

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ

JEFFERSON HALLISSON LUSTOSA DA SILVA

**EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO DO DIAZINON, TROLOX, GENISTEÍNA E
RESVERATROL, AO DILUIDOR TRIS-GEMA, NA CRIOPRESERVAÇÃO DE
SÊMEN OVINO**

TERESINA - PI

2023

JEFFERSON HALLISSON LUSTOSA DA SILVA

**EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO DO DIAZINON, TROLOX, GENISTEÍNA E
RESVERATROL, AO DILUIDOR TRIS-GEMA, NA CRIOPRESERVAÇÃO DE
SÊMEN OVINO**

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

Orientador: Prof. Dr. Amilton Paulo Raposo Costa

TERESINA - PI

2023

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

S586e Silva, Jefferson Hallisson Lustosa da.
Efeito da suplementação do diazinon, trolox, genisteína e resveratrol, ao diluidor tris-gema, na criopreservação de sêmen ovino / Jefferson Hallisson Lustosa da Silva . -- 2023.
81 f.

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

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

1. Espermatozoide. 2. Antioxidante. 3. Criopreservação. I. Costa, Amilton Paulo Raposo. II. Título.

CDD 636.0824

Bibliotecário: Rafael Gomes de Sousa - CRB3/1163

**EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO DO DIAZINON, TROLOX, GENISTEÍNA E
RESVERATROL, AO DILUIDOR TRIS-GEMA, NA CRIOPRESERVAÇÃO DE
SÊMEN OVINO**

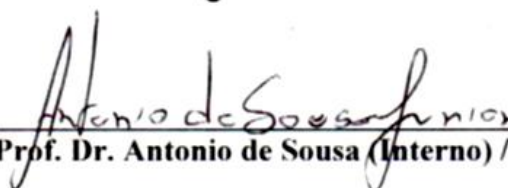
JEFFERSON HALLISSON LUSTOSA DA SILVA

Tese aprovada em: 31/05/2023

Banca Examinadora:



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



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



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



Prof. Dr. Mauricio Barbosa Salviano (Externo) / UNIFSA



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

Dedico,

*Aos meus pais, Celeste e José, aos meus irmãos Jéssica
e Bruno, e a minha esposa, Daniela, que são
minha base para seguir em frente com
determinação, e que sempre me deram a
confiança necessária para acreditar nos meus
sonhos.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus pelo dom da vida e por me guiar em toda minha caminhada e conquistas.

Aos meus pais, Celeste e José, e aos meus irmãos, Jéssica e Bruno, por batalharmos juntos por uma vida melhor, com amor e companheirismo.

À minha esposa, Daniela, que sempre me incentivou e me fez crescer cada dia mais, com muito amor, carinho e companheirismo.

À Universidade Federal do Piauí e ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, por prestar todo o apoio necessário durante a formação acadêmica.

Ao meu orientador, Professor Dr. Amilton Paulo Raposo Costa, por toda a orientação, aprendizado, conselhos e amizade.

Ao Professor Dr. José Adalmir Torres de Souza, pela disponibilização das instalações do Laboratório de Biotecnologia da Reprodução Animal (LBRA), para realização das análises experimentais e por todos os conselhos.

Ao Professor Dr. Antônio de Sousa Júnior pela inestimável colaboração durante toda a execução do trabalho e pela amizade.

Ao Biotério de Produção de Ovinos do Colégio Técnico de Teresina (CTT), em nome do Professor Dr. Antônio de Sousa Júnior, pela cessão das instalações e disponibilização dos animais para realização desse trabalho.

À toda equipe do LBRA e do Laboratório de Ciências Fisiológicas do CCA/UFPI, pela receptividade e cordialidade pelo qual fui recebido durante a realização do doutorado e pela convivência harmoniosa.

Aos amigos Marcos Celestino, Misael, Inaldo, Gabriel, Elisabeth, Sérgio, Marcos e Sara, por todo apoio e colaboração durante a execução desse trabalho, vocês foram fundamentais para a execução do mesmo.

Às amigas Gisele Soares e Marcela Gualter, pela amizade, companheirismo e por toda colaboração durante a realização desse trabalho.

À funcionária “dona Noêmia” por toda presteza e zelo com todos.

À CAPES pelo fornecimento de bolsa de Doutorado.

À equipe do Laboratório do Núcleo Integrado de Biotecnologia da Universidade Estadual do Ceará, em especial ao Pós-graduando Bruno, pela presteza em colaborar conosco.

A todos aqueles que de alguma maneira contribuíram para a realização desse sonho.

Muito Obrigado!

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	8
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS	10
RESUMO	11
ABSTRACT	12
1 INTRODUÇÃO.....	13
2 REVISÃO DE LITERATURA	15
2.1 Espermatozoide e sua função	15
2.2 Criopreservação e seus danos	16
2.3 Estresse celular	19
2.3.1 Diazinon	21
2.4 Estresse Oxidativo	Erro! Indicador não definido.
2.4.1 Respostas celulares ao estresse oxidativo.....	21
2.5 Mecanismos de defesa antioxidante	22
2.5.1 TROLOX® (6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametil croman-2-ácido carboxílico)	24
2.5.2 Fitoestrógenos.....	24
2.5.3 Resveratrol.....	25
2.6 Criopreservação	Erro! Indicador não definido.
2.7 Análises espermáticas.....	26
3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	73
CAPITULO I*	28
CAPITULO II*	47
CONSIDERAÇÕES FINAIS	72

LISTA DE TABELAS

Capítulo I

		Pág.
Tabela 1	Parâmetros cinéticos (CASA) de espermatozoides criopreservados de ovinos em meio de congelação suplementado com Diazinon (120 μ M) e Trolox (75 μ M) (n=6)	35
Tabela 2	Motilidade total e vigor pós-descongelamento de espermatozoides ovinos, criopreservados em meio de congelação suplementado com Diazinon (120 μ M) e Trolox (75 μ M), avaliados pelo teste de termo resistência (TTR) (n=6)	37
Tabela 3	Motilidade total e vigor pós-descongelamento de espermatozoides ovinos, criopreservados em meio de congelação suplementado com Diazinon (120 μ M) e Trolox (75 μ M), avaliados pelo teste de termo resistência (TTR) (n=6)	38
Tabela 4	Integridade da membrana plasmática, atividade mitocondrial e integridade acrossomal pós-descongelamento de espermatozoides ovinos, criopreservados em meio de congelação suplementado com Diazinon (120 μ M) e Trolox (75 μ M) (n=6)	39
Tabela 5	Funcionalidade da membrana espermática de espermatozoides ovinos, pós-descongelação, submetidos ao teste hisposmótico (HOST), criopreservados em meio de congelação suplementado com Diazinon (120 μ M) e Trolox (75 μ M) (n=6)	41

Capítulo II

		Pág.
Tabela 1	Motilidade total e vigor pós-descongelamento de espermatozoides ovinos, criopreservados em meio de congelação suplementado com Genisteína (25 μ M) e Resveratrol (20 μ M), avaliados pelo teste de termo resistência (TTR) (n=6)	57
Tabela 2	Parâmetros cinéticos (CASA) de espermatozoides criopreservados de ovinos em meio de congelação suplementado com Genisteína (25 μ M) e Resveratrol (20 μ M) (n=6)	58
Tabela 3	Parâmetros morfológicos (defeitos maiores, defeitos menores e defeitos totais) espermáticos pós-descongelação, do sêmen de ovinos, criopreservados em meio de congelação suplementado com Genisteína (25 μ M) e Resveratrol (20 μ M) (n=6)	59

Tabela 4	Integridade da membrana plasmática, atividade mitocondrial e integridade acrossomal pós-descongelamento de espermatozoides ovinos, criopreservados em meio de congelação suplementado com Genisteína (25 μ M) e Resveratrol (20 μ M) (n=6)	60
Tabela 5	Funcionalidade da membrana espermática de espermatozoides ovinos, pós-descongelação, submetidos ao teste hisposmótico, criopreservados em meio de congelação suplementado com Genisteína (25 μ M) e Resveratrol (20 μ M) (n=6)	60

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

ALH – Amplitude Lateral da Cabeça

BCF – Batimento flagelar cruzado

CASA – Computer Assisted Sperm Analysis (Análise computadorizada de espermatozoides)

DCF – Diacetato de carboxifluoresceína

DMSO – Dimetilsulfóxido

FITC-PNA – Isotiocianato de Fluoresceína Conjugada a *Peanut agglutinin*

HOST - Hypoosmotic Swelling Test (Teste Hiposmótico)

IP – Iodeto de propídio

JC-1 – Iodeto de tetraetilbenzimidazolil carbocianina

LIN – Linearidade

STR - Retilinearidade

TTR – Teste de Termorresistência

VAP – Velocidade de trajeto

VCL – Velocidade curvilinear

VSL – Velocidade progressiva

HSP – Heat Shock Proteins

CSP – Cold Shock Proteins

RESUMO

Com o avanço das técnicas reprodutivas e do melhoramento animal, em todas as espécies de interesse econômico, o aprimoramento das técnicas de conservação de germoplasma se tornaram cada vez mais necessárias. A criopreservação de sêmen é uma dessas principais técnicas de conservação, no entanto, elas geram danos irreversíveis nas células espermáticas, a exemplo da lipoperoxidação, causada por espécies reativas ao oxigênio (EROs). Diante disso, se faz necessário o estudo de métodos que atenuem esses danos e aumentem a qualidade final do material criopreservado. Dessa forma, objetivou-se avaliar o efeito do estresse subletal, por meio da suplementação com Diazinon (120 μM), assim como o efeito dos agentes antioxidantes Trolox (75 μM), Genisteína (25 μM) e Resveratrol (20 μM), no diluidor TRIS-gema, sobre a qualidade do sêmen criopreservado de ovinos. Para tanto, foram coletadas amostras de sêmen de seis carneiros da raça Dorper clinicamente saudáveis e com os parâmetros andrológicos/seminais normais. O sêmen foi diluído em diluidor Tris-Gema com glicerol e os respectivos tratamentos, em cada experimento. Experimento 1: Controle (Tris-Gema), T1 (Tris-Gema + 120 μM de Diazinon); T2 (Tris-Gema + 75 μM de Trolox). Experimento 2: Controle (Tris-Gema); T1 (Tris-Gema + 25 μM de Genisteína); T2 (Tris-Gema + 20 μM de Resveratrol). Posteriormente, foram realizadas as análises macro e microscópicas do ejaculado pré e pós-diluição. As amostras foram criopreservadas pelo método automatizado, em curva de congelamento lenta para a espécie ovina e, após 15 dias, foram realizadas as seguintes análises pós-descongelamento: análise física, avaliação da longevidade espermática pelo teste de termorresistência (TTR), avaliação morfológica pós-descongelamento, avaliação da ultraestrutura espermática: integridade da membrana plasmática, integridade acrossomal, atividade mitocondrial e funcionalidade da membrana plasmática espermática. Foi utilizado no estudo o delineamento inteiramente casualizado (DIC), os dados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey e Duncan, com um nível de significância de 5%. Observou-se um aumento significativo do vigor espermático no tratamento com Resveratrol, quando comparado ao sêmen pré-congelamento ($p < 0,05$). Os tratamentos não geraram alterações nos parâmetros da ultraestrutura espermática ($p > 0,05$). Não houve diferença entre os tratamentos na avaliação da longevidade espermática pelo TTR, no entanto, houve estabilizações na motilidade e vigor espermáticos entre os tempos do TTR ($p < 0,05$). Não houve diferença entre os tratamentos na análise de morfologia espermática do sêmen criopreservado. A funcionalidade da membrana plasmática foi reduzida nos grupos com 120 μM de Diazinon e 25 μM de Genisteína adicionadas meio diluidor. Não houve diferença entre os tratamentos na avaliação dos parâmetros cinéticos pelo CASA ($p > 0,05$), com exceção da motilidade progressiva do T1 (Tris-Gema + 120 μM de Diazinon) que se mostrou reduzida em relação ao controle ($p < 0,05$). Em conclusão, a suplementação de 120 μM de Diazinon ao meio diluidor Tris-Gema, não melhorou a cinética espermática bem como a qualidade estrutural dos espermatozoides criopreservados e a adição de 75 μM de Trolox manteve a qualidade espermática. A adição de 25 μM de Genisteína, ao diluidor Tris-Gema, mantém os parâmetros cinéticos espermáticos em relação ao controle, porém a suplementação de 20 μM de Resveratrol ao diluidor foi capaz de melhorar o vigor espermático do sêmen ovino criopreservado.

Palavras-chave: espermatozoide, antioxidante, criopreservação

ABSTRACT

With the advancement of reproductive biotechniques and animal improvement, in all species of economic interest, the improvement of germplasm conservation techniques has become increasingly necessary. Semen cryopreservation is one of these main conservation techniques, however, they generate irreversible damage to sperm cells, such as lipoperoxidation, caused by reactive oxygen species (ROS). Therefore, it is necessary to study methods that mitigate these damages and increase the final quality of the cryopreserved material. Thus, the objective was to evaluate the effect of sublethal stress, through supplementation with Diazinon (120 μM), as well as the effect of the antioxidant agents Trolox (75 μM), Genistein (25 μM) and Resveratrol (20 μM), on TRIS-yolk extender on the quality of cryopreserved ram semen. For this purpose, semen samples were collected from six clinically healthy Dorper rams with normal andrological/seminal parameters. The semen was diluted in Tris-Gema extender with glycerol and the respective treatments, in each experiment. Experiment 1: Control (Tris-Gem), T1 (Tris-Gem + 120 μM Diazinon); T2 (Tris-Gem + 75 μM Trolox). Experiment 2: Control (Tris-Gema); T1 (Tris-Gem + 25 μM Genistein); T2 (Tris-Gem + 20 μM Resveratrol). Subsequently, macro and microscopic analyzes of the pre- and post-dilution ejaculate were carried out. The samples were cryopreserved by the automated method, in a slow freezing curve for the ovine species and, after 15 days, the following post-thawing analyzes were carried out: physical analysis, evaluation of sperm longevity by the thermoresistance test (TTR), post morphological evaluation -thawing, evaluation of sperm ultrastructure: plasma membrane integrity, acrosomal integrity, mitochondrial activity and sperm plasma membrane functionality. The study used a completely randomized design (DIC), the data were submitted to analysis of variance and the averages compared by the Tukey and Duncan test, with a significance level of 5%. There was a significant increase in sperm vigor in the treatment with Resveratrol, when compared to pre-freezing semen ($p < 0.05$). Treatments did not change sperm ultrastructure parameters ($p > 0.05$). There was no difference between treatments in the evaluation of sperm longevity by TTR, however, there were stabilizations in sperm motility and vigor between TTR times ($p < 0.05$). There was no difference between treatments in sperm morphology analysis of cryopreserved semen. Plasma membrane functionality was reduced in the groups with 120 μM Diazinon and 25 μM Genistein added to extender medium. There was no difference between treatments in the evaluation of kinetic parameters by CASA ($p > 0.05$), with the exception of the progressive motility of T1 (Tris-Gem + 120 μM of Diazinon) which was reduced in relation to the control ($p < 0.05$). In conclusion, the supplementation of 120 μM of Diazinon to the Tris-Gema extender medium, did not improve the sperm kinetics as well as the structural quality of the cryopreserved spermatozoa and the addition of 75 μM of Trolox maintained the sperm quality. The addition of 25 μM of Genistein, to the extender Tris-Gema, maintains the sperm kinetic parameters in relation to the control, however the supplementation of 20 μM of Resveratrol to the extender was able to improve the sperm vigor of cryopreserved ram semen.

KEYWORDS: sperm, antioxidant, cryopreservation

1 INTRODUÇÃO

A utilização de sêmen criopreservado, em algumas biotecnologias reprodutivas, apresentam uma limitação devido aos baixos índices de fecundidade obtidos, quando comparado ao sêmen fresco ou resfriado (MAIA et al., 2009), uma vez que o processo de congelação/descongelação danifica cerca de 50% das células (SOUZA et al. 2016).

O processo de criopreservação tem sido cada vez mais utilizado, devido a praticidade no transporte e manipulação do material genético, como também pela possibilidade de diversos métodos de criopreservação. Entretanto, esta técnica é capaz de induzir crioinjúrias seminais em diferentes espécies, provocando uma redução nas características *in vitro* e na fertilidade dos espermatozoides, devido aos danos nas membranas (ABAVISANI et al., 2013).

Na tentativa de minimizar esses prejuízos, os antioxidantes vêm sendo utilizados nos meios de congelação de sêmen de várias espécies, inclusive na espécie ovina, com o objetivo de reduzir a produção de espécies reativas de oxigênio, melhorando a qualidade e resistência da célula espermática ao processo de criopreservação (CASTELLINI et al., 2003).

Além disso, a partir de estudos na área de microbiologia de alimentos, foram desenvolvidas estratégias de aplicação de tratamentos que induzissem um estresse subletal em gametas e embriões visando a melhoraria das taxas de sobrevivência após tecnologias de reprodução assistida (PRIBENSZKY; VAJTA, 2011).

A exposição prévia das células a estresses subletais pode estimular uma resposta com a síntese de proteínas de choque térmico (HSP). Estas células expostas a uma nova situação de estresse responderão de forma mais rápida, eficaz e reprogramada, procurando reduzir e limitar a extensão das lesões (MENTZ, 2018).

Estudos mais recentes demonstraram que a alta produção de Espécies Reativas ao Oxigênio (EROs), decorrente da exposição a doses maiores de organofosforados, um potencial indutor de estresse oxidativo, a exemplo do Diazinon, pode ser antagonizada pela introdução de antioxidantes como o Trolox, assim como a Genisteína, que tem grande potencial antioxidante (LIU et al., 2010; FLORES et al., 2017). Essas substâncias podem reduzir substancialmente os efeitos das EROS sobre a lipoperoxidação da membrana plasmática. Portanto, a comparação de substâncias que levem a produção de estresse a nível subletal, com o uso tradicional de substâncias antioxidantes, pode demonstrar novos caminhos para redução dos efeitos adversos das EROS como alternativa aos testes rotineiros com diferentes classes de antioxidantes, aumentando a eficácia do processo de criopreservação e outras biotécnicas reprodutivas.

Dessa forma, objetivou-se avaliar o efeito do estresse subletal, por meio da suplementação com Diazinon (120 μM), assim como o efeito dos agentes antioxidantes Trolox (75 μM), Genisteína (25 μM) e Resveratrol (20 μM), no diluidor TRIS-gema, sobre a qualidade do sêmen criopreservado de ovinos.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Espermatozoide e sua função

Os espermatozoides são células formadas no interior dos túbulos seminíferos dos testículos, possuem uma forma alongada e consistem de uma cabeça contendo um núcleo achatado e de forma oval com a cromatina altamente condensada, com a sua extremidade anterior recoberta pelo acrossoma, e uma cauda composta de colo e peças intermediária, principal e terminal (PESCH; BERGMANN, 2006).

A estrutura dos espermatozoides de mamíferos está fortemente relacionada às suas funções, que incluem capacitação espermática, reação acrossômica e processo de fertilização (JIANG et al. 2016). Contudo a seleção de espermatozoides funcionais desempenha um papel crucial na reprodução assistida.

Os espermatozoides são células altamente especializadas, que possuem como principal função fertilizar o óvulo (NAGATA et al., 2018). São células alongadas, recobertos pela membrana plasmática. Na cabeça estão o núcleo e o acrossoma. O colo conecta a cabeça com o flagelo, que é dividido em peça intermediária, principal e terminal (SANTOS et al., 2018), onde cada estrutura desempenha um papel importante para o funcionamento da célula espermática (VARNER et al., 2014).

Organelas de espermatozoides, incluindo o acrossoma, mitocôndrias e flagelos, têm sido implicadas no processo de fertilização (ERICSSON et al., 1993). Morfologicamente, o espermatozoide tem que sair no ejaculado já maduro, isto é, com a cromatina completamente condensada, membrana acrossomal íntegra e sem deformação, com a peça intermediária sem danos e o flagelo livre de gota citoplasmática. Isso facilita o transporte dos espermatozoides no trato reprodutivo da fêmea para o encontro com o ovócito. Além disso, a membrana íntegra permite a permanência de todos os componentes protéicos e lipídicos necessários para participar do mecanismo de fecundação (MARTINS et al., 2016).

Para obter uma fertilização bem-sucedida, os espermatozoides devem permanecer progressivamente móveis, capazes de produzir energia na forma de ATP para os processos celulares, manter a membrana plasmática e a integridade acrossomal e reter as enzimas necessárias para a penetração no oócito. A interrupção de qualquer uma dessas características do espermatozoide, durante o processamento do sêmen e a criopreservação, provavelmente comprometerá a capacidade de fertilização.

2.2 Criopreservação e estresse oxidativo

O processo de criopreservação espermática possibilita o uso de amostras de sêmen por períodos relativamente longos, reduz riscos e custos com aquisição de reprodutores, além de favorecer a rápida difusão do material genético (CASTELO et al., 2008). O uso do sêmen congelado permite maior aproveitamento de animais com alto potencial genético, transporte do sêmen para várias localidades, formação de bancos de germoplasma tanto de animais que correm risco de extinção como daqueles que não podem ser utilizados na reprodução, por danos ocasionados durante o manejo dos animais, e também possibilita replicar características de determinados grupos genéticos ao longo do tempo (BERTOZZO et al., 2009).

Em 1983, no Brasil, a Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, motivada pela perda de material genético de animais em extinção, incluiu a técnica de criopreservação em seu Programa de Pesquisa em Recursos Genéticos. Desde então, foi possível criar uma rede de conservação de recursos genéticos animais e por meio de núcleos de conservação, mantidos nos habitats onde os animais estiveram submetidos à seleção natural (*in situ*), e no armazenamento de sêmen, de embriões e de oócitos em Bancos de Germoplasma (MARIANTE et al., 2011).

