



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS, AMBIENTAIS E BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL
CURSO DE MESTRADO**

**CRIOPRESERVAÇÃO DE SÊMEN CAPRINO COM INCLUSÃO DE
ÓLEO DE LINHAÇA DOURADA (*Linum usitatissimum* L.) NO
DILUIDOR**

MÉROLE SOUZA FERREIRA DA SILVA

**CRUZ DAS ALMAS - BAHIA
AGOSTO- 2015**

**CRIOPRESERVAÇÃO DE SÊMEN CAPRINO COM INCLUSÃO DE
ÓLEO DE LINHAÇA DOURADA (*Linum usitatissimum* L.) NO
DILUIDOR**

MÉROLE SOUZA FERREIRA DA SILVA

Bióloga

Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, 2013.

Dissertação submetida ao Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, como requisito parcial para obtenção do Grau de Mestre em Ciência Animal.

Orientadora: Dra. Larissa Pires Barbosa

Co-Orientador: Dr. Lincoln da Silva Amorim

CRUZ DAS ALMAS – BAHIA

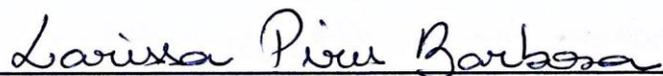
AGOSTO – 2015

FICHA CATALOGRÁFICA

S586c	<p>Silva, Mérole Souza Ferreira da. Criopreservação de sêmen caprino com inclusão de óleo de linhaça dourada (<i>Linum usitatissimum</i> L.) no diluidor / Mérole Souza Ferreira da Silva._ Cruz das Almas, BA, 2015. 80f.; il.</p> <p>Orientadora: Larissa Pires Barbosa. Coorientador: Lincoln da Silva Amorim.</p> <p>Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas.</p> <p>1.Caprino – Reprodução animal. 2.Caprino – Sêmen – Criopreservação. I.Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas. II.Título.</p> <p>CDD: 636.082</p>
-------	---

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS, AMBIENTAIS E BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL
CURSO DE MESTRADO**

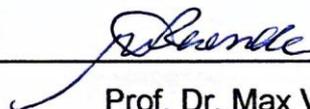
**COMISSÃO EXAMINADORA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE
MÉROLE SOUZA FERREIRA DA SILVA**



Profa. Dra. Larissa Pires Barbosa
Universidade Federal do Recôncavo da Bahia
(Orientadora)



Profa. Dra. Evani Souza de Oliveira Strada
Universidade Federal do Recôncavo da Bahia



Prof. Dr. Max Vitória Resende
Universidade Salvador

**CRUZ DAS ALMAS – BAHIA
AGOSTO – 2015**

*Ao meu Criador e Mantenedor, meu Pai e Senhor,
por me conceder mais esse presente, me guiando e
abençoando no desenvolvimento desse trabalho.*

A DEUS eu DEDICO!

Não é que os meus dias sejam sempre sol
Pois nuvens aparecem sem me avisar
E quando está escuro, eu também tenho medo
Não é que minhas flores nunca murcharão
Pois quantas vezes peço e recebo um não
Às vezes eu espero, às vezes eu me canso
Mas nada vai me impedir de sorrir e me alegrar
Eu posso confiar
Pois todo tempo, meu Deus comigo está
Eu tenho paz, em Cristo eu tenho paz
Eu venço as tempestades, seguro e escondido no Senhor
Tenho paz, não posso entender
No meio do deserto, eu vejo a esperança renascer
Tenho paz!!!

(Pedro Valença)

“DEUS um caminho fará onde não pareça haver nenhum, ele sempre é fiel, e se preciso for Ele abrirá o mar, eu sei, um caminho Deus fará”.
(Fernanda Baía)

E assim Ele fez.

***Não deixei de ter medo de errar, mas DEUS
não deixou o medo me parar.***

AGRADECIMENTOS

À DEUS por ter sido meu Porto Seguro, por ter me abençoado com saúde, ânimo e paciência todos os dias. Por ter guiado e abençoado a realização deste trabalho. PAI, muito obrigada por TUDO! EU TE AMO!

Ao meu esposo Everson, que me apoiou incondicionalmente, me incentivou, caminhou comigo, ou melhor, me carregou, foi paciente, compreensivo, por todo amor e carinho. MUITO OBRIGADA MEU AMOR!

À minha família por todo carinho, incentivo e apoio, pelo amor e orações da minha mãe, imprescindíveis para realização desse mestrado e sucesso na minha vida. OBRIGADA FAMÍLIA!

À minha grande orientadora, Dr^a Larissa Pires Barbosa, por toda paciência dispendida a mim, por todo incentivo, apoio incondicional, todos os conselhos e por todo carinho. Obrigada Pró por acreditar em mim, ter me concedido a honra de convivemos todos esses anos, por ter me ensinado tanto e apesar de todas as dificuldades, ter tornado este trabalho real. MUITO OBRIGADA PRÓ!

À galera do NERA, graduandos, mestrandos e doutorandos, em especial aqueles que participaram ativamente, sem os quais não teria sido possível a realização desta pesquisa. À doutoranda Rosiléia por ter se tornado uma grande amiga, por ter se dedicado totalmente a esse trabalho sendo uma ótima orientadora. Léa você foi essencial! MUITO OBRIGADA! Agradeço a William por ter sido meu braço direito nos testes complementares, por todo seu entusiasmo, dedicação e amizade. MUITO OBRIGADA WILL! Enfim, a todos os membros do grupo, vocês foram indispensáveis, essa vitória é nossa! MUITO OBRIGADA!

Aos irmãos adventistas do sétimo dia e amigos que me deram força, ânimo e motivos para continuar lutando. MUITO OBRIGADA!

À Universidade Federal do Recôncavo da Bahia e ao Programa de Pós-graduação em Ciência Animal pela oportunidade. Aos professores, por todos os ensinamentos e trocas de experiências. Aos servidores, especialmente os técnicos de laboratórios, por toda atenção e disponibilidade tentando ajudar sempre. OBRIGADA!

À CAPES pela concessão da bolsa de mestrado!

Aos Professores, Dr^a Evani Strada e Dr. Max Resende, por aceitarem participar da banca de defesa desta dissertação, contribuindo grandemente para o aprimoramento e conclusão deste trabalho. MUITO OBRIGADA!

Enfim, entre lágrimas e sorrisos, erros e acertos, mais uma conquista foi alcançada, meus sinceros agradecimentos a todos que contribuíram direta ou indiretamente nessa caminhada.

MUITO OBRIGADA!!!

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE FIGURAS	
LISTA DE TABELAS	
LISTA DE ABREVIATURAS	
RESUMO	
ABSTRACT	
INTRODUÇÃO.....	1
REVISÃO DE LITERATURA.....	3
Criopreservação e diluidores seminais.....	3
Linhaça e seus efeitos nos processos reprodutivos.....	6
Análises espermáticas pós-descongelamento.....	9
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	16
Capítulo 1	
ÓLEO DE LINHAÇA DOURADA (<i>Linum usitatissimum</i> L.) NO DILUIDOR PARA CRIOPRESERVAÇÃO DE SEMEN CAPRINO.....	25
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	48
ANEXOS.....	50

LISTA DE FIGURAS

REVISÃO DE LITERATURA	Página
Figura 1. Espermatozoides caprinos corados com DAB, modificada de Vidigal (2008).....	13
Figura 2. Espermatozoides corados com azul de toluidina, modificada de Carretero et al. (2009).....	15
 CAPÍTULO I	
Figura 1. Espermatozoides caprinos corados pelo método do Vermelho Congo.....	37
Figura 2. Espermatozoides caprinos corados com DAB.....	39
Figura 3. Espermatozoides caprinos corados com azul de toluidina.....	40

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO I	Página
Tabela 1. Motilidade espermática progressiva e vigor espermático no Teste de Termorresistência de sêmen caprino criopreservado com níveis de óleo de linhaça dourada no diluidor.....	34
Tabela 2. Teste Hiposmótico de sêmen caprino criopreservado com níveis de óleo de linhaça dourada no diluidor.....	36
Tabela 3. Teste de Integridade Acrossomal de sêmen caprino criopreservado com níveis de óleo de linhaça dourada no diluidor.....	37
Tabela 4. Teste de Atividade Mitocondrial de sêmen caprino criopreservado com níveis de óleo de linhaça dourada no diluidor.....	39
Tabela 5. Análise da compactação da cromatina espermática de sêmen caprino criopreservado com níveis de óleo de linhaça dourada no diluidor.....	40

LISTA DE ABREVIATURAS

DAB	3'3-diaminobenzidine
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DHA	Ácido docosahexaenoico
EPA	Ácido eicosapentaenoico
CLA	Ácido linoleico conjugado
PUFAs	Ácidos graxos poli-insaturados
ATP	Adenosina Trifosfato
CBRA	Colégio Brasileiro de Reprodução Animal
FIV	Fecundação <i>in vitro</i>
g	Grama
°C	Graus Celsius
HOST	Hypoosmotic Swelling Test
IA	Inseminação Artificial
m	Metro
µL	Microlitro
µM	Micromolar
mg	Miligrama
mL	Mililitro
min	Minutos
ng	Nanograma
NRC	National Research Council
P	Nível de significância
N	Normal
PBS	Phosphate Buffered Saline
%	Porcentagem
pH	Potencial hidrogeniônico
kcal	Quilocaloria
kJ	Quilojoule
TTR	Teste de Termorresistência
HO	Teste Hiposmótico

CRIOPRESERVAÇÃO DE SÊMEN CAPRINO COM INCLUSÃO DE ÓLEO DE LINHAÇA DOURADA (*Linum usitatissimum* L.) NO DILUIDOR

Autora: Mérole Souza Ferreira da Silva

Orientadora: Dra. Larissa Pires Barbosa

RESUMO: O estudo teve como objetivo avaliar o efeito da inclusão de óleo de linhaça dourada no diluidor para criopreservação de sêmen caprino. Foram utilizados quatro machos da raça Anglo Nubiana, com idade média de $4,25 \pm 1,19$ anos e peso médio de $59,75 \pm 7,94$ Kg, criados em sistema semi-intensivo. Coletas de sêmen foram realizadas duas vezes por semana, pelo método de vagina artificial, utilizando-se uma fêmea estrogenizada como manequim. Os ejaculados foram avaliados quanto aos aspectos físicos e morfológicos para formação de um “pool”, sendo fracionados em cinco tratamentos (T): T1 (controle negativo): diluidor Citrato-gema; T2 (controle positivo): Citrato-gema + 1% de lauril sulfato de sódio e T3, T4 e T5: Citrato-gema + 1% de lauril sulfato de sódio, acrescido de 0,13g; 0,29g e 0,45g de óleo de linhaça dourada, respectivamente. O sêmen foi criopreservado em máquina de congelação TK 3000® utilizando a curva para caprinos (P4S2) e descongelado a 37°C por 30 segundos. Foram realizadas avaliações físicas do sêmen pós-descongelação e os testes complementares de termorresistência (TTR) por 180 minutos, teste hiposmótico (HO), avaliação da integridade acrossomal, da atividade mitocondrial e análise da compactação da cromatina espermática. Os dados foram avaliados por Análise de Regressão a 5% de significância. Não houve diferença para os parâmetros avaliados ($P > 0,05$). Desta forma, a inclusão de até 0,45g de óleo de linhaça no diluidor para criopreservação de sêmen caprino não melhorou a viabilidade espermática após a criopreservação, por isso, sendo desnecessária a sua utilização nas concentrações avaliadas.

Palavras-chave: reprodução, espermatozoide, ômega 3, ácido alfa-linolênico

GOAT SEMEN CRYOPRESERVATION WITH GOLDEN LINSEED (*Linum usitatissimum* L.) OIL INCLUSION IN EXTENDER

Author: Mérole Souza Ferreira da Silva

Adviser: Dr^a Larissa Pires Barbosa

ABSTRACT: The study aimed to evaluate the effect of inclusion of golden flaxseed oil in extender for goat semen cryopreservation. Four males of Anglo Nubian were used with an average age of 4.25 ± 1.19 years and average weight of 59.75 ± 7.94 Kg, created in semi-intensive system. Semen samples were taken twice a week, by the method of artificial vagina, using a estrogenized female as mannequin. The ejaculates were evaluated about the physical and morphological aspects to forming a “pool”, fractionated in five treatments (T): T1 (negative control): extender citrate-yolk; T2 (positive control): yolk-citrate + 1% sodium lauryl sulfate and T3, T4 and T5: yolk-citrate + 1% sodium lauryl sulfate plus 0.13 g; 0.29 g and 0.45 g of golden flaxseed oil, respectively. Semen was cryopreserved in freezing machine TK 3000® using the curve to caprines (P4S2) and thawed at 37 ° C for 30 seconds. They were conducted physical evaluations of post-thaw semen and supplementary tests of heat resistance (TTR) for 180 minutes, hyposmotic test (HO), assessment of acrosome integrity, evaluation of mitochondrial activity and analysis of the spermatic chromatin compaction. The data were evaluated by Regression at 5% significance. There was no difference for the evaluated parameters ($P > 0.05$). In this way, the inclusion of up to 0.45 g of linseed oil in the caprine semen cryopreservation diluter has not improved spermatic viability after cryopreservation, therefore, it is unnecessary use in the concentrations evaluated.

Key-words: reproduction, sperm, omega 3, alpha-linolenic acid

INTRODUÇÃO

Muitos estudos têm sido desenvolvidos para aprimorar o processo de criopreservação seminal na espécie caprina e assim alavancar a utilização desses animais nos programas de inseminação artificial (IA), fecundação *in vitro* (FIV), entre outros (DORADO et al., 2009; KÜÇÜK et al., 2014). Com a finalidade de atenuar as injúrias causadas aos espermatozoides, os meios diluidores seminais tornaram-se foco de pesquisas. Desta forma, diferentes substâncias têm sido adicionadas aos meios no intuito de garantir proteção máxima às células espermáticas (FARSHAD et al., 2009; MEMON et al., 2012; KULAKSIZ et al., 2013).

Ácidos graxos poli-insaturados (PUFAs) têm sido cada vez mais estudados como suplemento, diferentes fontes já foram avaliadas, incluindo óleos vegetais. De forma geral, os resultados obtidos com essa adição mostram maior qualidade espermática pós-descongelamento por meio de alterações na composição lipídica das membranas dos espermatozoides (ANSARI et al., 2012; SANTOS, 2013).

Dentre os óleos vegetais utilizados com objetivo de melhorar os processos reprodutivos, tem-se o óleo de linhaça. A semente do linho, ou linhaça, é um alimento funcional, ou seja, quando ingerida de forma adequada proporciona múltiplos efeitos benéficos ao organismo (AMIN; THAKUR, 2014), ela apresenta uma complexa composição, é a maior fonte vegetal de ácido linolênico e também possui alto teor de ácido linoleico (Tabela Brasileira de Composição de Alimentos, 2011). Diversas pesquisas apontam os benefícios da utilização dessa semente, entre eles estão os efeitos desses ácidos graxos sobre a reprodução de fêmeas (NAZIR, et al., 2013) e machos (MOURVAKI, et al., 2010).

De acordo com Souza (2013) a suplementação oral de caprinos com semente de linhaça aumentou a concentração e qualidade espermática do sêmen fresco, e melhorou a resistência dos espermatozoides após descongelamento.

Contudo, a adição do óleo de linhaça a meios diluidores para criopreservação de sêmen ainda não foi estudada. Diante disso, o presente estudo teve como objetivo avaliar o efeito da inclusão de óleo de linhaça dourada no diluidor para criopreservação de sêmen caprino.

REVISÃO DE LITERATURA

Criopreservação e diluidores seminais

O aperfeiçoamento da criopreservação seminal tem evoluído progressivamente desde a descoberta do potencial crioprotetor do glicerol por Polge et al. (1949), esta técnica é de suma importância para as demais biotecnologias da reprodução, pois permite que o sêmen coletado seja armazenado a baixas temperaturas e utilizado posteriormente para diversos fins, como na inseminação artificial (IA), múltiplas ovulações e transferência de embriões (MOTE) e na produção de embriões *in vitro* (PIV) (Konyali et al., 2013; Maia, 2014).

