

**O uso do Eugenol na criopreservação do sêmen bovino**

**The use of Eugenol in the cryopreservation of bovine sêmen**

DOI:10.34117/bjdv6n11-162

Recebimento dos originais: 19/10/2020

Aceitação para publicação: 09/11/2020

**Yndyra Nayan Teixeira Carvalho Castelo Branco**

Doutora em Ciência Animal

Universidade Federal do Maranhão

Centro de Ciências Agrárias e Ambientais – CCAA, Campus IV MA-230, KM 04, s/nº - Boa Vista,

Chapadinha – MA, CEP 65500-000

E-mail: yndyranayan1@hotmail.com

**Marlon de Araújo Castelo Branco**

Doutor em Biotecnologia

Centro de Controle de Zoonoses de Teresina/PI

Rua Minas Gerais, 909 - Acarapé, Teresina - PI, 64003-850

E-mail: marlon704@gmail.com

**Micherlene da Silva Carneiro Lustosa**

Doutora em Ciência Animal

Instituto de Ensino Superior Múltiplo

Avenida Boa Vista, 700 - Boa Vista, Timon - MA, 65631-430

E-mail: micherlene100@hotmail.com

**Isolda Márcia Rocha do Nascimento**

Doutora em Ciência Animal

Colégio Técnico de Teresina

Campus Universitário, Socopo s/n - Socopo, Teresina - PI, 64049-550

E-mail: isoldamarcia@ufpi.edu.br

**Filipe Nunes Barros**

Mestre em Ciência Animal

Universidade Federal do Piauí

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

E-mail: filipenbarros@hotmail.com

**Marcos Antônio Celestino de Sousa Filho**

Mestre em Ciência Animal

Universidade Federal do Piauí

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

E-mail: marcoscelestino90@gmail.com

**Geraldo Magela Côrtes Carvalho**

Doutor em Ciência Animal

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – EMBRAPA Meio-Norte

Avenida Duque de Caxias, 5650 C.P 001 - Buenos Aires, Teresina - PI, 64008-780

E-mail: geraldo.carvalho@embrapa.br

**José Adalmir Torres de Souza**

Doutor em Medicina Veterinária

Universidade Federal do Piauí

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

E-mail: adalmir@ufpi.edu.br

## RESUMO

O experimento foi conduzido com o objetivo de avaliar os efeitos antioxidantes da adição do eugenol no diluidor TRIS-gema para a criopreservação de espermatozoides bovino. Foram utilizados vinte ejaculados de quatro bovinos Curraleiro Pé-Duro, após as coletas o sêmen foi diluído em TRIS-Gema e dividido em três alíquotas; controle, tratamento nas concentrações de 10 $\mu$ M e 50 $\mu$ M de eugenol. Posteriormente as amostras foram envasadas em palhetas de 0,25ml e criopreservadas. Em seguida as palhetas foram mantidas em equilíbrio por 60 minutos a 5°C, para então serem criopreservadas em protocolo padrão de criopreservação com uso da máquina TK 3000®, e por fim as palhetas foram mergulhadas em nitrogênio líquido (-196° C) e armazenadas em botijão criogênico. Após 30 dias foram realizadas as análises pós-criopreservação. As avaliações espermáticas incluíram motilidade e vigor espermático (TTR), nos tempos de 0, 60, 120 e 180 minutos, determinação da integridade das membranas plasmática e acrossomal, funcionalidade da membrana espermática (HOST), cinética espermática, quantificação da lipoperoxidação espermática, quantificação de GSH e teste de fertilização in vitro. Observou-se que a suplementação de eugenol nas concentrações de 50 $\mu$ M diferiu significativamente ( $P < 0,05$ ) dos demais tratamentos, induzindo um aumento na quantificação de GSH, uma redução na determinação de MDA, um aumento no VSL e preservou a integridade das membranas plasmática e acrossomal. Em conclusão, é sugerida a utilização do eugenol na criopreservação do sêmen de touros, a fim de limitar os danos induzidos pelo frio.

