



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ
CAMPUS MINISTRO PETRÔNIO PORTELLA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL**

MARINA REBECA SOARES CARNEIRO DE SOUSA

**Efeito da suplementação de antioxidantes ao tris-gema sobre a
viabilidade espermática do sêmen caprino pós criopreservação**

**Teresina (PI)
2019**

MARINA REBECA SOARES CARNEIRO DE SOUSA

Efeito da suplementação de antioxidantes ao tris-gema sobre a viabilidade espermática do sêmen caprino pós criopreservação

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Universidade Federal do Piauí, para submissão ao Exame de Defesa, como parte dos requisitos para a obtenção do título Doutor em Ciência Animal, Área de Concentração: Sanidade e Reprodução

Orientador: Prof. Dr. Amilton Paulo Raposo Costa

TERESINA/PI
2019

FICHA CATALOGRÁFICA
Universidade Federal do Piauí
Biblioteca Comunitária Jornalista Carlos Castello Branco
Divisão de Processos Técnicos

S725e Sousa, Marina Rebeca Soares Carneiro de.
Efeito da suplementação de antioxidantes ao trígemino sobre a viabilidade espermática do sêmen caprino pós criopreservação. / Marina Rebeca Soares Carneiro de Sousa. – 2019.
87 p.
Tese (Doutorado) – Pós-Graduação em Ciência Animal, Área de Concentração: Sanidade e reprodução, Universidade Federal do Piauí, Teresina, 2019.
"Orientação: Prof. Dr. Amilton Paulo Raposo Costa".
1. Fertilidade. 2. Caprinocultura. 3. Biotecnologia da reprodução. 4. ROS. I. Título.

CDD 636.89

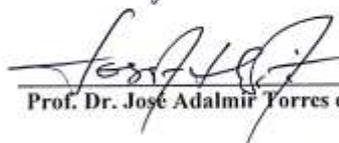
EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO DE ANTIOXIDANTES AO TRIS-GEMA
SOBRE A VIABILIDADE ESPERMÁTICA DO SÊMEN CAPRINO PÓS
CRIOPRESERVAÇÃO

MARINA REBECA SOARES CARNEIRO DE SOUSA

Tese aprovada em: 02/07/2019

Banca Examinadora:


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


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


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


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


Prof. Dra. Yndira Nayan Teixeira Carvalho Castelo Branco (Externa) / UFS

Dedico,

Primeiramente a Deus, minha rocha firme, meu Pai, que me conduz e protege.

A minha querida e presente mãe, Lucimeire Soares Sampaio de Sousa, que nunca poupou esforços para me fazer chegar até aqui, aquela me consola em momentos de angústia e medo, a minha melhor amiga.

Ao meu Pai, Ronaldo Carneiro de Sousa, meu herói, meu protetor, meu primeiro professor, meu espelho. Suas vitórias são minhas, e as minhas vitórias são suas.

Ao meu esposo, Wisllan César Santos Silva, meu companheiro de aventuras, minha força, meu maior incentivador, meu José!

À luz dos meus olhos, minha filha Ana Maria Carneiro Santos, e ao nosso novo bebê, tudo faço por vocês.

Aos meus sogros, Dêlania Pereira dos Santos e Júlio César da Silva, que me acolhem e cuidam sempre dos meus.

Aos meus queridos e admiráveis orientadores, Professor Amilton Raposo e Professor Antônio de Sousa Júnior, exemplo de sabedoria, paciência, dedicação e acolhimento.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por me proporcionar momentos de tanto aprendizado e felicidade, pelas conduções e por me trazer até aqui.

Aos meu pais, Lucimeire e Ronaldo, por toda uma vida de ensinamentos, acolhimento e amor, isso tudo é vitória de vocês.

Universidade Federal do Piauí, ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, e a Comissão de Aperfeiçoamento de Pessoal do Nível Superior (Capes) que muitas vezes foram casa e sustento nessa longa caminhada.

Ao meu esposo, Wisllan César, pelo amor, cuidado, paciência, e companheirismo, obrigada por dividir tudo isso comigo e tornar tudo possível. Te amo.

Aos meus Sogros, Dêlania e Júlio César por todo o apoio, por ser minha família, por toda a força e estímulo.

Aos meus amigos, Emanuella e Marlon, obrigado por todo conhecimento e experiências compartilhados, pelos finais de semana de ajuda e por toda a dedicação de vocês.

Aos professores Amilton Raposo e Antônio de Sousa Junior por todo o suporte, ensinamento, materiais e por todo o aprendizado científico e de campo. Agradeço ainda por todos os estagiários do colégio Técnico de Teresina, em especial Marcos, Madalena, Edinardo e Taciane, por toda a ajuda e momentos de alegria.

A professora Isolda Marcia Rocha do Nascimento que como uma mãe me acolheu e me ensina e arrasta com seus exemplos.

À propriedade Fazenda Sucupira em que foram realizadas as coletas. Pela oportunidade, ajuda nas coletas e acolhimento.

A todos os docentes que ministraram aulas e compartilharam seus conhecimentos e experiências durante o curso de Doutorado.

Muito obrigada!

SUMÁRIO

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS	vi
LISTA DE TABELAS	vii
LISTA DE FIGURAS	viii
RESUMO	ix
ABSTRACT	x
1 INTRODUÇÃO	12
2 REVISÃO DE LITERATURA	14
2.1 Caprinos da raça anglonubiana	14
2.2 Estrutura espermática	14
2.2.1 <i>Membrana plasmática</i>	15
2.2.2 <i>A cabeça do espermatozoide</i>	16
2.2.3 <i>O flagelo</i>	17
2.3 Produção das espécies reativas de oxigênio (ROS) e o stress oxidativo	18
2.4 Antioxidantes	20
2.5 β-cariofileno	22
2.6 Ácido elágico	24
2.7 Criopreservação espermática	25
2.7.1 <i>Meios diluidores e crioprotetores</i>	27
2.8 Avaliação espermática	28
2.8.1 <i>Integridade da membrana plasmática</i>	28
2.8.2 <i>Integridade do Acrossoma</i>	29
2.8.3 <i>Atividade Mitocondrial</i>	30
2.8.4 <i>Análise computadorizada do sêmen</i>	31
3 CAPÍTULO I: Suplementação de β-cariofileno ao tris-gema na criopreservação de sêmen caprino	33
4 CAPÍTULO II: Suplementação de ácido elágico ao tris-gema na criopreservação de sêmen caprino	52
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS	72
6 REFERÊNCIAS	73

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ALH	Deslocamento lateral da cabeça
ANOVA	Análise de Variância Anova
BC	β -cariofileno
BCF	Frequência de batimentos cruzados
CASA	Sistema analisador de espermatozoides auxiliado por computador
CBRA	Colégio Brasileiro de Reprodução Animal
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
DCF	Diacetato de carboxifluoresceína
DMSO	Dimetilsulfóxido
FITC-PNA	Isocianato de fluoresceína conjugado com Peanut agglutinin
JC-1	Fluorocromo catoônico lipofílico
LIN	Linearidade
MOP	motilidade progressiva
MT	Motilidade total
PBS	Tampão fosfato bovino
PC	processador central
STR	Retilinearidade
TTR	Teste de Termorresistência
UI	Unidade internacional
v/v	volume/volume
VAP	Velocidade média do percurso
VSL	Velocidade em linha reta
WOB	Wobble

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO I	Pág.
<p>Tabela 1 Integridade da membrana plasmática, potencial mitocondrial e Integridade acrossomal pós-descongelção de espermatozoides caprinos criopreservados em três concentrações diferentes de β-cariofileno.....</p>	44
<p>Tabela 2 Cinética pós-descongelção de espermatozoides caprinos criopreservados em tris-gema suplementado com três concentrações diferentes de β-cariofileno, avaliados pelo teste CASA (Sistema analisador de espermatozoides auxiliado por computador).....</p>	45
<p>Tabela 3 Motilidade total e vigor pós-descongelção de espermatozoides caprinos criopreservados em tris-gema suplementado com três concentrações diferentes de β-cariofileno, avaliados pelo teste de termorresistência (TTR).....</p>	46
CAPÍTULO II	
<p>Tabela 1 Motilidade total e vigor pós-descongelção de espermatozoides caprinos criopreservados em tris-gema suplementado com três diferentes concentrações de ácido elágico 90% de pureza e três diferentes concentrações de ácido elágico 95% de pureza, avaliados pelo teste de termorresistência (TTR).....</p>	65
<p>Tabela 2 Cinética pós-descongelção de espermatozoides caprinos criopreservados em tris-gema suplementado com três diferentes concentrações de ácido elágico 90% de pureza e três diferentes concentrações de ácido elágico 95% de pureza, avaliados pelo teste CASA (Sistema analisador de espermatozóides auxiliado por computador).....</p>	66
<p>Tabela 3 Integridade da membrana plasmática, potencial mitocondrial e integridade acrossomal pós-descongelção de espermatozoides caprinos criopreservados em Tris-Gema suplementado com três diferentes concentrações de ácido elágico 90% de pureza e em três diferentes concentrações de ácido elágico 95% de pureza.....</p>	67

LISTA DE FIGURAS

REVISÃO DE LITERATURA		Pág.
Figura 1	Estrutura química e molecular do β -cariofileno.....	23
Figura 2	Ácido gálico (1) e ácido elágico (2).....	24
CAPÍTULO I		
Figura 1	Geração intracelular de ROS pós-descongelção em espermatozoides caprinos criopreservados em Tris-Gema suplementado com três concentrações diferentes de β -cariofileno.....	46
CAPÍTULO II		
Figura 1	Geração intracelular de ROS pós-descongelção em espermatozoides caprinos criopreservados em Tris-Gema suplementado com três diferentes concentrações de ácido elágico 90% de pureza e em três diferentes concentrações de ácido elágico 95% de pureza.....	69

RESUMO

Bioteχνicas da reprodução como o congelamento de sêmen podem agregar melhoramento genético. Entretanto, reações de oxidação acabam baixando a taxa de viabilidade espermática pós descongelação. O β -cariofileno é um sesquiterpeno com atividades biológicas, destacando-se a atividade anti-inflamatória e antioxidante. O ácido elágico (AE) é um dímero do ácido gálico apresentando quatro anéis fundidos com quatro hidroxilas, de forte atividade antioxidante. Objetivou-se analisar efeitos antioxidantes e viabilidade espermática do sêmen caprino criopreservado em tris-gema suplementado com diferentes concentrações de β -cariofileno e diferentes concentrações e purzas de AE. Foram realizadas coletas semanais durante sete semanas, totalizando sete ejaculados de bodes da raça anglonubiana por coleta. Após avaliação e formação do pool, este foi dividido em quatro alíquotas para avaliação da atividade do β -cariofileno, correspondentes ao grupo tratamento respectivo: controle-0mM, B1-1,0 mM, B2-2,0 mM e B3-3,0 mM; e em sete alíquotas para avaliação da atividade do AE 90% de pureza: controle-0Mm, A1-0,5 mM, A2-1,0mM, A3-2,0mM e AE 95% de pureza: D1-0,5mM, D2-1,0mM e D3-2,0mM. Avaliaram-se a integridade da membrana plasmática, integridade acrossomal, potencial de membrana mitocondrial, cinética espermática (CASA), Teste de Termo Resistência (TTR) e detecção de espécies reativas ao oxigênio (ROS). Os resultados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e ao teste Kruskal Wallis para os resultados não paramétricos. Não houveram diferenças significativas ($p < 0,05$) em relação ao controle, entre os resultados obtidos para as variáveis e tratamentos estudados pós descongelação β -cariofileno. Entretanto, observou-se redução significativa ($p > 0,05$) dos parâmetros motilidade e vigor no TTR e cinética CASA nas concentrações A3 e D3 e, redução no potencial de membrana mitocondrial na concentração A3 e concentrações D2 e D3, quando comparados ao controle. Ambos os antioxidantes estudados não reduziram significativamente a produção de ROS. A suplementação das concentrações de β -cariofileno adotadas neste estudo ao diluidor tris-gema não provocaram efeitos na qualidade espermática do sêmen caprino anglonubiano, enquanto, em maiores concentrações do AE (1,0mM e 2mM) causa a diminuição da viabilidade espermática.

Palavras-chave: Fertilidade, caprinocultura, biotecnologia da reprodução, ROS

ABSTRACT

Reproduction biotechnics such as semen freezing can add genetic improvement. However, oxidation reactions lower the rate of sperm viability after thawing. β -caryophyllene is a sesquiterpene with biological activities, with emphasis on anti-inflammatory and antioxidant activity. Ellagic acid (EA) is a dimer of gallic acid having four fused rings with four hydroxylates, with a strong antioxidant activity. The objective of this study was to analyze antioxidant effects and sperm viability of cryopreserved goat semen in egg-yolk supplemented with different concentrations of β -caryophyllene and different concentrations and purities of EA. Weekly collections were carried out for seven weeks, totaling seven ejaculates of anglonubian herds by collection. After evaluation and formation of the pool, it was divided into four aliquots to evaluate β -caryophyllene activity, corresponding to the respective treatment group: control-0mM, B1-1,0mM, B2-2,0mM and B3-3,0 mM; and in seven aliquots for assessment of 90% purity EA activity: control -0mM, A1-0,5mM, A2-1,0mM, A3-2,0mM and 95% purity EA: D1-0,5mM, D2-1,0mM and D3-2,0mM. Plasma membrane integrity, acrosomal integrity, mitochondrial membrane potential, sperm kinetics (CASA), Thermo Resistance Test (TTR) and detection of oxygen reactive species (ROS) were evaluated. The results were submitted to analysis of variance (ANOVA) and Kruskal Wallis test for the non-parametric results. There were no significant differences ($p < 0,05$) in relation to the control, among the results obtained for the variables and treatments studied after β -caryophyllene thawing. However, there was a significant ($p > 0,05$) reduction of the motility and vigor parameters in the TTR and CASA kinetics at concentrations A3 and D3 and reduction in mitochondrial membrane potential at A3 concentration and D2 and D3 concentrations, when compared to the control. Both antioxidants studied did not significantly reduce ROS production. The supplementation of the β -caryophyllene concentrations adopted in this study to the egg-yolk diluent had no effect on the sperm quality of the anglonuban goat semen, whereas, in higher concentrations EA (1,0 mM and 2,0 mM) decreases sperm viability.

Key words: Fertility, goat breeding, breeding biotechnology, ROS

1 INTRODUÇÃO

A criopreservação do sêmen é um processo complexo, onde é importante atentar para diversos fatores a fim de obter resultados satisfatórios. Dentre esses fatores, destacam-se a diluição, a criopreservação, descongelação e também a fisiologia do sêmen de cada espécie. O processo de criopreservação de sêmen, além de possibilitar sua utilização por longo período, reduz riscos e custos com a aquisição e transporte de reprodutores; favorece rápida difusão de material genético entre regiões, países e continentes; minimiza a possibilidade de introdução de doenças transmissíveis via sêmen numa região e /ou país e a transmissão e propagação de doenças sexualmente transmissíveis nos rebanhos (TRALDI, 1994).

A criopreservação é um procedimento reconhecidamente deletério para as células espermáticas, por reduzir sua sobrevivência e, por consequência, seu potencial fertilizante (YESTE et al., 2014). Os espermatozoides durante a criopreservação são susceptíveis tanto aos danos peroxidativos, quanto aos danos causados pela desestabilização das proteínas da família das serino proteases, causando uma pré-capacitação induzida pelo frio (PARKS e GRAHAM, 1992).

Os danos peroxidativos induzem à formação de espécies reativas ao oxigênio (ROS), uma das principais causas da redução da viabilidade e da fertilidade dos espermatozoides (HSU et al., 1998), sendo um dos fatores que agem negativamente sobre a célula espermática durante o processo de refrigeração e congelamento do sêmen (CUNHA, 1997).

O estresse oxidativo tem um especial destaque na criopreservação de sêmen caprino, pois o manejo e o contato de criopreservadores associado a uma alta concentração de ácidos graxo poli-insaturados de membrana, proteínas, lipídios e cofatores favorece a formação de espécies reativas de oxigênio e espécies reativas nitrogênio. A reação destas espécies com os ácidos graxos poli-insaturados, presentes nas membranas celulares e nas lipoproteínas, desencadeia o processo denominado peroxidação lipídica ou lipoperoxidação, que pode ser avaliado e utilizado como indicador do estresse oxidativo celular (WILLIAMS e FORD, 2005).

Estudos têm sido desenvolvidos para aprimorar o processo de criopreservação seminal na espécie caprina e assim alavancar a utilização desses animais nos programas de inseminação artificial (IA) e fecundação in vitro (FIV) (DORADO et al., 2009; KÜÇÜK et al., 2014). Com a finalidade de atenuar as injúrias causadas aos espermatozoides, os meios diluidores seminais tornaram-se foco de

pesquisas. Desta forma, diferentes substâncias têm sido adicionadas aos meios no intuito de garantir proteção máxima às células espermáticas (FARSHAD et al., 2009; MEMON et al., 2012; KULAKSIZ et al., 2013).

A suplementação do meio de criopreservação com antioxidantes mostrou proporcionar efeito crioprotetor em touros (BILODEAU et al., 2002; SARZÖZKAN et al., 2009), carneiro (BUCAK et al., 2008), cabra (BUCAK et al., 2009), javali (FUNAHASHI e SANO, 2005) e caninos (MICHAEL et al., 2007). Melhorando os parâmetros do sêmen a exemplo da motilidade espermática e integridade da membrana pós descongelação (BUCAK et al., 2010).

O β -cariofileno (BC) é um sequiterpeno extraído do óleo de copaíba, *Canabis indica*, dentre outros vegetais com varias atividades biológicas. Destacam-se o efeito antibiótico (HO et al., 2011), antioxidante (CALLEJA et al., 2013) e anti-inflamatório (KOBAYASHI et al., 2011).

O interesse pelo estudo do Ácido Elágico (AE) aumentou durante última década, devido às suas propriedades biológicas. Com base em modelos in vitro e de pequenos animais, foi relatado que a AE, é um potente antioxidante, com ação anticarcinogênico e agente antiproliferativo (DEWICK, 2009; GARCÍA-NIÑO; ZAZUETA, 2015; UZAR et al., 2012).

O objetivo deste estudo, portanto, é analisar efeitos antioxidantes da adição de BC isolado e AE em diferentes concentrações no meio de criopreservação avaliando-se a viabilidade espermática e o potencial antioxidante do meio através de diversos testes nos meios suplementados.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Caprinos da raça anglonubiana

Os caprinos anglonubianos pertencem às raças do tronco das cabras Asiáticas Africanas, sendo originária, por volta de 1860, de cabras tipo Nubiana do vale do Alto Nilo, da região de Núbia, no atual Sudão, cruzadas com cabras comuns da Inglaterra após intenso processo de seleção (COUTINHO, 2011).

Dentre as raças exóticas trazidas para o Brasil, a anglonubiana teve o propósito de originar rebanhos de dupla aptidão, além de apresentar elevada rusticidade, quando comparadas às demais. Sendo comum a presença de reprodutores da raça Anglonubiana na maioria dos rebanhos do Nordeste (OLIVEIRA et al., 2009).

É uma raça de aptidão dupla, com boa produção de carne e leite. Apresenta resultados satisfatórios para a produção de carne quando pesquisado sob sistema semi intensivo em especial aos 150 dias de idade quando o ganho de peso é de cerca de 150g/dia (OLIVEIRA et al. 2009), estando ápta à produção de carne quando comparada a outras raças caprinas (MEDEIROS et al. 2001).

São caprinos robustos e de porte grande, com fêmeas pesando em média 60 kg e machos pesando em média 80 kg (SANTOS, 2003). Segundo Garcia et al. (2006), a Raça Anglo Nubiana pode ser utilizada na melhoria da qualidade da carne de caprinos SRD, por meio de conformação e índice de compacidade de carcaça.

2.2 Estrutura espermática

Os espermatozoides são células especializadas, que possui limitada capacidade de reparação (MCKINNON; VOSS, 1993) sendo formados dentro dos túbulos seminíferos dos testículos (FRANDSON, WILKE e FAILS, 2005; CUNNINGHAM; KLEIN, 2008).

O conjunto de plasma seminal e espermatozoide formam o sémen. Os espermatozoides carregam o material genético do reprodutor e são responsáveis por fecundarem os oócitos. Já o plasma seminal é a fração líquida, produzida pelas glândulas acessórias e pelos epidídimos do sistema genital masculino, responsável pela integridade, nutrição e viabilidade dos espermatozoides (CORTELL, 1981).

Os espermatozoides podem ser definidos como células haploides especializadas, que tem uma habilidade limitada para biossíntese e regeneração celular (AMANN e GRAHAM, 1992). Essas células possuem um mecanismo próprio de

maturação altamente sensível e dependente de hormônios hipofisários e gonadais. (PESCH e BERGMANN, 2006).

Desordens na espermatogênese podem ocasionar alterações nos parâmetros dos espermatozoides no ejaculado ou até provocando quadros de infertilidade (HAFEZ, 2004; CUNNINGHAM; KLEIN, 2008; GONÇALVES; FIGUEIREDO; FREITAS, 2008).

Para que seja considerado qualitativamente viável e potencialmente fértil é necessário que, o espermatozoide possua morfologia, atividade metabólica e membranas normais. A presença de membranas íntegras é pré-requisito para que os eventos relacionados ao processo de fertilização, como a capacitação espermática, penetração nos revestimentos do ovócito, ligação à zona pelúcida e fusão com o oócito possam ocorrer (ARRUDA et al., 2005).

2.2.1 Membrana plasmática

A membrana plasmática envolve todo o espermatozoide, constituindo assim o componente mais externo da célula, composta por uma bicamada lipídica com proteínas integrais e periféricas, glicoproteínas de superfície e glicolipídios organizados em um mosaico fluído (SINGER e NICHOLSON, 1972).

É composta principalmente por ácidos graxos poli-insaturados, em especial o ácido decosa-hexanóico (DHA), que são de grande importância celular, pois conferem as características de fluidez, necessária para os eventos associados à fertilização, e permeabilidade à membrana (HAFEZ, 2004; CUNNINGHAM; KLEIN, 2008; GONÇALVES; FIGUEIREDO; FREITAS, 2008). Essa fluidez depende da temperatura, teor de colesterol e seu grau de saturação. Colesteróis saturados garantem maior rigidez, enquanto os insaturados conferem maior fluidez às membranas (OLLERO; POWERS; ALVAREZ, 2000).

Segundo Scott (1973), os tipos de fosfolipídios presentes nos espermatozoides variam consideravelmente de uma espécie para outra. Durante sua fase de maturação no epidídimo, ocorre aumento na proporção de ácidos graxos poli-insaturados dos espermatozoides, devendo ter efeito pronunciado nas propriedades físicas e químicas da membrana lipoproteica (VANDENHEUVEL, 1971). Assim, qualquer mudança que ocorra em cada fosfolipídio, ou na composição de seus ácidos graxos, altera a estrutura e a função da membrana dos espermatozoides (KHOSRO BEYGI e ZARGHAMI, 2007).