A criopreservação seminal é essencial para pesquisa, pois contribui para um aumento na produção de animais de alto valor genético; conservação de espécies em extinção, com a formação dos bancos de germoplasma; produção e conservação de animais transgênicos; entre outras finalidades (Barbas; Mascarenhas, 2009).

O processo de congelação do sêmen consiste na inibição do metabolismo celular por meio da redução da temperatura, desidratação e conseqüente congelação da célula (Barbas; Mascarenhas, 2009), que pode ser feito utilizando método manual ou automatizado (Ferreira et al., 2009).

O processo de criopreservação utilizando máquinas de congelação automatizadas permite o controle sobre as taxas de decréscimo da temperatura por meio da utilização de curvas padronizadas para as espécies, corroborando para obtenção de maior qualidade espermática após descongelação, além de permitir que um maior número de palhetas sejam processadas por vez, contribuindo para o avanço nas pesquisas na área de reprodução animal (Purdy, 2006; Ferreira et al., 2009; Maia, 2010).

Em ambos os processos, manual ou automatizado, estudos mostram que ocorre estresse celular (Purdy, 2006; Watson, 2000), que reflete na redução da qualidade espermática nas diversas espécies, incluindo a caprina (Nordstoga et al., 2011).

Mesmo com o aperfeiçoamento ao longo de anos de pesquisas, a criopreservação causa danos irreversíveis às células, como a redução da motilidade espermática progressiva e conseqüentemente do vigor espermático após descongelação; mudanças na estrutura da bicamada lipídica, causando aumento da permeabilidade da membrana plasmática; maior número de patologias; lesões na membrana acrossomal ou ainda desprendimento total do acrossoma; fragmentação do DNA espermático, entre outros prejuízos que causam modificações no metabolismo celular (Watson, 2000; Barbas; Mascarenhas, 2009; Dorado et al., 2009; Küçük et al., 2014).

Para reduzir os efeitos das crioinjúrias às células espermáticas, possibilitando a reversão do metabolismo celular eficaz após o processo de congelação/descongelação, é necessário que o sêmen receba subsídios por meio de diluidores que mantenham a viabilidade espermática após a descongelação (Watson, 2000; Purdy, 2006; Roof et al., 2012). No decorrer dos anos muitos pesquisadores contribuíram para elaboração de diferentes diluidores seminais visando proporcionar um ambiente adequado aos espermatozoides durante o armazenamento e proteção frente ao processo de criopreservação, prologando assim, a fertilidade dessas células (Mara et al., 2007; Bispo et al., 2011; Küçük et al., 2014).

As principais finalidades dos diluidores seminais são: fornecer energia aos espermatozoides; proteger as células espermáticas durante a manipulação das variações de temperatura; manter o pH adequado; inibir o crescimento bacteriano e associado a taxas lentas de decréscimo de temperatura, possibilitar que as células percam água por osmose, inibindo a formação de grandes cristais de gelo intracelulares, fornecendo assim, condições favoráveis para que as células permaneçam com qualidade e viabilidade após o processo de congelação e descongelação (Watson, 2000; Silva; Guerra, 2011).

Para que desempenhem essas funções, os meios diluidores devem ser compostos por uma fonte de energia, como a glicose ou a frutose; substâncias tampão, como Tris ou citrato de sódio; crioprotetores não penetrantes

(extracelulares), como a gema de ovo ou o leite desnatado; crioprotetores penetrantes (intracelulares), como o glicerol e o etilenoglicol e substâncias antibióticas, sendo as mais utilizadas, estreptomicina, penicilina e gentamicina (Barbas; Mascarenhas, 2009; Gibbons, 2002).

Para sêmen caprino, entre os meios mais estudados e utilizados no processo de criopreservação, estão: Tris-gema (Bispo et al., 2011; Matos-Brito et al., 2013), Citrato-gema (Bispo et al., 2011; Matos-Brito et al., 2013), diluidores a base de leite desnatado (Dorado et al., 2010; Küçük et al., 2014), a base de soja, como a versão comercial Bioxcell® (Roof et al., 2012; Penitente-Filho et al., 2014), a base de água de coco, comercialmente vendido como o ACP-101® (Oliveira et al., 2011), entre outros.

Contudo, segundo Maia (2014), as taxas de concepção obtidas utilizando sêmen caprino criopreservado ainda não são satisfatórias, com isso muitas pesquisas continuam sendo desenvolvidas para aperfeiçoar os diluidores e assim melhorar a qualidade e viabilidade seminal pós-descongelamento (Naing et al., 2010; Ansari et al., 2012).

Para aprimorar os meios utilizados para diluição seminal, substâncias antioxidantes (Memon et al., 2012; Penitente-Filho et al., 2014; Shafiei et al., 2015), carboidratos (Naing et al., 2010; Quan et al., 2012), crioprotetores (Farshad et al., 2009; Kulaksiz et al., 2013; Büyükleblebici et al., 2014), entre outros componentes, têm sido alvos de diversos estudos.

Pesquisas têm relacionado à composição lipídica da membrana espermática, a qual é rica em ácidos graxos poli-insaturados (PUFAs), com o sucesso da criopreservação (Towhidi et al., 2013; Kaka et al., 2015). Desta forma, fontes de ácidos graxos também estão sendo adicionadas aos meios visando à incorporação desses a membrana dos espermatozoides, tornando-a mais resistente frente ao processo de congelamento/descongelamento (Ansari et al., 2012; Towhidi et al., 2013; Kaka et al., 2015).

Já foram adicionadas fontes lipídicas aos meios diluidores de bovinos (Towhidi; Parks; 2012; Kaka et al., 2015), ovinos (Towhidi et al., 2013) e os resultados mostram melhora da qualidade espermática pós-descongelamento. Em sêmen caprino, a adição de uma fonte de ácidos graxos poli-insaturados tipo ômega 3 ao meio diluidor, aumentou a viabilidade espermática pós-

descongelamento por meio de alterações na composição lipídica das membranas (Ansari et al., 2012).

A inclusão de óleo de peixe ao diluidor seminal como fonte de PUFA, foi estudada por Kaeoket et al. (2010), que encontraram maior motilidade progressiva e maior integridade acrossomal, ou seja, maior viabilidade espermática após criopreservação de sêmen suíno. Abdi-Benemar et al. (2015), além de obterem maior qualidade espermática nos testes *in vitro*, encontraram maiores taxas de concepção por meio da inseminação artificial de ovelhas, utilizando sêmen ovino criopreservado em diluidor acrescido de óleo de peixe.

Fontes vegetais de lipídios também têm sido utilizadas. Del Valle et al. (2013) não encontraram diferenças após descongelamento sobre a viabilidade espermática de ovinos com a inclusão de óleo de coco e óleo de palma ao diluidor. No entanto, Santos (2013) obteve maior motilidade espermática progressiva após criopreservação ao adicionar 4% de óleo de coco ao meio diluidor seminal de caprinos. Contudo, torna-se indispensável à realização de pesquisas para determinar a melhor fonte a ser utilizada e um nível ótimo de suplementação dos meios diluidores.

Linhaça e seus efeitos na qualidade seminal

Segundo Bernacchia et al. (2014), o linho (*Linum usitatissimum* L.) é nativo das regiões do oriente do Mediterrâneo, ocidente da Ásia, Oriente Médio e Índia. A semente de linhaça é originária do linho, uma planta herbácea anual, pertencente à família Lineacea, que atinge até 1,30m de altura, produz frutos em forma de cápsulas arredondadas onde são produzidas as sementes oleaginosas, que apresentam variedades, sendo as mais conhecidas a marrom e a dourada (Novello; Pollonio, 2011; Bernacchia et al., 2014).

A principal diferença entre as variedades da semente de linhaça não se encontra na sua composição, mas na forma em que a planta é cultivada, ou seja, local de plantio, clima e utilização de agrotóxicos. A produção das sementes marrons é feita em locais quentes e úmidos, enquanto que as douradas em locais frios e essas são cultivadas de forma orgânica, enquanto que na produção das sementes marrons são utilizados agrotóxicos. As condições de estocagem também podem alterar a cor das sementes (Novello; Pollonio, 2011).

O linho é utilizado na confecção de tecidos, por meio da fabricação de fibra têxtil, as sementes são muito utilizadas na culinária, delas são produzidas farinhas e o óleo de linhaça, o qual também é utilizado na produção de tintas para pintura e impressão, na indústria de sabão, entre outros (Bernacchia et al., 2014; Novello; Pollonio, 2011). Contudo, diante de sua complexa composição, várias pesquisas vêm sendo desenvolvidas ao longo dos anos, para avaliar os efeitos da linhaça no organismo (Serraino et al., 1992; Rickard et al., 2000; Mucci et al., 2015).

Conforme a Tabela Brasileira de Composição de Alimentos (2011), as sementes de linhaça contêm em média: 6,7% de umidade; 495kcal ou 2072kJ de energia; 14,1g de proteína; 32,3g de lipídeos; 43,3g de carboidratos; 33,5g de fibra alimentar; 3,7g de cinzas; 211mg de cálcio; 347mg de magnésio; 2,81mg de manganês; 615mg de fósforo; 4,7mg de ferro; 9mg de sódio; 869mg de potássio; 1,09mg de cobre; 4,4mg de zinco; 0,12mg de tiamina e 0,13mg de piroxidina por 100g de parte comestível.

A composição de ácidos graxos é de 4,2g de saturados; 7,1g de mono-insaturados; 25,3g de poli-insaturados; 0,03g de ácido mirístico ou tetradecanóico (14:0); 2,49g de ácido palmítico ou hexadecanóico (16:0); 1,62g de ácido esteárico ou octadecanóico (18:0); 0,06g de ácido araquídico ou eicosanóico (20:0); 0,04g de ácido lignocérico ou tetracosanóico (24:0); 0,03g de ácido palmitoléico ou hexadecenóico (16:1); 7,06g de ácido oleico ou octadecenóico (18:1); 0,04g de ácido gadoléico ou eicosenóico (20:1); 5,42g de ácido linoleico ou octadecadienóico (18:2 n-6) e 19,81g de ácido linolênico ou octadecatrienóico (18:3 n-3) por 100g de parte comestível de semente de linhaça (Tabela Brasileira de Composição de Alimentos, 2011).

Segundo Amin; Thakur (2014), a linhaça é um alimento funcional, pois além de fornecer diversos nutrientes, quando consumida de forma adequada, proporciona inúmeros benefícios à saúde. Estudos mostram diversos efeitos biológicos da linhaça, como: atividade anti-inflamatória (Singh et al., 2008); antioxidante (Hu et al., 2007); anticancerígena (Truan et al., 2010); atua na regulação do sistema digestório (Palla; Gilani, 2015); no controle glicêmico (Hutchins et al., 2013); na redução das taxas de colesterol (Fukumitsu et al., 2010); mantém a atividade cerebral saudável (Mucci et al., 2015); um bom funcionamento do coração com a redução da pressão sanguínea (Leyva et al.,

2011) e também atua nos processos reprodutivos, tanto em machos (Mourvaki, et al., 2010) quanto em fêmeas (Nazir, et al., 2013).

Nas diversas espécies domésticas, a membrana dos espermatozoides contem altos níveis de PUFAs, como o ácido docosahexaenoico (DHA) (Brinsko et al., 2005; Moraes et al., 2010), o que confere fluidez a membrana, maior motilidade espermática progressiva e conseqüentemente maior viabilidade seminal (Towhidi; Parks; 2012; Kaka et al., 2015). Com isso, muitas pesquisas têm avaliado a inclusão da linhaça na dieta de machos, por essa ser rica em PUFAs, sendo a maior fonte vegetal de ácido linolênico, o qual é precursor do DHA (Bernacchia et al., 2014; Mourvaki, et al., 2010; Tabela Brasileira de Composição de Alimentos, 2011).

Mourvaki et al. (2010) concluíram que a adição de semente de linhaça na dieta de coelhos melhorou a qualidade espermática, por meio da incorporação de ácidos graxos à membrana dos espermatozoides. Em pesquisa com equinos, Schmid-Lausigk; Aurich (2014) observaram uma atenuação na perda da motilidade e integridade espermática após resfriamento seminal com a adição de óleo de linhaça na dieta.

Moallem et al. (2015) obtiveram maior motilidade espermática de bovinos suplementados com óleo de linhaça após o processo de criopreservação e uma maior proporção de DHA na membrana das células espermáticas. De forma semelhante, Bongalhardo et al. (2009), em pesquisa com inclusão de diferentes fontes de lipídeos na dieta de galos, concluíram que a linhaça pode substituir o óleo de peixe como fonte de PUFAs, promovendo alterações no perfil lipídico das membranas dos espermatozoides.

Gopinger et al. (2012) avaliaram o efeito da inclusão de óleo de linhaça na dieta de codornas macho e concluíram que o aumento da motilidade espermática e a porcentagem de espermatozoides normais foi proporcional ao aumento dos níveis de óleo na dieta. Souza (2013), ao suplementar a dieta de caprinos com semente de linhaça obteve sêmen com maior concentração e qualidade espermática, e maior resistência dos espermatozoides após descongelação.

Todavia, pesquisas que relacionem qualidade seminal com a inclusão de óleo de linhaça diretamente aos meios diluidores são inexistentes, com isso, torna-se viável a realização de estudos que avaliem os efeitos dessa suplementação.

Análises espermáticas pós-descongelamento

O processo de criopreservação pode causar danos irreversíveis às células (Watson, 2000; Purdy, 2006; Barbas; Mascarenhas, 2009). Com isso, antes da utilização seminal em programas de reprodução assistida, avaliações da qualidade e viabilidade espermática pós-descongelamento são imprescindíveis (Arruda et al., 2011; Silva; Guerra, 2012).

A avaliação da motilidade espermática progressiva e do vigor espermático pós-descongelamento é utilizada subjetivamente para prever a viabilidade espermática, no entanto somente essas avaliações são insuficientes diante da complexidade da célula espermática (Siqueira et al. 2007). Com isso, faz-se necessária a utilização de testes complementares que possam avaliar com maior acurácia o potencial fecundante das células, nesse sentido, muitos métodos já foram desenvolvidos ao longo de anos de pesquisas (Batista; Guerra, 2010; Arruda et al., 2011).

O Teste de Termorresistência (TTR) é capaz de avaliar a longevidade dos espermatozoides *in vitro*, supondo-se que os espermatozoides estariam no aparelho reprodutor da fêmea (Santos et al., 2006; Castilho et al., 2009). O TTR foi proposto primeiramente por Dimitropoulos, em 1967, para avaliação do sêmen bovino pós-descongelamento, posteriormente esse método foi adaptado para demais espécies. O teste consiste no acondicionamento das amostras seminais, cobertas por óleo mineral, em microtubos de polietileno e incubação em banho-maria sob temperatura pré-estabelecida e por um período de tempo determinado, avaliando-se a motilidade progressiva e o vigor espermático (Santos et al., 2006; Barros et al., 2013).

A temperatura e o período de incubação variam de acordo com a espécie estudada, segundo as recomendações do Manual Para Exame Andrológico do CBRA (1998), o sêmen caprino deve ser descongelado e mantido em banho-maria a 37°C e após 5 minutos de incubação a motilidade e o vigor espermático não devem ser inferiores a 30% e 2, respectivamente. Amostras que apresentem valores inferiores aos recomendados não são consideradas aptas para serem utilizadas nos programas de reprodução.

Santos et al. (2006) concluíram que o TTR deve ser um procedimento de rotina nos laboratórios de manipulação de sêmen caprino, pois esse teste é eficiente em prever a longevidade do sêmen após descongelamento. Segundo

Arruda et al. (1992), há correlação positiva entre a motilidade espermática obtida durante o TTR e as taxas de prenhez de fêmeas bovinas. Luz et al. (2000), em pesquisa com sêmen ovino criopreservado, afirmaram que há correlação entre a porcentagem de espermatozoides móveis durante o TTR e as taxas de fecundação obtidas por meio da inseminação laparoscópica, mas que os resultados encontrados nesse teste devem ser complementados com mais variáveis laboratoriais, com técnicas que avaliem a integridade das células espermáticas, para estimar com maior precisão a capacidade fecundante do sêmen.