**Palavras-Chave:** Curraleiro Pé-Duro, membrana plasmática, espécies reativas ao oxigênio, glutathiona reduzida.

## ABSTRACT

The experiment was carried out with the objective of evaluating the antioxidant effects of the addition of eugenol in the TRIS-yolk extender in cryopreservation of bovine sperm. Twenty ejaculates from four Curraleiro Pé-Duro cattle were used, after the collection the semen was diluted in TRIS-Gem and divided into three aliquots; control, treatment in concentrations of 10 $\mu$ M and 50 $\mu$ M of eugenol. Subsequently the samples were filled in 0.25ml packaged in straws and cryopreserved. Then the straws were kept in equilibrium for 60 minutes at 5°C, to then be cryopreserved in a standard cryopreservation protocol using the TK 3000® machine, and finally the packaged in straws were dipped in liquid nitrogen (-196° C) and stored in a cylinder cryogenic. After 30 days, post-cryopreservation analyzes were performed. Sperm evaluations included sperm motility and vigor (TTR), at 0, 60, 120 and 180 minutes, determination of plasma and acrosomal membrane integrity, sperm membrane functionality (HOST), sperm kinetics, sperm lipoperoxidation quantification, quantification GSH and in vitro fertilization test. It was observed that eugenol supplementation in concentrations of 50 $\mu$ M differed significantly ( $P < 0.05$ ) from the other treatments, inducing an increase in the quantification of GSH, a reduction in the determination of MDA, an increase in VSL and preserved the integrity of the membranes plasma and acrosomal. In conclusion, the use of eugenol in the cryopreservation of semen in bulls is suggested, in order to limit the damage induced by cold.

**Keywords:** Curraleiro Pé-Duro, plasma membrane, species reactive to oxygen, reduced glutathione.

## 1 INTRODUÇÃO

Os avanços biotecnológicos na reprodução animal refletem em um maior êxito na produção e no melhoramento genético dos animais, capaz de maximizar a eficiência reprodutiva. Neste aspecto, a criopreservação tem sido amplamente utilizada, devido aos seus benefícios sobre o melhoramento genético de animais de produção, a otimização da criação e exploração de macho através de programas de inseminação artificial (IA), e a conservação de material genético de animais em vias de extinção, agindo sobre o armazenamento do sêmen por prazo indefinido, através da congelação, em processo hábil para interromper o metabolismo espermático (Lema, 2011; Morrell e Mayer, 2017). Entretanto o processo de criopreservação induz a geração de espécies reativas ao oxigênio (ROS), o qual é responsável por danificar os espermatozoides de mamíferos, provocando alterações da motilidade, danos ao DNA e as membranas espermáticas (Simon et al. 2013) e consequentemente redução na fertilização oocitária (Griveau e Le Lannou, 1997).

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

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

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

Em estudos sobre peroxidação lipídica Castelo Branco et al. (2017) observou que o óleo essencial de limão (*Citrus limon*), foi eficiente na redução da LPO espermática. Outros compostos, como o eugenol (4-alil-2-metoxifenol), um metoxifenol com uma cadeia curta de hidrocarbonetos, e

principal componente (80% –95%) fenólicos do óleo de cravo (*Eugenia caryophyllata*), tem demonstrado atividade protetora sobre as células.

O eugenol por muito tempo foi utilizado como especiaria devido ao seu forte odor, e como anti-séptico dentário devido ao seu efeito detergente, contudo atualmente vem sendo estudado e evolutivamente ao progresso das pesquisas demonstra apresentar diversas propriedades biológicas, inclusive atividade antioxidativa. Em estudos para estimar a capacidade do eugenol em atuar como antioxidante observou-se um poder redutor efetivo deste composto na capacidade de eliminação de radicais livres, demonstrado pela redução de ferricianeto de potássio e Cúprico ( $\text{Cu}^{2+}$ ) e por métodos de redução quando comparados com  $\alpha$ -Tocoferol, BHT e BHA (Gülçin, 2011).

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

## **2 MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1 ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL**

Todos os procedimentos realizados com os animais estavam em conformidade com a legislação europeia para experimentação animal (Diretiva 2010/63 / UE) e com a legislação brasileira em pesquisa animal (Lei 11.794 de 08 de outubro de 2008). O procedimento descrito neste artigo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da EMBRAPA MEIO – NORTE, sob o protocolo de 001/2016.

### **2.2 REAGENTES E MEIOS**

O eugenol e todos os demais produtos químicos foram obtidos a partir da Sigma-Aldrich® (St. Louis, MO, USA).

### **2.3 DILUIDORES EXPERIMENTAIS**

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

## 2.4 ANIMAIS

Foram utilizados quatro touros da raça Curraleiro Pé-Duro, provenientes Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – EMBRAPA Meio Norte localizada na cidade de Campo Maior, Piauí, Brasil (04° 49' 40" latitude sul e 42° 10' 07" de longitude oeste), com idades média de 5 anos, pesando entre 310 a 365 Kg e com escore de condição corporal 3-4 (escala 1-5). Todos os touros tinham histórico de fertilidade comprovada e foram avaliados quanto à saúde geral, à integridade dos órgãos reprodutivos e à qualidade espermática.

