009).

Alguns ácidos graxos poli-insaturados foram testados como aditivos em meio de congelamento e seus efeitos benéficos para o processo da criopreservação seminal, como ácido linoleico (TAKAHASHI *et al.*, 2012), docosahexaenoico (DHA) (NASIRI *et al.*, 2012) e ácido araquidônico (EJAZ *et al.*, 2014).

Existe ainda a família ômega-9 (ω -9), em que se destaca o ácido oleico, um ácido graxo monoinsaturado n-9 com uma cadeia de 18 carbonos, com efeitos benéficos como aumento da viabilidade espermática, da integridade da membrana plasmática, da capacidade antioxidante total, da enzima superóxido dismutase (SOD) e diminuição das quantidades de malondialdeído e óxido nítrico durante o armazenamento de espermatozoides a 4°C durante 72 horas (HASHEM *et al.*, 2017). O uso do ácido oleico-linoleico aumenta a resistência osmótica dos espermatozoides e a permeabilidade da membrana à água e aos crioprotetores, que por sua vez contribuem para a estabilização da membrana e aumentam a resistência à criopreservação (GLAZAR *et al.*, 2009). Hashem *et al.* (2017) mostraram que o ácido oleico na concentração adequada e variando com o tempo de armazenamento foi capaz de melhorar a motilidade total, motilidade progressiva direta, VCL, porcentagem de viabilidade, porcentagem de espermatozoides com membrana plasmática intacta, capacidade antioxidante e atividade da superóxido dismutase em sêmen ovino resfriado. Também observaram o aumento na quantidade de malondialdeído e óxido nítrico nos espermatozoides de carneiro durante o armazenamento em baixa temperatura.

Alguns ácidos graxos como o docosahexaenoico, palmítico, oleico, linoleico, araquidônico, linolênico e esteárico, presentes no plasma seminal (TAVILANI *et al.*, 2006), protegem as células espermáticas contra choques térmicos e favorecem a manutenção da motilidade espermática, desempenhando um importante papel na funcionalidade da célula, e consequentemente na capacidade de fertilização (GULAYA *et al.*, 2001).

Estratégias têm sido desenvolvidas para melhorar a resistência das células espermáticas ao método da criopreservação, por exemplo, a inclusão de ácidos graxos poli-insaturados e antioxidantes no diluidor, podendo melhorar a fluidez da membrana e reduzir a ação dos radicais livres sobre as células (NASIRI *et al.*, 2012; TOWHIDI; PARKS, 2012).

Nichi (2009) observou que a alta quantidade de PUFAs na membrana espermática torna-a mais susceptível a ação prejudicial das ROS e ao estresse oxidativo, podendo afirmar que um tratamento com o propósito de alterar o perfil lipídico seminal ou espermático também poderia causar enorme impacto nos espermatozoides. A partir do momento que esses PUFAs fossem incorporados à membrana espermática, aumentaria a sua susceptibilidade ao ataque das ROS, fato este que poderia ser evitado pela inclusão de substâncias antioxidantes aos diluidores seminais. Além disso, caso não ocorra a incorporação dos ácidos graxos a membrana plasmática, as células espermáticas seriam poupadas dos ataques das ROS, já que os PUFAs permaneceriam no meio extracelular gerando um aumento da quantidade de substrato para a ação das espécies reativas neste local. Outro questionamento levantado, é o fato de que devido à degradação ruminal, a maioria dos triglicérides e ácidos graxos são hidrogenados em sua passagem pelo rúmen, o que impede sua absorção e consequente eficiência da suplementação de PUFAs via oral. Desse modo, a suplementação de amostras espermáticas com ácidos graxos durante a criopreservação seria uma alternativa para manter a viabilidade espermática pós-descongelamento (STRZEZEK *et al.*, 2012; VIEIRA, 2018).

Devido a escassa quantidade de trabalhos envolvendo esses dois ácidos graxos, buscase respostas quanto ao uso e as quantidades destes junto ao sêmen caprino criopreservado no intuito de melhorar as respostas da criopreservação.

2.8 Criopreservação seminal

A criopreservação é uma técnica essencial e amplamente empregada que permitiu a expansão dos programas de reprodução animal. Essa biotécnica permite o armazenamento de material genético por tempo indeterminado, um melhor aproveitamento dos animais de alto valor zootécnico e a redução dos custos com a manutenção de animais na propriedade (PURDY,

2006). Com a criopreservação, também é possível minimizar os riscos de transmissão de doenças sexualmente transmissíveis, além de favorecer a rápida difusão de material genético (ARAV; SARAGUSTY, 2016).

As etapas dessa biotécnica reprodutiva, as quais fazem parte a diluição, crioproteção (adição de crioprotetores), resfriamento, congelação, armazenamento criogênico e pós-descongelação, têm a função de conservar o sêmen para uso posterior, mas também têm o potencial de afetar a estrutura e a função do esperma (PADILHA *et al.*, 2012).

Os espermatozoides são submetidos a diferentes fatores estressantes durante a congelação, por exemplo a formação e dissolução de cristais de gelo, desidratação, aumento da concentração dos solutos, transição de fase dos fosfolípidios da membrana, estresse osmótico e tóxico pela variação na quantidade de crioprotetores (BORTOLOZZO *et al.*, 2008). Entretanto, o grande problema enfrentado durante a criopreservação é impedir a formação de cristais de gelo intra e extracelulares, além do aumento da concentração de soluto (MATEOS-REX; AGUILLAR, 1996).

Os danos causados nos espermatozoides durante a criopreservação são consequência da interação entre as células e o meio, e surgem através da cristalização do gelo, que expõe as células a um ambiente hiperosmótico, provocando retirada de água intracelular. Da mesma forma, durante a descongelação ocorre o processo reverso, com fluxo de água para o interior da célula que poderá causar ruptura da membrana celular (HOLT, 2000).

Os cristais de gelo começam a se formar no meio extracelular quando se atinge temperaturas abaixo de 0°C, levando ao aumento da concentração de soluto no meio extracelular, visto que o líquido intracelular congela mais lentamente e causa o extravasamento de líquido desidratando o espermatozoide progressivamente. Caso a velocidade de congelação seja muito lenta, o aumento da concentração de sais intracelulares causada pela desidratação pode danificar o espermatozoide. Caso essa velocidade seja muito rápida, cristais de gelo intracelular podem se formar. A taxa de congelação adequada é justamente o equilíbrio entre esses fatores (SALMITO-VANDERLEY *et al.*, 2012). A fim de minimizar os efeitos da criopreservação, constatou-se que a adição de crioprotetores penetrantes e não penetrantes ao diluente pode evitar a formação dos cristais de gelo. Na espécie ovina e caprina, o crioprotetor penetrante mais utilizado é o glicerol e o não penetrante é a gema de ovo (PURDY, 2006).

A produção excessiva de ROS durante a criopreservação é outro fator negativo de grande importância. Em quantidades elevadas, as ROS provocam danos as células germinativas, como esgotamento da adenosina trifosfato (ATP) nas mitocôndrias, indução de lesões no DNA do espermatozoide, redução da viabilidade e da capacidade fecundante

(AITKEN; GRAVES, 2002). Nesse sentido, estudos realizados em diferentes espécies de animais, comprovaram que a suplementação de antioxidantes no sêmen antes da congelação/descongelação minimiza os efeitos deletérios do estresse oxidativo, melhorando a qualidade espermática pós-criopreservação (SOUZA *et al.*, 2017; SOUZA *et al.*, 2016).

A criopreservação seminal e sua associação a outras biotécnicas trouxeram benefícios aos programas de seleção e melhoramento genético, sendo alvo de pesquisas a muitos anos (SALGADO, 2020). A descoberta dos agentes crioprotetores foi de grande importância para a expansão dos programas de reprodução através da criopreservação espermática (BENSON *et al.*, 2012), no entanto, mesmo com todos os avanços alcançados, as taxas de sobrevivência dos espermatozoides criopreservados ainda não são tão altas, devido à crioinjúrias estruturais, funcionais e bioquímicas nos diversos componentes presentes na composição da célula (WATSON, 2000; SALGADO, 2020).

Métodos estão sendo elaborados para elevar a resistência dos espermatozoides ao processo de criopreservação, dentre eles, a inclusão de ácidos graxos e antioxidantes no diluente seminal, podendo resultar na melhoria da fluidez da membrana e na redução da ação dos radicais livres sobre as células (NASIRI *et al.*, 2012).

2.9 Análises espermáticas

As análises espermáticas são testes fundamentais para certificação da qualidade do material armazenado, buscando qualificar o potencial de fertilidade do macho, por meio das análises a partir da funcionalidade, integridade e viabilidade espermática após o processo de congelação/descongelação (KUÇUK *et al.*, 2014).

Nas diversas espécies é empregada a avaliação convencional do ejaculado em que são observadas as características físicas: volume, aspecto, turbilhão ou movimento de massa, motilidade total e motilidade progressiva individual, vigor e concentração, além da morfologia e dos defeitos espermáticos (maiores e menores) (CBRA, 2013).

O ejaculado de pequenos ruminantes é caracterizado por volume em torno de 0,5 a 1,5 mililitros e o total de espermatozoides ejaculados variando entre 3 e 5 bilhões. Deve apresentar uma motilidade espermática de no mínimo 70%, uma motilidade massal ≥ 4 (escala de 0 - 5), uma concentração de $2 - 5 \times 10^9$ espermatozoides/mL e quantidade de defeitos maiores $\leq 10\%$ (CBRA, 2013). As patologias encontradas nas células espermáticas são classificadas em defeitos menores, que não interferem diretamente na fertilidade, e em defeitos maiores, que podem gerar infertilidade ou inviabilidade embrionária, podendo estar localizados no

acrossoma, cabeça, peça intermediária, cauda ou ainda apresentar anomalias e malformações (BLOM, 1973).

O teste de termorresistência (TTR) possibilita verificar a diminuição na curva linear nos valores de motilidade e vigor com o decorrer do tempo de incubação durante o teste de exaustão. Uma possível explicação para tal diminuição seria por conta do maior consumo de suas substâncias nutritivas durante o começo do teste, como também das perdas de componentes intracelulares ou de lesões estruturais na cauda das células espermáticas, diminuindo sua viabilidade durante as duas primeiras horas (BARROS *et al.*, 2013).

A verificação da motilidade e morfologia espermática são fatores primordiais para determinar a qualidade seminal, tornando-as ferramentas na seleção de um ejaculado (VERSTEGEN *et al.*, 2002). Então, através do *Computer Assisted Sperm Analysis* (CASA) é possível realizar a automatização das análises com maior objetividade e agilidade, no qual esse sistema possibilita a visualização, digitalização e análise de imagens sucessivas das células espermáticas, fornecendo informação precisa e significativa do movimento individual de cada espermatozoide. Este sistema também pode ser utilizado para calcular o número de células por unidade de volume e ser modificado para capturar dados aproximados de morfologia de cada célula examinada (AMANN; KATZ, 2004).

A análise dos vários parâmetros da motilidade espermática é realizada por um sistema estroboscópico de alta precisão controlado por computador, além de utilizar videomicrografia que é responsável pelo monitoramento constante e análise sequencial do movimento da célula espermática (MORTIMER, 2000; AMANN; KATZ, 2004).

O CASA avalia o movimento da cabeça do espermatozoide, mesmo sendo o flagelo que origina a motilidade. Isso se deve ao fato da cabeça se mover mais lentamente que a cauda, possibilitando a captura de imagens mais claras (MORTIMER, 2000; AMANN; KATZ, 2004). O sistema ainda utiliza um padrão do tamanho da cabeça para os espermatozoides de cada espécie, fazendo com que o computador reconheça objetos que não se enquadrem no tamanho da cabeça espermática preestabelecida (MORTIMER, 2000). Os parâmetros obtidos através do sistema de análise de sêmen computadorizado são a motilidade total (MT), motilidade progressiva (MP), 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 espermáticas e a estabilidade da sua característica semipermeável são pré-requisitos para a viabilidade espermática, sendo necessário que a

membrana plasmática e a membrana acrossomal estejam integras para que ocorra fecundação (PEÑA *et al.*, 2005). E mesmo a membrana estando íntegra, mas funcionalmente instável, as células germinativas masculinas são incapazes de interagir com o ambiente do trato genital feminino e, conseqüentemente, fertilizar o oócito (RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ *et al.*, 2007).

Outra análise utilizada para avaliar a qualidade espermática é o uso de corantes fluorescentes, conhecidos como sondas, que são capazes de identificar condições subcelulares, mostrando alterações metabólicas e estruturais das células e de seu interior (SOUSA *et al.*, 2012). A avaliação da integridade da membrana plasmática utiliza sondas com afinidade por DNA. Uma vez lesionada a membrana, a sonda atravessa esta estrutura e cora o núcleo, rico em DNA. Diversas sondas podem ser utilizadas com esta finalidade, como o Hoechst 33258, YoPro-1 e Iodeto de propídeo (IP). Pode-se também fazer uso de sondas anfipáticas, que podem transpor a membrana intacta e se ligar às esterases, reconhecendo a célula como viável, como no caso do Diacetato de carboxifluoresceína (DCF) e do SYBR-14[®] (Figura 1) (SILVA; GADELLA, 2006). Comumente associa-se esses dois tipos de sondas, obtendo resultados mais confiáveis na identificação de uma membrana plasmática espermática preservada, uma vez que a membrana íntegra cora em verde, pela ligação do DCF às esterases e a membrana lesionada cora a região nuclear em vermelho pela ligação do IP ao núcleo celular (COLETO *et al.*, 2002).

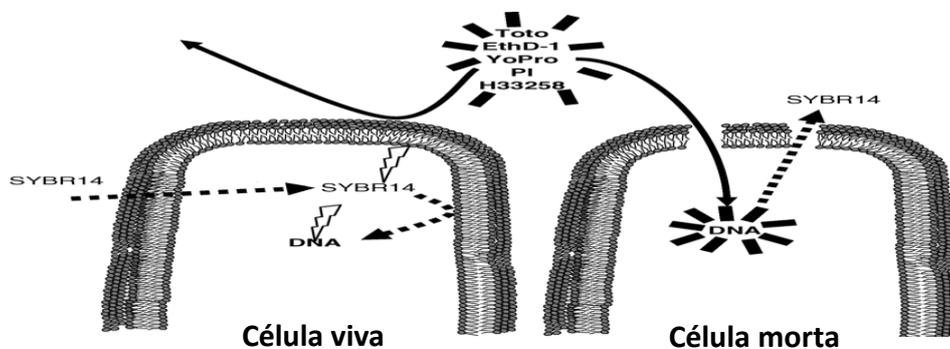


Figura 1 - Esquema da ação das sondas que são utilizadas em testes de integridade da membrana plasmática. Fonte: Silva e Gadella (2006)

Silva e Gadella (2006) observaram que as lectinas ao serem utilizadas, são capazes de ligar-se a carboidratos existentes exclusivamente nas glicoproteínas da membrana acrossomal (Figura 2). Substâncias geralmente derivadas da ervilha da espécie *Pisum sativum* (PSA) e do amendoim da espécie *Arachis hypogaea* (PNA), são associadas à fluoróforos, permitindo sua visualização ao microscópio de imunofluorescência, sendo mais utilizado o Isocianato de fluoresceína (FITC).

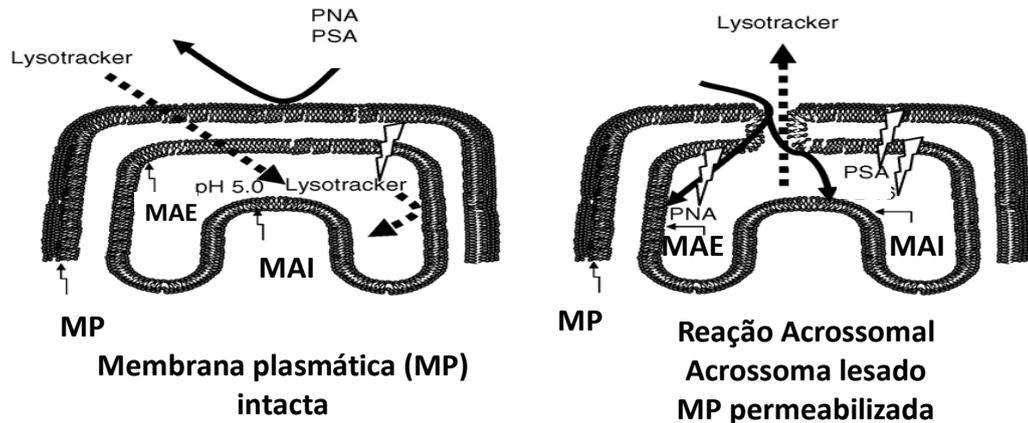


Figura 2 - Esquema da ação das sondas fluorescentes nas membranas acrossomais externa (MAE) e interna (MAI). Fonte: adaptado de Silva e Gadella (2006)

As lectinas descritas acima possuem diferentes locais de atuação. A PNA se liga aos glicoconjugados da membrana acrossomal externa e a PSA apresenta afinidade pela membrana acrossomal interna, precisamente aos grupos sacarídeos da glicoproteína pró-acrosina (HOLDEN *et al.*, 1990). Logo, ao utilizar PSA, caso a membrana plasmática esteja intacta não haverá fluorescência. Contudo, se a membrana plasmática estiver lesionada, como nos casos de fixação da célula espermática, observa-se fluorescência na região do acrossoma (SILVA; GADELLA, 2006).

Grande parte do ATP necessário ao metabolismo total do espermatozoide vem das mitocôndrias. Para avaliar a função mitocondrial espermática tem sido utilizado diferentes sondas fluorescentes, onde estas, são ativamente transportadas nas mitocôndrias que possuem respiração ativa. Logo, quanto mais ativa a respiração mitocondrial, mais corante é acumulado nesta organela (GRAHAM; MOCÉ, 2005).

Uma das sondas eficazes na classificação do potencial da membrana mitocondrial é o Fluorocromo catiônico lipofílico (JC-1). Esta sonda em concentrações mais baixas permanece no seu estado monomérico e fluoresce em verde, enquanto em concentrações elevadas, forma agregados que fluorescem na cor laranja. Sendo assim, o JC-1 possui a capacidade de diferenciar uma mitocôndria funcional, além de permitir que os diferentes níveis da função mitocondrial sejam diferenciados pela intensidade da cor laranja na mitocôndria (GUTHRIE; WELCH, 2006).

A funcionalidade da membrana espermática também pode ser avaliada por meio do teste hiposmótico (HOST), observando as alterações morfológicas sofridas pelos espermatozoides quando expostos a condições hipotônicas (aumento de tamanho dos flagelos ou curvatura dos

mesmos) (CBRA, 2013). É caracterizado pelo influxo de fluidos para dentro do espermatozoide, sob condições hiposmóticas, até atingir o equilíbrio entre os compartimentos, indicando que o transporte de água por meio da membrana está ocorrendo normalmente (INAMASSU *et al.*, 1999). Uma das consequências deste influxo de água para o interior da célula espermática é o aumento do volume celular (edema), com posterior dobramento da cauda. Pesquisadores utilizam essa técnica para avaliação da viabilidade funcional da membrana espermática em diversas espécies, como em ovinos (OBERST *et al.*, 2003) e caprinos (FONSECA *et al.*, 2001; SOUZA; MORAIS, 2017).