A integridade da membrana espermática é de suma importância para que haja hiperativação da motilidade, capacitação espermática e reação acrossomal, culminando na fecundação do oócito (Emerick et al., 2011). Assim, torna-se indispensável à utilização de testes que avaliem sua viabilidade funcional (Arruda et al., 2011). Há vários métodos com essa finalidade na literatura (Arruda et al., 2011), o Teste Hiposmótico (HO) ou “Hypoosmotic Swelling Test” (HOST) avalia a integridade e funcionalidade da membrana espermática e foi sugerido por Jeyendran et al. (1984) para espermatozoides humanos, contudo, estudos mostram que essa técnica vem sendo utilizada para diversas espécies, como: bovinos (Martins et al., 2011); equinos (Melo et al., 2005); ovinos (Santos et al., 2015); caninos (Acipreste et al., 2014) e também caprinos (Oliveira et al., 2013).

O HO é um procedimento de fácil realização e interpretação, e consiste na incubação da amostra seminal em banho-maria a 37°C com uma solução hiposmótica por tempo determinado. A osmolaridade da solução utilizada e o tempo de exposição da amostra variam entre os pesquisadores e dependendo da espécie (Oliveira et al., 2013; Acipreste et al., 2014; Santos et al., 2015).

A célula espermática ao ser submetida à solução hiposmótica permite, por osmose, a passagem de água através da membrana para o seu interior até que haja o restabelecimento do equilíbrio osmótico entre os fluidos dos meios extra e intracelular. Quando a membrana espermática está íntegra, ocorre aumento do volume celular (edema) o que provoca alterações morfológicas nos espermatozoides, como o enrolamento ou dobramento da cauda, que podem ser observadas sob microscopia de contraste de fase (Bittencourt et al., 2005; Oliveira et al., 2013). Assim, os espermatozoides devem ser classificados quanto à

presença ou não de cauda dobrada, ou seja, reativos ou não ao HO (Kumi-Diaka, 1993).

Santos et al. (2006), ao avaliar a integridade espermática de sêmen caprino criopreservado por meio do HO, encontraram média de $39,8 \pm 15,0\%$ espermatozoides reativos para animais adultos e $41,7 \pm 14,5\%$ para animais jovens. Em estudo avaliando concentrações de gema de ovo no diluidor de sêmen caprino armazenado a 5°C por 24hs, Bispo et al. (2011) obtiveram $42,2 \pm 15,7\%$ e $56,2 \pm 11,5\%$ de células reativas ao teste, em diluidor com 20% e 2% de gema de ovo, respectivamente. Büyükleblebici et al. (2014) em pesquisa com adição de diferentes crioprotetores ao meio diluidor seminal caprino encontraram médias que variaram de $34,3 \pm 2,89\%$ a $56,0 \pm 2,77\%$ espermatozoides reativos ao HO após descongelamento. O Teste Hiposmótico é uma ferramenta complementar indispensável como indicativo de fertilidade, por demonstrar de forma simples se a membrana espermática está funcionalmente íntegra e bioquimicamente ativa (Emerick et al., 2011; Oliveira et al., 2013).

A avaliação da membrana acrossomal é também imprescindível para tentar prever, da forma mais fidedigna possível, a viabilidade espermática pós-descongelamento, pois a integridade dessa organela e a manutenção do seu conteúdo enzimático determinam o sucesso da fecundação, ou seja, a penetração na zona pelúcida e fusão com o oócito (Emerick et al., 2011). Com o desenvolvimento de várias pesquisas em qualidade seminal, muitos métodos para avaliação do acrossoma já foram estudados, estabelecidos e adaptados para as diferentes espécies, entre eles estão técnicas de coloração simples como: Vermelho Congo (Cerovsky, 1976); Pope (Pope et al., 1991) e várias sondas fluorescentes (Silva; Guerra, 2012).

A técnica de coloração pelo Vermelho Congo (Cerovsky, 1976) é simples, acessível, e permite uma visualização detalhada das patologias de acrossoma por meio da microscopia de luz (Muradás et al., 2006). Para realização desse teste de cada amostra seminal descongelada devem ser preparados esfregaços seminais em lâminas de vidro, os quais devem secar ao ar, depois, para coloração das células espermáticas, deve-se imergir as lâminas em solução aquosa saturada de vermelho congo por um minuto, lavá-las suavemente e secá-las ao ar, em seguida, os esfregaços devem ser imersos em solução aquosa a 0,5% de violeta genciana por 30 segundos, suavemente lavados e secarem ao ar (CBRA, 2013).

Para quantificação dos defeitos de acrossoma, as lâminas devem ser observadas em microscopia de luz, sob imersão (1.000X). Esse método permite classificar os espermatozoides quanto à integridade acrossomal em: íntegro; heterogêneo; em destacamento; destacado; entre outros (Muradás et al., 2006).

Contudo, de acordo com Siqueira et al. (2007), somente as avaliações convencionais de motilidade e vigor espermáticos, e os testes de Termorresistência, Integridade de Membrana Plasmática e Acrossomal são insuficientes para obtenção de um prognóstico confiável sobre o potencial fertilizante das amostras seminais após congelação/descongelação. Pesquisas mostram um aperfeiçoamento das técnicas de avaliação da qualidade espermática com o desenvolvimento de novos métodos de análise seminal a fim de diminuir a subjetividade e a variabilidade nos resultados dos testes existentes e, com isso, aprimorar a capacidade de predição da fertilidade do sêmen após criopreservação (Batista; Guerra, 2010; Arruda et al., 2011).

As mitocôndrias espermáticas estão presentes na peça intermediária da célula, produzem energia em forma de adenosina trifosfato (ATP) por meio da fosforilação oxidativa, sendo que aproximadamente 90% da energia utilizada pelos espermatozoides para metabolismo e movimento celular, provem dessas organelas, com isso, alterações no potencial mitocondrial refletem sobre a motilidade progressiva e vigor espermático (Câmara; Guerra, 2008). Segundo Batista; Guerra (2010), testes complementares que avaliem a função mitocondrial nos espermatozoides têm sido cada vez mais empregados, diferentes sondas fluorescentes são utilizadas, as quais são transportadas ativamente nas mitocôndrias que apresentam o processo de respiração ativo e são quantificadas com o auxílio da microscopia de fluorescência (Soares et al., 2011). Métodos de coloração simples também são aplicados, tornando o custo da avaliação menor por permitir a análise sob microscopia de luz, nesse método quanto mais mitocôndrias estiverem ativas, mais coloração é visualizada na peça intermediária dos espermatozoides (Cavalcante et al., 2005; Silva, 2011).

Uma das técnicas de avaliação da atividade mitocondrial espermática é a coloração com 3,3-diaminobenzidina (DAB). Por meio de uma reação em cadeia no Complexo Citocromo C, o DAB é polimerizado e se deposita na bainha mitocondrial, ou seja, na peça intermediária espermática, com isso quanto mais atividade mitocondrial a célula apresentar maior será a deposição desse reagente

e mais coloração é emitida por essas organelas (Silva, 2011). Esse método foi desenvolvido por Hrudka (1987), deve ser realizado na ausência de luz e consiste na incubação, em proporção de 1:1, da amostra seminal com DAB (1mg/ml de PBS), em banho-maria a 37°C por 60 minutos, posteriormente são preparados esfregaços os quais devem ser fixados em formaldeído a 10% por 10 minutos, em seguida lavados e secos ao ar (Silva, 2011; Nogueira, 2015).

Para quantificação da atividade mitocondrial avalia-se 200 espermatozoides por lâmina sob microscopia de luz em objetiva de imersão (100X) e classifica-se em: Classe I (peça intermediária totalmente corada); Classe II ($\geq 50\%$ da peça intermediária corada); Classe III ($\leq 50\%$ da peça intermediária corada) e Classe IV (ausência de coloração da peça intermediária) (Figura 1) (Hrudka, 1987; Silva, 2011; Nogueira, 2015).

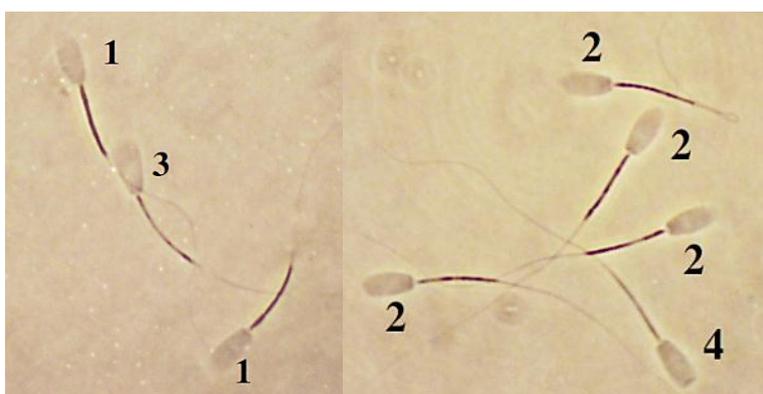


Figura 1. Espermatozoides caprinos corados com DAB, modificada de Vidigal (2008). 1- Classe I; 2- Classe II; 3- Classe III; 4- Classe IV.

A cromatina espermática também tem sido alvo de muitos estudos, pois alterações no material genético podem não somente interferir no processo de fecundação, como principalmente no desenvolvimento embrionário, impossibilitando o nascimento de um descendente viável ou transmitindo mutações gênicas para próxima geração, o que reforça a necessidade da análise da cromatina na avaliação do sêmen antes da sua utilização nos programas de reprodução assistida, como a inseminação artificial (IA) e a fecundação *in vitro* (FIV) (Beletti, 2013).

Segundo Balhorn (2007), a cromatina espermática é formada pela junção do DNA (ácido desoxirribonucleico) com protaminas, as quais são proteínas histonas

especializadas, ou nucleoproteínas específicas dos espermatozoides, sendo responsáveis por conferir ao material genético dessas células alto grau de compactação quando comparado ao das células somáticas. Essa compactação pode sofrer alterações durante o processo de congelação/descongelação expondo o DNA espermático a lesões irreversíveis (Ismail et al., 2013; Üstüner et al., 2015). Existem vários métodos que podem detectar essas alterações, como: COMETA (Ismail et al., 2013); TUNEL (Üstüner et al., 2015); SCSA (Bungum et al., 2011); Laranja de acridina; Azul de Toluidina (Kamimura et al., 2010), entre outros.

O teste com o corante azul de toluidina tem sido difundido largamente, por ser de fácil execução e viável economicamente, não sendo necessária a utilização de citometria de fluxo ou microscopia de fluorescência para análise de possíveis danos na cromatina (Beletti; Mello, 2004; Kamimura et al., 2010). O azul de toluidina é um corante metacromático, ou seja, que muda sua tonalidade de acordo as moléculas a que se liga, assim, se houver lesões cromatínicas, as moléculas do corante se ligarão aos grupos fosfatos do DNA, o que está diretamente relacionado com a compactação da cromatina, por isso a técnica também é denominada como metacromasia induzida (Beletti, 2013).

Para realização da técnica criada por Mello (1982), confeccionam-se esfregaços das amostras seminais, após secagem em temperatura ambiente, deve-se imergir os esfregaços em solução Carnoys (etanol e ácido acético 3:1) por 1 minuto e, em seguida, em etanol a 70% por 3 minutos, para fixação das amostras, posteriormente realiza-se uma hidrólise com ácido clorídrico 4N durante 15 minutos, lavagem em água destilada e secagem ao ar. Para coloração dos esfregaços utiliza-se uma gota do corante azul de toluidina em Tampão Mc Ilvaine a 0,025%, pH 4,0, entre lâmina e lamínula. Avalia-se 500 espermatozoides por lâmina sob microscopia de luz em objetiva de imersão (100X), classificando-os conforme compactação da cromatina em: íntegra (cabeça corada em azul claro); fragmentada (cabeça corada em azul escuro ou violeta) (Figura 2) (Kamimura et al., 2010).

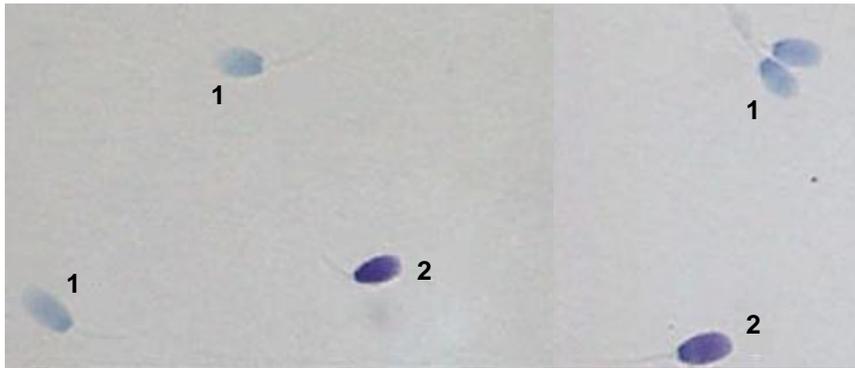


Figura 2. Espermatozoides corados com azul de toluidina, modificada de Carretero et al. (2009). 1 – Cromatina íntegra, 2 – Cromatina fragmentada.

Pesquisas são desenvolvidas todos os anos buscando aprimorar ou criar técnicas laboratoriais que avaliem mais características dos espermatozoides fazendo uma correlação com a fertilidade *in vivo*, com a finalidade de garantir a utilização de sêmen de qualidade após o processo de criopreservação (Arruda et al., 2011). De acordo com Batista; Guerra (2010), atualmente a associação de várias técnicas para avaliação seminal *in vitro* pode promover um prognóstico mais confiável da fertilidade *in vivo* do sêmen descongelado de caprinos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDI-BENEMAR, H. et al. Effects of DHA supplementation of the extender containing egg yolk and α -tocopherol on the freezability and post-thawing fertility of ram semen. **Small Ruminant Research**, 2015.

ACIPRESTE, A. C. et al. Avaliação da eficácia de crioprotetores permeantes e não permeantes no descongelamento rápido e lento do sêmen canino. **Ciência Animal Brasileira**, v. 15, n. 1, p. 107-114, 2014.

AMIN, T.; THAKUR, M. *Linum usitatissimum* L. (Flaxseed) A Multifarious Functional Food. **Online International Interdisciplinary Research Journal** v. 4, n. 1, p. 220-238, 2014.

ANSARI, M. et al. Docosahexaenoic acid and alpha-tocopherol improve sperm cryosurvival in goat. **Slovak Journal of Animal Science**, v. 45, n. 1, p. 7-13, 2012.

ARRUDA, R. P. et al. Métodos de avaliação da morfologia e função espermática: momento atual e desafios futuros. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 35, n. 2, p. 145-151, 2011.

ARRUDA, R. P. et al. Avaliação de sêmen congelado de bovinos. Provas lenta e rápida de termo-resistência: efeitos sobre a fertilidade. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v.29, n.1, p.131-137, 1992.

BALHORN, R. The protamine family of sperm nuclear proteins. **Genome biology**, v. 8, n. 9, p. 227, 2007.

BARBAS, J. P.; MASCARENHAS, R. D. Cryopreservation of domestic animal sperm cells. **Cell and Tissue Banking**, v. 10, n. 1, p. 49-62, 2009.

BARROS, M. H. C. et al. 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.

BATISTA, A. M.; GUERRA, M. M. P. Novas técnicas para avaliação da qualidade do sêmen caprino. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.34, n.3, p.125-132, 2010.

BELETTI, M. E. Cromatina espermática: quebrando paradigmas. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.37, n.2, p.92-96, 2013.

BELETTI, M.E.; MELLO, M.L.S. Comparison between the toluidina blue stain and the Feulgen reaction for evaluation of rabbit sperm chromatin condensation and their relationship with sperm morphology. **Theriogenology**, v.62, p.398-402, 2004.

BERNACCHIA, R.; PRETI, R.; VINCI, G. Chemical composition and health benefits of flaxseed. **Austin Journal of Nutrition and Food sciences**, v. 2, n. 8, p. 1045, 2014.