As proteínas interligadas com os lipídios são classificadas como integrais ou periféricas. As proteínas integrais são liberadas da membrana apenas por solventes ou detergentes, sendo essenciais para sua estrutura (AMANN e GRAHAM, 1993). As proteínas periféricas, por outro lado, são solúveis em diluidores seminais e água, sendo facilmente removidas. As proteínas integrais agem como poros ou canais através da membrana, como receptores para outras moléculas, ou são encontradas entre as duas bicamadas da membrana (AMANN e PICKETT, 1987).

2.2.2 A cabeça do espermatozoide

A cabeça do espermatozoide, em geral, é constituída por acrossoma e núcleo, sendo o acrossoma uma organela originada a partir do complexo de Golgi e com enzimas hidrolíticas em seu interior, tais como próacrosina, hialuronidase, esterases e hidrolases ácidas. Essas enzimas são liberadas durante o processo de reação acrossomal para que haja a penetração do espermatozoide no oócito (PESCH e BERGMANN, 2006), ou seja, a fertilização, devendo o acrossoma se manter íntegro até que a zona de ligação entre o gameta masculino e o feminino esteja completa (SILVA e GADELLA, 2006).

O acrossoma consiste em uma membrana interna e uma membrana externa que se fundem na parte distal do acrossoma. É dividido em três segmentos diferentes: (a) margem anterior, que é o segmento apical, (b) segmento principal e (c) a porção caudal, que é o segmento equatorial. A junção entre o segmento principal e o segmento equatorial é marcada por uma diminuição abrupta da espessura da capa acrossomal e um aumento considerável na densidade de seu conteúdo. O acrossoma contém enzimas essenciais para a lise da zona pelúcida e penetração da corona radiada do oócito. Essas enzimas são libertadas durante a reação acrossômica (RA), quando a membrana acrossomal externa se funde com a membrana plasmática (ROVAN, 2001).

O constituinte melhor caracterizado do acrossoma é acrosina, um membro da família de serino protease que está presente apenas em células espermáticas. Este tipo de protease difere de outras enzimas em outros tecidos pelo peso molecular, a especificidade do substrato e inibidor específico. (MÜLLER-ESTERL e FRITZ, 1981).

A integridade do acrossoma é essencial para a fecundação e sua avaliação pode ser efetuada logo após a coleta do sêmen ou após teste de resistência osmótica, que consiste em determinar o percentual de acrossomas intactos após incubação em meio hiposmótico. O percentual de acrossomas intactos foi correlacionado com o

tamanho da leitegada e maior percentual de acrossomas intactos foi observado no grupo de ejaculados de alta fertilidade em comparação aos de baixa fertilidade (GADEA, MATAS e LUCAS, 1998).

O núcleo do espermatozoide retém a cromatina condensada com as informações genéticas que irão constituir o genoma de um novo indivíduo, após fertilização, sendo a integridade desta estrutura indispensável para que haja o perfeito desenvolvimento embrionário e para que a gestação seja levada a termo (MORAES et al., 1998). Existem evidências de que os defeitos na estrutura nuclear apresentam correlação positiva com a redução da capacidade fertilizante dos espermatozoides e desenvolvimento de defeitos embrionários precoces (PESCH e BERGMANN, 2006), tornando o potencial de fertilidade das células espermáticas um reflexo do estado de sua cromatina (EVENSON et al., 1999).

2.2.3 O flagelo

A cauda corresponde à parte mais longa do espermatozoide, formada pelas peças intermediária, principal e terminal (SINGH, 2006). A peça intermediária é de estrutura complexa e caracterizada pela presença da bainha mitocondrial (MIES FILHO, 1987; CARVALHO et al., 2002), responsável pela geração da energia utilizada pelo axonema para execução dos movimentos flagelares (CARVALHO et al., 2002; HAFEZ e HAFEZ, 2004; SINGH, 2006), essenciais para que os espermatozoides de mamíferos alcancem o local da fertilização e possam dar início a este processo (PESCH e BERGMANN, 2006).

As mitocôndrias, presentes na bainha mitocondrial, estão enroladas de forma helicoidal em torno das fibras densas exteriores (PAGLIARINI et al., 2008). São responsáveis por aproximadamente 90% da produção de energia celular, que ocorre por meio do processo de fosforilação oxidativa. Sendo responsável pela maior parte da produção endógena de espécies reativas ao oxigênio (ROS), além disso, é considerada a reguladora central da apoptose celular (CÂMARA; GUERRA, 2008). São essenciais na cinética espermática, estabelecendo uma correlação positiva entre sobrevivência e o número de mitocôndrias. Espermatozoides com muitas mitocôndrias possuem maior capacidade de sobrevivência (ROVAN, 2001).

A relação produção/consumo energético mitocondrial versus função espermática apresenta diferenças entre as espécies influenciando sobre a produção, passagem e manipulação dos espermatozoides. Uma vez se estabelecendo a medição

para processamento e armazenamento espermático, é possível estabelecer meios energéticos para maior viabilidade e longevidade para espermatozoides, reduzindo os danos espermáticos após o processo de criopreservação (MORAES e MEYERS, 2018).

Assim, a integridade funcional da mitocôndria é um aspecto importante para a sobrevivência da célula no trato reprodutivo da fêmea durante as técnicas de reprodução assistida (SILVA e GADELLA, 2006).

2.3 Produção das espécies reativas de oxigênio (ROS) e o stress oxidativo

A obtenção de energia pelo metabolismo celular mitocondrial acarreta na formação de subprodutos conhecidos como radicais livres, principalmente os advindos do oxigênio, que são conhecidos como espécies reativas de oxigênio (ROS). De modo geral, as ROS são moléculas que contêm um oxigênio num estado altamente reativo, com uma alta capacidade oxidativa (CARDOSO et al., 2006).

As ROS podem ser produzidas no citoplasma, nas mitocôndrias ou na membrana e o seu alvo celular (proteínas, lipídios, carboidratos e DNA) está relacionado com o seu sítio de formação (YU e ANDERSON, 1997), sendo a principal fonte produtora a cadeia mitocondrial transportadora de elétrons (MOLINA, 2003).

As principais fontes endógenas produtoras de ROS incluem as mitocôndrias e a atividade de algumas enzimas como: xantina oxidase, citocromo P450-oxidase, monoaminoxidases, as enzimas envolvidas na via de produção de prostaglandinas e tromboxanos e a NADPH-oxidase da membrana plasmática de macrófagos, que produzem uma grande quantidade de ROS em resposta ao estímulo fagocitário (HALLIWEL e GUTTERIDGE, 1989; BLAKE, 1995).

Entre as ROS, as mais importantes são o radical hidroxila (OH⁻), o ânion superóxido (O₂⁻), o peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e o óxido nítrico (NO₂) (NICHI, 2003; BARROS, 2007).

O ânion superóxido, gerado a partir de uma molécula de oxigênio pela adição de um elétron, apesar de ser um radical livre, não é altamente reativo, pois não consegue penetrar em membranas lipídicas, ficando restrito ao compartimento onde é produzido. O ânion superóxido parece ser o produto primário do sistema de produção de ROS, gerando o peróxido de hidrogênio após uma reação de dismutase (RODRIGUES, 2009).

A formação de superóxido acontece espontaneamente, especialmente no meio aeróbico, rico em elétrons, próximo à membrana mitocondrial interna, que ocorre devido ao escape de elétrons da cadeia respiratória (NORDBERG; ARNÉR, 2001).

O peróxido de hidrogênio (H_2O_2) não é um radical livre, mas é um metabólito do oxigênio extremamente deletério porque participa como intermediário na reação que produz o radical $OH\cdot$. É gerado a partir da dismutação enzimática do $O_2\cdot^-$ pela superóxido dismutase, tem vida longa e é capaz de atravessar membranas biológicas (MAIA; BICUDO, 2009).

O radical hidroxila é considerado o radical mais reativo em sistemas biológicos, sendo capaz de causar mais danos do que qualquer outra ROS. É formado a partir do peróxido de hidrogênio, em uma reação catalisada por íons metais (Fe^{++} ou Cu^+), denominada reação de Fenton. O $OH\cdot$ reage rapidamente com biomoléculas e pode desencadear a peroxidação dos lipídios na membrana plasmática do espermatozóide (ARUOMA et al., 1989; RODRIGUES, 2009; NICHI, 2003).

O óxido nítrico apresenta aspectos similares ao $O_2\cdot^-$, visto que não reage diretamente com as biomoléculas apesar de seu elétron despareado. O $NO\cdot$ reage facilmente com outros radicais livres, gerando principalmente radicais menos reativos, funcionando então, como um antioxidante. Porém, se $O_2\cdot^-$ for produzido em grandes quantidades paralelamente com o $NO\cdot$, ambos reagem produzindo o peroxidonitrito ($OONO\cdot$), altamente citotóxico (HALLIWELL et al., 1989).

As ROS, em pequenas quantidades, são fisiologicamente necessárias por induzir a cascata de fosforilação da tirosina, associada à capacitação espermática, hiperativação da motilidade, reação acrossomal e fusão dos gametas. No entanto, a geração excessiva de ROS pode subjugar o sistema intracelular de defesa antioxidante do espermatozoide (MAIA e BICUDO, 2009).

Quanto maior for à exposição dos espermatozoides a estas ROS maiores serão os danos, provocando lipoperoxidação da membrana celular, uma deterioração oxidativa dos ácidos graxos poliinsaturados, como também alteração da estrutura dos receptores de proteínas e enzimas (VERNET et al., 2004).

A geração de altas concentrações de espécies reativas de oxigênio no sêmen também é atribuída ao declínio no metabolismo de energia do espermatozóide, na motilidade e viabilidade espermática e à desnaturação do DNA em cavalos, touros, carneiros, bodes e homens (BILODEAU et al., 2002; ARMSTRONG et al., 1999). Os espermatozoides são bastante sensíveis ao ataque das ROS (JONES e MANN, 1977),

por possuírem lipídios altamente insaturados e uma pequena quantidade de citoplasma, tornando-os suscetíveis aos danos peroxidativos (VERNET et al., 2004).

Durante o período de estocagem do sêmen, a produção de ROS tem sido apontada como a principal causa da redução na motilidade, na integridade espermática (VISWANATH e SHANNON, 1997) e no declínio do metabolismo energético (BAUMBER et al., 2002). Os eventos ocorridos durante esse processo envolvem redução da temperatura, desidratação celular, congelação e descongelação (MEDEIROS et al., 2002). Estes procedimentos ocasionam danos celulares devido a mudança na temperatura, formação de cristais de gelo, injúrias oxidativas, alterações na membrana do espermatozoide, lesões no DNA, estresse osmótico além da toxicidade dos crioprotetores (BALL et al., 2002). A conservação de espermatozoides requer uma redução ou atraso do metabolismo das células espermáticas para gerar o prolongamento da sua vida (YOSHIDA, 2000).

2.4 Antioxidantes

Antioxidantes são substâncias que retardam a velocidade da oxidação, através de um ou mais mecanismos, tais como inibição de radicais livres e complexação de metais (PIETTA, 2000), podendo agir diretamente na neutralização da ação dos radicais livres ou participar indiretamente de sistemas enzimáticos com essa função (HALLIWELL e GUTTERDGE, 1999).

O sistema antioxidante representa a defesa dos organismos contra as ROS e é constituído por componentes enzimáticos e não enzimáticos, que atuam conjuntamente na proteção celular. O sistema enzimático é considerado a linha de defesa primária, uma vez que evita o acúmulo do O_2^- e H_2O_2 . Existem também as defesas secundárias que impedem a propagação da lipoperoxidação (LPO), e as terciárias, enzimas de reparo de danos já instalados (YU, 1994).

O espermatozóide conta com um sistema enzimático de defesa antioxidante, que inclui superóxido dismutase (SOD), catalase, glutathione peroxidase (GPx) e glutathione reductase (GR), bem como os antioxidantes não enzimáticos como: ácido ascórbico e alfa-tocoferol (AITKEN, 1994). No meio extracelular, ele é protegido pelo plasma seminal que contém antioxidantes, enzimáticos e não enzimáticos, como o ácido ascórbico, ácido úrico, albumina e outras proteínas, catalase, SOD, glutathione, taurina, hipotaurina e vitamina E (NICHI, 2003).

No entanto, enzimas antioxidantes intracelulares, não conferem proteção total à membrana plasmática que envolve o acrossoma e a cauda, forçando os espermatozoides a suplementarem essa limitada defesa intrínseca, com a proteção conferida pelo plasma seminal, o qual contém antioxidantes enzimáticos (ALVAREZ e STOREY, 1989; ZINI et al., 1993), além de uma variedade de antioxidantes não enzimáticos (SALEH e AGARWAL, 2002).

Os antioxidantes exógenos protegem a célula através da prevenção, da interceptação e do reparo das reações de oxidação (RODRIGUES, 2009).

A prevenção na formação de ROS tem como o principal meio de controle a quelatação de metais de transição, que, por sua vez, ao se desprenderem dos produtos da redução do oxigênio, produzem oxidantes secundários ainda mais reativos como o radical hidroxila (BARROS, 2007).

A interceptação das ROS está relacionada com a quebra da reação que ocorre com os radicais livres para a formação de produtos oxidantes, sendo que essa quebra deve resultar em produtos finais não radicais, ou seja, sem elétrons despareados (NICHI, 2003).

O reparo dos danos causados pelas espécies reativas ao oxigênio, no caso dos espermatozoides, se torna impossível na falta de sistemas de enzimas citoplasmáticas necessárias a essa função (BARROS, 2007; RODRIGUES, 2009).

Substâncias antioxidantes têm sido adicionadas a diluentes do sêmen, com o objetivo de reduzir os danos oxidativos causados pela elevada concentração de ROS em amostras de sêmen de bovinos (BECONI et al., 1993; BILODEAU et al., 2001; FOOTE et al., 2002), ovinos (MAXWELL e STOJANOV, 1996; UPRETI et al., 1997), caprinos (SINHA et al., 1996), suínos (PEÑA et al., 2003; ROCA et al., 2004), equinos (BALL et al., 2001; SILVA et al., 2006) e caninos (COLETO et al., 2006). No entanto, resultados contraditórios têm sido observados com o uso destas substâncias na preservação da viabilidade espermática do sêmen in natura, refrigerado e congelado, em virtude da divergência do tipo e da concentração do antioxidante utilizado (MAXWELL e STOJANOV, 1996; UPRETI et al., 1997; DONNELLY et al., 1999).

Estudos demonstraram efeito positivo da adição de Glutathione ao sêmen equino (BALL et al., 2001), caprino (SINHA et al., 1996) e bovino (SLAWETA et al., 1988). Em carneiros, Maxwell e Stojanov (1996) ressaltaram que antioxidantes hidrossolúveis (SOD, CAT, Citocromo c e Glutathione peroxidase) foram hábeis em

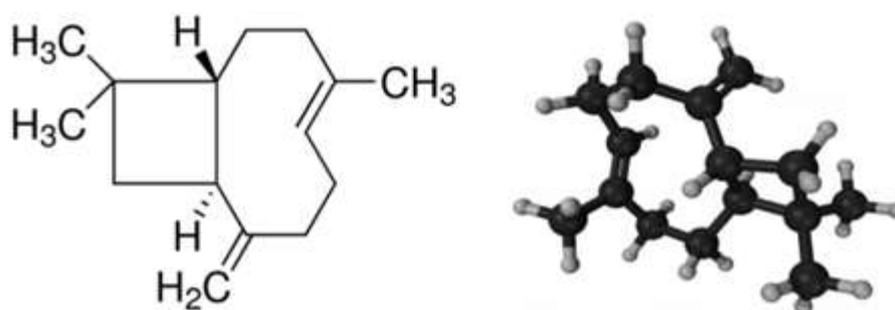
preservar a sobrevivência e a integridade do acrossoma dos espermatozoides durante a refrigeração.

Ressalta-se, entretanto, que apesar da importância dos antioxidantes enzimáticos na proteção contra os danos oxidativos aos espermatozoides, muitas pesquisas também utilizam substâncias antioxidantes não enzimáticas, como taurina, trealose, selênio e compostos surfactantes, visando aumentar a motilidade, a viabilidade e a integridade da membrana dos espermatozoides (EL-ALAMY e FOOTE, 2001; AISEN et al., 2002).

Dentre os antioxidantes não enzimáticos utilizados na composição dos diluentes de sêmen destaca-se a trealose, que é um dissacarídeo que possui ação protetora contra o efeito osmótico e interação específica com fosfolípidos da membrana, tornando o meio hipertônico, causando desidratação da célula antes da congelação e reduzindo a quantidade de injúria celular determinada pela cristalização do gelo (SCHMEHL et al., 1986; STOREY e NOILES, 1998). A taurina é um dos aminoácidos presentes na composição do fluido epididimário, possuindo ação protetora contra o acúmulo de ROS em casos de exposição a condições aeróbicas e ao processo de congelação/descongelação (HOLMES et al., 1992; ALVAREZ e STOREY, 1983; CHEN et al., 1993).

2.5 β -cariofileno

Também conhecido com trans cariofileno (Figura 1), o β -cariofileno (BCP), está presente como componente de óleos essenciais de inúmeros vegetais e em diferentes concentrações. É o composto majoritários do óleo de copaíba e participa da composição dos óleos de manjeriço (*Ocimum* spp), canela (*Cinnamomum zeylanicum*), lavanda (*Lavandula angustifolia*), maconha (*Cannabis sativa*), orégano (*Origanum vulgare*), pimenta-do-reino (*Piper guineense*) e alecrim (*Rosmarinus officinalis*). Com características organolépticas marcantes, possui um odor amadeirado e picante e devido a estas propriedades tem sido empregado no preparo de produtos de panificação, condimentos, doces e bebidas alcólicas e não-alcólicas (VARGA et al., 2017).

Figura 1: Estrutura química e molecular do β -cariofileno

Fonte: ZEBELO *et al.* (2012).

Presente em espécies de plantas medicinais de uso comum no Brasil, o β -cariofileno é um constituinte importante e o seu percentual varia de acordo com a parte da planta em que foi retirado. Leite *et al.* (2013) avaliaram o potencial antiparasitário *in vitro* de um terpenóide componente de óleo essencial, o β -cariofileno e o eugenol, contra as formas epimastigota e promastigota de *T. cruzi* e *L. brasiliensis*, respectivamente, bem como verificar sua citotoxicidade em células de mamíferos.

Na literatura, atividades farmacológicas destacam-se com estudos *in vitro*, dentre elas, podemos citar a atividade antiproliferativa (LOIZZO *et al.*, 2008), anestésica (GHELARDINI *et al.*, 1999), antiviral (DUKINC; BENZIC; VUKO, 2011), antifúngica (HO *et al.*, 2011), antibacteriana (SHAFAGHAT, 2011), anti-inflamatória (KOBAYASHI *et al.*, 2011), antioxidante (CALLEJA *et al.*, 2013) e os efeitos neuroprotetores em modelos de isquemia cerebral (CHOI *et al.*, 2013), convulsão (LIU *et al.*, 2015), hipóxia em células da glia (GUO *et al.*, 2014), doença de Alzheimer (CHENG *et al.*, 2018) e depressão (OLIVEIRA, 2016).

Dentre suas características físico-químicas, a baixa solubilidade em água é a mais citada, o que sugere sua elevada afinidade pela membrana celular e capacidade de transposição da barreira hematoencefálica (FIDYT *et al.*, 2016). Como resultado do seu amplo emprego, a toxicidade do beta-cariofileno vem sendo estudada *in vivo* e *in vitro*. Esta substância, atualmente, é considerada não mutagênica, não genotóxica e a dose letal oral aguda (DL50) em ratos é relatada como maior que 5000 mg/kg de peso corporal (SCHMITT; LEVY; CARROLL, 2016).

Estudos como o de Cheng *et al.* (2014) e Ojha *et al.* (2016) demonstraram os efeitos neuroprotetores, antioxidantes e anti-inflamatórios do BCP em modelos de Parkinson e Alzheimer, respectivamente. Essas atividades foram evidenciadas por meio

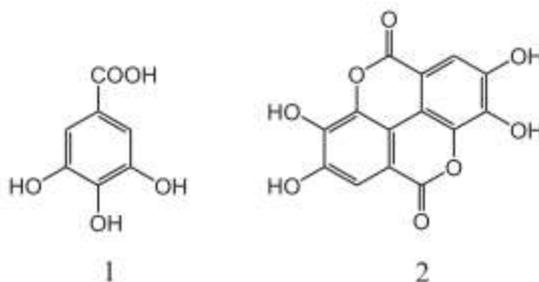
da atenuação do estresse oxidativo, inibição da peroxidação lipídica e redução dos níveis de citocinas pró inflamatórias e mediadores inflamatórios. Estes achados são associados ao fato de que o BCP é um agonista seletivo dos receptores canabinóides tipo 2 (CB2) (CARDOSO, 2018).

2.6 Ácido elágico

Dentre os fitoquímicos estudados, os compostos fenólicos denominados polifenóis se destacaram devido sua atividade antioxidante, anti-inflamatória, antimutagênica e anticarcinogênica (PRIOR, 2003).

O ácido elágico (AE) é um bisfenol pertencente ao grupo dos taninos hidrolisáveis. É uma molécula planar que contém quatro grupos hidroxila e dois grupos lactona (figura 2). É um dímero do ácido gálico. (BARCH et al, 1996). Pode ser encontrado na forma livre ou glicosilada (glicose, ramanose e arabinose), porém em baixas quantidades. É de ocorrência natural comumente encontrado em morango, romã, uvas muscadine, castanhas, amora silvestre e framboesa. Os AE glicosilados são formados a partir do chiquimato, onde os grupos hidroxila do açúcar são esterificados com os ácidos fenólicos (MONTEIRO et al, 2005).

Figura 2: ácido gálico (1) e ácido elágico (2)



Fonte: BARCH et al., 1996.

Nas plantas, os polifenóis são formados a partir do metabolismo secundário, atuando na proteção contra a incidência de raios ultravioletas e patógenos. Estudos evidenciam que o consumo de alimentos ricos em compostos fenólicos previne o desenvolvimento de diversas patologias, tais como o câncer, doenças cardiovasculares e neurodegenerativas (MANACH et al., 2004). Os efeitos farmacobiológicos são associados a uma ação antioxidante direta, seja ela por mecanismos sequestrador de radicais livres ou por mecanismo quelante de íons metálicos (PERRON e BRUMAGHIM, 2009).