O método espectrofotométrico do TBARS (substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico), permite a avaliação da peroxidação lipídica da membrana plasmática das células espermáticas, induzida pelo estresse sofrido provavelmente durante a criopreservação. Entre os aldeídos produzidos, destaca-se o malondialdeído (MDA) devido sua produção em níveis elevados, sendo comumente utilizado como medida do estresse oxidativo (BARRERA *et al.*, 2018).

O método do TBARS se baseia na quantificação do complexo formado pela reação de duas moléculas de ácido tiobarbitúrico com uma de malondialdeído (MDA), formando um cromógeno de coloração rósea, sendo medido por espectrofotometria a 532, 538 e 540 nm. É possível mensurar ainda, a produção de ânion superóxido e de peróxido de hidrogênio após o estresse celular, como também determinar a concentração de glutatona e a atividade da catalase (BUEGE; AUST, 1978).

Outro método utilizado para indicar as alterações das defesas antioxidantes e o aumento do estresse oxidativo é a técnica de determinação dos níveis de glutatona reduzida (GSH). Deste modo, a quantificação dos níveis de glutatona pode apontar possível correlação entre a diminuição das enzimas antioxidantes (GSH e GSH-Px) e o aumento nos níveis de bases de DNA lesadas devido ao dano oxidativo (ROVER JÚNIOR *et al.*, 2001).

A GSH pode ser utilizada como defesa contra o estresse oxidativo. Essa proteção é devido ao seu grupamento sulfidrila (SH); podendo estar em duas formas: a forma reduzida e a oxidada (GSSG). As interações da GSH com enzimas associadas como a glutatona redutase e a glutatona peroxidase facilitam esse ataque às ROS (LUBERDA, 2005). A glutatona peroxidase (GPx) é uma enzima antioxidante que catalisa a redução do peróxido de hidrogênio (e outros produtos da peroxidação lipídica) na presença da GSH, a qual é convertida em GSSG. Posteriormente, sofre uma reação de redução pela glutatona redutase na presença de fosfato de dinucleotídeo de nicotinamida e adenosina (NADPH), o qual é doador de elétrons nas reações da via das pentoses-fosfato, havendo redução de NADPH^+ e conversão à NADP (ARUOMA *et al.*, 1989).

Um complexo sistema de agentes enzimáticos e não enzimáticos são responsáveis pela proteção antioxidante dos espermatozoides mamíferos; e segundo AITKEN *et al.* (2014), a GSH é o principal antioxidante não enzimático, tendo sua função associada à suas interações com outros sistemas (como a superóxido dismutase) como mecanismo profilático às ROS.

3 CAPÍTULO I*

*Apresentado segundo normas do periódico CIÊNCIA RURAL

1 SUPLEMENTAÇÃO DO DILUIDOR COM ÁCIDO ARAQUIDÔNICO SOBRE A 2 VIABILIDADE ESPERMÁTICA CAPRINA PÓS-CRIOPRESERVAÇÃO

3 4 **Resumo**

5 A criopreservação seminal, apesar de bastante utilizada na caprinocultura, gera danos aos
6 espermatozoides, reduzindo sua viabilidade. Isto posto, a adição de ácidos graxos ao diluidor,
7 com função antioxidante, tornou-se uma opção para aumentar a resistência espermática,
8 reduzindo efeitos deletérios do estresse oxidativo. Assim, objetivou-se avaliar os efeitos
9 antioxidantes da suplementação de 0,5 μM , 5 μM e 50 μM de ácido araquidônico ao diluidor
10 TRIS-gema no processo de criopreservação de espermatozoides caprinos da raça Anglo-
11 nubiana. Para tanto, utilizou-se quatro caprinos Anglo-nubianos, sendo coletadas seis
12 amostras/animal, usando vagina artificial. Após avaliação dos ejaculados, foi feito o *pool*,
13 diluído em TRIS-gema e dividido de acordo com os tratamentos. Em seguida, o sêmen foi
14 criopreservado. Posteriormente, realizaram-se as análises pós-criopreservação: avaliação
15 morfológica, teste de termorresistência, integridade da membrana plasmática e acrossomal,
16 potencial mitocondrial, cinética espermática pelo CASA, quantificação da lipoperoxidação
17 (MDA) e dos níveis de glutathiona reduzida (GSH). Observou-se que as concentrações de ácido
18 araquidônico mantiveram a qualidade morfológica dos espermatozoides, e não apresentaram
19 diferenças no teste de termorresistência e na quantificação do MDA. Em relação à integridade
20 da membrana plasmática, acrossomal e do potencial mitocondrial, a concentração de 50 μM foi
21 prejudicial a todas elas. Já concentração de 0,5 μM melhorou a motilidade total do sêmen pós-
22 criopreservado, diferindo de 50 μM , e a concentração de 5 μM apresentou maior atividade do
23 GSH. Conclui-se que a suplementação de ácido araquidônico ao diluidor TRIS-gema manteve
24 a qualidade morfológica dos espermatozoides caprinos pós-criopreservação, além de contribuir
25 para melhoria da motilidade total e do potencial enzimático antioxidante.

26
27 **Palavras-chave:** Antioxidantes, ácido araquidônico, estresse oxidativo, criopreservação.

28 29 **Introdução**

30
31 A criopreservação seminal é uma biotécnica bastante utilizada na criação de caprinos e
32 ovinos, visando a otimização no ganho genético e a maximização produtiva (MORADI *et al.*,
33 2020). Entretanto, durante a criopreservação ocorrem inúmeras alterações, dentre elas, o
34 aumento das reações oxidativas gerando uma produção excessiva de espécies reativas de
35 oxigênio (ROS) (AITKEN; GRAVES, 2002).

36 Isto acarreta desequilíbrio nos níveis de ROS no meio, resultando em alterações na
37 osmolaridade do ejaculado e na conformação espermática durante as etapas de congelação e
38 descongelação, diminuindo a viabilidade dos espermatozoides e, conseqüentemente, as taxas
39 de fertilidade pós-descongelação (BATISSACO *et al.*, 2020). Contudo, a presença das ROS é
40 necessária de forma equilibrada, sendo essencial nos mecanismos de capacitação espermática,
41 hiperativação, reação acrossomal e fusão do espermatozoide ao ovócito (NASEER *et al.*, 2015).

42 Além das reações oxidativas no plasma seminal dos caprinos, destaca-se a presença da
43 fosfolipase A, secretada pelas glândulas bulbouretrais. Essas fosfolipases têm a capacidade de
44 reagir com lipídeos presentes em componentes essenciais de muitos diluidores utilizados na
45 criopreservação. Por meio da catálise de processos hidrolíticos, elas convertem os ácidos graxos
46 e isolecitas presentes nos meios diluidores, dando origem a substâncias altamente tóxicas às
47 células espermáticas (JIMÉNEZ-RABADÁN *et al.*, 2012; SANTIAGO-MORENO *et al.*,
48 2017).

49 Diante do exposto, estudos realizados em diferentes espécies de animais mostraram que
50 a diluição seminal e o acréscimo de substâncias antioxidantes no sêmen antes da
51 criopreservação reduzem os efeitos deletérios do estresse oxidativo (SOUZA *et al.*, 2017;
52 SOUZA *et al.*, 2016).

53 Nesse sentido, a adição de ácidos graxos poli-insaturados (PUFAs) ao diluidor tem sido
54 realizada com o intuito de aumentar a resistência dos espermatozoides ao método da
55 criopreservação, sendo capaz de melhorar a fluidez da membrana e reduzir a ação dos radicais
56 livres sobre as células (NASIRI *et al.*, 2012; TOWHIDI; PARKS, 2012). O Ácido araquidônico
57 (C20:4n6), um PUFAs ômega-6 (ω -6), encontrado nos fosfolipídios da membrana celular, está
58 relacionado com a síntese de prostaglandinas, que aumentam o influxo de cálcio através da
59 membrana espermática, levando à fusão das membranas e à reação acrossômica (VIANA,
60 2018), além de aumentar a motilidade, a integridade do DNA e viabilidade espermática
61 (EJAZ *et al.*, 2014). Deste modo, objetivou-se avaliar o efeito antioxidante da suplementação
62 de 0,5 μ M, 5 μ M e 50 μ M de ácido araquidônico ao diluidor TRIS-gema no processo de
63 criopreservação de espermatozoides caprinos da raça Anglo-nubiana.

64

65 **Metodologia**

66

67 *Ética em experimentação animal*

68 Os procedimentos foram submetidos e aprovados pela Comissão de Ética no Uso de
69 Animais (CEUA) da Universidade Federal do Piauí (UFPI), registrados com o número
70 643/2020 e certificado (Anexo).

71 *Animais*

72 Foram utilizados quatro caprinos da raça Anglo-nubiana, com 1,5 a 3 anos de idade,
73 provenientes de uma propriedade localizada no município de Brasileira, na região centro-norte
74 do Estado do Piauí, com escore de condição corporal 4, na escala 1 a 5. Essa raça foi escolhida
75 devido a sua rusticidade e a ótima adaptação as condições bioclimatológicas da região Nordeste.

76 Previamente, foram realizados exames andrológicos, constatação de proles dos reprodutores e
77 avaliação quanto à saúde geral. Durante o experimento, os animais foram mantidos em regime
78 semi-intensivo, com acesso ao pasto durante o dia, contendo capim mombaça (*Panicum*
79 *maximum cv. Mombaça*), e alojados no aprisco durante a noite, sendo fornecido ao cocho
80 silagem de milho, ração de manutenção contendo 20% de proteína bruta tendo acesso a sal
81 mineral próprio para espécie e água a vontade.

82 *Coleta de sêmen e avaliação inicial*

83 As coletas de sêmen foram realizadas uma vez por semana, durante seis semanas
84 (totalizando 6 ejaculados/animal), com o auxílio de uma fêmea em estro, pelo método da vagina
85 artificial. Em seguida, os ejaculados foram colocados em Banho-maria a 37°C e avaliados
86 individualmente, quanto a cor, aspecto, volume (mL) e aos demais parâmetros conforme
87 recomendações do Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (motilidade de massa: ≥ 4 ; vigor
88 ≥ 3 ; motilidade espermática: $\geq 80\%$; concentração $\geq 2 \times 10^9$ espermatozoides/mL;
89 espermatozoides morfológicamente normais: $\geq 80\%$) (CBRA, 2013). A concentração
90 espermática foi obtida por meio da câmara de Neubauer, na diluição de 1:400. Após essa etapa,
91 as amostras viáveis dos quatro ejaculados foram misturadas para formação de um “pool” por
92 coleta, sendo novamente avaliados em relação à qualidade espermática.

93 *Diluição seminal*

94 Posteriormente, foi adicionado o meio diluidor TRIS-gema (3,605g de Tris; 2,024g de
95 ácido cítrico; 1,488g de frutose; 25mg de gentamicina; 50.000UI de penicilina; 100mL de água
96 destilada; 20% de gema de ovo e 5% de glicerol, com osmolaridade de 350mOsm/kg e pH 6,8)
97 ao “pool”, para, finalmente, suplementar com diferentes concentrações de ÁCIDO
98 ARAQUIDÔNICO (ÁCIDO ARAQUIDONICO – $\geq 98,5\%$ (GC), Sigma-Aldrich®, EUA), e
99 avaliar quanto à qualidade espermática. As amostras foram divididas nos seguintes tratamentos:
100 Controle (Tris-gema sem adição de ácido araquidônico); Tris-gema + 0,5 μ M de ácido
101 araquidônico; Tris-gema + 5 μ M de ácido araquidônico e Tris-gema + 50 μ M de ácido
102 araquidônico.

103 *Criopreservação do sêmen*

104 Após diluição e fracionamento, as amostras de sêmen foram envasadas em palhetas de
105 0,25mL, à temperatura ambiente, para uma concentração final de 20×10^6 espermatozoides
106 viáveis / palheta. Então, foram congeladas na máquina TK 3000® (TK Tecnologia em
107 congelação Ltda., Uberaba, Brasil), utilizando curva de resfriamento lenta, com tempo de
108 estabilização a 5°C de 1 hora, e armazenadas. Posteriormente descongelou-se em Banho-maria
109 a 37°C por 30 segundos para realização das análises pós-criopreservação.

110 *Avaliação morfológica*

111 A morfologia foi estimada em cada amostra de sêmen descongelado pelo método de
112 câmara úmida. Uma alíquota de 10 μ L do sêmen puro foi adicionada em tubo com 4mL de
113 citrato de sódio formolado a 4%. Posteriormente, essas alíquotas foram avaliadas,
114 contabilizando 200 espermatozoides por meio da observação microscópica (1000x), na qual as
115 alterações morfológicas foram agrupadas e os espermatozoides classificados em
116 espermatozoides normais e espermatozoides com defeitos maiores e menores, segundo Bloom
117 (1973).

118 *Teste de termorresistência (TTR)*

119 O teste de termorresistência foi realizado de acordo Machado *et al.* (2018), que consiste
120 em verificar a longevidade das amostras de sêmen descongeladas. Uma alíquota de 10 μ L de
121 sêmen descongelado foi incubada a 37°C em Banho-maria e avaliada quanto à motilidade total
122 e ao vigor espermático por meio de microscopia de contraste de fase com placa aquecedora
123 acoplada, aumento de 400x, nos tempos 0, 60, 120 e 180 minutos.

124 *Avaliação da cinética espermática usando sistema visual óptico integrado*

125 A cinemática espermática foi avaliada por meio do *Computer Assisted Sperm Analysis*
126 (CASA), que consiste em um sistema de microscopia óptica de contraste de fase com
127 iluminação estroboscópica, e uma fase quente a 37°C, uma câmera de vídeo e um computador
128 com o analisador de sêmen Classe™ software (Microptics, SL, versão 3.2.0, Barcelona,
129 Espanha), no qual foram analisados os parâmetros: motilidade total (MT - μ m/s), motilidade
130 progressiva (MP - μ m/s), velocidade curvilínea (VCL - μ m/s), velocidade em linha reta (VSL
131 - μ m/s), velocidade média do percurso (VAP - μ m/s), linearidade (LIN - %), retilinearidade
132 (STR - %), deslocamento lateral de cabeça (ALH - μ m), oscilação (WOB - %) e frequência de
133 batimento cruzado (BCF - Hz), para cada espermatozoide analisado.

134 *Análise da integridade da membrana plasmática*

135 Foi utilizado o método de coloração dupla com Diacetato de carboxifluoresceína (DCF;
136 Sigma-Aldrich®, USA) e Iodeto de propídio (IP; Sigma-Aldrich®, USA), modificado por Coletto
137 *et al.* (2002), para avaliação da integridade da membrana plasmática, em que alíquotas de 50 μ L
138 de sêmen pós descongelado foram diluídas em 150 μ L de Tris, 5 μ L de DCF e 20 μ L de IP e
139 incubadas por 10 minutos a 37°C. Avaliaram-se 200 espermatozoides em microscópio de
140 epifluorescência (400x), usando-se filtro de emissão DBP 580-630nm e excitação DBP
141 485/20nm. Os espermatozoides foram classificados em membrana intacta quando se
142 apresentaram corados em verde e com membrana danificada quando corados em vermelho.

143 *Análise da integridade acrossomal*

144 Para realização deste teste foi utilizado o corante Isotiocianato de fluoresceína
145 conjugado a Peanut agglutinin (FITC-PNA; Sigma-Aldrich®, USA), de acordo com a técnica
146 descrita por Roth *et al.* (1998). Alíquotas de 20µL de FITC-PNA foram colocadas sobre
147 esfregaços de lâminas contendo espermatozoides, as quais foram incubadas por 20 minutos em
148 câmara úmida a 4°C, na ausência de luz. Posteriormente, as lâminas foram enxaguadas duas
149 vezes em PBS refrigerado (4°C) e colocadas para secagem na ausência de luz. Imediatamente
150 antes da avaliação, 5µL de meio de montagem UCD (4,5mL de glicerol, 0,5mL de PBS, 5mg
151 de azida sódica e 5mg de p-fenilenodiamina) foram colocados sobre a lâmina e cobertos com
152 lamínula. Avaliaram-se 200 espermatozoides por lâmina em microscópio de epifluorescência
153 (400x), usando-se filtro de emissão *long pass* (LP) 515nm e *band pass* (BP) 450-490nm para
154 excitação. As células espermáticas foram classificadas em espermatozoides com acrossomas
155 intactos, quando apresentaram a região acrossomal corada com fluorescência verde, ou com
156 acrossomas reagidos, apresentando uma faixa verde fluorescente na região equatorial da cabeça
157 espermática ou não apresentando fluorescência verde em toda região da cabeça.

158 *Análise do potencial de membrana mitocondrial*

159 A análise do potencial de membrana mitocondrial foi realizada pela utilização de um
160 fluorocromo catiônico lipofílico JC-1 (GUTHRIE; WELCH, 2006). Alíquotas de 50µL de
161 sêmen pós-descongelado foram diluídas em 150µL de Tris contendo 5µL de JC-1 (0,15mM em
162 DMSO) e incubadas por 10 minutos a 38°C. Então, 200 espermatozoides foram avaliados em
163 microscópio de epifluorescência com aumento de 1000x, sob óleo de imersão, utilizando o filtro
164 de emissão LP 515nm e BP 450-490nm para excitação. Os espermatozoides corados em laranja
165 foram classificados com alto potencial de membrana mitocondrial e aqueles corados em verde
166 foram classificados com baixo potencial de membrana.

167 *Quantificação da lipoperoxidação da membrana espermática*

168 As concentrações de malondialdeído (MDA), uma das substâncias reativas ao ácido
169 tiobarbitúrico (TBARS), foram determinadas de acordo com o método descrito por Ohkawa *et*
170 *al.* (1979), com adaptações. Para isso, 400µL de sêmen pós-descongelado foram adicionados a
171 175µL de ácido acético a 20% (pH 3,5) e 300µL de ácido tiobarbitúrico 0,5%. Em seguida, a
172 mistura foi incubada em Banho-maria por 45 minutos a 100°C e posteriormente resfriada em
173 banho de gelo durante 15 minutos. Após esse procedimento, adicionou-se à mistura 25µL de
174 dodecil sulfato de sódio (SDS) 8,1%, centrifugando por 15 minutos a 12.000 rpm a 25°C.
175 Transferiram-se 200µL do sobrenadante para placa de 96 poços, onde foi realizada leitura no
176 comprimento de onda de 532nm. Uma curva analítica de calibração foi preparada utilizando

177 MDA como padrão, em concentrações de 1, 5, 10, 25 e 50nmol/mL. As amostras foram
178 analisadas em duplicata sendo os resultados expressos em nmol de MDA por mL de amostra.

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

180 A concentração de glutathiona reduzida foi baseada na reação de Ellman (5,5'-ditiobis
181 (ácido 2-nitrobenzoico), de acordo com algumas modificações da técnica descrita por Khan *et*
182 *al.* (2011). Em um tubo contendo 2mL tampão EDTA, foram adicionados 200µL da amostra.
183 Após agitação, foi retirado 1mL da mistura e colocado em outro eppendorf com 1mL de TCA
184 (ácido tricloroacético) a 10%. Então, foi centrifugado a 3000 rpm por 15 minutos. Em seguida,
185 foram recolhidos 500µL do sobrenadante e adicionado 1mL de tampão Tris-HCl 0,4M, EDTA,
186 pH 8,9 e mais 25µL de Ditiobisnitrobenzoato (DTNB) 0,01M. Após 1 minuto de reação, foi
187 feita a leitura em espectrofotômetro em 412nm. A concentração foi expressa em µM/mL. Para
188 a curva padrão da glutathiona foram feitas soluções de glutathiona a 6,66; 13,33; 26,66; 40; 53,33
189 e 66µM.