A rápida congelação do sêmen, juntamente com lenta descongelação, implica em danos causados pela formação de cristais de gelo, que se agrupam formando grandes cristais, que rompem a membrana. A curva de congelação ideal deve ser suficientemente lenta para permitir que os espermatozoides se desidratem, e rápida o bastante para evitar que as células espermáticas fiquem expostas por muito tempo às elevadas concentrações dos solutos (SNOECK, 2003).

Três são as etapas de temperatura da criopreservação. A primeira corresponde ao arrefecimento situado próximo de 0°C, provocando danos nas células da grande parte dos animais e plantas quando submetidos à exposição contínua a estas temperaturas; a segunda de 0 aos -40°C, compreendendo o intervalo de temperatura de congelação, ocorrendo neste período à maioria dos danos celulares; e por fim, a temperatura criogênica a -196°C, na qual os efeitos bioquímicos e fisiológicos são praticamente nulos (PESCH; BERGMANN, 2006).

Diversos estudos sugerem que espermatozoides de diferentes espécies possuem particularidades criobiológicas e graus de sensibilidade variados para manipulação experimental, choque térmico (transições da fase lipídica), congelação e tolerância osmótica (WATSON, 2000; PURDY, 2006).

Os efeitos da criopreservação na função e fertilidade dos espermatozoides foram estudados extensivamente em muitas espécies. A ultraestrutura espermática, principalmente,

a membrana plasmática e as membranas acrossomais externas, são comprometidas durante a criopreservação (LAYEK et al., 2016).

Durante a criopreservação os espermatozoides sofrem um choque por frio e isso resulta em menor sobrevivência dos espermatozoides pós-descongelamento. Para aqueles que sobrevivem, ocorre uma longevidade reduzida no trato reprodutivo da fêmea.

Os efeitos negativos da criopreservação sobre os espermatozoides incluem, além do choque por frio, outros danos, como o estresse osmótico e alterações na fluidez e permeabilidade da membrana (NAGATA et al., 2019), superprodução de espécies reativas de oxigênio (EROs), redução da integridade acrossômica, comprometimento do potencial de membrana mitocondrial e menor motilidade espermática em diversas espécies de animais domésticos. Nesse sentido, compreender as modificações moleculares infligidas pelo processo de congelamento-descongelamento é essencial para diminuir ou prevenir os danos causados durante a criopreservação (PERIS-FRAU et al., 2020).

A criopreservação consiste em três etapas: diluição com o extensor/resfriamento, adição de crioprotetor e congelamento/descongelamento. A melhoria nos procedimentos de criopreservação de espermatozoides exigirá uma avaliação cuidadosa da complexidade da sua membrana plasmática, a interação de seus componentes e a influência do resfriamento, congelamento e descongelamento nessas interações (PARKS; GRAHAM, 1992). Os danos à membrana, causados pela criopreservação, afetam a capacitação e hiperativação espermática, assim como o processo de fertilização, que pode ser observado quando o mesmo número de espermatozoides é inseminado, a fertilidade do sêmen fresco é superior ao criopreservado (SANTOS et al., 2015).

Além disso, as diferenças entre as espécies em termos de tamanho, formato e composição lipídico-proteica dos espermatozoides denotam que o processo de criopreservação não é igualmente eficiente entre todas as espécies. Foi relatado que touros, carneiros, cavalos e javalis produzem mais espermatozoides criossensíveis do que humanos, coelhos, gatos e cães (PERIS-FRAU et al., 2020). O principal efeito deletério causado ao espermatozoide é a geração de EROs durante todo o ciclo de congelamento e descongelamento, acompanhada por baixos níveis de antioxidantes no plasma seminal e no extensor, induzindo um estado de estresse oxidativo que causa a peroxidação lipídica do sistema de membrana biológica e resulta em qualidade reduzida do sêmen (CHAITHRASHREE et al., 2020).

O estresse oxidativo foi identificado como um dos muitos mediadores da infertilidade no macho, causando disfunção do espermatozoide, uma vez que a produção aumentada de EROs sobrecarrega as defesas antioxidantes do corpo. Embora pequenas quantidades de EROs

sejam necessárias para o funcionamento normal dos espermatozoides, níveis desproporcionais podem afetar negativamente a qualidade dos espermatozoides e prejudicar sua capacidade geral de fertilização (AGARWAL et al., 2014). Altos níveis de EROs podem diminuir a motilidade dos espermatozoides, inativar as enzimas glicolíticas que afetam a qualidade do sêmen, deteriorando os lipídios da membrana, proteínas e DNA nuclear ou mitocondrial. Embora o sêmen ovino possua um sistema de defesa natural contra EROS, ele é considerado insuficiente sob estresse mediado pela criopreservação.

Com isso, recomenda-se a adição de antioxidantes em meios utilizados para criopreservação para proteger as células espermáticas contra os danos causados pelas EROs durante a criopreservação dos espermatozoides com o intuito de aumentar as taxas de fecundação após inseminação artificial (CHAITHRASHREE et al., 2020).

O estresse oxidativo é caracterizado como um distúrbio no estado de equilíbrio do sistema pró-oxidante e antioxidante das células, representados pela produção e eliminação das EROS. As EROS, conhecidas também como radicais livres, são produtos do metabolismo aeróbio celular, na qual uma molécula de O_2 é reduzida em duas moléculas de água, através da incorporação de 4 elétrons. No entanto, quando essa redução ocorre de forma incompleta, ou seja, agregando menos de 4 elétrons, há a formação das EROS: superperóxidos (O_2^-), peróxidos de hidrogênio (H_2O_2) e radicais de hidroxila (OH) (MENEZO et al., 2016).

Estes metabólitos, parcialmente reduzidos, são instáveis e altamente reativos, características que levam a um comportamento de interação com moléculas de lipídios, carboidratos e ácidos nucleicos, visando adquirir elétrons e retomar a estabilidade das moléculas. Dessa forma, as moléculas que concedem os elétrons sofrem oxidação, gerando danos celulares, como peroxidação lipídica, alterações na membrana e no DNA mitocondrial, danos no retículo endoplasmático, desnaturação proteica e alterações no fuso meiótico, que favorecem a produção de mais EROS (CROCOMO et al., 2012; AMIN et al., 2014).

Apesar do excesso de EROS ser nocivo às células, estas moléculas são necessárias como sinalizadoras em reações do ciclo celular. Portanto, a redução excessiva de EROS pode levar à parada do desenvolvimento embrionário devido ao comprometimento de funções biológicas (HARVEY, 2007; FRIGONI, 2016).

A produção de EROS é aumentada em condições de cultivo *in vitro* devido a fatores ambientais como a alta tensão de oxigênio (O_2), cátions metálicos na água ou em reagentes utilizados, exposição à luz, presença de espermatozoides e danos celulares prévios de manipulação (CROCOMO et al., 2012).

Nos últimos anos, além dos danos ultraestruturas, bioquímicos e funcionais, os estudos associaram os baixos índices de fecundidade às EROs as quais são produzidas durante o processo de congelação/descongelação da célula espermática (BUCAK et al. 2008, SOUZA et al. 2016). Sendo os espermatozoides de ovinos susceptíveis ao estresse oxidativo, devido à elevada concentração de ácidos graxos poli-insaturados presentes na membrana plasmática (BUCAK et al., 2007).

Por outro lado, alguns estudos demonstraram que restrições calóricas e diminuição do metabolismo de glicose, que são fatores de estresse celular, levam o metabolismo mitocondrial a prolongar o tempo de vida. Esses efeitos podem ocorrer em função do aumento da formação de EROS dentro das mitocôndrias, causando uma resposta adaptativa que aumenta a resistência ao estresse e, a longo prazo, a redução do estresse oxidativo. Esse conceito recebeu o nome de hormese mitocondrial ou mito-hormese (RISTOW; ZARSE, 2010).

O conceito de hormese consiste em um fenômeno biológico em que o organismo, frente a estímulos subletais, tende a se adaptar (SILVA; FERRARI, 2011). Após a adaptação a determinado limiar de estresse, podem ocorrer benefícios ao seu desempenho (GONÇALVES, 2014). A hormese aumenta a expressão de HSP, metalotioneínas (quelantes de metais tóxicos) e outras enzimas antioxidantes, na tentativa de defesa contra os radicais livres. Dessa forma, com o aumento das defesas celulares, há redução das taxas de morte celular, aumentando a longevidade (RATTAN; DEMIROVIC, 2010).

A mito-hormese é a denominação do processo de adaptação das mitocôndrias, que pode produzir efeitos positivos, e um desses meios é pela produção de radicais livres. A teoria da mito-hormese apresenta que, em células inicialmente normais, uma carga oxidante específica no balanço redox da mitocôndria pode ser benéfica (GONÇALVES, 2014).

2.3 Estresse subletal

Os diversos procedimentos que estão presentes nas técnicas de reprodução assistida, acabam exercendo alguma forma de estresse não controlado, em estruturas como oócitos e embriões. Vários relatos sobre estratégias que consistem em aplicar alguma forma de estresse subletal, de maneira controlada, em gametas e embriões, tem mostrado que, em sua grande maioria, esse tipo de estratégia pode gerar benefícios de alguma forma. As principais maneiras já apresentadas envolvem formas de estresse subletal que se baseiam em aumento de pressão hidrostática, alterações na pressão osmótica, aquecimento ou estresse oxidativo (MEZZALIRA, 2018).

Quando as células são submetidas a vários fatores indutores de estresse, ocorre um aumento na produção de uma classe de proteínas denominadas proteínas de choque térmico (HSP, do inglês *heat shock proteins*) (VENDRELL-FLOTATS et al., 2017), as quais estão presentes em todas as células das mais variadas formas de vida (DILLER, 2006). As HSP também atuam como chaperonas moleculares e há evidências de que essas proteínas desempenham papéis fisiológicos importantes em condições normais (KREGEL, 2002). As HSP também são expressas como resposta a um aumento de temperatura e a outros estímulos estressantes com o objetivo de proteger as células, mantendo a sua sobrevivência, e podem ser benéficas às mesmas quando são expostas a insultos subsequentes (DILLER, 2006).

As chaperonas moleculares têm função de manter as proteínas que foram sintetizadas em sua correta conformação, interagindo com outras proteínas e, dessa forma, minimizam a probabilidade de que essas outras proteínas interajam de forma inadequada uma com a outra (FEDER; HOFMANN, 1999). Assim, impedem a desnaturação de proteínas e auxiliam a sua renaturação durante e após períodos de exposição a agentes estressores (NAHLEH et al., 2012).

Quando há um aumento nas concentrações de proteínas malformadas, a resposta ao choque térmico (HSP) é ativada, aumentando a expressão dos genes das proteínas de estresse, que estão presentes em todos os compartimentos subcelulares das células eucarióticas (HOOGENRAAD, 2017). Essa alteração na expressão gênica pode ser mensurada através da quantificação de mRNA, utilizando a técnica de reação em cadeia da polimerase em tempo real (qPCR) (ARYA et al., 2005).

De acordo com Fulda et al. (2010) qualquer situação que promova alterações na homeostase celular estimula uma HSP. Embora o nome pareça se referir a alterações na temperatura, essa resposta também é induzida a partir de outros estímulos, sendo uma das principais atividades celulares que preservam a sobrevivência frente ao estresse. Uma das principais alterações celulares causadas pelo estresse é o dano proteico que leva à agregação de proteínas desdobradas.

Os princípios da resposta fisiológica ao estresse podem ser extrapolados desde os seres menos desenvolvidos, até organismos mais complexos, como os seres humanos. Ao enfrentar uma situação estressante, o organismo produz e libera fatores que desencadearão a melhor adaptação possível ao agente estressor. Através desses fatores, o organismo em questão se torna um pouco mais tolerante mediante a mesma situação estressante, e essa resistência ser extrapolada para outras situações, igualmente estressantes, mas de origem diferente da primeira. O que irá ocorrer, após a liberação dos fatores de tolerância, vai ser influenciado pela intensidade do estresse provocado, assim como pela intensidade da resposta (MENTZ, 2018).

2.3.1 Diazinon

O Diazinon é um organofosforado comumente utilizado como ectoparasiticida em pequenos e grandes animais. Assim como os demais organofosforados, inibe a ação da enzima acetilcolinesterase, alterando o balanço oxidativo e antioxidante, além de causar danos ao DNA (GENG et al., 2015; INCE et al., 2017). Dessa forma, conforme mencionado anteriormente, substâncias capazes de gerar estresse celular oxidativo, quando utilizado em doses subletais, podem induzir alterações positivas a nível celular, a exemplo das células espermáticas e elevar a qualidade dessas células após exposição a outros tipos de danos como a criopreservação.

Em elevadas doses, os organofosforados Malation e Diazinon são capazes de reduzir a qualidade espermática e as concentrações hormonais, devido a elevação do estresse oxidativo nos testículos, além de danos histopatológicos e diminuição do peso dos órgãos do sistema genital masculino, podendo reduzir a fertilidade dos animais expostos (SCHONS, 2022).

Devido a sua propriedade lipofílica, o organofosforados atravessam facilmente a bicamada lipídica das membranas celulares, e dentro da célula produz radicais livres que causam um estresse oxidativo local (OZSOY et al., 2016; RIEGER et al., 2017). De forma semelhante, o Diazinon causa estresse oxidativo em diferentes tipos celulares de mamíferos devido a sua produção prévia de espécies reativas de oxigênio, causando apoptose em várias células no organismo (COLOVIC et al., 2015).

Por ser uma substância muito difundida no uso agropecuário para controle de ectoparasitas, há uma grande importância da mensuração do efeito que doses subletais desse composto pode causar na fertilidade animal, pois é uma substância que pode gerar estresse oxidativo em diferentes tipos de células, bem como pode induzir a uma elevação da resistência aos danos provocados pelo processo de criopreservação espermática, através da alta produção de proteínas CSP (*Cold Shock Proteins*).

2.3.2 Respostas celulares ao estresse subletal

Para neutralizar o estresse celular e os danos proteicos decorrentes, as células aumentam a expressão dos genes responsáveis pelas chaperonas moleculares, que auxiliam no redobramento de proteínas e reduzem a agregação proteica. Para que esse processo ocorra é necessário que haja uma adaptação de uma célula ao efeito estressor (FULDA et al., 2010). A resposta inicial ao estímulo estressante é direcionar a célula a um processo de defesa e recuperação do insulto. A exposição prévia das células a estresses subletais pode estimular uma

resposta com a síntese de HSP ou proteínas de choque por frio (CSP). Estas células expostas a uma nova situação de estresse responderão de forma mais rápida, eficaz e reprogramada, procurando reduzir e limitar a extensão das lesões (MENTZ, 2018).

No entanto, se o estímulo nocivo não for resolvido, as células ativam reações que levam a apoptose. No embrião bovino, por exemplo, a capacidade das células em realizar a apoptose é um fenômeno adquirido durante o desenvolvimento e é possível identificá-lo entre o estágio de oito e dezesseis células (HANSEN, 2007). Em nível molecular a apoptose é criteriosamente regulada através de duas principais vias e o resultado final de ambas é a ativação da cascata de caspases e a clivagem de substratos celulares específicos, resultando em mudanças morfológicas e bioquímicas associadas à apoptose (ZIMMERMANN et al., 2001).

2.4 Mecanismos de defesa antioxidante

É cada vez maior a procura de novos compostos com o objetivo de melhorar as defesas antioxidantes de sistemas biológicos bem como combater as EROS, as responsáveis pelo estresse oxidativo, através do desequilíbrio do sistema redox, interferindo na ação de substâncias antioxidantes no organismo (MOURÃO, 2007).

Uma molécula antioxidante pode ser definida como qualquer substância que, quando presente em baixas concentrações comparadas àquela do substrato oxidável, previne ou retarda, a oxidação daquele substrato. Além disso, também possui a capacidade de transformar uma espécie reativa de oxigênio em água (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1999).

Durante o período de estocagem do sêmen, a produção de EROS tem sido apontada como a principal causa da redução na motilidade, na integridade espermática e no declínio do metabolismo energético (BAUMBER et al., 2002; BILODEAU et al., 2002). Estudos têm demonstrado uma melhoria da qualidade cinética dos espermatozoides com adição de substâncias que combatam as EROS, no meio diluente, sendo utilizadas diversas substâncias como: vitaminas E e C, Trolox, CAT, SOD, cisteamina, cisteína, selênio, dentre outras (BUCAK et al., 2007).

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

As defesas antioxidantes endógenas têm como função remover as EROS ou convertê-las em produtos intermediários não tóxicos. Existem várias evidências da atividade protetora dos componentes do sistema antioxidante (FERREIRA; MATSUBARA, 1997), como o combate da lipoperoxidação e da apoptose espermática, prevenção das lesões de reperfusão pós-isquemia de coração, rim, fígado e intestino, desempenhada por enzimas como, SOD e CAT (BARBOSA et al., 2010).

Com exceção da vitamina E (a-tocoferol), que é um antioxidante estrutural da membrana, a maior parte dos agentes antioxidantes encontra-se no meio intracelular (FERREIRA; MATSUBARA, 1997). Acredita-se que esta vitamina é o inibidor primário de EROS encontradas em pequenas quantidades nas membranas celulares de mamíferos e no plasma seminal (SIKKA, 2004). Por sua vez a vitamina C proporciona proteção contra a oxidação descontrolada no meio aquoso da célula, devido ao seu alto poder redutor (JAYAPRAKASHA; PATIL, 2007).

As superóxidos dismutases e redutases devem funcionar em conjunto com enzimas que removem H_2O_2 . As Catalases estão em nenhuma ou em baixa quantidade na mitocôndria, onde grande quantidade de O_2 é gerado (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2004). Os antioxidantes não enzimáticos agem como agente redutor - doador de elétrons, além de se ligarem a moléculas de O_2 que possam ser substrato para formação de EROS, ou seja, de forma geral atuam prevenindo ou minimizando os danos provocados pelas EROS (SILVA et al., 2010).

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

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

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

2.4.1 TROLOX® (6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametil croman-2-ácido carboxílico)

O TROLOX® é um análogo hidrossolúvel do tocoferol, foi sintetizado por Scott et. al. (1974) e indicado como antioxidante para a preservação de óleos e gorduras. Esta substância apresenta propriedades antioxidantes e é eficaz tanto em gordura animal quanto vegetal, característica que o torna singular, já que o tocoferol tem pouca atividade na preservação da peroxidação de óleos vegetais (SCOTT et al., 1974).

A vitamina E ou tocoferol é um composto lipossolúvel natural da membrana celular (MANEESH et al., 2006) e protege as células das EROS. Acredita-se que a vitamina E é o inibidor primário dos radicais livres encontrados nas membranas celulares e no plasma seminal de mamíferos (SIKKA, 2004).

O mecanismo de ação do efeito antioxidante do Trolox é semelhante ao da vitamina E, ou seja, ele envolve o OH⁻ fenólico e a remoção de radicais peroxil (ALBERTINI; ABUJA, 1999).

O efeito da adição da Trolox ao diluidor de congelamento do sêmen ovino foi observado por Silva (2010), onde relatou que a adição de Trolox (60 e 120 µM) ao diluente Tris-gema proporciona maior integridade estrutural e cinética de espermatozoides de carneiros pós-criopreservação.

2.4.2 Fitoestrógenos

Os alimentos de origem vegetal são considerados uma rica fonte de fitoestrógenos, que são compostos polifenólicos não esteroides derivados do metabolismo vegetal com estrutura conformacional semelhante ao 17-β estradiol (E2) (PÉREZ-RIVERO et al., 2007; DI GIOIA; PETROPOULOS, 2019). Quando ingeridos por animais, os fitoestrógenos podem atuar como moduladores seletivos de receptores de estrogênio e agir como desreguladores endócrinos de forma agonista ou antagonista, dependendo da dose ingerida (ADAMS, 1995; DI GIOIA; PETROPOULOS, 2019), interferindo na síntese, secreção, transporte e metabolismo dos hormônios reprodutivos, durante o desenvolvimento embrionário e na vida adulta (WHITTEN; PATISAUL, 2001).

Cerca de 100 fitoestrógenos foram reconhecidos. São categorizados de acordo com sua estrutura química, em quatro classes: isoflavonóides (Genisteína, Daidzeína, Formononetina); flavonóides (naringenina, kaemferol); cumestanos (coumestrol “COU”, sativol, diacetato de COU, 4-metoxicumestrol) e lignanas (enterolactona e enterodiol) (NILSSON et al., 2001; WOŁAWEK-POTOCKA et al., 2013). A soja é a fonte mais abundante de isoflavonas, pois

é um dos alimentos com maior teor de Genisteína e Daidzeína, enquanto a alfafa e o trevo contêm uma grande quantidade de cumarinas. Vale ressaltar que os fitoestrógenos estão naturalmente presentes nas plantas, como glicosídeos, que são hidrolisados a aglicona (forma ativa) catalisada por enzimas presentes no sistema digestório (BONILLA, 2004).

Nos últimos anos, os antioxidantes naturais, flavonóides e isoflavonóides, têm recebido uma considerável atenção. Muitos esforços têm sido feitos para elucidar a relação entre a estrutura e a atividade destes compostos. Estudos sugerem que o anel B de flavonóides e isoflavonóides é o centro da atividade antioxidante, sendo atribuído a esse centro a capacidade de sequestrar radicais livres. Além deste, as isoflavonas apresentam a propriedade de quelar metais, dependente da posição da hidroxila fenólica. A Genisteína tem três grupamentos hidroxílicos fenólicos com diferentes ações antioxidantes. A ação antioxidante da Genisteína contra os radicais peroxila está diretamente relacionada com a presença da hidroxila fenólica na posição C4' (ZHANG et al., 2003; SIMÃO et al., 2005).