Entretanto, estudos mais recentes mostram que os polifenóis poderiam se ligar à proteínas e afetar a atividade de enzimas, estimular a síntese de glutatona e regular a transdução de sinal por meio da modulação de fatores de transcrição, tais como Nfr2, NF- κ B e AP-1. Age de forma indireta estimulando (JAKOBS et al., 2006; ANDREADI et al., 2006; VIRGILI e MARINO, 2008)

O ácido elágico possui atividade antioxidante comprovada, entretanto, com mecanismo de ação ainda não elucidado. Estudos demonstram que essa atividade atua em várias frentes, desde de sequestro de espécies reativas de oxigênio, nitrogênio e radical peroxil até a formação de complexos insolúveis com íons metálicos Fe²⁺, Fe³⁺, Cu²⁺, Zn²⁺ e Co²⁺ (DALVI, 2014). Importante ressaltar, que 1 μ M de AE promove efeito citoprotetor em estudos *in vitro* (LABIENIEC e GABRYELAK, 2007).

2.7 Criopreservação espermática

A criopreservação permite o armazenamento de material genético por tempo indeterminado sob baixas temperaturas (CARDOSO et al., 2005). Esse processo é constituído de diluição, refrigeração, congelação, armazenamento e descongelação (HAMMERSTEDT; GRAHAM; NOLAN, 1990).

Os procedimentos de criopreservação do sêmen de muitas espécies são considerados ineficientes, em decorrência de grande número de células espermáticas tornarem-se aparentemente inférteis após a congelação/descongelação. Comparado ao sêmen fresco, por exemplo, uma quantidade oito vezes maior de células espermáticas criopreservadas de bovinos são necessárias para se obter a mesma taxa de fertilidade (SHANNON e VISHWANATH, 1995).

Para o sucesso da fertilização é necessário a disponibilidade de gametas viáveis e funcionalmente normais, tanto *in vivo* quanto *in vitro*. A criopreservação de gametas e embriões tornou-se um procedimento complementar e essencial para a aplicação de biotécnicas como inseminação artificial, fertilização *in-vitro*, transferência de embriões e engenharia genética (PARKS, 1985).

Acredita-se que as injúrias causadas pelo procedimento de criopreservação interfiram no transporte e na sobrevivência espermática no sistema genital da fêmea (SALAMON e MAXWELL, 1995). A membrana plasmática do espermatozoide é considerada o local primário de danos durante a criopreservação (WATSON, 1995). Alguns estudos têm demonstrado que o efeito osmótico e da temperatura, determinados pelos procedimentos de congelação e descongelação, induzem grandes alterações no

volume de água da célula, resultando em considerável estresse mecânico nas membranas celulares (NOILES et al., 1995).

Verificou-se que o procedimento de criopreservação afeta a composição lipídica e organizacional da membrana plasmática dos espermatozoides, determinando assimetria dessa bicamada fosfolipídica, resultando em danos ultra-estruturais e predispondo os espermatozoides a defeitos morfológicos, como perda ou anormalidade do acrossoma (HINKOVSKA-GALCHEVA et al., 1989).

A criopreservação de sêmen é um processo complexo, a qual inviabiliza a sobrevivência de uma proporção de espermatozoides, sendo importante atentar para diversos fatores a fim de obter resultados satisfatórios, e compreender as causas de crioinjúrias, é fator fundamental para alcançar melhores resultados neste processo. Vários estudos demonstraram que a criopreservação produz mudanças na sobrevivência de espermatozoides (ALHAIDER e WATSON, 2009).

Apesar da preservação da motilidade, espermatozoides criopreservados exibem danos na membrana plasmática (CHECK e CHECK, 1991), que afetam os processos de capacitação e hiperativação espermática, bem como de fertilização (WATSON, 1995). As modificações na distribuição e nos componentes da membrana espermática, ocasionam desestabilização semelhante àquela que ocorre no processo de capacitação espermática, e podem ser devido ao processamento do sêmen ou a composição dos diluidores (PÉREZ et al., 1996). A criopreservação antecipa a maturação das membranas espermáticas, aumentando a proporção de espermatozoides capacitados ou com o acrossomo reagido, quando comparados aos do sêmen in natura (MAXWELL e WATSON, 1996). Como consequência, reduz a sobrevivência espermática em virtude das células capacitadas serem precocemente ativadas e morrerem em curto período de tempo, antes de atingirem o local de fertilização (WATSON, 1995). Por conseguinte, os danos ocorridos durante a criopreservação dependem da estabilidade estrutural da membrana plasmática dos espermatozoides (De LEEUW et al., 1993).

Desta forma, esta biotécnica tem por intuito preservar a principal função espermática, que é a fecundação do oócito, por meio do qual requer que as amostras de espermatozoides sejam submetidas à refrigeração moderada e controlada (HOLT, 2000), pois o controle da temperatura diminui a possibilidade de perda da viabilidade celular, por diminuir a formação de grandes cristais de gelo no interior da célula (KUMAR et al., 2003).

Entre espécies, as diferenças na sensibilidade espermática observadas durante o procedimento de refrigeração são amplamente atribuídas à variação na composição da membrana, como, por exemplo, a relação entre ácidos graxos saturados e insaturados (NOILES et al., 1995). Durante os procedimentos de criopreservação, a irreversível redução na motilidade, na integridade morfológica e na capacidade fertilizante dos espermatozoides pode também ser determinada pelo acúmulo de produtos tóxicos do metabolismo celular ou, principalmente, pelo aumento da produção de ROS decorrente da redução do oxigênio, como por exemplo, radical hidroxila e o peróxido de hidrogênio (MISRA e FRIDOVICH, 1972; WANG et al., 1997; BAUMBER et al., 2003).

2.7.1 Meios diluidores e crioprotetores

O sêmen é muito sensível a variações de temperatura e pH. Nesse contexto as propriedades físico químicas do meio diluidor vai ter forte influência sobre este. Substancias presentes nos meios, atuarão como agentes protetores e fornecerão as condições necessárias para sobrevivência desse espermatozóide ejaculado. Fornecem energia, tamponam o pH, a osmolaridade, o equilíbrio eletrolítico, tornam-se essenciais (AISEN, 2008).

Os meios para criopreservação do sêmen caprino são constituídos à base de citrato de sódio, gema de ovo, lactose, água de coco, Tris e leite bovino desnatado em pó e reconstituído por um crioprotetor interno ou penetrante (glicerol, etilenoglicol ou dimetil sulfóxido), sais (citrato de sódio ou ácido cítrico) e antibióticos (penicilina ou estreptomicina) (PURDY, 2006).

Os crioprotetores podem ser classificados em externos ou não penetrantes ou internos ou penetrantes. Os externos são substâncias constituídas por macromoléculas, lipídios e proteínas que não atravessam a membrana plasmática. As mais utilizadas são gema de ovo, leite, carboidratos (glicose, frutose, lactose, sacarose, manose, rafinose, trealose), polímeros sintéticos (polivinilpirrolidona e metilcelulose) e albumina sérica bovina (HOLT, 2000; LEBOEUF et al., 2000). Essas substâncias tornam o meio hipertônico com o aumento da osmolaridade do meio extracelular, permitindo assim a passagem da água do interior da célula espermática para o meio extracelular, impedindo, desta forma, a formação de cristais de gelo no interior na célula durante a criopreservação (GONZALEZ, 2004).

A gema de ovo é um diluente usado rotineiramente na criopreservação de sêmen dos animais domésticos, como podemos observar na maioria dos meios comerciais. O efeito protetor da gema de ovo sobre a membrana plasmática da célula espermática deve-se à presença das frações lipoproteicas de baixa densidade na sua composição. A lipoproteção com relação ao choque térmico parece estar relacionada à quelação do íon Ca^{+2} do meio, evitando sua entrada no espermatozóide. É possível que os lipossomas interajam com o cálcio e outros componentes do meio de congelação que afetem a tonicidade ou a fração da água não congelada durante a criopreservação (WILHELM et al., 1996).

Os citoprotetores internos ou penetrantes são formados por moléculas com a capacidade de atravessar a membrana plasmática atuando também atuam no meio extracelular, diminuindo as lesões química ou mecânica que a congelação provoca no espermatozóide. Possuem funções coligativas, atuando sobre o ponto crioscópico intracelular, causando uma diminuição e permitindo assim a permanência da água no estado líquido sob baixas temperaturas. Além de diminuir a água intracelular e, conseqüentemente, o tamanho e o número de cristais de gelo (WATSON, 2000). São classificados em dois grupos: os álcoois (etanol, glicerol, etilenoglicol, entre outros) e as amidas (MEDEIROS et al., 2002).

O glicerol é o crioprotetor de maior eleição para a criopreservação do sêmen caprino (LEBOEUF et al., 2000). O seu mecanismo de ação se dá pela redução da concentração do soluto nos meios intra e extracelulares, diminuindo a formação e tamanho de cristais de gelo (DALIMATA e GRAHAM, 1997).

2.8 Avaliação espermática

2.8.1 Integridade da membrana plasmática

A membrana plasmática possui um importante papel nos processos de capacitação e fertilização do oócito e sua constituição bioquímica é um dos principais pontos de interesse do estudo da fisiologia e patologia espermática. Teorias sobre a fusão de membranas (oócito/espermatozóide) sugerem que sua fluidez é pré-requisito para a função normal da célula (BARROS, 2007). É responsável ainda, pela manutenção do equilíbrio osmótico e atua como uma barreira mantendo, assim, diferenças de composição entre os meios intra e extracelulares (NICHII, 2003).

Para avaliação da integridade da membrana plasmática, sondas com afinidade por DNA são utilizadas. Uma vez lesionada a membrana, a sonda atravessa esta estrutura e cora o núcleo, rico em DNA. Em revisão de Silva e Gadella (2006), foram listadas diferentes sondas utilizadas com esta finalidade: Hoechst 33258, YoPro-1, Iodeto de Propídeo (IP), Etídio Homodimérico-1, ToPro-3 e TOTO. Outra forma de avaliar a integridade da membrana é fazer uso de sondas classificadas como anfipáticas, que conseguem atravessar a membrana intacta e se ligar às esterases, identificando a célula como viável, como no caso do Diacetato de Carboxifluoresceína (DCF) e do SYBR-14®. Segundo Medina et al. (2000), o DCF é um éster não polar, não fluorescente e permeável à membrana plasmática. Dentro da célula é hidrolisado por esterases inespecíficas, resultando em um composto fluorescente e impermeável à membrana plasmática intacta que fluoresce em verde.

Geralmente faz-se associação destas sondas com outra que tenha afinidade com DNA, como o IP, onde são obtidos resultados confiáveis para identificar a preservação da membrana plasmática de espermatozoides, uma vez que a membrana íntegra cora em verde, pela ligação do DCF às esterases e a lesionada cora a região nuclear em vermelho pela ligação do IP ao núcleo celular (COLETO et al., 2002). Peterson et al. (2007), usando uma combinação de sondas fluorescentes (SYBR-14®/IP) presentes em um kit comercialmente vendido como LIVE/DEAD (Molecular Probes Inc., Eugene, OR, USA) na avaliação de sêmen de caprinos da raça Saanen, concluíram existir correlação entre a proporção de células com membranas intactas e a quantidade de espermatozoides móveis armazenados a 18 °C ($r= 0,77$) e 4 °C ($r= 0,98$), sendo 4 °C a temperatura de conservação espermática indicada, visto que apresentou melhores índices de preservação das membranas dos espermatozoides caprinos.

2.8.2 Integridade do Acrossoma

O acrossomo é um dos principais componentes da célula espermática, visto ser ele o responsável pela fusão do espermatozóide com o oócito (BARROS, 2007).

Uma revisão sobre a avaliação da integridade do acrossoma destacou-se que as lectinas podem ser utilizadas, uma vez que são capazes de ligar-se a carboidratos existentes exclusivamente nas glicoproteínas da membrana acrossomal. Substâncias geralmente derivadas da ervilha da espécie *Pisum sativum* (PSA) e do amendoim da espécie *Arachis hypogaea* (PNA), assim como a Concanavalina A (ConA), uma lectina D-glucose/D-manose ligante extraída de sementes da forrageira *Canavalia ensiformis*,

são associadas à fluoróforos, para permitir sua visualização ao microscópio de imunofluorescência, sendo mais utilizado o Isocianato de Fluoresceína (FITC) (SILVA e GADELLA, 2006).

Estas lectinas possuem diferentes locais de atuação, como a PNA que se liga aos glicoconjugados da membrana acrossomal externa e as PSA e ConA que apresentam afinidade pela membrana acrossomal interna, mais especificamente aos grupos sacarídeos da glicoproteína pró-acrosina (HOLDEN et al., 1990). Desta forma, no caso do uso das PSA e ConA, quando a membrana plasmática está intacta, não há fluorescência. Entretanto, quando a membrana plasmática está lesionada, como nos casos de fixação da célula espermática, observa-se fluorescência na região do acrossoma (SILVA e GADELLA, 2006).

Kitiyant et al. (2002), usando FITC-PNA e ethidium homodimer-1 (EthD-1) para avaliar reação acrossomal induzida com heparina e cálcio ionóforo em sêmen criopreservado de búfalo, obtiveram 78% de espermatozoides vivos com acrossoma intacto e 9% de reação acrossomal verdadeira, enquanto usando FITC-PNA/TBG, obtiveram 80% de vivos e 10% de reação acrossomal verdadeira, tanto pela heparina quanto pelo cálcio ionóforo. Além disso, alta correlação foi observada entre as duas técnicas de coloração ($r > 0,90$), reforçando a capacidade do FITC-PNA em avaliar a ocorrência de reação acrossomal. Em contrapartida, Prathalingam et al. (2006), avaliando a integridade do acrossoma com FITC-PNA/IP, encontraram $1,16 \pm 0,9\%$ de reação acrossomal verdadeira em sêmen de touro pós-descongelamento.

2.8.3 Atividade Mitocondrial

Diferentes sondas fluorescentes têm sido utilizadas para avaliar a função mitocondrial espermática. Estas sondas são ativamente transportadas nas mitocôndrias que possuem respiração ativa. Portanto, quanto mais ativa a respiração mitocondrial, mais corante é acumulado nesta organela (GRAHAM e MOCÉ, 2005).

Diferentes sondas fluorescentes têm sido utilizadas para avaliar a função mitocondrial espermática. Garner et al. (1997) testaram a ação dos fluoróforos Rodamina 123 (R123), JC-1 e MitoTracker™ (MITO) para avaliar a função mitocondrial da célula espermática de bovinos e identificaram que a sonda JC-1 foi eficaz na classificação do potencial da membrana mitocondrial. As sondas mitocondriais são ativamente transportadas nas mitocôndrias com a respiração ativa.

Portanto, quanto mais ativa a respiração mitocondrial mais corante é acumulado nestas organelas (GRAHAM e MOCÉ, 2005).

As sondas R123 e MITO são transportadas nas mitocôndrias que apresentem respiração ativa e o acúmulo destas substâncias faz com que a peça intermediária floresça na coloração verde. Todas as mitocôndrias funcionais coram-se em verde com R123 e MITO, não havendo diferença entre as taxas respiratórias exibidas pelos espermatozoides (SILVA e GADELLA, 2006).

Em contrapartida, o JC-1 apresenta diferenças quanto à coloração, uma vez que em concentrações mais baixas permanece no seu estado monomérico e fluoresce em verde, enquanto em concentrações elevadas o JC-1 forma agregados que fluorescem na cor laranja. Portanto, o JC-1 não apenas tem a habilidade para distinguir mitocôndria funcional, mas permite que os diferentes níveis de função mitocondrial sejam diferenciados pela intensidade da cor laranja na mitocôndria (GUTHRIE e WELCH, 2006).

Hemachand e Shaha (2003), trabalhando com espermatozoides caprinos obtidos do epidídimo ou do ejaculado, submetidos a estresse oxidativo, relataram haver relação entre o padrão de coloração com o JC-1 e a motilidade espermática. Por sua vez, Marco-Jiménez et al. (2006) mostraram que o processo de congelação/descongelação de espermatozoides caprinos da raça Murciano-granadina determina considerável redução do número de células com alto potencial mitocondrial (59,0 vs. 27,7%), utilizando-se o JC-1.

2.8.4 Análise computadorizada do sêmen

Os movimentos dos espermatozoides não seguem um padrão único. Apresentam movimento progressivo, movimento circular, ou simplesmente se limitam a oscilar no campo microscópico (movimento oscilatório) (SALVIANO e SOUZA, 2008). A análise convencional, feita em microscopia óptica através da observação de uma gota seminal colocada sob lamínula, limita-se a analisar o percentual de espermatozoides móveis. Através da análise espermática assistida por computador (CASA) é possível avaliar qualitativamente este movimento (MACK et al., 1988).

Através de videomicrografia, captada através de uma câmera acoplada a um microscópio, é feita análise sequencial e monitoramento do movimento individual de cada célula espermática (AMANN e KATZ, 2004). O software reconhece os espermatozoides e desenha para cada célula uma sequência completa do movimento

para reconstituir sua trajetória, classificando-a conforme os padrões definidos como: móvel não progressivo, linear lento, linear rápido e imóvel (MORTIMER, 2000).

O software ainda caracteriza o movimento em: velocidade curvilínea (VCL), velocidade média da trajetória (VAP), velocidade linear progressiva (VSL), retilinearidade (STR) e linearidade (LIN).

CAPÍTULO I*

* Apresentado segundo normas da revista Brazilian Academy of Sciences (ABC)

1 **Suplementação de β -cariofileno ao tris-gema na criopreservação de sêmen caprino**

2 *MARINA REBECA SOARES CARNEIRO DE SOUSA*¹, *ANTONIO DE SOUSA*

3 *JÚNIOR*², *MARLON ARAUJO CASTELO BRANCO*³, *EMANUELLA RIBEIRO*

4 *MOURA*⁴, *AMILTON PAULO RAPOSO COSTA*⁵

5 ¹ Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Universidade Federal do Piauí,

6 Campus Universitário Ministro Petrônio Portela, Bairro Ininga, CEP: 64049-550 -

7 Teresina – PI, Telefone: (86) 3215-5753.

8 ² Colégio Técnico de Teresina- PI - Universidade Federal do Piauí, Campus

9 Universitário Ministro Petrônio Portela, Bairro Ininga, CEP: 64049-550 - Teresina – PI,

10 Telefone: (86) 3215-5753.

11 ³ Centro de controle de zoonoses de Teresina – Piauí, R. Minas Gerais, 909 - Acarapé,

12 CEP: 64003-850 - Teresina – PI, Telefone: (86) 32159144.

13 ⁴ Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Universidade Federal do Piauí,

14 Campus Universitário Ministro Petrônio Portela, Bairro Ininga, CEP: 64049-550 -

15 Teresina – PI, Telefone: (86) 3215-5753.

16 ⁵ **Departamento de Morfofisiologia Veterinária (DMV)**, Centro de Ciências Agrárias

17 (CCA), Universidade Federal do Piauí (UFPI), Campus Universitário Ministro Petrônio

18 Portela, Bairro Ininga, CEP: 64049-550 - Teresina – PI.

19 Palavras-Chave: antioxidante, β -cariofileno, caprino, ROS, sêmen.

20 An. Acad. Bras. Ciênc. Seção: Ciências Biológicas

21 Autor correspondente: Marina Rebeca Soares Carneiro de Sousa

22 Email: marinacsousa1@hotmail.com

23

24 Abstract

25 Biotechniques of reproduction such as semen freezing may add genetic
26 improvement. However, oxidation reactions lower the rate of sperm viability after
27 thawing. β -caryophyllene is a sesquiterpene with biological activities, with emphasis on
28 anti-inflammatory and antioxidant activity. The objective of this study was to analyze
29 antioxidant effects and sperm viability of cryopreserved goat semen in egg-yolk
30 supplemented with different concentrations of β -caryophyllene. Weekly collections
31 were carried out for seven weeks, totaling seven ejaculates of goats of the Anglonubian
32 breed by collection. After evaluation and formation of the pool, it was divided into four
33 aliquots, corresponding to the respective treatment group: 0mM (control), 1.0mM (B1),
34 2.0mM (B2) and 3.0mM (B3). Plasma membrane integrity, acrosomal integrity,
35 mitochondrial membrane potential, sperm kinetics (CASA), Thermo Resistance Test
36 (TTR) and detection of oxygen reactive species (ROS) were evaluated. The results were
37 submitted to analysis of variance (ANOVA) and Kruskal Wallis test for the non-
38 parametric results. There were no significant differences ($p < 0.05$) in relation to the
39 control, among the results obtained for the variables and treatments studied after
40 thawing. The supplementation of the β -caryophyllene concentrations adopted in this
41 study to the egg-yolk diluent had no effect on the spermatic quality of the Anglonuban
42 goat semen.

43 Key words: antioxidant, goat, ROS, spermatozoa

44 **Introdução**

45 O processo de criopreservação de sêmen, além de possibilitar sua utilização por
46 longo período, reduz riscos e custos com a aquisição e transporte de reprodutores;
47 favorece rápida difusão de material genético entre regiões, países e continentes;
48 minimiza a possibilidade de introdução de doenças transmissíveis via sêmen numa
49 região e /ou país e a transmissão e propagação de doenças sexualmente transmissíveis
50 nos rebanhos (Traldi, 1994).

51 O estresse oxidativo tem um especial destaque na criopreservação de sêmen
52 caprino, pois o manejo e o contato de criopreservadores associado a uma alta
53 concentração de ácidos graxo poli-insaturados de membrana, proteínas, lipídios e
54 cofatores favorece a formação de espécies reativas de oxigênio (ROS) e espécies
55 reativas nitrogênio. A reação destas espécies com os ácidos graxos poli-insaturados,
56 presentes nas membranas celulares e nas lipoproteínas, desencadeia o processo
57 denominado peroxidação lipídica ou lipoperoxidação, que pode ser avaliado e utilizado
58 como indicador do estresse oxidativo celular (Williams e Ford, 2005).

59 A suplementação do meio de criopreservação com antioxidantes mostrou
60 proporcionar efeito crioprotetor em diversas espécies, melhorando os parâmetros do
61 sêmen a exemplo da motilidade espermática e integridade da membrana pós
62 descongelção (Bucak et al., 2010a).

63 O β -cariofileno é um metabolito secundário presente nos vegetais classificado
64 como sequiterpeno. Possui atividade antioxidante (Calleja et al., 2013), e está presente
65 em diversas plantas, tais como o manjericão (*Ocimum spp*), canela (*Cinnamomum*
66 *zeylanicum*), lavanda (*Lavandula angustifolia*), maconha (*Cannabis sativa*), orégano
67 (*Origanum vulgare*), pimenta-do-reino (*Piper guineense*) e alecrim (*Rosmarinus*
68 *officinalis*) (Fidyt et al., 2016; Varga et al., 2017).

69 Nesse contexto a adição de β -cariofileno isolado em diferentes concentrações no
70 meio tris-gema de criopreservação é o foco desse estudo, tendo como objetivo analisar
71 efeitos antioxidantes e viabilidade espermática do sêmen caprino pós descongelação.