## 2.5 COLETA DE SÊMEN E AVALIAÇÃO INICIAL

As coletadas de sêmen foram feitas duas vezes por semana, durante três semanas, totalizando 20 ejaculados, com o auxílio de um eletroestimulador controlado automaticamente (Biocon ® Soluções para Biotecnologia, Uberaba, Minas Gerais, Brasil), utilizando um tubo de ensaio graduado de 15 mL, estéril. Os ejaculados foram transportados em caixa térmica a 37 °C para o Laboratório para posterior avaliação. Imediatamente após a chegada ao laboratório as amostras de sêmen de cada animal foram colocadas em banho Maria a 37 °C e avaliadas separadamente quando a cor, aspecto, volume (mL), turbilhonamento (0-5), motilidade total (%) e vigor espermático (1-5), em microscópio de contraste de fase (Olympus optical Co., Ltda., 163 Tóquio, Japão). A concentração espermática foi obtida em câmara de Neubauer, na diluição de 1:200, em solução de citrato de sódio em formol a 4 %. Para análise da morfologia espermática, utilizou-se o método de câmara úmida, segundo o Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA 2013). Apenas ejaculados com turbilhonamento  $\geq 3$ ; motilidade total  $\geq 80\%$ ; vigor  $\geq 3$ ; concentração espermática  $\geq 3,5 \times 10^9$  espermatozoides/mL e patologias espermáticas  $\leq 20\%$  foram utilizados nesse estudo. Quando aprovados, as amostras dos quatro ejaculados foram diluídas separadamente em tris gema, posteriormente a diluição, cada ejaculado foi subdividido em 3 alíquotas e acrescentado eugenol (10  $\mu\text{M}$  e 50  $\mu\text{M}$ ), enquanto que uma alíquota sem nenhuma suplementação foi mantida como controle. Logo em seguida, cada uma das três alíquotas de cada animal, foram mantidas a 37° em banho maria e submetidas a uma nova avaliação, objetivando eliminar qualquer efeito negativo do diluidor e dos tratamentos sobre as amostras estudadas.

## 2.6 CRIOPRESERVAÇÃO DO SÊMEN

O sêmen diluído, de acordo com os tratamentos experimentais, foi envasado em palheta de 0,25mL (20 X 10<sup>6</sup> espermatozoides viáveis por palheta) e congelado em máquina TK 3000® (TK Tecnologia em congelação Ltda, Uberaba, Brasil), na curva de congelação rápida, e após atingir -120°

C, as palhetas foram mergulhadas em nitrogênio líquido (-196° C) e armazenadas em botijão criogênico. O tempo de equilíbrio na temperatura de 5° C foi de 60 minutos. Após 30 dias de armazenamento as amostras de sêmen foram descongeladas em banho-maria a 37°C por 30 segundos e avaliadas quanto à termo resistência (TR), integridade da membrana plasmática, integridade do acrossoma, funcionalidade da membrana plasmática, cinética espermática, quantificação da lipoperoxidação da membrana espermática, determinação da concentração de glutathione reduzida e teste de fertilidade *in vitro*.

## 2.7 TESTE DE TERMORRESISTÊNCIA (TTR)

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

## 2.8 ANALISE DA INTEGRIDADE DA MEMBRANA PLASMÁTICA

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

## 2.9 ANALISE DA INTEGRIDADE ACROSSOMAL

Para avaliação da integridade do acrossoma, utilizou-se o corante isotiocianato de fluoresceína conjugado a Peanut agglutinin (FITC-PNA; Sigma-Aldrich®, St Louis, MO, USA), de acordo com a técnica descrita por Roth et al. (1998), em que uma alíquota de 20µL da solução estoque de FITC-PNA (1mg/mL) foi descongelada e adicionada à 480µL de solução de fosfato tamponada (PBS) para obter a concentração final de 100µg/mL. Alíquotas (20µL) desta solução foram colocadas sobre esfregaços de lâminas contendo espermatozoides, as quais foram incubadas por 20 minutos em câmara úmida a 4°C, na ausência de luz. Após incubação, as lâminas foram enxaguadas duas vezes em PBS refrigerado (4°C) e colocadas para secagem na ausência de luz. Imediatamente antes da avaliação, 5µL de meio de montagem UCD (4,5mL de glicerol, 0,5mL de PBS, 5mg de azida sódica e 5mg de p-fenilenodiamina) foram colocados sobre a lâmina e cobertos com lamínula. Foram avaliados 200 espermatozoides por lâmina, com aumento de 1000x, sob óleo de imersão, em microscópio de epifluorescência (Olympus optical Co., Ltda., Tóquio, Japão), usando-se filtro de emissão LP 515nm e BP 450-490nm para excitação. Os espermatozoides foram classificados como portadores de acrossomas intactos, quando apresentavam a região acrossomal corada com fluorescência verde, ou com acrossoma reagido, quando apresentavam uma faixa verde fluorescente na região equatorial da cabeça espermática ou não apresentavam fluorescência verde em toda região da cabeça.