190 *Delineamento e Análise estatística*

191 Os dados foram analisados em delineamento inteiramente casualizado (4 tratamentos e
192 6 repetições). Inicialmente, as variáveis foram submetidas ao teste de normalidade, sendo
193 verificado a distribuição normal dos dados. Posteriormente, foram calculadas as médias e
194 desvios-padrão das variáveis pesquisadas e foram submetidos à análise de variância (ANOVA)
195 utilizando-se o procedimento modelos lineares gerais (Proc GLM). Para comparação das
196 médias foi utilizado o teste de Duncan, na probabilidade de 5%. As análises foram executadas
197 através do programa *Statistical Analysis System* (SAS Institute Inc, 2013).

198

199 **Resultados**

200

201 Os resultados da morfologia espermática (Tabela 1) mostraram que não houve diferença
202 significativa ($p > 0,05$) entre o controle e as concentrações de ácido araquidônico adicionadas
203 ao diluidor no sêmen caprino pós-criopreservado.

204 **Tabela 1** - Médias e desvios-padrão da morfologia dos espermatozoides caprinos pós-descongelados após
 205 suplementação do ácido araquidônico no diluidor

Tratamentos	Espermatozoides	
	Normais (%)	Defeitos maiores (%)
Pool	71.66 ± 4.23	6.16 ± 2.06
Controle	65.83 ± 4.13	10.00 ± 4.14
0,5 µM de ácido araquidônico	67.75 ± 7.44	10.58 ± 5.12
5 µM de ácido araquidônico	70.83 ± 6.72	9.00 ± 5.45
50 µM de ácido araquidônico	69.58 ± 6.94	8.00 ± 3.97

206 Valores de média com letras sobrescrito diferentes na mesma coluna indicam diferenças significativas ($p < 0,05$)
 207 pelo teste de DUNCAN.

208 Em relação aos parâmetros de motilidade total (%) e vigor (1 - 5) dos tratamentos
 209 analisados durante o teste de termorresistência (TTR), foi utilizado esquema fatorial 4 x 4
 210 (quatro tratamentos e 4 tempos) pelo fato de existir mais de um fator a ser analisado. Observou-
 211 se que não houve interação entre os fatores, sendo analisados individualmente e, com isso, não
 212 foi observada diferença significativa ($p > 0,05$) (Tabela 2) das variáveis motilidade e vigor entre
 213 os tratamentos durante cada hora avaliada. Houve diferença apenas entre os tempos testados
 214 para os parâmetros avaliados.

215 **Tabela 2** - Médias e desvios-padrão da motilidade total e vigor pós-descongelamento de espermatozoides caprinos após suplementação do ácido araquidônico no diluidor,
 216 submetidos ao teste de termorresistência (TTR)

Tratamentos	0 minutos		60 minutos		120 minutos		180 minutos	
	Motilidade (%)	Vigor (1 - 5)						
Controle	48.33 ± 7.52	3.00 ± 0.0	38.33 ± 13.29	2.50 ± 0.54	22.50 ± 13.32	2.00 ± 0.63	8.33 ± 11.25	0.83 ± 0.75
0,5 µM de ácido araquidônico	49.16 ± 8.01	3.00 ± 0.0	35.00 ± 20.73	2.33 ± 0.81	19.16 ± 18.55	1.83 ± 1.16	6.66 ± 11.69	0.66 ± 0.81
5 µM de ácido araquidônico	46.66 ± 5.16	3.00 ± 0.0	31.66 ± 7.52	2.50 ± 0.54	20.00 ± 13.78	2.00 ± 0.89	6.66 ± 7.52	0.83 ± 0.75
50 µM de ácido araquidônico	41.66 ± 11.69	2.83 ± 0.40	26.66 ± 17.22	2.16 ± 0.75	15.83 ± 17.72	1.50 ± 1.04	7.50 ± 13.69	0.66 ± 0.81

217 Valores de média com letras minúsculas diferentes na mesma coluna indicam diferenças significativas entre os tempos para motilidade ($p < 0,05$) pelo teste de DUNCAN.

218 Após as análises da integridade das membranas plasmática e acrossomal, e do potencial
 219 mitocondrial (Tabela 3) dos espermatozoides caprinos pós-criopreservação, observou-se que o
 220 tratamento com 50 µM de ácido araquidônico alterou ($p < 0,05$) a MP, AC e o MIT em relação
 221 aos demais tratamentos.

222 **Tabela 3** - Médias e desvios-padrão da integridade de membrana plasmática (MP), integridade acrossomal (AC)
 223 e potencial mitocondrial (MIT) dos espermatozoides caprinos pós-descongelados após suplementação do ácido
 224 araquidônico no diluidor

Tratamentos	MP (%)	AC (%)	MIT (%)
Controle	47.00 ± 9.54 ^a	57.50 ± 6.22 ^a	47.00 ± 6.57 ^a
0,5 µM de ácido araquidônico	44.83 ± 15.22 ^a	51.50 ± 8.71 ^a	47.16 ± 11.14 ^a
5 µM de ácido araquidônico	43.50 ± 13.47 ^a	49.66 ± 7.31 ^a	42.50 ± 14.34 ^a
50 µM de ácido araquidônico	20.00 ± 4.28 ^b	33.33 ± 15.73 ^b	18.33 ± 12.30 ^b

225 Valores de média com letras sobrescrito diferentes na mesma coluna indicam diferenças significativas ($p < 0,05$)
 226 pelo teste de DUNCAN.

227 Os parâmetros cinéticos pós-descongelção de espermatozoides caprinos estão
 228 apresentados na Tabela 4. Verificou-se que após a descongelção dos tratamentos, a motilidade
 229 total (MT) do tratamento com 0,5µM de ácido araquidônico apresentou maior valor e diferiu
 230 significativamente do tratamento com 50µM de ácido araquidônico.

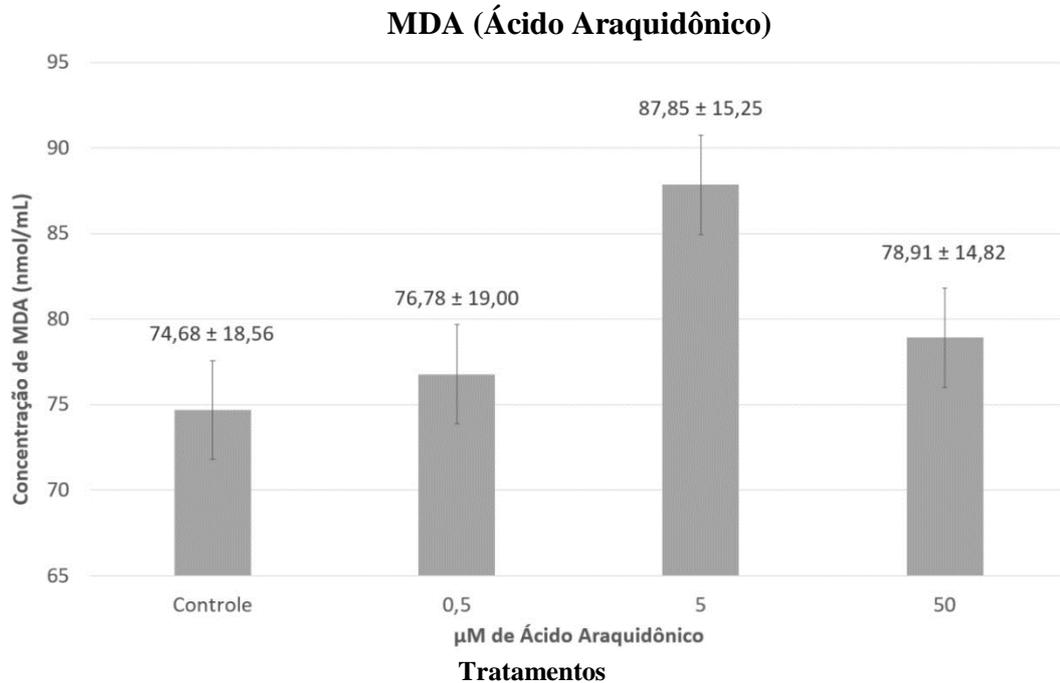
231 **Tabela 4** - Médias e desvios-padrão dos parâmetros cinéticos (CASA) de espermatozoides caprinos
 232 criopreservados após suplementação do ácido araquidônico no diluidor

Parâmetros de motilidade	Controle	0,5 µM de ácido araquidônico	5 µM de ácido araquidônico	50 µM de ácido araquidônico
MT	48,54 ± 9,06 ^{ab}	58,32 ± 9,68 ^a	46,15 ± 15,04 ^{ab}	33,22 ± 20,54 ^b
MP	15,89 ± 12,11	22,03 ± 8,57	15,71 ± 8,15	12,95 ± 15,75
VCL	64,73 ± 24,68	62,93 ± 11,81	65,01 ± 14,60	61,86 ± 20,31
VSL	34,46 ± 18,19	36,13 ± 9,14	35,12 ± 11,84	34,65 ± 16,76
VAP	45,42 ± 22,06	45,05 ± 9,69	45,61 ± 13,27	44,69 ± 19,91
LIN	51,73 ± 7,23	57,05 ± 4,64	53,07 ± 7,10	54,11 ± 7,42
STR	74,99 ± 3,77	79,77 ± 3,05	76,19 ± 4,51	76,73 ± 3,73
WOB	68,78 ± 6,98	71,46 ± 4,18	69,51 ± 6,53	70,43 ± 8,06
ALH	3,16 ± 0,45	2,93 ± 0,24	3,03 ± 0,32	2,80 ± 0,44
BCF	9,89 ± 1,17	10,03 ± 0,93	9,58 ± 1,17	9,57 ± 1,66

233 Valores de média com letras minúsculas diferentes na mesma linha indicam diferenças significativas ($p < 0,05$)
 234 pelo teste de DUNCAN. **MT** - Motilidade total; **MP** - Motilidade progressiva; **VCL** - velocidade curvilínea; **VSL**
 235 - velocidade em linha reta; **VAP** - velocidade média de percurso; **LIN** - linearidade; **STR** - retilinearidade; **WOB**
 236 - Oscilação; **ALH** - Amplitude de deslocamento lateral da cabeça e **BCF** - frequência de batimentos de cauda.

237 Em relação à produção de malondialdeído (MDA), substância reativa ao ácido
 238 tiobarbitúrico, não foi observada diferença significativa ($p > 0,05$) entre os tratamentos
 239 analisados (Figura 1).

240



241

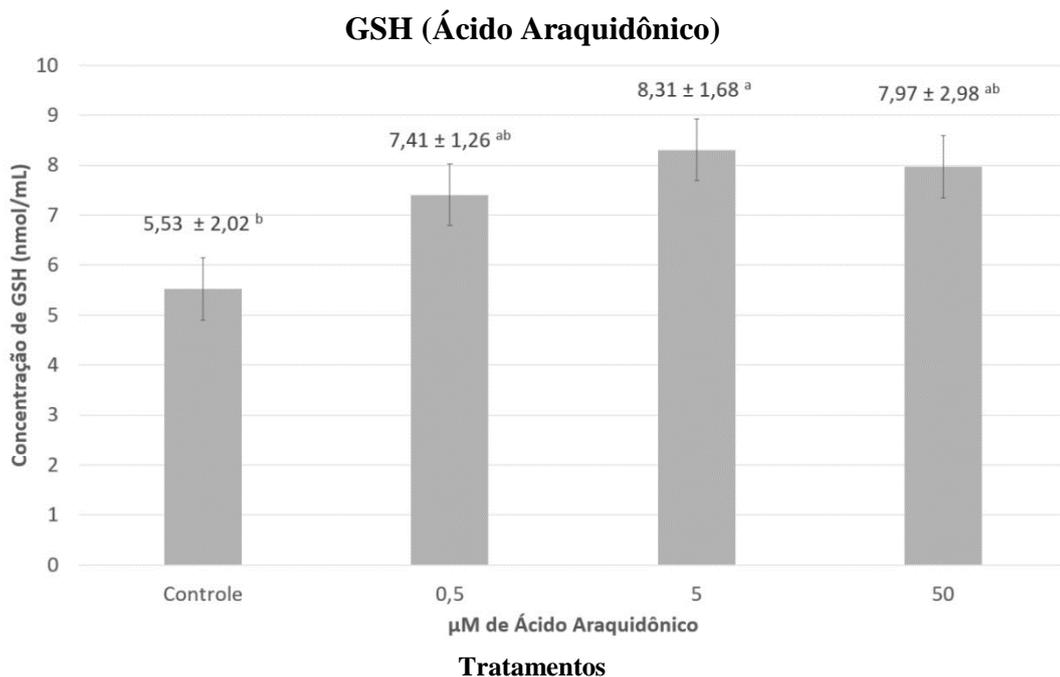
242

243 **Figura 1** – Quantificação do MDA em sêmen caprino pós-criopreservado após suplementação do ácido
 244 araquidônico no diluidor. MDA: Malondialdeído. Os valores são expressos como média ± desvio padrão (DP).
 245 Não foram observadas diferenças entre os grupos utilizando Análise de Variância (ANOVA), seguido de
 246 DUNCAN como post hoc teste ($p < 0,05$).

247

248 Após análise da concentração da glutathiona reduzida, observou-se que a concentração
 249 de 5 μM de ácido araquidônico apresentou maiores valores de GSH, diferindo estatisticamente
 250 ($p < 0,05$) do controle (Figura 2).

250



251

252

253
254 **Figura 2** – Quantificação da concentração de GSH em sêmen caprino pós-criopreservado após suplementação do
255 ácido araquidônico no diluidor. GSH: Glutathiona reduzida. Os valores são expressos como média \pm desvio padrão
256 (DP). As diferenças entre os grupos foram determinadas por Análise de Variância (ANOVA), seguido de
257 DUNCAN como post hoc teste ($p < 0,05$).

258 **Discussão**

259

260 Nos últimos anos, a melhoria na compreensão das alterações bioquímicas e da excessiva
261 formação de radicais livres durante a criopreservação tem levado a realização de pesquisas
262 utilizando diversos ácidos graxos como antioxidantes. No entanto, é inédita uma pesquisa que
263 faça uso do ácido araquidônico nesta função durante a criopreservação da espécie caprina.

264 Uma das análises realizadas foi a morfologia espermática, essencial na determinação da
265 qualidade seminal e do potencial fecundante das células espermáticas. No presente trabalho,
266 observou-se que os tratamentos mantiveram o percentual de espermatozoides normais ($p >$
267 $0,05$), além do que, o percentual de defeitos maiores permaneceu estatisticamente dentro do
268 preconizado pelo CBRA para sêmen criopreservado caprino (Tabela 1) (CBRA, 2013). A
269 manutenção desses percentuais pode ser explicada pela qualidade dos reprodutores
270 selecionados, como também pelo fato de todas as coletas terem sido realizadas fora da estação
271 de monta, não havendo bruscas alterações hormonais e bioquímicas, que conseqüentemente,
272 promoveriam uma maior chance de malformação dos espermatozoides (TOAZZA, 2018).

273 Já em relação ao teste de termorresistência (TTR), foi observado que não houve
274 interação significativa ($p > 0,05$) entre os tratamentos e o fator tempo, sendo assim avaliados
275 separadamente. Ademais, observou-se que não houve diferença estatística ($p > 0,05$) entre as
276 concentrações de ácido araquidônico para as variáveis motilidade e vigor durante o TTR
277 (Tabela 2). Os parâmetros motilidade e vigor apresentaram redução estatisticamente semelhante
278 a cada hora testada, tanto no grupo controle como nas concentrações de $0,5 \mu\text{M}$, $5 \mu\text{M}$ e $50 \mu\text{M}$
279 ácido araquidônico. No entanto, Hossain *et al.*, (2007) observaram que os ácidos oleico,
280 araquidônico e linoleico, individualmente, melhoraram a motilidade e a viabilidade de
281 espermatozoides de javali quando comparados ao grupo controle.

282 Como esperado, houve diferença apenas entre os tempos testados para os parâmetros,
283 observando diminuição dos valores dos mesmos com o passar do tempo de análise. Tal fato é
284 explicado pelo maior consumo de substâncias nutritivas do sêmen durante as primeiras horas
285 do TTR, como também às perdas de componentes intracelulares ou às lesões estruturais na
286 cauda das células espermáticas, reduzindo sua viabilidade, sendo esta decorrente da redução da
287 geração de ATP durante as primeiras horas (BARROS *et al.*, 2013).

288 No que se refere à avaliação da integridade das membranas plasmática e acrossomal, e
289 do potencial mitocondrial, sabe-se que a verificação simultânea destes aumenta a acurácia da
290 análise seminal, estando interligados (BATISSACO *et al.*, 2020). Então, foi observado que o
291 tratamento com 50 μM de ácido araquidônico alterou ($p < 0,05$) a MP, AC e o MIT em relação
292 aos demais tratamentos (Tabela 3), mostrando que as demais concentrações de ácido
293 araquidônico mantiveram os parâmetros de qualidade estrutural de espermatozoides
294 criopreservados de caprinos.

295 Uma provável causa para os resultados dos tratamentos com 0,5 μM e 5 μM de ácido
296 araquidônico não apresentarem uma melhora em relação ao controle, pode ser a insuficiente
297 incorporação do ácido graxo à membrana espermática. De acordo com Ejaz *et al.* (2014), existe
298 a possibilidade de os ácidos graxos serem carregados através da membrana plasmática, e ao
299 atravessarem a membrana externa e entrarem no núcleo hidrofóbico, estes seriam protonados,
300 possibilitando-lhes a inclusão no folheto interno, aumentando as taxas de integridade de
301 membranas, fato este não observado no presente experimento.

302 Ademais, os resultados inferiores ao utilizar a concentração de 50 μM de ácido
303 araquidônico podem estar relacionados a uma possível dose excessiva do antioxidante, tendo
304 em vista que ácido araquidônico é convertido em prostaglandina E2, por meio da ação da ciclo-
305 oxigenase, induzindo o influxo de Ca^{2+} através da membrana espermática, levando a fusão das
306 membranas (JOBIM *et al.*, 2009; VIANA, 2018). Ou seja, o influxo de cálcio e de bicarbonato
307 vem sendo relacionado ao aumento do pH, a regulação dos níveis de AMPc e hiperpolarização
308 da membrana plasmática (NISHIGAKI *et al.*, 2014).

309 Em relação à cinética espermática avaliada pelo CASA (Tabela 4), observou-se, dentre
310 os parâmetros analisados, que apenas a motilidade total (MT) apresentou diferença
311 significativa, no qual o tratamento com 0,5 μM de ácido araquidônico obteve o maior valor
312 dentre os demais, além de diferir do tratamento com 50 μM de ácido araquidônico. A
313 concentração de 0,5 μM apresentou melhor MT e maiores valores dos demais parâmetros
314 cinéticos possivelmente, devido à uma melhor interação cooperativa com a gema do ovo,
315 contribuindo com a proteção das membranas espermáticas contra a ação das ROS, mantendo a
316 produção de ATP, que é fonte de energia para o batimento flagelar, e favorecendo a motilidade
317 espermática.