72 **Material e Métodos**

73 Todos os procedimentos realizados com os animais estavam em conformidade
74 com a legislação brasileira em pesquisa animal (Lei 11.794 de 08 de outubro de 2008).
75 O procedimento descrito neste artigo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de
76 Animais (CEUA) da Universidade Federal do Piauí (UFPI) sob o protocolo de N°
77 460/18.

78 *Diluidores, reagentes e meio*

79 O diluidor Tris-Gema constituído a partir de 3,605 g de Tris; 2,024 g de ácido
80 cítrico; 1,488g de frutose; 25 mg de gentamicina; 50.000 UI de penicilina; 100mL de
81 água destilada; 20% de gema de ovo e 5% de glicerol, com osmolaridade de ~350
82 mOsm/kg e pH 6,8, foi utilizado para diluição e congelamento do sêmen. O β -
83 cariofileno e todos os demais produtos químicos foram obtidos a partir da Sigma-
84 Aldrich® (St. Louis, MO, USA).

85 Quatro diluidores experimentais diferentes foram preparados na seguinte
86 disposição: Controle (0 mM), B1 (β -cariofileno concentração 1,0mM), B2 (β -
87 cariofileno concentração 2,0mM), B3 (β -cariofileno concentração 3,0mM, adicionados
88 ao Tris-Gema.

89 *Animais*

90 Foram utilizados seis caprinos machos e uma fêmea, provenientes de
91 propriedade particular localizada no município de David Caldas-PI, com idade média de
92 dois anos, da raça Anglonubiana e com escore de condição corporal 3-4 (escala 1-5).

93 Todos os animais tiveram histórico de fertilidade comprovada e foram avaliados quanto
94 à saúde geral, à integridade dos órgãos reprodutivos e à qualidade espermática.

95 *Coleta de sêmen e avaliação inicial*

96 As coletas de sêmen foram realizadas durante os últimos meses da estação com
97 baixo índice pluviométrico e durante os últimos meses de estação chuvosa em seis
98 animais, totalizando sete coletas.

99 As coletas foram realizadas com o auxílio de uma cabra sabidamente em cio e o
100 uso de vagina artificial, utilizando um tubo de ensaio graduado de 15mL, estéril e
101 devidamente protegido com uma folha de papel alumínio para evitar a exposição do
102 sêmen à luz.

103 Após a coleta as amostras de sêmen de cada animal foram colocadas em banho
104 Maria a 37 °C e avaliadas separadamente quando cor, aspecto, volume (mL),
105 turbilhonamento (0-5), motilidade total (%) e vigor espermático (1-5), em microscópio
106 de contraste de fase (Olympus optical Co., Ltda., 163 Tóquio, Japão).

107 A concentração espermática foi obtida em câmara de Neubauer, na diluição de
108 1:200, em solução de citrato de sódio em formol a 4 %. Para análise da morfologia
109 espermática, foi utilizado o método de câmara úmida, segundo o Colégio Brasileiro de
110 Reprodução Animal (Cbra 2013). Apenas ejaculados com turbilhonamento ≥ 3 ;
111 motilidade total $\geq 80\%$; vigor ≥ 3 ; concentração espermática $\geq 3,5 \times 10^9$
112 espermatozoides/mL e patologias espermáticas $\leq 20\%$ foram utilizados nesse estudo.

113 Quando aprovadas, amostras dos seis ejaculados foram misturadas para
114 formação de um pool, objetivando aumentar o volume do sêmen e eliminar a
115 variabilidade. Logo após a formação do pool, este foi dividido em 4 alíquotas,
116 correspondentes ao grupo tratamento respectivo.

117 *Criopreservação do sêmen*

118 O pool de sêmen previamente avaliado e aprovado foi diluído em meio Tris-
119 Gema (37°C) contendo β -Cariofileno (1,0mM, 2,0mM ou 3,0mM), enquanto que uma
120 alíquota sem nenhuma suplementação foi mantida como controle. O sêmen diluído foi
121 envasado em palheta de 0,25mL (50×10^6 espermatozoides viáveis por palheta) e
122 congelado em maquina TK 3000® (TK Tecnologia em congelação Ltda., Uberaba,
123 Brasil), na curva de congelação rápida (-0,5° 182 C/min, de 25° C a 5° C e -20° C/min,
124 de 5° C a -120° C) e, após atingir -120° C, as palhetas foram mergulhadas em nitrogênio
125 líquido (-196° C) e armazenadas em botijão criogênico.

126 O tempo de equilíbrio na temperatura de 5° C foi de 60 minutos. Após 30 dias de
127 armazenamento as amostras de sêmen foram descongeladas em banho-maria a 37°C por
128 30 segundos e avaliadas quanto à integridade da membrana plasmática, integridade do
129 acrossoma, função mitocondrial, cinemática espermática e teste de termo resistência
130 (TTR).

131 *Análise da integridade da membrana plasmática*

132 Para avaliação da integridade da membrana plasmática, utilizou-se o método de
133 coloração dupla com diacetato de carboxifluoresceína (DCF; Sigma-Aldrich®, St.
134 Louis, MO, USA) e iodeto de propídio (IP; Sigma-Aldrich®, St. Louis, MO, USA),
135 modificado por Coletto et al. (2002), em que alíquotas de 50 μ L de sêmen pós
136 descongelado foram diluídas em 150 μ L de Tris (3,605 g de Tris, 2,024 g de ácido
137 cítrico, 1,488g de frutose, 100mL de água destilada) contendo 5 μ L de DCF (0,46mg/mL
138 em DMSO) e 20 μ L de IP (0,5mg/mL em PBS) e incubadas por 10 minutos a 38°C. Um
139 total de espermatozoides foi avaliado em microscópio de epifluorescência (Olympus
140 optical Co., Ltda., Tóquio, Japão), com aumento de 400x, usando-se filtro de emissão
141 DBP 580- 630nm e excitação DBP 485/20nm.

142 Os espermatozoides foram classificados em membrana intacta quando se
143 apresentavam corados em verde, e com membrana danificada quando corados em
144 vermelho.

145 *Análise da integridade acrossomal*

146 Para avaliação da integridade do acrossoma, utilizou-se o corante isotiocianato
147 de fluoresceína conjugado a Peanut agglutinin (FITC-PNA; Sigma-Aldrich®, St Louis,
148 MO, USA), de acordo com a técnica descrita por Roth et al. (1998), em que uma
149 alíquota de 20µL da solução estoque de FITC-PNA (1mg/mL) foi descongelada e
150 adicionada a 480µL de solução de fosfato tamponada (PBS) para obter a concentração
151 final de 100µg/mL. Alíquotas (20µL) desta solução foram colocadas sobre esfregaços
152 de lâminas contendo espermatozoides, as quais foram incubadas por 20 minutos em
153 câmara úmida a 4°C, na ausência de luz.

154 Após incubação, as lâminas foram enxaguadas duas vezes em PBS refrigerado
155 (4°C) e colocadas para secagem na ausência de luz. Imediatamente antes da avaliação,
156 5µL de meio de montagem UCD (4,5mL de glicerol, 0,5mL de PBS, 5mg de azida
157 sódica e 5mg de p-fenilenodiamina) foram colocados sobre a lâmina e cobertos com
158 lamínula.

159 Foram avaliados 200 espermatozoides por lâmina, com aumento de 1000x, sob
160 óleo de imersão, em microscópio de epifluorescência (Olympus optical Co., Ltda.,
161 Tóquio, Japão), usando-se filtro de emissão LP 515nm e BP 450-490nm para excitação.

162 Os espermatozoides foram classificados como portadores de acrossomas
163 intactos, quando apresentavam a região acrossomal corada com fluorescência verde, ou
164 com acrossoma reagido, quando apresentavam uma faixa verde fluorescente na região
165 equatorial da cabeça espermática ou não apresentavam fluorescência verde em toda
166 região da cabeça.

167 *Análise do potencial de membrana mitocondrial*

168 A função mitocondrial foi determinada pela utilização de um fluorocromo
169 catiônico lipofílico JC-1 (Guthrie e Welch 2006). Para tanto, alíquotas de 50µL de
170 sêmen pós-descongelado foram diluídas em 150µL de Tris contendo 5µL de JC-1 228
171 (0,15mM em DMSO) e incubadas por 10 minutos a 38°C. Um total de 200
172 espermatozoides foi avaliado em microscópio de epifluorescência (Olympus optical
173 Co., Ltda., Tóquio, Japão), com aumento de 1000x, sob óleo de imersão, usando-se
174 filtro de emissão LP 515nm e BP 450-490nm para excitação.

175 As células coradas em laranja foram classificadas com alto potencial de
176 membrana mitocondrial, e aquelas coradas em verde foram classificadas com baixo
177 potencial de membrana.

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

179 A cinemática espermática foi avaliada por meio de um sistema analisador de
180 espermatozoide auxiliado por computador (CASA). O CASA consistiu de um sistema
181 de microscopia óptica de contraste de fase (Nikon TM H5505, Eclipse 50i, Japão), com
182 iluminação estroboscópica, e uma fase quente a 37°C, uma câmera de vídeo (Basler
183 Visão Technologie TM A312FC, Ahrensburg, Alemanha) e um PC com o analisador de
184 esperma Classe TM software (Microoptics, SL, versão 3.2.0, Barcelona, Espanha).

185 As variáveis cinéticas dos espermatozoides foram avaliadas após a lavagem das
186 amostras em meio Tyrode-albmina-lactato-piruvato (SPERM-TALP) (v/v) e
187 centrifugado a 300x para retirada dos agregados da gema de ovo do meio de
188 criopreservação e posteriormente incubados num banho-maria a 37°C durante 5min.

189 Observou-se: motilidade progressiva (MOP-- µm/s), velocidade curvilinear
190 (VCL - µm/s), velocidade em linha reta (VSL - µm/s), velocidade média do percurso
191 (VAP µm/s), linearidade (LIN - %), retilinearidade (STR-%), deslocamento lateral de

192 cabeça (ALH - μm), Wobble (WOB - %) e frequência de batimento cruzado (BCF-Hz),
193 para cada espermatozoide analisado.

194 *Teste de Termo Resistência (TTR)*

195 O teste de termo resistência consistiu em avaliar a longevidade dos
196 espermatozoides das amostras de sêmen descongeladas, incubado em banho-maria a
197 37°C por um período de 3 horas.

198 As mostras descongeladas foram acondicionadas em microtubos de 1,5mL e
199 incubadas a 37°C , posteriormente, foram avaliadas quanto à motilidade total (MT - %) e
200 o vigor (1- 5) espermático por meio de microscopia de contraste de fase (Olympus
201 optical Co., Ltda., Tóquio, Japão) com placa aquecedora acoplada, com aumento de
202 400x, nos tempos 0, 60, 120 e 180 minutos pós-descongelação de acordo com Colégio
203 brasileiro de reprodução animal (Cbra, 2013).

204 *Deteção de espécies reativas ao oxigênio (ROS)*

205 O nível intracelular de espécies reativas ao oxigênio (ROS) nos espermatozoides
206 foi determinado utilizando a associação dos corantes fluorescentes Carboxy CM-
207 H2DFFDA (C6827, Invitrogen, Eugene, OR, EUA) e iodeto de propídio (Sigma-
208 Aldrich®, St. Louis, MO, USA).

209 Para cada amostra, $2\mu\text{l}$ de Carboxy CM-H2DFFDA ($0,01\text{mmol}$) e $1\mu\text{l}$ de Iodeto
210 de propídio - PI ($2,4\text{mmol}$) foram adicionados a um volume final de $400\mu\text{l}$ de suspensão
211 de espermatozoides em PBS (10^7 de células/ml) seguido por incubação durante 30 min.
212 a 37°C no escuro e analisadas imediatamente por citômetro de fluxo (Amnis® imaging
213 flow cytometers – EMD Millipore, Darmstadt, Alemanha), equipada com um laser de
214 iões de argon de 488nm a 642nm de excitação e seis canais de imagiologia de alta
215 resolução.

216 Foram analisados 10.000 espermatozoides por amostra. Os dados expressos
217 como a porcentagem de espermatozoides com ROS intracelular e membrana plasmática
218 íntegra (CM-H₂DFDA + / PI -).

219 *Delineamento e análise estatística*

220 O delineamento experimental foi em bloco ao acaso, com quatro tratamentos:
221 controle, B1 (β -cariofilno 1,0mM), B2 (β -cariofilno 2,0mM) e B3 (β -cariofilno 3,0mM)
222 em sete coletas. Avaliou-se os dados quanto à normalidade por meio do teste de
223 Shapiro-Wilk. As variáveis: potencial de membrana mitocondrial, integridade
224 acrossomal, cinética espermática e produção de ROS intracelular; foram submetidas à
225 análise de variância (ANOVA) aplicando-se o teste Tukey a 5% de probabilidade para
226 aquelas que apresentaram significância. Integridade da membrana plasmática,
227 motilidade e vigor no teste de termo resistência (TTR) apresentaram distribuição não-
228 paramétrica, sendo realizado o teste Kruskal Wallis com a determinação das relações
229 entre as variáveis feita pela correlação de Dunn ($P < 0,05$). Testes foram realizados
230 utilizando-se o software Statistical Analysis System (SAS Institute Inc, 2013).

231 **Resultados**

232 A qualidade dos espermatozoides, em termos de integridade da membrana
233 plasmática, integridade acrossomal e potencial de membrana mitocondrial estão
234 resumidos na Tabela 1. Todas as concentrações de β -cariofileno suplementadas ao
235 diluidor apresentaram resultados semelhantes ao controle ($P > 0,05$).

236 **Tabela 1** Integridade da membrana plasmática, potencial mitocondrial e Integridade
 237 acrossomal pós-descongelamento de espermatozoides caprinos criopreservados em três
 238 concentrações diferentes de β -cariofileno

Tratamentos	Integridade da Membrana Plasmática (%)	Potencial da Membrana Mitocondrial (%)	Integridade Acrossomal (%)
CONTROLE	29,43±23,12 27	37,42 ± 6,26	48,00 ± 11,22
B1	28,86±18,45 21	26,00 ± 12,88	46,14 ± 13,40
B2	18,00±10,52 15	24,71 ± 9,84	40,42 ± 6,99
B3	21,14±11,84 21	26,14 ± 6,64	40,00 ± 15,76

239 Valores de Integridade da Membrana Plasmática (%) expressos como média \pm desvio padrão e
 240 mediana. Shapiro-Wilk, Kruskal-Wallis e Dunn Test. Valores de Potencial da Membrana Mitocondrial
 241 (%) e Integridade Acrossomal (%) expressos em média \pm desvio padrão. Shapiro-Wilk, ANOVA e
 242 Tukey.

243

244 O efeito do β -cariofileno, acrescido ao diluidor de criopreservação de sêmen,
 245 sobre os parâmetros de cinética dos espermatozoides de caprinos anglonubianos pós
 246 descongelamento a 37°C (Tabela 2). As diferentes concentrações de β -cariofileno não
 247 afetaram os parâmetros de cinética espermática.

248 **Tabela 2** Cinética pós-descongelção de espermatozoides caprinos criopreservados em Tris-Gema suplementado com três concentrações
 249 diferentes de β -cariofileno, avaliados pelo teste CASA (Sistema analisador de espermatozoides auxiliado por computador)

250

251	Parâmetros de cinética											
	Tratamento	ALH	BCF	HIP	LIN	MP	MT	STR	VAP	VCL	VSL	WOB
252	Controle	2,9±0,3	9,4±1,1	5,9±2,4	71,2±5	17,8±8,9	27,2±13,7	86,2±4,6	72,8±8,3	91,6±7,5	64,9±7,9	81,3±4,8
	B1 1mM	2,8±0,5	8,8±1,1	5,4±2,5	69,4±9,1	16,6±7,9	27,3±12	86,2±4,1	69,7±9,5	86,6±6,4	60,2±10,1	80,3±7,4
253	B2 2mM	2,9±0,3	9,1±0,7	6,1±1,3	68,6±7,6	18,9±4,6	32,2±10,1	85,6±5,2	69,3±9	86,6±8,3	59,6±10,5	79,9±4,7
	B3 3mM	2,8±0,4	9±0,7	6,7±3,2	65,1±14,4	20±13,1	32,1±18,9	83,2±9,4	64,3±21,6	86,9±8,2	55,1±21,5	77,7±10,2

254 Valores expressos como média \pm desvio padrão. Shapiro-Wilk, ANOVA e Tukey.

255 **ALH** - Amplitude de deslocamento lateral da cabeça; **BCF** - frequência de batimentos de cauda; **HIP** - hiperatividade; **LIN** - linearidade; **MP** -
 256 motilidade progressiva; **MT** - motilidade total; **STR** - retilinearidade; **VAP** - velocidade média de percurso; **VCL** - velocidade curvilínea; **VSL** -
 257 velocidade em linha reta; **WOB** - oscilação.

258 Os valores de motilidade e vigor de espermatozoides de caprinos após a criopreservação em diferentes concentrações de β -
 259 cariofileno, no tempo de termo resistência (TTR) a 37°C em 0, 60, 120 e 180 minutos são mostrados na Tabela 3. Não houve
 260 diferença significativa ($P>0,05$) para as variáveis motilidade e vigor espermático entre os tratamentos para todos os tempos de
 261 incubação no TTR.

262 **Tabela 3** Motilidade total e vigor pós-descongelção de espermatozoides caprinos
 263 criopreservados em Tris-Gema suplementado com três concentrações diferentes de β -
 264 cariofileno, avaliados pelo teste de termorresistência (TTR)

Parâmetro	Tempo (min)	Controle	B1	B2	B3
MOT. (%)	0	30	40	30	40
VIG. (1-5)	0	3	3	3	3
MOT. (%)	60	30	30	30	20
VIG. (1-5)	60	3	3	3	2
MOT. (%)	120	20	30	20	20
VIG. (1-5)	120	2	3	2	3
MOT. (%)	180	20	10	20	20
VIG. (1-5)	180	2	2	2	2

265 Os valores expressos como mediana. Shapiro-Wilk, Kruskal-Wallis e Dunn Test.

266

267

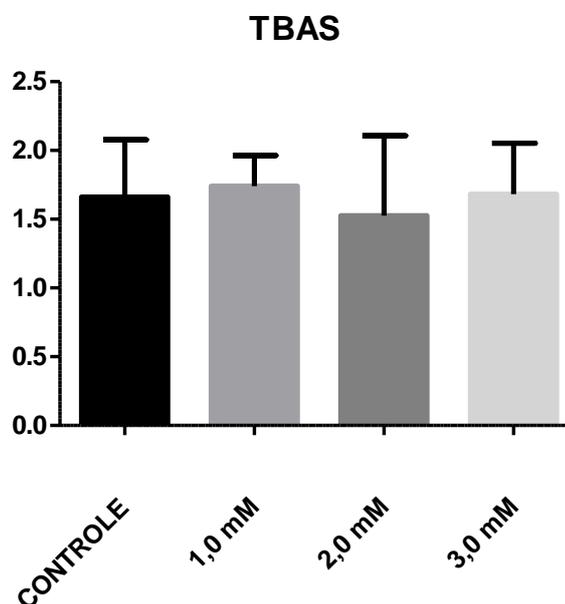
268

A produção de ROS intracelular pós-descongelção em espermatozoides caprinos

269 criopreservados em Tris-Gema suplementado com três concentrações diferentes de β -

270 cariofileno, são mostrados na Figura 1. Não houve diferença significativa na produção

271 de ROS intracelular quando comparados ao controle ($P > 0,05$).



272

273

Valores expressos como média \pm desvio padrão. Shapiro-Wilk, ANOVA e Tukey.

274 **Figura 1.** Geração intracelular de ROS pós-descongelção em espermatozoides
 275 caprinos criopreservados em Tris-Gema suplementado com três concentrações
 276 diferentes de β -cariofileno.

277 **Discussão**

278 Não foram observadas diferenças significativas entre os grupos experimentais em
279 relação à integridade acrossômica, integridade da membrana plasmática e potencial de
280 atividade mitocondrial, o que sugere que a presença β -cariofileno, nas concentrações
281 utilizadas nesse estudo, não melhoram ($P>0,05$) os parâmetros de qualidade de
282 espermatozoides caprinos criopreservados. Em um estudo anterior, Wittayarat et al.
283 (2012) indicou que o antioxidante natural, chá verde (*Cammelia sinensis*), aumentou
284 significativamente a motilidade espermática em humanos, porém não foram observados
285 efeitos benéficos na membrana plasmática e na integridade acrossomal. Kalthur et al.
286 (2012) demonstraram que a biotina pode melhorar a motilidade dos espermatozoides e a
287 sobrevivência prolongada de sêmen descongelado.

288 A cinética espermática é crucial para facilitar a passagem através do colo do útero
289 e da junção uterotubal. Também é importante para a penetração e acúmulo dos
290 espermatozoides na zona pelúcida do óvulo (Garner e Hafez, 1993). Em todos os
291 tratamentos com suplementação de β -cariofileno ao tris-gema não foram observadas
292 diferenças significativas dos resultados obtidos para os parâmetros cinéticos em relação
293 ao controle. Esse resultado está de acordo com descrito por Bucak et al. (2010b) para
294 espermatozoides congelados e descongelados de cabra angorá, onde a adição de
295 carnitina e inositol resultou em aumentos insignificantes nas motilidades subjetivas e
296 dos parâmetros de motilidade dos espermatozoides obtidos através da análise CASA.

297 O teste de termo resistência (TTR) tem por objetivo selecionar amostras de sêmen
298 mais resistentes a lesões latentes ao calor e maximizar as chances de sobrevivência
299 espermática dentro do trato reprodutivo feminino. No entanto não existe uma correlação
300 positiva entre qualidade de espermatozoides ao final da TTR e fertilidade. Viana et al.

301 (2009) demonstrou que espermatozoides com taxa de motilidade de 0% ao final de 5
302 horas de incubação a 38°C apresentaram taxa de prenhes de 66% na IATF.

303 A adição de diferentes concentrações de β -cariofileno ao diluidor demonstraram
304 não interferir nos valores de motilidade e vigor nos diferentes tempos da TTR. Apesar
305 de não ter sido observado significância para essas variáveis, é importante considerar que
306 o comportamento durante o teste de termorresistência (TTR) foi semelhante em relação
307 aos tratamentos utilizados, sendo altas nas primeiras horas do teste, diminuindo nas
308 horas intermediárias e, posteriormente, estabilizando em baixos valores nas horas finais
309 do teste (Kumar, 2000). Isso ocorre porque as reservas energéticas vão se esgotando, em
310 virtude de o metabolismo celular estar elevado. Assim, há um aumento considerável de
311 espermatozoides mortos e, por conseguinte, maior produção de ROS, mais danos
312 peroxidativos e menor viabilidade espermática (Brito et al. 2017).