Por meio de diversos estudos, foi demonstrado que a ingestão de fitoestrógenos causa alterações reprodutivas em animais de ambos os sexos, além de síndromes de infertilidade temporária (PÉREZ-RIVERO et al., 2009; PEÑA-CORONA et al., 2019). No entanto, também há evidências de que os fitoestrógenos favorecem a reprodução ao aumentar a concentração, motilidade e volume espermático necessários para a fertilização (YOUSEF et al., 2004).

Em sêmen ovino, Adwas et. al. (2019) verificaram que a suplementação com Genisteína, uma isoflavona com potencial antioxidante, no diluidor seminal para criopreservação, foi capaz de aumentar a capacidade antioxidante, reduziu a lipoperoxidação, além de reduzir a fragmentação de DNA e a expressão da proteína pró-apoptótica caspase-3 na concentração de 10 μM . Por outro lado, uma concentração maior de Genisteína (100 μM) causou efeitos deletérios à célula espermática e integridade funcional. Em um estudo de revisão, a Cisteamina teve seu benefício comprovado melhorando parâmetros de motilidade e viabilidade em sêmen ovino criopreservado (AKALIN et al., 2016).

2.4.3 Resveratrol

O Resveratrol (trans-3,5,4-trihidroxi-trans-estilbeno) é um polifenol encontrado em diversas espécies de plantas, entre elas, uvas, amoras e amendoim (BURNS et al., 2002). Estudos *in vitro* e *in vivo* mostram que o Resveratrol possui diversas propriedades biológicas como, por exemplo, eficácia antioxidante, anti-inflamatória, antifúngica, anticarcinogênica e inibidora da agregação plaquetária (RASTIJA et al., 2009; LI et al., 2010).

Os efeitos protetores do Resveratrol contra o dano oxidativo *in vivo* e *in vitro* são provavelmente devido à regulação de antioxidantes endógenos dos sistemas celulares, além de atuar como um antioxidante “scavenger” de EROs (SPANIER et al., 2009). Ele também inibe a formação de radicais livres de oxigênio suprimindo genes que induzem oxidação e induzindo enzimas antioxidantes incluindo SOD, CAT, tioredoxina e GPx (DOLINSKY et al., 2009; SPANIER et al., 2009; TANNO et al., 2010). Estudos também relataram que o Resveratrol quelata o metal de transição cobre, que é capaz de gerar radicais livres e causar lipoperoxidação (FERRETTI et al., 2004).

Apesar do efeito do Resveratrol ter sido demonstrado com eficácia na melhoria de parâmetros espermáticos dessas espécies, não há relatos claros dos efeitos do Resveratrol acrescentado no diluidor seminal para criopreservação do sêmen de ovinos nas dosagens atualmente descritas.

2.5 Análises espermáticas

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

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

A funcionalidade da membrana pode ser testada, dentre outros, pelo teste hiposmótico (JEYENDRAN et al., 1984). Esse teste baseia-se na observação de que um espermatozoide, com uma membrana celular íntegra, se colocado em solução hiposmótica, permite a passagem da água pela membrana celular até o restabelecimento do equilíbrio osmótico entre os fluidos extra e intracelulares, sendo um indicativo de que o transporte de água através da membrana está ocorrendo normalmente (INAMASSU et al., 1999).

A utilização de sondas fluorescentes permite avaliar a integridade da membrana plasmática, através da combinação do Iodeto de Propídio com o Diacetato de

Carboxifluoresceína. O Diacetato de Carboxifluoresceína, por conter radicais acetil, consegue transpor a membrana intacta, sendo imediatamente desacetilada por esterases intracelulares, tornando a sonda impermeável e fazendo com que as células íntegras corem em verde. O Iodeto de Propídio somente penetra através de células que contenham membrana plasmática lesada, tendo afinidade pelo DNA e corando o núcleo da célula em vermelho (ARRUDA; CELEGHINI, 2003).

A integridade acrossomal pode ser mensurada por diferentes métodos, todavia os mais comumente usados são aqueles que utilizam isotiocianato de fluoresceínas conjugadas a lecitinas, tais como: *Peanut Agglutinin* (FITC-PNA) ou *Pisum Sativum Agglutinin* (FITC-PSA) (HERRERA et al., 2002). Estas lecitinas ligam-se especificamente a conteúdos acrossomais por meio da interação com glicoconjugados da membrana acrossomal externa (FITC-PNA) ou com grupos sacarídeos da glicoproteína pró-acrosina (FITC-PSA) (GILLAN et al., 2005; SILVA; GADELLA, 2006).

O corante JC-1 não apenas tem a habilidade para distinguir a mitocôndria funcional daquela não funcional, mas permite que os diferentes níveis de função mitocondrial sejam observados, visto que mitocôndrias com respiração pouco ativa acumula pouco corante e fluorescem em verde, ao passo que mitocôndrias com respiração bastante ativa acumulam mais corante, formando um agregado e fluorescendo em laranja (GRAHAM; MOCÉ, 2005).

A análise computadorizada do sêmen (CASA), oferece informações sobre a cinética espermática, com a utilização de campos de vídeo contendo imagens de espermatozoides eletronicamente digitalizados, fornecendo informação acurada, precisa e significativa do movimento individual de cada espermatozoide (AMANN; KATZ, 2004). Os parâmetros comumente obtidos através de analisadores de sêmen computadorizados são: velocidade do percurso curvilíneo (VCL), velocidade do percurso médio (VAP), velocidade em linha reta (VSL), retilinearidade (STR), linearidade (LIN), oscilação (WOB), frequência de batimento cruzado (BCF), e deslocamento lateral da cabeça (ALH) (VERSTEGEN et al., 2002).

CAPITULO I*

1 **Efeito da adição do Diazinon e do Trolox, ao diluidor Tris-Gema, na**
2 **criopreservação do sêmen de ovinos**

3 [*Effect of the addition of Diazinon and Trolox, to the Tris-egg yolk extender, in*
4 *cryopreservation of semen from rams*]

5 J. H. L Silva¹, A.P.R Costa¹

6 ¹Universidade Federal do Piauí, Teresina, PI, Brasil

7
8 **RESUMO**

9 Objetivou-se avaliar o efeito do estresse subletal, por meio da suplementação com
10 Diazinon (120 µM), assim como o efeito do agente antioxidante Trolox (75 µM), no
11 diluidor TRIS-gema, sobre a qualidade do sêmen criopreservado de ovinos. Para tanto,
12 foram coletadas amostras de sêmen de seis carneiros da raça Dorper, clinicamente
13 saudáveis e com os parâmetros andrológicos/seminais normais. O sêmen foi diluído em
14 meio Tris-Gema com glicerol e os respectivos tratamentos: Controle (Tris-Gema), T1
15 (Tris-Gema + 120 µM de Diazinon) e T2 (Tris-Gema + 75 µM de Trolox).
16 Posteriormente, foram realizadas as análises físicas do ejaculado pré e pós-diluição. As
17 amostras foram criopreservadas pelo método automatizado e, após 15 dias, foram
18 realizadas as seguintes análises pós-descongelamento: análise física, teste de
19 termorresistência (TTR), avaliação morfológica pré-congelação e pós-descongelação,
20 integridade da membrana plasmática, integridade acrossomal, atividade mitocondrial,
21 funcionalidade da membrana plasmática espermática e análise computadorizada do
22 sêmen (CASA). A análise estatística foi realizada utilizando o SAS 2013, e as diferenças
23 foram consideradas significativas quando $p < 0,05$. No tratamento com Diazinon, a
24 integridade acrossomal e a funcionalidade da membrana plasmática, se mostraram
25 reduzidas em relação aos demais tratamentos ($p < 0,05$), porém os demais parâmetros
26 cinéticos foram semelhantes ($p > 0,05$). Em conclusão, a suplementação de 120 µM de
27 Diazinon ao meio diluidor Tris-Gema, não melhorou a cinética espermática bem como a
28 qualidade estrutural dos espermatozoides, porém o tratamento com Trolox (75 µM),
29 mantém a qualidade espermática do sêmen criopreservado de ovinos.

30 **Palavras-chave:** antioxidante, criopreservação, organofosforado

31 **INTRODUÇÃO**

32 A utilização de sêmen criopreservado se tornou cada vez mais importante ao longo
33 dos anos, pois tem sido utilizado em diversas biotécnicas reprodutivas, devido à sua
34 praticidade de manipulação, transporte e armazenamento. Entretanto, esta técnica é capaz
35 de induzir crioinjúrias e outros efeitos deletérios aos espermatozoides, incluindo a
36 indução prematura da reação acrossômica, perda de motilidade, redução na integridade
37 do DNA, danos na membrana plasmática, acrossomal e mitocondrial, provocando a
38 redução da fertilidade dos espermatozoides (Abavisani *et al.*, 2013; Morrell e Mayer,
39 2017).

40 No entanto, as crioinjúrias podem ser reduzidas pela adição de antioxidantes ao
41 meio diluidor durante a criopreservação, melhorando os parâmetros pós-descongelção
42 de motilidade e fertilização *in vitro* (Castelo Branco *et al.*, 2017).

43 Tem sido observado que o Trolox é um excelente inibidor da lipoperoxidação,
44 devido ao fato de distribuir-se nas camadas duplas de lipídeos das biomembranas,
45 envolvendo o OH[•] fenólico e proporcionando a remoção de radicais peroxil (Albertini e
46 Abuja, 1999).

47 Por outro lado, a exposição prévia das células a estresses subletais podem
48 estimular uma resposta com a síntese de proteínas de choque térmico (HSP). Estas células
49 expostas a uma nova situação de estresse responderão de forma mais rápida, eficaz e
50 reprogramada, procurando reduzir e limitar a extensão das lesões (Mentz, 2018).

51 Em elevadas doses, os organofosforados Malation e Diazinon são capazes de
52 reduzir a qualidade espermática e as concentrações hormonais, devido a elevação do
53 estresse oxidativo nos testículos, além de danos histopatológicos e diminuição do peso
54 dos órgãos do sistema genital masculino, podendo reduzir a fertilidade dos animais
55 expostos (Schons, 2022).

56 Porém, a níveis subletais, esses compostos podem levar a síntese de proteínas de
57 choque térmico (HSPs), atuando no reagrupamento e remodelação de proteínas,
58 exercendo a função de chaperonas moleculares, elevando sua resistência ao processo de
59 criopreservação. Todavia, ainda não existem evidências e estudos relativos ao uso de
60 organofosforados, como indutor oxidativo subletal, na criopreservação espermática.

61 Dessa forma, o objetivo desse estudo foi avaliar o efeito do estresse subletal, por
62 meio da suplementação com Diazinon (120 µM), assim como o efeito do agente

63 antioxidante Trolox (75 μ M), no diluidor TRIS-gema, sobre a qualidade do sêmen
64 criopreservado de ovinos.

65

66 MATERIAL E MÉTODOS

67 Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da
68 Universidade Federal do Piauí, UFPI, Teresina - PI, sob protocolo nº 745/2022.

69 Foram utilizados seis carneiros da raça Dorper, provenientes do Biotério de
70 Produção de Ovinos do Colégio Técnico de Teresina (CTT), da Universidade Federal do
71 Piauí, localizado na cidade de Teresina. Os carneiros foram mantidos sob regime semi-
72 intensivo, em área com pastagem cultivada de capim *Tifton sp* e *Mombaça sp*, dividida
73 em piquetes, recebendo silagem de milho, água e 20g/animal/dia de sal mineral, e
74 avaliados quanto à normalidade dos parâmetros andrológicos antes do estudo, de acordo
75 com as recomendações do Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (motilidade em
76 massa: ≥ 3 ; motilidade espermática: ≥ 80 %; concentração: 1 a 3 bilhões
77 espermatozoides/mL; número total de espermatozoides no ejaculado: 3 a 5 bilhões;
78 espermatozoides morfológicamente normais: ≥ 80 % (CBRA, 2013).

79 Foram realizadas 6 coletas de sêmen dos 6 reprodutores, com auxílio de uma
80 vagina artificial, com um intervalo de 4 dias entre as coletas, totalizando 36 ejaculados.
81 Após cada coleta, foram avaliados individualmente o ejaculado de cada reprodutor e
82 selecionado conforme as características seminais desejáveis de reprodutores ovinos
83 (CBRA, 2013). Posteriormente, foi formado o *pool* do ejaculado dos seis produtores,
84 avaliado as características físicas do *pool*, e diluído em diluidor Tris-Gema (3,605 g de
85 Tris; 2,024 g de ácido cítrico; 1,488g de frutose; 25 mg de gentamicina; 50.000 UI de
86 penicilina; 100 ml de água destilada; 20% de gema de ovo e 5% de glicerol, com
87 osmolaridade de 350 mOsm/kg e pH 6,8), avaliando os parâmetros físicos de motilidade
88 e vigor espermático após a diluição. Três diluidores experimentais foram preparados na
89 seguinte disposição: Controle (Tris-Gema), T1 (Tris-Gema + 120 μ M de Diazinon) e T2
90 (Tris-Gema + 75 μ M de Trolox). Uma parte do mesmo *pool* foi diluído em cada um dos
91 grupos experimentais. As concentrações utilizadas nos tratamentos T1 (120 μ M de
92 Diazinon) e T2 (75 μ M de Trolox) foram obtidas através de avaliação de desempenho em
93 testes preliminares. Nesses testes, foram utilizadas as concentrações de 60, 120 e 180 μ M
94 de Diazinon e as concentrações de 25, 50 e 75 μ M de Trolox, acrescidos ao diluidor Tris-

95 Gema, de forma individual, inserindo o volume de sêmen necessário, conforme o cálculo
96 de concentração espermática estabelecido pelo CBRA (2013) e avaliados os parâmetros
97 de motilidade e vigor espermático imediatamente após a diluição e 15 minutos pós-
98 diluição, obtendo as melhores concentrações utilizadas neste estudo.

99 Imediatamente após a coleta e processamento, as amostras de sêmen foram
100 envasadas em palhetas de 0,25 mL, à temperatura ambiente, para uma concentração final
101 de 20×10^6 espermatozoides viáveis/palheta, e então foram congeladas em máquina TK
102 3000® (TK Tecnologia em Congelação Ltda., Uberaba, Brasil), ajustada para uma taxa
103 de resfriamento de $-0,5 \text{ }^\circ\text{C}/\text{min}$ da temperatura ambiente ($25 \text{ }^\circ\text{C}$) até atingir a temperatura
104 de $5 \text{ }^\circ\text{C}$. Após estabilização a $5 \text{ }^\circ\text{C}$ por 1 hora, o congelamento foi realizado a $-20 \text{ }^\circ\text{C}/\text{min}$
105 até atingir uma temperatura de $-120 \text{ }^\circ\text{C}$, quando as palhetas foram colocadas diretamente
106 em nitrogênio líquido ($-196 \text{ }^\circ\text{C}$). Após um período de 15 dias, as amostras foram
107 submetidas às análises pós-descongelação. A descongelação foi realizada em banho-
108 maria, em uma temperatura de $37 \text{ }^\circ\text{C}$ por 30 segundos, para avaliação quanto à motilidade
109 total e vigor no teste de termo resistência (TTR), análise computadorizada do sêmen
110 (CASA), avaliação morfológica pós-descongelação, avaliação da integridade da
111 membrana plasmática, integridade acrossomal, atividade mitocondrial, através de sondas
112 fluorescentes, funcionalidade da membrana plasmática espermática (HOST).

113 O teste de termorresistência avaliou a longevidade dos espermatozoides das
114 amostras de sêmen descongeladas, incubadas em banho-maria a $37 \text{ }^\circ\text{C}$ por um período de
115 3 horas. As amostras descongeladas foram acondicionadas em microtubos de 1,5 mL e
116 incubadas a $37 \text{ }^\circ\text{C}$, posteriormente, foram avaliadas quanto à motilidade total (MT - %) e
117 o vigor (1-5) espermático por meio de microscopia de contraste de fase (Olympus optical
118 Co., Ltda., Tóquio, Japão) com placa aquecedora acoplada, com aumento de 400x, nos
119 tempos 0, 30, 60, 120 e 180 minutos pós-descongelamento de acordo com Colégio
120 Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA, 2013).

121 A análise computadorizada do sêmen descongelado foi realizada no Núcleo
122 Integrado de Biotecnologia da Universidade Estadual do Ceará (NIB/UECE), através do
123 sistema CASA (Computer-Assisted Sperm Analyses), utilizando o software Sperm Class
124 Analyzer® (SCA) (Microoptics, SL, versão 3.2.0, Barcelona, Espanha). Uma amostra de
125 $10 \text{ } \mu\text{L}$ de sêmen descongelado de cada ejaculado foi diluído em $50 \text{ } \mu\text{L}$ de meio TRIS
126 (3,605 g de Tris (hidroximetil) aminometano; 2,024 g de ácido cítrico; 1,488g de frutose;

127 100 mL de água destilada) previamente aquecido em banho-maria a 37°C, e uma alíquota
128 de 10 µL dessa diluição foi inserido em lâmina previamente aquecida a 37°C e analisado
129 com auxílio de microscópio de contraste de fase acoplado a uma vídeo-câmera adaptada
130 ao sistema (Nikon™ H5505, Eclipse 50i, Japão). Para cada amostra foram analisados
131 cinco campos. Dentre os parâmetros avaliados estão: motilidade total (MT - %),
132 motilidade progressiva (MP - %), velocidade curvilínea (VCL - µm/s), velocidade em
133 linha reta (VSL - µm/s), velocidade média do percurso (VAP - µm/s), linearidade (LIN -
134 %), retilinearidade (STR - %), índice de oscilação ou wobble (WOB - %), deslocamento
135 lateral de cabeça (ALH - µm) e frequência de batimento cruzado (BCF - Hz), individual
136 para cada espermatozoide analisado.

137 A morfologia foi estimada em cada amostra de sêmen descongelado, pelo método
138 da câmara úmida, por meio do qual foram avaliados 200 espermatozoides por observação
139 microscópica (1000x), e a porcentagem das diversas alterações morfológicas foi agrupada
140 e classificada em espermatozoides normais, espermatozoides com defeitos maiores,
141 defeitos menores e defeitos totais, conforme Bloom (1973).

142 Para avaliação da integridade da membrana plasmática, foi utilizado o método de
143 coloração dupla com diacetato de carboxifluoresceína (DCF; Sigma-Aldrich®, St.Louis,
144 MO, USA) e iodeto de propídio (IP; Sigma-Aldrich®, St. Louis, MO, USA), modificado
145 por Coleto *et al.* (2002), em que alíquotas de 50 µL de sêmen pós-descongelamento foram
146 diluídas em 150 µL de Tris (3,605 g de Tris, 2,024 g de ácido cítrico, 1,488 g de frutose,
147 100 mL de água destilada) contendo 5 µL de DCF (0,46mg/mL em DMSO) e 20 µL de
148 IP (0,5 mg/mL em PBS) e incubadas por 10 minutos a 37 °C. Um total de 200
149 espermatozoides foi avaliado em microscópio de epifluorescência (Olympus optical Co.,
150 Ltda., Tóquio, Japão), com aumento de 400x, usando-se filtro de emissão DBP 580-
151 630nm e excitação DBP 485/20nm. Os espermatozoides foram classificados com
152 membrana intacta, quando se apresentaram corados em verde, e com membrana
153 danificada quando corados em vermelho.

154 Para avaliação da integridade do acrossoma, foi utilizado o corante isotiocianato
155 de fluoresceína conjugado a *Peanut agglutinin* (FITC-PNA; Sigma-Aldrich®, St Louis,
156 MO, USA), de acordo com a técnica descrita por Roth *et al.* (1998), em que uma alíquota
157 de 20 µL da solução estoque de FITC-PNA (1 mg/mL) foi descongelada e adicionada a
158 480 µL de solução de fosfato tamponada (PBS) para obter a concentração final de 100

159 $\mu\text{g/mL}$. Alíquotas (20 μL) desta solução foram inseridas sobre esfregaços de lâminas
160 contendo espermatozoides, as quais foram incubadas por 20 minutos em câmara úmida a
161 4 °C, na ausência de luz. Após incubação, as lâminas foram enxaguadas duas vezes em
162 PBS refrigerado (4 °C) e reservadas para secagem na ausência de luz. Imediatamente
163 antes da avaliação, 5 μL de meio de montagem UCD (4,5 mL de glicerol, 0,5 mL de PBS,
164 5mg de azida sódica e 5mg de p-fenilenodiamina) foi inserido sobre a lâmina e cobertos
165 com lamínula. Foram avaliados 200 espermatozoides por lâmina, com aumento de 1000
166 x, sob óleo de imersão, em microscópio de epifluorescência (Olympus optical Co., Ltda.,
167 Tóquio, Japão), usando-se filtro de emissão LP 515 nm e BP 450-490 nm para excitação.
168 Os espermatozoides foram classificados como portadores de acrossomas intactos, quando
169 apresentaram a região acrossomal corada com fluorescência verde, ou como portadores
170 de acrossoma reagido, quando apresentaram uma faixa verde fluorescente na região
171 equatorial da cabeça espermática ou não apresentaram fluorescência verde em toda região
172 da cabeça.

173 A função mitocondrial foi determinada pela utilização de um fluorocromo
174 catiônico lipofílico JC-1 (Guthrie e Welch, 2006). Para tanto, alíquotas de 50 μL de sêmen
175 pós-descongelamento foram diluídas em 150 μL de Tris, contendo 5 μL de JC-1 (0,15 mM
176 em DMSO) e incubadas por 10 minutos a 37 °C. Um total de 200 espermatozoides foram
177 avaliados em microscópio de epifluorescência (Olympus optical Co., Ltda., Tóquio,
178 Japão), com aumento de 1000 x, sob óleo de imersão, usando-se filtro de emissão LP 515
179 nm e BP 450-490 nm para excitação. Os espermatozoides com a região da peça
180 intermediária coradas em laranja foram classificados com alto potencial de membrana
181 mitocondrial, e aqueles com a região da peça intermediária coradas em verde foram
182 classificados com baixo potencial de membrana mitocondrial.