318 No tocante à produção de ROS, é sabido que o estresse celular induz a lipoperoxidação
319 da membrana plasmática, produzindo o MDA (BARRERA *et al.*, 2018). Logo, foi observado
320 que a produção de MDA não apresentou diferença significativa ($p > 0,05$) entre os tratamentos
321 (Figura 1), podendo-se inferir que a adição do ácido araquidônico, um ácido graxo poli-

322 insaturado, manteve o sistema redox equilibrado, em níveis necessários para manter a taxa de
323 peroxidação lipídica.

324 Em relação à análise da concentração de glutathiona reduzida, observou-se que a
325 concentração de 5 μ M de ácido araquidônico apresentou maior atividade da enzima GSH,
326 diferindo estatisticamente ($p < 0,05$) do controle (Figura 2), mostrando que o ácido
327 araquidônico induz as defesas da célula contra os radicais livres que geram danos celulares
328 mediado pelo superóxido. Ainda não se sabe exatamente o mecanismo do GSH na regulação
329 do potencial transmembrana mitocondrial, porém, sabe-se que o GSH tem a capacidade de
330 melhorar a qualidade seminal, protegendo as pontes dissulfeto e assim, contribuindo para a
331 manutenção da estrutura nuclear do espermatozoide (YESTE *et al.*, 2013).

332 Conclui-se que a suplementação de ácido araquidônico ao diluidor TRIS-gema manteve
333 a qualidade morfológica dos espermatozoides caprinos após a criopreservação, além de
334 contribuir para melhoria da motilidade total e do potencial enzimático antioxidante.

335

336 Referências

337

338 AITKEN, R. J.; GRAVES, J. A. M. Human spermatozoa: The future of sex. **Nature**, p.415:
339 963, 2002.

340

341 BARRERA, G.; PIZZIMENTI, S.; DAGA, M.; DIANZANI, C.; ARCARO, A.;
342 CETRANGOLO, G. P.; GIORDANO, G.; CUCCI, M. A.; GRAF, M.; GENTILE, F. Lipid
343 peroxidation-derived aldehydes, 4-hydroxynonenal and malondialdehyde in aging-related
344 disorders. **Antioxidants**, v. 7 (8), p. 102, 2018.

345

346 BARROS, M. H. C.; SHIOMI, H. H.; AMORIM, L. S.; SIQUEIRA, J. B.; PINHO, R. O.;
347 LIMA, D. M. A.; LOPES, P. S.; GUIMARÃES, S. E. F.; GUIMARÃES, J. D. Viabilidade
348 espermática do sêmen congelado de suínos da raça piau avaliada pelo teste de termorresistência.
349 **Acta Veterinaria Brasilica**, v.7 (2), p. 164-170, 2013.

350

351 BATISSACO, L.; ARRUDA, R. P.; ALVES, M. B. R.; TORRES, M. A.; LEMES, K. M.;
352 PRADO-FILHO, R. R.; ALMEIDA, T. G.; ANDRADE, A. F. C.; CELEGHINI, E. C. C.
353 Cholesterol-loaded cyclodextrin is efficient in preserving sperm quality of cryopreserved ram
354 semen with low freezability. **Reproductive Biology**, v. 20 (1), p. 14-24, 2020.

355

356 BLOM, E. Ultrastructure of some characteristic sperm defects and a proposal for a new
357 classification of the bull spermogram. **Nordisk Veterinærmedicin**, v.25, p.383-391, 1973.

358

359 CBRA. Colégio Brasileiro de Reprodução Animal, Belo Horizonte, Minas Gerais. **Manual**
360 **para exame andrológico e avaliação de sêmen animal**, 2013.

361

362 COLETO, Z. F.; GUERRA, M. M. P.; BATISTA, A. M. Avaliação do sêmen congelado de
363 caprinos com drogas fluorescentes. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, v.24, p. 101-
364 104, 2002.

- 365
366 EJAZ, R.; ANSARI, M. S.; RAKH, B.A.; ULLAH, N.; HUSNA, A. U.; IQBAL, R.; AKHTER,
367 S. Arachidic acid in extender improves post-thaw parameters of cryopreserved Nili-Ravi
368 buffalo bull semen. **Reproduction Domestic Animal**, v.49, p.122-125, 2014.
369
- 370 GUTHRIE, H. D.; WELCH, G.R. Determination of intracellular reactive oxygen species and
371 high mitochondrial membrane potential in Percoll-treated viable boar sperm using
372 fluorescence-activated flow cytometry. **Journal of Animal Science**, v. 84, p. 2089-2100, 2006.
373
- 374 HOSSAIN. S.; TAREK, K. M. A.; HAMMANO K. I.; TSUJII H. Effect of fatty acids on boar
375 sperm motility viability and acrosome reaction. **Reproductive Medicine and Biology**, v.6 (4),
376 p. 235-239, 2007.
377
- 378 JIMÉNEZ-RABADÁN, P.; MORRELL, J. M.; JOHANNISSON, A.; RAMÓN, M.; GARCÍA-
379 ÁLVAREZ, O.; MAROTO-MORALES, A.; ALVARO-GARCÍA, P. J.; PÉREZ-GUZMÁN,
380 M. D.; FERNÁNDEZ-SANTOS, M. R.; GARDE, J. J.; SOLER, A. J. Single layer
381 centrifugation (SLC) improves sperm quality of cryopreserved Blanca-Celtibérica buck semen.
382 **Animal Reproduction Science**, v.136 (1-2), p.47-54, 2012.
383
- 384 JOBIM, M. I. M.; GREGORY, R. M.; MATTOS, R. C. Marcadores protéicos de fertilidade no
385 plasma seminal e na membrana plasmática. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 6,
386 p.11-19, 2009.
387
- 388 KHAN, H.; KHAN, M. F.; JAN, S. U.; ULLAH, N. Effect of aluminium metal on glutathione
389 (GSH) level in plasma and cytosolic fraction of human blood. **Pakistan Journal of**
390 **Pharmaceutical Sciences**, v. 24, p. 13-18, 2011.
391
- 392 MACHADO, W. M.; BARBOSA, L. P.; SOUZA, R. S.; FRANCA, C. S.; PINHEIRO, E. E.
393 G.; LENTS, M. P.; ARAUJO, R. C. S. A.; SANTANA, A. L. A. Fish oil associated to ascorbic
394 acid in diluter for cryopreservation goat semen. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária**
395 **e Zootecnia**, v. 70 (1), p. 131-138, 2018.
396
- 397 MORADI, M.; KARIMI, I.; AHMADI, S.; MOHAMMED, L. J. The necessity of antioxidant
398 inclusion in caprine and ovine semen extenders: A systematic review complemented with
399 computational insight. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 55 (9), p.1-17, 2020.
400
- 401 NASEER, Z.; AHMAD, E.; AKSOY, M.; KÜÇÜK, N.; SERIN, I.; CEYLAN, A.;
402 BOYACIOĞLU, M.; KUM, C. Protective effect of cholesterol-loaded cyclodextrin
403 pretreatment against hydrogen peroxide induced oxidative damage in ram sperm. **Cryobiology**,
404 v.71 (1), p. 18-23, 2015.
405
- 406 NASIRI, A. H.; TOWHIDI, A.; ZEINOALDINI, S. Combined effect of DHA and α -tocopherol
407 supplementation during bull semen cryopreservation on sperm characteristics and fatty acid
408 composition. **Andrologia**, v.44, Supl.1, p.550-555, 2012.
409
- 410 NISHIGAKI, T.; JOSÉ, O.; GONZÁLEZ-COTA, A. L.; ROMERO, F.; TREVIÑO, C. L.;
411 DARSZON, A. Intracellular pH in sperm physiology. **Biochemical and Biophysical**
412 **Research**, v. 450, p. 1149-158, 2014.
413

- 414 OHKAWA, H.; OHISHI, N.; YAGI, K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by
415 thiobarbituric acid reaction. **Analytical biochemistry**, v. 95 (2), p. 351-358, 1979.
416
- 417 ROTH, T. L., WEISS, R. B., BUFF, J. L. Heterologous in vitro fertilization and sperm
418 capacitation in an endangered African antelope, the Scimitar-Horned Oryx (*Oryx dammah*).
419 **Biology Reproduction**, v. 58, p. 475-482, 1998.
420
- 421 SANTIAGO-MORENO, J.; ESTESO, M. C.; CASTAÑO, C.; TOLEDANO-DÍAZ, A.;
422 DELGADILLO, J. A.; LÓPEZ-SEBASTIÁN, A. Seminal plasma removal by density-gradient
423 centrifugation is superior for goat sperm preservation compared with classical sperm washing.
424 **Animal Reproduction Science**, v.181, p.141-150, 2017.
425
- 426 SAS Institute Inc. Statistical Analysis System user's guide. Version 9.4. Cary, Statistical
427 Analysis System Institute. 550 p, 2013.
428
- 429 SOUZA, W. L.; MORAES, E. A.; COSTA, J. M. S.; SOUSA, P. H. F.; LOPES JUNIOR, E.
430 S.; OLIVEIRA, R. P.; TONIOLLI, R. Efeito de diferentes concentrações de melatonina em
431 espermatozoides de carneiros sobre estresse oxidativo após criopreservação. **Pesquisa**
432 **Veterinária Brasileira**, v.36 (7), p.657-664, 2016.
433
- 434 SOUZA, W. L.; MORAES, E. A.; TONIOLLI, R. Adição de antioxidantes ao sêmen de
435 carneiros e seus efeitos após a descongelação. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.37, p.471-
436 478, 2017.
437
- 438 TOAZZA, R. **Influência da sazonalidade nas características reprodutivas de carneiros de**
439 **raças leiteiras**. 2018. 83f. Dissertação (Mestrado) – Universidade do Estado de Santa Catarina,
440 Lages, Santa Catarina, 2018.
441
- 442 TOWHIDI, A.; PARKS, J. E. Effect of n-3 fatty acids and α -tocopherol on post-thaw
443 parameters and fatty acid composition of bovine sperm. **Journal of Assisted Reproduction**
444 **and Genetics**, v.29, p.1051-1056, 2012.
445
- 446 VIANA, A. G. A. **Avaliação proteômica de plasma seminal de touros holandeses (*Bos***
447 ***taurus*) de alta e baixa fertilidades**. 2018. 96f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal
448 do Ceará, Fortaleza, 2018.
449
- 450 YESTE, M.; FLORES, E.; ESTRADA, E.; BONET, S.; RIGAU, T.; RODRÍGUEZ-GIL, J. E.
451 Reduced glutathione and procaine hydrochloride protect the nucleoprotein structure of boar
452 spermatozoa during freeze-thawing by stabilising disulfide bonds. **Reproduction, Fertility**
453 **and Development**, v. 25 (7), p. 1036-50, 2013.

4 CAPÍTULO II*

*Apresentado segundo normas do periódico JOURNAL OF VETERINARY SCIENCE (JVS)

1 AVALIAÇÃO DA SUPLEMENTAÇÃO DO ÁCIDO OLEICO AO DILUIDOR SOBRE 2 A VIABILIDADE ESPERMÁTICA EM SÊMEN CAPRINO PÓS-CONGELAMENTO

3 4 **Resumo**

5 A fim de otimizar a produtividade da caprinocultura, têm-se utilizado as biotécnicas
6 reprodutivas, destacando-se a criopreservação. Com isso, é crescente o interesse por substâncias
7 que possam diminuir o estresse causado por essa técnica e que melhorem as defesas
8 antioxidantes dos sistemas biológicos. Portanto, objetivou-se analisar a aplicação de diferentes
9 concentrações do ácido oleico (0,5 μM , 5 μM e 50 μM) ao diluidor TRIS-gema, sobre a
10 viabilidade espermática após a criopreservação dos espermatozoides caprinos. Para isto,
11 utilizou-se quatro caprinos da raça Anglo-nubiana, sendo coletadas seis amostras/animal,
12 usando vagina artificial. Após análise dos ejaculados, foi feito o “pool”, a diluição em TRIS-
13 gema e alíquotagem dos tratamentos. Então, o sêmen foi criopreservado, e posteriormente,
14 realizaram-se as análises pós-criopreservação: avaliação morfológica, teste de
15 termorresistência, integridade da membrana plasmática e acrossomal, potencial mitocondrial,
16 cinética espermática pelo CASA, quantificação da lipoperoxidação espermática e dos níveis de
17 glutatona reduzida (GSH). Verificou-se que as concentrações de ácido oleico preservaram a
18 qualidade morfológica espermática pós-criopreservação, mas não foram influenciadoras
19 durante a termorresistência, nem em relação a produção do malondialdeído e a concentração de
20 GSH. Observou-se que a concentração de 50 μM de ácido oleico foi prejudicial ($p < 0,05$) à
21 integridade acrossomal. Já os tratamentos com 0,5 e 5 μM melhoraram significativamente ($p <$
22 $0,05$) a motilidade total, diferindo do tratamento com 50 μM de ácido oleico. Constatou-se que
23 a adição de ácido oleico ao diluidor preservou a qualidade morfológica espermática e melhorou,
24 nas concentrações de 0,5 e 5 μM , a motilidade total do sêmen caprino pós-criopreservação.

25
26 **Palavras-chave:** Antioxidantes, ácido oleico, estresse oxidativo, criopreservação.

27 28 **Introdução**

29
30 Afim de otimizar a eficiência reprodutiva da caprinocultura, a criopreservação seminal
31 consolidou-se como uma alternativa, permitindo a conservação e multiplicação do material
32 genético de animais geneticamente superiores, além de contribuir para a redução de custos com
33 os reprodutores (CÂMARA *et al.*, 2019).

34 Contudo, durante a criopreservação, as células espermáticas são expostas a fatores
35 estressantes, como as espécies reativas de oxigênio (ROS) (LIEBERMAN *et al.*, 2016). A
36 vulnerabilidade às ROS é decorrência da baixa capacidade antioxidante citoplasmática e do alto
37 teor de ácidos graxos poli-insaturados na membrana celular (DARBANDI *et al.*, 2019). Isto
38 posto, a presença elevada das ROS nos espermatozoides resulta em danos irreversíveis,
39 causando queda na viabilidade espermática devido à redução extracelular de antioxidantes que
40 protegeriam essa célula da ação dos radicais livres (VARNER *et al.*, 2015).

41 Além disso, a membrana espermática é composta por uma grande quantidade de ácidos
42 graxos, que capacitam os espermatozoides a sobreviverem à criopreservação (NICHI, 2009;
43 LUCIO *et al.*, 2017) e auxiliam na hiperativação espermática e nos eventos subsequentes da
44 fecundação (ESPINOSA-CERVANTES; CÓRDOVA-IZQUIERDO, 2018; TUFARELLI *et*
45 *al.*, 2018). Entretanto, a presença dos ácidos graxos torna a célula um alvo preferencial da
46 peroxidação lipídica (LECEWICZ *et al.*, 2018; LONE *et al.*, 2018), sendo mais susceptível ao
47 estresse oxidativo devido às duplas ligações, insaturações, que são mais facilmente clivadas
48 pelas ROS (NICHI *et al.*, 2007). Esse estresse oxidativo causa a perda da integridade estrutural
49 e funcional das membranas (BANDAY *et al.*, 2017).

50 Assim sendo, os níveis de antioxidantes que combatem o estresse oxidativo sofrem
51 redução acentuada durante a criopreservação. Por isso, é crescente o interesse por substâncias
52 que possam combater a alta produção das ROS e que melhorem as defesas antioxidantes de
53 sistemas biológicos (CASTELO BRANCO, 2018). De acordo com pesquisas, o ácido oleico
54 apresenta melhoria na motilidade (em ovinos) (MARTI *et al.*, 2008), na porcentagem de
55 integridade da membrana plasmática, na capacidade antioxidante, e diminuição das quantidades
56 de malondialdeído (HASHEM *et al.*, 2017). Com base no exposto, objetivou-se analisar a
57 viabilidade espermática após aplicação de diferentes concentrações do ácido oleico (0,5 µM,
58 5 µM e 50 µM) junto ao diluidor TRIS-gema, no processo de criopreservação dos
59 espermatozoides caprinos.

60

61 **Metodologia**

62

63 *Ética em experimentação animal*

64 Os procedimentos foram submetidos e aprovados pela Comissão de Ética no Uso de
65 Animais (CEUA) da Universidade Federal do Piauí (UFPI), registrados com o número
66 643/2020 e certificado (Anexo).

67 *Animais*

68 Foram utilizados quatro caprinos da raça Anglo-nubiana, com 1,5 a 3 anos de idade,
69 provenientes de uma propriedade localizada no município de Brasileira, na região centro-norte
70 do Estado do Piauí, com escore de condição corporal 4, na escala 1 a 5. Essa raça foi escolhida
71 devido a sua rusticidade e a ótima adaptação as condições bioclimatológicas da região Nordeste.
72 Previamente, foram realizados exames andrológicos, constatação de proles dos reprodutores e
73 avaliação quanto à saúde geral. Durante o experimento, os animais foram mantidos em regime
74 semi-intensivo, com acesso ao pasto durante o dia, contendo capim mombaça (*Panicum*

75 *maximum cv. Mombaça*), e alojados no aprisco durante a noite, sendo fornecido ao cocho
76 silagem de milho, ração de manutenção contendo 20% de proteína bruta tendo acesso a sal
77 mineral próprio para espécie e água a vontade.

78 *Coleta de sêmen e avaliação inicial*

79 As coletas de sêmen foram realizadas uma vez por semana, durante seis semanas
80 (totalizando 6 ejaculados/animal), com o auxílio de uma fêmea em estro, pelo método da vagina
81 artificial. Em seguida, os ejaculados foram colocados em Banho-maria a 37°C e avaliados
82 individualmente, quanto a cor, aspecto, volume (mL) e aos demais parâmetros conforme
83 recomendações do Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (motilidade de massa: ≥ 4 ; vigor
84 ≥ 3 ; motilidade espermática: $\geq 80\%$; concentração $\geq 2 \times 10^9$ espermatozoides/mL;
85 espermatozoides morfológicamente normais: $\geq 80\%$) (CBRA, 2013). A concentração
86 espermática foi obtida por meio da câmara de Neubauer, na diluição de 1:400. Após essa etapa,
87 as amostras viáveis dos quatro ejaculados foram misturadas para formação de um “pool” por
88 coleta, sendo novamente avaliados em relação à qualidade espermática.

89 *Diluição seminal*

90 Posteriormente, foi adicionado o meio diluidor TRIS-gema (3,605g de Tris; 2,024g de
91 ácido cítrico; 1,488g de frutose; 25mg de gentamicina; 50.000UI de penicilina; 100mL de água
92 destilada; 20% de gema de ovo e 5% de glicerol, com osmolaridade de 350mOsm/kg e pH 6,8)
93 ao “pool”, para, finalmente, suplementar com diferentes concentrações de ÁCIDO OLEICO
94 (ÁCIDO OLEICO, grau reagente ~ 99%, Sigma-Aldrich®, EUA), e avaliar quanto à qualidade
95 espermática. As amostras foram divididas nos seguintes tratamentos: Controle (Tris-gema sem
96 adição de ácido oleico); Tris-gema + 0,5 μM de ácido oleico; Tris-gema + 5 μM de ácido oleico
97 e Tris-gema + 50 μM de ácido oleico.