313 Foi investigado o efeito do β -cariofileno nos parâmetros do espermatozóide e o
314 estresse oxidativo pós congelação e descongelação do sêmen caprino. Os
315 espermatozóides são altamente sensíveis à LPO, que ocorre como resultado da oxidação
316 de lipídios de membrana por meio de moléculas de oxigênio parcialmente reduzidas,
317 por exemplo, radicais superóxido, peróxido de hidrogênio e hidroxila. A Peroxidação
318 espontânea das membranas dos espermatozóides destroem a estrutura da matriz lipídica,
319 devido aos ataques das ROS, formados pela redução univalente de oxigênio, durante a
320 criopreservação. O dano leva à perda da integridade da membrana, deterioração da
321 membrana, diminuição da motilidade espermática, perda de fertilidade, vazamento de
322 enzimas intracelulares e danos no DNA do espermatozoide, através do estresse
323 oxidativo e da produção de aldeídos citotóxicos (Bucak et al. 2010a).

324 A suplementação com antioxidantes poderia prevenir este processo (Sikka, 2004).
325 No entanto, no presente estudo, o antioxidante β -cariofileno aparentemente não atingiu

326 eficácia alguma na prevenção da formação de LPO, quando comparados os parâmetros
327 de ROS ao controle. Estudos relacionados à LPO corroboram com os resultados
328 encontrados, em que não foi registrado um decréscimo no nível de MDA na presença de
329 ácido hialurônico e tióis para o estado congelado (Bucak et al. 2008) ou em metionina e
330 ditioeritritol para armazenamento de esperma líquido (Coyan et al. 2010).

331 Os resultados obtidos permitem concluir que a suplementação do diluidor de
332 criopreservação tris-gema com β -cariofileno, nas concentrações utilizadas, não causa
333 efeitos significativos ($p>0,05$) na qualidade espermática do sêmen caprino
334 anglonubiano.

335 **Resumo**

336 Biotécnicas da reprodução como o congelamento de sêmen podem agregar
337 melhoramento genético. Entretanto, reações de oxidação acabam baixando a taxa de
338 viabilidade espermática pós descongelação. O β -cariofileno é um sesquiterpeno com
339 atividades biológicas, destacando-se a atividade anti-inflamatória e antioxidante.
340 Objetivou-se analisar efeitos antioxidantes e viabilidade espermática do sêmen caprino
341 criopreservado em tris-gema suplementado com diferentes concentrações de β -
342 cariofileno. Foram realizadas coletas semanais durante sete semanas, totalizando sete
343 ejaculados de caprinos da raça Anglonubiana por coleta. Após avaliação e formação do
344 pool, este foi dividido em quatro alíquotas, correspondentes ao grupo tratamento
345 respectivo: 0mM (controle), 1,0 mM (B1), 2,0 mM (B2) e 3,0 mM (B3). Avaliaram-se a
346 integridade da membrana plasmática, integridade acrossomal, potencial de membrana
347 mitocondrial, cinética espermática (CASA), Teste de Termo Resistência (TTR) e
348 detecção de espécies reativas ao oxigênio (ROS). Os resultados foram submetidos à
349 análise de variância (ANOVA) e ao teste Kruskal Wallis para os resultados não
350 paramétricos. Não houveram diferenças significativas ($p<0,05$) em relação ao controle,

351 entre os resultados obtidos para as variáveis e tratamentos estudados pós descongelação.
352 A suplementação das concentrações de β -cariofileno adotadas neste estudo ao diluidor
353 tris-gema não provocaram efeitos na qualidade espermática do sêmen caprino
354 anglonubiano.
355 Palavras-Chave: antioxidante, caprino, ROS, espermatozoides.

356 Referências

- 357 BRITO LS, BARBOSA LP, RESENDE MV, PINHEIRO A M, DA FRANÇA CS AND
358 DE CARVALHO CARDOSO R. 2017. Ácido ascórbico no diluidor para
359 criopreservação de sêmen caprino. *Cienc. anim. bras.*, Goiânia, v.18, 1-10, e-40117.
- 360 BUCAK MN, ATEŞŞAHIN A AND YÜCE A. 2008. Effect of anti-oxidants and
361 oxidative stress parameters on ram semen after the freeze–thawing process. *Small*
362 *Ruminant Research*, 75(2-3), 128-134.
- 363 BUCAK MN, et al. 2010a. Effects of antioxidants on post-thawed bovine sperm and
364 oxidative stress parameters: antioxidants protect DNA integrity against cryodamage.
365 *Cryobiology*, 61(3), 248-253.
- 366 BUCAK MN, SARIÖZKAN S, TUNCER PB, SAKIN F, ATEŞŞAHIN A,
367 KULAKSIZ R, AND ÇEVİK M. 2010b. The effect of antioxidants on post-thawed
368 Angora goat (*Capra hircus ancyrensis*) sperm parameters, lipid peroxidation and
369 antioxidant activities. *Small Ruminant Research*, 89(1), 24-30.
- 370 CALLEJA MA, VIEITES JM, MONTERO-METERDEZ T. TORRES M I, FAUS MJ,
371 GIL A AND SUÁREZ A. 2013. The antioxidant effect of β -caryophyllene protects rat
372 liver from carbon tetrachloride-induced fibrosis by inhibiting hepatic stellate cell
373 activation. *British journal of nutrition*, 109(3), 394-401.
- 374 CBRA. Colégio Brasileiro de Reprodução Animal. Manual para exame andrológico e
375 avaliação de sêmen animal. Belo Horizonte, 2013.
- 376 ÇOYAN K, et al. 2010. Influence of methionine and dithioerythritol on sperm motility,
377 lipid peroxidation and antioxidant capacities during liquid storage of ram
378 semen. *Research in veterinary science*, 89(3), 426-431.
- 379 COLETO, Z. F.; GUERRA, M. M. P.; BATISTA, A. M. 2002. Avaliação do sêmen
380 congelado de caprinos com drogas fluorescentes. *Rev. Bras. Med. Vet.* 24, 101-104.
- 381 FIDYT K, et al. 2016. β -caryophyllene and β -caryophyllene oxide — natural
382 compounds of anticancer and analgesic properties. *Cancer Medicine*, v. 5, n. 10, p.
383 3007-3017.
- 384 GARNER DL AND HAFEZ ESE. 1993. Spermatozoa and seminal plasma, in: E.S.E.
385 Hafez (Ed.), *Reproduction in Farm Animals*, Lea&Febier, Philadelphia, pp. 167–182.

- 386 GUTHRIE, H.D.; WELCH, G.R. 2006. Determination of intracellular reactive oxygen
387 species and high mitochondrial membrane potential in Percoll-treated viable boar
388 sperm using fluorescence-activated flow cytometry. *Journal of Animal Science*, v. 84,
389 p. 2089-2100.
- 390 KALTHUR G, SALIAN SR, KEYVANIFARD F, SREEDHARAN S, THOMAS JS,
391 KUMAR P, AND ADIGA SK. 2012. Supplementation of biotin to sperm preparation
392 medium increases 522 the motility and longevity in cryopreserved human spermatozoa.
393 *J. Assist. Reprod. 523 Genet.* 29, 631–635.
- 394 KUMAR S. 2000. Cellular damages during cryopreservation and assessment of in vitro
395 fertilizing capacity of spermatozoa. *Ind Vet Med. J.*24:1-6.
- 396 SIKKA SC. 2004. Role of oxidative stress and antioxidants in andrology and assisted
397 reproductive technology, *J. Androl.* 25 5–18.
- 398
399 TRALDI AS. 1994. Tópicos em reprodução e I.A. em caprinos – Manual técnico. Texto
400 apostilado.
- 401 VARGA ZV. 2017. β -Caryophyllene protects against alcoholic steatohepatitis by
402 attenuating inflammation and metabolic dysregulation in mice. *British Journal of*
403 *Pharmacology*.
- 404 VIANNA FP, PAPA FO, ZAHN FS AND DELL'AQUA JR JA. 2009
405 Thermoresistance sperm tests are not predictive of potential fertility for cryopreserved
406 bull semen. *Animal Reproduction Science, Brasil*, v. 113, 279–282.
- 407 WILLIAMS AC AND FORD WCL. 2005. Relationship between reactive oxygen
408 species production and lipid peroxidation in human sperm suspensions and their
409 association with sperm function. *Fertil Steril*, v.83, p.929-936.
- 410 WITTAYARAT M, KIMURA T, KODAMA R, NAMULA Z, CHATDARONG K,
411 TECHAKUMPHU M, SATO Y, TANIGUCHI M, AND OTOI T. 2012. Long-term
412 preservation of chilled canine semen using vitamin C in combination with green tea
413 polyphenol. *Cryo. Letters* 602 33, 318–326.

CAPÍTULO II*

* Apresentado segundo normas da Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal - RBSPA

1 *Supplementation of ellagic acid with egg-yolk in cryopreservation of goat semen*

2 **Suplementação de ácido elágico ao tris-gema na criopreservação de sêmen caprino**

3 *MARINA REBECA SOARES CARNEIRO DE SOUSA¹, ANTONIO DE SOUSA*
4 *JÚNIOR², MARLON ARAUJO CASTELO BRANCO³, EMANUELA RIBEIRO MOURA⁴,*
5 *MARIANA ELENA CHAVES⁵, ISOLDA MARCIA ROCHA DO NASCIMENTO ⁶*
6 *AMILTON PAULO RAPOSO COSTA⁷*

7 ¹ Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Universidade Federal do Piauí,
8 Campus Universitário Ministro Petrônio Portela, Bairro Ininga, CEP: 64049-550 -
9 Teresina – PI, Telefone: (86) 3215-5753

10 ² Colégio Técnico de Teresina- PI - Universidade Federal do Piauí, Campus
11 Universitário Ministro Petrônio Portela, Bairro Ininga, CEP: 64049-550 - Teresina – PI,
12 Telefone: (86) 3215-5753

13 ³ Centro de controle de zoonoses de Teresina – Piauí, R. Minas Gerais, 909 - Acarapé,
14 CEP: 64003-850 - Teresina – PI, Telefone: (86) 32159144

15 ⁴ Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Universidade Federal do Piauí,
16 Campus Universitário Ministro Petrônio Portela, Bairro Ininga, CEP: 64049-550 -
17 Teresina – PI, Telefone: (86) 3215-5753

18 ⁵ Departamento de Química (DMV), Centro de Ciências da Natureza (CCN),
19 Universidade Federal do Piauí (UFPI), Campus Universitário Ministro Petrônio Portela,
20 Bairro Ininga, CEP: 64049-550 - Teresina – PI

21 ⁶ Colégio Técnico de Teresina- PI - Universidade Federal do Piauí, Campus
22 Universitário Ministro Petrônio Portela, Bairro Ininga, CEP: 64049-550 - Teresina – PI,
23 Telefone: (86) 3215-5753

24 ⁷ Departamento de Morfofisiologia Veterinária (DMV), Centro de Ciências Agrárias
25 (CCA), Universidade Federal do Piauí (UFPI), Campus Universitário Ministro Petrônio
26 Portela, Bairro Ininga, CEP: 64049-550 - Teresina – PI

27 Abstract

28 The generation of reactive oxygen reactions (ROS) is an important factor that
29 leads to the process of choosing the spermatozoa in the cryopreservation process.
30 Supplementation of the cryopreservation medium with antioxidants is in cryoprotective
31 effect in several species. Ellagic acid (EA) is a dimer of gallic acid four rings fused with
32 four hydroxylates, with strong antioxidant activity. The objective was to propose
33 antioxidant effects and the viability of goat semen cryopreserved in egg-yolk
34 supplemented with different concentrations and purities of EA. Weekly collections were
35 carried out at seven weeks, totalizing seven ejaculates of goats of the Anglo-Australian
36 breed by collection. After evaluation and pool formation, the result was 30 minutes
37 purity: A1-0.5 mM, A2-1.0 mM, A3- 2.0 mM; ellagic acid 95% purity: D1-0.5mM, D2-
38 1.0mM and D3-2.0mM, equal to the egg-yolk thinner. The plasma membrane, the
39 acrosomal membrane, the mitochondrial membrane potential, the spermatoc kinetics
40 (CASA), the Thermo-Resistance Test (TTR) and the Detection of Oxygen Reactive
41 Species (ROS) were evaluated. The results were analyzed by variance (ANOVA) and
42 Kruskal Wallis test for non-parametric results. Significant observation ($p > 0.05$) of the
43 non-TTR motility and vigor parameters, CASA kinetics in memories A3 and D3; and,
44 mitochondrial membrane potential in the A3 and concentrations D2 and D3, when
45 compared to the control. The supplementation of the egg-yolk cryopreservation diluent
46 with ellagic acid of greater cause causes the greater of the sperm viability of the
47 Anglonuban goat semen.

48 Key words: antioxidant, goat, ROS, spermatozoa.

49 **Resumo**

50 A geração de espécies reativas de oxigênio (ROS) é um fator importante que leva
51 ao declínio da qualidade dos espermatozoides no processo de criopreservação. A
52 suplementação do meio de criopreservação com antioxidantes mostrou proporcionar
53 efeito crioprotetor em diversas espécies. O ácido elágico (AE) é um dímero do ácido
54 gálico apresentando quatro anéis fundidos com quatro hidroxilas, de forte atividade
55 antioxidante. Objetivou-se analisar efeitos antioxidantes e viabilidade espermática do
56 sêmen caprino criopreservado em tris-gema suplementado com diferentes
57 concentrações e purzas de AE. Realizou-se coletas semanais durante sete semanas,
58 totalizando seis ejaculados de caprinos da raça anglonubiana por coleta. Após avaliação
59 e formação do pool, este foi dividido em sete alíquotas, correspondentes ao grupo
60 tratamento respectivo: Controle-0mM, ácido elágico 90% de pureza: A1-0,5 mM, A2-
61 1,0mM, A3- 2,0mM; ácido elágico 95% de pureza: D1-0,5mM, D2-1,0mM e D3-
62 2,0mM, adicionados ao diluidor tris-gema. Avaliaram-se a integridade da membrana
63 plasmática, integridade acrossomal, potencial de membrana mitocondrial, cinética
64 espermática (CASA), Teste de Termo Resistência (TTR) e detecção de espécies
65 reativas ao oxigênio (ROS). Os resultados foram submetidos à análise de variância
66 (ANOVA) e ao teste Kruskal Wallis para os resultados não paramétricos. Observou-se
67 redução significativa ($p>0,05$) dos parâmetros motilidade e vigor no TTR e cinética
68 CASA nas concentrações A3 e D3 e, redução no potencial de membrana mitocondrial
69 na concentração A3 e concentrações D2 e D3, quando comparados ao controle. A
70 suplementação do diluidor de criopreservação tris-gema com ácido elágico em maiores
71 concentrações causa a diminuição da viabilidade espermática do sêmen caprino
72 anglonubiano.

73 Palavras-Chave: antioxidante, caprino, ROS, espermatozoides.

74 **Introdução**

75 A geração de espécies reativas de oxigênio (ROS) é um fator importante que
76 leva ao declínio da qualidade dos espermatozoides no processo de criopreservação
77 (Carneiro et al., 2018). Infelizmente, a membrana plasmática dos espermatozoides de
78 caprinos tem alto conteúdo de ácidos graxos insaturados ricos em fosfolípidios, e a
79 peroxidação lipídica após a criopreservação leva ao acúmulo de peróxidos de ácidos
80 graxos tóxicos que podem danificar os espermatozoides impondo um alto estresse
81 oxidativo (Alcay et al., 2016).

82 A suplementação do meio de criopreservação com antioxidantes mostrou
83 proporcionar efeito crioprotetor em diversas espécies, melhorando os parâmetros do
84 sêmen a exemplo da motilidade espermática e integridade da membrana pós
85 descongelação (Bucak et al., 2010).

86 O ácido elágico (AE) é um dímero do ácido gálico apresentando quatro anéis
87 fundidos com quatro hidroxilas, sendo que ambos são metabólitos secundários de
88 vegetais, classificado como um polifenol (Manach et al, 2004). A atividade antioxidante
89 do AE e seus derivados foi estudado por Nuncio-Jáuregui et al. (2015), que extrai-o de
90 romãs espanholas, e observou uma forte atividade antioxidante, corroborando com os
91 dados de outros autores.

92 Objetivou-se, portanto, o estudo da atividade antioxidante do ácido elágico, em
93 diferentes purezas e concentrações, acrescido ao tris-gema, avaliando a viabilidade
94 espermática através de diversos testes.

95 **Material e Métodos**

96 Todos os procedimentos realizados com os animais estavam em conformidade
97 com a legislação brasileira em pesquisa animal (Lei 11.794 de 08 de outubro de 2008).

98 O procedimento descrito neste artigo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de
99 Animais (CEUA) da Universidade Federal do Piauí (UFPI) sob o protocolo de N°
100 460/18.

101 *Diluidores, reagentes e meio*

102 O diluidor Tris-gema constituído a partir de 3,605 g de Tris; 2,024 g de ácido
103 cítrico; 1,488g de frutose; 25 mg de gentamicina; 50.000 UI de penicilina; 100mL de
104 água destilada; 20% de gema de ovo e 5% de glicerol, com osmolaridade de ~350
105 mOsm/kg e pH 6,8, foi utilizado para diluição e congelamento do sêmen. O Ácido
106 elágico com pureza de 90% foi obtido da Active Pharmaceutica ®, China. Ácido
107 elágico com pureza de 95%, e todos os demais produtos químicos foram obtidos a partir
108 da Sigma-Aldrich® (St. Louis, MO, USA).

109 Sete diluidores experimentais diferentes foram preparados na seguinte
110 disposição: Controle (0 μ M), A1 (ácido elágico 90% de pureza concentração 0,5 mM),
111 A2 (ácido elágico 90% de pureza concentração 1,0mM), A3 (ácido elágico 90% de
112 pureza concentração 2,0mM, D1 (ácido elágico 95% de pureza concentração 0,5mM),
113 D2 (ácido elágico 95% de pureza concentração 1,0mM) e D3 (ácido elágico 95% de
114 pureza concentração 2,0mM), adicionados ao diluidor Tris-gema.

115 *Animais*

116 Foram utilizados seis caprinos machos e uma fêmea, provenientes de
117 propriedade particular localizada no município de David Caldas-PI, com idade média de
118 dois anos, da raça Anglonubiana e com escore de condição corporal 3-4 (escala 1-5).
119 Todos os animais tiveram histórico de fertilidade comprovada e foram avaliados quanto
120 à saúde geral, à integridade dos órgãos reprodutivos e à qualidade espermática.

121 *Coleta de sêmen e avaliação inicial*

122 As coletas de sêmen foram realizadas durante os últimos meses da estação com
123 baixo índice pluviométrico e durante os últimos meses de estação chuvosa em seis
124 animais, totalizando sete coletas.

125 As coletas foram realizadas com o auxílio de uma cabra sabidamente em cio e o
126 uso de vagina artificial, utilizando um tubo de ensaio graduado de 15mL, estéril e
127 devidamente protegido com uma folha de papel alumínio para evitar a exposição do
128 sêmen à luz.

129 Após a coleta as amostras de sêmen de cada animal foram colocadas em banho
130 Maria a 37 °C e avaliadas separadamente quando cor, aspecto, volume (mL),
131 turbilhonamento (0-5), motilidade total (%) e vigor espermático (1-5), em microscópio
132 de contraste de fase (Olympus optical Co., Ltda., 163 Tóquio, Japão).

133 A concentração espermática foi obtida em câmara de Neubauer, na diluição de
134 1:200, em solução de citrato de sódio em formol a 4 %. Para análise da morfologia
135 espermática, foi utilizado o método de câmara úmida, segundo o Colégio Brasileiro de
136 Reprodução Animal (Cbra 2013). Apenas ejaculados com turbilhonamento ≥ 3 ;
137 motilidade total $\geq 80\%$; vigor ≥ 3 ; concentração espermática $\geq 3,5 \times 10^9$
138 espermatozoides/mL e patologias espermáticas $\leq 20\%$ foram utilizados nesse estudo.

139 Quando aprovadas, amostras dos seis ejaculados foram misturadas para
140 formação de um pool, objetivando aumentar o volume do sêmen e eliminar a
141 variabilidade. Logo após a formação do pool, este foi dividido em 7 alíquotas,
142 correspondentes ao grupo tratamento respectivo.

143 *Criopreservação do sêmen*

144 O pool de sêmen previamente avaliado e aprovado foi diluído em meio Tris-
145 gema (37°C) contendo Ácido elágico com 90% de pureza (0,5mM, 1,0mM ou 2,0mM)
146 ou Ácido elágico com 95% de pureza (0,5mM, 1,0mM ou 2,0mM), enquanto que uma

147 alíquota sem nenhuma suplementação foi mantida como controle. O sêmen diluído foi
148 envasado em palheta de 0,25mL (50×10^6 espermatozoides viáveis por palheta) e
149 congelado em maquina TK 3000® (TK Tecnologia em congelação Ltda., Uberaba,
150 Brasil), na curva de congelação rápida ($-0,5^\circ 182 \text{ C/min}$, de 25° C a 5° C e -20° C/min ,
151 de 5° C a -120° C) e, após atingir -120° C , as palhetas foram mergulhadas em nitrogênio
152 líquido (-196° C) e armazenadas em botijão criogênico.

153 O tempo de equilíbrio na temperatura de 5° C foi de 60 minutos. Após 30 dias de
154 armazenamento as amostras de sêmen foram descongeladas em banho-maria a 37° C por
155 30 segundos e avaliadas quanto à integridade da membrana plasmática, integridade do
156 acrossoma, função mitocondrial, cinemática espermática e teste de termorresistência
157 (TTR).

158 *Análise da integridade da membrana plasmática*

159 Para avaliação da integridade da membrana plasmática, utilizou-se o método de
160 coloração dupla com diacetato de carboxifluoresceína (DCF; Sigma-Aldrich®, St.
161 Louis, MO, USA) e iodeto de propídio (IP; Sigma-Aldrich®, St. Louis, MO, USA),
162 modificado por Coletto et al. (2002), em que alíquotas de $50\mu\text{L}$ de sêmen pós
163 descongelação foram diluídas em $150\mu\text{L}$ de Tris (3,605 g de Tris, 2,024 g de ácido
164 cítrico, 1,488g de frutose, 100mL de água destilada) contendo $5\mu\text{L}$ de DCF (0,46mg/mL
165 em DMSO) e $20\mu\text{L}$ de IP (0,5mg/mL em PBS) e incubadas por 10 minutos a 38° C . Um
166 total de espermatozoides foi avaliado em microscópio de epifluorescência (Olympus
167 optical Co., Ltda., Tóquio, Japão), com aumento de 400x, usando-se filtro de emissão
168 DBP 580- 630nm e excitação DBP 485/20nm.

169 Os espermatozoides foram classificados em membrana intacta quando se
170 apresentavam corados em verde, e com membrana danificada quando corados em
171 vermelho.