## 2.10 TESTE DE FUNCIONALIDADE DA MEMBRANA ESPERMÁTICA PÓS-CRIOPRESERVAÇÃO

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

## 2.11 CINÉTICA ESPERMÁTICA

A cinemática espermática foi avaliada por meio de um Sistema de Análises de espermatozoide Computadorizado (CASA). O CASA consistu de um sistema de microscopia óptica de contraste de fase (Nikon™ H5505, Eclipse 50i, Japão), com iluminação estroboscópica, e uma fase quente a 37°C,



uma câmera de vídeo (Basler Visão Tecnologie™ A312FC, Ahrensburg, Alemanha) e um PC com o analisador de esperma Classe™ software (Microptics, SL, versão 3.2.0, Barcelona, Espanha). As variáveis avaliadas foram: motilidade progressiva (MOP--  $\mu\text{m/s}$ ), velocidade curvilinear (VCL -  $\mu\text{m/s}$ ), velocidade em linha reta (VSL -  $\mu\text{m/s}$ ), velocidade média do percurso (VAP- $\mu\text{m/s}$ ), linearidade (LIN - %), retilinearidade (STR-%), deslocamento lateral de cabeça (ALH -  $\mu\text{m}$ ), Wobble (WOB - %) e frequência de batimento cruzado (BCF-Hz), para cada espermatozoide analisado.

## 2.12 QUANTIFICAÇÃO DA LIPOPEROXIDAÇÃO DA MEMBRANA ESPERMÁTICA

A taxa de peroxidação lipídica dos espermatozoides foi estimada pela medida do nível de malonalialdeído (MDA), utilizando o ácido tiobarbitúrico (TBA), baseado no método descrito por Buege e Aust (1978). Os níveis de malonalialdeído foram medidos após a suplementação de 500  $\mu\text{L}$  de sêmen pós-criopreservado, mais Tampão Tris-ácido cítrico, pH 7,4, adicionado a 1mL do reagente TBA (15% de ácido tricloroacético; 0,25N de ácido clorídrico e 0,375% de ácido tiobarbitúrico) e 1% (v/v) de BHT 50mM. A mistura foi tratada em água fervente (100 ° C) durante 15 min. Posteriormente as amostras foram resfriadas, e centrifugadas 1.200g por 15 min. O sobrenadante foi removido e a absorbância foi medida a 535 nm em espectrofotômetro UV-VIS (Perkin Elmer - Lambda 25). A concentração de MDA foi determinada pela curva de calibração feita diariamente com malonaldeído (MDA) como padrão, nas concentrações de 1 a 20mmol. O MDA produzido foi expresso em  $\mu\text{mol}$  de TBARS/mL de diluidor.

## 2.13 MÉTODO DA DETERMINAÇÃO DOS NÍVEIS DE GLUTATIONA REDUZIDA (GSH)

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



## 2.14 TESTE DE FERTILIDADE IN VITRO

Os complexos *cumulus-oócitos* (CCOs) foram coletados por aspiração folicular de ovários obtidos de um matadouro local. Foram considerados adequados para o cultivo in vitro os oócitos com três ou mais camadas de células do cumulus compactas, com citoplasma homogêneo ou apresentando pequenas irregularidades. Os CCOs selecionados foram submetidos à maturação in vitro em meio TCM-199 acrescido de 2,4 mM de NaHCO<sub>3</sub>; 2,2 mg/mL de piruvato de sódio; 5 µg/mL de LH; 5 µg/mL de FSH; 100 ng/µl de eGF; 1 µg/mL de estradiol; 50 µM de cisteína; 10% de SFB e 1% de gentamicina, por 24 horas, em estufa incubadora à 39°C com 5% de CO<sub>2</sub> e 95% de umidade. Após a maturação, todos os oócitos foram fertilizados com sêmen criopreservado suplementado ou não com eugenol a 10 e 50 µM em meio base TRIS, preparado segundo a técnica de gradiente de Percoll.