98 *Criopreservação do sêmen*

99 Após diluição e fracionamento, as amostras de sêmen foram envasadas em palhetas de
100 0,25mL, à temperatura ambiente, para uma concentração final de 20×10^6 espermatozoides
101 viáveis / palheta. Então, foram congeladas na máquina TK 3000® (TK Tecnologia em
102 congelação Ltda., Uberaba, Brasil), utilizando curva de resfriamento lenta, tempo de
103 estabilização a 5°C de 1 hora, e armazenadas. Posteriormente descongelou-se em Banho-maria
104 a 37°C por 30 segundos para realização das análises pós-criopreservação.

105 *Avaliação morfológica*

106 A morfologia foi estimada em cada amostra de sêmen descongelado pelo método de
107 câmara úmida. Uma alíquota de 10 μL do sêmen puro foi adicionada em tubo com 4mL de
108 citrato de sódio formolado a 4%. Posteriormente, essas alíquotas foram avaliadas,

109 contabilizando 200 espermatozoides por meio da observação microscópica (1000x), na qual as
110 alterações morfológicas foram agrupadas e os espermatozoides classificados em
111 espermatozoides normais e espermatozoides com defeitos maiores e menores, segundo Bloom
112 (1973).

113 *Teste de termorresistência (TTR)*

114 O teste de termorresistência foi realizado de acordo Machado *et al.* (2018), que consiste
115 em verificar a longevidade das amostras de sêmen descongeladas. Uma alíquota de 10 μ l de
116 sêmen descongelado foi incubada a 37°C em Banho-maria e avaliada quanto à motilidade total
117 e ao vigor espermático por meio de microscopia de contraste de fase com placa aquecedora
118 acoplada, aumento de 400x, nos tempos 0, 60, 120 e 180 minutos.

119 *Avaliação da cinética espermática usando sistema visual óptico integrado*

120 A cinemática espermática foi avaliada por meio do *Computer Assisted Sperm Analysis*
121 (CASA), que consiste em um sistema de microscopia óptica de contraste de fase com
122 iluminação estroboscópica, e uma fase quente a 37°C, uma câmera de vídeo e um computador
123 com o analisador de sêmen Classe™ software (Microptics, SL, versão 3.2.0, Barcelona,
124 Espanha), no qual foram analisados os parâmetros: motilidade total (MT - μ m/s), motilidade
125 progressiva (MP - μ m/s), velocidade curvilinear (VCL - μ m/s), velocidade em linha reta (VSL
126 - μ m/s), velocidade média do percurso (VAP - μ m/s), linearidade (LIN - %), retilinearidade
127 (STR - %), deslocamento lateral de cabeça (ALH - μ m), oscilação (WOB - %) e frequência de
128 batimento cruzado (BCF - Hz), para cada espermatozoide analisado.

129 *Análise da integridade da membrana plasmática*

130 Foi utilizado o método de coloração dupla com Diacetato de carboxifluoresceína (DCF;
131 Sigma-Aldrich®, USA) e Iodeto de propídio (IP; Sigma-Aldrich®, USA), modificado por Coletto
132 *et al.* (2002), para avaliação da integridade da membrana plasmática, em que alíquotas de 50 μ L
133 de sêmen pós descongelado foram diluídas em 150 μ L de Tris, 5 μ L de DCF e 20 μ L de IP e
134 incubadas por 10 minutos a 37°C. Avaliaram-se 200 espermatozoides em microscópio de
135 epifluorescência (400x), usando-se filtro de emissão DBP 580-630nm e excitação DBP
136 485/20nm. Os espermatozoides foram classificados em membrana intacta quando se
137 apresentaram corados em verde e com membrana danificada quando corados em vermelho.

138 *Análise da integridade acrossomal*

139 Para realização deste teste foi utilizado o corante Isotiocianato de fluoresceína
140 conjugado a Peanut agglutinin (FITC-PNA; Sigma-Aldrich®, USA), de acordo com a técnica
141 descrita por Roth *et al.* (1998). Alíquotas de 20 μ L de FITC-PNA foram colocadas sobre
142 esfregaços de lâminas contendo espermatozoides, as quais foram incubadas por 20 minutos em

143 câmara úmida a 4°C, na ausência de luz. Posteriormente, as lâminas foram enxaguadas duas
144 vezes em PBS refrigerado (4°C) e colocadas para secagem na ausência de luz. Imediatamente
145 antes da avaliação, 5µL de meio de montagem UCD (4,5mL de glicerol, 0,5mL de PBS, 5mg
146 de azida sódica e 5mg de p-fenilenodiamina) foram colocados sobre a lâmina e cobertos com
147 lamínula. Avaliaram-se 200 espermatozoides por lâmina em microscópio de epifluorescência
148 (400x), usando-se filtro de emissão *long pass* (LP) 515nm e *band pass* (BP) 450-490nm para
149 excitação. As células espermáticas foram classificadas em espermatozoides com acrossomas
150 intactos, quando apresentaram a região acrossomal corada com fluorescência verde, ou com
151 acrossomas reagidos, apresentando uma faixa verde fluorescente na região equatorial da cabeça
152 espermática ou não apresentando fluorescência verde em toda região da cabeça.

153 *Análise do potencial de membrana mitocondrial*

154 A análise do potencial de membrana mitocondrial foi realizada pela utilização de um
155 fluorocromo catiônico lipofílico JC-1 (GUTHRIE; WELCH, 2006). Alíquotas de 50µL de
156 sêmen pós-descongelado foram diluídas em 150µL de Tris contendo 5µL de JC-1 (0,15mM em
157 DMSO) e incubadas por 10 minutos a 38°C. Então, 200 espermatozoides foram avaliados em
158 microscópio de epifluorescência com aumento de 1000x, sob óleo de imersão, utilizando o filtro
159 de emissão LP 515nm e BP 450-490nm para excitação. Os espermatozoides corados em laranja
160 foram classificados com alto potencial de membrana mitocondrial e aqueles corados em verde
161 foram classificados com baixo potencial de membrana.

162 *Quantificação da lipoperoxidação da membrana espermática*

163 As concentrações de malondialdeído (MDA), uma das substâncias reativas ao ácido
164 tiobarbitúrico (TBARS), foram determinadas de acordo com o método descrito por Ohkawa *et*
165 *al.* (1979), com adaptações. Para isso, 400µL de sêmen pós-descongelado foram adicionados
166 a 175µL de ácido acético a 20% (pH 3,5) e 300µL de ácido tiobarbitúrico 0,5%. Em seguida, a
167 mistura foi incubada em Banho-maria por 45 minutos a 100°C e posteriormente resfriada em
168 banho de gelo durante 15 minutos. Após esse procedimento, adicionou-se à mistura 25µL de
169 dodecil sulfato de sódio (SDS) 8,1%, centrifugando por 15 minutos a 12.000 rpm a 25°C.
170 Transferiram-se 200µL do sobrenadante para placa de 96 poços, onde foi realizada leitura no
171 comprimento de onda de 532nm. Uma curva analítica de calibração foi preparada utilizando
172 MDA como padrão, em concentrações de 1, 5, 10, 25 e 50nmol/mL. As amostras foram
173 analisadas em duplicata sendo os resultados expressos em nmol de MDA por mL de amostra.

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

175 A concentração de glutathiona reduzida foi baseada na reação de Ellman (5,5'-ditiobis
176 (ácido 2-nitrobenzoico), de acordo com algumas modificações da técnica descrita por Khan *et*

177 *al.* (2011). Em um tubo contendo 2mL tampão EDTA, foram adicionados 200µL da amostra.
 178 Após agitação, foi retirado 1mL da mistura e colocado em outro eppendorf com 1mL de TCA
 179 (ácido tricloroacético) a 10%. Então, foi centrifugado a 3000 rpm por 15 minutos. Em seguida,
 180 foram recolhidos 500µL do sobrenadante e adicionado 1mL de tampão Tris-HCl 0,4M, EDTA,
 181 pH 8,9 e mais 25µL de Ditiobisnitrobenzoato (DTNB) 0,01M. Após 1 minuto de reação, foi
 182 feita a leitura em espectrofotômetro em 412nm. A concentração foi expressa em µM/mL. Para
 183 a curva padrão da glutathione foram feitas soluções de glutathione a 6,66; 13,33; 26,66; 40; 53,33
 184 e 66µM.

185 *Delineamento e Análise estatística*

186 Os dados foram analisados em delineamento inteiramente casualizado (4 tratamentos e
 187 6 repetições). Inicialmente, as variáveis foram submetidas ao teste de normalidade, sendo
 188 verificado a distribuição normal dos dados. Posteriormente, foram calculadas as médias e
 189 desvios-padrão das variáveis pesquisadas e foram submetidos à análise de variância (ANOVA)
 190 utilizando-se o procedimento modelos lineares gerais (Proc GLM). Para comparação das
 191 médias foi utilizado o teste de Duncan, na probabilidade de 5%. As análises foram executadas
 192 através do programa *Statistical Analysis System* (SAS Institute Inc, 2013).

193

194 **Resultados**

195

196 Após as análises da morfologia espermática (Tabela 1), verificou-se que não houve
 197 diferença significativa ($p > 0,05$) entre o controle e os tratamentos com ácido oleico.

198 **Tabela 1** - Médias e desvios-padrão da morfologia dos espermatozoides caprinos pós-descongelados após
 199 suplementação do ácido oleico no diluidor

Tratamentos	Espermatozoides	
	Normais (%)	Defeitos maiores (%)
Pool	71.66 ± 4.23	6.16 ± 2.06
Controle	65.83 ± 4.13	10.00 ± 4.14
0,5 µM de ácido oleico	67.41 ± 9.22	9.33 ± 5.27
5 µM de ácido oleico	68.33 ± 6.80	5.66 ± 4.57
50 µM de ácido oleico	70.25 ± 6.90	7.25 ± 3.54

200 Valores de média com letras sobrescrito diferentes na mesma coluna indicam diferenças significativas ($p < 0,05$)
 201 pelo teste de DUNCAN.

202 No que diz respeito aos parâmetros de motilidade total (%) e vigor (1 - 5) durante o teste
 203 de termorresistência (TTR), foi utilizado esquema fatorial 4 x 4 (quatro tratamentos e 4 tempos)

204 pelo fato de existir mais de um fator a ser analisado. Constatou-se que não houve interação
205 entre os tratamentos e o fator tempo, sendo analisados individualmente. Nesse contexto, não
206 foi observado diferença estatística ($p > 0,05$) entre os tratamentos analisados (Tabela 2) para as
207 variáveis motilidade e vigor.

208 **Tabela 2** - Médias e desvios-padrão da motilidade total e vigor pós-descongelamento de espermatozoides caprinos após suplementação do ácido oleico no diluidor, submetidos ao
 209 teste de termorresistência (TTR)

Tratamentos	0 minutos		60 minutos		120 minutos		180 minutos	
	Motilidade (%)	Vigor (1 - 5)						
Controle	48.33 ± 7.52	3.00 ± 0.0	38.33 ± 13.29	2.50 ± 0.54	22.50 ± 13.32	2.00 ± 0.63	8.33 ± 11.25	0.83 ± 0.75
0,5 µM de ácido oleico	48.33 ± 6.83	3.0 ± 0.0	34.16 ± 14.97	2.50 ± 0.54	20.00 ± 17.60	1.83 ± 0.75	6.66 ± 11.69	0.66 ± 0.81
5 µM de ácido oleico	50.00 ± 5.47	3.16 ± 0.40	36.66 ± 15.05	2.33 ± 0.81	18.33 ± 11.25	1.83 ± 0.75	5.83 ± 7.35	0.83 ± 0.75
50 µM de ácido oleico	35.83 ± 9.17	2.50 ± 0.54	15.83 ± 12.81	2.00 ± 0.63	9.16 ± 10.68	1.33 ± 1.03	2.50 ± 4.18	0.33 ± 0.51

210 Valores de média com letras minúsculas diferentes na mesma coluna indicam diferenças significativas entre os tempos para motilidade ($p < 0,05$) pelo teste de DUNCAN.

211 Quanto a análise da integridade acrossomal (Tabela 3), observou-se que o tratamento
 212 com 50 μM de ácido oleico diferiu estatisticamente ($p < 0,05$) dos demais tratamentos. A
 213 integridade da membrana plasmática e o potencial mitocondrial (Tabela 3) dos espermatozoides
 214 caprinos pós-criopreservação não foram influenciados estatisticamente ($p > 0,05$) ao adicionar
 215 de ácido oleico ao diluidor.

216 **Tabela 3** - Médias e desvios-padrão da integridade de membrana plasmática (MP), integridade acrossomal (AC)
 217 e potencial mitocondrial (MIT) dos espermatozoides caprinos pós-descongelados após suplementação do ácido
 218 oleico no diluidor

Tratamentos	MP (%)	AC (%)	MIT (%)
Controle	47.00 \pm 9.54	57.50 \pm 6.22 ^a	47.00 \pm 6.57
0,5 μM de ácido oleico	43.16 \pm 13.93	49.16 \pm 10.00 ^a	42.16 \pm 10.98
5 μM de ácido oleico	35.16 \pm 19.63	54.66 \pm 7.76 ^a	35.33 \pm 19.74
50 μM de ácido oleico	40.50 \pm 17.27	34.75 \pm 11.32 ^b	38.50 \pm 13.54

219 Valores de média com letras sobrescrito diferentes na mesma coluna indicam diferenças significativas ($p < 0,05$)
 220 pelo teste de DUNCAN.

221 No que se refere aos parâmetros cinéticos de espermatozoides caprinos pós-
 222 criopreservados (Tabela 4), observou-se que a motilidade total (MT) dos tratamentos com 0,5
 223 μM e 5 μM de ácido oleico apresentaram valores maiores e diferentes estatisticamente do
 224 tratamento com 50 μM de ácido oleico.

225 **Tabela 4** - Médias e desvios-padrão dos parâmetros cinéticos (CASA) de espermatozoides caprinos
 226 criopreservados após suplementação do ácido oleico no diluidor

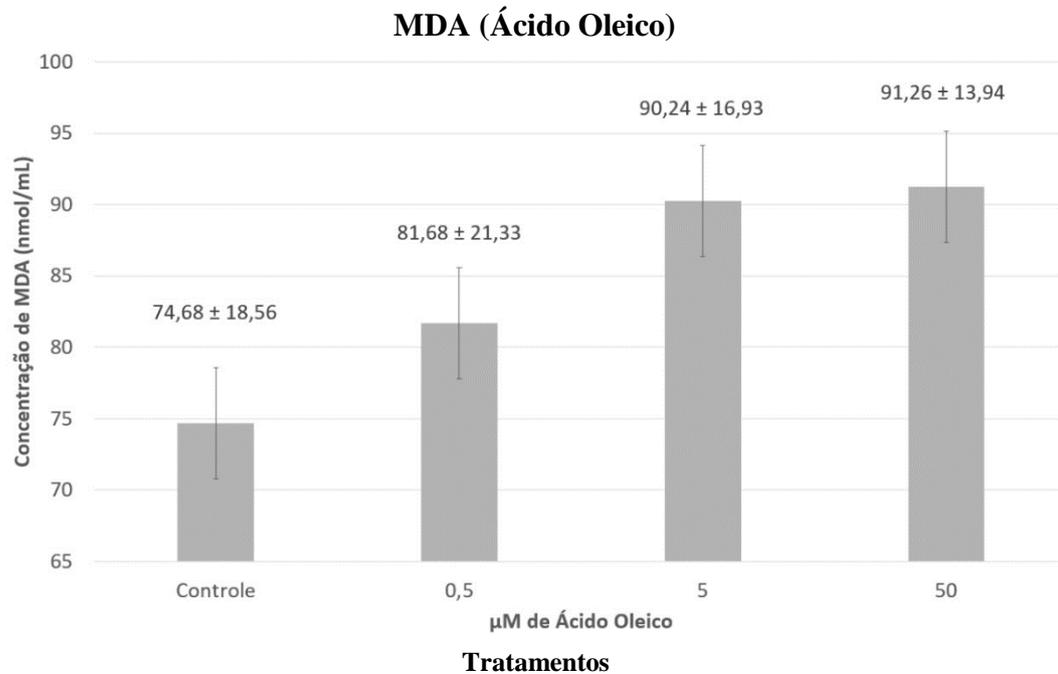
Parâmetros de motilidade	Controle	0,5 μM de ácido oleico	5 μM de ácido oleico	50 μM de ácido oleico
MT	48,54 \pm 9,06 ^{ab}	60,10 \pm 15,27 ^a	51,32 \pm 7,07 ^a	37,56 \pm 9,79 ^b
MP	15,89 \pm 12,11	22,00 \pm 10,21	17,35 \pm 9,17	12,30 \pm 5,19
VCL	64,73 \pm 24,68	70,05 \pm 14,48	64,72 \pm 15,17	63,80 \pm 15,54
VSL	34,46 \pm 18,19	37,94 \pm 13,45	36,02 \pm 16,67	34,12 \pm 12,70
VAP	45,42 \pm 22,06	49,64 \pm 14,99	46,11 \pm 17,14	43,28 \pm 13,16
LIN	51,73 \pm 7,23	52,95 \pm 7,85	53,72 \pm 10,91	52,21 \pm 7,68
STR	74,99 \pm 3,77	75,57 \pm 4,34	76,42 \pm 5,75	77,52 \pm 5,91
WOB	68,78 \pm 6,98	69,81 \pm 6,71	69,76 \pm 8,82	67,04 \pm 5,01
ALH	3,16 \pm 0,45	3,17 \pm 0,28	3,09 \pm 0,21	3,17 \pm 0,32
BCF	9,89 \pm 1,17	9,58 \pm 1,08	9,58 \pm 1,19	9,97 \pm 1,10

227 Valores de média com letras minúsculas diferentes na mesma linha indicam diferenças significativas ($p < 0,05$)
 228 pelo teste de DUNCAN. **MP** - Motilidade progressiva; **VCL** - velocidade curvilínea; **VSL** - velocidade em linha

229 reta; **VAP** - velocidade média de percurso; **LIN** - linearidade; **STR** - retilinearidade; **WOB** - Oscilação; **ALH** -
 230 Amplitude de deslocamento lateral da cabeça e **BCF** - frequência de batimentos de cauda.

231 A respeito da quantificação da lipoperoxidação da membrana espermática (MDA), não
 232 foi observada diferença estatística ($p > 0,05$) após suplementar o diluidor com diferentes
 233 concentrações de ácido oleico (Figura 1).