183 Para avaliação da funcionalidade da membrana espermática, através do teste
184 hiposmótico (HOST), uma proporção de 10 μL de sêmen descongelado de cada
185 tratamento, de forma individualizada, foi diluído em 1 mL de solução hiposmótica
186 constituída por citrato tri-sódico e frutose, obedecendo a uma concentração de 150
187 mOsm/L. Outra alíquota de 10 μL de sêmen, de cada tratamento, de forma
188 individualizada, foi diluído em 1 mL de solução isosmótica, constituída por citrato tri-
189 sódico e frutose, obedecendo a uma concentração de 300 mOsm/L, conforme Fonseca *et*
190 *al.* (2005) e incubados em Banho-Maria a 37°C, durante 60 minutos. Posteriormente,

191 10 μ L de cada solução (hiposmótica e isosmótica) foi inserido sobre lâmina, coberta com
192 lamínula, e observada em microscópio de contraste de fase (Olympus optical Co., Ltda.,
193 Tóquio, Japão) com aumento de 1000x. O resultado foi expresso em percentual pela
194 diferença de caudas dobradas antes e após o teste, em 200 espermatozoides contados.

195 O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, com três
196 tratamentos e 6 repetições (coletas). As variáveis motilidade total e vigor no teste de termo
197 resistência (TTR), integridade da membrana plasmática, integridade acrossomal,
198 atividade mitocondrial, funcionalidade da membrana plasmática espermática (HOST) e
199 avaliação morfológica pré e pós-descongelamento foram submetidas à análise de variância
200 (ANOVA), utilizando-se o procedimento modelos lineares gerais (Proc GLM), e para
201 comparação de média foram utilizados os testes paramétricos de Duncan e Tukey, na
202 probabilidade de 5%. As análises foram executadas através do programa *Statistical*
203 *Analysis System* (SAS Institute Inc, 2002).

204

205 **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

206

207 Os parâmetros cinéticos, pós-descongelamento, de espermatozoides criopreservados,
208 analisados pelo sistema CASA, são observados na Tab. 1. O grupo suplementado com
209 Diazinon (120 μ M) apresentou menor motilidade progressiva (10,92%) em comparação
210 com o grupo Controle (20,82%) ($p < 0,05$), porém não diferiu do grupo suplementado com
211 Trolox (75 μ M) ($p > 0,05$, Tab. 1). Por outro lado, a motilidade progressiva do grupo
212 suplementado com Trolox (75 μ M) se manteve ao mesmo nível do tratamento controle
213 ($p > 0,05$). Os demais parâmetros cinéticos espermáticos foram preservados de forma
214 semelhante em todos os diluidores utilizados no processo de criopreservação ($p > 0,05$).

215 O sêmen criopreservado em meio com Diazinon (120 μ M) não apresentou a
216 resposta esperada de proteção após o estímulo nocivo provocado pelo processo de
217 criopreservação, através de uma concentração subletal, mantendo uma motilidade
218 progressiva abaixo do tratamento controle. No entanto, o grupo suplementado com
219 Diazinon manteve uma motilidade total de acordo com o preconizado pelo CBRA (2013)
220 para o sêmen criopreservado de ovinos ($\geq 30\%$). Dessa forma, observa-se que o Diazinon
221 (120 μ M) estimulou um nível de estresse subletal nas células espermáticas, porém sem
222 melhorar os parâmetros cinéticos.

223
224
225
226

Tabela 1. Parâmetros cinéticos (CASA) de espermatozoides criopreservados de ovinos em meio de congelação suplementado com Diazinon (120 µM) e Trolox (75 µM) (n=6)

Parâmetros	Controle	Diazinon	Trolox
MT (%)	51,67±13,73	35,67±9,44	51±10,18
MP (%)	20,82±10,77 ^a	10,92±2,77 ^b	13,5±4,23 ^{ab}
VCL (µm/s)	61,22±10,42	54,98±5,75	54,95±5,7
VSL (µm/s)	33,88±11,08	26,58±4,54	25,53±5,47
VAP (µm/s)	42,65±10,96	36,67±4,2	35,1±5,04
LIN (µm/s)	54,23±9,0	48,1±4,38	46,28±7,48
STR (µm/s)	78,23±7,01	72,73±4,18	72,15±5,46
WOB (µm/s)	68,98±6,43	66,1±3,32	63,83±6,15
ALH (µm/s)	3,18±0,43	3,18±0,41	3,15±0,21
BCF (µm/s)	9,6±1,76	8,6±1,74	10,17±1,55

227
228
229
230
231
232
233
234

Médias com mesma letra não diferem entre si pelo teste de Duncan a 5% (P>0,05).

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

MT – motilidade total; **MP** - motilidade progressiva; **VCL** – velocidade curvilínea; **VSL** - velocidade em linha reta; **VAP** – velocidade média de percurso; **LIN** - linearidade; **STR** - retilinearidade; **WOB** – Oscilação; **ALH** - Amplitude de deslocamento lateral da cabeça e **BCF** - frequência de batimentos de cauda. Médias com mesma letra não diferem entre si pelo teste de Duncan a 5% (P>0,05).

235
236
237
238
239
240
241

O sêmen criopreservado em meio com Diazinon (120 µM) não apresentou a resposta esperada de proteção após o estímulo nocivo provocado pelo processo de criopreservação, através de uma concentração subletal, mantendo uma motilidade progressiva abaixo do tratamento controle. No entanto, o grupo suplementado com Diazinon manteve uma motilidade total de acordo com o preconizado pelo CBRA (2013) para o sêmen criopreservado de ovinos (≥ 30%). Dessa forma, observa-se que o Diazinon (120 µM) estimulou um nível de estresse subletal nas células espermáticas, porém sem melhorar os parâmetros cinéticos.

242
243
244
245
246
247

Em geral, se o estímulo estressor não for além de um certo limite, a célula pode se adaptar, montando uma adequada resposta celular protetora, o que garante a sobrevivência da mesma. Por outro lado, pode ocorrer uma falha em ativar ou manter uma resposta protetora, por exemplo, se o agente estressor for muito intenso, resultando na ativação de cascatas de sinalização de estresse, que eventualmente induzem as vias de morte celular (Perkins e Gilmore, 2006; Weston e Davis, 2007).

248
249
250
251

Os resultados desse estudo divergem dos observados por Silva (2010), avaliando o efeito da suplementação do Trolox (30, 60 e 120 µM) na qualidade do sêmen criopreservado de ovinos, onde a percentagem de espermatozoides com motilidade progressiva (MP), LIN, STR, WOB, VSL e VAP, utilizando 60 µM e 120 µM de Trolox,

252 foram superiores às observadas no controle. Observa-se que as médias de motilidade
253 progressiva foram muito semelhantes aos observados nesse estudo, para o grupo Trolox
254 (75 μM – 13,5%).

255 Os parâmetros de MT, MP, LIN, STR e BCF observados nesse estudo foram
256 superiores aos observados por Peixoto (2007), avaliando o efeito do Trolox (60 μM) na
257 qualidade do sêmen criopreservado de ovinos. Amostras com elevados valores desses
258 parâmetros de velocidade e de LIN e BCF apresentam melhor migração e penetração no
259 muco cervical (Mortimer, 2000; Verstegen et al., 2002).

260 O efeito inibitório do Trolox sobre a lipoperoxidação, através da neutralização de
261 radicais peróxil e radicais alcoxil, encontrados nas membranas espermáticas, durante o
262 processo de criopreservação (Pereira et al. 2003), não foi suficiente para produzir
263 melhores parâmetros cinéticos dos espermatozoides ovinos, e isso pode ser atribuído à
264 dose utilizada e à sua interação com o diluidor Tris-gema, interagindo com menor
265 intensidade sobre a bicamada lipídica do espermatozoide.

266 No teste de termorresistência (TTR) espermático a 37 °C nos tempos 0, 30, 60,
267 120 e 180 minutos pós-descongelamento, observou-se que os parâmetros de motilidade e
268 vigor não diferiram estatisticamente entre os tratamentos e o controle, em nenhum dos
269 tempos avaliados, quando adicionado Diazinon (120 μM) e Trolox (75 μM) ao diluidor
270 de criopreservação de sêmen em ovinos (Tab. 2; $p>0,05$). No entanto, houve variações
271 entre os tempos dentro de cada tratamento para as variáveis motilidade e vigor e
272 espermático (Tab. 2; $p<0,05$).

273 Sousa Filho *et al.* (2021), avaliando o efeito da vitamina E (116 μM) no sêmen
274 criopreservado de cães, também não observaram efeitos positivos da motilidade e vigor
275 espermáticos, avaliados pelo TTR, nos diferentes tempos de avaliação da longevidade
276 espermática, corroborando com os resultados desse estudo. O mesmo resultado foi
277 observado por Peixoto *et al.* (2013), quando utilizaram Trolox na criopreservação de
278 sêmen de cães, nas concentrações de 200 e 300 $\mu\text{M/L}$.

279 Tabela 2. Motilidade total e vigor pós-descongelamento de espermatozoides ovinos, criopreservados em meio de congelação suplementado
 280 com Diazinon (120 µM) e Trolox (75 µM), avaliados pelo teste de termo resistência (TTR) (n=6)
 281

Tratamentos	0 minutos		30 minutos		60 minutos		120 minutos		180 minutos	
	Motilidade	Vigor	Motilidade	Vigor	Motilidade	Vigor	Motilidade	Vigor	Motilidade	Vigor
Controle	29,17±8,01 ^a	2,83±0,41 ^A	17,5±7,58 ^b	2,67±0,51 ^A	12,5±6,89 ^b	2,17±0,98 ^A	4,83±3,54 ^c	1,33±0,81 ^B	1,5±2,07 ^c	0,5±0,55 ^C
Diazinon	19,17±6,64 ^a	2,5±0,55 ^A	12,5±4,18 ^b	2,17±0,75 ^A	7,33±3,88 ^c	2±1,09 ^{AB}	3±1,89 ^{cd}	1,17±0,75 ^{BC}	1±2 ^d	0,33±0,51 ^C
Trolox	28,33±7,53 ^a	2,83±0,41 ^A	16,67±4,08 ^b	2,67±1,03 ^A	9,5±6,12 ^c	2,17±0,75 ^A	3,33±1,37 ^d	1,17±0,41 ^B	0,67±1,21 ^d	0,33±0,51 ^C

282 Valores de média com letras minúsculas diferentes na mesma linha indicam diferenças significativas entre os tempos para motilidade (p<0,05) pelo teste de Duncan

283 Valores de média com letras maiúsculas diferentes na mesma linha indicam diferenças significativas entre os tempos para vigor (p<0,05) pelo teste de Duncan

284

285 Castelo Branco *et al.* (2020), avaliando o efeito do Eugenol (10µM e 50µM), adicionado ao meio de congelação de sêmen de touros,
 286 observaram o mesmo efeito de estabilização da redução da motilidade e vigor e espermático pelo TTR, sobretudo nos tempos 120 e 180
 287 minutos pós-descongelação.

288 Para o tratamento com Diazinon houve uma redução significativa da motilidade espermática até o tempo de 60 minutos pós-
 289 descongelação (T60) (p<0,05), havendo uma estabilização entre os tempos 60 e 120 minutos (p>0,05) e entre os tempos 120 e 180 minutos
 290 (p>0,05). Para o tratamento com Trolox houve uma redução significativa da motilidade espermática até o tempo de 120 minutos pós-
 291 descongelação (p<0,05), havendo uma estabilização entre os tempos 120 e 180 minutos (p>0,05).

292 Esses resultados podem indicar a necessidade de maior tempo de ação do Diazinon e do Trolox, pós-descongelamento, na bicamada
 293 lipídica dos espermatozoides, para estabilização dos danos ocasionados pela criopreservação espermática, em especial, a lipoperoxidação da
 294 membrana plasmática.

295 Para os resultados de morfologia espermática (Tab. 3), observou-se que a adição
 296 de Diazinon e Trolox ao meio diluidor não alterou o percentual de defeitos espermáticos
 297 no sêmen criopreservado de ovinos, e não alterou o percentual de defeitos espermáticos
 298 antes (*pool*) e após o processo de criopreservação em cada tratamento ($p>0,05$). Observa-
 299 se que há uma tendência de aumento no percentual de defeitos maiores após o processo
 300 de criopreservação. O percentual de espermatozoides com defeitos maiores, em todos os
 301 grupos, está de acordo com o preconizado pelo CBRA (2013), com valores menores que
 302 10%, assim como o percentual de espermatozoides normais é superior a 80%.

303

304 Tabela 3. Parâmetros morfológicos (defeitos maiores, defeitos menores e defeitos totais)
 305 espermáticos pós-descongelamento, do sêmen de ovinos, criopreservados em meio de
 306 congelação suplementado com Diazinon (120 μ M) e Trolox (75 μ M) (n=6)

307

Parâmetros	Controle	Diazinon	Trolox	Pool
Defeitos maiores (%)	8 \pm 3,03	5 \pm 2	7,67 \pm 4,54	4,43 \pm 1,28
Defeitos menores (%)	6 \pm 3,09	9,17 \pm 3,76	5,5 \pm 2,88	9,63 \pm 4,03
Defeitos totais (%)	14 \pm 3,85	14,17 \pm 3,97	13,17 \pm 3,87	14,07 \pm 3,55

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

309

310 Resultado semelhante foi observado por Castelo Branco *et al.* (2017), ao avaliar
 311 o percentual de defeitos maiores, menores e totais, pós-descongelamento, do sêmen de
 312 bovinos criopreservados em diluidor suplementado com inibidores de serino protease
 313 (inibidor do ativador do plasminogênio 1 – PAI 1 e Antipaina), onde esses agentes
 314 antioxidantes não interferiram nesses padrões de morfologia espermática. O mesmo autor
 315 também não observou interferência desses antioxidantes no potencial de membrana
 316 mitocondrial, a exemplo do Diazinon nesse estudo e não observou interferência na
 317 integridade de membrana plasmática, a exemplo do Trolox neste estudo.

318 Esses resultados demonstram que o Diazinon e o Trolox, assim como algumas
 319 outras categorias de antioxidantes, não promovem uma alteração no padrão morfológico
 320 das células espermáticas, no entanto, podem gerar alterações a níveis ultraestruturais da
 321 célula, a exemplo da estrutura da membrana plasmática e potencial de membrana
 322 mitocondrial, provavelmente por serem os principais sítios de ação das EROs sob os
 323 espermatozoides.

324 Na avaliação da ultraestrutura espermática, através de sondas fluorescentes,
 325 observou-se que a adição de Diazinon e Trolox não gerou um incremento no percentual
 326 de células com integridade de membrana plasmática, bem como no percentual de células
 327 espermáticas com atividade mitocondrial (Tab. 4; $p>0,05$), porém o Diazinon reduziu o
 328 percentual de espermatozoides com acrossoma intacto quando comparado aos demais
 329 tratamentos (Tab. 4; $p<0,05$). O Trolox apresentou uma tendência favorável para a
 330 manutenção da integridade do acrossoma.

331

332 Tabela 4. Integridade da membrana plasmática, atividade mitocondrial e integridade
 333 acrossomal pós-descongelamento de espermatozoides ovinos, criopreservados em meio
 334 de congelação suplementado com Diazinon (120 μ M) e Trolox (75 μ M) (n=6)
 335

Parâmetros	Controle	Diazinon	Trolox
Integridade de Membrana Plasmática (%)	34,33 \pm 7,97	28,83 \pm 7,08	38,83 \pm 12,59
Atividade Mitocondrial (%)	35,33 \pm 12,75	20,67 \pm 5,2	33 \pm 12,29
Integridade Acrossomal (%)	34,67 \pm 2,73 ^{ab}	30,17 \pm 2,32 ^b	36,67 \pm 2,42 ^a

336

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

337

Médias com mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% ($P>0,05$).

338

339 Em estudo realizado por Souza *et al.* (2017), avaliando a associação de Trolox ao
 340 ácido ascórbico ou melatonina, também não houve aumento do percentual de
 341 espermatozoides com integridade de membrana plasmática e acrossomal nos tratamentos
 342 utilizando Trolox, no entanto, os autores obtiveram maiores percentuais de atividade
 343 mitocondrial quando associaram o Trolox ao ácido ascórbico e melatonina.

344 Tem sido observado que o Trolox é um excelente inibidor da lipoperoxidação,
 345 devido ao fato de distribuir-se bicamada lipídica das biomembranas, envolvendo o OH-
 346 fenólico e proporcionando a remoção de radicais peroxil (Albertini e Abuja, 1999), no
 347 entanto não foi observado no presente estudo a efetividade das característica
 348 antioxidantes do Trolox na criopreservação do sêmen, sugerindo que a substância pode
 349 ter um efeito dose dependente, não apresentando um nível de concentração necessário
 350 para exercer uma atividade antioxidante nessas regiões específicas dos espermatozoides.
 351 Além disso, a associação de antioxidantes com diferentes características, no meio diluidor

352 para criopreservação, pode potencializar os efeitos de cada um dos antioxidantes
353 utilizados.

354 Peña *et al.* (2003), utilizando o Trolox nas concentrações de 100 e 200 μM , na
355 congelação do sêmen de suínos, identificaram que a maior dosagem conferiu melhores
356 resultados para a motilidade espermática e potencial de membrana mitocondrial.

357 O diluidor suplementado com 120 μM de Diazinon apresentou bom potencial de
358 manutenção da motilidade espermática pré-congelação, mostrando estabilidade no meio
359 diluidor, alcançando uma motilidade espermática de 72,5%. Não existem estudos
360 anteriores do efeito do Diazinon na qualidade espermática, quando inserido no diluidor
361 para criopreservação. No entanto, em estudo realizado em roedores sobre os efeitos do
362 Diazinon na qualidade espermática, foi observado que a exposição de camundongos ao
363 Diazinon levou à redução da qualidade espermática e do potencial de fertilidade (Naderi
364 *et al.*, 2020), o que pode estar associado às lesões provocadas pelo aumento da
365 peroxidação lipídica na membrana celular, que afetou, dentre outras, a região acrossômica
366 e estresse oxidativo. Portanto, não foi observado o efeito de subletalidade na concentração
367 empregada, gerando danos ao acrossoma espermático.

368 Breininger *et al.* (2005), verificaram que a dosagem de 200 $\mu\text{g/mL}$ de acetato de
369 α -tocoferol preservou a integridade mitocondrial, elevando a motilidade espermática em
370 suínos, uma vez que foi preservada a matriz de energia.

371 Silva (2010), comparando o efeito do Trolox (30, 60 e 120 μM) e da Catalase,
372 adicionados ao diluidor Tris-Gema na congelação do sêmen de ovinos, observou que, ao
373 aumentar a concentração do Trolox ao meio diluidor, houve maior preservação do
374 acrossoma quando comparado à utilização da Catalase.

375 Na análise da funcionalidade da membrana plasmática, pelo teste hiposmótico
376 (HOST), houve redução do percentual de células espermáticas com membrana funcional
377 quando diluídos em meio de congelação suplementado com Diazinon, quando comparado
378 aos demais grupos (Tab. 5; $0 < 0,05$). O Trolox manteve a funcionalidade da membrana
379 plasmática ao nível do controle ($P > 0,05$). Resultado semelhante foi observado por Castelo
380 Branco *et al.* (2020), que não verificaram efeito positivo do Eugenol (10 μM e 50 μM) na
381 funcionalidade da membrana plasmática, pelo teste hiposmótico ($p > 0,05$).

382 Taherdehi *et al.* (2019) e Naderi *et al.* (2020), avaliando o efeito da administração
383 endógeno do Diazinon na qualidade espermática e tecido testicular de camundongos,

384 observaram redução da qualidade espermática e aumento da peroxidação lipídica, com
 385 redução da produção de glutathiona reduzida no parênquima testicular, mostrando que o
 386 Diazinon pode gerar efeitos negativos nas membranas espermáticas ainda na fase de
 387 espermatogênese, o que pode ocasionar redução da integridade e funcionalidade da
 388 membrana plasmática, em doses elevadas.

389 Carvalho (2022), avaliando o efeito da adição de Diazinon ao meio de maturação
 390 em oócitos bovinos, observou uma redução da qualidade das estruturas embrionárias
 391 formadas, embora não tenha interferido na taxa de clivagem das células, em seus estágios
 392 iniciais. Devido a sua propriedade lipofílica, os organofosforados atravessam facilmente
 393 a bicamada lipídica das membranas celulares, e dentro da célula produz radicais livres
 394 que causam estresse oxidativo local (Ozsoy *et al.*, 2016; Rieger *et al.*, 2017)

395 Essa característica explica alguns dos efeitos negativos diretos que o Diazinon, na
 396 concentração atualmente utilizada, provocou a nível ultraestrutural nas células
 397 espermáticas, impactando diretamente na integridade e funcionalidade da membrana
 398 plasmática do espermatozoide, no entanto, não gerou alterações significativas na cinética
 399 espermática, denotando baixa letalidade do composto, sem induzir respostas adaptativas.