172 *Análise da integridade acrossomal*

173 Para avaliação da integridade do acrossoma, utilizou-se o corante isotiocianato
174 de fluoresceína conjugado a Peanut agglutinin (FITC-PNA; Sigma-Aldrich®, St Louis,
175 MO, USA), de acordo com a técnica descrita por Roth et al. (1998), em que uma
176 alíquota de 20µL da solução estoque de FITC-PNA (1mg/mL) foi descongelada e
177 adicionada a 480µL de solução de fosfato tamponada (PBS) para obter a concentração
178 final de 100µg/mL. Alíquotas (20µL) desta solução foram colocadas sobre esfregaços
179 de lâminas contendo espermatozoides, as quais foram incubadas por 20 minutos em
180 câmara úmida a 4°C, na ausência de luz.

181 Após incubação, as lâminas foram enxaguadas duas vezes em PBS refrigerado
182 (4°C) e colocadas para secagem na ausência de luz. Imediatamente antes da avaliação,
183 5µL de meio de montagem UCD (4,5mL de glicerol, 0,5mL de PBS, 5mg de azida
184 sódica e 5mg de p-fenilenodiamina) foram colocados sobre a lâmina e cobertos com
185 lamínula.

186 Foram avaliados 200 espermatozoides por lâmina, com aumento de 1000x, sob
187 óleo de imersão, em microscópio de epifluorescência (Olympus optical Co., Ltda.,
188 Tóquio, Japão), usando-se filtro de emissão LP 515nm e BP 450-490nm para excitação.

189 Os espermatozoides foram classificados como portadores de acrossomas
190 intactos, quando apresentavam a região acrossomal corada com fluorescência verde, ou
191 com acrossoma reagido, quando apresentavam uma faixa verde fluorescente na região
192 equatorial da cabeça espermática ou não apresentavam fluorescência verde em toda
193 região da cabeça.

194 *Análise do potencial de membrana mitocondrial*

195 A função mitocondrial foi determinada pela utilização de um fluorocromo
196 catiônico lipofílico JC-1 (Guthrie & Welch 2006). Para tanto, alíquotas de 50µL de

197 sêmen pós-descongelado foram diluídas em 150 μ L de Tris contendo 5 μ L de JC-1 228
198 (0,15mM em DMSO) e incubadas por 10 minutos a 38°C. Um total de 200
199 espermatozoides foi avaliado em microscópio de epifluorescência (Olympus optical
200 Co., Ltda., Tóquio, Japão), com aumento de 1000x, sob óleo de imersão, usando-se
201 filtro de emissão LP 515nm e BP 450-490nm para excitação.

202 As células coradas em laranja foram classificadas com alto potencial de
203 membrana mitocondrial, e aquelas coradas em verde foram classificadas com baixo
204 potencial de membrana.

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

206 A cinemática espermática foi avaliada por meio de um sistema analisador de
207 espermatozoide auxiliado por computador (CASA). O CASA consistiu de um sistema
208 de microscopia óptica de contraste de fase (Nikon TM H5505, Eclipse 50i, Japão), com
209 iluminação estroboscópica, e uma fase quente a 37°C, uma câmera de vídeo (Basler
210 Visão Technologie TM A312FC, Ahrensburg, Alemanha) e um PC com o analisador de
211 esperma Classe TM software (Microoptics, SL, versão 3.2.0, Barcelona, Espanha).

212 As variáveis cinéticas dos espermatozoides foram avaliadas após a lavagem das
213 amostras em meio Tyrode-albmina-lactato-piruvato (SPERM-TALP) (v/v) e
214 centrifugado a 300x para retirada dos agregados da gema de ovo do meio de
215 criopreservação e posteriormente incubados num banho-maria a 37°C durante 5min.

216 Observou-se: motilidade progressiva (MOP-- μ m/s), velocidade curvilinear
217 (VCL - μ m/s), velocidade em linha reta (VSL - μ m/s), velocidade média do percurso
218 (VAP μ m/s), linearidade (LIN - %), retilinearidade (STR-%), deslocamento lateral de
219 cabeça (ALH - μ m), Wobble (WOB - %) e frequência de batimento cruzado (BCF-Hz),
220 para cada espermatozoide analisado.

221 *Teste de Termorresistência (TTR)*

222 O teste de termorresistência consistiu em avaliar a longevidade dos
223 espermatozoides das amostras de sêmen descongeladas, incubado em banho-maria a
224 37°C por um período de 3 horas.

225 As mostras descongeladas foram acondicionadas em microtubos de 1,5mL e
226 incubadas a 37°C, posteriormente, foram avaliadas quanto à motilidade total (MT - %) e
227 o vigor (1- 5) espermático por meio de microscopia de contraste de fase (Olympus
228 optical Co., Ltda., Tóquio, Japão) com placa aquecedora acoplada, com aumento de
229 400x, nos tempos 0, 60, 120 e 180 minutos pós-descongelção de acordo com Colégio
230 brasileiro de reprodução animal (Cbra, 2013).

231 *Deteção de espécies reativas ao oxigênio (ROS)*

232 O nível intracelular de espécies reativas ao oxigênio (ROS) nos espermatozoides
233 foi determinado utilizando a associação dos corantes fluorescentes Carboxy CM-
234 H2DFFDA (C6827, Invitrogen, Eugene, OR, EUA) e iodeto de propídio (Sigma-
235 Aldrich®, St. Louis, MO, USA).

236 Para cada amostra, 2µl de Carboxy CM-H2DFFDA (0,01mmol) e 1µl de Iodeto
237 de propídio - PI (2,4mmol) foram adicionados a um volume final de 400µl de suspensão
238 de espermatozoides em PBS (10⁷ de células/ml) seguido por incubação durante 30 min.
239 a 37 ° C no escuro e analisadas imediatamente por citômetro de fluxo (Amnis® imaging
240 flow cytometers – EMD Millipore, Darmstadt, Alemanha), equipada com um laser de
241 iões de argon de 488nm a 642nm de excitação e seis canais de imagiologia de alta
242 resolução.

243 Foram analisados 10.000 espermatozoides por amostra. Os dados expressos
244 como a percentagem de espermatozoides com ROS intracelular e membrana plasmática
245 integra (CM-H2DFFDA + / PI -).

246 *Delineamento e análise estatística*

247 O delineamento experimental foi em bloco ao acaso, com sete tratamentos:
248 Controle (0 μ M), A1 (ácido elágico 90% de pureza concentração 0,5mM), A2 (ácido
249 elágico 90% de pureza concentração 1,0mM), A3 (ácido elágico 90% de pureza
250 concentração 2,0mM), D1 (ácido elágico 95% de pureza concentração 0,5mM), D2
251 (ácido elágico 95% de pureza concentração 1,0mM) e D3 (ácido elágico 95% de pureza
252 concentração 2,0mM) em sete coletas. Avaliou-se os dados quanto à normalidade por
253 meio do teste de Shapiro-Wilk. As variáveis: integridade acrossomal, cinética
254 espermática (CASA) e produção de ROS intracelular; foram submetidas à análise de
255 variância (ANOVA) aplicando-se o teste Tukey a 5% de probabilidade para aquelas que
256 apresentaram significância. Integridade da membrana plasmática, potencial de
257 membrana mitocondrial, motilidade e vigor no teste de termorresistência (TTR)
258 apresentaram distribuição não-paramétrica, sendo realizado o teste Kruskal Wallis com
259 a determinação das relações entre as variáveis feita pela correlação de Dunn ($P < 0,05$).
260 Testes foram realizados utilizando-se o software Statistical Analysis System (SAS
261 Institute Inc, 2013).

262 **Resultados e Discussão**

263 Os espermatozóides sofrem uma série de mudanças quando influenciados por uma
264 variedade de fatores, como danos físicos, danos químicos e estresse oxidativo. Por
265 exemplo, a estrutura e a função necessárias para a fertilização espermática são alteradas
266 ou mesmo perdidas durante o processo de criopreservação, restringindo enormemente o
267 uso dessa tecnologia (Pini et al., 2018).

268 O estresse oxidativo é um dos fatores predominantes que são prejudiciais aos
269 espermatozoides durante a criopreservação (Morató et al, 2018). A suplementação de
270 um diluente com antioxidantes melhora o efeito prejudicial da criopreservação na
271 qualidade do esperma (Sobeh et al., 2017).

272 O interesse no ácido elágico aumentou durante última década, devido às suas
273 propriedades biológicas. Com base em modelos in vitro e de pequenos animais, foi
274 relatado que o ácido elágico, é um potente antioxidante, com ação anticarcinogênica e
275 agente antiproliferativo (Dewick, 2009; García-Niño & Zazueta, 2015; Uzar et al.,
276 2012).

277 Alguns estudos descreveram os danos causados aos espermatozóides por
278 oxidantes. A cisplatina induziu anormalidades incrementais nos espermatozóides de
279 ratos que poderiam ser bloqueados pelo ácido elágico (Turk et al. 2008). Da mesma
280 forma, a ciclofosfamida induziu a peroxidação lipídica, levando a danos estruturais nos
281 espermatozóides e no tecido testicular de ratos. O ácido elágico (2 mg / kg) também
282 exerceu um efeito protetor neste cenário (Ceribasi et al. 2010).

283 Os valores de motilidade e vigor de espermatozoides de caprinos após a
284 criopreservação em pureza e concentrações diferentes de ácido elágico no tempo de
285 termorresistência (TTR) a 37°C em 0, 60, 120 e 180 minutos são mostrados na Tabela
286 1. O tempo de incubação reduziu a percentagem de espermatozoides com motilidade
287 total, assim como diminuiu o vigor para todos os tratamentos.

288 A maior concentração de ácido elágico a 90% de pureza foi significativamente
289 inferior ao controle nos tempos 0 e 60min em relação as variáveis de motilidade e vigor.
290 Bem como, a maior concentração de ácido elágico 95% de pureza foi significativamente
291 inferior ao controle nos tempos 0, 60 e 180min em ambas as variáveis. Não foram
292 observadas diferenças estatisticamente significantes entres os tratamentos de purezas
293 diferentes e mesma concentração de ácido elágico.

294 **Tabela 1.** Motilidade total e vigor pós-descongelamento de espermatozoides caprinos
 295 criopreservados em tris-gema suplementado com três diferentes concentrações de ácido
 296 elágico 90% de pureza e três diferentes concentrações de ácido elágico 95% de pureza,
 297 avaliados pelo teste de termorresistência (TTR)

Parâmetro	Tempo (min)	Controle	A1	A2	A3	D1	D2	D3
MOT. (%)	0	30	30	20	10*	30	20	10*
VIG. (1-5)	0	3	3	2	1*	3	2	1*
MOT. (%)	60	30	20	20	10*	20	20	10*
VIG. (1-5)	60	3	2	2	1*	3	2	1*
MOT. (%)	120	20	20	20	10	20	20	0
VIG. (1-5)	120	2	2	2	1	2	2	0
MOT. (%)	180	20	20	20	10	10	10	0*
VIG. (1-5)	180	2	2	2	1	1	1	0*

298 Os valores expressos como mediana. Tratamentos com asteriscos diferem significativamente
 299 comparado o grupo controle (* $p < 0,05$). Shapiro-Wilk, Kruskal-Wallis e Dunn Test.

300

301 O efeito do ácido elágico em diferentes purezas, acrescido ao diluidor de
 302 criopreservação de sêmen, sobre os parâmetros de cinética dos espermatozoides de
 303 caprinos anglonubianos pós descongelamento a 37°C é observado na Tabela 2. A maior
 304 concentração de ácido elágico a 90% de pureza reduziu significativamente os
 305 parâmetros de amplitude de deslocamento lateral da cabeça, hiperatividade, motilidade
 306 progressiva, motilidade total, velocidade média de percurso, velocidade curvilínea e
 307 velocidade em linha reta.

308 Enquanto a maior concentração de ácido elágico a 95% de pureza reduziu
 309 significativamente os parâmetros de amplitude de deslocamento lateral da cabeça,
 310 frequência de batimentos de cauda, hiperatividade, linearidade, motilidade progressiva,
 311 motilidade total, velocidade média de percurso, velocidade curvilínea, velocidade em
 312 linha reta e oscilação.

313

314 **Tabela 2.** Cinética pós-descongelamento de espermatozoides caprinos criopreservados em tris-gema suplementado com três diferentes
 315 concentrações de ácido elágico 90% de pureza e três diferentes concentrações de ácido elágico 95% de pureza, avaliados pelo teste CASA
 316 (Sistema analisador de espermatozoides auxiliado por computador)

Tratamentos	Parâmetros de Cinética										
	ALH	BCF	HIP	LIN	MP	MT	STR	VAP	VCL	VSL	WOB
Controle	2,9±0,3 ^c	9,4±1,1 ^b	5,9±2,4 ^c	71,2±5 ^b	17,8±8,9 ^b	27,2±13,7 ^c	86,2±4,6	72,8±8,3 ^c	91,6±7,5 ^c	64,9±7,9 ^c	81,3±4,8 ^b
A1	2,7±0,31 ^{bc}	7,7±2,7 ^{ab}	5,8±3 ^c	72±4,2 ^b	14,9±9,3 ^b	21,9±11,4 ^{ac}	87,8±2,5	74,1±8,9 ^c	90,2±9,6 ^c	65,1±8,6 ^c	82±3 ^b
A2	2,6±0,4 ^{bc}	8,7±0,6 ^{ab}	3,3±2,8 ^{ac}	66,1±10,3 ^b	11,7±8,1 ^b	24,8±20,5 ^{bc}	83,2±7,4	59,5±11,7 ^{bc}	74,8±10,4 ^{bc}	50,2±13,6 ^{bc}	79±6 ^b
A3	1,6±1 ^{ab*}	5,8±3,4 ^{ab}	0,4±0,6 ^{a**}	52,4±15,1 ^{ab}	1,5±1,8 ^{ab**}	3,8±3,3 ^{a**}	78,7±14,7	39,7±14 ^{ab***}	58,8±18,3 ^{ab**}	31±13,4 ^{ab***}	67,3±11,7 ^{ab}
D1	2,7±0,2 ^{bc}	8,7±0,5 ^{ab}	4,4±2,9 ^{bc}	67,4±7,9 ^b	14,1±8,2 ^b	25,7±13,1 ^c	84±5,8	66,4±13,1 ^c	82,6±13,9 ^{bc}	56,4±13,4 ^c	80±4,6 ^b
D2	2,6±0,4 ^{bc}	9,2±1,2 ^b	2,6±1,9 ^{ac}	67,2±7,2 ^b	8,8±4,5 ^{ab}	16±6,7 ^{ac}	84,7±3,9	65,1±10,2 ^c	82,2±12,4 ^{bc}	55,2±9,5 ^c	79,3±5,8 ^b
D3	1,4±1,3 ^{a**}	5,9±4,3 ^{a*}	0,7±1,5 ^{ab**}	43,9±23,5 ^{a**}	2,1±4,1 ^{a**}	5,4±8,1 ^{ab**}	65±30,5	29±18,1 ^{a***}	43,6±25,5 ^{a***}	22,5±15,3 ^{a***}	57±27,4 ^{a**}

317 Valores expressos como média ± desvio padrão. Tratamentos com asteriscos diferem (* P<0.05, ** P<0.01, *** P<0.001), valores de média com letras
 318 sobrescrito diferentes (a, b ou c) na mesma coluna indicam diferenças significativas (P <0,05) em relação ao grupo Controle. Shapiro-Wilk, ANOVA e
 319 Tukey.

320 **ALH** - Amplitude de deslocamento lateral da cabeça; **BCF** - frequência de batimentos de cauda; **HIP** – hiperatividade; **LIN** – linearidade; **MP** -
 321 motilidade progressiva; **MT** – motilidade total; **STR** - retilinearidade; **VAP** – velocidade media de percurso; **VCL** – velocidade curvilínea; **VSL** -
 322 velocidade em linha reta; **WOB** – oscilação.

323

324 Os resultados de motilidade e vigor no teste de termorresistência (TTR) ao longo do tempo, bem como os parâmetros cinéticos na
 325 avaliação CASA, demonstraram que nas maiores concentrações e pureza do ácido elágico, este apresentou efeito prejudicial à viabilidade
 326 espermática, enquanto que em baixas concentrações não promoveram diferenças significantes quando comparados ao controle. Estes
 327 achados contrastam ao esperado, entretanto corroboram com os resultados de outros estudos onde o antioxidante curcumina causou uma
 328 diminuição na motilidade espermatozóide, na reação de capacitação/acrossoma e na fertilização murina in vitro (Naz, 2011), e o ácido
 329 elágico provocou efeitos deletérios, especialmente nas concentrações de 2 e 4mM em relação à atividade mitocondrial em carneiro merino.
 330 Provavelmente, efeitos tóxicos causados por superdose destas substancias (Omur et al., 2016).

331 A integridade da membrana plasmática e do acrossoma é a base do metabolismo
 332 dos espermatozoides e é crucial para a participação na fertilização dos óvulos-
 333 espermatozoides (Zheng et al., 2017). Modificações no potencial de membrana
 334 mitocondrial têm mostrado ser uma função da integridade funcional das mitocôndrias
 335 dos espermatozoides (Gravance et al., 2001).

336 Os parâmetros de avaliação dos espermatozoides, em termos de integridade da
 337 membrana plasmática, integridade acrossomal e potencial de membrana mitocondrial
 338 estão resumidos na Tabela 3. A maior concentração de ácido elágico 90% de pureza
 339 apresentou resultado significativamente inferior em relação ao controle ($p>0,05$) para a
 340 variável potencial da membrana mitocondrial. As concentrações D2 e D3 de ácido
 341 elágico 95% foram significativamente inferiores ao controle ($p<0,05$) em relação ao
 342 potencial de membrana mitocondrial.

343 **Tabela 3.** Integridade da membrana plasmática, potencial mitocondrial e Integridade
 344 acrossomal pós-descongelamento de espermatozoides caprinos criopreservados em Tris-
 345 gema suplementado com três diferentes concentrações de ácido elágico 90% de pureza e
 346 em três diferentes concentrações de ácido elágico 95% de pureza

Tratamentos	Integridade da Membrana Plasmática(%)	Potencial da Membrana Mitocondrial (%)	Integridade Acrossomal (%)
CONTROLE	29,4 ± 23,1	37,4 ± 6,3	48,0 ± 11,2 ^b
A1	30,1 ± 16,7	28,4 ± 11,8	37,8 ± 16,9 ^{ab}
A2	15,8 ± 10,9	11,7 ± 5,4	43,8 ± 16,4 ^b
A3	18,4 ± 9,6	13,3 ± 5,5*	32,0 ± 13,2 ^{ab}
D1	20,9 ± 11,6	19,1 ± 14,3	38,7 ± 17,4 ^{ab}
D2	15,6 ± 6,2	11,7 ± 4,5*	27,4 ± 14,2 ^{ab}
D3	12,0 ± 4,9	9,1 ± 4,5*	20,3 ± 6,9 ^{a*}

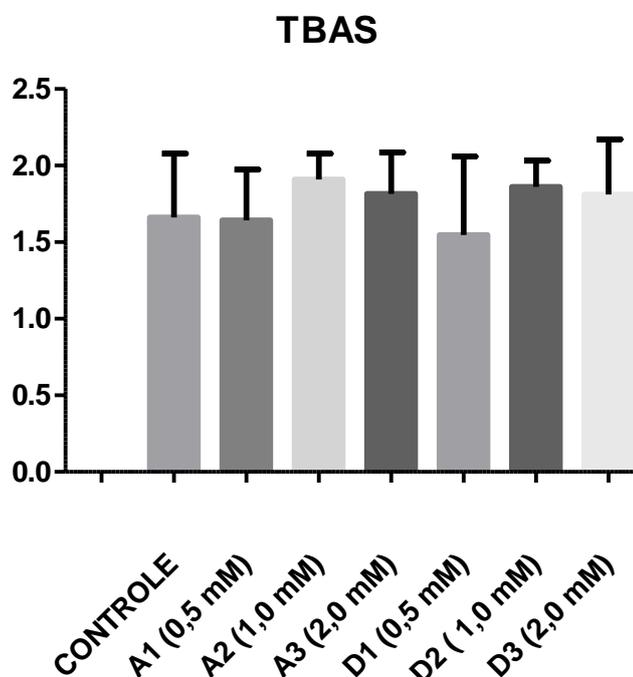
347 Valores expressos como média ± desvio padrão. Tratamentos com asteriscos diferem ($p<0,05$), valores de
 348 média com letras sobrescrito diferentes (a, b) na mesma coluna indicam diferenças significativas ($p<0,05$)
 349 em relação ao grupo Controle. Integridade da Membrana Plasmática e Potencial da Membrana
 350 Mitocondrial: Shapiro-Wilk, Kruskal-Wallis, Dunn. Integridade Acrossomal: Shapiro-Wilk, ANOVA e
 351 Tukey

352 As mitocôndrias dos espermatozoides são conhecidas por serem fonte de espécies
 353 reativas de oxigênio (ROS), além de controlar a produção/consumo de ATP. (Saleh &
 354 Agarwal, 2002). A produção excessiva de ROS pode sobrecarregar o sistema de defesa

355 antioxidante endógeno no espermatozóide, resultando em peroxidação lipídica (LPO),
356 que tem sido associada ao comprometimento da função da membrana (Sikka, 2004).

357 Estudos confirmam que os níveis elevados de ROS no sêmen criopreservado
358 diminuíram a qualidade espermática devido ao desequilíbrio no sistema de defesa
359 antioxidante (Amidi et al., 2016; Longobardi et al., 2017). A suplementação com
360 antioxidantes poderia prevenir este processo (Sikka, 2004).

361 No entanto, no presente estudo, o antioxidante ácido elágico aparentemente não
362 atingiu eficácia alguma na prevenção da formação de LPO, quando comparados os
363 parâmetros de ROS ao controle (Figura 1). Estudos relacionados à LPO corroboram
364 com os resultados encontrados, em que não foi registrado um decréscimo no nível de
365 MDA na presença de ácido hialurônico e tióis para o estado congelado (Bukat et al.
366 2008) ou em metionina e ditioeritritol para armazenamento de esperma líquido (Coyan
367 et al. 2010).



368

369 Valores expressos como média \pm desvio padrão. Shapiro-Wilk, ANOVA e Tukey.

370 **Figura 1.** Geração intracelular de ROS pós-descongelção em espermatozoides
371 caprinos criopreservados em Tris-Gema suplementado com três diferentes

372 concentrações de ácido elágico 90% de pureza e em três diferentes concentrações de
373 ácido elágico 95% de pureza.

374

375 Os resultados obtidos permitem concluir que a suplementação do diluidor de
376 criopreservação tris-gema com ácido elágico, nas concentrações e purezas utilizadas,
377 causa a diminuição da viabilidade espermática do sêmen caprino anglonubiano com
378 redução significativa ($p > 0,05$) dos parâmetros motilidade e vigor no TTR, cinética
379 CASA nas concentrações A3 e D3; e, potencial de membrana mitocondrial na
380 concentração A3 e concentrações D2 e D3, quando comparados ao controle. As demais
381 concentrações acrescentadas ao diluidor não provocaram diferenças significantes.