234



235

236

237

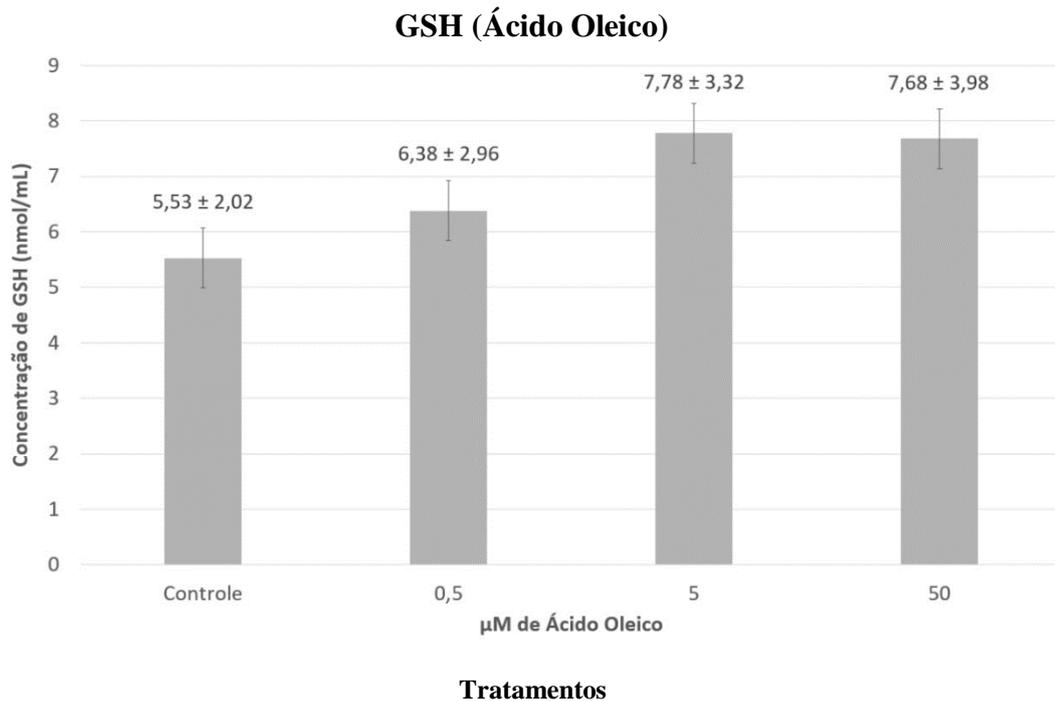
238 **Figura 1** – Quantificação da lipoperoxidação da membrana espermática (MDA) em sêmen caprino pós-
 239 criopreservado após suplementação do ácido oleico no diluidor. MDA: Malondialdeído. Os valores são expressos
 240 como média ± desvio padrão (DP). Não foram observadas diferenças entre os grupos utilizando Análise de
 241 Variância (ANOVA), seguido de DUNCAN como post hoc teste ($p < 0,05$).

242

243

Após análise da concentração de glutathiona reduzida (GSH) (Figura 2), observou-se que os valores de GSH não diferiram significativamente entre os tratamentos ($p > 0,05$).

244



245

246

247

Figura 2 – Quantificação da concentração de glutatona reduzida (GSH) em sêmen caprino pós-criopreservado após suplementação do ácido oleico no diluidor. Os valores são expressos como média \pm desvio padrão (DP). Não foram observadas diferenças entre os grupos utilizando Análise de Variância (ANOVA), seguido de DUNCAN como post hoc teste ($p < 0,05$).

251

252 **Discussão**

253

254 Este estudo expande o conhecimento sobre os efeitos da suplementação do ácido oleico
 255 ao diluidor, visando a criopreservação de sêmen caprino. Informações estas, de grande valia,
 256 pois apesar da vasta literatura a respeito da utilização de antioxidantes, são escassos os estudos
 257 envolvendo ácido oleico nesta função na espécie caprina.

258 Após a avaliação morfológica dos espermatozoides pós-criopreservação, observou-se
 259 que as concentrações de ácido oleico mantiveram a taxa de espermatozoides normais (Tabela
 260 1) ($p > 0,05$). Fato este, importante, pois sabe-se que o aumento do percentual de células
 261 espermáticas defeituosas está, provavelmente, relacionado à alta produção de ROS (CASTELO
 262 BRANCO, 2018). Também, verificou-se que não houve diferença entre os tratamentos em
 263 relação aos defeitos maiores, mantendo valores aceitáveis pelo CBRA para sêmen
 264 criopreservado caprino (CBRA, 2013). Possivelmente, a boa qualidade dos reprodutores
 265 selecionados e a realização das coletas fora da estação de monta, sem alterações hormonais e
 266 bioquímicas (TOAZZA, 2018), contribuíram para manutenção da qualidade espermática, bem
 267 como a presença do antioxidante no meio, fornecendo um maior substrato para atuação das
 268 ROS, protegendo, assim, as células espermáticas.

269 Acerca do teste de termorresistência, não foi observada interação ($p > 0,05$) entre os
270 tratamentos e o fator tempo, sendo assim analisados isoladamente. Logo, não houve diferença
271 estatística ($p > 0,05$) entre as concentrações de ácido oleico para as variáveis motilidade e vigor
272 durante o TTR (Tabela 2). Entre os tempos testados houve diferença para os parâmetros de
273 motilidade e vigor, verificando a diminuição deles com o passar do tempo de análise. Fato este
274 já esperado, em função do esgotamento das reservas energéticas, devido ao metabolismo celular
275 elevado, provocando o aumento do número de espermatozoides mortos, e, conseqüentemente,
276 elevação na produção de ROS, mais danos peroxidativos e menor viabilidade espermática
277 (BRITO *et al.*, 2017).

278 Em relação à integridade da membrana plasmática e o potencial mitocondrial dos
279 espermatozoides caprinos pós-criopreservação (Tabela 3), não foi observado influência ($p >$
280 $0,05$) após adição do ácido oleico ao diluidor. Isto sugere que o ácido oleico manteve
281 estatisticamente, o percentual de danos à membrana plasmática provocados pelas ROS, não
282 interferindo na produção de ATP intracelular e no potencial mitocondrial.

283 Castelo Branco (2018) obteve dados semelhantes em relação à taxa de integridade da
284 membrana plasmática, ao suplementar o diluidor com concentrações as de $50 \mu\text{M}$ e $100 \mu\text{M}$ de
285 ácido oleico na espécie bovina. Contradizendo estes dados, Hashem *et al.* (2017) observaram
286 efeitos protetores na viabilidade do espermatozoide ovino e na integridade da membrana
287 plasmática após suplementação do diluidor com ácido oleico.

288 No que se refere à análise da integridade acrossomal, foi observado que o tratamento
289 com $50 \mu\text{M}$ de ácido oleico diferiu estatisticamente ($p < 0,05$) dos demais tratamentos,
290 indicando que essa concentração de ácido oleico não apresenta o efeito antioxidante esperado,
291 e sim, efeitos citotóxicos, prejudicando a sobrevivência espermática. Sampaio *et al.* (2015),
292 verificaram que as concentrações de $37 \mu\text{M}$ e $74 \mu\text{M}$ de ácido oleico-linoleico e β -sitosterol não
293 foram eficazes na preservação da integridade da membrana acrossomal e não alteraram a
294 atividade mitocondrial durante a criopreservação de espermatozoides bovinos e equinos. Já foi
295 especulado que altas concentrações de antioxidantes podem aumentar, acima do desejado, a
296 fluidez da membrana plasmática, fazendo com que os espermatozoides se tornem mais
297 propensos a danos acrossomais (SHOAE; ZAMIRI, 2008).

298 Outra importante avaliação é a dinâmica da motilidade fornecida pelo sistema CASA,
299 com informações úteis para a determinação da qualidade seminal antes e depois da
300 criopreservação (BATISSACO *et al.*, 2020), no qual foi observado que a motilidade total (MT)
301 dos tratamentos com $0,5 \mu\text{M}$ e $5 \mu\text{M}$ de ácido oleico apresentaram valores maiores e diferentes
302 estatisticamente do tratamento com $50 \mu\text{M}$ de ácido oleico (Tabela 4). Hashem *et al.*, (2017)

303 também observaram que as concentrações de 0,5 e 1 mM de ácido oleico aumentaram a
304 motilidade total, a progressiva e a curvilínea de sêmen de carneiro, durante armazenamento a
305 4°C até 72 horas. Já Castelo Branco (2018), mostrou que diferentes concentrações de ácido
306 oleico (50 µM e 100 µM) não influenciaram os parâmetros cinéticos observados no CASA.
307 Pode ser que essas concentrações do ácido oleico tenham melhorado a MT espermática em
308 razão da sua capacidade de sequestrar as ROS, evitando alterações nas proteínas, lipídios e
309 ácidos nucleicos (MA, 2010), que levariam à danos nas mitocôndrias e, conseqüentemente,
310 diminuição da motilidade espermática.

311 Já o método espectrofotométrico do TBARS, permite a avaliação da lipoperoxidação
312 através da quantificação do malondialdeído (MDA). Nesta análise (Figura 1), não foi observada
313 diferença estatística ($p > 0,05$) em relação à produção de malondialdeído (MDA) entre os
314 tratamentos analisados, ou seja, o ácido oleico não interferiu na taxa de peroxidação lipídica
315 durante a técnica de criopreservação.

316 Em relação à quantificação da concentração de glutathiona reduzida (Figura 2), observou-
317 se que os valores de GSH não apresentaram diferença entre os tratamentos ($p > 0,05$), no
318 entanto, é relevante que houve um crescimento na atividade da enzima GSH ao adicionar ácido
319 oleico ao diluidor, mostrando que o ácido oleico pode ter contribuído para proteção das células
320 ao estimular da ação desta enzima, que está associada a outras enzimas, tais como a glutathiona
321 redutase e a glutathiona peroxidase, no mecanismo profilático às ROS.

322 Contradizendo os dados encontrados, Castelo Branco (2018), verificou, após a
323 suplementação de 100 µM de ácido oleico ao meio diluidor, durante a criopreservação com
324 sêmen bovino, um aumento proporcional tanto nos níveis de MDA quanto na atividade de GSH.
325 Isso leva ao entendimento de que algumas concentrações podem alterar a composição lipídica
326 do meio e da membrana plasmática, induzindo a peroxidação lipídica, e conseqüente aumento
327 na produção de MDA. Fato não observado nesta pesquisa, porventura, devido às concentrações
328 utilizadas, demonstrando que são necessárias mais pesquisas quanto à concentração ideal destes
329 antioxidantes e sua possível utilização para proteção da membrana dos espermatozoides
330 caprinos criopreservados.

331

332 **Conclusão**

333

334 Conclui-se que a adição de ácido oleico ao diluidor preservou a qualidade morfológica
335 espermática após a criopreservação e a suplementação de 0,5 e 5 µM de ácido oleico
336 melhoraram a motilidade total do sêmen caprino pós-criopreservado.

337

338 **Referências**

339

340 BANDAY, M. N.; LONE, F. A.; RASOOL, F.; RASHID, M.; SHIKARI, A. Use of antioxidants
341 reduce lipid peroxidation and improve quality of crossbred ram sperm during its
342 cryopreservation. **Cryobiology**, v. 74. p. 25-30, 2017.

343

344 BATISSACO, L.; ARRUDA, R. P.; ALVES, M. B. R.; TORRES, M. A.; LEMES, K. M.;
345 PRADO-FILHO, R. R.; ALMEIDA, T. G.; ANDRADE, A. F. C.; CELEGHINI, E. C. C.
346 Cholesterol-loaded cyclodextrin is efficient in preserving sperm quality of cryopreserved ram
347 semen with low freezability. **Reproductive Biology**, v. 20 (1), p. 14-24, 2020.

348

349 BLOM, E. Ultrastructure of some characteristic sperm defects and a proposal for a new
350 classification of the bull spermogram. **Nordisk Veterinaermedicin**, v. 25, p. 383-391, 1973.

351

352 BRITO, L. S.; BARBOSA, L. P.; RESENDE, M. V.; PINHEIRO, A. M.; FRANÇA, C. S.;
353 CARDOSO, R. C. Ácido ascórbico no diluidor para criopreservação de sêmen caprino. **Ciência**
354 **Animal Brasileira**, v. 18, 2017.

355

356 CÂMARA, T. S.; SOUSA JÚNIOR, A.; BARÇANTE, F. P. S.; SILVA, J. H. L.; SOUSA, M.
357 S.; MACHADO, A. A. C.; SALGUEIRO, C. C. M.; MONTENEGRO, A. R.; NUNES, J. F.
358 Comparação da qualidade seminal de caprinos das raças Canindé e Alpina Britânica no
359 Nordeste brasileiro. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.71 (4),
360 p.1260-1268, 2019.

361

362 CASTELO BRANCO, Y. N. T. C. **Efeito da suplementação dos ácidos oleico e palmítico e**
363 **do eugenol na criopreservação de sêmen bovino**. 2018. 110f. Tese (Doutorado) –
364 Universidade Federal do Piauí, Teresina, 2018.

365

366 CBRA. Colégio Brasileiro de Reprodução Animal, Belo Horizonte, Minas Gerais. **Manual**
367 **para exame andrológico e avaliação de sêmen animal**, 2013.

368

369 COLETO, Z. F.; GUERRA, M. M. P.; BATISTA, A. M. Avaliação do sêmen congelado de
370 caprinos com drogas fluorescentes. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, v. 24, p. 101-
371 104, 2002.

372

373 DARBANDI, M.; DARBANDI, S.; AGARWAL, A.; BASKARAN, S.; DUTTA, S.;
374 KHORSHID, H. R. K.; ESTEVES, S.; GILANY, K.; HEDAYATI, M.; NOBAKHT, F.;
375 AKHONDI, M. M.; LAKPOUR, N.; SADEGHI, M. R. Reactive oxygen species-induced
376 alterations in H19-Igf2 methylation patterns, seminal plasma metabolites, and semen quality.
377 **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**, v. 36 (2), p. 241-253, 2019.

378

379 ESPINOSA-CERVANTES, R.; CÓRDOVA-IZQUIERDO, A. Efecto del estrés calórico y el
380 estrés oxidativo en la función espermática de los mamíferos. **Revista Complutense de**
381 **Ciencias Veterinarias**, v. 12 (1), p. 27–39, 2018.

382

383 GUTHRIE, H. D.; WELCH, G.R. Determination of intracellular reactive oxygen species and
384 high mitochondrial membrane potential in Percoll-treated viable boar sperm using
385 fluorescence-activated flow cytometry. **Journal of Animal Science**, v. 84, p. 2089-2100, 2006.

- 386
387 HASHEM, E. Z.; HADDAD, R.; ESLAMI, M. Evaluation of ram semen enrichment with oleic
388 acid on different spermatozoa parameters during low temperature liquid storage. **Small**
389 **Ruminant Research**, v. 150, p. 30-39, 2017.
- 390
391 KHAN, H.; KHAN, M. F.; JAN, S. U.; ULLAH, N. Effect of aluminium metal on glutathione
392 (GSH) level in plasma and cytosolic fraction of human blood. **Pakistan Journal of**
393 **Pharmaceutical Sciences**, v. 24, p. 13-18, 2011.
- 394
395 LECEWICZ, M.; STRZEZEK, R.; KORDAN, W.; MAJEWSKA, A. Effect of extender
396 supplementation with low-molecular-weight antioxidants on selected quality parameters of
397 cryopreserved canine spermatozoa. **Journal of Veterinary Research**, v. 62 (2), p. 221-227,
398 2018.
- 399
400 LIEBERMAN, D.; MCCLURE, E.; HARSTON, S.; MADAN, D. Maintaining semen quality
401 by improving cold chain equipment used in cattle artificial insemination. **Nature**
402 **Scientific Reports**, v. 6, p. 28108, 2016.
- 403
404 LONE, S. A.; PRASAD, J. K.; GHOSH, S. K.; DAS, G. K.; BALAMURUGAN, B.; VERMA,
405 M. R. Study on correlation of sperm quality parameters with antioxidant and oxidant status of
406 buffalo bull semen during various stages of cryopreservation. **Andrologia**, v. 50 (4), p. 1-8,
407 2018.
- 408
409 LUCIO, C. F.; BRITO, M. M.; ANGRIMANI, D. S. R.; BELAZ, K. R. A.; MORAIS, D.;
410 ZAMPIERI, D.; LOSANO, J. D. A.; ASSUMPCÃO, M. E. O. A.; NICHI, M.; EBERLIN, M.
411 N.; VANNUCCHI, C. I. Lipid composition of the canine sperm plasma membrane as markers
412 of sperm motility. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 52, p. 208-213, 2017.
- 413
414 MA, Q. Transcriptional responses to oxidative stress: pathological and toxicological
415 implications. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 125, p. 376-393, 2010.
- 416
417 MACHADO, W. M.; BARBOSA, L. P.; SOUZA, R. S.; FRANCA, C. S.; PINHEIRO, E. E.
418 G.; LENTS, M. P.; ARAUJO, R. C. S. A.; SANTANA, A. L. A. Fish oil associated to ascorbic
419 acid in diluter for cryopreservation goat sêmen. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária**
420 **e Zootecnia**, v. 70 (1), p. 131-138, 2018.
- 421
422 MARTI, E.; MARTI, J. I.; MUIÑO-BLANCO, T.; CEBRIÁN-PÉREZ, J. A. Effect of the
423 cryopreservation process on the activity and immunolocalization of antioxidant enzymes in ram
424 spermatozoa. **Journal of Andrology**, Philadelphia, v. 29 (4), p. 459-467, 2008.
- 425
426 NICHI, M. **Efeito do tratamento com antioxidantes e ácidos graxos poli-insaturados em**
427 **amostras espermáticas epididimárias de touros**. 2009. 120f. Tese (doutorado) – Faculdade
428 de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.
- 429
430 NICHI, M.; GOOVAERTS, I. G.; CORTADA, C. N.; BARNABE, V. H.; DE CLERCQ, J. B.;
431 BOLS, P. E. Roles of lipid peroxidation and cytoplasmic droplets on in vitro fertilization
432 capacity of sperm collected from bovine epididymides stored at 4 and 34 degrees C.
433 **Theriogenology**, v. 67, p. 334-40, 2007.
- 434

- 435 OHKAWA, H.; OHISHI, N.; YAGI, K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by
436 thiobarbituric acid reaction. **Analytical biochemistry**, v. 95 (2), p. 351-358, 1979.
437
- 438 ROTH, T. L.; WEISS, R. B.; BUFF, J. L. Heterologous in vitro fertilization and sperm
439 capacitation in an endangered African antelope, the Scimitar-Horned Oryx (*Oryx dammah*).
440 **Biology Reproduction**, v. 58, p. 475-482, 1998.
441
- 442 SAMPAIO, B. F. B.; BENDER, E. S. C.; COSTA E SILVA, E. V.; ZÚCCARI, C. E. S. N.
443 Effect of oleic-linoleic acid and β -sitosterol to freezing extender of bulls and stallions sêmen.
444 **Semina: Ciências Agrárias**, v. 36 (3), p. 1369-1384, 2015.
445
- 446 SAS Institute Inc. Statistical Analysis System user's guide. Version 9.4. Cary, Statistical
447 Analysis System Institute. 550p, 2013.
448
- 449 SHOAE, A.; ZAMIRI, M. J. Effect of butylated hydroxytoluene on bull spermatozoa frozen in
450 egg yolk-citrate extender. **Animal Reproduction Science**, v. 104, p. 414-418, 2008.
451
- 452 TOAZZA, R. **Influência da sazonalidade nas características reprodutivas de carneiros de**
453 **raças leiteiras**. 2018. 83f. Dissertação (Mestrado) – Universidade do Estado de Santa Catarina,
454 Lages, Santa Catarina, 2018.
455
- 456 TUFARELLI, V.; RIZZO, A.; LACALANDRA, G. M.; GUARICCI, A. C.; LAUDADIO, V.;
457 VALENTINI, L. Effects of the supplementation with an high-polyphenols extra-virgin olive oil
458 on kinetic sperm features and seminal plasma oxidative status in healthy dogs. **Reproduction**
459 **in Domestic Animals**, v. 53, n. 3, p. 582-587, 2018.
460
- 461 VARNER, D. D.; GIBB, Z.; AITKEN, R. J. Stallion fertility: A focus on the spermatozoon.
462 **Equine Veterinary Journal**, v. 47 (1), p. 16 - 24, 2015.