400
 401 Tabela 5. Funcionalidade da membrana espermática de espermatozoides ovinos, pós-
 402 descongelação, submetidos ao teste hisposmótico (HOST), criopreservados em meio de
 403 congelação suplementado com Diazinon (120 µM) e Trolox (75 µM) (n=6)
 404

Parâmetros	Controle	Diazinon	Trolox
HOST (%)	16,67±8,91 ^a	8,17±5,19 ^b	12,17±7,08 ^{ab}

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

406 Médias com mesma letra não diferem entre si pelo teste de Duncan a 5% (P>0,05).

407

408 Aguiar *et al.* (2020), avaliando o efeito da suplementação com Trolox (40 µM) no
 409 diluidor, para o sêmen refrigerado de equinos, também não observaram aumento do
 410 percentual de células espermáticas com funcionalidade da membrana plasmática
 411 (p>0,05), pelo HOST, quando compara ao grupo controle e ácido decosa-hexaenoico
 412 (30ng/mL - DHA).

413 Por outro lado, Rosin *et al.* (2020), observaram um aumento do percentual de
 414 espermatozoides com funcionalidade da membrana plasmática de touros, quando
 415 criopreservado em diluidor suplementado com 250 µM/mL de Vitamina E (Trolox) e 0,60
 416 mg/mL de Vitamina C, mostrando que há uma grande variabilidade de resultados que

417 podem ser influenciados diretamente pela espécie animal, concentrações utilizadas no
418 meio diluidor, raças, variações individuais ou associações com diferentes categorias de
419 antioxidantes, com mecanismos de ação complementares.

420

421 **CONCLUSÃO**

422 A suplementação de 120 µM de Diazinon, ao meio diluidor Tris-Gema, reduziu a
423 cinética espermática bem como a qualidade estrutural dos espermatozoides, porém o
424 tratamento com Trolox (75 µM) manteve a qualidade espermática do sêmen
425 criopreservado de ovinos.

426

427 **AGRADECIMENTOS**

428 Agradecemos ao biotério de produção de ovinos do Colégio Técnico de Teresina
429 (CTT), da Universidade Federal do Piauí (UFPI), pela seção dos animais, ao laboratório
430 de Biotecnologia da Reprodução Animal da UFPI, pela seção das instalações para análises
431 pós-descongelamento das amostras e à CAPES, pela disponibilização de bolsa para
432 realização deste estudo.

433

434

435 **REFERÊNCIAS**

436

437 ABAVISANI, A.; ARSHAMI, J.; NASERIAN, A.A. *et al.* Qualidade de sêmen
438 resfriado ou congelado-descongelado bovino após a adição de suplementação de ácidos
439 graxos ômega-3 ao extensor. *International Journal of Fertility & Sterility*, v.7, p.161-
440 168, 2013.

441

442 AGUIAR, C.S.; BARROS, C.H.S.C.; MACHADO, W.M. *et al.* Efeito do ácido docosa-
443 hexaenoico e do Trolox® no diluidor de refrigeração de sêmen de garanhões da raça
444 Mangalarga Marchador. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v.72,
445 n.1, p.71-78, 2020.

446

447 ALBERTINI, R.; ABUJA, P.M. Prooxidant and antioxidant properties of Trolox C,
448 analogue of vitamin E, in oxidation of low-density lipoprotein. *Free Radical Research*,
449 v.30, n.3, p.181-188, 1999.

450

451 ALHAIDER, A.K.; WATSON, P.F. Cryopreservation of dog semen: The effects of
452 Equex STM paste on plasma membrane fluidity and the control of intracellular free
453 calcium. *Animal Reproduction Science*, v.110, p.147-161, 2009.

454

- 455 BLOOM, E. Ultrastructure of some characteristic sperm defects and a proposal for a new
456 classification of the bull spermogram. *Nord Vet Med*, v.25, p.383-391, 1973.
457
- 458 BREININGER, E.; BEORLEGUI, N.B.; O'FLAHERTY, C.M.; BECONI, M.T. Alpha-
459 tocopherol improves biochemical and dynamic parameters in cryopreserved boar semen.
460 *Theriogenology*, v.63, p.2126–2135, 2005.
461
- 462 CARVALHO, M.A. *Efeito do diazinon e trolox na produção in vitro de embriões*
463 *bovinos*. 2022. 45p. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Programa de Pós-
464 Graduação em Ciência Animal, Universidade Federal do Piauí, Teresina.
465
- 466 CASTELO BRANCO, M.A.; CARVALHO, Y.N.T.; MORAES JÚNIOR, F.J. *et al.*
467 Plasminogen activator inhibitor 1 and antipain preserve acrosome integrity of bovine
468 spermatozoa during cryopreservation. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e*
469 *Zootecnia*. v.69, n.5, p.1114-1124, 2017.
470
- 471 CASTELO BRANCO, Y.N.T.C.; CASTELO BRANCO, M.A.; LUSTOSA, M.S.C. *et*
472 *al.* O uso do Eugenol na criopreservação do sêmen bovino. *Brazilian Journal of*
473 *Development*, v.6, n.11, p.86336-86355, 2020.
474
- 475 CBRA – Colégio Brasileiro de Reprodução Animal. Manual para exame andrológico e
476 avaliação de sêmen animal. 3.ed. Belo Horizonte: CBRA, 2013.
477
- 478 COLETO, Z.F., GUERRA, M.M.P., BATISTA, A.M. Avaliação do sêmen congelado
479 de 452 caprinos com drogas fluorescentes. *Revista Brasileira de Medicina Veterinária*,
480 v.24, p.101-104, 2002.
481
- 482 GUTHRIE, H.D.; WELCH, G.R. Determination of intracellular reactive oxygen species
483 and high mitochondrial membrane potential in Percoll-treated viable boar sperm using
484 fluorescence-activated flow cytometry. *Journal of Animal Science*, v.84, p.2089-2100,
485 2006.
486
- 487 HOLT, W.V. Fundamental aspects of sperm cryobiology: the importance of species and
488 individual differences. *Theriogenology*, v.53, p.47-58, 2000.
489
- 490 MENTZ, D.A. *Efeitos da alta pressão gasosa sobre a viabilidade e expressão gênica de*
491 *blastocistos expandidos bovinos produzidos in vitro submetidos à criopreservação*.
492 2018. 62p. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias), Programa de Pós-
493 Graduação em Ciências Veterinárias, Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade
494 Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.
495
- 496 MORRELL, J.M.; MAYER, I. Reproduction biotechnologies in germplasm banking of
497 livestock species: a review. *Zygote*, v.25, p.545–557, 2017.
498
- 499 MORTIMER, S. T. Casa- Practical aspects. *Journal of Andrology*, v.21, n.4, p.515-524,
500 2000.
501

- 502 NADERI, N.; SOURI, M.; ESFAHANI, M. H. N. *et al.* Ferulago angulata extract
503 ameliorates epididymal sperm toxicity in mice induced by lead and diazinon.
504 *Andrology*, v.8, n.3, p.706-718, 2020.
505
- 506 OZSOY, A.Z.; NURSAL, A.F.; KARSLI, M.F. *et al.* Protective effect of intravenous lipid
507 emulsion treatment on malathion-induced ovarian toxicity in female rats. *European Review*
508 *for Medical and Pharmacological Sciences*, v.20, n.11, p.2425-34, 2016.
509
- 510 PEIXOTO, A.L.V.A. *Efeito da adição de vitamina C e Trolox ao diluidor utilizado*
511 *para criopreservação de sêmen ovino*. 2007. 96p. Tese (Doutorado em Ciências
512 Veterinárias). Programa de Pós-Graduação em Ciência Veterinária, Universidade Federal
513 Rural de Pernambuco.
514
- 515 PEIXOTO, P.C.V.A.; COLETO, Z.F.; MOURA, C.S. *et al.* Efeito da adição de trolox e
516 glutathiona reduzida na viabilidade *in vitro* de espermatozoides de cães. *Ciência Animal*
517 *Brasileira*, v.14, n.4, p.436-447, 2013.
518
- 519 PEÑA, F.J.; JOHANNISSON, A.; WALLGREN, M. *et al.* Antioxidant supplementation
520 *in vitro* improves boar sperm motility and mitochondrial membrane potential after
521 cryopreservation of different fractions of the ejaculate. *Animal Reproduction Science*,
522 v.78, p.85-98, 2003.
523
- 524 PEREIRA, C.; AGOSTINHO, P.; MOREIRA, P.I.; DUARTE, A.I.; SANTOS, M.S.;
525 OLIVEIRA, C.R. Estratégia de neuroproteção: Efeito da vimpocetina em modelos *in*
526 *vitro* de stress oxidativo. *Acta Med*, v.16, p.401-406, 2003.
527
- 528 PERKINS, N.D.; GILMORE, T.D. “Good cop, bad cop: the different faces of NF- κ B,”
529 *Cell Death and Differentiation*, v.13, n.5, p.759–772, 2006.
530
- 531 RIEGER, D.K.; SANTOS, A.A.; SUÑOL, C.; FARINA, M. Involvement of
532 superoxide in malaoxon-induced toxicity in primary cultures of cortical neurons.
533 *Journal Of Toxicology And Environmental Health*, v.80, n.19-21, p.1106-1115, 2017.
534
- 535 ROSIN, M.R.; OLIVEIRA, W.; MOTA, M.F. *et al.* Viabilidade *in vitro* do sêmen
536 bovino congelado com diferentes antioxidantes no crioprotetor. Resultados parciais. In:
537 Jornada Científica e Tecnológica, 10., Realeza, 2020. *Anais...* Realeza: UFFS, 2020,
538 v.1, n.10, p.1-4.
539
- 540 ROTH, T.L.; WEIS, R.B.; BUFF, J.L. *et al.* Heterologous *in vitro* fertilization and
541 sperm capacitation in an endangered African antelope, the Scimitar-Horned Oryx (*Oryx*
542 *dammah*). *Biology of Reproduction*, v.58, n.2, p.475-482, 1998.
543
- 544 SAS. SAS Software. Version 9.0. Cary, North Carolina: SAS Institute Inc., 2002.
545
- 546 SCHONS, D.D. *Efeitos da exposição aos inseticidas malation e diazinon sobre o*
547 *sistema genital masculino: uma revisão crítica da literatura focada em roedores*. 2022.
548 60 p. Trabalho de conclusão de curso (Graduação em Ciências Biológicas).
549 Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

- 550
551 SILVA, S.V. *Avaliação de espermatozoides ovinos criopreservados em Tris-gema*
552 *acrescido de antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos*. 2010. 118p. Tese (Doutorado
553 em Ciências Veterinárias). Programa de Pós-Graduação em Ciência Veterinária.
554 Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife.
555
- 556 SOUSA FILHO, M.A.C.; EVANGELISTA, L.S.M.; BARROS, F.N. *et al.* Efeito da
557 adição do ácido palmítico e da vitamina E ao diluidor Tris-gema na criopreservação de
558 sêmen canino. *Acta Scientiae Veterinariae*, v.1839, n.49, p.1-8, 2021.
559
- 560 SOUZA, W.L.; MORAES, E.A.; TONIOLLI, R. Adição de antioxidantes ao sêmen de
561 carneiros e seus efeitos após a descongelação. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v.37,
562 n.5, p.471-478, 2017.
563
- 564 TAHERDEHI, F.G.; NIKRAVESH, M.R.; JALALI, M. *et al.* Evaluating the protective
565 role of ascorbic acid in malathion-induced testis tissue toxicity of male rats.
566 *International Journal Of Preventive Medicine*, v.10, n.1, p.45, 2019.
567
- 568 VERSTEGEN, J.; IGUER-OUADA, M.; ONCLIN, K. Computer assisted semen
569 analyzers in andrology research and veterinary practice. *Theriogenology*, v.57, p.149-
570 179, 2002.
571
- 572 WESTON, C.R.; DAVIS, R.J. "The JNK signal transduction pathway," *Current*
573 *Opinion in Cell Biology*, v.19, n.2, p.142–149, 2007.

CAPITULO II*

1 **Efeito da suplementação de Genisteína e Resveratrol ao diluidor Tris-Gema na**
2 **criopreservação de sêmen ovino**

3

4 Jefferson Hallisson Lustosa da Silva^{1*}, Amilton Paulo Raposo Costa¹

5

6 ¹Universidade Federal do Piauí, Teresina, PI, Brasil

7 *Autor correspondente: jeffersonlustosamv@gmail.com

8

9 **Resumo**

10 Objetivou-se avaliar o efeito dos agentes antioxidantes Genisteína (25 µM) e Resveratrol
11 (20 µM), no diluidor TRIS-gema, sobre a qualidade do sêmen criopreservado de ovinos.
12 Para tanto, foram coletadas amostras de sêmen de seis ovinos da raça Dorper clinicamente
13 saudáveis e com os parâmetros andrológicos/seminais normais. O sêmen foi diluído em
14 meio Tris-Gema com glicerol e os respectivos tratamentos: Controle (Tris-Gema); T1
15 (Tris-Gema + 25 µM de Genisteína) e T2 (Tris-Gema + 20 µM de Resveratrol).
16 Posteriormente, foram realizadas as análises físicas do ejaculado pré e pós-diluição. As
17 amostras foram criopreservadas pelo método automatizado e, após 15 dias, foram
18 realizadas as seguintes análises pós-descongelamento: análise física, teste de
19 termorresistência (TTR), cinética espermática (CASA), avaliação morfológica pré-
20 congelação e pós-descongelamento, integridade da membrana plasmática, integridade
21 acrossomal, atividade mitocondrial e funcionalidade da membrana plasmática
22 espermática. A análise estatística foi realizada utilizando o SAS 2013, e as diferenças
23 foram consideradas significativas quando $p < 0,05$. A integridade acrossomal foi menor no
24 grupo suplementado com Resveratrol ($p < 0,05$), assim como o mesmo elevou o percentual
25 de espermatozoides com defeitos maiores em relação ao *pool* de espermatozoides pré-
26 congelação. A suplementação com Genisteína reduziu a funcionalidade da membrana
27 plasmática espermática. Em conclusão, a adição de 25 µM de Genisteína, ao diluidor Tris-

28 Gema, mantém os parâmetros cinéticos espermáticos e a suplementação de 20 μ M de
29 Resveratrol é capaz de melhorar o vigor espermático do sêmen criopreservado de ovinos.

30 **Palavras-chave:** fitoestrógenos, polifenol, sêmen, criopreservação

31

32 **Introdução**

33 O processo de criopreservação espermática possibilita o uso de amostras de sêmen
34 por períodos relativamente longos, reduz riscos e custos com aquisição de reprodutores,
35 além de favorecer a rápida difusão do material genético e formação de bancos de
36 germoplasma (Castelo et al., 2008; Bertozzo et al., 2009).

37 No entanto, sabe-se que o resfriamento, congelamento e descongelamento do
38 espermatozoide ovino podem causar danos irreversíveis, comprometendo assim sua
39 capacidade de fertilização (Hezavehei et al., 2018). O principal efeito deletério causado
40 ao espermatozoide é a geração de espécies reativas de oxigênio (EROs) durante todo o
41 ciclo de congelamento e descongelamento, acompanhada por baixos níveis de
42 antioxidantes no plasma seminal e no extensor, induzindo um estado de estresse oxidativo
43 que causa a peroxidação lipídica do sistema de membrana biológica e resulta em
44 qualidade reduzida do sêmen (Chaithrashree et al., 2020).

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

50 O Resveratrol é abundantemente encontrado na videira, e está entre os compostos
51 fenólicos que inibem a formação de EROS, retardando o envelhecimento celular e

52 orgânico (David et al., 2007). Na presença de trans-resveratrol, a peroxidação lipídica é
53 inibida com mais eficiência quando comparado às vitaminas C e E, demonstrando que o
54 Resveratrol possui melhores efeitos antioxidantes que tais vitaminas (Stojanović et al.,
55 2001).

56 Além disso, nos últimos anos, têm se aprofundado o efeito antioxidante dos
57 flavonóides e isoflavonóides. Nesse contexto, foi observado que a Genisteína age contra
58 radicais peroxila e no sequestro de outros radicais livres (Simão et al., 2005). Porém, não
59 existem evidências claras do efeito desses compostos sobre a qualidade do sêmen
60 criopreservado de ovinos em concentrações específicas. Dessa forma, o objetivo desse
61 estudo foi avaliar o efeito da suplementação com Genisteína e Resveratrol, no diluidor
62 TRIS-gema, sobre a qualidade do sêmen criopreservado de ovinos.

63

64 **Materiais e Métodos**

65 Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da
66 Universidade Federal do Piauí, UFPI, Teresina - PI, sob protocolo nº 745/2022.

67

68 **Animais**

69 Foram utilizados seis carneiros da raça Dorper, provenientes do Biotério de
70 Produção de Ovinos do Colégio Técnico de Teresina (CTT), da Universidade Federal do
71 Piauí, localizado na cidade de Teresina. Os carneiros foram mantidos sob regime semi-
72 intensivo, em área com pastagem cultivada de capim *Tifton sp* e *Mombaça sp*, dividida
73 em piquetes, recebendo silagem de milho, água e sal mineral *ad libitum*, e avaliados
74 quanto à normalidade dos parâmetros andrológicos antes do estudo, de acordo com as
75 recomendações do Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (motilidade em massa: ≥ 3 ;

76 motilidade espermática: $\geq 80\%$; concentração: 1 a 3 bilhões espermatozoides/mL; número
77 total de espermatozoides no ejaculado: 3 a 5 bilhões; espermatozoides morfologicamente
78 normais: $\geq 80\%$ (CBRA, 2013).

79

80 **Coleta e diluição do sêmen**

81 Foram realizadas 6 coletas de sêmen dos 6 reprodutores, com auxílio de uma
82 vagina artificial, com um intervalo de 4 dias entre as coletas, totalizando 36 ejaculados.
83 Após cada coleta, foram avaliados individualmente o ejaculado de cada reprodutor e
84 selecionado conforme as características seminais desejáveis de reprodutores ovinos
85 (CBRA, 2013). Posteriormente, foi formado o *pool* do ejaculado dos seis produtores,
86 avaliado as características físicas do *pool*, e diluído em diluidor Tris-Gema (3,605 g de
87 Tris; 2,024 g de ácido cítrico; 1,488g de frutose; 25 mg de gentamicina; 50.000 UI de
88 penicilina; 100 ml de água destilada; 20% de gema de ovo e 5% de glicerol, com
89 osmolaridade de 350 mOsm/kg e pH 6,8), avaliando os parâmetros físicos de motilidade
90 e vigor espermático após a diluição. Três diluidores experimentais foram preparados na
91 seguinte disposição: Controle (Tris-Gema), T1 (Tris-Gema + 25 μM de Genisteína) e T2
92 (Tris-Gema + 20 μM de Resveratrol). Uma parte do mesmo *pool* foi diluído em cada um
93 dos grupos experimentais. As concentrações utilizadas nos tratamentos T1 (25 μM de
94 Genisteína) e T2 (20 μM de Resveratrol) foram obtidas através de avaliação de
95 desempenho em testes preliminares, utilizando as concentrações de 15, 25 e 250 μM de
96 Genisteína, e as concentrações de 20, 40 e 80 μM de Resveratrol, acrescidos ao diluidor
97 Tris-Gema, de forma individual, inserindo o volume de sêmen necessário, conforme o
98 cálculo de concentração espermática estabelecido pelo CBRA (2013) e avaliados os

99 parâmetros de motilidade e vigor espermático imediatamente após a diluição e 15 minutos
100 pós-diluição, obtendo as melhores concentrações utilizadas neste estudo.

101

102 **Criopreservação do sêmen**

103 Imediatamente após a coleta e processamento, as amostras de sêmen foram
104 envasadas em palhetas de 0,25 mL, à temperatura ambiente, para uma concentração final
105 de 20×10^6 espermatozoides viáveis/palheta, e então foram congeladas em máquina TK
106 3000® (TK Tecnologia em Congelação Ltda., Uberaba, Brasil), ajustada para uma taxa
107 de resfriamento de $-0,5 \text{ }^\circ\text{C}/\text{min}$ da temperatura ambiente ($25 \text{ }^\circ\text{C}$) até atingir a temperatura
108 de $5 \text{ }^\circ\text{C}$. Após estabilização a $5 \text{ }^\circ\text{C}$ por 1 hora, o congelamento foi realizado a $-20 \text{ }^\circ\text{C}/\text{min}$
109 até atingir uma temperatura de $-120 \text{ }^\circ\text{C}$, quando as palhetas foram colocadas diretamente
110 em nitrogênio líquido ($-196 \text{ }^\circ\text{C}$). O tempo médio entre o processo de diluição e início da
111 criopreservação foi de 15 minutos. Após um período de 15 dias, as amostras foram
112 submetidas às análises pós-descongelação. A descongelação foi realizada em banho-
113 maria, em uma temperatura de $37 \text{ }^\circ\text{C}$ por 30 segundos, para avaliação quanto à motilidade
114 total e vigor no teste de termo resistência (TTR), integridade da membrana plasmática,
115 integridade acrossomal, atividade mitocondrial, através de sondas fluorescentes,
116 funcionalidade da membrana plasmática espermática (HOST), avaliação morfológica
117 pós-descongelação e análise computadorizada do sêmen (CASA).

118

119 **Teste de Termorresistência (TTR)**

120 O teste de termorresistência avaliou a longevidade dos espermatozoides das
121 amostras de sêmen descongeladas, incubadas em banho-maria a $37 \text{ }^\circ\text{C}$ por um período de
122 3 horas. As amostras descongeladas foram acondicionadas em microtubos de 1,5 mL e

123 incubadas a 37 °C, posteriormente, foram avaliadas quanto à motilidade total (MT - %) e
124 o vigor (1-5) espermático por meio de microscopia de contraste de fase (Olympus optical
125 Co., Ltda., Tóquio, Japão) com placa aquecedora acoplada, com aumento de 400x, nos
126 tempos 0, 30, 60, 120 e 180 minutos pós-descongelamento de acordo com Colégio
127 Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA, 2013).