BISPO, C. A. S. et al. Características in vitro e fertilidade do sêmen caprino armazenado a 5° C por 24 horas utilizando duas concentrações de gema de ovo no diluente. **Ciência Animal Brasileira**, v. 12, n. 4, p. 653-660, 2011.

BITTENCOURT, R. F. et al. Utilização do teste hiposmótico para avaliar a eficácia de diferentes protocolos de criopreservação do sêmen caprino. **Ciência Animal Brasileira**, v. 6, n. 3, p. 213-218, 2005.

BONGALHARDO, D. C.; LEESON, S.; BUHR, M. M. Dietary lipids differentially affect membranes from different areas of rooster sperm. **Poultry Science**, v. 88, n. 5, p. 1060-1069, 2009.

BRINSKO, S. P. et al. Effect of feeding a DHA-enriched nutraceutical on the quality of fresh, cooled and frozen stallion semen. **Theriogenology**, v. 63, n. 5, p. 1519-1527, 2005.

BUNGUM, M.; BUNGUM, L.; GIWERCMAN, A. Sperm chromatin structure assay (SCSA): a tool in diagnosis and treatment of infertility. **Asian Journal of Andrology**, v. 13, n. 1, p. 69-75, 2011.

BÜYÜKLEBLEBİCİ, S. et al. The Comparison of Three Different Cryoprotectants in Cryopreservation of Angora Goat Semen. **Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi**, v. 20, n. 4, p. 613-619, 2014.

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

CARRETERO, M. I. et al. Evaluación del ADN espermático de llamas utilizando azul de toluidina. **Investigación Veterinaria**, v. 11, n. 1, p. 55-63, 2009.

CASTILHO, E. F. et al. Uso de própolis e ácido ascórbico na criopreservação do sêmen caprino. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 38, n. 12, p. 2335-2345, 2009.

CAVALCANTE, T.V. et al. Avaliação da atividade mitocondrial em espermatozoides pós-colheita e pós descongelação de caprinos das raças Boer e Alpina no outono e primavera. **Archives of Veterinary Science**, v. 10, n. 2, p. 89-93, 2005.

CEROVSKY, J. A. A new staining procedure for boar spermatozoa. **Zivocisna Vyroba**, v. 21, p. 351-362, 1976.

DEL VALLE, I. et al. Function of ram spermatozoa frozen in diluents supplemented with casein and vegetable oils. **Animal Reproduction Science**, v. 138, n. 3, p. 213-219, 2013.

DIMITROPOULOS, R. La signification du test de la thermorésistance dans l'appréciation de la valeur fécondante du sperme congelé. **Annuaire Médecine Vétérinaire**, v. 4, p. 215 - 224, 1967.

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

DORADO, J.; MUÑOZ-SERRANO, A.; HIDALGO, M. The effect of cryopreservation on goat semen characteristics related to sperm freezability. **Animal Reproduction Science**, v. 121, n. 1, p. 115-123, 2010.

EMERICK, L. L. et al. Avaliação da integridade de membrana em espermatozóide bovino criopreservado para prever o índice de prenhez. **Ciência Animal Brasileira**, v. 12, n. 3, p. 536-546, 2011.

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

FERREIRA, M. S. et al. Efeito do diluidor e do método de congelação na viabilidade de sêmen caprino. In: Congresso Brasileiro de Zootecnia, 19., 2009, São Paulo. **Anais...** São Paulo: ABZ, 2009. Disponível em: <<http://www.abz.org.br/anais-zootec-2009.html>>. Acesso em: 15 abr. 2015.

FUKUMITSU, S. et al. Flaxseed lignan lowers blood cholesterol and decreases liver disease risk factors in moderately hypercholesterolemic men. **Nutrition Research**, v. 30, n. 7, p. 441-446, 2010.

GIBBONS, A. Inseminación artificial com semen congelado en cabras de raza Angora. **Revista Taurus**, v. 4, n. 16, p. 24-32, 2002.

GOPINGER, E et al. Efeito da inclusão de óleo de linhaça na dieta de codornas macho (*Coturnix coturnix coturnix*) sobre características seminais e avaliação biométrica dos testículos. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**, v. 107, n. 583-584, p. 177-181, 2012.

Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA). **Manual para exame andrológico e avaliação do sêmen animal**. 2.ed. Belo Horizonte: CBRA, 1998. 49p.

Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA). **Manual para exame andrológico e avaliação do sêmen animal**. 3.ed. Belo Horizonte: CBRA, 2013. 104p.

HRUDKA, F. Cytochemical and ultracytochemical demonstration of cytochrome-c oxidase in spermatozoa and dynamics of changes accompanying ageing or induced by stress. **International Journal of Andrology**, v. 10, n. 6, p. 809-828, 1987.

HU, C.; YUAN, Y. V.; KITTS, D. D. Antioxidant activities of the flaxseed lignin secoisolariciresinol diglucoside, its aglycone secoisolariciresinol and the mammalian lignans enterodiol and enterolactone *in vitro*. **Food and Chemical Toxicology**, v. 45, n. 11, p. 2219-2227, 2007.

HUTCHINS, A. M. et al. Daily flaxseed consumption improves glycemic control in obese men and women with pre-diabetes: a randomized study. **Nutrition Research**, v. 33, n. 5, p. 367-375, 2013.

ISMAIL, M. I. et al. Evaluation of DNA integrity of cryopreserved boer goat (*Capra hircus*) sperm using comet assay at various pH conditions. **Scientific Papers Animal Science and Biotechnologies**, v. 46, n. 1, p. 65-70, 2013.

JEYENDRAN, R.S. Development of an assay to assess the functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to other semen characteristics. **Journal Reproduction Fertility**, v. 70, n. 1, p. 219-228, 1984.

KAEOKET, K. et al. Effect of docosahexaenoic acid on quality of cryopreserved boar semen in different breeds. **Reproduction in domestic animals**, v. 45, n. 3, p. 458-463, 2010.

KAKA, A. et al. α -Linolenic acid supplementation in BioXcell® extender can improve the quality of post-cooling and frozen-thawed bovine sperm. **Animal reproduction science**, v. 153, p. 1-7, 2015.

KAMIMURA, C. F.; JACOMINI, J. O.; BELETTI, M. E. Alterações de cromatina em espermatozoides de ovinos e caprinos avaliadas por azul de toluidina e alaranjado de acridina. **Ciência e agrotecnologia**, v. 34, n. 1, p. 212-219, 2010.

KONYALI, C. et al. Optimizing conditions for treating goat semen with cholesterol-loaded cyclodextrins prior to freezing to improve cryosurvival. **Cryobiology**, v. 67, n. 2, p. 124-131, 2013.

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

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

KUMI-DIAKA, J. Subjecting canine semen to the hypo-osmotic test. **Theriogenology**, v.39, n. 6, p.1279-1289, 1993.

LEYVA, D. R. et al. The effect of dietary flaxseed on improving symptoms of cardiovascular disease in patients with peripheral artery disease Rationale and design of the FLAX-PAD randomized controlled trial. **Contemporary Clinical Trials**, v. 32, n. 5, p. 724-730, 2011.

LUZ, S. L. N.; NEVES, J. P.; GONCALVES, P. B. D. Parâmetros utilizados na avaliação do sêmen congelado ovino para inseminação laparoscópica. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 37, n. 2, p. 141-145, 2000.

MAIA, M. S. Tecnologia de sêmen e inseminação artificial em caprinos. **Acta Veterinaria Brasilica**, v.8, n. 2, p. 389-395, 2014.

MAIA, M. S. Tecnologia do sêmen e inseminação artificial em caprinos e ovinos. Natal: EMPARN, 2010. (EMPARN. Circuito de Tecnologias Adaptadas para a Agricultura Familiar, 7; n. 13). Disponível em:<<http://adcon.rn.gov.br/ACERVO/EMPARN/DOC/DOC000000000024678.PDF>> Acesso em: 02 abr 2015.

MARA, L. et al. Effect of different diluents on goat semen fertility. **Animal Reproduction Science**, v. 102, n. 1, p. 152-157, 2007.

MARTINS, L. F. et al. Avaliação de diferentes osmolaridades de soluções hiposmóticas e tempos de incubação no teste hiposmótico do sêmen de touros Nelore. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 40, n. 7, p. 1519-1525, 2011.

MATOS-BRITO, B. G. et al. Effect of initial seminal plasma fructose concentration on goat semen storage at 5 °C. **Archivos de Zootecnia**, v. 62, n. 237, p. 143-146, 2013.

MELLO, M.L.S. Induced metachromasy in bull spermatozoa. **Histochemistry**, v.74, n.3, p.387-392, 1982.

MELO, M. I. V.; HENRY, M.; BEKER, A. R. C. L. Teste hiposmótico para avaliação da viabilidade do sêmen equino resfriado com diferentes diluidores. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 57, n. 6, p. 757-763, 2005.

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

MOALLEM, U. et al. Dietary α -linolenic acid from flaxseed oil or eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids from fish oil differentially alters fatty acid composition and characteristics of fresh and frozen-thawed bull semen. **Theriogenology**, v. 83, n. 7, p. 1110-1120, 2015.

MORAES, E. A. et al. Fontes de óleo e níveis de suplementação de vitamina E na ração sobre a qualidade do sêmen suíno acondicionado a 17 e 5°C. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 39, n. 7, p. 1450-1456, 2010.

MOURVAKI, E. et al. Effects of flaxseed dietary supplementation on sperm quality and on lipid composition of sperm subfractions and prostatic granules in rabbit. **Theriogenology**, v. 73, n. 5, p. 629-637, 2010.

MUCCI, D. B. et al. Flaxseed mitigates brain mass loss, improving motor hyperactivity and spatial memory, in a rodent model of neonatal hypoxic-ischemic encephalopathy. **Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids (PLEFA)**, 2015.

MURADÁS, P. R. et al. Alguns parâmetros de viabilidade de espermatozóides equinos colhidos por vagina artificial e por lavagem da cauda do epidídimo. **Archives of Veterinary Science**, v. 11, n. 3, p. 69-74, 2006.

NAING, S. W. et al. Effect of sugars on characteristics of Boer goat semen after cryopreservation. **Animal Reproduction Science**, v. 122, n. 1, p. 23-28, 2010.

NAZIR, G. et al. Improvement of conception rate in postpartum flaxseed supplemented buffalo with Ovsynch+ CIDR protocol. **Animal Reproduction Science**, v. 137, n. 1, p. 15-22, 2013.

NOGUEIRA, B. G. **Características do sêmen equino refrigerado por 72 horas com antioxidantes não enzimáticos**. 2015. 68p. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal), Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Mato Grosso do Sul, 2015.

NORDSTOGA, A. B. et al. Fertility results after vaginal deposition of frozen-thawed buck semen diluted with two different extenders using one-or two-step procedures. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 46, n. 1, p. 82-86, 2011.

NOVELLO, D.; POLLONIO, M. A. R.. Caracterização e propriedades da linhaça (*Linum usitatissimum* L.) e subprodutos. **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, v. 29, n. 2, p. 317-330, 2011.

OLIVEIRA, I. R. S. et al. Correlações entre o teste hiposmótico e a avaliação clássica do sêmen de caprinos. **Ciência Animal Brasileira**, v. 14, n. 2, p. 216-221, 2013.

OLIVEIRA, R. V. et al. Avaliação de espermatozoides caprinos congelados em meio à base de água de coco em pó (ACP-101®) ou TRIS. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 63, n. 6, p. 1295-1302, 2011.

PALLA, A. H.; GILANI, A.-H.. Dual effectiveness of flaxseed in constipation and diarrhea: Possible mechanism. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 169, p. 60-68, 2015.

- PENITENTE-FILHO, J. M. et al. Association of vitamin E with rapid thawing on goat semen. **The Scientific World Journal**, v. 2014, p. 1-5, 2014.
- POLGE, C.; SMITH, A.U.; PARKES, A.S. Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures. **Nature**, v. 164, p. 666, 1949.
- POPE, C. E.; ZHANG, Y. Z.; DRESSER, B. L. A simple staining method for evaluating acrosomal status of cat spermatozoa. **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, v. 22, n. 1, p. 87-95, 1991.
- PURDY, P. H. A review on goat sperm cryopreservation. **Small Ruminant Research**, v. 63, n. 3, p. 215-225, 2006.
- QUAN, G. B. et al. Comparison of the effect of various disaccharides on frozen goat spermatozoa. **Biopreservation and Biobanking**, v. 10, n. 5, p. 439-445, 2012.
- RICKARD, S. E.; YUAN, Y. V.; THOMPSON, L. U. Plasma insulin-like growth factor I levels in rats are reduced by dietary supplementation of flaxseed or its lignin secoisolariciresinol diglycoside. **Cancer Letters**, v. 161, n. 1, p. 47-55, 2000.
- ROOF, D. J. et al. Comparison of two commercial extenders for cryopreservation of goat semen without sperm washing. **Theriogenology**, v. 77, n. 2, p. 412-420, 2012.
- SANTOS, A. D. F. et al. Uso de testes complementares para avaliação do congelamento do sêmen de bodes submetidos ao manejo de fotoperíodo artificial. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 35, n. 5, p. 1934-1942, 2006.
- SANTOS, B. M. B. **Criopreservação de sêmen caprino e ovino em diluente de origem vegetal à base de água de coco em pó sem adição de gema de ovo**. 2013. 66p. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias), Faculdade de Veterinária da Universidade Estadual do Ceará, Ceará, 2013.
- SANTOS, V. S. et al. Adição da polpa liofilizada do Noni em diluente para congelação de sêmen sobre a integridade da membrana plasmática de espermatozoides ovinos. **Scientia Plena**, v. 11, n. 4, p. 1-5, 2015.
- SCHMID-LAUSIGK, Y.; AURICH, C.. Influences of a diet supplemented with linseed oil and antioxidants on quality of equine semen after cooling and cryopreservation during winter. **Theriogenology**, v. 81, n. 7, p. 966-973, 2014.
- SERRAINO, M. R.; THOMPSON, L. U.; CUNNANE, S. C. Effect of low level flaxseed supplementation on the fatty acid composition of mammary glands and tumors in rats. **Nutrition Research**, v. 12, n. 6, p. 767-772, 1992.
- SHAFIEI, M. et al. The effect of superoxide dismutase mimetic and catalase on the quality of postthawed goat semen. **Theriogenology**, v. 83, n. 8, p. 1321–1327, 2015.

SILVA, E. C. B.; GUERRA, M. M. P. Sondas fluorescentes: um avanço na avaliação da integridade estrutural e funcional de espermatozoides. **Revista de Ciências Agroveterinárias**, v. 11, n. 2, p. 162-169, 2012.

SILVA, R. O. C. **Efeito da adição de antioxidantes enzimáticos na criopreservação do sêmen caprino**. 2011. 84p. Dissertação (Mestrado em Ciências), Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

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

SINGH, S. et al. Evaluation of anti-inflammatory activity of plant lipids containing alpha-linolenic acid. **Indian Journal of Experimental Biology**, v. 46, n. 6, p. 453-456, 2008.

SIQUEIRA, J. B. al. Relação da taxa de gestação com sêmen bovino congelado e testes de avaliação espermática *in vitro*. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 36, n. 2, p. 387-395, 2007.

SOARES, A. T. et al. Espermatozoides caprinos criopreservados em meio à base de leite desnatado acrescido de glutathione reduzida. **Ciência Rural**, v. 41, n. 11, p. 1991-1997, 2011.

SOUZA, R. S. **Perfil metabólico, qualidade e congelabilidade seminal de reprodutores caprinos suplementados com semente de linhaça (*Linum usitatissimum*) na dieta**. 2013. 152p. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal), Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Bahia, 2013.

Tabela Brasileira de Composição de Alimentos - TACO. 4ed. Campinas, SP: NEPA-UNICAMP, p.161, 2011.

TOWHIDI, A.; PARKS, J. E. Effect of n-3 fatty acids and α -tocopherol on post-thaw parameters and fatty acid composition of bovine sperm. **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**, v. 29, n. 10, p. 1051-1056, 2012.

TOWHIDI, A. et al. Combined n-3 fatty acids and α -tocopherol supplementation improved the ovine sperm cryosurvival. **Iranian Journal of Biotechnology**, v. 11, n. 4, p. 238-243, 2013.