5 CONCLUSÃO

Pesquisas envolvendo ácidos graxos com a função antioxidante têm sido bastante realizadas nos últimos anos, tendo em vista seus possíveis benefícios sobre a qualidade seminal pós-criopreservação. Assim, estes benefícios precisam ser esclarecidos, principalmente por se tratar de sêmen caprino, com particularidades já descritas.

Isto posto, os resultados da suplementação do diluidor TRIS-gema com ácido araquidônico e ácido oleico validam o potencial antioxidante destes ácidos graxos, sendo indispensável a realização de mais pesquisas buscando uma avaliação precisa da concentração ideal e seus efeitos antioxidantes, com intuito de melhorar a qualidade seminal pós-criopreservação na espécie caprina.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGARWAL, A.; GUPTA, S.; SIKKA, S. The role of free radicals and antioxidants in reproduction. **Current opinion in obstetrics & gynecology**, v. 18, n. 3, p. 325-332, 2006.
- AITKEN, R. J. Free radicals, lipid peroxidation and sperm function. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 7, p. 659-668, 1995.
- AITKEN, R. J.; DE IULIIS, G. N.; FINNIE, J. M.; HEDGES, A.; MCLACHLAN, R. I. Analysis of the relationships between oxidative stress, DNA damage and sperm vitality in a patient population: development of diagnostic criteria. **Human Reproduction**, v. 25, p. 2415-2426, 2010.
- AITKEN, R. J.; GRAVES, J. A. M. Human spermatozoa: The future of sex. **Nature**, v. 415, p. 963, 2002.
- AITKEN, R. J.; HARKISS, D.; BUCKINGHAM, D. W. Analysis of lipid peroxidation mechanisms in human spermatozoa. **Molecular Reproduction and Development**, v. 35, n. 3, p. 302-315, 1993.
- AITKEN, R. J.; KRAUSZ, C. Oxidative stress, DNA damage and the Y chromosome. **Reproduction**, v. 122, n. 4, p. 497-506, 2001.
- AITKEN, R. J.; SMITH, T. B.; JOBLING, M. S.; BAKER, M. A.; DE LULIIS, G. N. Oxidative stress and male reproductive health. **Asian Journal of Andrology**, v. 16, n. 1, p. 31, 2014.
- ÁLVAREZ, A. L.; SERRES, C.; TORRES, P.; CRESPO, F.; MATEOS, E.; GÓMEZCUÉTARA, C. Effect of cholesterol-loaded cyclodextrin on the cryopreservation of donkey spermatozoa. **Animal Reproduction Science**, v. 94, n. 1-4, p. 89-91, 2006.
- AMANN, R.P.; KARTZ, D.F. Reflections on CASA after 25 years. **Journal of Andrology**, v. 25, p. 317-325, 2004.
- ANDRADE, E.; MELO-STERZA, F.; SENEDA, M.; ALFIERI, A. Consequências da produção das espécies reativas de oxigênio na reprodução e principais mecanismos antioxidantes. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.34, p.79-85, 2010.
- ARAV, A.; SARAGUSTY, J. Directional freezing of sperm and associated derived technologies. **Animal Reproduction Science**, v. 169, p. 6-13, 2016.
- ARUOMA, O. I.; HALLIWELL, B.; LAUGHTON, M. J.; QUINLAN, G. J.; GUTTERIDGE, J. M. The mechanism of initiation of lipid peroxidation. Evidence against a requirement for an iron(II)-iron(III) complex. **The Biochemical Journal**, v. 258, n. 2, p. 617-620, 1989.
- AZERÊDO, G. A.; ESPER, C. R.; RESENDE, K. T. Evaluation of plasma membrane integrity of frozen-thawed goat spermatozoa with or without seminal plasma. **Small Ruminant Research**, v. 41, p. 257-263, 2001.
- AZEVEDO, H. C. **Integridade e funcionalidade dos espermatozoides ovinos submetidos à criopreservação após a incorporação de colesterol, desmosterol, ácido oléico- linoléico e**

olactoalbumina. 2006. 195f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) - Universidade Estadual Paulista, Botucatu, São Paulo, 2006.

BALL, B.A.; MEDINA, V.; GRAVANCE, G.C.; BAUMBER, J. Effect of antioxidants on preservation of motility, viability and acrosomal integrity of equine spermatozoa during storage at 5°C. **Theriogenology**, v. 56, p. 577-589, 2001.

BANDAY, M. N.; LONE, F. A.; RASOOL, F.; RASHID, M.; SHIKARI, A. Use of antioxidants reduce lipid peroxidation and improve quality of crossbred ram sperm during its cryopreservation. **Cryobiology**. v. 74. p. 25-30, 2017.

BARRERA, G.; PIZZIMENTI, S.; DAGA, M.; DIANZANI, C.; ARCARO, A.; CETRANGOLO, G. P.; GIORDANO, G.; CUCCI, M. A.; GRAF, M.; GENTILE, F. Lipid peroxidation-derived aldehydes, 4-hydroxynonenal and malondialdehyde in aging-related disorders. **Antioxidants**, v. 7, n. 8, p. 102, 2018.

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.

BENSON, J. D.; WOODS, E. J.; WALTERS, E. M.; CRITSER, J. K. The cryobiology of spermatozoa. **Theriogenology**, v. 78, p. 1682-1699, 2012.

BILODEAU, J. F.; BLANCHETTE, S.; N. CORMIER, N.; SIRARD, M. A. 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.

BILODEAU, J. F.; CHATTERJEE, S.; SIRARD, M. A.; CAGNON, C. Levels of antioxidant defense are decreased in bovine spermatozoa after a cycle of freezing and thawing. **Molecular Reproduction and Development**, v. 55, p. 282-288, 2000.

BLESBOIS, E.; LESSIRE, M.; GRASSEAU, I.; HALLOUIS, J. M.; HERMIER, D. Effect of dietary fat on the fat acid composition and fertilizing ability of fowl semen. **Biology of reproduction**, v. 56, p. 1216-1220, 1997.

BLIGH, E. G.; DYER, W. J. A rapid method of total lipid extraction and purification. **Canadian Journal of Biochemistry and Physiology**, v. 37, n. 8, p. 911-917, 1959.

BLOM, E. Ultrastructure of some characteristic sperm defects and a proposal for a new classification of the bull spermogram. **Nordisk Veterinaermedicin**, v. 25, p. 383-391, 1973.

BOQUEST, A. C.; ABEYDEERA, L. R.; WANG, W. H.; DAY, B. N. Effect of adding reduced glutathione during insemination on the development of porcine embryos in vitro. **Theriogenology**, v. 51, n. 7, p. 1311-1319, 1999.

BORTOLOZZO F. P.; BERNARDI M. L.; BENNEMANN P. E.; WENTZ I. **Inseminação artificial em suínos**. In: Gonçalves P.B. D. 2008.

BOUSSEAU, S.; BRILLARD, P.; MARQUANT-LE GUIENNE, B.; GUÉRIN, B.; CAMUS, A.; LECHAT, M. Comparison of bacteriological qualities of various egg yolk sources and the in vitro and in vivo fertilizing potential of bovine semen frozen in egg yolk or lecithin based diluents. **Theriogenology**, v. 50, p. 699-706, 1998.

BRITO, L. F. C. Evaluation of stallion sperm morphology. **Clinical Techniques in Equine Practice**, v. 6, p. 249-64, 2007.

BUEGE, J. A.; AUST, S. D. Microsomal Lipid Peroxidation. **Methods in Enzymology**, v. 52, p. 302-310, 1978.

BURNAUGH, L.; SABEUR, K.; BALL, B. A. Generation of superoxide anion by equine spermatozoa as detected by dihydroethidium. **Theriogenology**, v. 67, n. 3, p. 580-589, 2007.

CAMPANHOLI, S. P.; MONTEIRO, F. M.; DIAS, E. A. R.; MERCADANTE, M. E. Z.; PAZ, C. C. P DE; DELL'AQUA JUNIOR, J. A.; PAPA, F. O.; DELL'AQUA, C. DE P. F.; VANTINI, R.; GARCIA, J. M. Effect of seminal plasma removal before cryopreservation of bovine semen obtained by electroejaculation on semen quality and in vitro fertility. **Theriogenology**, v. 89, p. 114-121, 2017.

CAMPBELL, M. K.; FARRELL, S. O. **Bioquímica: bioquímica básica**. 5 Ed., v.1, Thomson Learning, 2007.

CÁRDENAS, R. N.; PEDRAZA, C. J. Espécies reativas de oxígeno y sistemas antioxidantes: Aspectos básicos. **Educacion Química**, v. 17, n. 2, p. 164-173, 2006.

CASTELO, T. S.; FROTA, T. R.; SILVA, A. R. Considerações sobre a criopreservação do sêmen de caprino. **Acta Veterinaria Brasilica**, v. 2, p. 67-75, 2008.

CASTRO, S. V.; CARVALHO, A. A.; SILVA, C. M. G.; FAUSTINO, L. R.; FIGUEIREDO, J. R.; RODRIGUES, A. P. R. Agentes crioprotetores intracelulares: características e utilização na criopreservação de tecido ovariano e oócitos. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 39, n. 2, p. 1-17, 2011.

CBRA. Colégio Brasileiro de Reprodução Animal, Belo Horizonte, Minas Gerais. **Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal**, 2013.

COLETO, Z. F.; GUERRA, M. M. P.; BATISTA, A. M. Avaliação do sêmen congelado de caprinos com drogas fluorescentes. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, v. 24, p. 101-104, 2002.

COMHAIRE, F. H.; MAHMOUD, A. M. A.; DEPUYDT, C. E.; ZALATA, A. A.; CHRISTOPHE, A. B. Mechanisms and effects of male genital tract infection on sperm quality and fertilizing potencial: the andrologist's viewpoint. **Human Reproduction**. v. 5, p. 393-398, 1999.

CONCANNON, P. W.; BATTISTA, M. Canine semen freezing and artificial insemination. In: KIRK, R.W (Ed). **Current Veterinary Therapy: Small Animal Practice**X. Philadelphia: WB Saunders, p. 1247-1259, 1989.

COSTA, R. G.; CARTAXO, F. Q.; SANTOS, N. M.; QUEIROGA, R. C. R. E. Carne caprina e ovina: composição lipídica e características sensoriais. **Revista brasileira de saúde e produção animal**, v. 9, n. 3, p. 497-506, 2008.

DALIMATA, A. M.; GRAHAM, J. K. Cryopreservation of rabbit spermatozoa using acetamide in combination with trehalose and methyl cellulose. **Theriogenology**, v. 48, p. 831-841, 1997.

DARBANDI, M.; DARBANDI, S.; AGARWAL, A.; BASKARAN, S.; DUTTA, S.; KHORSHID, H. R. K.; ESTEVES, S.; GILANY, K.; HEDAYATI, M.; NOBAKHT, F.; AKHONDI, M. M.; LAKPOUR, N.; SADEGHI, M. R. Reactive oxygen species-induced alterations in H19-Igf2 methylation patterns, seminal plasma metabolites, and semen quality. **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**, v.36, n.2, p. 241-253, 2019.

DEKA, B. B.; RAO, A. R. Effect of extenders and thawing methods on post-thawing preservation of goat semen. **Indian Veterinary Journal**, v. 64, p. 591-594, 1987.

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.

DOBRAKOWSKI, M.; KASPERCZYK, S.; HORAK, S.; CHYRA-JACH, D.; BIRKNER, E.; KASPERCZYK, A. Oxidative stress and motility impairment in the semen of fertile males, **Andrologia**, v. 39, n. 10, 2017.

EJAZ, R.; ANSARI, M. S.; RAKH, B.A.; ULLAH, N.; HUSNA, A. U.; IQBAL, R.; AKHTER, S. Arachidic acid in extender improves post-thaw parameters of cryopreserved Nili-Ravi buffalo bull semen. **Reproduction Domestic Animal**, v. 49, p. 122-125, 2014.

ESPINOSA-CERVANTES, R.; CÓRDOVA-IZQUIERDO, A. Efecto del estrés calórico y el estrés oxidativo en la función espermática de los mamíferos. **Revista Complutense de Ciencias Veterinarias**, v. 12, n. 1, p. 27-39, 2018.

FARIAS, J. L. DE S.; DE ARAÚJO, M. R. A.; LIMA, A. R.; ALVES, F. S. F.; OLIVEIRA, L. S.; DE SOUZA, H. A. Análise socioeconômica de produtores familiares de caprinos e ovinos no semiárido cearense, Brasil. **Archivos de zootecnia**. v. 63, n. 241, p. 13-24, 2014.

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.

FOLCHINI, N. P.; LEIVAS, F. G.; SANTOS, F. W.; SCHWENGBER, E. B.; MARTIN, D. M.; SPIAZZI, C. C.; BRUM, D. S. Uso de mini-Percoll modificado para seleção e redução da formação de espécies reativas de oxigênio (ROS) em espermatozoides bovinos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 36, n. 4, p. 239-244, 2012.

FONSECA, J. F.; TORRES, C. A. A.; ROVAY, H.; BORGES, A. M.; BARBOSA, L. P.; MAFFILI, V. V.; FRAGA, D. B. M. Hypoosmotic swelling test in goat spermatozoa. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 25, n. 3, p. 436-457, 2001.

FRACZEK, M.; KURPISZ, M. O sistema redox no sémen humano e danos peroxidativa de espermatozoides. **Postepy Hig Med Dosw** (Online), v. 59, p. 523-34, 2005.

FUNAHASHI, H.; SANO, T. Select antioxidants improve the function of extended boar semen stored at 10 degrees C. **Theriogenology**, v. 63, p. 1605-1616, 2005.

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

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**, v. 82-83, p. 321-339, 2004.

Ghibu S.; LAUZIER, B.; DELEMASURE, S.; AMOUREUX, S.; SICARD, P.; VERGELY, C.; MURESAN, A.; MOGOSAN, C.; ROCHETTE, L. Antioxidant properties of alpha-lipoic acid: effects on red blood membrane permeability and adaptation of isolated rat heart to reversible ischemia. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 320, p. 141-148, 2009.

GLAZAR, A. I.; MULLEN, S. F.; LIU, J.; BENSON, J. D.; CRITSER, J. K.; SQUIRES, E. L.; GRAHAM, J. K. Osmotic tolerance limits and membrane permeability characteristics of stallion spermatozoa treated with cholesterol. **Cryobiology**, v. 59, n. 2, p. 201-206, 2009.

GLEW, R. H. Lipid Metabolism II: Pathways of Metabolism of Special Lipids. In: DEVLIN, T. M. **Textbook of Biochemistry with Clinical Correlations**, 7 Ed., Wiley-Liss, p. 732, 2010.

GRAHAM, J. K.; MOCÉ, E. Fertility evaluation of frozen/thawed semen. **Theriogenology**, v. 64, p. 492-504, 2005.

GUERRA, M. M. P.; EVANS, G.; MAXWELL, W. H. C. Papel de oxidantes e antioxidantes na andrologia (Revisão de Literatura). **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 28, p. 187-195, 2004.

GUERRA, M. M. P.; SOUZA, A. F. de; SOARES, A. T.; CÉESAR, C. N. R.; SILVA, S. V.; BATISTA, A. M. Aspectos críticos da congelação do sêmen caprino. In: **Congresso Brasileiro de Reprodução Animal**, XVIII (Anais), p. 46-56, 2009.

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.

GUTHRIE, H. D.; WELCH, G. R. Effects of reactive oxygen species on sperm function. **Theriogenology**, v. 78, p. 1700-1708, 2012.

GUTHRIE, H. D.; WELCH, G. R. Determination of intracellular reactive oxygen species and high mitochondrial membrane potential in Percoll-treated viable boar sperm using fluorescence-activated flow cytometry. **Journal of Animal Science**, v. 84, p. 2089-2100, 2006.

HAFEZ, E. S. E.; HAFEZ, B. **Reprodução Animal**. 7ª ed. Manole Ltda, 2004.

HALLIWELL, B. Espécies reativas e antioxidantes. Redox Biology é um tema fundamental da vida aeróbica. **Plant Physiology**, v. 141, p. 312-322, 2006.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. **Radicais livres em biologia e medicina**. 4 Ed., Clarendon Press, Oxford, 2006.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. **Radicais livres em biologia e medicina**. 3 Ed., Clarendon Press, Oxford, 1999.

HASHEM, E. Z.; ESLAMI, M. Kinetin improves motility, viability and antioxidative parameters of ram semen during storage at refrigerator temperature. **Cell and Tissue Banking**, v. 19, p. 97-111, 2018.

HASHEM, E. Z.; HADDAD, R.; ESLAMI, M. Evaluation of ram semen enrichment with oleic acid on different spermatozoa parameters during low temperature liquid storage. **Small Ruminant Research**, v. 150, p. 30-39, 2017.

HOLDEN, C. A.; HYNE, R. V.; SATHANANTHAN, A. H.; TROUNSON, A. O. Assessment of the human sperm acrosome reaction using concanavalin A lectin. **Molecular Reproduction and Development**, v. 25, p. 247-57, 1990.

HOLT, W. V. Fundamental aspects of sperm cryobiology: the importance of species and individual differences. **Theriogenology**, v. 53, p. 47-58, 2000.

HOSSAIN, S.; TAREK, K. M. A.; HAMMANO K. I.; TSUJII H. Effect of fatty acids on boar sperm motility viability and acrosome reaction. **Reproductive Medicine and Biology**, v. 6, n. 4, p. 235-239, 2007.

IBGE, Diretoria de Pesquisas, Coordenação de Agropecuária, Pesquisa da Pecuária Municipal 2017. Acesso: https://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/periodicos/84/ppm_2017_v45_br_informativo.pdf.

INAMASSU, A.; VECHI, E.; LOPES, M. D. Viabilização do teste hipo-osmótico em cães e sua relação com outras variáveis espermáticas. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 23, p. 302-304, 1999.

IZQUIERDO, A. C.; LANG, C. G. R.; JIMÉNEZ, C. A. C.; JIMÉNEZ, M. S. C. Estrés oxidativo y antioxidantes en la conservación espermática oxidative stress and antioxidants in the spermatoc conservation. **Revista Complutense de Ciencias Veterinarias**, v. 3, n. 1, p. 01-38, 2009.

JOBIM, M. I. M.; GREGORY, R. M.; MATTOS, R. C. Marcadores protéicos de fertilidade no plasma seminal e na membrana plasmática. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, n. 6, p. 11-19, 2009.

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.

KUÇUK, 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.