128

129 **Análise computadorizada do sêmen (CASA)**

130 A análise computadorizada do sêmen descongelado foi realizada no Núcleo
131 Integrado de Biotecnologia da Universidade Estadual do Ceará (NIB/UECE), através do
132 sistema CASA (Computer-Assisted Sperm Analyses), utilizando o software Sperm Class
133 Analyzer® (SCA) (Microoptics, SL, versão 3.2.0, Barcelona, Espanha). Uma amostra de
134 10 µL de sêmen descongelado de cada ejaculado foi diluído em 50 µL de meio TRIS
135 (3,605 g de Tris (hidroximetil) aminometano; 2,024 g de ácido cítrico; 1,488g de frutose;
136 100 mL de água destilada) previamente aquecido em banho-maria a 37°C, e uma alíquota
137 de 10 µL dessa diluição foi inserido em lâmina previamente aquecida a 37°C e analisado
138 com auxílio de microscópio de contraste de fase acoplado a uma vídeo-câmera adaptada
139 ao sistema (Nikon™ H5505, Eclipse 50i, Japão). Para cada amostra foram analisados
140 cinco campos. Dentre os parâmetros avaliados estão: motilidade total (MT - %),
141 motilidade progressiva (MP - %), velocidade curvilinear (VCL - µm/s), velocidade em
142 linha reta (VSL - µm/s), velocidade média do percurso (VAP - µm/s), linearidade (LIN -
143 %), retilinearidade (STR - %), índice de oscilação ou wobble (WOB - %), deslocamento
144 lateral de cabeça (ALH - µm) e frequência de batimento cruzado (BCF - Hz), individual
145 para cada espermatozoide analisado.

146

147 **Avaliação morfológica**

148 A morfologia foi estimada em cada amostra de sêmen descongelado, pelo método
149 da câmara úmida, por meio do qual foram avaliados 200 espermatozoides por observação
150 microscópica (1000x), e a porcentagem das diversas alterações morfológicas foi agrupada
151 e classificada em espermatozoides normais, espermatozoides com defeitos maiores,
152 defeitos menores e defeitos totais, conforme Bloom (1973).

153

154 **Análise da integridade da membrana plasmática**

155 Para avaliação da integridade da membrana plasmática, foi utilizado o método de
156 coloração dupla com diacetato de carboxifluoresceína (DCF; Sigma-Aldrich®, St.Louis,
157 MO, USA) e iodeto de propídio (IP; Sigma-Aldrich®, St. Louis, MO, USA), modificado
158 por Coletto et al. (2002), em que alíquotas de 50 µL de sêmen pós-descongelamento foram
159 diluídas em 150 µL de Tris (3,605 g de Tris, 2,024 g de ácido cítrico, 1,488 g de frutose,
160 100 mL de água destilada) contendo 5 µL de DCF (0,46mg/mL em DMSO) e 20 µL de
161 IP (0,5 mg/mL em PBS) e incubadas por 10 minutos a 37 °C. Um total de 200
162 espermatozoides foi avaliado em microscópio de epifluorescência (Olympus optical Co.,
163 Ltda., Tóquio, Japão), com aumento de 400x, usando-se filtro de emissão DBP 580-
164 630nm e excitação DBP 485/20nm. Os espermatozoides foram classificados com
165 membrana intacta, quando se apresentaram corados em verde, e com membrana
166 danificada quando corados em vermelho.

167

168 **Análise da integridade acrossomal**

169 Para avaliação da integridade do acrossoma, foi utilizado o corante isotiocianato
170 de fluoresceína conjugado a *Peanut agglutinin* (FITC-PNA; Sigma-Aldrich®, St Louis,

171 MO, USA), de acordo com a técnica descrita por Roth et al. (1998), em que uma alíquota
172 de 20 μL da solução estoque de FITC-PNA (1 mg/mL) foi descongelada e adicionada a
173 480 μL de solução de fosfato tamponada (PBS) para obter a concentração final de 100
174 $\mu\text{g/mL}$. Alíquotas (20 μL) desta solução foram inseridas sobre esfregaços de lâminas
175 contendo espermatozoides, as quais foram incubadas por 20 minutos em câmara úmida a
176 4 °C, na ausência de luz. Após incubação, as lâminas foram enxaguadas duas vezes em
177 PBS refrigerado (4 °C) e reservadas para secagem na ausência de luz. Imediatamente
178 antes da avaliação, 5 μL de meio de montagem UCD (4,5 mL de glicerol, 0,5 mL de PBS,
179 5mg de azida sódica e 5mg de p-fenilenodiamina) foi inserido sobre a lâmina e cobertos
180 com lamínula. Foram avaliados 200 espermatozoides por lâmina, com aumento de 1000
181 x, sob óleo de imersão, em microscópio de epifluorescência (Olympus optical Co., Ltda.,
182 Tóquio, Japão), usando-se filtro de emissão LP 515 nm e BP 450-490 nm para excitação.
183 Os espermatozoides foram classificados como portadores de acrossomas intactos, quando
184 apresentaram a região acrossomal corada com fluorescência verde, ou como portadores
185 de acrossoma reagido, quando apresentaram uma faixa verde fluorescente na região
186 equatorial da cabeça espermática ou não apresentaram fluorescência verde em toda região
187 da cabeça.

188

189 **Análise do potencial de membrana mitocondrial**

190 A função mitocondrial foi determinada pela utilização de um fluorocromo
191 catiônico lipofílico JC-1 (Guthrie e Welch, 2006). Para tanto, alíquotas de 50 μL de sêmen
192 pós-descongelamento foram diluídas em 150 μL de Tris, contendo 5 μL de JC-1 (0,15 mM
193 em DMSO) e incubadas por 10 minutos a 37 °C. Um total de 200 espermatozoides foram
194 avaliados em microscópio de epifluorescência (Olympus optical Co., Ltda., Tóquio,

195 Japão), com aumento de 1000 x, sob óleo de imersão, usando-se filtro de emissão LP 515
196 nm e BP 450-490 nm para excitação. Os espermatozoides com a região da peça
197 intermediária coradas em laranja foram classificados com alto potencial de membrana
198 mitocondrial, e aqueles com a região da peça intermediária coradas em verde foram
199 classificados com baixo potencial de membrana mitocondrial.

200

201 **Avaliação da Funcionalidade da membrana plasmática (HOST)**

202 Para avaliação da funcionalidade da membrana espermática, através do teste
203 hiposmótico (HOST), uma proporção de 10 µL de sêmen descongelado de cada
204 tratamento, de forma individualizada, foi diluído em 1 mL de solução hiposmótica
205 constituída por citrato tri-sódico e frutose, obedecendo a uma concentração de 150
206 mOsm/L. Outra alíquota de 10 µL de sêmen, de cada tratamento, de forma
207 individualizada, foi diluído em 1 mL de solução isosmótica, constituída por citrato tri-
208 sódico e frutose, obedecendo a uma concentração de 300 mOsm/L, conforme Fonseca *et*
209 *al.* (2005) e incubados em Banho-Maria a 37°C, durante 60 minutos. Posteriormente,
210 10µL de cada solução (hiposmótica e isosmótica) foi inserido sobre lâmina, coberta com
211 lamínula, e observada em microscópio de contraste de fase (Olympus optical Co., Ltda.,
212 Tóquio, Japão) com aumento de 1000x. O resultado foi expresso em percentual pela
213 diferença de caudas dobradas antes e após o teste, em 200 espermatozoides contados.

214

215 **Análise Estatística**

216 O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado. As
217 variáveis estudadas (motilidade total e vigor no teste de termo resistência (TTR),
218 integridade da membrana plasmática, integridade acrossomal, atividade mitocondrial,

219 através de sondas fluorescentes, funcionalidade da membrana plasmática espermática
220 (HOST) e avaliação morfológica pós-descongelamento) foram submetidas à análise de
221 variância (ANOVA) e para comparação de média foram utilizados os testes paramétricos
222 de Duncan e Tukey, na probabilidade de 5%. As análises foram executadas através do
223 programa *Statistical Analysis System* (SAS Institute Inc, 2002).

224

225 **Resultados**

226

227 No teste de termorresistência (TTR) espermático a 37 °C nos tempos 0, 30, 60,
228 120 e 180 minutos pós-descongelamento, observou-se que os parâmetros de motilidade e
229 vigor espermático não diferiram estatisticamente entre os tratamentos e o controle, em
230 nenhum dos tempos avaliados, quando adicionado Genisteína (25 µM) e Resveratrol (20
231 µM) ao diluidor de criopreservação de sêmen em ovinos (Tabela 1; $p > 0,05$).

232

233 O vigor espermático observado no grupo com diluidor suplementado com
234 Resveratrol apresentou tendência de crescimento em relação aos demais tratamentos no
235 tempo 0 (T0) pós-descongelamento, assim como o grupo com diluidor suplementado com
236 Genisteína, apresentou tendência de estabilização da motilidade espermática no T120 e
no vigor espermático no mesmo tempo pós-descongelamento. No entanto, houve variações

237 entre os tempos dentro de cada tratamento para as variáveis motilidade e vigor e espermático (Tabela 1; $p < 0,05$).

238 **Tabela 1** – Motilidade total e vigor pós-descongelamento de espermatozoides ovinos, criopreservados em meio de congelação suplementado
 239 com Genisteína (25 μM) e Resveratrol (20 μM), avaliados pelo teste de termo resistência (TTR) (n=6)
 240

Tratamentos	0 minutos		30 minutos		60 minutos		120 minutos		180 minutos	
	Motilidade	Vigor	Motilidade	Vigor	Motilidade	Vigor	Motilidade	Vigor	Motilidade	Vigor
Controle	29,17±8,01 ^a	2,83±0,41 ^A	17,5±7,58 ^b	2,67±0,51 ^A	12,5±6,89 ^b	2,17±0,98 ^A	4,83±3,54 ^c	1,33±0,81 ^B	1,5±2,07 ^c	0,5±0,55 ^C
Genisteína	23,33±6,05 ^a	3±0,63 ^A	15±5,47 ^b	2,5±0,55 ^{AB}	8,5±4,32 ^c	2±0,89 ^{BC}	5,33±2,58 ^{dc}	1,5±0,55 ^C	0,5±0,83 ^d	0,33±0,51 ^D
Resveratrol	29,17±11,14 ^a	3,17±0,4 ^A	16,17±9,75 ^b	2,67±0,81 ^{AB}	9,17±4,91 ^{bc}	2±0,63 ^{BC}	4,5±1,22 ^c	1,33±0,51 ^C	1,17±1,94 ^c	0,5±0,55 ^D

241 Valores de média com letras minúsculas diferentes na mesma linha indicam diferenças significativas entre os tempos para motilidade ($p < 0,05$) pelo teste de Duncan

242 Valores de média com letras maiúsculas diferentes na mesma linha indicam diferenças significativas entre os tempos para vigor ($p < 0,05$) pelo teste de Duncan

243

244 Para o tratamento com Genisteína houve uma redução significativa da motilidade espermática até o tempo de 60 minutos pós-
 245 descongelação (T60) ($p < 0,05$), havendo uma estabilização entre os tempos 60 e 120 minutos ($p > 0,05$) e entre os tempos 120 e 180 minutos
 246 ($p > 0,05$). Para o tratamento com Resveratrol houve uma redução significativa da motilidade espermática até o tempo de 30 minutos pós-
 247 descongelação ($p < 0,05$), havendo uma estabilização entre os tempos 30 e 60 minutos ($p > 0,05$) e entre os tempos 60 e 180 minutos.

248 Para a variável vigor espermático houve uma estabilização mais acentuada do padrão observado para o sêmen do grupo controle,
 249 mantendo-se sem diferença até o tempo de 60 minutos (Tabela 1; $p > 0,05$). Para o sêmen suplementado com Genisteína e Resveratrol houve
 250 manutenções no padrão de vigor espermático observado até 30 minutos entre os tempos, com reduções significativas logo em seguida.

251 Os parâmetros cinéticos espermáticos pós-descongelção, avaliados pelo sistema
 252 computadorizado (CASA), para o sêmen criopreservado de ovinos, em meio
 253 suplementado com Genisteína (25 µM) e Resveratrol (20 µM), são observados na Tabela
 254 2. Os tratamentos T1 e T2 mantiveram os padrões cinéticos espermáticos ao nível do
 255 controle, nas diferentes variáveis cinéticas espermáticas avaliadas ($p>0,05$, Tabela 2).

256
 257 **Tabela 2** - Parâmetros cinéticos (CASA) de espermatozoides criopreservados de ovinos
 258 em meio de congelação suplementado com Genisteína (25 µM) e Resveratrol (20 µM)
 259 (n=6)

Parâmetros	Controle	Genisteína	Resveratrol
MT (%)	51,67±13,73	48,83±16,12	52±14,25
MP (%)	20,82±10,77	13,92±4,95	17,1±4,37
VCL (µm/s)	61,22±10,42	55,32±4,52	58,6±5,48
VSL (µm/s)	33,88±11,08	27,18±5,09	30,7±5,9
VAP (µm/s)	42,65±10,96	36,53±4,0	40,27±5,56
LIN (µm/s)	54,23±9,0	48,77±5,79	52,02±5,68
STR (µm/s)	78,23±7,01	73,85±6,68	75,78±5,02
WOB (µm/s)	68,98±6,43	65,95±2,35	68,48±3,41
ALH (µm/s)	3,18±0,43	3,25±0,3	3,22±0,25
BCF (µm/s)	9,6±1,76	9,15±1,67	9,1±0,39

261 Os valores são expressos como média ± desvio padrão (DP)
 262 **MT** – motilidade total; **MP** - motilidade progressiva; **VCL** – velocidade curvilínea; **VSL** - velocidade em
 263 linha reta; **VAP** – velocidade média de percurso; **LIN** - linearidade; **STR** - retilinearidade; **WOB** –
 264 Oscilação; **ALH** - Amplitude de deslocamento lateral da cabeça e **BCF** - frequência de batimentos de cauda.
 265 Médias com mesma letra não diferem entre si pelo teste de Duncan a 5% ($P>0,05$).
 266

267 Para os resultados de morfologia espermática, como mostrado na Tabela 3, não
 268 houve alterações no padrão de defeitos espermáticos em nenhum dos tratamentos, após o
 269 processo de criopreservação ($p>0,05$). Observa-se que há uma tendência de aumento no
 270 percentual de defeitos maiores após o processo de criopreservação, ao comparar o
 271 percentual de defeitos maiores do *pool* de espermatozoides do sêmen diluído em cada
 272 tratamento, antes da criopreservação, com a mesma característica de defeitos após a
 273 criopreservação, porém sem alterações significativas ($p>0,05$). No entanto, o percentual
 274 de espermatozoides com defeitos maiores, em todos os grupos, está de acordo com o

275 preconizado pelo CBRA (2013), com valores menores que 10%, assim como o percentual
 276 de espermatozoides normais, que foram superiores a 80%.

277

278 **Tabela 3** - Parâmetros morfológicos (defeitos maiores, defeitos menores e defeitos totais)
 279 espermáticos pós-descongelamento, do sêmen de ovinos, criopreservados em meio de
 280 congelamento suplementado com Genisteína (25 µM) e Resveratrol (20 µM) (n=6)

281

Parâmetros	Controle	Genisteína	Resveratrol	Pool
Defeitos maiores (%)	8±3,03	7,5±2,74	8,5±3,98	4,43±1,28
Defeitos menores (%)	6±3,09	7,17±4,35	7,83±6,36	9,63±4,03
Defeitos totais (%)	14±3,85	14,67±6,83	18,33±7,34	14,07±3,55

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

283 Médias com mesma letra não diferem entre si pelo teste de Duncan a 5% (P>0,05).

284

285 Na avaliação da ultraestrutura espermática, através de sondas fluorescentes,
 286 observou-se que a adição de Genisteína e Resveratrol não elevou o percentual de células
 287 com integridade de membrana plasmática e acrossomal, assim como no percentual de
 288 células espermáticas com atividade mitocondrial (Tabela 4; p>0,05). A Genisteína
 289 apresentou uma tendência favorável para elevar o percentual de células com integridade
 290 de membrana plasmática, quando comparado aos demais grupos, no entanto não houve
 291 uma elevação significativa (p>0,05).

292 **Tabela 4** - Integridade da membrana plasmática, atividade mitocondrial e integridade
 293 acrossomal pós-descongelamento de espermatozoides ovinos, criopreservados em meio
 294 de congelação suplementado com Genisteína (25 μ M) e Resveratrol (20 μ M) (n=6)
 295

Parâmetros	Controle	Genisteína	Resveratrol
Integridade de Membrana plasmática (%)	34,33 \pm 7,97	36 \pm 6,87	34 \pm 8,15
Atividade Mitocondrial (%)	35,33 \pm 12,75	29,83 \pm 11,39	32 \pm 9,65
Integridade Acrossomal (%)	34,67 \pm 2,73	34,33 \pm 2,16	33,56 \pm 2,36

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

297

298 Na análise da funcionalidade da membrana plasmática, pelo teste hiposmótico
 299 (HOST), observa-se uma redução do percentual de células espermáticas com membrana
 300 funcional no sêmen criopreservado em meio de congelação suplementado com
 301 Genisteína, quando comparado aos demais grupos (Tabela 5; $0 < 0,05$).

302

303 **Tabela 5** – Funcionalidade da membrana espermática de espermatozoides ovinos, pós-
 304 descongelação, submetidos ao teste hisposmótico, criopreservados em meio de
 305 congelação suplementado com Genisteína (25 μ M) e Resveratrol (20 μ M) (n=6)
 306

Parâmetros	Controle	Genisteína	Resveratrol
HOST (%)	16,67 \pm 8,91 ^a	8 \pm 4,6 ^b	12 \pm 3,79 ^{ab}

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

308 Médias com mesma letra não diferem entre si pelo teste de Duncan a 5% ($P > 0,05$).

309

310 **Discussão**

311 Através de vários estudos, foi demonstrado que a ingestão de Fitoestrógenos causa
 312 alterações reprodutivas em animais, bem como algumas síndromes temporárias de
 313 infertilidade (Peña-Corona et al., 2019). No entanto, também há evidências de que os
 314 Fitoestrógenos, a exemplo da Genisteína, favorecem a reprodução por elevar a
 315 concentração, motilidade e volume espermático necessário para a fertilização (Yousef et

316 al., 2004; Domínguez et al., 2014). Dessa forma, é de grande importância o
317 aprofundamento dos estudos com essa classe de substâncias, com potencial antioxidante.

318 No presente estudo, a Genisteína foi capaz de manter o vigor espermático após o
319 processo de criopreservação. A influência benéfica das isoflavonas nos parâmetros
320 seminais tem sido atribuída ao seu efeito antioxidante, pois reduzem a produção de
321 peróxido de hidrogênio e protegem os espermatozoides contra danos oxidativos (Yousef
322 et al., 2004).

323 Elsayed et al. (2019) verificaram, que a suplementação de Genisteína no diluidor
324 de criopreservação de sêmen, em ovinos, foi capaz de aumentar a capacidade
325 antioxidante, reduzir a lipoperoxidação, além de reduzir a fragmentação de DNA e a
326 expressão da proteína pró-apoptótica caspase-3 na concentração de 10 μM . Por outro
327 lado, uma concentração maior de Genisteína (100 μM) causou efeitos deletérios à célula
328 espermática e na sua integridade funcional.

329 Apesar dos estudos demonstrando os efeitos inibidores da Genisteína, e de outras
330 Isoflavonas, na lipoperoxidação em células espermáticas, produzidos pelas EROs, a
331 Genisteína (25 μM) não aumentou o percentual de células com membranas plasmáticas e
332 acrossomais íntegras, na avaliação da ultraestrutura espermática, embora tenha
333 apresentado uma tendência de elevação do percentual de células espermáticas com
334 integridade de membrana plasmática. A Genisteína (25 μM) também reduziu o percentual
335 de espermatozoides com funcionalidade da membrana plasmática, demonstrando que a
336 mesma não foi eficiente em impedir os efeitos deletérios causados na bicamada lipídica
337 da membrana plasmática espermática, durante o processo de criopreservação.

338 Domínguez et al. (2014), avaliando o efeito da suplementação com dietas ricas em
339 isoflavonas na qualidade do sêmen criopreservado de ovinos, observaram que não houve

340 alterações no volume espermático, motilidade total e progressiva e na integridade de
341 membrana plasmática e acrossomal dos espermatozoides, resultando em efeitos
342 semelhantes aos observados nesse estudo, com a suplementação direta da Genisteína (25
343 μM) no meio diluidor para criopreservação do sêmen de ovinos.

344 Por outro lado, Prihantoko et al. (2020), avaliando o efeito da suplementação de
345 1mmol e 2mmol de Genisteína no diluidor de sêmen bovino para criopreservação,
346 observaram que houve aumento do percentual de células espermáticas com integridade
347 de membrana plasmática e acrossomal, assim como no aumento da motilidade
348 espermática. Nesse experimento, as dosagens utilizadas no diluidor foram bem maiores
349 às utilizadas no presente estudo, mostrando que pode haver um efeito dose-dependente.

350 Em ovinos, foram encontrados resultados muito divergentes quanto aos efeitos
351 deletérios ou benéficos atribuídos à ingestão de Fitoestrógenos sobre os parâmetros
352 seminiais (Ramírez et al., 2022). Portanto, são necessários mais estudos sobre os efeitos
353 dessas substâncias na qualidade do sêmen criopreservado de ovinos.

354 O uso do Resveratrol como agente antioxidante tem sido sugerido como
355 alternativa na preservação da fertilidade de espermatozoides criopreservados (Gripa et
356 al., 2021). Ourique (2012), avaliando o efeito do Resveratrol (1 e 10mg/kg) na qualidade
357 espermática de roedores hipertireóideos, observou melhoria da motilidade espermática
358 nos animais suplementados quando comparados aos animais do grupo Controle. Nesse
359 estudo, verificou-se que o Resveratrol (20 μM) foi capaz de melhorar o vigor espermático
360 após o processo de criopreservação, quando comparado ao sêmen diluído antes da
361 criopreservação. Possivelmente esse efeito se deve à supressão das EROs produzidas
362 durante o processo de criopreservação, reduzindo os danos provocados sobre a membrana
363 espermática e conseqüentemente sobre o vigor espermático.