TRUAN, J. S.; CHEN, J.- M.; THOMPSON, L. U. Flaxseed oil reduces the growth of human breast tumors (MCF-7) at high levels of circulating estrogen. **Molecular Nutrition & Food Research**, v. 54, n. 10, p. 1414-1421, 2010.

ÜSTÜNER, B. et al. Effect of freezing rate on goat sperm morphology and DNA integrity. **Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences**, v. 39, n. 1, p. 110-114, 2015.

VIDIGAL, K. F. **Integridade e funcionalidade da membrana plasmática, acrossomo e mitocôndrias espermáticas em caprinos segundo a conformação escrotal**. 2008. 77p. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal), Universidade Federal do Piauí, Piauí, 2008.

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

CAPÍTULO 1

ÓLEO DE LINHAÇA DOURADA (*Linum usitatissimum* L.) NO DILUIDOR PARA CRIOPRESERVAÇÃO DE SEMEN CAPRINO¹

¹Artigo a ser submetido ao comitê editorial do periódico científico Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia.

1 **Óleo de linhaça dourada (*Linum usitatissimum* L.) no diluidor para**
2 **criopreservação de sêmen caprino**

3
4 Golden flaxseed oil (*Linum usitatissimum* L.) in extender for cryopreservation of goat
5 semen

6
7 Mérole Souza Ferreira da Silva^{1*}; Larissa Pires Barbosa¹; Rosileia Silva Souza¹; William
8 Morais Machado¹; Emmanuel Emydio Gomes Pinheiro²; Maicon Pereira Lents¹; Ronival
9 Dias Lima de Jesus¹; Daniel Macedo Cavalcante¹

10
11 ¹Universidade Federal do Recôncavo da Bahia – UFRB, Cruz das Almas - Bahia.

12 ²Universidade Federal da Bahia – UFBA, Salvador - Bahia.

13 *Autor para correspondência. E-mail: meroleferreira@hotmail.com

14
15 **RESUMO**

16
17 O estudo teve como objetivo avaliar o efeito da inclusão de óleo de linhaça
18 dourada no diluidor para criopreservação de sêmen caprino. Foram utilizados
19 quatro machos da raça Anglo Nubiana, com idade média de 4,25±1,19 anos e
20 peso médio de 59,75±7,94Kg, criados em sistema semi-intensivo. Coletas de
21 sêmen foram realizadas duas vezes por semana, pelo método de vagina artificial,
22 utilizando-se uma fêmea estroginizada como manequim. Os ejaculados foram
23 avaliados quanto aos aspectos físicos e morfológicos para formação de um
24 “pool”, sendo fracionados em cinco tratamentos (T): T1 (controle negativo):
25 diluidor Citrato-gema; T2 (controle positivo): Citrato-gema + 1% de lauril sulfato de
26 sódio e T3, T4 e T5: Citrato-gema + 1% de lauril sulfato de sódio, acrescido de
27 0,13g; 0,29g e 0,45g de óleo de linhaça dourada, respectivamente. O sêmen foi
28 criopreservado em máquina de congelação TK 3000® utilizando a curva para
29 caprinos (P4S2) e descongelado a 37°C por 30 segundos. Foram realizadas
30 avaliações físicas do sêmen pós-descongelação e os testes complementares de
31 termorresistência (TTR) por 180 minutos, teste hiposmótico (HO), avaliação da
32 integridade acrossomal, da atividade mitocondrial e análise da compactação da
33 cromatina espermática. Os dados foram avaliados por Análise de Regressão a
34 5% de significância. Não houve diferença para os parâmetros avaliados (P>0,05).

35 Desta forma, a inclusão de até 0,45g de óleo de linhaça no diluidor para
36 criopreservação de sêmen caprino não melhorou a viabilidade espermática após a
37 criopreservação, por isso, sendo desnecessária a sua utilização nas
38 concentrações avaliadas.

39

40 **Palavras-chave:** reprodução, espermatozoide, ômega 3, ácido alfa-linolênico

41

42

43

44

45

46

47

48

49

50

51

52

53

54

55

56

57

58

59

60

61

62

63

64

65

66

67

68

ABSTRACT

69
70
71
72
73
74
75
76
77
78
79
80
81
82
83
84
85
86
87
88
89
90
91
92
93
94
95
96
97
98
99
100
101
102

The study aimed to evaluate the effect of inclusion of golden flaxseed oil in extender for goat semen cryopreservation. Four males of Anglo Nubian were used with an average age of 4.25 ± 1.19 years and average weight of $59.75 \pm 7,94$ Kg, created in semi-intensive system. Semen samples were taken twice a week, by the method of artificial vagina, using a estrogenized female as mannequin. The ejaculates were evaluated about the physical and morphological aspects to forming a "pool", fractionated in five treatments (T): T1 (negative control): extender citrate-yolk; T2 (positive control): yolk-citrate + 1% sodium lauryl sulfate and T3, T4 and T5: yolk-citrate + 1% sodium lauryl sulfate plus 0.13 g; 0.29 g and 0.45 g of golden flaxseed oil, respectively. Semen was cryopreserved in freezing machine TK 3000® using the curve to caprines (P4S2) and thawed at 37 ° C for 30 seconds. They were conducted physical evaluations of post-thaw semen and supplementary tests of heat resistance (TTR) for 180 minutes, hyposmotic test (HO), assessment of acrosome integrity, evaluation of mitochondrial activity and analysis of the spermatic chromatin compaction. The data were evaluated by Regression at 5% significance. There was no difference for the evaluated parameters ($P > 0.05$). In this way, the inclusion of up to 0.45 g of linseed oil in the caprine semen cryopreservation diluter has not improved spermatic viability after cryopreservation, therefore, it is unnecessary use in the concentrations evaluated.

Key-words: reproduction, sperm, omega 3, alpha-linolenic acid

INTRODUÇÃO

103

104

105 A criopreservação do sêmen caprino é uma ferramenta indispensável para
106 otimizar a utilização dessa espécie nos programas de reprodução assistida (Maia,
107 2014). Diversos estudos têm sido conduzidos para aperfeiçoar essa técnica, com
108 o intuito de fornecer subsídios aos espermatozoides para que esses mantenham
109 a qualidade e viabilidade após o processo (Dorado *et al.*, 2010; Küçük *et al.*,
110 2014).

111

112

113

114

115

116

117

Diluidores seminais são utilizados para fornecer energia às células
espermáticas, conferir proteção frente ao decréscimo da temperatura, entre outras
finalidades (Gibbons, 2002). Mesmo com a elaboração e aprimoramento de vários
meios diluidores no decorrer de anos de pesquisas, os valores de motilidade
espermática progressiva e vigor espermático observados após descongelação do
sêmen caprino ainda não são desejáveis e proporcionam a obtenção de baixos
índices de concepção (Roof *et al.*, 2012; Maia, 2014).

118

119

120

121

122

123

124

O principal componente da membrana dos espermatozoides são os lipídios,
a qual é rica em ácidos graxos poli-insaturados (PUFAs), o que a confere fluidez,
sendo essa característica indispensável para que haja motilidade espermática e
consequente fertilização do oócito (Brinsko *et al.*, 2005; Ansari *et al.*, 2012). O
processo de congelação causa lesões na membrana plasmática das células
tornando-as mais susceptíveis ao choque pelo frio (Purdy, 2006; Silva e Guerra,
2011).

125

126

127

128

129

130

Pesquisadores têm suplementado os meios diluidores seminais com fontes
de PUFAs para aumentar a crioresistência das células, e os resultados
observados têm sido incorporação de ácidos graxos à membrana, maior
motilidade e viabilidade espermática pós-descongelação (Ansari *et al.*, 2012;
Towhidi *et al.*, 2013; Kaka *et al.*, 2015). Contudo, ainda não foi determinada a
melhor fonte a ser utilizada, nem o melhor nível de inclusão.

131

132

133

134

135

136

A linhaça possui alto teor de ácidos graxos, especialmente os ácidos
linolênico e linoleico (Tabela Brasileira de Composição de Alimentos, 2011).
Estudos mostram os diversos benefícios desses ácidos sobre os processos
reprodutivos de fêmeas (Nazir, *et al.*, 2013) e machos (Mourvaki *et al.*, 2010). A
suplementação da dieta de machos com linhaça melhora a qualidade espermática
após congelação/descongelação (Moallem *et al.*, 2015). No entanto, pesquisas

137 que relacionem qualidade espermática após criopreservação com adição de
138 linhaça aos meios diluidores seminais ainda não foram realizadas.

139 Diante disso, o presente estudo teve como objetivo avaliar o efeito da
140 inclusão de óleo de linhaça dourada no diluidor para criopreservação de sêmen
141 caprino.

142

143

144

MATERIAL E MÉTODOS

145

146 O estudo foi realizado no Setor de Caprinocultura do Centro de Ciências
147 Agrárias, Ambientais e Biológicas (CCAAB) da Universidade Federal do
148 Recôncavo da Bahia (UFRB), no período compreendido entre dezembro de 2014
149 a janeiro de 2015, na cidade de Cruz das Almas-BA, a qual possui clima quente e
150 úmido (Clima Af de acordo com Köppen e Geiger), uma temperatura média de
151 23,0°C e pluviosidade média anual de 1136 mm (Fonte: CLIMATE-DATA.ORG) e
152 as análises foram realizadas no Laboratório de Reprodução Animal da UFRB. O
153 projeto de pesquisa foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais
154 (CEUA) da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia (UFRB) com o número
155 do processo 23007.006635/2014-60.

156 Foram utilizados quatro machos adultos da raça Anglo Nubiana, com idade
157 média de $4,25 \pm 1,19$ anos e peso médio de $59,75 \pm 7,94$ Kg, com fertilidade
158 comprovada segundo o preconizado pelo CBRA (2013), os quais foram criados
159 em sistema semi-intensivo, recebendo água à vontade, feno de Tifton-85
160 (*Cynodon* sp) e mistura concentrada, formulada segundo o NRC (2007),
161 composta por 85% de farelo de milho, 11% de farelo de soja, 2% de uréia e 2%
162 de sal mineral.

163 As coletas de sêmen foram realizadas duas vezes por semana, pelo método
164 de vagina artificial, utilizando-se uma fêmea estrogenizada como manequim,
165 totalizando cinco ejaculados viáveis por animal. Os ejaculados foram
166 acondicionados em caixa térmica contendo água a 37°C e transportados ao
167 laboratório no período de 5 minutos após a coleta, onde foram acondicionados em
168 banho-maria à 37°C e avaliados quantos aos aspectos físicos e morfológicos:
169 volume do ejaculado (mL); aspecto seminal (1-3); turbilhonamento espermático (0
170 a 5); motilidade espermática progressiva (0 a 100%); vigor espermático (0 a 5) e

171 concentração espermática, que foi mensurada após diluição de 20 μ L de sêmen
172 em formol-salina (ANEXO A) pela contagem das células em câmara de Neubauer,
173 com uso de microscopia óptica sob aumento de 400x, segundo o Colégio
174 Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA, 2013).

175 Para avaliação da morfologia espermática, uma alíquota de 20 μ L de sêmen
176 foi preservada em formol-salina (ANEXO A) (Hancock, 1956), utilizando-se a
177 técnica de preparação úmida sob microscopia de contraste de fase com aumento
178 de 1.000x sob imersão, 200 células foram contadas e avaliadas, sendo feita a
179 proporção de defeitos maiores, menores e totais, segundo CBRA (2013).

180 Os ejaculados que apresentaram aspectos físicos e morfológicos dentro dos
181 valores preconizados pelo CBRA (2013) foram reunidos para formação de um
182 “pool”, e fracionados em cinco alíquotas de 200 μ L, as quais foram diluídas nos
183 tratamentos (T), os quais tiveram como meio base o diluidor Citrato-gema (Mies
184 Filho, 1987) (ANEXO B), sendo T1 (controle negativo): diluidor Citrato-gema; T2
185 (controle positivo): Citrato-gema + 1% de lauril sulfato de sódio e T3, T4 e T5:
186 Citrato-gema + 1% de lauril sulfato de sódio (Soares *et al.*, 2013), acrescido de
187 0,13g; 0,29g e 0,45g/100mL de óleo de linhaça dourada (TIARAJU ®),
188 respectivamente. A definição dos valores de óleo de linhaça testados teve como
189 referência o estudo realizado por Kaeoket *et al.* (2010).

190 A diluição final foi feita para obtenção de uma concentração de 100 milhões
191 de espermatozoides por dose, utilizando palhetas de 0,25mL. Após o envase as
192 palhetas foram seladas e seguiram para o processo de criopreservação em
193 máquina de congelação TK 3000®, utilizando a curva para caprinos (P4S2) que
194 consistiu em duas etapas, sendo a primeira referente à curva positiva
195 (resfriamento a 0,25°C/min até alcançar +5°C iniciando em 32°C) e a segunda à
196 curva negativa, dividida em duas fases: congelamento a partir de +5°C numa
197 velocidade 10°C/min e 5°C/min até atingir -120°C. Com o fim do congelamento as
198 palhetas foram submersas em nitrogênio líquido, acondicionadas em raques e
199 armazenadas em botijão criogênico.

200 Após criopreservação uma palheta de cada tratamento foi descongelada a
201 37°C por 30 segundos, para realização das avaliações físicas do sêmen pós-
202 descongelação quanto aos parâmetros de motilidade espermática progressiva (0
203 a 100%) e vigor espermático (0 a 5), segundo os valores preconizados pelo CBRA
204 (2013) para sêmen criopreservado.

205 O sêmen foi avaliado pelo Teste de Termorresistência (TTR) por 180
206 minutos. Uma palheta de cada tratamento foi descongelada e o sêmen foi
207 transferido para microtubos de polietileno, previamente aquecidos à mesma
208 temperatura, e mantidos em banho-maria a 37°C, as amostras foram cobertas
209 com óleo mineral, e avaliadas nos tempos 0, 5, 60, 120, 180 minutos quanto à
210 motilidade espermática progressiva (0 a 100%) e vigor espermático (0 a 5).

211 Para avaliação da integridade da membrana plasmática foi realizado o Teste
212 Hiposmótico (HO) que consistiu na diluição de uma alíquota de 10µL de sêmen de
213 cada palheta descongelada, em 1mL de solução hiposmótica (100mOsmol/Kg⁻¹)
214 (ANEXO C), e acondicionamento por 30 minutos em banho-maria a 37°C. Para
215 quantificação do HO, 200 células espermáticas foram contadas em microscopia
216 de contraste de fase com aumento de 1.000 vezes sob imersão, e classificadas
217 quanto à presença ou não de cauda dobrada ou enrolada, segundo Kumi-Diaka
218 (1993). O cálculo do número de espermatozoides reativos ao HO foi realizado por
219 meio da fórmula citada por Melo e Henry (1999) $HO\% = (\% \text{ de alterações na}$
220 $\text{região da cauda após o HO}) - (\% \text{ de alterações na região da cauda antes do HO})$.

221 A avaliação da integridade da membrana acrossomal foi realizada pelo
222 método de Cerovsky (1976), com a coloração pelo Vermelho Congo, por meio da
223 preparação de esfregaços seminais com uma alíquota de cada palheta
224 descongelada (ANEXO D). Sob microscopia de luz com aumento de 1.000X em
225 imersão, 200 células foram contadas e classificadas como: 1) acrossoma íntegro;
226 2) acrossoma irregular; 3) desprendimento parcial do acrossoma; 4)
227 desprendimento total do acrossoma.

228 A atividade mitocondrial dos espermatozoides foi avaliada por meio da
229 incubação de 20µL de cada amostra descongelada com 20µL de DAB (1mg/mL
230 de PBS), a 37°C, por 60 minutos na ausência de luz. Após incubação, foram feitos
231 esfregaços, os quais foram fixados em formaldeído a 10% por 10 minutos,
232 lavados em água destilada e secaram ao ar sob proteção de luz. Em microscópio
233 de luz, sob aumento de 1.000 vezes, em imersão, foram avaliados 200
234 espermatozoides por lâmina e classificados segundo Hrudka (1987), de acordo
235 com a deposição do corante na peça intermediária em: classe I (peça
236 intermediária totalmente corada); classe II ($\geq 50\%$ da peça intermediária corada);
237 classe III ($\leq 50\%$ da peça intermediária corada) e classe IV (ausência de
238 coloração da peça intermediária).