A fertilização in vitro foi realizada em gotas de 100µl de meio Fert-Talp acrescido de 10µg/ml de heparina, cobertas com óleo mineral, com concentração espermática de  $1 \times 10^6$  espermatozoides vivos/ml, co-incubados em atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>, a 38,5 °C por 22 horas. Após 48 horas os presumíveis zigotos foram avaliados quanto a taxa de clivagem.

## 2.15 DELINEAMENTO E ANÁLISE ESTATÍSTICA

O delineamento experimental foi em bloco ao acaso, com quatro blocos (animais), cinco repetições (coletas). As variáveis de termorresistência, funcionalidade e integridade das membranas espermáticas, cinética espermática, foram submetidas a análise de variância (ANOVA) utilizando-se o procedimento modelos lineares gerais (Proc GLM) e para comparação de média foi utilizado o teste Duncan, na probabilidade de 5%. As análises foram executadas através do programa Statistical Analysis System (SAS Institute Inc, 2013).

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

## 3 RESULTADOS

As alterações dos parâmetros de motilidade e vigor de espermatozoides bovinos após a criopreservação em diferentes concentrações: controle, (10µM e 50µM) de eugenol, em tempo progressivo, 0, 60, 120 e 180 minutos, de incubação à 37°C, são mostrados na Tabela 1. Em geral, o sêmen apresentou valores significativamente menores de motilidade e vigor espermático após a

descongelamento e progressivamente decrescentes ao longo tempo. Embora os espermatozoides dos tratamentos e do controle, apresentassem valores significativamente maiores após a descongelamento, o tempo de incubação reduziu a porcentagem de espermatozoides com motilidade total, no entanto ao observar os tempos 120 e 180 minutos para este parâmetro, não se identificou diferenças significativas ( $P < 0,05$ ), entre os grupos em estudo. Para vigor, observou-se que o controle e os tratamentos obtiveram um decréscimo em função do tempo, contudo para os tratamentos ( $10\mu\text{M}$  e  $50\mu\text{M}$ ) de eugenol, nos tempos de 120 e 180 minutos não foram observadas diferenças significativas ( $P < 0,05$ ), após o estresse térmico.

Tabela 1 - Motilidade total (%) e vigor (1 - 5) pós-descongelamento de espermatozoides bovinos, criopreservados sobre a adição de diferentes concentrações (10  $\mu$ M e 50  $\mu$ M) de eugenol, avaliados pelo teste de termo resistência (TTR)

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

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.

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.

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

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

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

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

Valores de média com letras minúsculas diferentes na mesma linha indicam diferenças significativas (P <0,05) para membrana plasmática, pelo teste de Duncan.

Valores de média com letras maiúsculas diferentes na mesma linha indicam diferenças significativas (P <0,05) para membrana acrossomal, pelo teste de Duncan.

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

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

TABELA 3 - Parâmetros da cinética espermática e funcionalidade da membrana plasmática, na pós-descongelamento de doses seminais bovinas diluídas em TRIS-gema e suplementada com diferentes concentrações (10 µM e 50µM) de eugenol

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

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

**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.

Valores de média com letras minúsculas diferentes na mesma linha indicam diferenças significativas (P <0,05) pelo teste de Duncan.

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

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

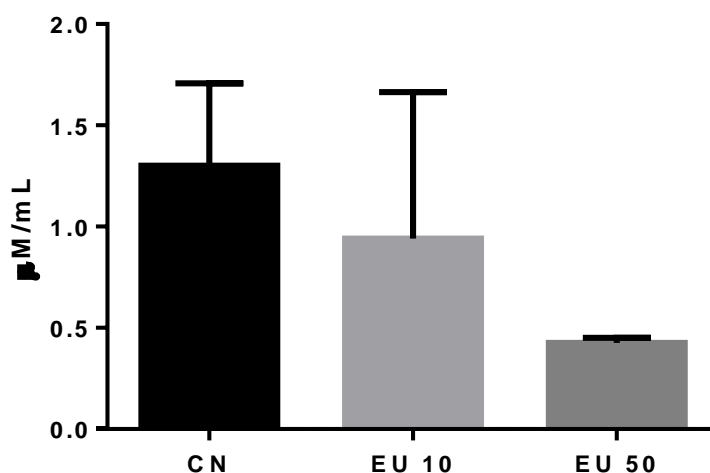


Figura 2 - Quantificação de GSH em sêmen pós-criopreservado de touros, suplementados com diferentes concentrações (10  $\mu$ M e 50  $\mu$ M) de eugenol. GSH: Glutathiona reduzida. CN: controle. EU10: Eugenol 10 $\mu$ M. EU50: Eugenol 50 $\mu$ M. Os valores representam a média  $\pm$  D.P.M. As diferenças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