364 O vigor espermático é um parâmetro avaliado em conjunto com a motilidade e é
365 definido como a qualidade do movimento exibido pelos espermatozoides móveis
366 (Cardoso et al. 2005), dessa forma, se os espermatozoides apresentam maior vigor, pode
367 haver uma maior possibilidade de os mesmos chegarem ao sítio de fecundação no trato
368 reprodutivo da fêmea. De acordo com Christiansen (1988), o vigor em escala 3, conforme
369 foi observado no sêmen pós-descongelção em meio diluidor com Resveratrol,
370 apresentam espermatozoides com rápidos movimentos látero-laterais, com ocasional
371 progressão, o que pode favorecer o processo de fecundação.

372 Al-Mutary et al. (2020), avaliando o efeito da suplementação com Resveratrol
373 (200 e 400 μM), no meio diluidor para resfriamento de sêmen de ovinos, observaram
374 aumento da motilidade total e progressiva do sêmen refrigerado, mostrando também que
375 o Resveratrol apresenta bom potencial para manutenção e maximização de parâmetros
376 cinéticos espermáticos.

377 Por outro lado, o grupo tratado com 20 μM de Resveratrol não melhorou a
378 integridade e funcionalidade da membrana plasmática, das células espermáticas do sêmen
379 criopreservado, resultado diferente do observado por Lv et al. (2019), avaliando o efeito
380 da criopreservação de sêmen caprino com diluidor suplementado com 10 e 50 μM de
381 Resveratrol, que observaram um aumento do percentual de espermatozoides com
382 integridade de membrana plasmática e acrossomal, bem como na atividade mitocondrial.

383 Os efeitos protetores do Resveratrol contra o dano oxidativo *in vivo* e *in vitro*
384 ocorrem devido à regulação de antioxidantes endógenos dos sistemas celulares, além de
385 atuar como um antioxidante “scavenger” de EROs (Spanier et al., 2009). O Resveratrol
386 também inibe a formação de radicais livres de oxigênio suprimindo genes pró-oxidantes
387 (Dolinsky et al., 2009; Spanier et al., 2009) e induzindo enzimas antioxidantes incluindo

388 SOD, CAT, tioredoxina e GPx (Ungvari et al., 2007; Spanier et al., 2009; Tanno et al.,
389 2010). Estudos também relataram que o Resveratrol quelou o metal de transição cobre, que
390 é capaz de gerar radicais livres e causar lipoperoxidação (Ferretti et al., 2004).

391 Não se observou diferença entre os grupos Controle, Genisteína (25 μ M) e
392 Resveratrol (20 μ M) na longevidade espermática pós-descongelção, avaliado pelo teste
393 de termorresistência (TTR), mas houve reduções dos valores de motilidade e vigor
394 espermático, entre os tempos, em um padrão de comportamento diferenciado em cada
395 grupo (Tabela 1). Essa redução nos valores de motilidade e vigor podem ser explicados
396 devido a um maior consumo de suas substâncias nutritivas nos primeiros períodos do
397 teste, além das perdas de componentes intracelulares ou de lesões estruturais na cauda
398 dos espermatozoides, diminuindo sua viabilidade em função da redução do ATP
399 produzido durante as duas primeiras horas (Barros et al., 2013).

400 O TTR tem por objetivo selecionar amostras de sêmen mais resistentes a lesões
401 latentes ao calor e maximizar as chances de sobrevivência espermática dentro do trato
402 reprodutivo da fêmea.

403 Elsayed et al. (2019) avaliou o efeito da suplementação de 0, 1, 5, 10 e 100 μ M de
404 Genisteína, ao diluidor Tris-Gema, na motilidade progressiva de espermatozoides
405 criopreservados de ovinos. Eles observaram um aumento significativo desse parâmetro
406 pós-descongelção, utilizando a concentração de 10 μ M de Genisteína + Tris-Gema,
407 quando comparado ao sêmen criopreservado em meio Tris-Gema base, em análise não
408 computadorizada. Esse resultado foi diferente do observado nesse estudo, na análise da
409 cinética espermática. Isso demonstra que a Genisteína, em menores concentrações, pode
410 gerar efeitos benéficos sobre a motilidade espermática.

411 Por outro lado, Domínguez et al. (2014) não observaram alterações nos padrões
412 cinéticos e na morfologia espermática ao ofertarem uma dieta com 23% de alfafa, um
413 ingrediente rico em fitoestrógenos como a Genisteína e a Daidzeína. As concentrações
414 circulantes dessas substâncias, após absorção pelo trato gastrointestinal, podem ter sido
415 insuficientes para gerar os efeitos esperados na cinética espermática, através da redução
416 dos danos provocados pelos radicais livres.

417 No estudo conduzido por Silva (2010), avaliando a adição de Resveratrol (0, 5,
418 10, 15 e 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$), adicionado ao diluidor de criopreservação Tris-Gema-Glicerol, não
419 observaram melhoria nos parâmetros cinéticos espermáticos, como a motilidade
420 progressiva, em análise não computadorizada, bem como não observaram melhoria nos
421 parâmetros da ultraestrutura espermática.

422 Assunção (2016), avaliando o efeito da suplementação de 50, 100 e 1000 μM de
423 Resveratrol, ao diluidor Tris-Gema, na cinética de espermatozoides criopreservados de
424 bovinos, observaram que a motilidade progressiva e o VAP (velocidade média do
425 percurso), analisada pelo CASA, foi significativamente superior no grupo suplementado
426 com 50 μM de Resveratrol, quando comparado ao grupo controle e às demais
427 concentrações de Resveratrol, resultado diferente do observado nesse estudo, em que a
428 adição de 20 μM de Resveratrol não resultou em melhoria nos parâmetros cinéticos
429 espermáticos, avaliados pelo CASA.

430 Os demais parâmetros de velocidade não foram alterados nos grupos
431 suplementados com Genisteína e Resveratrol. Por definição, o VCL é a trajetória real do
432 espermatozoide, o VSL é a velocidade em linha reta e o VAP é a velocidade da trajetória
433 média da célula espermática. Em casos em que a trajetória da cabeça espermática é muito
434 regular e linear com pouco movimento lateral, VAP e VCL devem ser quase iguais a VSL

435 (MATOS et al., 2008). Porém, nesse estudo, houve maiores variações entre esses
436 parâmetros, levando a maiores valores de ALH, o que pode ter interferido diretamente na
437 motilidade progressiva dos espermatozoides nos diferentes grupos avaliados.

438 O ALH é amplitude do deslocamento lateral da cabeça do espermatozoide e está
439 relacionada com a linearidade do movimento (MATOS et al., 2008). Quanto maior ALH,
440 maior será a oscilação da cabeça da célula espermática e o movimento será menos linear
441 e progressivo.

442

443 **Conclusão**

444 A adição de 20 μM de Resveratrol não alterou a qualidade do sêmen
445 criopreservado de ovinos, no entanto, a adição de 25 μM de Genisteína, ao diluidor Tris-
446 Gema, manteve os parâmetros cinéticos espermáticos e reduziu a funcionalidade da
447 membrana plasmática.

448

449 **Agradecimentos**

450 Agradecemos ao biotério de produção de ovinos do Colégio Técnico de Teresina
451 (CTT), da Universidade Federal do Piauí (UFPI), pela seção dos animais, ao laboratório
452 de Biotecnologia da Reprodução Animal da UFPI, pela seção das instalações para análises
453 pós-descongelamento das amostras e à CAPES, pela disponibilização de bolsa para
454 realização deste estudo.

455 **Referências**

- 456 Al-Mutary G, Al-Ghadi MQ, Ammari AA, Al-Himadi AR, Al-Jolimeed AH, Arafah
457 MW, Amran RA, Aleissa MS, Swelum AA. Effect of different concentrations of
458 resveratrol on the quality and in vitro fertilizing ability of ram semen stored at 5 °C for
459 up to 168 h. *Theriogenology*. 2020;152:139–146.
460
- 461 Assunção CM. Efeito do Resveratrol na criopreservação do sêmen bovino. 2016. 80p.
462 Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas). Programa de Pós-graduação em
463 Ciências Biológicas. Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora.
464
- 465 Barros MHC, Shiomi HH, Amorim LS, Siqueira JB, Pinho RO, Lima DMA, Lopes PS,
466 Guimarães SEF, Guimarães JD. Viabilidade espermática do sêmen congelado de suínos
467 da raça piau avaliada pelo teste de termorresistência. *Acta Veterinaria Brasilica*.
468 2013;7(2):164-170.
469
- 470 Bertozzo BR, Shiroma MYM, Zúccari CESN. Efeito da adição de colesterol ao meio de
471 incubação do sêmen bovino congelado sobre a integridade das membranas plasmática e
472 acrossomal. In: X Encontro Iniciação Científica UFMS; 2009; Campo Grande. Brasil.
473 UFMS; 2009. pág. 16-33.
474
- 475 Bloom E. Ultrastructure of some characteristic sperm defects and a proposal for a new
476 classification of the bull spermogram. *Nord Vet Med*. 1973;25:383-391.
477
- 478 Câmara DR, Guerra MMP. Refrigeração e criopreservação do sêmen ovino: danos
479 inerentes à técnica e influência da suplementação do meio com antioxidantes sobre a
480 qualidade espermática. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*. 2011;35(1):33-40.
481
- 482 Cardoso RCS, Silva, AR, Silva LDP. Métodos de avaliação do sêmen canino congelado.
483 *Revista Brasileira de Reprodução Animal*. 2005; 29(3/4):179-187.
484
- 485 Castelo TS, Frota TR, Silva AR. Considerações sobre a criopreservação do sêmen de
486 caprinos. *Acta Vet Bras*. 2008;2:67-75.
487
- 488 CBRA – Colégio Brasileiro de Reprodução Animal. Manual para exame andrológico e
489 avaliação de sêmen animal. 3.ed. Belo Horizonte: CBRA, 2013.
490
- 491 Coletto ZF, Guerra MMP, Batista AM. Avaliação do sêmen congelado de 452 caprinos
492 com drogas fluorescentes. *Revista Brasileira de Medicina Veterinária*. 2002;24:101-104.
493
- 494 ChaithraShree AR, Ingole SD, Dighe VD, Nagvekar AS, Bharucha SV, Dagli NR,
495 Kekan PM, Kharde SD. Effect of melatonin on bovine sperm characteristics and
496 ultrastructure changes following cryopreservation. *Vet Med Sci*. 2020;6(2):177-186.
497
- 498 Christiansen IJ. Reprodução no cão e no gato. São Paulo: Editora Manole, 1988.
499
- 500 David JMP, David JP, Santos VLCS, Santos MLS, Mota MD. Resveratrol: Ações e
501 benefícios à saúde humana. *Diálogos e Ciência*, 2007;5(10):1-11.
502

- 503 Dolinsky VW, Chan AYM, Frayne IR, Light PE, Rosiers CD, Dyck JRB. Resveratrol
504 prevents the prohypertrophic effects of oxidative stress on LKB1. *Circulation*.
505 2009;119(12):1643-1652.
506
- 507 Domínguez-Rebolledo AE, Alcaraz-Romero A, Cantón-Castillo JG, Loeza-Concha H,
508 Ramón-Ugalde J. Efecto de la Alfalfa (*Medicago Sativa L.*) en la dieta sobre la calidad
509 de los espermatozoides epididimarios de ovinos Katahdin con Pelibuey. In: Reunión
510 Científica Tecnológica, Forestal y Agropecuaria Tabasco y III Simposio internacional
511 en producción agroalimentaria tropical; 2014; Tabasco, México. Tabasco: Instituto
512 Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias; 2014. pág. 186-189.
513
- 514 Elsayed DH, El-Shamy AA, Abdelrazek HMA, El-Badry DA. Effect of genistein on
515 semen quality, antioxidant capacity, caspase-3 expression and DNA integrity in
516 cryopreserved ram spermatozoa. *Small Ruminant Research*. 2019;177:50-55.
517
- 518 Ezazi H, Abdi-Benemar H, Taghizadeh A, Khalili, B, Seifdavati, J, Jafaroghli M,
519 Elghandour MM, Salem AZ. The influence of dietary sunflower oil, rich in n-6
520 polyunsaturated fatty acids, in combination with vitamin C on ram semen parameters,
521 sperm lipids and fertility. *Journal of the Science of Food and Agriculture*.
522 2019;99(8):3803–3810.
523
- 524 Ferretti G, Bacchetti T, Menanno F, Curatola G. Effect of genistein against copper-
525 induced lipid peroxidation of human high density lipoproteins (HDL). *Atherosclerosis*.
526 2004;172(1):55-61.
527
- 528 Grippa EF, Dalmolin R, Brum DS, Leivas FG, Carvalho NC. Efeito do resveratrol na
529 cinética espermática de sêmen congelado em equinos da raça crioula. In: Salão
530 Internacional de Ensino, Pesquisa e Extensão; 2021; Rio Grande do Sul, Brasil. Rio
531 Grande do Sul: UNIPAMPA; 2021. pág. 16.
532
- 533 Guthrie HD, Welch GR. Determination of intracellular reactive oxygen species and high
534 mitochondrial membrane potential in Percoll-treated viable boar sperm using
535 fluorescence-activated flow cytometry. *Journal of Animal Science*. 2006;84:2089-2100.
536
- 537 Hezavehei M, Sharafi M, Kouchesfahani HM, Henkel R, Agarwal A, Esmaili V,
538 Shahverdi A. Sperm cryopreservation: A review on current molecular cryobiology and
539 advanced approaches. *Reproductive BioMedicine Online*. 2018;37(3):327–339.
540
- 541 Lv C, Larbi A, Wu G, Hong Q, Quan G. Improving the quality of cryopreserved goat
542 semen with a commercial bull extender supplemented with resveratrol. *Animal*
543 *Reproduction Science*. 2019;208:106-127.
544
- 545 Matos DL, Araújo AA, Roberto IG, Toniolli R. Análise computadorizada de
546 espermatozoides: revisão de literatura. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*.
547 2008;32(4): 225-232.
548

- 549 Ourique GM. Resveratrol aumenta a motilidade espermática, previne a lipoperoxidação
550 e melhora as defesas antioxidantes em testículos de ratos hipertireóideos. [dissertação].
551 Santa Maria: Universidade Federal de Santa Maria; 2012. Português.
552
- 553 Peña-Corona S, León P, Mendieta E, Villanueva M, Salame A, Vargas D, Mora G,
554 Serrano H, Villa-Godoy A. Effect of a single application of coumestrol and/or dimethyl
555 sulfoxide, on sex hormone levels and vaginal cytology of anestrus bitches. *Vet Méx.*
556 2019;6(1):1-15.
557
- 558 Prihantoko KD, Yulastuti F, Haniarti H, Kusumawati A, Widayati DT, Budiyanto A.
559 The Effect of Genistein on the Plasma Membrane Integrity of Frozen Ongole Grade
560 Bull Semen Based on Skim Milk – Soy Lecithin Extender. *IOP Conference Series:
561 Earth and Environmental Science.* 2020;465:1-10.
562
- 563 Ramírez MM, Estrada DV, Rodríguez IJ, Pérez-Rivero JJ, Reséndiz AS, González HFF,
564 Gutiérrez JLC, Peña-Corona SI. Efectos de los fitoestrógenos en la fisiología
565 reproductiva de especies productivas. *Revisión. Rev Mex Cienc Pecu,* 2022;13(3):803-
566 829.
567
- 568 Roth TL, Weiss RB, Buff JL, Bush LM, Wildt DE, Bush M. Heterologous in vitro
569 fertilization and sperm capacitation in an endangered African antelope, the Scimitar-
570 Horned Oryx (*Oryx dammah*). *Biology of Reproduction.* 1998;58(2):475-482.
571
- 572 SAS. SAS Software. Version 9.0. Cary, North Carolina: SAS Institute Inc., 2002.
573
- 574 Silva ECB. Efeito da adição de diferentes crioprotetores e antioxidantes na
575 criopreservação do sêmen de ovinos da raça Santa Inês. 2010. 98p. Dissertação
576 Mestrado em Ciência Veterinária). Programa de Pós-Graduação em Ciência Veterinária.
577 Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife.
578
- 579 Simão ANC, Suzukawa AA, Casado MF, Oliveira RD, Guarnier FA, Cecchini R.
580 Genistein abrogates pre-hemolytic and oxidative stress damage induced by 2, 2'-azobis
581 (amidinopropane). *Life Sciences.* 2005;78:1202-1210.
582
- 583 Stojanovic S, Sprinz H, Brede O. Efficiency and mechanism of the antioxidant action o
584 transresveratrol and its analogues in the radical liposome oxidation. *Archives of
585 Biochemistry and Biophysics.* 2001;391(1):79-89.
586
- 587 Tanno M. Induction of manganese superoxide dismutase by nuclear translocation and
588 activation of SIRT1 promotes cell survival in chronic heart failure. *The Journal of
589 Biological Chemistry.* 2010;285(11):8375-8382.
590
- 591 Ungvari Z, Orosz Z, Rivera A, Labinskyy N, Xiangmin Z, Olson S, Podlutzky A,
592 Csiszar A. Resveratrol increases vascular oxidative stress resistance. *American Journal
593 of Physiology. Heart and Circulatory Physiology.* 2007;292(5):2417-2424.
594

595 Yousef MI, Esmail AM, Baghdadi HH. Effect of isoflavones on reproductive
596 performance, testosterone levels, lipid peroxidation, and seminal plasma biochemistry
597 of male rabbits. *J Environ Sci Health*. 2004;39(5-6):819-833.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados apresentados neste trabalho não foram capazes de demonstrar o efeito do estresse subletal na melhoria da qualidade dos espermatozoides de ovinos, porém é um modelo experimental que pode ser aprimorado para testar novas concentrações e novas substâncias.

Os resultados dos antioxidantes mostram que eles podem ser úteis na melhora da qualidade do sêmen criopreservado de ovinos, visto que foi observado melhora do vigor espermático com a utilização do Resveratrol. Assim, o modelo experimental com antioxidantes deve ser continuado para que possam ser testadas novas doses e novos agentes antioxidantes, visando melhorar os parâmetros pós-descongelção do sêmen ovino, cuja tecnologia ainda carece de aperfeiçoamentos.

Além disso, novos estudos e técnicas devem ser realizadas, visando ampliar o entendimento acerca da atividade enzimática e das alterações moleculares sofridas pelas células espermáticas, aperfeiçoando sobremaneira o processo de criopreservação do sêmen da espécie ovina.

3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABAVISANI, A.; ARSHAMI, J.; NASERIAN, A.A.; KANDELOUSI, M.A.S.; AZIZZADEH, M. Qualidade de sêmen resfriado ou congelado-descongelado bovino após a adição de suplementação de ácidos graxos ômega-3 ao extensor. **International Journal of Fertility & Sterility**, v. 7, p. 161-168, 2013.
- ADAMS, N. R. Detection of the effects of phytoestrogens on sheep and cattle. **Journal of Animal Science**, v. 73, n. 5, p. 1509-1515, 1995.
- ADWAS, A. A.; ELSAYED, A. S. I.; QUWAYDIR, F. A. Oxidative stress and antioxidant mechanisms in human body. **Journal of Applied Biotechnology & Bioengineering**, v. 6, p. 43-47, 2019.
- AGARWAL, A.; COCUZZA, M.; ABDELRAZIK, H.; SHARMA, R. Oxidative stress measurement in patients with male or female factor infertility. **Handbook of Chemiluminescent Methods in Oxidative Stress Assessment**, p.195-218, 2008.
- AGARWAL, A.; VIRK, G.; ONG, C.; DU PLESSIS, S. S. Effect of oxidative stress on male reproduction. **The World Journal of Men's Health**, v. 32, n. 1, p. 1-17, 2014.
- AKALIN, P. P.; BUCAK, M. N.; GÜNGÖR, S.; BASPINAR, N.; ÇOYAN, K.; DURSUN, S.; ILI, P.; AKSOY, A. et al. Influence of lycopene and cysteamine on sperm and oxidative stress parameters during liquid storage of ram semen at 5 °C. **Small Ruminant Research**, [s. l.], v. 137, p. 117–123, 2016.
- ALBERTINI, R.; ABUJA, P. M. Prooxidant and antioxidant properties of Trolox C, analogue of vitamin E, in oxidation of low-density lipoprotein. **Free Radical Research**, v. 30, n. 3, p. 181-188, 1999.
- AMANN, R.; KATZ, D. F. Reflections on CASA after 25 years. **Journal of Andrology** [S.l.], v. 25, p. 317-325, 2004.
- AMIN, A.; GAD, A.; SALILEW-WONDIM, D.; PRASTOWO, S.; HELD, E.; HOELKER, M.; RINGS, F.; THOLEN, E.; NEUHOFF, C.; LOOFT, C.; SCHELLANDER, K.; TESFAYE, D. Bovine embryo survival under oxidative-stress conditions is associated with activity of the NRF2-mediated oxidative-stress-response pathway. **Molecular Reproduction and Development**, v. 81, p. 497-513, 2014.
- ARRUDA, R. P.; CELEGHINI, E. C. C. Validação de uma técnica para avaliação simultânea das membranas plasmática, acrossomal e mitocondrial de espermatozoides bovinos. **Acta Scientiae Veterinariae**, [S.l.], v. 31, p. 230-231, 2003. Suplemento.
- ARYA, A.; SHERGILL, I. S.; WILLIAMSON, M.; GOMMERSALL, L.; ARYA, N.; PATEL, H. R. Basic principles of real-time quantitative PCR. **Expert Review of Molecular Diagnostics**, v. 5, p. 209-219, 2005.