239 Para análise da compactação da cromatina espermática utilizou-se o
240 protocolo de Beletti e Mello (2004). Foram confeccionados esfregaços com uma
241 alíquota de cada palheta descongelada, após secagem em temperatura ambiente,
242 os esfregaços foram fixados em solução Carnoys (ANEXO E) durante 1 minuto e,
243 em seguida, em etanol 70%, durante 3 minutos. Realizou-se uma hidrólise com
244 ácido clorídrico 4N por 15 minutos, lavagem em água destilada e secagem em
245 temperatura ambiente. Para coloração dos esfregaços uma gota de solução do
246 corante Azul de Toluidina a 0,025% em tampão Mc Ilvaine, pH 4,0 (ANEXO F), foi
247 depositada entre lâmina e lamínula (Mello, 1982). Foram avaliados 500
248 espermatozoides por lâmina em microscopia de luz, sob objetiva de imersão de
249 100X e classificados quanto: cromatina íntegra (região da cabeça corada em azul
250 claro); cromatina fragmentada (região da cabeça corada em azul escuro ou
251 violeta).

252 Foi utilizado o delineamento inteiramente casualizado (DIC). Os dados foram
253 avaliados quanto à normalidade por meio do teste de Shapiro-Wilk. Apenas a
254 variável “Classe I” do teste de avaliação da atividade mitocondrial apresentou
255 distribuição não-paramétrica, sendo realizado o teste Kruskal Wallis, as demais
256 variáveis apresentaram distribuição normal sendo aplicado o Teste de Regressão
257 a 5% de significância. Foi utilizado o programa SPSS versão 21 (1989 – 2012).

258

259

260

RESULTADOS E DISCUSSÃO

261

262 Não houve diferença ($P>0,05$) entre os tratamentos para motilidade
263 espermática progressiva e vigor espermático pós-descongelação (Mot 0'; Vig 0' –
264 Tab. 1), com média geral de $49,4\pm 9,6\%$ e $2,52\pm 0,56$, respectivamente. Os valores
265 apresentados por todos os tratamentos atenderam ao preconizado pelo CBRA
266 (2013) para sêmen caprino criopreservado, sendo recomendado por esse
267 motilidade espermática progressiva igual ou superior a 30% e vigor espermático
268 igual ou superior a 2, após descongelação. Com isso, observa-se que o meio
269 diluidor utilizado foi eficiente em manter a viabilidade espermática independente
270 dos níveis de óleo de linhaça dourada utilizados como suplementos.

271

272

273 Tabela 1. Motilidade espermática progressiva e vigor espermático no Teste de
 274 Termoresistência do sêmen caprino criopreservado com níveis de óleo de
 275 linhaça dourada no diluidor

Parâmetro	Níveis de óleo de linhaça (g)				
	0 (CN)	0 (CP)	0,13	0,29	0,45
Motilidade (%)					
Sêmen fresco	77,00±5,70	77,00±5,70	77,00±5,70	77,00±5,70	77,00±5,70
Mot 0'	44,00±9,61	45,00±9,35	54,00±8,21	55,00±10,00	49,00±10,83
TTR Mot 5'	47,00±10,95	48,00±10,36	55,00±7,07	53,00±10,36	48,00±8,36
TTR Mot 60'	44,00±11,93	41,00±11,93	47,00±9,08	46,00±12,44	39,00±7,41
TTR Mot 120'	28,00±20,49	21,60±17,61	23,00±20,84	22,60±14,10	19,00±15,16
TTR Mot 180'	9,00±8,21	7,00±10,95	5,10±8,59	7,00±8,36	1,24±2,12
Vigor (0 a 5)					
Sêmen fresco	3,60±0,22	3,60±0,22	3,60±0,22	3,60±0,22	3,60±0,22
Vig 0'	2,50±0,50	2,40±0,65	2,60±0,54	2,60±0,41	2,50±0,70
TTR Vig 5'	2,50±0,35	2,50±0,50	2,70±0,44	2,70±0,44	2,50±0,50
TTR Vig 60'	2,20±0,57	1,90±1,02	2,10±0,82	2,10±0,82	2,00±0,93
TTR Vig 120'	1,30±0,90	1,08±0,94	1,00±0,70	1,24±0,62	0,72±0,54
TTR Vig 180'	0,38±0,39	0,30±0,44	0,22±0,25	0,34±0,42	0,22±0,25

276 CN= Controle Negativo; CP= Controle Positivo; TTR=Teste de Termoresistência; Mot= Motilidade
 277 espermática; Vig= Vigor espermático. Os dados foram analisados por Análise de Regressão a 5%
 278 de probabilidade. Os dados referem-se às médias ± desvio padrão.

279

280 No Teste de Termoresistência (TTR) também não houve diferença ($P>0,05$)
 281 entre os tratamentos para motilidade espermática progressiva e vigor
 282 espermático, nos tempos 5, 60, 120 e 180 minutos (Tab. 1). Contudo, os
 283 resultados mostram que no decorrer do teste a porcentagem de espermatozoides
 284 vivos diminuiu de forma semelhante entre os tratamentos, causando um
 285 decréscimo simultâneo dos valores de motilidade progressiva e vigor espermático
 286 até o final dos 180 minutos.

287 O período de sobrevivência dos espermatozoides incubados *in vitro* em
 288 condições semelhantes as do trato genital das fêmeas a serem inseminadas,

289 pode prever a habilidade fertilizante do sêmen (Santos *et al.*, 2006). As
290 amostras analisadas mantiveram potencial fecundante até os 60 minutos do teste
291 com média geral entre os tratamentos de $43,4 \pm 10,56\%$ e $2,06 \pm 0,83$ para
292 motilidade progressiva e vigor espermático, respectivamente, de acordo com os
293 valores preconizados pelo CBRA (2013) para sêmen caprino pós-descongelção.

294 Pesquisas têm relacionado os danos causados às membranas e organelas
295 celulares durante o processo de criopreservação com a motilidade espermática
296 progressiva e vigor espermático, devido ao comprometimento do
297 reestabelecimento do metabolismo celular normal após descongelção (Silva e
298 Guerra, 2011). A peroxidação lipídica, decorrente do estresse causado às células
299 durante a criopreservação, provoca lesões irreversíveis, as quais alteram a
300 estrutura e permeabilidade das membranas, o que acarreta em perda da fluidez
301 sendo esse fator indispensável para que haja movimento celular e fertilização do
302 oócito (Maia e Bicudo, 2009; Towhidi *et al.*, 2013).

303 Segundo Ansari *et al.* (2012) a adição de 10 ng mL^{-1} de uma fonte de ômega
304 3 ao meio diluidor seminal de caprinos melhorou a motilidade espermática pós
305 descongelção devido a incorporação de ácido docosahexaenoico (DHA) na
306 membrana das células, o qual promoveu proteção aos espermatozoides frente a
307 congelação. No entanto, Kaka *et al.* (2015) encontraram melhores valores para
308 motilidade e vigor espermático trabalhando com 5 ng mL^{-1} de ácido alfa linolênico
309 no diluidor seminal de bovinos.

310 Os níveis de óleo de linhaça dourada adicionados ao meio diluidor citrato-
311 gema não alteraram a resistência espermática, pois não foram eficientes em
312 promover maiores valores de motilidade espermática progressiva e vigor
313 espermático pós-descongelção ou durante o TTR, quando comparados ao
314 tratamento controle. A linhaça é rica em ácidos graxos poli-insaturados (PUFAs),
315 sendo a maior fonte vegetal de ácido linolênico, o qual é precursor do DHA. As
316 concentrações de óleo de linhaça dourada utilizadas como suplemento ao diluidor
317 seminal podem ter sido inferiores as necessárias para fornecer melhor proteção
318 aos espermatozoides e maior fluidez da membrana por meio da incorporação de
319 DHA.

320 Em estudo com sêmen caprino utilizando diluidor á base de água de coco
321 em pó (ACP-101c) acrescido de porcentagens de óleo de coco extravirgem,
322 Santos (2013) obteve melhores resultados de motilidade espermática pós-

323 descongelação ao adicionar 4% de óleo de coco ao meio diluidor. Entretanto, Del
 324 Valle *et al.* (2013) estudando os efeitos de óleos vegetais sobre a congelabilidade
 325 do sêmen de ovinos não encontrou diferença entre o grupo controle e os
 326 tratamentos com a inclusão de 5% de óleo de coco, 5 e 10% de óleo de palma, já
 327 a concentração de 20% do óleo de palma teve efeito prejudicial sobre as células
 328 espermáticas.

329 Não houve diferença ($P>0,05$) entre os tratamentos para a integridade da
 330 membrana plasmática (Tab.2). Os resultados obtidos por meio do Teste HO
 331 mostram que a porcentagem média de células reativas foi de $42,5\pm 12,46\%$, ou
 332 seja, menos de 50% dos espermatozoides de todos os tratamentos apresentaram
 333 membrana plasmática íntegra após congelação/descongelação.

334

335 Tabela 2. Teste Hiposmótico do sêmen caprino criopreservado com níveis de óleo
 336 de linhaça dourada no diluidor

HO (%)	Níveis de óleo de linhaça (g)				
	0 (CN)	0 (CP)	0,13	0,29	0,45
Reativos	41,30±8,17	38,70±15,01	47,90±13,52	41,40±12,65	43,20±12,98
Não reativos	58,70±8,17	61,30±15,01	52,10±13,52	58,60±12,65	56,80±12,98

337 HO= Teste Hiposmótico; CN= Controle Negativo; CP= Controle Positivo. Os dados foram
 338 analisados por Análise de Regressão a 5% de probabilidade. Os dados referem-se às médias \pm
 339 desvio padrão.

340

341 Pesquisas recentes com criopreservação de sêmen caprino em meio diluidor
 342 a base de gema, mostram resultados semelhantes para integridade de membrana
 343 plasmática por meio do HO. Memon *et al.* (2012) obtiveram $58,10\pm 1,53\%$ de
 344 espermatozoides com membrana íntegra, Büyükleblebici *et al.* (2014)
 345 encontraram médias de $48,0\pm 4,39\%$ e $49,9\pm 3,22\%$ de células reativas ao teste
 346 utilizando 3 e 6% de glicerol no diluidor, respectivamente e Salmani *et al.* (2014)
 347 obtiveram $64,9\pm 1,7\%$ de espermatozoides reativos ao HO após descongelação.
 348 Esses resultados sugerem uma média de $55,22\%$ de células espermáticas
 349 reativas ao teste para espécie caprina.

350 A membrana plasmática espermática e o acrossoma são de suma
 351 importância para que haja hiperativação da motilidade, capacitação espermática e
 352 reação acrossomal culminando na fecundação do oócito, podendo-se afirmar que

353 a viabilidade da célula espermática depende da qualidade de suas membranas,
 354 as quais devem apresentar-se fisicamente íntegras e funcionalmente ativas para
 355 que o espermatozoide possua capacidade fecundante (Emerick *et al.*, 2011).

356 Os resultados do teste de integridade acrossomal também não
 357 apresentaram diferença ($P>0,05$) entre os tratamentos (Tab. 3) e a porcentagem
 358 média de espermatozoides com membrana acrossomal íntegra foi de
 359 $36,82\pm 15,45\%$. Corroborando com os resultados do Teste Hiposmótico, o que
 360 demonstra que nos níveis utilizados a inclusão de óleo de linhaça dourada no
 361 diluidor de sêmen caprino não melhora a qualidade morfológica dos
 362 espermatozoides após criopreservação (Fig. 1).

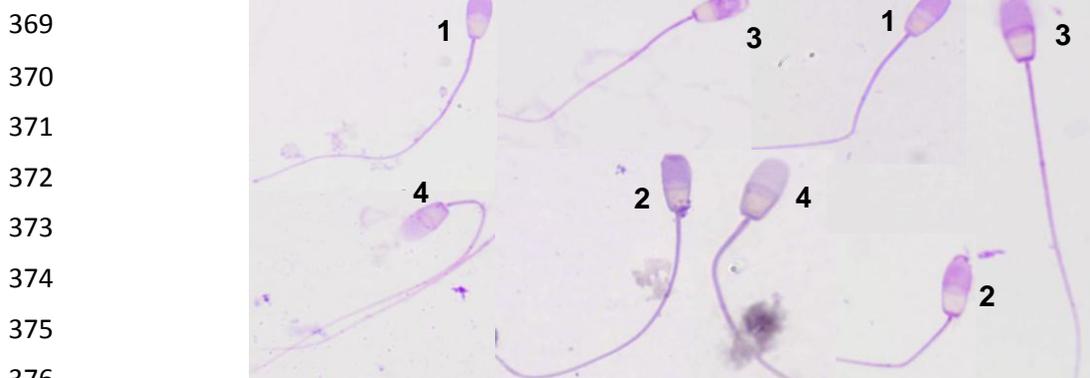
363

364 Tabela 3. Teste de Integridade Acrossomal do sêmen caprino criopreservado com
 365 níveis de óleo de linhaça dourada no diluidor

Acrossoma (%)	Níveis de óleo de linhaça (g)				
	0 (CN)	0 (CP)	0,13	0,29	0,45
Integro	29,60±15,26	38,80±13,07	42,40±25,96	34,90±14,28	38,40±8,71
Irregular	5,80±4,13	6,40±5,53	5,80±3,19	4,40±0,82	3,90±3,00
Desprendimento parcial	35,30±7,85	32,00±10,85	25,70±12,08	37,00±16,81	33,10±9,92
Desprendimento total	29,30±21,31	22,80±8,62	26,10±13,42	23,70±10,22	24,60±13,25

366 CN= Controle Negativo; CP= Controle Positivo. Os dados foram analisados por Análise de
 367 Regressão a 5% de probabilidade. Os dados referem-se às médias \pm desvio padrão.

368



377 Figura 1. Espermatozoides caprinos corados pelo método do Vermelho Congo. 1-
 378 Acrossoma íntegro; 2- Acrossoma irregular; 3- Desprendimento parcial do acrossoma; 4-
 379 Desprendimento total do acrossoma.

380 A técnica de criopreservação provoca, além do estresse térmico, o químico e
381 o mecânico, por meio da exposição das células a soluções crioprotetoras, ao
382 resfriamento, congelação/descongelação, o que pode provocar a formação de
383 poros na membrana plasmática ou até mesmo sua ruptura (Purdy, 2006; Silva e
384 Guerra, 2011). Os valores médios encontrados mostram que a membrana
385 acrossomal dos espermatozoides sofreu diferentes lesões, a média de
386 espermatozoides com acrossoma irregular foi de $5,26 \pm 3,33\%$; com
387 desprendimento parcial do acrossoma de $32,62 \pm 11,50\%$ e com desprendimento
388 total do acrossoma de $25,30 \pm 13,37\%$, contudo não foi encontrada diferença
389 ($P > 0,05$) entre os tratamentos para essas variáveis (Tab. 3).

390 De forma semelhante, Del Valle *et al.* (2013) não obtiveram diferenças nas
391 porcentagens de espermatozoides com membrana plasmática e acrossomal
392 íntegras entre o grupo controle e os tratamentos com a inclusão de óleo de coco e
393 óleo de palma em diluidor de sêmen ovino. Já Kaka *et al.* (2015) encontraram
394 maiores porcentagens de células apresentando membrana plasmática e
395 acrossomal íntegra com adição de 5 ng mL^{-1} de ácido alfa linolênico no diluidor
396 seminal de bovinos.

397 Esperava-se, com a utilização de óleo de linhaça dourada no diluidor,
398 conferir maior qualidade morfológica aos espermatozoides após descongelação,
399 associando a esse resultado a incorporação eficaz de ácidos graxos poli-
400 insaturados, especialmente o DHA, nas membranas espermáticas,
401 proporcionando proteção e aumento da resistência a rupturas, as quais podem
402 ser causadas pela formação de cristais de gelo, peroxidação lipídica, entre outras
403 crioinjúrias.