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

LECEWICZ, M.; STRZEZEK, R.; KORDAN, W.; MAJEWSKA, A. Effect of extender supplementation with low-molecular-weight antioxidants on selected quality parameters of cryopreserved canine spermatozoa. **Journal of Veterinary Research**, v. 62, n. 2, p. 221-227, 2018.

LEHNINGER, D. N.; COX, M. M. Lipídios. In: LEHNINGER D. N. **Princípios de Bioquímica**. São Paulo: Sarvier, 5ª edição, Artmed, p. 343-366, 2011.

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.

LONE, S. A.; PRASAD, J. K.; GHOSH, S. K.; DAS, G. K.; BALAMURUGAN, B.; VERMA, M. R. Study on correlation of sperm quality parameters with antioxidant and oxidant status of buffalo bull semen during various stages of cryopreservation. **Andrologia**, v. 50, n. 4, p. 1-8, 2018.

LUBERDA, Z. The role of glutathione in mammalian gametes. **Reproductive Biology**, v. 5, n. 1, p. 5-17, 2005.

LUCIO, C. F.; BRITO, M. M.; ANGRIMANI, D. S. R.; BELAZ, K. R. A.; MORAIS, D.; ZAMPIERI, D.; LOSANO, J. D. A.; ASSUMPÇÃO, M. E. O. A.; NICHI, M.; EBERLIN, M. N.; VANNUCCHI, C. I. Lipid composition of the canine sperm plasma membrane as markers of sperm motility. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 52, p. 208-213, 2017.

MACHADO, R.; FREITAS, A. R.; SIMPLÍCIO, A. A.; SANTOS, D. O. Flutuações sazonais e efeitos de raça no sêmen caprino. **XXXVII Reunião Anual da SBZ**, Viçosa, MG, 2000.

MAIA, M. S. **Tecnologia do Sêmen e Inseminação Artificial em Caprinos e Ovinos**. 13 Ed., EMPARN, Natal, Rio Grande do Norte, 2010.

MAIA, M. S. **Viabilidade espermática e geração de metabólitos reativos do oxigênio (ROS) no sêmen ovino criopreservado em diluidor aditivado de lauril sulfato de sódio (OE), trolox-C e catalase**. 2006. 147f. Tese (doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Botucatu, 2006.

MAIA, M. S.; BICUDO, S. D. Radicais livres, antioxidantes e função espermática em mamíferos: uma revisão. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 33, n. 4, p. 183-193, 2009.

MANDAL, R.; BADYAKAR, D.; CHAKRABARTY, J. Role of membrane lipid fatty acids in sperm cryopreservation. **Advances in Andrology**, v. 2014, 9p, 2014.

MANJUNATH, P.; NAUC, V.; BERGERON, A.; MÉNARD, M. Major proteins of bovine seminal plasma bind to the low-density lipoprotein fraction of hen's egg yolk. **Biology of Reproduction**, v. 67, p. 1250-1258, 2002.

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**, v. 29, n. 4, p. 459-467, 2008.

MATA-CAMPUZANO, M., ÁLVAREZ-RODRÍGUEZ, M., ÁLVAREZ, M., TAMAYO-CANUL, J., ANEL, L., DE PAZ, P., MARTÍNEZ-PASTOR, F. (2015). Post-thawing quality and incubation resilience of cryopreserved ram spermatozoa are affected by antioxidant supplementation and choice of extender. **Theriogenology**, v. 83, n. 4, p. 520-528, 2015.

MATEOS-REX, E.; AGUILLAR, C. G. C. Técnicas de control de la reproducción en ganado caprino. In: **Nuevas técnicas de reproducción asistida aplicadas a la producción animal**. Cuenca: Universidad de Castilla la Mancha, p. 183-202, 1996.

MEMON, A. A.; WAHID, H.; ROSNINA, Y.; GOH, Y. M.; EBRAHIMI, M.; NADIA, F. M. Effect of ascorbic acid concentrations, methods of cooling and freezing on Boer goat semen cryopreservation. **Reproduction in Domestic Animals**, v.48, n.2, p. 325-330, 2013.

MORTIMER, S. T. CASA - Practical Aspects, **Journal of andrology**, v. 21, n. 4, p. 515-524, 2000.

NASEER, Z.; AHMAD, E.; AKSOY, M.; KÜÇÜK, N.; SERIN, I.; CEYLAN, A.; BOYACIOĞLU, M.; KUM, C. Protective effect of cholesterol-loaded cyclodextrin pretreatment against hydrogen peroxide induced oxidative damage in ram sperm. **Cryobiology**, v. 71, n. 1, p. 18-23, 2015.

NASIRI, A. H.; TOWHIDI, A.; ZEINOALDINI, S. Combined effect of DHA and α -tocopherol supplementation during bull semen cryopreservation on sperm characteristics and fatty acid composition. **Andrologia**, v. 44, Suplemento 1, p. 550-555, 2012.

NICHI, M. **Efeito do tratamento com antioxidantes e ácidos graxos poli-insaturados em amostras espermáticas epididimárias de touros**. 2009. 120f. Tese (doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

NICHI, M.; GOOVAERTS, I. G. F.; CORTADA, C. N. M.; BARNABE, V. H.; DE CLERCQ, J. B. P.; BOLS, P. E. J. Roles of lipid peroxidation and cytoplasmic droplets on in vitro fertilization capacity of sperm collected from bovine epididymides stored at 4 and 34 °C. **Theriogenology**, v. 67, n. 2, p. 334-340, 2007.

NOGUEIRA FILHO, A.; FIGUEIREDO JÚNIOR, C. A.; YAMAMOTO, A. **Mercado de carne, leite e pele de caprinos e ovinos na área de atuação do BNB**. Banco do Nordeste do Brasil. n. 27, 128 p., 2010.

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.

O'BRIEN, J. K.; HOLLINSHEAD, F. K.; EVANS, K. M.; EVANS, G.; MAXWELL, W. M. C. Flow cytometric sorting of frozen-thawed spermatozoa in sheep and non-human primates. **Reproduction Fertility Development**, v. 15, p. 367-375, 2003.

OBERST, E. R.; JOBIM, M. I. I.; MATTOS, R. C.; KROTH, E.; LARA, G.; SMIDERIE, W.; BRONZONATO, M. Teste hiposmótico e sua relação com outros métodos para a avaliação da integridade da membrana plasmática do carneiro. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 27, n. 3, p. 375-376, 2003.

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

PARKS, J. E.; LYNCH, D. V. Lipid composition and thermotropic phase behavior of boar, bull, stallion, and roosters sperm membranes. **Cryobiology**, v. 29, n. 1, p. 255-266, 1992.

PEÑA, F. J.; SARAVIA, F.; JOHANNISSON, A.; WALLGREN, M.; MARTÍNEZ RODRÍGUEZ, H. Um método novo e simples para avaliar as alterações da membrana início em congelados e descongelados espermatozoides javali. **International Journal of Andrology**, v. 28, p. 107-114, 2005.

PESCH, S.; BERGMAN, M. Structure of mammalian spermatozoa in respect to viability, Fertility and Cryopreservation. **Micron**, v. 37, p. 597-612, 2006.

POULOS, A.; DARIN-BENNETT, A.; WHITE, I. The phospholipid-bound fatty acids and aldehydes of mammalian spermatozoa. **Comparative biochemistry and physiology Part B: Comparative biochemistry**, v. 46, p. 541-549, 1973.

PRATA, L. F.; RIBEIRO, A. C.; REZENDE, K. T.; CARVALHO, M. R. B.; RIBEIRO, S. D. A.; COSTA, R. G. Composição, perfil nitrogenado e características do leite caprino (saanen), Região Sudeste, Brasil. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 18, n. 4, p. 1-12, 1998.

PURDY, P. H. A review on goat sperm cryopreservation. **Small Ruminant Research**, v. 63, p. 215-225, 2006.

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.

RATO, L.; ALVES, M. G.; CAVACO, J. E.; OLIVEIRA, P. F. Nutrition/Physiology High-energy diets: a threat for male fertility? **Obesity Reviews**, v. 15, p. 996-1007, 2014.

REITER, R. J.; ROSALES-CORRAL, S. A.; MANCHESTER, L. C.; TAN, D. X. Peripheral reproductive organ health and melatonin: ready for prime time. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 14, p. 7231-7272, 2013.

RIBEIRO, S. D. A. Caprinocultura: Criação Racional de Caprinos. **Nobel**, São Paulo, 1997.

RODRÍGUEZ-MARTINEZ, O. D. Y. C.; ARAKI, K.; GARCIA, I.; VASSALLI, P. An early and massive wave of germinal cell apoptosis is required for the development of functional spermatogenesis. **The EMBO Journal**, v. 16, p. 2262-2270, 2007.

ROVER JÚNIOR, L.; HÖEHR, N. F.; VELLASCO, A. P.; KUBOTA, L. T. [Antioxidant system involving the glutathione metabolic cycle associated to electroanalytical methods in the oxidative stress evaluation]. **Química Nova**, v. 24, n. 1, p. 112-119, 2001.

SALAMON, S.; MAXWELL, W. M. C. Frozen storage of ram semen I. Processing, freezing, thawing and fertility after cervical insemination. **Animal Reproduction Science**, v.37, p.185-249, 1995.

SALGADO, L. C. **Utilização do caseinato de sódio na congelação de sêmen Ovino**. 2020. 60f. Dissertação (mestrado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Botucatu, 2020.

SALMITO-VANDERLEY, C. S. B.; VIEIRA, M. J. A. F.; LEITE, L. V.; OLIVEIRA, F. C. E.; LINHARES, F. R. A.; SALGUEIRO C. C. M.; NUNES, J. F. Meios de congelação para conservação de sêmen de peixes da família Characidae. **Ciência Animal**, v. 22, n. 1, p. 255-268. 2012.

SANTIAGO-MORENO, J.; ESTESO, M. C.; CASTAÑO, C.; TOLEDANO-DÍAZ, A.; DELGADILLO, J. A.; LÓPEZ-SEBASTIÁN, A. Seminal plasma removal by density-gradient centrifugation is superior for goat sperm preservation compared with classical sperm washing. **Animal Reproduction Science**, v. 181, p. 141-150, 2017.

SANTOS, G. R DE A.; MENDONÇA, R. C.; SILVA, M. A.; QUEIROZ, L. O. Caracterização da caprinocultura na bacia leiteira sergipana. **Scientia Plena**, v. 10, n. 11, p. 2-11, 2014.

SHAN, X.; AW, T.; JONES, D. P. Glutathione-dependent protection against oxidative injury. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 47, p. 61-71, 1990.

SIKKA, S. C. Oxidative stress and role of antioxidants in normal and abnormal sperm function. **Frontiers in Bioscience**, v. 1, p. 78-86, 1996.

SILVA, A. F.; COSTA, E. P.; OLIVEIRA, F. A.; TORRES, C. A. A.; HASS, G. T. S.; NASCIMENTO, V. A. Uso de dimetil-formamida associada ou não ao glicerol na criopreservação de sêmen caprino. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 35, n. 2, p. 452-456, 2006.

SILVA, C. M. B. **Efeito da melatonina em espermatozoides de eqüino**. 2010. 72f. Tese (Doutorado) - Universidade Técnica de Lisboa, Lisboa, 2010.

SILVA, E. C. B.; GUERRA, M. M. P. Terapias antioxidantes na criopreservação espermática. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**, v. 111, p. 143-149, 2012.

SILVA, E. F.; CARDOSO, T. F.; TAVARES, G. C.; COSTA, V. G. G.; SILVA, J. F.; VARELA JR, A. S.; LEITE, F. P. L.; COSCINI, C. D. Criopreservação de sêmen suíno e a pesquisa com antioxidantes. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**, v. 108, p. 103-112, 2013.

SILVA, F. M.; GADELLA, B. M. Dynamics of the mammalian sperm plasma membrane in the process of fertilization. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1469, p. 197-235, 2006.

SILVA, K. M. G.; MORAES, T. A. P.; SILVA, E. C. B.; GAMBOA, S. C.; GUERRA, M. M. P. Efeito da adição de trolox e pentoxifilina na motilidade, integridade do acrossoma e do DNA de espermatozoides equinos após descongelamento. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 61, n. 1, p. 42-49, 2009.

SILVA, P. F. N. **Physiology of peroxidation processes in mammalian sperm**. 2006. 186f. Tese (Doutorado) - Faculty of Veterinarian Medicine, Utrecht University, Utrecht, 2006.

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

SIMPLÍCIO, A. A.; MACHADO, R. Tecnologia de sêmen e inseminação artificial na espécie caprina. In: **CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL**, Belo Horizonte. Anais. Belo Horizonte: CBRA, p. 171-177, 1989.

SIQUEIRA, A. P.; SILVA FILHO, J. M. DA; BRUSCHI, J. H.; PALHARES, M. S.; BORGES, A. M.; BRUSCHI, M. C. M.; PEIXOTO, M. P.; ROSSI, R. Taxa de concepção de cabras inseminadas com sêmen caprino resfriado a 5°C, por 12 ou 24 horas, em meio diluidor à base de gema de ovo. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 61, n. 1, p. 66-71, 2009.

SOARES, I. A. C. **Uso da melatonina na criopreservação do sêmen caprino**. 2016. 50f. Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa – UFV, Viçosa, Minas Gerais, 2016.

SOUSA, D. B.; BICUDO, S. D.; AZEVEDO, H. C.; MAIA, M. S. Ranqueamento/agrupamento do sêmen congelado de carneiros da raça Santa Inês analisados pelo sistema CASA e sondas fluorescentes pela análise estatística multivariada. **Veterinária e Zootecnia**, v. 20, p. 649-657, 2012.

SOUSA, W. H. O Agronegócio da caprinocultura de corte no Brasil. **Tecnologia & Ciência Agropecuária**, João Pessoa, v. 1, n. 1, p. 51-58, 2007.

SOUZA, W. L.; MORAIS, E. A. Dimetilformamida adicionada no sêmen de caprinos e seu efeito sobre a longevidade e funcionalidade da membrana espermática após criopreservação. **Revista Semiárido De Visu**, v. 5, n. 1, p. 11-20, 2017.

SOUZA, W. L.; MORAES, E. A.; COSTA, J. M. S.; SOUSA, P. H. F.; LOPES JUNIOR, E. S.; OLIVEIRA, R. P.; TONIOLLI, R. Efeito de diferentes concentrações de melatonina em espermatozoides de carneiros sobre estresse oxidativo após criopreservação. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 36, n. 7, p. 657-664, 2016.

SOUZA, W. L.; MORAES, E. A.; TONIOLLI, R. Adição de antioxidantes ao sêmen de carneiros e seus efeitos após a descongelamento. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 37, p. 471-478, 2017.

STRZEZEK, R.; KOZIOROWSKA-GILUN, M.; STAWISZYNSKA, M. Cryopreservation of canine semen: the effect of two extender variants on the quality and antioxidant properties of spermatozoa. **Polish Journal of Veterinary Sciences**, v. 15, p. 721-6, 2012.

SURAI P. F.; NOBLE R. C.; SPARKS N. H.; SPEAKE B. K. Effect of long-term supplementation with arachidonic or docosahexaenoic acids on sperm production in the broiler chicken. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 120, p. 257-264, 2000.

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**, v. 47, n. 1, p. 92-97, 2012.

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.

TEIXEIRA, C. P. A. B.; JARDIM, W.F. **Processos Oxidativos Avançados**. Campinas - SP. Agosto, 2004.

TORK, A. L. P. **Efeito da utilização de extrato de hibisco (*hibiscus sabdariffa*) em espermatozoides caprino pós-descongelamento**. 2018. 42f. Trabalho de Conclusão de Curso, Universidade Federal da Paraíba – UFPB, João Pessoa, Paraíba. 2018.

TOWHIDI, A.; PARKS, J. E. Effect of n-3 fatty acids and α -tocopherol on post-thaw parameters and fatty acid composition of bovine sperm. **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**, v. 29, p. 1051-1056, 2012.

TUFARELLI, V.; RIZZO, A.; LACALANDRA, G. M.; GUARICCI, A. C.; LAUDADIO, V.; VALENTINI, L. Effects of the supplementation with an high-polyphenols extra-virgin olive oil on kinetic sperm features and seminal plasma oxidative status in healthy dogs. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 53, n. 3, p. 582-587, 2018.

VARNER, D. D.; GIBB, Z.; AITKEN, R. J. Stallion fertility: A focus on the spermatozoon. **Equine Veterinary Journal**, v. 47, n. 1, p. 16-24, 2015.

VERNET, P.; AITKEN, R. J.; DREVET, J. R. Antioxidant strategies in the epididymis. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 216, p. 31-39, 2004.

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

VIANA, A. G. A. **Avaliação proteômica de plasma seminal de touros holandeses (*Bos taurus*) de alta e baixa fertilidades**. 2018. 96f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2018.

VIEIRA, M. M. M.; FURTADO, F. M. V.; CÂNDIDO, M. J. D.; BARBOSA FILHO, J. A. D.; CAVALCANTE, A. C. R.; MAGALHÃES, J. A.; COSTA, N. DE L. Aspecto fisiológico e bioclimático de caprinos nas regiões semiáridas. **Pubvet**, v. 10, p. 356-369, 2016.

VIEIRA, N. M. G. **Estresse oxidativo seminal em cães: estudo da susceptibilidade dos espermatozoides e possíveis terapias durante a criopreservação**. 2018. 110f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2018.

VISHAL, T.; GUPTA, B. M.; TANDON, R. Free radicals/ reactive oxygen species. **JK-Practitioner**, v. 12, n. 3, p. 143-148, 2005.

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

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

YIN, H.; XU, L.; PORTER, N. A. Free radical lipid peroxidation: mechanisms and analysis. **Chemical Reviews**, v. 111, n. 10, p. 5944-5972, 2011.

ZINI, A.; AL-HATHAL, N. Antioxidant Therapy in Male Infertility Fact or Fiction. **Asian Journal of Andrology**, v. 13, p. 374-381, 2011.

ANEXOS

ANEXO A – Certificado do Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFPI)



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E INOVAÇÃO
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS**



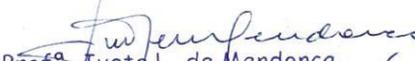
Campus Universitário Ministro Petrônio Portela, Bairro Ininga, Teresina, Piauí, Brasil; CEP: 64049-550
Telefone (86) 3215-5734 _e-mail: ceeapi@ufpi.edu.br

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "***Efeito da adição do ácido araquidônico e do ácido oleico sobre a viabilidade espermática pós- congelação em sêmen caprino***", registrada nº **643/2020**, sob a responsabilidade do Prof. Dr. **JOSÉ ADALMIR TORRES DE SOUZA** do **Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária/CCA/UFPI** que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de Pesquisa Científica, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi **Aprovado** pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFPI) da Universidade Federal do Piauí, em **Ad. Referendum**.

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência da Autorização	01/07/2020 a 10/09/2020
Espécie/Linhagem/raça	Caprino
Nº de Animais	04
Peso/ Idade	50kg/ 3 anos
Sexo	Machos
Origem	Fazenda Nova Vista - Santa Cruz dos Milagres/PI
Local de alojamento dos animais durante o experimento	Fazendas- baias
Grau de Invasividade	1

Teresina, 01 de Julho de 2020.


 Prof.^a Ivete L. de Mendonça
 Comitê de Ética em Experimentação Animal-UFPI
 Coordenadora