BARBOSA, K. B. F.; COSTA, N. M. B.; ALFENAS, R. C. G.; DE PAULA, S. O.; MINIM, V. P. R.; BRESSAN J. Oxidative stress: the concept, implications and factors modulating. **Revista de Nutrição**, v. 23, p. 629-643, 2010.

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

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.

BERTOZZO, B. R.; SHIROMA, M. Y. M.; ZÚCCARI, C. E. S. N. Efeito da adição de colesterol ao meio de incubação do sêmen bovino congelado sobre a integridade das membranas plasmática e acrossomal. 2009, v. 10, p. 16-33. In: X Encontro Iniciação Científica UFMS, 2009, Campo Grande. **Anais...**, X Encontro Iniciação Científica UFMS.

BILODEAU, J. F.; BLANCHETTE, S.; CORMIER, N.; SIRAD, 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.

BONILLA, C. A. Isoflavonas en ginecología, terapia no convencional. **Rev Colomb de Obstet y Ginecol**, v. 55, n. 3, p. 209-217, 2004.

BUCAK, M. N.; ATESSAHIN, A.; VARISLI, O.; YUCE, A.; TEKIN, N.; AKÇAY, A. The influence of trehalose, taurine, cysteamine and hyaluronan on ram semen Microscopic and oxidative stress parameters after freeze-thawing process. **Theriogenology**, v. 67, n. 15, p. 1060-1067, 2007.

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

BURNS, J.; YOKOTA, T.; ASHIHARA, H.; LEAN, M.E.; CROZIER, A. Plant foods and herbal sources of resveratrol, **Journal Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, n. 11, p. 3337-3340, 2002.

CÂMARA, D. R.; GUERRA, M. M. P. Refrigeração e criopreservação do sêmen ovino: danos inerentes à técnica e influência da suplementação do meio com antioxidantes sobre a qualidade espermática. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 35, n. 1, p. 33-40, 2011.

CASTELLINI, C., LATTAIOLI, P., DAL BOSCO, A., MINELLI, A., MUGNAI, C. Oxidative status and semen characteristics of rabbit buck as affected by dietary vitamin

E, C and n-3 fatty acids. **Reproduction Nutrition and Development**, v. 43, n. 1, p. 91-103, 2003.

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

CHAITHRASHREE, A. R.; INGOLE, S. D.; DIGHE, V. D. et al. Effect of melatonin on bovine sperm characteristics and ultrastructure changes following cryopreservation. **Veterinary Medicine and Science**, v. 6, n. 2, p. 177-186, 2020.

ČOLOVIĆ, M. B.; VASIĆ, V. M.; AVRAMOVIĆ, N. S.; GAJIĆ, M. M.; DJURIĆ, D. M.; KRSTIĆ, D. Z. In vitro evaluation of neurotoxicity potential and oxidative stress responses of diazinon and its degradation products in rat brain synaptosomes. **Toxicology Letters**, [S.L.], v. 233, n. 1, p. 29-37, 2015.

CROCOMO, L. F.; MARQUES FILHO, W. C.; LANDIM-ALVARENGA, F. C.; BICUDO, S. D. Produção de embriões *in vitro*: estresse oxidativo e antioxidantes. **Veterinária e Zootecnia**, v. 19, n. 4, p. 470-479, 2012.

DI GIOIA, F.; PETROPOULOS, S. A. Phytoestrogens, phytosteroids and saponins in vegetables: Biosynthesis, functions, health effects and practical applications. **Adv Food Nutr Res**, v. 90, p. 351-421, 2019.

DILLER, K. R. Stress protein expression kinetics. **Annual Review of Biomedical Engineering**, v. 8, p. 403-424, 2006.

DOLINSKY, V.W.; CHAN, A. Y. M.; FRAYNE, I. R. et al. Resveratrol prevents the prohypertrophic effects of oxidative stress on LKB1. **Circulation**, v. 119, n. 12, p. 1643-1652, 2009.

ERICSSON, S. A.; GARNER, D. L.; THOMAS, C. A. et al. Interrelationships among fluorometric analyses of spermatozoal function, classical semen quality parameters and the fertility of frozen-thawed bovine spermatozoa. **Theriogenology**, v. 39, n. 5, p. 1009-1024, 1993.

FEDER, M. E.; HOFMANN, G. E. Heat-shock proteins, molecular chaperones, and the stress response: evolutionary and ecological physiology. **Annual Review of Physiology**, v. 61, n. 1, p. 243-282, 1999.

FERREIRA, A. L. A.; MATSUBARA, L. S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v.43, n.1, p.61-68, 1997.

FERRETTI, G.; BACCHETTI, T.; MENANNO, F.; CURATOLA, G. Effect of genistein against copper-induced lipid peroxidation of human high density lipoproteins (HDL). **Atherosclerosis**, v. 172, n. 1, p. 55-61, 2004.

FLORES, D.; SOUZA, V.; BETANCOURT, M.; TETELTITLA, M.; GONZÁLEZ-MÁRQUEZ, H.; CASAS, E.; BONILLA, E.; RAMÍREZ-NOGUERA, P.; GUTIÉRREZ-RUIZ, M. C.; DUCOLOMB, Y. Oxidative stress as a damage mechanism in porcine cumulus-oocyte complexes exposed to malathion during in vitro maturation. **Environmental Toxicology**, v. 32, p. 1669-1678, 2017.

FRIGONI, N. A. S. R. **Estratégias para minimização do estresse oxidativo em sistemas de produção in vitro de embriões bovinos destinados à vitrificação**. 2016. 124 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) - Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2016.

FULDA, S.; GORMAN, A. M.; HORI, O.; SAMALI, A. Cellular stress responses: cell survival and cell death. **International Journal of Cell Biology**, v. 2010, p. 1-23, 2010.

GENG, X.; SHAO, H.; ZHANG, Z.; NG, J. C.; PENG, C. Malathion induced testicular toxicity is associated with spermatogenic apoptosis and alterations in testicular enzymes and hormone levels in male Wistar rats. **Environmental Toxicology And Pharmacology**, [S.L.], v. 39, n. 2, p. 659-667, 2015.

GILLAN, L.; EVANS, G.; MAXWELL, W. M. C. Flow cytometric evaluation of sperm parameters in relation to fertility potential. **Theriogenology**, v. 63, p. 445-457, 2005.

GONÇALVES, A. F. Estresse oxidativo promovendo a longevidade – um conceito de mito-hormese. **Revista Brasileira de Nutrição Funcional**, n. 59, 2014.

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

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. **Free radicals in biology and medicine**. 3. ed. New York: Oxford, 1999.

HALLIWELL, B.; WHITEMAN, M. Measuring reactive species and oxidative damage *in vivo* and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? **British Journal of Pharmacology**, v. 142, n. 2, p. 231-255, 2004.

HANSEN, P. J. To be or not to be - determinants of embryonic survival following heat shock. **Theriogenology**, v. 68, p. 40-48, 2007.

HARVEY, A. J. The role of oxygen in ruminant preimplantation embryo development and metabolism. **Animal Reproduction Science**, v. 98, n. 1, p. 113-128, 2007.

HERRERA, J.; FIERRO, R.; ZAYAS, H.; CONEJO, J.; JIMÉNEZ, I.; GARCÍA, A.; BETANCOURT, M. Acrosome reaction infertile and subfertile boar sperm. **Archives of Andrology**, v. 48, p. 133-139, 2002.

HOOGENRAAD, N. A brief history of the discovery of the mitochondrial unfolded protein response in mammalian cells. **Journal of Bioenergetics and Biomembranes**, p. 1-3, 2017.

- INAMASSU, A.; VECHI, E.; LOPES, M. D. Viabilização do teste hipo-osmótico em cães e sua relação com outras variáveis espermáticas. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, [S.l.], v. 23, p. 302-304, 1999.
- INCE, S.; ARSLAN-ACAROZ, D.; DEMIREL, H. H.; VAROL, N.; OZYUREK, H-A; ZEMHERI, F.; KUCUKKURT, I. Taurine alleviates malathion induced lipid peroxidation, oxidative stress, and proinflammatory cytokine gene expressions in rats. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, [S.L.], v. 96, p. 263-268, 2017.
- JAYAPRAKASHA, G. K.; PATIL, B.S. In vitro evaluation of the antioxidant activities in fruit extracts from citron and blood orange. **Food Chemistry**, v. 101, n. 1, p. 410-418, 2007.
- JEYENDRAN, R. S. et al. Development of an assay to assess the functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to other semen characteristics. **Journal Reproduction Fertility**, [S.l.], v. 70, p. 219-228, 1984.
- JIANG, Z.; HARRINGTON, P.; ZHANG, M.; MARJANI, S. L.; PARK, J.; KUO, L.; PRIBENSZKY, C.; TIAN, X. Effects of High Hydrostatic Pressure on Expression Profiles of In Vitro Produced Vitrified Bovine Blastocysts. **Scientific Reports**, v. 6, p. 1-10, 2016.
- KREGEL, K. C. Invited review: heat shock proteins: modifying factors in physiological stress responses and acquired thermotolerance. **Journal of Applied Physiology**, v. 92, n. 5, p. 2177-2186, 2002.
- KUÇUK, N.; AKSOY, M.; UCAN, U.; AHMAD, E.; NASEER, Z.; CEYLAN, A.; SERIN, I. Comparison of two different cryopreservation protocols for freezing goat semen. **Cryobiology**, v.68, p.327–331, 2014.
- LAYEK, S. S.; MOHANTY, T. K.; KUMARESAN, A.; PARKS, J. E. Cryopreservation of Bull semen: Evolution from egg yolk based to soybean based extenders. **Animal Reproduction Science**, v. 172, p. 1-9. 2016.
- LI, T.; WANG, W.; CHEN, H.; LI, T.; YE, L. Evaluation of anti-leukemia effect of resveratrol by modulating SIRT6 signaling. **International Immunopharmacology**, v. 10, p. 18-25, 2010.
- LIU, S.; HOU, W.; YAO, P.; ZHANG, B.; SUN S; NUSSLER, A. K.; LIU, L. Quercetin protects against ethanol-induced oxidative damage in rat primary hepatocytes. **Toxicology in Vitro**, v. 24, n. 2, p. 516-522, 2010.
- MAIA, M. S.; BICUDO, S. D.; AZEVEDO, H. C.; SICHERLE, C. C.; SOUSA, D. B.; RODELLO, L. Motility and viability of ram sperm cryopreserved in a Tris-egg yolk extender supplemented with anti-oxidants. **Small Ruminant Research**, v. 85, p. 85-90, 2009.

MANEESH, M.; JAYALAKSHMI, H.; SINGH, T. A.; CHAKRABARTI, A. Impaired hypothalamic-pituitary-gonadal axis function in men with diabetes mellitus. **Indian Journal of Clinical Biochemistry**, v. 21, n. 1, p. 165-168, 2006.

MARIANTE, A. S.; ALBUQUERQUE, M. S. M.; RAMOS, A. F. Criopreservação de recursos genéticos animais brasileiros. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 35, n. 2, p. 64-68, 2011.

MARTINS, C.F.; DODE, M. A. N.; SILVA, A. E. D. F. Atlas de Morfologia Espermática Bovina. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA). Embrapa, 2016. 100p. ISBN 978-85-7035- 540-9. Brasília, DF, 2016.

MENEZO, Y. J. R.; SILVESTRIS, E.; DALE, B.; ELDER, K. Oxidative stress and alterations in DNA methylation: two sides of the same coin in reproduction. **Reproductive BioMedicine Online**, v. 33, n. 6, p. 668-683, 2016.

MENTZ, D. A. **Efeitos da alta pressão gasosa sobre a viabilidade e expressão gênica de blastocistos expandidos bovinos produzidos *in vitro* submetidos à criopreservação**. 2018. 62p. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias), Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2018.

MEZZALIRA, J. C. **Estresse controlado e moduladores de cromatina para otimizar a criotolerância e o desenvolvimento de oócitos e embriões bovinos produzidos *in vitro***. 2018. 73p. Tese (Doutorado em Ciência Animal), Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Universidade do Estado de Santa Catarina, Lages, 2018.

MOURÃO, L. R. M. B. **Efeito antioxidante do ácido indol-3-acético sobre fígado de camundongos submetidos à hepatocarcinogênese induzida**. 2007. 105p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia), Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2007.

NAGATA, M. P. B.; ENDO, K.; OGATA, K.; YAMANAKA, K.; EGASHIRA, J.; KATAFUCHI, N. et al. Live births from artificial insemination of microfluidic-sorted bovine spermatozoa characterized by trajectories correlated with fertility. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 115, n. 14, 2018.

NAGATA, M. B.; EGASHIRA, J.; KATAFUCHI, N.; ENDO, K.; OGATA, K.; YAMANAKA, K.; YAMANOUCHI, T.; MATSUDA, H.; HASHIYADA, Y.; YAMASHITA, K. Bovine sperm selection procedure prior to cryopreservation for improvement of post-thawed semen quality and fertility. **Journal of Animal Science and Biotechnology**, v. 10, p. 91, 2019.

NAHLEH, Z.; TFAYLI, A.; NAJM, A.; EL SAYED, A.; NAHLE, Z. Heat shock proteins in cancer: targeting the 'chaperones'. **Future Medicinal Chemistry**, v. 4, n. 7, p. 927-935, 2012.

NILSSON, S.; MAKELA, S.; TREUTER, E.; TUJAGUE, M.; THOMSEN, J.; ANDERSSON, G. et al. Mechanisms of Estrogen Action. *Phys Ver*, v. 81, n. 4, p. 1535-1565, 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.

OZSOY, N.; KARSLI, U.; ALICI, B. Protective effect of intravenous lipid emulsion treatment on malathion-induced ovarian toxicity in female rats. **European Review for Medical and Pharmacological Sciences**. [S.L.], v. 20, n. 11, p. 2425-34, jun. 2016.

PARKS, J. E.; GRAHAM, J. K. Effects of cryopreservation procedures on sperm membranes. **Theriogenology**. v. 38, n. 2, p. 209-222, 1992.

PEÑA-CORONA, S.; LEÓN, P.; MENDIETA E.; VILLANUEVA, M.; SALAME, A.; VARGAS, D. et al. Effect of a single application of coumestrol and/or dimethyl sulfoxide, on sex hormone levels and vaginal cytology of anestrus bitches. **Vet Méx**, v. 6, n. 1, p.1-15, 2019.

PÉREZ-RIVERO, J. J.; MARTÍNEZ-MAYA, J. J.; PÉREZ-MARTÍNEZ, M.; AGUILAR-SETIÉN, Á.; SERRANO, H. Efecto del coumestrol sobre la producción espermática y la conducta de exploración olfatoria de perros estimulados con moco vaginal estral. **Vet Méx**, v. 40, n. 1, p. 9-16, 2009.

PÉREZ-RIVERO, J. J.; SETIÉN, A.; MARTÍNEZ-MAYA, J. J.; PÉREZ-MARTÍNEZ, M.; SERRANO, H. Los fitoestrógenos y el efecto de su consumo en diferentes órganos y sistemas de animales domésticos. **Agric Tec**, v. 67, n. 3, p. 325-331, 2007.

PERIS-FRAU, P.; SOLER, A. J.; INIESTA-CUERDA, M. et al. Sperm Cryodamage in Ruminants: Understanding the Molecular Changes Induced by the Cryopreservation Process to Optimize Sperm Quality. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 8, p. 2781, 2020.

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

PRIBENSZKY, C.; VAJTA, G. Cells under pressure: how sublethal hydrostatic pressure stress treatment increases gametes' and embryos' performance? **Reproduction, Fertility and Development**, v. 23, n. 1, p. 48-55, 2011.

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

RASTIJA, V.; NIKOLIĆ, S.; MEDIĆ-ŠARIĆ, M. Molecular modeling of wine polyphenols. **Journal of Mathematical Chemistry**, v. 46, n. 3, p. 820-833, 2009.

RATTAN, S. I. S.; DEMIROVIC, D. Hormesis can and does work in humans. **Dose response**. v. 8, n. 1, p. 58-63, 2010.

REITER, R.J.; TAN, D.X.; BURKHARD, S. Reactive oxygen and nitrogen species and cellular and organismal decline: amelioration with melatonin. **Mechanisms of Ageing and Development**, v.123, p.1007-1019, 2002.

RIEGER, D. K.; SANTOS, A. A.; SUÑOL, C.; FARINA, M. Involvement of superoxide in malaoxon-induced toxicity in primary cultures of cortical neurons. **Journal Of Toxicology And Environmental Health**, [S.L.], v. 80, n. 19-21, p. 1106-1115, 2017.

RISTOW, M.; ZARSE, K. How increased oxidative stress promotes longevity and metabolic health: The concept of mitochondrial hormesis (mitohormesis). **Experimental Gerontology**, v. 45, p. 410-418, 2010.

SANTOS, J. F. D.; SANTOS, K. J. D.; SANTOS, A. P. P. et al. Qualidade do sêmen bovino criopreservado. **Revista Espacios**. v. 39, n. 14, p. 18, 2018.

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

SCHONS, D. D. **Efeitos da exposição aos inseticidas malation e diazinon sobre o sistema genital masculino: uma revisão crítica da literatura focada em roedores**. 2022. 60 p. Trabalho de conclusão de curso (Graduação em Ciências Biológicas). Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2022.

SCOTT, J. W.; CORT, W. M.; HARLEY, H.; PARRISH, D. R.; SAUCY, G. 6-Hydroxychroman-2-carboxylic acids: novel antioxidants. **Journal of the American Oil Chemist's Society**, v. 51, p. 200-203, 1974.

SIKKA, S. C. Role of oxidative stress and antioxidants in andrology and assisted reproductive technology. **Journal of Andrology**, v. 25, p. 5-18, 2004.

SILVA, C. M. G; FAUSTINO, L. R.; SARAIVA, M. V. A.; ROSSETO, R.; FIGUEIREDO, J. R. Influência da tensão de oxigênio na maturação oocitária e cultivo *in vitro* de folículos e embriões. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 34, p. 233-242, 2010.

SILVA, S.V. **Avaliação de espermatozoides ovinos criopreservados em Tris-gema acrescido de antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos**. 2010. 118p. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias). Programa de Pós-Graduação em Ciência Veterinária. Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2010.

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

SILVA, W. J. M. D.; FERRARI, C. K. B. Metabolismo mitocondrial, radicais livres e envelhecimento. **Revista Brasileira de Geriatria e Gerontologia**, v. 14, n. 3, p. 441-451, 2011.

SIMÃO, A. N. C.; SUZUKAWA, A. A.; CASADO, M. F.; OLIVEIRA, R. D.; GUARNIER, F. A.; CECCHINI, R. Genistein abrogates pre-hemolytic and oxidative stress damage induced by 2, 2'-azobis (amidinopropane). **Life Sciences**, v. 78, p. 1202-1210, 2005.

SNOECK, P. Aspectos da criopreservação de sêmen equino: composição do meio diluidor, curvas de congelamento e fertilidade. Universidade Federal de Minas Gerais, 2003.

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

SPANIER, G.; XU, H.; XIA, N.; TOBIAS, S.; DENG, S.; WOJNOWSKI, L.; FORSTEMANN, U.; LI, H. Resveratrol reduces endothelial oxidative stress by modulating the gene expression of superoxide dismutase 1 (SOD1), glutathione peroxidase 1 (GPx1) and NADPH oxidase subunit (Nox4). **Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 60, n. 4, p. 111-116, 2009.

TANNO, M.; KUNO, A.; YANO, T. et al. Induction of manganese superoxide dismutase by nuclear translocation and activation of SIRT1 promotes cell survival in chronic heart failure. **The Journal of Biological Chemistry** v. 285, n. 11, p. 8375-8382, 2010.

VARNER, D.D.; GIBB, Z.; AITKEN, R. J. Stallion fertility: A focus on the spermatozoon. **Equine Veterinary Journal**. 2014.

VENDRELL-FLOTATS, M.; ARCARONS, N.; BARAU, E.; LÓPEZ-BÉJAR, M.; MOGAS, T. Effect of heat stress during in vitro maturation on developmental competence of vitrified bovine oocytes. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 52, n. 4, p. 48-51, 2017.

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

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

WHITTEN, P. L.; PATISAUL, H. B. Cross-species and interassay comparisons of phytoestrogen action. **Environ Health Perspect**, v. 109, p. 5-20, 2001.

WOŁAWEK-POTOCKA, I.; MANNELLI, C.; BORUSZEWSKA, D.; KOWALCZYK-ZIEBA, I.; WAŚNIEWSKI, T.; SKARŻYŃSKI, D. J. Diverse effects of phytoestrogens on the reproductive performance: cow as a model. **Int J Endocrinol**, v. 2013, p. 1-15, 2013.

YOON, S-J.; KWON, W-S.; RAHMAN, M. S. et al. A Novel Approach to Identifying Physical Markers of Cryo-Damage in Bull Spermatozoa., **Plos One**, v. 10, n. 5, 2015.

YOUSEF, M. I.; ESMAIL, A. M.; BAGHDADI, H. H. Effect of isoflavones on reproductive performance, testosterone levels, lipid peroxidation, and seminal plasma biochemistry of male rabbits. **J Environ Sci Health**, v. 39, n. 5-6, p. 819-833, 2004.

ZHANG, H-Y.; WANG, L-F.; SUN, Y-M. Why B-ring is the active center for genistein to scavenge peroxy radical: a DFT study. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v. 13, p. 909-911, 2003.

ZIMMERMANN, K. C.; BONZON, C.; GREEN, D. R. The machinery of programmed cell death. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 92, n. 1, p. 57-70, 2001.