404 Os danos causados durante a criopreservação podem resultar ainda em
405 alterações intracelulares, como alteração do potencial mitocondrial ou, até
406 mesmo, fragmentação da cromatina espermática (Purdy, 2006; Silva e Guerra,
407 2011). Para obtenção de um prognóstico confiável da qualidade seminal deve-se
408 avaliar várias características espermáticas que relacionem a fertilidade *in vitro*
409 com a fertilidade *in vivo*.

410 Para atividade mitocondrial espermática não houve diferença ($P > 0,05$) entre
411 os tratamentos (Tab. 4), porém os resultados mostram que poucos
412 espermatozoides estavam com todas as mitocôndrias ativas, sendo a mediana
413 geral de espermatozoides classificados em Classe I de $15,60 \pm 11,05\%$; Classe II

414 de $26,70 \pm 13,80\%$; Classe III de $22,10 \pm 15,00\%$ e Classe IV de $35,80 \pm 21,50\%$ (Fig.
415 2).

416

417 Tabela 4. Teste de Atividade Mitocondrial do sêmen caprino criopreservado com
418 níveis de óleo de linhaça dourada no diluidor

Mitocôndria (%)	Níveis de óleo de linhaça (g)				
	0 (CN)	0 (CP)	0,13	0,29	0,45
Classe I	$15,50 \pm 8,50$	$20,00 \pm 10,75$	$16,00 \pm 13,25$	$11,00 \pm 10,25$	$15,50 \pm 12,50$
Classe II	$30,00 \pm 10,25$	$26,50 \pm 18,25$	$22,50 \pm 11,25$	$27,00 \pm 18,50$	$27,50 \pm 10,75$
Classe III	$32,50 \pm 21,00$	$20,00 \pm 12,75$	$23,00 \pm 16,25$	$19,50 \pm 21,00$	$15,50 \pm 4,00$
Classe IV	$23,50 \pm 29,00$	$26,50 \pm 32,75$	$38,50 \pm 16,00$	$47,00 \pm 13,50$	$43,50 \pm 16,25$

419 Classe I= peça intermediária totalmente corada; Classe II= $\geq 50\%$ da peça intermediária corada;
420 Classe III= $\leq 50\%$ da peça intermediária corada e Classe IV= ausência de coloração da peça
421 intermediária. CN= Controle Negativo; CP= Controle Positivo. Os dados apresentaram distribuição
422 não-paramétrica, sendo realizado o teste Kruskal Wallis. Os dados referem-se às medianas \pm
423 interquartil.

424

425

426

427

428

429

430

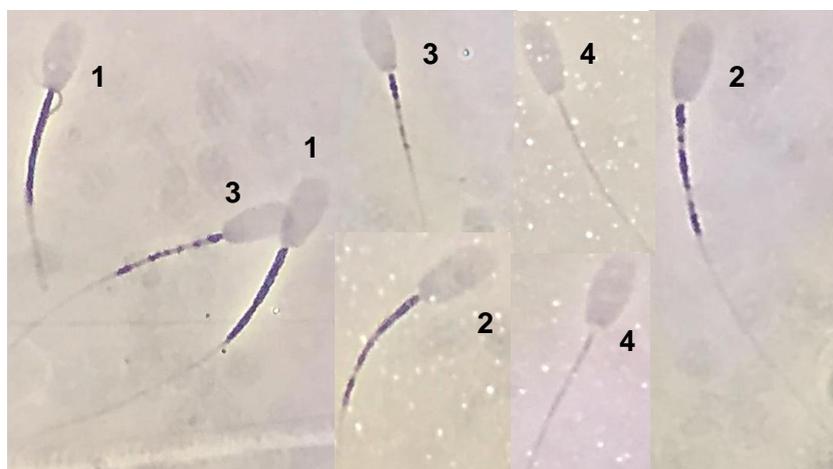
431

432

433

434

435



436 Figura 2. Espermatozoides caprinos corados com DAB. 1- Classe I; 2- Classe II; 3-
437 Classe III; 4- Classe IV.

438

439 Os valores encontrados podem ser relacionados à porcentagem média de
440 espermatozoides com motilidade progressiva pós-descongelção, pois esse
441 processo requer energia o que possui correlação positiva com a produção de ATP
442 nas mitocôndrias, sendo de suma importância que elas estejam íntegras e ativas
443 para que haja movimento celular (Câmara e Guerra, 2008).

444 Por meio de avaliações utilizando sondas fluorescentes, Soares *et al.* (2013)
 445 não obteve melhor potencial mitocondrial espermático ao adicionar ao diluidor
 446 seminal bovino 50, 100 e 150 $\mu\text{M}/100\text{mL}$ de uma fonte de ácido linoleico
 447 conjugado (CLA), porém a adição de 150 μM apresentou efeito negativo sobre as
 448 mitocôndrias dos espermatozoides, diminuindo a sua atividade. Os níveis de óleo
 449 de linhaça dourada testados neste estudo não promoveram diferenças ($P>0,05$)
 450 no potencial mitocondrial espermático, mas também não provocaram uma
 451 diminuição da atividade dessas organelas.

452 O sêmen caprino pode ser classificado como apto a ser utilizado nos
 453 programas de reprodução assistida pelas análises convencionais de motilidade
 454 progressiva e vigor espermático, integridade da membrana plasmática e do
 455 acrossoma e até da atividade mitocondrial, contudo os espermatozoides podem
 456 não ser viáveis devido a alterações no material genético, as quais podem interferir
 457 principalmente no desenvolvimento embrionário, impossibilitando o nascimento de
 458 um descendente viável ou transmitindo mutações gênicas para próxima geração
 459 (Beletti, 2013).

460 Os resultados obtidos por meio da análise da compactação da cromatina
 461 espermática mostraram-se iguais entre os tratamentos ($P>0,05$) (Tab. 5) (Fig. 3).

462

463 Tabela 5. Análise da compactação da cromatina espermática do sêmen caprino
 464 criopreservado com níveis de óleo de linhaça dourada no diluidor

Cromatina (%)	Níveis de óleo de linhaça (g)				
	0 (CN)	0 (CP)	0,13	0,29	0,45
Íntegra	94,44 \pm 2,30	94,20 \pm 2,89	95,28 \pm 2,53	94,20 \pm 3,07	94,40 \pm 2,34
Fragmentada	5,56 \pm 2,30	5,80 \pm 2,89	4,72 \pm 2,53	5,80 \pm 3,07	5,60 \pm 2,34

465 CN= Controle Negativo; CP= Controle Positivo. Os dados foram analisados por Análise de
 466 Regressão a 5% de probabilidade. Os dados referem-se às médias \pm desvio padrão.

467

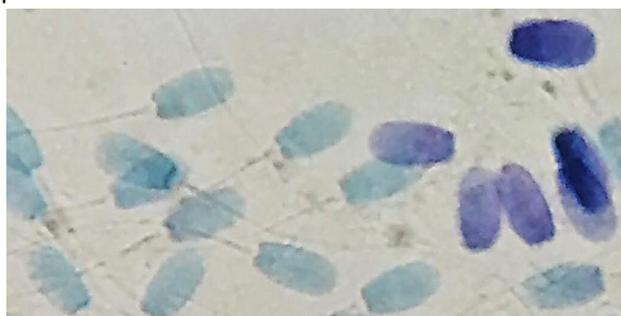
468

469

470

471

472



473 Figura 3. Espermatozoides caprinos corados com azul de toluidina. Cromatina
 474 íntegra (azul claro); Cromatina fragmentada (azul escuro ou violeta).

475 O valor médio de espermatozoides com cromatina altamente compactada foi
476 de $94,50 \pm 2,62\%$, o que demonstra um baixo percentual de células exibindo
477 fragmentação da cromatina ($5,50 \pm 2,63\%$). Essas alterações podem ter ocorrido
478 não somente durante as etapas da criopreservação, como também desde a
479 espermatogênese, tornado o DNA mais vulnerável a lesões irreversíveis durante a
480 congelação/descongelação. Visto que, de acordo com Kamimura *et al.* (2010), no
481 sêmen fresco de caprinos a porcentagem média de espermatozoides exibindo
482 fragmentação da cromatina foi de até $2,40 \pm 0,20$.

483 O diluidor seminal citrato-gema foi eficiente em preservar a integridade do
484 DNA espermático independente dos níveis de óleo de linhaça dourada utilizados
485 como suplemento. Pesquisas que relacionem a integridade da cromatina
486 espermática com a inclusão de fontes de ácidos graxos poli-insaturados
487 inexistem.

488 Os mecanismos exatos pelos quais os lipídios preservam a viabilidade
489 espermática ainda não foram totalmente elucidados, as pesquisas com inclusão
490 de diversas fontes de ácidos graxos nos meios diluidores seminais não exibem
491 um consenso entre os pesquisadores quanto a melhor fonte e o melhor nível a ser
492 utilizado.

493 Kaeoket *et al.* (2010) trabalharam com óleo de peixe nas mesmas
494 concentrações deste estudo (0,13; 0,29 e 0,45g/100mL) no diluidor de sêmen
495 suíno e encontraram maior motilidade progressiva, integridade acrossômica, ou
496 seja, maior viabilidade espermática após criopreservação utilizando a
497 concentração de 0,29g de óleo. Abdi-Benemar *et al.* (2015) adicionaram ao
498 diluidor de sêmen ovino 0,15; 0,30 e 0,45g/100mL de óleo de peixe e obtiveram
499 maior motilidade, integridade de membranas, maior viabilidade espermática após
500 congelação/descongelação com a inclusão de 0,30 e 0,45g, o que foi confirmado,
501 além das avaliações convencionais *in vitro*, por meio das taxas de concepção
502 obtidas pela inseminação artificial de ovelhas.

503 Estudos mostram que alguns óleos vegetais já foram utilizados como fontes
504 de PUFA's no diluidor seminal, como o óleo de palma (Del Valle *et al.*, 2013), óleo
505 de coco (Santos, 2013), contudo o óleo de linhaça ainda não foi estudado sob
506 esse aspecto, com isso o melhor nível a ser utilizado ainda não foi definido.

507 O óleo de linhaça apresenta uma rica e complexa composição e múltiplos
508 benefícios para saúde. No entanto, não houve diferença entre os tratamentos

509 para nenhum dos parâmetros avaliados, demonstrando que os níveis utilizados
510 neste estudo não foram eficientes em promover melhor qualidade e viabilidade
511 espermática após congelação/descongelação, mas também não causaram efeitos
512 deletérios ao sêmen. Dessa forma, faz-se necessária a realização de mais
513 pesquisas que visem avaliar a inclusão de óleo de linhaça em níveis mais
514 elevados no meio diluidor para criopreservação seminal.

515

516

CONCLUSÕES

517

518 A inclusão de até 0,45g/100mL de óleo de linhaça no diluidor para
519 criopreservação de sêmen caprino não melhorou a viabilidade espermática após a
520 criopreservação, por isso, sendo desnecessária a sua utilização nas
521 concentrações avaliadas.

522

523

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

524

525

526 ABDI-BENEMAR, H.; JAFAROGHLI, M.; KHALILI, B. et al. Effects of DHA
527 supplementation of the extender containing egg yolk and α -tocopherol on the
528 freezability and post-thawing fertility of ram semen. Small Ruminant Research,
529 2015.

530

531 ANSARI, M.; TOWHIDI, A.; SHAHRBABA, M. M.; BAHREINI, M.
532 Docosahexaenoic acid and alpha-tocopherol improve sperm cryosurvival in
533 goat. Slovak Journal of Animal Science, v. 45, n. 1, p. 7-13, 2012.

534

535 BELETTI, M. E. Cromatina espermática: quebrando paradigmas. Revista
536 Brasileira de Reprodução Animal, v.37, n.2, p.92-96, 2013.

537

538 BELETTI, M.E.; MELLO, M.L.S. Comparison between the toluidina blue stain and
539 the Feulgen reaction for evaluation of rabbit sperm chromatin condensation and
540 their relationship with sperm morphology. Theriogenology, v.62, p.398-402, 2004.

541

- 542 BRINSKO, S. P.; VARNER, D. D.; LOVE, C. C. et al. Effect of feeding a DHA-
543 enriched nutraceutical on the quality of fresh, cooled and frozen stallion semen.
544 Theriogenology, v. 63, n. 5, p. 1519-1527, 2005.
- 545
- 546 BÜYÜKLEBLEBİCİ, S.; TUNCER, P. B.; TASDEMİR, U. et al. The Comparison of
547 Three Different Cryoprotectants in Cryopreservation of Angora Goat
548 Semen. Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi, v. 20, n. 4, p. 613-619,
549 2014.
- 550
- 551 CÂMARA, D. R.; GUERRA, M. M. P. Mitocôndria espermática: além da síntese de
552 adenosina trifosfato (ATP) Revista Brasileira de Reprodução Animal, v.32, n.2,
553 p.93-99, 2008.
- 554
- 555 CEROVSKY, J.A. A new staining procedure for boar spermatozoa. Zivocisna
556 Vyroba, v. 21, p. 351-362, 1976.
- 557
- 558 CLIMATE-DATA.ORG. Disponível em: <[http://pt.climate-
560 data.org/location/43358/](http://pt.climate-
559 data.org/location/43358/)>. Acesso em: 07 jul. 2015.
- 561 DEL VALLE, I. ; SOUTER, A.; MAXWELL, W.M.C. et al. Function of ram
562 spermatozoa frozen in diluents supplemented with casein and vegetable
563 oils. Animal Reproduction Science, v. 138, n. 3, p. 213-219, 2013.
- 564
- 565 DORADO, J.; MUNÓZ-SERRANO, A.; HIDALGO, M. The effect of
566 cryopreservation on goat semen characteristics related to sperm freezability.
567 Animal Reproduction Science, v. 121, n. 1, p. 115-123, 2010.
- 568
- 569 EMERICK, L. L.; DIAS, J. C.; FILHO, V. R. V. et al. Avaliação da integridade de
570 membrana em espermatozóide bovino criopreservado para prever o índice de
571 prenhez. Ciência Animal Brasileira, v. 12, n. 3, p. 536-546, 2011.
- 572
- 573 GIBBONS, A. Inseminación artificial con semen congelado en cabras de raza
574 Angora. Revista Taurus, v. 16, p. 24-32, 2002.
- 575

- 576 HANCOCK, J.L. The morphology of boar espermatozoa. *Journal of Reproductive*
577 *Microscopy Society*, v. 76, n.3, p.84-97, 1956.
- 578
- 579 HENRY, M.; NEVES, J.P; JOBIM, M.I.M. Manual para exame andrológico e
580 avaliação de sêmen animal. 3. ed. Belo Horizonte: Colégio Brasileiro de
581 Reprodução Animal, 2013, 104p.
- 582
- 583 HRUDKA, F. Cytochemical and ultracytochemical demonstration of cytochrome-c
584 oxidase in spermatozoa and dynamics of changes accompanying ageing or
585 induced by stress. *International Journal of Andrology*, v. 10, n. 6, p. 809-828,
586 1987.
- 587
- 588 KAEOKET, K. ; SANG-URAI, P.; THAMNIYOM, A. et al. Effect of
589 docosahexaenoic acid on quality of cryopreserved boar semen in different
590 breeds. *Reproduction in domestic animals*, v. 45, n. 3, p. 458-463, 2010.
- 591
- 592 KAKA, A.; WAHID, H.; ROSNINA, Y. et al. α -Linolenic acid supplementation in
593 BioXcell® extender can improve the quality of post-cooling and frozen-thawed
594 bovine sperm. *Animal Reproduction Science*, v. 153, p. 1-7, 2015.
- 595
- 596 KAMIMURA, C. F.; JACOMINI, J. O.; BELETTI, M. E. Alterações de cromatina em
597 espermatozóides de ovinos e caprinos avaliadas por azul de toluidina e alaranjado
598 de acridina. *Ciência e Agrotecnologia*, v. 34, n. 1, p. 212-219, 2010.
- 599
- 600 KÜÇÜK, N.; AKSOY, M.; UÇAN, U. et al. Comparison of two different
601 cryopreservation protocols for freezing goat semen. *Cryobiology*, v. 68, n. 3, p.
602 327-331, 2014.
- 603
- 604 KUMI-DIAKA, J. Subjecting canine semen to the hypo-osmotic test.
605 *Theriogenology*, v. 39, n. 6, p. 1279-1289, 1993.
- 606
- 607 MAIA, M. S. Tecnologia de sêmen e inseminação artificial em caprinos. *Acta*
608 *Veterinaria Brasilica*, v.8, Supl. 2, p. 389-395, 2014.
- 609