382 Referências

383 ALCAY, S.; GOKCE, E.; TOKER, M.B.; ONDER, N.T.; USTUNER, B.; UZABAC,
384 E.; GUL, Z.; CAVUS, S. Freeze-dried egg yolk based extenders containing various
385 antioxidants improve post-thawing quality and incubation resilience of 445 goat
386 spermatozoa. **Cryobiology**, 72: 269-273, 2016.

387 AMIDI, F. et al. The role of antioxidants in sperm freezing: a review. **Cell and tissue**
388 **banking**, v. 17, n. 4, p. 745-756, 2016.

389 BUCAK, M.N.; ATEŞŞAHIN, A.; YÜCE, A. Effect of anti-oxidants and oxidative
390 stress parameters on ram semen after the freeze–thawing process. **Small Ruminant**
391 **Research**, v. 75, n. 2-3, p. 128-134, 2008.

392 BUCAK, M.N. et al. Effects of antioxidants on post-thawed bovine sperm and
393 oxidative stress parameters: antioxidants protect DNA integrity against cryodamage.
394 **Cryobiology**, v. 61, n. 3, p. 248-253, 2010. Coletto et al. 2002.

395 CARNEIRO, J.A.M.; CANISSO, I.F.; BANDEIRA, R.S.; SCHEEREN, V.F.C.;
396 FREITAS-DELL'AQUA, C.P.; ALVARENGA, M.A.; PAPA, F.; DELL'AQUA,
397 J.A.JR. Effects of coenzyme Q10 on semen cryopreservation of stallions classified as
398 having good or bad semen freezing ability. **Anim Reprod Sci**, 192: 107-118. 2018.

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

401 ÇERİBAŞI, A.O. et al. Toxic effect of cyclophosphamide on sperm morphology,
402 testicular histology and blood oxidant-antioxidant balance, and protective roles of
403 lycopene and ellagic acid. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, v. 107, n. 3,
404 p. 730-736, 2010.

- 405 COLETO, Z. F., GUERRA, M. M. P., AND BATISTA, A. M. Avaliação do sêmen
406 congelado de caprinos com drogas fluorescentes. **Rev. Bras. Med. Vet.** 24, 101-104,
407 2002.
- 408 ÇOYAN, K. et al. Influence of methionine and dithioerythritol on sperm motility, lipid
409 peroxidation and antioxidant capacities during liquid storage of ram semen. **Research**
410 **in veterinary science**, v. 89, n. 3, p. 426-431, 2010.
- 411 DEWICK, P. M. Medicinal Natural Products. **Chichester**, UK: John Wiley & Sons,
412 Ltd, 2009.
- 413 GARCÍA-NIÑO, W. R.; ZAZUETA, C. Ellagic acid: pharmacological activities and
414 molecular mechanisms involved in liver protection. **Pharmacological Research**, v. 97,
415 p. 84–103, 2015.
- 416 GRAVANCE, C.G.; GARNER, D.L.; MILLER, M.G. et al. Fluorescent probes and
417 flow cytometry to assess rat sperm integrity and mitochondrial function. **Reprod.**
418 **Toxicol.**, v.15, p.5-10, 2001.
- 419 GUTHRIE, H.D.; WELCH, G.R. Determination of intracellular reactive oxygen
420 species and high mitochondrial membrane potential in Percoll-treated viable boar
421 sperm using fluorescence-activated flow cytometry. **Journal of Animal Science**, v. 84,
422 p. 2089-2100, 2006.
- 423 LONGOBARDI, V. et al. Resveratrol prevents capacitation-like changes and improves
424 in vitro fertilizing capability of buffalo frozen-thawed sperm. **Theriogenology**, v. 88, p.
425 1-8, 2017.
- 426 MANACH, C.; SCALBERT, A.; MORAND, C.; REMESY, C.; JUMENEZ, L.
427 Polyphenols: food sources and bioavailability. **American Journal Clinical Nutrition**,
428 New York, n.79, p.727-47, 2004.
- 429 MORATÓ, R.; PRIETO-MARTÍNEZ, N.; MUIÑO, R.; HIDALGO, C.O.;
430 RODRÍGUEZ-GIL, J.E.; BONET, S.; YESTE, M.; Aquaporin 11 is related to
431 cryotolerance and fertilising ability of frozen? thawed bull spermatozoa. **Reprod Fertil**
432 **Dev**, doi: 10.1071/RD17340, 2018.
- 433 NAZ, R.K. Can curcumin provide an ideal contraceptive?. **Molecular reproduction**
434 **and development**, v. 78, n. 2, p. 116-123, 2011.
- 435 NUNCIO-JÁUREGUI, N.; NOWICKA, P.; MUNERA-PICAZO, S.; HERNÁNDEZ,
436 F.; CARBONELL-BARRACHINA, Á. A.; WOJDYŁO, A. Identification and
437 quantification of major derivatives of ellagic acid and antioxidant properties of thinning
438 and ripe Spanish pomegranates. **Journal of Functional Foods**, v. 12, p. 354–364,
439 2015.
- 440 OMUR, A. D. et al. Protective effects of the antioxidants curcumin, ellagic acid and
441 methionine on motility, mitochondrial transmembrane potential, plasma membrane and
442 acrosome integrity in freeze-thawed Merino ram sperm. **Vet Med**, v. 61, n. 1, p. 10-16,
443 2016.

- 444 PINI, T.; DE GRAAF, S.P.; DRUART, X.; TSIKIS, G.; LABAS, V.; TEIXEIRA-
445 GOMES, A.P.; GADELLA, B.M.; LEAHY, T. Binder of Sperm Proteins 1 and 5 have
446 contrasting effects on the capacitation of ram spermatozoa. **Biol Reprod**, 98: 765-775
447 2018.
- 448 SALEH, R.A.; HCLD, ASHOK AGARWAL. Oxidative stress and male infertility:
449 from research bench to clinical practice. **Journal of andrology**, v. 23, n. 6, p. 737-752,
450 2002.
- 451 SIKKA SC. Role of oxidative stress and antioxidants in andrology and assisted
452 reproductive technology, *J. Androl.* 25 5–18, 2004.
- 453 SOBEH, Mansour et al. Polyphenolics from *Albizia harveyi* exhibit antioxidant
454 activities and counteract oxidative damage and ultra-structural changes of cryopreserved
455 bull semen. **Molecules**, v. 22, n. 11, p. 1993, 2017.
- 456 TÜRK, Gaffari et al. Improvement of cisplatin-induced injuries to sperm quality, the
457 oxidant-antioxidant system, and the histologic structure of the rat testis by ellagic acid.
458 **Fertility and Sterility**, v. 89, n. 5, p. 1474-1481, 2008.
- 459 UZAR, E.; ALP, H.; CEVIK, M. U.; FIRAT, U.; EVLIYAOGU, O.; TUFEK, A.;
460 ALTUN, Y. Ellagic acid attenuates oxidative stress on brain and sciatic nerve and
461 improves histopathology of brain in streptozotocin-induced diabetic rats. **Neurological**
462 **Sciences**, v. 33, n. 3, p. 567–574, 2012.
- 463 ZHENG, Yuxin et al. Effects of water-soluble *Laminaria japonica* polysaccharide 3
464 (LJP-P3) on bull cryopreservation sperm. **Cryobiology**, v. 79, p. 50-55, 2017.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados obtidos permitem concluir que a suplementação do diluidor de criopreservação tris-gema com os antioxidantes e concentrações estudadas não provocam alterações significativas na redução das ROS e conseqüentemente não produzem melhorias na viabilidade espermática dos espermatozoides caprinos da raça anglonubiana.

O ácido elágico, nas concentrações e purezas utilizadas, causa a diminuição da viabilidade espermática do sêmen caprino anglonubiano com redução significativa ($p > 0,05$) dos parâmetros motilidade e vigor no TTR, cinética CASA nas concentrações A3 e D3; e, potencial de membrana mitocondrial na concentração A3 e concentrações D2 e D3 quando comparados ao controle. Resultado, provavelmente, de efeitos tóxicos causados por superdose dessa substância. Nas demais concentrações acrescentadas ao diluidor não foram observadas diferenças significantes.

A suplementação do diluidor de criopreservação tris-gema com β -cariofileno, nas concentrações utilizadas, não produziu alterações significativas ($p > 0,05$) na qualidade espermática do sêmen caprino anglonubiano.

Multiplos são os fatores que envolvem o estudo dos danos oxidativos que comprometem a funcionalidade e a integridade das células espermáticas. A busca por substâncias com atividade antioxidante, em determinadas ocasiões, extrapola o conhecimento sobre os princípios da criopreservação, da bioquímica e da fisiologia espermática. Buscou-se literatura que norteasse o melhor entendimento dos resultados obtidos, no entanto, fez-se evidente a necessidade de maiores estudos para a elucidação de mecanismos que possibilitem a compreensão da ação destes antioxidantes neste contexto.

6 REFERÊNCIAS

- AISEN, E.G. **Reprodução ovina e caprina**. São Paulo: Medvet, V.1, 203P., 2008.
- AISEN, E.G.; MEDINA, V.H.; VENTURINO, A. Cryopreservation and post-thawed fertility of ram semen frozen in different trehalose concentrations. **Theriogenology**, v. 57, p. 1801- 1808, 2002.
- AITKEN, R. J. A Free radical theory of male infertility. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 6, n.1, p. 19-24, 1994.
- ALHAIDER, A.K.; WATSON, P.F. Cryopreservation of dog semen: The effects of Equex STM paste on plasma membrane fluidity and the control of intracellular free calcium. **Animal Reproduction Science**, v.110, p.147-161, 2009.
- ALVAREZ, J.G.; STOREY, B.T. Role of glutathione peroxidase in protecting mammalian spermatozoa from loss of motility caused by spontaneous lipid peroxidation. **Gamete Research**, v. 23, p. 77-90, 1989.
- ALVAREZ, J.G.; STOREY, B.T. Taurine, hypotaurine, epinephrine and albumin inhibit lipid peroxidation in rabbit spermatozoa and protect against loss of motility. **Biology of Reproduction**, v. 29, p. 548-555, 1983.
- AMANN, R. P.; GRAHAM, J. K. Sperm function. In: Mckinnon, A. O.; Voss, J. L. (Ed.). **Equine reproduction. Philadelphia: Lea & Febiger**. p.735-736, 1993.
- AMANN, R. P.; GRAHAM, J. K. Spermatozoal function. In: **McKINNON, A. O.; VOSS, J. L. Equine Reproduction. Philadelphia: Lea e Febiger**. Cap. 80, p.717-718, 1992.
- AMANN, R. P.; PICKETT, B. W. Principles of cryopreservation and a review of cryopreservation of stallion spermatozoa. **Equine Veterinary Science**, v.7, p.145-173, 1987.
- AMANN, R.; KATZ, D.F. Reflections on CASA after 25 years. **Journal Andrology**, v.25, p.317-325, 2004.
- ANDREADI, C. K.; HOWELLS, L. M.; ATHERFOLD, P. A.; MANSON, M.M. Involvement of Nrf2, p38, B-Raf, and nuclear factor-kappaB, but not phosphatidylinositol 3-kinase, in induction of hemoxygenase-1 by dietary polyphenols. **Mol. Pharmacol.** 69:1033–1040; 2006.
- ARMSTRONG, J. S.; RAJASEKARAN, M.; CHAMULITRAT, W.; GATTI, P.; HELLSTROM, W. J.; SIKKA, S. C. Characterization of reactive oxygen species induced effects on human spermatozoa movement and energy metabolism. **Free Radical Biology & Medicine**, v.26, n.7/8, p. 869-880, 1999.
- ARRUDA, R. P.; CELEGHINI, E. C. C.; SOUZA, L. W. O.; NASCIMENTO, J.; ANDRADE, A. F. C.; RAPHAEL, C. F.; GARCIA, A. R. Importância da qualidade do

sêmen em programas de IATF e TETF. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 33, p. 145-150, 2005.

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.

BALL, B.A.; VO, A.T.; BAUMBER, J. Generation of reactive oxygen species by equine spermatozoa. **American Journal of Veterinary Research**, v. 62, p. 508-515, 2001.

BARCH, D.H.; RUNDHAUGEN, L.M.; STONER, G.D.; PILLAY, N.S.; ROSCHE, W.A. Structure-function relationships of the dietary anticarcinogen ellagic acid. **Carcinogenesis**, 17 (2): 265-269, 1996.

BARROS, P. M. H. **Estresse oxidativo e integridade do DNA em sêmen resfriado de gato- do-mato (*Leopardus tigrinus*, SCHREBER,1775)**. 2007. 120 f. Tese (Doutor em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

BAUMBER, J.; BALL, B.A.; LINFOR, J.J. et al. Reactive oxygen species and cryopreservation promote DNA fragmentation in equine spermatozoa. **Journal of Andrology**, v. 24, n. 4, p. 621-628, 2003.

BAUMBER, J.; VO, A.; SABEUR, K.; BALL, B. A. Generation of reactive oxygen species by equine neutrophils and their effect on motility of equine spermatozoa. **Theriogenology**, v. 57, p.1025-1033, 2002.

BECONI, M.T.; FRANCA, C.R.; MORA, N.G. et al. Effect of natural antioxidants on frozen bovine semen preservation. **Theriogenology**, v. 40, p. 841-851, 1993.

BILODEAU, J. F.; BLANCHETTE, S.; 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.; BLANCHETTE, S.; GAGNON, C. et al. Thiols prevent H₂O₂-mediated loss of sperm motility in cryopreserved bull semen. **Theriogenology**, v. 56, p. 275-286, 2001.

BLAKE, D.; WINYARD, P. G. **Immunopharmacology of Free Radical Species**. New York: Academic Press. 1995, p 301.

BUCAK, M. M. et al. Effect of antioxidants on microscopic semen parameters, lipid peroxidation and antioxidant activities in Angora goat semen following cryopreservation. **Small ruminant research**, v. 81, n. 2-3, p. 90-95, 2009.

BUCAK, M. N.; ATEŞŞAHİN, A.; YÜCE, A.. Effect of anti-oxidants and oxidative stress parameters on ram semen after the freeze–thawing process. **Small Ruminant Research**, v. 75, n. 2-3, p. 128-134, 2008.

BUCAK, Mustafa Numan et al. The effect of antioxidants on post-thawed Angora goat (*Capra hircus ancyrensis*) sperm parameters, lipid peroxidation and antioxidant activities. **Small Ruminant Research**, v. 89, n. 1, p. 24-30, 2010.

CALLEJA, M. A.; VIEITES, J.M.; MONTERO-MELÉNDEZ, T.; TORRES, M.I.; FAUS, M.J.; GIL, A.; SUÁREZ, A. The antioxidant effect of β -caryophyllene protects rat liver from carbon tetrachloride-induced fibrosis by inhibiting hepatic stellate cell activation. **British Journal of Nutrition**, v. 109, n. 3, p. 394-401, 2013.

CÂMARA, D. R.; GUERRA, M. M. P. Mitocôndria espermática: além da síntese de adenosina trifosfato (ATP). **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 32, n. 2, p. 93-99, 2008.

CARDOSO, L. M. Espécies reativas de oxigênio no controle neurovegetativo da pressão arterial. In: **SIMPÓSIO BRASILEIRO DE FISIOLÓGIA CARDIOVASCULAR, Anais... Ribeirão Preto - SP (Medicina)**, v.39. n.1. p. 77-88, jan./mar, 2006.

CARDOSO, N. A. **Efeitos comportamentais e neuroquímicos do beta-cariofileno em modelos experimentais de ansiedade e depressão em camundongos**. Universidade Federal do Ceará, Campus Sobral, Sobral, 2018.

CARDOSO, R.C.S.; SILVA, A.R.; SILVA, L.D.M. Use of the powdered coconut water (ACP®-106) for cryopreservation of canine spermatozoa. **Animal Reproduction Science**, v.2, p.257-262, 2005.

CARVALHO, O.F.; FERREIRA, J.D.J.; SILVEIRA, N.A.; FRENEAU, G.E. Efeito oxidativo do óxido nítrico e infertilidade no macho. **J Bras Patol Med Lab**, v.38, p.33-38, 2002.

CHECK, M.L.; CHECK, J.H. Poor hypo-osmotic swelling test results from cryopreserved sperm despite preservation of sperm motility. **Archives of Andrology**, v. 26, p. 37-41, 1991.

CHEN, Y.; FOOTE, R.H.; BROCKETT, C.C. Effect of sucrose, trehalose, hypotaurine, taurine, and blood serum on survival of frozen bull sperm. **Cryobiology**, v. 30, p. 423-431, 1993.

CHENG, J. DONG S.; YI L.; GENG D.; LIU Q. Magnolol abrogates chronic mild stress-induced depressive-like behaviors by inhibiting neuroinflammation and oxidative stress in the prefrontal cortex of mice. **International Journal of Immunopharmacology**, v. 59, p. 61-67, 2018.

CHENG, Y. DONG S.; LIU S. β -Caryophyllene ameliorates the Alzheimer-like phenotype in APP/PS1 Mice through CB2 receptor activation and the PPAR γ pathway. **Pharmacology**, v. 94, n. 1, p. 1-12, 2014.

CHOI, I. Y.; JU C.; ANTHONY J. A. M.; LEE, D. I.; PRATHER, P.L.; KIM W. K. Activation of cannabinoid CB2 receptor-mediated AMPK/CREB pathway reduces cerebral ischemic injury. **American Journal of Pathology**, v. 182, n. 3, p. 928-939, 2013.

COLETO, Z. F., GUERRA, M. M. P., AND BATISTA, A. M. Avaliação do sêmen congelado de caprinos com drogas fluorescentes. **Rev. Bras. Med. Vet.** 24, 101-104, 2002.

COLETO, Z.F.; SOUZA, A.F.; BERINSON, K.M. et al. **Efeito da adição de diferentes concentrações de vitamina C e Trolox ao sêmen criopreservado de cães.** In: CONGRESSO NORTE-NORDESTE DE REPRODUÇÃO ANIMAL, 3, Belém, 2006.

CORTELL, J.M. goat production: collection, processing and artificial insemination of goat semen. **Academic press:** london, P. 171-191, 1981.

COUTINHO, J. P. **Produção e caracterização da carne de sol da carne de caprinos da Raça Anglo Nubiana elaborada com diferentes teores de cloreto de sódio.** / Jean Pereira Coutinho. – Itapetinga, BA: Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, 2011.

CUNHA, I.C.N. **Estudo da viabilidade do processo de refrigeração do sêmen canino utilizando-se diluidores à base de leite e glicina-gema.** 124p. Dissertação (Mestrado em Reprodução Animal) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, São Paulo, 1997.

CUNNINGHAM, J. G.; KLEIN, B. G. **Tratado de fisiologia veterinária.** 4. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008, 710 p.

DALIMATA, A. M.; GRAHAM, J.K. cryopreservation of rabbit spermatozoa using acetamide in combination with trehalose and methylcellulose **Theriogenology**, V.49, 831-841, 1997.

DALVI, L. T. **Mecanismos de ação de antioxidantes de origem vegetal: estudo do polifenol ácido elágico e do extrato de caqui (Diospyros kaki).** Brasília: Universidade de Brasília (UnB). Programa de pós-graduação em Nutrição Humana; 2008.

De LEEUW, F.E.; de LEEUW, A.M.; DEN DAAS, J.H. et al. Effects of various cryoprotective agents and membrane-stabilizing compounds on bull sperm membrane integrity after cooling and freezing. **Cryobiology**, v. 3, p. 32-44, 1993.

DEWICK, P. M. Medicinal Natural Products. **Chichester**, UK: John Wiley & Sons, Ltd, 2009.

DONNELLY, E.T.; McCLURE, N.; LEWIS, S.E. Antioxidant supplementation in vitro does not improv human sperm motility. **Fertility and Sterility**, v. 72, n. 3, p. 484-95, 1999.

DORADO, J. et al. Assessment of goat semen freezability according to the spermatozoa characteristics from fresh and frozen samples. **Animal Reproduction Science**, v. 112, n. 1, p. 150-157, 2009.

DUKINC, V.; BEZIC, N.; VUKO, E. Antiphytoviral activity of essential oil from endemic species *Teucrium arduini*. **Natural Products Communications**, v. 6, n. 9, p. 1385-1388, 2011.

EL-ALAMY, M.A.; FOOTE, R.H. Freezability of spermatozoa from Finn and Dorset rams in multiple semen extenders. **Animal Reproduction Science**, v. 65, p. 245-254, 2001.

EVENSON, D.P.; JOST, L.K.; MARSHALL, D.; ZINAMAN, M.J.; CLEGG, E.; PURVIS, K.; DE ANGELIS, P.; CLAUSSEN, O.P. Utility of the sperm chromatin structure assay as a diagnostic and prognostic tool in the human fertility clinic. **Hum Reprod**, v.14, p.1039-1049, 1999.

FARSHAD, A.; KHALILI, B., FAZELI, P. The effect of different concentrations of glycerol and DMSO on viability of Markhoz goat spermatozoa during different freezing temperatures steps. **Pakistan Journal of Biological Sciences**, v. 12, n. 3, p. 239-245, 2009.

FIDYT, K. et al. β -caryophyllene and β -caryophyllene oxide — natural compounds of anticancer and analgesic properties. **Cancer Medicine**, v. 5, n. 10, p. 3007-3017, 2016.

FOOTE, R.H.; BROCKETT, C.C.; KAPROTH, M.T. Motility and fertility of bull sperm in whole milk extender containing antioxidants. **Animal Reproduction Science**, v. 71, p. 13-23, 2002.

FRANDSON, R. D.; WILKE, W. L.; FAILS, A. D. **Anatomia e Fisiologia os Animais de Fazenda**. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara, 2005. 454 p.

FUNAHASHI, H.; SANO, T. Select antioxidants improve the function of extended boar semen stored at 10 C. **Theriogenology**, v. 63, n. 6, p. 1605-1616, 2005.

GADEA J., MATAS C. & LUCAS X. Prediction of porcine semen fertility by homologous in vitro penetration hIVP/assay. **Animal Reproduction Science**. 56: 95-108. 1998.

GARCIA, M. H. O.; BEZERRA, F. J.; SANTOS FILHO, J. M.; RONDINA, D.; SILVA, D. P. G.; OLIVEIRA FILHO, J. P. **Aspectos qualitativos das carcaças de caprinos anglo nubiano x SRD e Boer x SRD abatidos em duas faixas de peso**. Revista científica eletrônica de medicina veterinária. Publicação científica da faculdade de medicina veterinária e zootecnia de garça/FAMED Ano III, Número 6, janeiro de 2006.

GARCÍA-NIÑO, W. R.; ZAZUETA, C. Ellagic acid: pharmacological activities and molecular mechanisms involved in liver protection. **Pharmacological Research**, v. 97, p. 84–103, 2015.