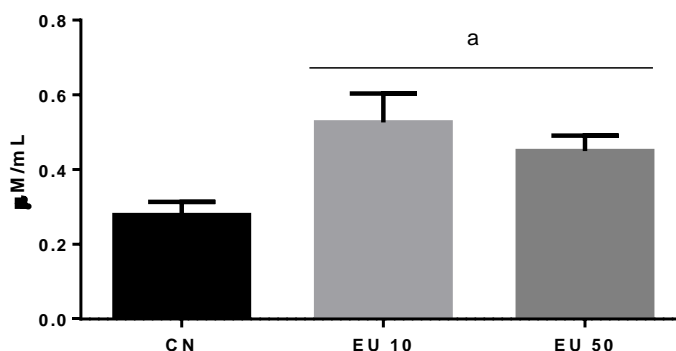
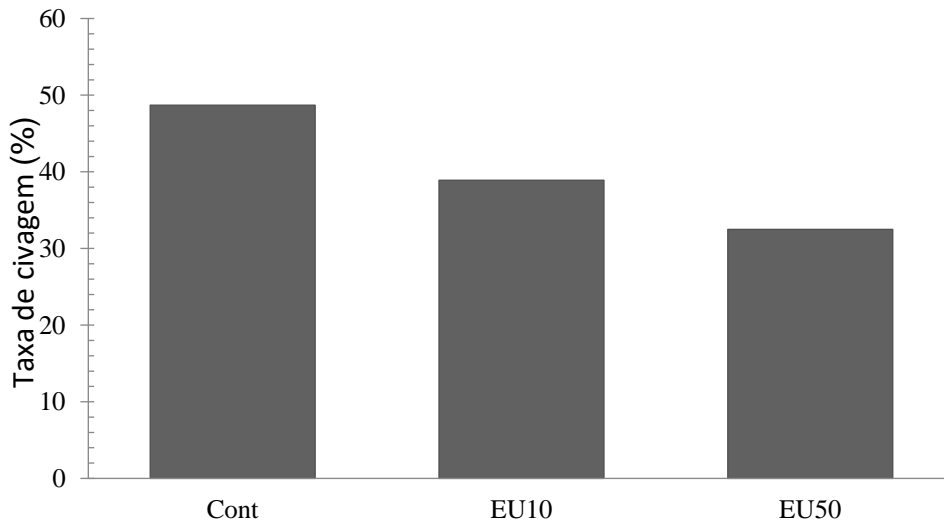


Figura 3 – Taxa de fertilização *in vitro*, utilizando sêmen bovino criopreservado em TRIS-gema, suplementado com diferentes concentrações (10, 50  $\mu\text{M}$ ) de eugenol. **Cont.** – Controle; **E10** – 10  $\mu\text{M}$  de eugenol, **E50** – 50  $\mu\text{M}$  de eugenol.



#### 4 DISCUSSÃO

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

Os resultados deste trabalho mostraram que o eugenol não foi eficiente em aumentar os parâmetros de VAP, VCL, STR, LIN, BCF ou ALH. No entanto, a análise da cinética espermática pós-



descongelamento para os parâmetros de VSL e WOB, mostrou-se maior para o tratamento Eugenol - 50µM, quando em comparação aos demais tratamentos. Podendo-se inferir a partir de então que mediante a concentração e a capacidade do eugenol de inibir a atividade e a expressão gênica de indutores de ciclooxigenase ativados por lipopolissacarídeos em macrófagos de rato (Kim et al., 2003), supostamente tenha através desta ação estimulado o aumento na velocidade em linha reta juntamente com o movimento de oscilação, mesmo que por pouco tempo.

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

Também, observou-se neste estudo que o eugenol não melhorou o percentual de membrana plasmática, quando comparado ao controle, no entanto os grupos em estudo preservaram a integridade da MP ao longo do tempo, e as concentrações de 10 e 50µM de eugenol preservaram na progressão do tempo a integridade da MA. Gangwar et al. (2018), ao verificarem a ação da glutatona reduzida (GSH) ao diluidor de criopreservação espermática, observaram que esta aumentou a motilidade e o percentual de acrossomas intacto.