GARNER, D.L.; PINKEL, D. ; JOHNSON, L. A. ; PACE, M. M. Assessment of spermatozoal function using dual fluorescent staining and flow cytometric analyses. **Biology of Reproduction**, v.34, p.127-138, 1997.

GHELARDINI, C.; GALEOTTI, N.; SALVATORE, G.; MAZZANTI, G. Local anaesthetic activity of the essential oil of *Lavandula angustifolia*. **Planta Medica**, v. 65, n. 8, p. 700-703, 1999.

GONÇALVES, P. B. D.; FIGUEIREDO, J. R.; FREITAS, V. J. F. **Biotécnicas aplicadas à reprodução animal**. 2. ed. São Paulo: Roca, 2008. 395 p.

GONZALEZ, R.A.F. **Efeito da criopreservação usando diferentes técnicas de congelação e crioprotetores sob parâmetros espermáticos e a integridade de membranas no espermatozoide bovino.** Universidade de São Paulo. Pirassununga. 2004.

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

GUO, K.; MOU, X.; HUANG, J.; XIONG, N.; LI, H. Trans-caryophyllene suppresses hypoxia-induced neuroinflammatory responses by inhibiting NF- κ B activation in microglia. **The Journal of Molecular Neuroscience**, v. 54, n. 1, p. 41-48, 2014.

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.** São Paulo, Brasil Manole, 7ed, 2004.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. **Antioxidant defenses.** In: Free radicals in biology and medicine. Oxford: Clarenton Press,1999. p.105-245.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. **Free Radicals in Biology and Medicine.** Oxford: Claredon Press, 1989, 543 p.

HAMMERSTEDT, R.H.; GRAHAM, J.K.; NOLAN, J.P. Cryopreservation of mammalian sperm: what we ask them to survive. **Journal of Andrology**, v.11, p.73-88, 1990.

HEMACHAND, T.; SHAHA, C. Functional role of sperm surface glutathione S-transferases and extracellular glutathione in the haploid spermatozoa under oxidative stress. **FEBS Lett**, v.538, p.14-18, 2003.

HINKOVSKA-GALCHEVA, V.; PETKOVA, D.; KOUMANOV, K. Changes in the phospholipid composition and phospholipid asymmetry of ram sperm plasma membranes after cryopreservation. **Cryobiology**, v. 26, p. 70-75, 1989.

HO, C. L.; LIAO, P.C.; WANG, E.I.; SU, Y.C. Composition and antifungal activities of the leaf essential oil of *Neolitsea parvigemma* from Taiwan. **Natural Product Communications**, v. 6, n. 9, p. 1357-1360, 2011.

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.

HOLMES, R.P.; GOODMAN, H.O.; SHIHABI, Z.K. et al. The taurine and hypotaurine content of human semen. **Journal of Andrology**, v. 13, p. 289-292, 1992.

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

HSU, P.C.; LIU, M.Y.; HSU, C.C.; CHEN, L.Y.; GUO, Y. L. Effects of vitamin E and/or C on reactive oxygen species-related lead toxicity in rat sperm. **Toxicology**, v. 128, p. 169-179, 1998.

JAKOBS, S.; FRIDRICH, D.; HOFEM, S.; PAHLKE, G.; EISENBRAND, G. Natural flavonoids are potent inhibitors of glycogen phosphorylase. **Mol. Nutr. Food Res.** 50:52–57; 2006.

JONES, R.; MANN, T. Damage to spermatozoa by peroxidation endogenous phospholipids. **Journal of reproduction and fertility**, V. 50, P. 261-68,1977.

KHOSRO, B.; ZARGHAMI N. Fatty acid composition of human spermatozoa and seminal plasma levels of stress biomarkers in subfertile males. **Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids**, v.77, p.117, 2007.

KITIYANANT Y, CHAISALEE B, PAVASUTHIPASIT K. Evaluation of the acrossome reaction and viability in buffalo spermatozoa using two staining methods: the effects of heparin and calcium ionophore A23187. **International Journal of Andrology**, v.25, p.215-222, 2002.

KOBAYASHI, C.; FONTANIVE, T.O.; ENZWEILER, B.G.; DE BONA, L.R.; MASSONI, T.; APEL, M.A.; HENRIQUES, A.T.; RICHTER, M.F.; ARDENGHI, P.; SUYENAGA, E.S. Pharmacological evaluation of Copaifera multijuga oil in rats. **Pharmaceutical Biology**, v. 49, n. 3, p. 306-313, 2011.

KÜÇÜK, N. et al. Comparison of two different cryopreservation protocols for freezing goat semen. **Cryobiology**, v. 68, n. 3, p. 327-331, 2014.

KULAKSIZ, R. et al. The effect of different glycerol concentrations on freezability of semen from Angora, Kilis and Saanen goats. **Slovak Journal of Animal Science**, v. 46, n. 2, p. 39-44, 2013.

KUMAR, S.; MILLAR, J.D.; WATSON, P.F. The effect of cooling rate on the survival of cryopreserved bull, ram, and boar spermatozoa: a comparison of two controlled-rate cooling machines. **Cryobiology**, v.46, p.246-253, 2003.

LABIENIEC, M.; GABRYELAK, T. Antioxidative and oxidative changes in the digestive gland cells of freshwater mussels *Unio tumidus* caused by selected phenolic compounds in the presence of H₂O₂ or Cu²⁺ ions. **Toxicology in Vitro** (21): 146–156, 2007.

LEBOEUF, B.; RESTALL, B.; SALAMON, S. Production and storage of goat Semen for artificial insemination. **Animal reproduction science**, V.62, P.113-141, 2000.

LEITE, N. F.; SOBRAL-SOUZA, C.E.; ALBUQUERQUE, R. S.; BRITO, D.I.V.; LAVOR, A.K.L.S.; ALENCAR, L.B.B.; TINTINO, S.R.; FERREIRA, J.V.A.; FIGUEREDO, F.G.; LIMA, L.F.; CUNHA, F.A.B.; PINHO, A. I.; COUTINHO, H.D.M. Atividade antiparasitária in vitro e citotóxica de cariofileno e eugenol contra Trypanosoma cruzi e Leishmania brasiliensis. **Rev. cuba. plantas med**;18(4):522-528, oct.-dic. 2013.

LIU, H.; SONG, Z.; LIAO, D.; ZHANG, T.; LIU, F.; ZHUANG, K.; LUO, K.; YANG, L. Neuroprotective effects of trans-caryophyllene against kainic acid induced seizure activity and oxidative stress in mice. **Neurochemical Research**, v. 40, n. 1, p. 118-123, 2015.

LOIZZO, M. R. et al. Antiproliferative effects of essential oils and their major constituents in human renal adenocarcinoma and amelanotic melanoma cells. **Cell Proliferation**, v. 41, n. 6, p. 1002-1012, 2008.

MACK, S.O.; WOLF, D.F. TASH, J.S. Quantitation of specific parameters of motility in large numbers of human sperm by digital image processing. **Biology of Reproduction**, v.38, p.270-281, 1988.

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.

MANACH, C.; SCALBERT, A.; MORAND, C.; REMESY, C.; JUMENEZ, L. Polyphenols: food sources and bioavailability. **American Journal Clinical Nutrition**, New York, n.79, p.727-47, 2004.

MARCO-JIMÉNEZ, F.; VIUDES-DE-CASTRO, M. P.; BALASCH, S.; MOCÉ, E.; SILVESTRE, M. A.; GOMEZ, E. A.; VICENTE, J. S. Morphometric changes in goat sperm heads induced by cryopreservation. **Cryobiology**, v. 52, p. 295-304, 2006.

MAXWELL, W.M.C; STOJANOV, T. Liquid storage of ram semen in the absence or presence of some antioxidants. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 8, p. 1013-1020, 1996.

MCKINNON, A. O.; VOSS, J. L. **Equine reproduction**. 1. ed. North Providence Road: Williams & Wilkins, p.1137, 1993.

MEDEIROS, C.M.O.; FORELL, F.; OLIVEIRA, A.T.D.; RODRIGUES, J.L. current status of sperm cryopreservation: why isn't it better? **Theriogenology**, V.57, P. 327-344, 2002.

MEDEIROS, J. X. **Situação atual das cadeias produtivas**. In: REUNIAO TECNICA APOIO A CADEIA PRODUTIVA DA OVINO-CAPRINOCULTURA BRASILEIRA, 2001, Brasilia. Relatorio final. Brasilia: CNPq, 2001. p.16-21.

MEDINA, V. H.; VICENTE, W. R. R. *et al.* Uso de sondas fluorescentes para avaliação da integridade da membrana plasmática de espermatozoides ovinos antes e após congelamento. **ARS Veterinária**, v.16, p. 204-209, 2000.

MEMON, A. A. et al. Effect of antioxidants on post thaw microscopic, oxidative stress parameter and fertility of Boer goat spermatozoa in Tris egg yolk glycerol extender. **Animal Reproduction Science**, v. 136, n. 1, p. 55-60, 2012.

MICHAEL, A. et al. Effect of antioxidant supplementation on semen quality and reactive oxygen species of frozen-thawed canine spermatozoa. **Theriogenology**, v. 68, n. 2, p. 204-212, 2007.

- MIES FILHO, A. **Reprodução dos Animais**. 6. ed., Porto Alegre : Sulina. 1987. 314p.
- MISRA, H.P.; FRIDOVICH, I. The univalent reduction of oxygen by reduced flavins and quinones. **Journal of Biology and Chemistry**, v. 247, p. 188-192, 1972.
- MOLINA, M.R. El estrés oxidativo y el destino celular. **Revista Química Viva**, v. 2, n. 1, 2003.
- MONTEIRO, J. M.; ALBUQUERQUE, U. P.; ARAUJO, E. L.; AMORIM, E. L. C. **Taninos: uma abordagem da química à ecologia**. Química Nova, v. 28, n. 5, p. 892-896, 2005.
- MORAES, C.N.; NEVES, J.P.; GONÇALVES, P.B.D.; OLIVEIRA, J.F.C.; SCHWEITZER, C.M. Criopreservação do sêmen ovino em pellets com etileno glicol. **Ciênc Rural**, v.28, p.287-292, 1998.
- MORAES, C.R; MEYERS, S. The sperm mitochondrion: Organelle of many functions. **Animal Reproduction Science**, 2018.
- MORTIMER, S.T. **CASA – Practical Aspects**. Human Reproduction Update, p.515-524, 2000.
- MÜLLER-ESTERL, W.; FRITZ, H. Sperm acrosin. **Methods in enzymology (I. Lorand, ed.)**. Academic press, New York, V. 80, P. 621–632, 1981.
- NICHI, M. **Sistemas de proteção enzimática e níveis de peroxidação espontânea dos lipídeos seminais de touros zebuínos e taurinos criados a campo na região de Dourados, MS**. 2003, 101 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003.
- NOILES, E.E.; BAILEY, J.L.; STOREY, B.T. Temperature dependence of the water permeability, L_p , of murine sperm shows a discontinuity between 4^o and 0^oC. **Cryobiology**, v. 32, p. 220-238, 1995.
- 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.
- 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.
- OJHA, S. JAVED, H.; AZIMULLAH, S.; HAQUE, M.E. β -Caryophyllene, a phytocannabinoid attenuates oxidative stress, neuroinflammation, glial activation, and salvages dopaminergic neurons in a rat model of Parkinson disease. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 418, n. 1, p. 59-70, 2016.
- OLIVEIRA, D. F.; CRUZ, J. F.; CARNEIRO, P. L. S.; MALHADO, C. H. M.; RONDINA D; FERRAZ, R. C. N.; TEIXEIRA NETO, M. R. Desenvolvimento ponderal e características de crescimento de caprinos da raça Anglo Nubiana criados

em sistema semi-intensivo. **Rev. Bras. Saúde Prod. An.**, v.10, n.2, p.256-265, abr/jun, 2009.

OLIVEIRA, D. R. **Avaliação da atividade tipo antidepressiva do óleo essencial das folhas de *Spiranthera odoratissima* A. ST. -HIL. e de seu componente majoritário, β cariofileno.** 123 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2016.

OLLERO, M.; POWERS, R. D.; ALVAREZ, J. G. Variation of docosahexaenoic acid content in subsets of human spermatozoa at different stages of maturation: implications for sperm lipoperoxidative damage. **Molecular Reproduction Development**, v. 55, n. 3, p. 326– 334, 2000.

PAGLIARINI, D. J.; CALVO, S. E.; CHANG, B.; SHETH, S. A.; VAFAI, S. B.; ONG, S.E.; WALFORD, G. A.; SUGIANA, C.; BONEH, A.; CHEN, W. K.; COLINA, D. E.; VIDAL, M.; EVANS, J. G.; THORBURN, D. R.; CARR, S. A.; MOOTHA, V. K. A mitochondrial protein compendium elucidates complex I disease biology. **Cell**, v. 134 , p. 112 – 123, 2008.

PARKS, J. E.; HAMMERSTEDT, R. H. Development changes occurring in the lipids of ram epididymal spermatozoa plasma membrane. **Biology of Reproduction**, v. 32, n. 3, p. 653- 668, 1985.

PARKS, J.E.E GRAHAM, J.K. effects of cryopreservation procedures on sperm membranes. **Theriogenology**, V.38, P.209-222, 1992.

PEÑA, F.J.; JOHNNISSON, A.; WALLGREN, M. et al. Antioxidant supplementation in vitro improves boar sperm motility and mitochondrial membrane potential after cryopreservation of different fractions of the ejaculate. **Animal Reproduction Science**, v. 78, p. 85-98, 2003.

PÉREZ, L.J.; VALCÁRCEL, A.; DE LAS HERAS, M.A. et al. Evidence that frozen/thawed ram spermatozoa show accelerated capacitation in vitro as assessed by chlortetracycline assay. **Theriogenology**, v. 46, p. 131-140, 1996.

PERRON, N.R.L.; BRUMAGHIM, J.L. A review of the antioxidant mechanisms of polyphenol compounds related to iron binding. **Cell Biochem Biophys**. 53(2):75-100, 2009.

PESCH, S.; BERGMANN, M. Structure of mammalian spermatozoa in respect to viability, fertility and cryopreservation. **Micron**, v.37, n.7, p.597-612. 2006.

PETERSON, K.; KAPPEN, M.A.P.M.; URSEM, P.J.F.; NÖTHLING, J.O.; COLENBRANDER, B.; GADELLA, B.M. Microscopic and flow cytometric semen assessment of Dutch AI-bucks: effect of semen processing procedures and their correlation to fertility. **Theriogenology**, v.67, p.863-871, 2007.

PIETTA, P.G. Flavonoids as antioxidants. **Journal of Natural Products**, v. 63, n. 7, p. 1035- 1042, 2000.

PRATHALINGAM, N. S.; HOLT, W. V.; REVELL, S. G.; MIRCZUK, S.; FLECK, R. A.; WATSON, P. F. Impact of antifreeze proteins and antifreeze glycoproteins on bovine sperm during freeze-thaw. **Theriogenology**, v. 66, p. 1894-1900, 2006.

PRIOR, R.L. Fruits and vegetables in the prevention of cellular oxidative damage. **Am J Clin Nutr**; 78(3): 570-578, 2003.

PURDY, P.H. A review on goat sperm cryopreservation. **Small ruminant research**, V.63, P.215-225, 2006.

ROCA, J.; GIL, M.A.; HERNANDEZ, M. et al. Survival and fertility of boar spermatozoa after freeze-thawing in extender supplemented with butylated hydroxytoluene. **Journal of Andrology**, v. 25, n. 3, p. 397-405, 2004.

RODRIGUES, M.P. **Perfil oxidativo e avaliação funcional de sêmen criopreservado de touros (*Bos taurus taurus* e *Bos taurus indicus*) criados em clima tropical**. 144 f. Dissertação (Mestre em Medicina Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

ROVAN, E. Biochemistry sperm. W. Busch, A. Holzmann (Eds.), **Veterinary Medicine Neurology, Physiology and Pathology of reproduction in males Animals**, Schattauer, Stuttgart, p. 23-54, 2001.

SALAMON, S.; MAXWELL, W.M.C. Frozen storage of ram semen II. Causes of low fertility after cervical insemination and methods of improvement. **Animal Reproduction Science**, v. 38, p. 1-36, 1995.

SALEH, R.A.; AGARWAL, A. Oxidative stress and male infertility: from research bench to clinical practice. **Journal of Andrology**, v. 23, n. 6, p. 737-752, 2002.

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

SANTOS, C.L. **Estudo do desenvolvimento, das características da carcaça e do crescimento alométrico de cordeiros das raças Santa Inês e Bergamácia**. 1999. 143p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) Universidade Federal de Lavras, Lavras.

SARIÖZKAN, Serpil et al. The influence of cysteine and taurine on microscopic-oxidative stress parameters and fertilizing ability of bull semen following cryopreservation. **Cryobiology**, v. 58, n. 2, p. 134-138, 2009.

SCHMEHL, M.K.; VAZQUEZ, I.A.; GRAHAM, E.F. The effects of nonpenetrating cryoprotectants added to TEST-yolk-glycerol extender on the post-thaw motility of ram spermatozoa. **Cryobiology**, v. 23, p. 512-517, 1986.

SCHMITT, D.; LEVY, R.; CARROLL, B. Toxicological Evaluation of β -Caryophyllene Oil. **International Journal of Toxicology**, v. 35, n. 6, 2016.

SCOTT, T. W. Lipid metabolism of spermatozoa. **Journal Reproduction & Fertility**, v.18, p.65-76, 1973.

SHAFAGHAT, A. Antibacterial activity and GC/MS analysis of the essential oils from flower, leaf and stem of *Origanum vulgare* ssp. *viride* growing wild in north-west Iran. **Natural Product Communications**, v. 6, n. 9, p. 1351-1352, 2011.

SHANNON, P.; VISHWANATH, R. The effect of optimal and suboptimal concentrations of sperm on the fertility of fresh and frozen bovine semen and a theoretical model to explain the fertility differences. **Animal Reproduction Science**, v. 39, p. 1-10, 1995.

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

SINGER, S. Jonathan; NICOLSON, Garth L. The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. **Science**, v. 175, n. 4023, p. 720-731, 1972.

SINGH, B.K. **Compêndio de andrologia e inseminação artificial em animais de fazenda**. São Paulo: Andrei Editora, 2006. 331p.

SINHA, M.P.; SINHA, A.K.; SING, B.K. et al. The effect of glutathione on the motility, enzyme leakage and fertility of frozen goat semen. **Animal Reproduction Science**, v. 41, p. 237-243, 1996.

SLAWETA, R.; LASKOWSKA, T.; SZYMANSKA, E. Lipid peroxides, spermatozoa quality and activity of glutathione peroxidase in bull semen. **Acta Physiologica Polonica**, v. 39, n. 3, p. 207-214, 1988.

STOREY, B.T.; NOILES, E.E.; THOMPSON, K.A. Comparison of glycerol, other polyols, trehalose and raffinose to provide a defined cryoprotectant medium for mouse sperm cryopreservation. **Cryobiology**, v. 37, p. 46-58, 1998.

TRALDI AS. **Tópicos em reprodução e I.A. em caprinos** – Manual técnico. Texto apostilado, 1994.

UPRETI, G.C.; JENSEN, K.; OLIVER, J.E. et al. Motility of ram spermatozoa during storage in a chemically-defined diluent containing antioxidants. **Animal Reproduction Science**, v. 48, p. 269-278, 1997.

UZAR, E.; ALP, H.; CEVIK, M. U.; FIRAT, U.; EVLIYAOGU, O.; TUFEK, A.; ALTUN, Y. Ellagic acid attenuates oxidative stress on brain and sciatic nerve and improves histopathology of brain in streptozotocin-induced diabetic rats. **Neurological Sciences**, v. 33, n. 3, p. 567-574, 2012.

VANDENHEUVEL, F.A. Structure of membranes and role of lipids therein. **Advances in Lipid Research**, v.9, p.161-248, 1971.

VARGA, Z. V. β -Caryophyllene protects against alcoholic steatohepatitis by attenuating inflammation and metabolic dysregulation in mice. **British Journal of Pharmacology**, 2017.

VERNET, P.; AITKEN, R. J.; DREVET, J. R. Antioxidant strategies in the epididymis. **Mol cell endocrinol**, V. 216, P. 31-39, 2004.

VIRGILI, F.; MARINO, M. Regulation of cellular signals from nutritional molecules: a specific role for phytochemicals, beyond antioxidant activity. **Free Radical Biology & Medicine** 45,1205–1216, 2008.

VISHWANATH, R.; SHANNON, P. Do sperm cells age? A review of the physiological change in sperm during storage at ambient temperature. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 9, p. 321-331, 1997.

VISHWANATH, R.; SHANNON, P. Do sperm cells age? A review of the physiological changes in sperm during storage at ambient temperature. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 9, n. 3, p. 321-332, 1997.

WANG, A.W.; ZHANG, H.; IKEMOTO, I. et al. Reactive oxygen species generation by seminal cells during cryopreservation. **Urology**, v. 49, p. 921-925, 1997.

WATSON, P. F. Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 7, p. 871-891, 1995.

WATSON, P.F. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. **Animal reproduction science**, V.60-61, P. 481-492, 2000.

WILHELM, K. H.; GRAHAM, J. K.; SQUIRES, E. L. Effects of phosphatidylserine and cholesterol liposomes on the viability, motility, and acrosomal integrity of stallion spermatozoa prior to and after cryopreservation. **Cryobiology**, V. 33, P. 320- 329. 1996.

WILLIAMS, A.C.; FORD, W.C.L. Relationship between reactive oxygen species production and lipid peroxidation in human sperm suspensions and their association with sperm function. **Fertility and sterility**, v. 83, n. 4, p. 929-936, 2005.

YESTE M, ESTRADA E, ROCHA LG, MARÍN H, RODRÍGUEZ-GIL JE, MIRÓ J. Cryotolerance of stallion spermatozoa is related to ros production and mitochondrial membrane potential rather than to the integrity of sperm nucleus. **Andrology**, V.2, P.1-13, 2014.

YOSHIDA, M. Conservation of sperms: current status and new trends. **Animal Reproduction Science**, v. 60-61, p. 349-355, 2000.

YU, P.B. Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. **Physiological Reviews**, v. 74, n. 1, p. 139-162, 1994.

YU, T.W.; ANDERSON, D. Reactive oxygen species-induced DNA damage and its modification: a chemical investigation. **Mutation Research**, v. 379, n. 2, p. 201-210, 1997.

ZEBELO, Simon A. et al. Plasma membrane potential depolarization and cytosolic calcium flux are early events involved in tomato (*Solanum lycopersicon*) plant-to-plant communication. **Plant Science**, v. 196, p. 93-100, 2012.

ZINI, A; DE LAMIRANDE, E.; GAGNON, C. Reactive oxygen species in semen of infertile patients: levels of superoxide dismutase and catalase-like activities in seminal plasma and spermatozoa. **International Journal of Andrology**, v. 16, n. 3, p. 183-188, 1993.