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

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

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

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

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

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

**5 CONCLUSÃO**

Em conclusão, diante da atividade antioxidante do eugenol potencializando os sistemas de defesa espermáticos, é sugerido sua adição na criopreservação do sêmen bovino.

**REFERÊNCIAS**

- Banday, MN, Lone, F,A, Rasool, F, Rashid, M, Shikari, A. Use of antioxidants reduce lipid peroxidation and improve quality of crossbred ram sperm during its cryopreservation. *Cryobiology*.74, 25-30, 2017.
- Bucak, M.N.; Atessahin, A.; Varisli, O.; Yuge, A.; Tekin, N.; Akçay, A. The influence of trehalose, taurine, cysteamine and hyluronan on ram semen Microscopic and oxidative stress parameters after freeze-thawing process. *Theriogenology*, v.67, n.15, p.1060-1067, 2007.
- Buege, J.A.; Aust, S.D. Microsomal Lipid Peroxidation. *Methods in Enzymology*, v.52, p.302-10,1978.
- Campanholi, S.P.; Monteiro, F.M.; Dias, E.A.R.D.; Mercadante, M.E.Z.; Paz, C.C.P.; Dell'aqua Junior, J.A.; Papa, F.O.; Dell'aqua, C.P.F.; Vantini, R.; Garcia, J.M. Efeito da remoção do plasma seminal antes da criopreservação de sêmen bovino obtido por eletroejaculação na qualidade do sêmen e fertilidade in vitro. *Theriogenology*, v.89, p.114–121,2017.
- Castelo Branco, MA, Carvalho, YNT, Moraes Júnior, FJ, Barros, FN, Barçante, FPS, Carvalho, GMC, Evangelista, LSM, Silva, ALA, Sousa Filho, MA, Sousa, JAT. Plasminogen activator inhibitor 1 and antipain preserve acrosome integrity of bovine spermatozoa during cryopreservation. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*. 69,5, 1114-1124, 2017.
- CBRA. Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (2013). 'Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal'. (CBRA: Belo Horizonte)
- Cerolini, S, Maldjian, A, Surai, P, Noble, R. Viability susceptibility to peroxidation and fatty acid composition of boar semen during liquid storage. *Anim. Reprod. Sci.* 58, 99–111, 2000.
- Coletto, Z. F., Guerra, M. M. P., and Batista, A. M. Avaliação do sêmen 489 congelado de caprinos com drogas fluorescentes. *Rev. Bras. Med. Vet.* 24, 101-104, 2002.
- 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.
- Fonseca, J. F.; Torres, C. A. A.; Maffili, V. V; Borges, A. M.; Santos, A. D. F.; Rodrigues, M. T.; Oliveira, R. F. M. The hypoosmotic swelling test in fresh goat spermatozoa. *Animal Reproduction*, v. 2, p. 139-144, 2005.
- Gangwar, C.; Saxena, A.; Patel, A.; Singh, S.P.; Yadav, S.; Kumar, R.; Singh, V. Efeito da suplementação reduzida de glutathione em crioinjúrias espermáticos induzidos por criopreservação em sêmen de touros Murrah. *Ciência da Reprodução Animal*, v.192, p.171-178, 2018.

Griveau, JF, Le Lannou, D. Reactive oxygen species and human 511 spermatozoa: physiology and pathology. *International Journal of Andrology*. 20, 61–9, 1997.

Gulçin, I, Elmastas, M, Aboul-enein, H,Y (2007) Determination of antioxidant and radical scavenging activity of basil (*Ocimum basilicum* L. family Lamiaceae) assayed by different methodologies. *Phytother*.

Jones, R. and Mann, T. Damage to ram spermatozoa by peroxidation of endogenous phospholipids. *J. Reprod. Fertil.*, 50: 261-268, 1997.

Juyena, N.; Stelletta, C. Seminal plasma: an essential attribute to spermatozoa. *J Androl*, v.33, p.536-51. 2012.

Khan H, Khan MF, Jan SU, Ullah N. Effect of aluminium metal on glutathione (GSH) level in plasma and cytosolic fraction of human blood. *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences*. 24,(1):13-18, 2011.

Kiernan, M, Fahey, A, Fair, S. The effect of the in vitro supplementation of exogenous long-chain fatty acids on bovine sperm cell function. *Reproduction, fertility and development*, 25, 947–954, 2013.

Kim ts, Kang BY, Cho D, Kim SH. 2003. Induction of interleukin – 12 production in mouse macrophages by berberine, a benzodioxoloquinolizine alkaloid, deviates CD4+ T cells from a Th2 to a Th1 response. *Imunology*.109:407-414.

Kumi-diaka, J. Subjecting canine semen to the hypo-osmotic test. *Theriogenology*, v. 39, p. 1279-1289, 1993.

Lemma, A (2011). Effect of Cryopreservation on Sperm Quality and Fertility, Artificial Insemination in Farm Animals, Dr. Milad Manafi (Ed.).

Liu Q, Wang X, Wang W, Zhang X, Xu S, Ma D, Xiao Z, Xiao Y. Effect of the addition of six antioxidants on sperm motility, membrane integrity and mitochondrial function in red seabream (*Pagrus major*) sperm cryopreservation. *Fish Physiol Biochem*. Apr;41(2):413-22, 2015.

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* 7 (2), 164 – 170, 2013.

Malo, C, Gil, L, Gonzalez, N, Martinez, F, Cano, R, de Blas, I, Espinosa, E (2010). Anti-oxidant supplementation improves boar sperm characteristics and fertility after cryopreservation: comparison between cysteine and rosemary (*Rosmarinus officinalis*). *Cryobiology* 61, 142–147.

Michos IA, Basioura AG, Boscós CM, Tsakmakidis IA. Proper use and impact of ‘Computer Assisted Semen Analysis’ technique on sêmen evaluation of farm animals. *Journal of the Hellenic Veterinary Medical Society*, 64:267-274, 2013.

Morrell JM, Mayer I. Reproduction biotechnologies in germplasm banking of livestock species: a review. *Zygote*.25(5):545-557, 2017.

Nagy A, Polichronopoulos T, Gasparly A, Solti L, Cseh S. Correlation between bull fertility and sperm cell velocity parameters generated by computer-assisted semen analysis. *Acta Veterinaria Hungarica*. 63:370-381, 2015.

Nagy, S., Hallap, T., Johannisson, A., Martinez-Rodriguez, H., Changes in plasma membrane and acrosome integrity of frozen-thawed bovine spermatozoa during a 4 h incubation as measured by multicolor flow cytometry. *Anim. Reprod. Sci.* 80, 225–235, 2004.

Ntemka, A.; Tsousis, G.; Brozos, C.; Kiossis, E.; Boscos, C.M.; Tsakmakidis, I.A. Breed differences of bull frozen-thawed semen. *Reproduction in Domestic Animals*, v.51, p.945–952, 2016.

Reiter, RJ. Oxidative damage in the central nervous system: protection by melatonin. *Progress in Neurobiology*, v.56, p.359-384, 1998.

Roth, T.L., Weiss, R.B., and Buff, J.L. Heterologous in vitro fertilization and sperm capacitation in an endangered African antelope, the Scimitar-Horned Oryx (*Oryx capensis*). *Biol. Reprod.* 58, 475-482, 1998.

Sariözkan, S., Bucak, MN, Tuncer, PB, Ulutaş, PA e Bilgen, A. A influência de cisteína e taurina nos parâmetros de estresse oxidativo-microscópico e capacidade de fertilização do sêmen de touros após a criopreservação. *Criobiologia* . 58 : 134–138, 2009.

Shahzad K, Bock F, Al-Dabet MM, Gadi I, Nazir S, Wang H, Kohli S, Ranjan S, Mertens PR, Nawroth PP, Isermann B. Stabilization of endogenous Nrf2 by minocycline protects against Nlrp3-inflammasome induced diabetic nephropathy. *Sci Rep.* 2016; 6: 34228.

Simon, L, Proutski, I, Stevenson, M, Jennings, D, McManus, J, Lutton, D, Lewis, SEM. Sperm DNA damage has a negative association with live-birth rates after IVF, *Reprod. Bio. Med. Online.* 26, 68–78, 2013.

Watson, P.F. Desenvolvimentos e conceitos recentes na criopreservação de espermatozoides e na avaliação de sua função pós-descongelamento. *Reprod Fertil Dev* . 7 : 871–891, 1995.

Yeste, M.; Castillo-martín, M.; Bonet, S.; Briz, M.D. Direct binding of boar ejaculate and epididymal spermatozoa to porcine epididymal epithelial cells is also needed to maintain sperm survival in in vitro co-culture. *Anim Reprod Sci*, v.131, p.181-193. 2012.