- 610 MAIA, M. S. Tecnologia do sêmen e inseminação artificial em caprinos e ovinos.
611 Natal: EMPARN, 2010. (EMPARN. Circuito de Tecnologias Adaptadas para a
612 Agricultura Familiar, 7; n. 13). Disponível
613 em:<<http://adcon.rn.gov.br/ACERVO/EMPARN/DOC/DOC000000000024678.PDF>
614 > Acesso em: 02 abr 2015.
- 615
- 616 MAIA, M. S.; BICUDO, S. D. Radicais livres, antioxidantes e função espermática
617 em mamíferos: uma revisão. Revista Brasileira de Reprodução Animal, Belo
618 Horizonte, v. 33, n. 4, p. 183-193, 2009.
- 619
- 620 MELLO, M.L.S. Induced metachromasy in bull spermatozoa. Histochemistry, v.74,
621 n.3, p.387-392, 1982.
- 622
- 623 MELO, M. I. V.; HENRY, M. Teste hiposmótico na avaliação do sêmen equino.
624 Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia, v. 51, n. 1, p. 71-78, 1999.
- 625
- 626 MEMON, A. A.; WAHID, H.; ROSNINA, Y. et al. Effect of antioxidants on post thaw
627 microscopic, oxidative stress parameter and fertility of Boer goat spermatozoa in
628 Tris egg yolk glycerol extender. Animal Reproduction Science, v. 136, n. 1, p. 55-
629 60, 2012.
- 630
- 631 MIES FILHO, A. Inseminação Artificial. Editora Sulina. 6ª ed., v. 2, 750 p., Porto
632 Alegre, 1987.
- 633
- 634 MOALLEM, U.; NETA, N.; ZERON, Y. et al. Dietary α -linolenic acid from flaxseed
635 oil or eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids from fish oil differentially alters
636 fatty acid composition and characteristics of fresh and frozen-thawed bull semen.
637 Theriogenology, v. 83, n. 7, p. 1110-1120, 2015.
- 638
- 639 MOURVAKI, E.; CARDINALI, R.; BOSCO, A. D. et al. Effects of flaxseed dietary
640 supplementation on sperm quality and on lipid composition of sperm subfractions
641 and prostatic granules in rabbit. Theriogenology, v. 73, n. 5, p. 629-637, 2010.
- 642

- 643 NATIONAL RESEARCH COUNCIL – NRC. Nutrient requeriments of small
644 ruminants. 7. ed. Washington: National Academic Press, 2007. 408 p.
645
- 646 NAZIR, G.; GHUMAN, S.P.S.; SINGH, J. et al. Improvement of conception rate in
647 postpartum flaxseed supplemented buffalo with Ovsynch + CIDR protocol. *Animal*
648 *Reproduction Science*, v. 137, n. 1, p. 15-22, 2013.
649
- 650 PURDY, P. H. A review on goat sperm cryopreservation. *Small Ruminant*
651 *Research*, v. 63, n. 3, p. 215-225, 2006.
652
- 653 ROOF, D. J.; BOWLEY, S.; PRICE, L.L.; MATSAS, D.J. Comparison of two
654 commercial extenders for cryopreservation of goat semen without sperm washing.
655 *Theriogenology*, v. 77, n. 2, p. 412-420, 2012.
656
- 657 SALMANI, H.; TOWHIDI, A.; ZHANDI, M. et al. In vitro assessment of soybean
658 lecithin and egg yolk based diluents for cryopreservation of goat
659 semen. *Cryobiology*, v. 68, n. 2, p. 276-280, 2014.
660
- 661 SANTOS, A. D. F.; TORRES, C. A. A.; FONSECA, J. F. et al. Uso de testes
662 complementares para avaliação do congelamento do sêmen de bodes submetidos
663 ao manejo de fotoperíodo artificial. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v. 35, n. 5, p.
664 1934-1942, 2006.
665
- 666 SANTOS, B. M. B. Criopreservação de sêmen caprino e ovino em diluente de
667 origem vegetal à base de água de coco em pó sem adição de gema de ovo. 2013.
668 66p. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias), Faculdade de Veterinária
669 da Universidade Estadual do Ceará, Ceará, 2013.
670
- 671 SILVA, S. V.; GUERRA, M. M. P. Efeitos da criopreservação sobre as células
672 espermáticas e alternativas para redução das crioinjúrias. *Revista Brasileira de*
673 *Reprodução Animal*, v. 35, n. 4, p. 370-384, 2011.
674
- 675 SOARES, M. P.; BRANDELLI, A.; CELEGHINI, E. C. C. et al. Effect of cis-9, trans-
676 11 and trans-10, cis-12 isomers of conjugated linoleic acid on the integrity and

677 functionality of cryopreserved bovine spermatozoa. *Cryobiology*, v. 67, n. 1, p.
678 102-105, 2013.

679

680 Tabela Brasileira de Composição de Alimentos - TACO. 4ed. Campinas, SP:
681 NEPA-UNICAMP, p.161, 2011.

682

683 TOWHIDI, A.; ZEINOALDINI, S.; ARDEBILI, R. et al. Combined n-3 fatty acids and
684 α -tocopherol supplementation improved the ovine sperm cryosurvival. *Iranian*
685 *Journal of Biotechnology*, v. 11, n. 4, p. 238-43, 2013.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A adição do óleo de linhaça dourada no meio diluidor citrato-gema como fonte de ácidos graxos poli-insaturados não melhora a qualidade espermática caprina pós-descongelamento até o nível de 0,45g/100mL de meio, sendo desnecessária a sua utilização nas concentrações avaliadas. Contudo, faz-se necessária a realização de mais pesquisas que visem avaliar a inclusão de níveis mais elevados de óleo de linhaça no diluidor seminal para criopreservação.

ANEXOS

ANEXO A

FORMOL-SALINA 10%

(Manual de Técnicas em Histologia e Biologia Celular do Laboratório de Biologia Celular da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo – USP, 2002)

Formol 36-40%.....	100ml
Cloreto de sódio (NaCl).....	9g
Água destilada	900ml

ANEXO B**DILUIDOR CITRATO-GEMA (MIES FILHO, 1987)****Solução 1:**

Citrato de Sódio.....	2,94g
Água destilada.....	100mL

Solução 2:

Solução 1	73mL
D-Frutose	1g
Sulfato de gentamicina.....	10mg
Gema de ovo.....	20mL
Glicerol.....	7mL

ANEXO C

SOLUÇÃO HIPOOSMÓTICA (100mOsmol/Kg^{-1}) (REVELL; MRODE, 1994)

Frutose.....	9g
Citrato trissódico.....	4,9g
Água destilada.....	1000mL

ANEXO D

COLORAÇÃO PELO VERMELHO CONGO (CEROVSKY, 1976)

(Manual para Exame Andrológico e Avaliação de Sêmen Animal. Colégio Brasileiro de Reprodução Animal. 3ª ed., 2013)

1. Preparar 100mL de solução aquosa saturada de vermelho congo
2. Preparar 100mL de solução aquosa a 0,5% de violeta de genciana

Preparo da lâmina:

- Fazer esfregaço delgado com sêmen fresco e secar no ar;
- Imergir a lâmina na solução de vermelho congo por um minuto;
- Lavar em água corrente suavemente;
- Secar ao ar;
- Imergir na solução de violeta de genciana por 30 segundos
- Lavar em água corrente, suavemente;
- Secar ao ar e avaliar.

ANEXO E**SOLUÇÃO CARNOYS**

(Manual de técnicas em Histologia e Biologia Celular do Laboratório de Biologia Celular da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo – USP, 2002)

Solução 3:1 (100mL)

Álcool 100.....75 mL

Ácido acético.....25 mL

ANEXO F

PREPARAÇÃO DA SOLUÇÃO TAMPÃO DE MCLLVINE (fosfato citrato) (FRADE, 2011)

Para a preparação da solução tampão de Mcllvaine, foram preparadas inicialmente duas soluções distintas, sendo uma de fosfato de sódio dibásico, e outra de ácido cítrico.

A solução aquosa de fosfato de sódio dibásico (Na_2PO_4) foi preparada na concentração de 0,05 M, e para tal dissolveu-se uma massa de 8,907g de Na_2PO_4 em 1 litro de água destilada, sendo verificado, por meio do pHmetro, até a solução possuir um pH de aproximadamente 9.

A solução aquosa de ácido cítrico ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$) foi preparada na concentração de 0,05 M, e para tal dissolveu-se uma massa correspondente a 10,504g de $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$ em 1 litro de água destilada, sendo verificado, por meio do pHmetro, até a solução possuir um pH de aproximadamente 2.

Partindo-se de uma das soluções citadas acima como base, adicionou-se aos poucos a outra solução, até que atingisse o pH desejado, no caso 4,0, o qual foi detectado por meio do pHmetro.

ANEXO G

NORMAS PARA ELABORAÇÃO DA DISSERTAÇÃO DO PROGRAMA DE MESTRADO EM CIÊNCIA ANIMAL

1. FORMATAÇÃO GERAL

Papel A4;

Fonte Arial;

Espaçamento entre linha de 1,5 cm;

Margens:

a) margem esquerda: 3,0 cm

b) margem direita: 2,5 cm

c) margem superior: 2,5 cm

d) margem inferior: 2,5 cm

e) margem superior de página da Introdução, Revisão de Literatura, dos títulos dos capítulos e das Considerações: cinco toques, iniciando a introdução no sexto toque (espaçamento do parágrafo = 1,5)

f) cabeçalho: 1,5 cm

g) rodapé: 1,5 cm

h) tabulação: 1 cm

Numeração das páginas

a) considerar para efeito de paginação, todas as folhas do volume a partir da INTRODUÇÃO;

b) indicar a numeração, seqüencialmente, em algarismos arábicos, no alto e à direita de cada página (formatar o número em **FUNTE ARIAL 12, NEGRITO**);

c) omitir a indicação da numeração nas páginas que contêm informações preliminares, a primeira página da Introdução, Revisão Bibliográfica e das Considerações Finais, as das pré-capas dos Capítulos, as que iniciam os Capítulos (títulos) e as da seção de Anexos;

Da Língua utilizada

Os artigos poderão ser escritos na língua portuguesa ou inglesa.

2. FORMATAÇÃO PRÉ-TEXTUAL

Capa: papel tipo Couche 180g

Conteúdo: Vide modelo

Folha de rosto: vide modelo

Ficha catalográfica: vide modelo

Folha de Aprovação: só deverá ser incluída na versão final (definitiva) da Dissertação, onde será digitado o nome da Comissão Examinadora (vide modelo).

Dedicatória: Página opcional, não deve ultrapassar uma página.

Agradecimentos: Página opcional, máximo de duas páginas.

Sumário: As partes que precedem o Sumário (p.e.: Dedicatória e Agradecimentos) não são relacionadas, enquanto que os Anexos e Apêndices, quando forem necessários, devem ser incluídos no Sumário. O espaçamento é **simples**, justificado (vide anexo).

Resumo e Abstract: devem ser escritos em **uma única página cada um**, com fonte Arial 12, espaçamento 1,5. Devem tratar de forma resumida os conteúdos dos Capítulos. Dois espaços abaixo do título devem ser listado o autor(a) e orientador(a), da seguinte forma. Iniciar o Resumo dois espaços abaixo do nome do orientador, conforme exemplo em anexo.

Na última linha devem ser listadas as **palavras-chave e Key-words**, respectivamente. **Não numerar as páginas do Resumo e do Abstract.**

2. FORMATAÇÃO TEXTUAL

Constituída por Introdução, Revisão de Literatura, Referências Bibliográficas, Capítulos (com sua bibliografia) e Considerações Finais.

Introdução: em caixa alta, no início da página, sem parágrafo, máximo de duas páginas. Dois espaços antes de iniciar o parágrafo.

Revisão de Literatura: em caixa alta, no início da página, sem tabulação. Dois espaços antes de iniciar o parágrafo. Citações Bibliográficas: em todo o texto, as citações deverão ser em caixa baixa.

Referências Bibliográficas: A literatura mencionada nos Itens INTRODUÇÃO e REVISÃO DE LITERATURA deve ser relacionada sob o título de “Referências Bibliográficas”. A lista de referências bibliográficas deve ser ordenada alfabeticamente, obedecendo ao sistema de chamada alfabética, isto é, as citações indicam os documentos pelo sobrenome do autor e ano de publicação. As normas para a citação devem seguir as recomendações da ABNT.

Capítulos.

- a) Antes de começar o artigo, o autor deverá apresentar uma folha indicando o início do Capítulo e que funcionará como uma pré-capa, contendo as informações seguintes: Capítulo 1 (na 1ª linha da página, em caixa alta, arial 13 e em negrito), Título do Artigo (centralizado, caixa alta, arial 12, negrito e espaçamento 1,5 cm) e o periódico científico que irá submeter para publicação (normal, arial 10, espaçamento simples):
- b) Cada Capítulo deverá seguir a formatação de acordo com as normas para submissão de artigos do Periódico Científico escolhido; exceto quanto à FONTE e o ESPAÇAMENTO; assim, independente do periódico, o corpo do texto deverá ser ARIAL 12, ESPAÇAMENTO 1,5.

Considerações finais: em caixa alta, no início da página, sem parágrafo, máximo de uma página. Dois espaços antes de iniciar o parágrafo.

3. FORMATAÇÃO PÓS-TEXTUAL

Anexos: Usar uma folha como pré-capa com o nome ANEXO em negrito e centralizado. Havendo mais de um anexo: Anexo A, Anexo B, entre outros.

Deverá ser anexada as normas da revista de cada capítulo.

ANEXO H

Normas para publicação no periódico científico do Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia.

INSTRUÇÕES AOS AUTORES

Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia (*Brazilian Journal of Veterinary and Animal Sciences*)

Política Editorial

O periódico *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia (Brazilian Journal of Veterinary and Animal Science)*, ISSN 0102-0935 (impresso) e 1678-4162 (on-line), é editado pela FEPMVZ Editora, CNPJ: 16.629.388/0001-24, e destina-se à publicação de artigos científicos sobre temas de medicina veterinária, zootecnia, tecnologia e inspeção de produtos de origem animal, aquacultura e áreas afins.

Os artigos encaminhados para publicação são submetidos à aprovação do Corpo Editorial, com assessoria de especialistas da área (relatores). Os artigos cujos textos necessitarem de revisões ou correções serão devolvidos aos autores. Os aceitos para publicação tornam-se propriedade do Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia (ABMVZ) citado como *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* Os autores são responsáveis pelos conceitos e informações neles contidos. São imprescindíveis originalidade, ineditismo e destinação exclusiva ao ABMVZ.

Reprodução de artigos publicados

A reprodução de qualquer artigo publicado é permitida desde que seja corretamente referenciado. Não é permitido o uso comercial dos resultados.

A submissão e tramitação dos artigos é feita exclusivamente on-line, no endereço eletrônico <www.abmvz.org.br>.

Não serão fornecidas separatas. Os artigos encontram-se disponíveis nos endereços www.scielo.br/abmvz ou www.abmvz.org.br.

Orientação para tramitação de artigos

- Toda a tramitação dos artigos é feita exclusivamente pelo Sistema de publicação on-line do ABMVZ no endereço www.abmvz.org.br.
- Apenas o autor responsável pelo artigo deverá preencher a ficha de submissão, sendo necessário o cadastro do mesmo no Sistema.
- Toda comunicação entre os diversos atores do processo de avaliação e publicação (autores, revisores e editores) será feita exclusivamente de forma eletrônica pelo Sistema, sendo o autor responsável pelo artigo informado, automaticamente, por e-mail, sobre qualquer mudança de status do artigo.
- A submissão só se completa quando anexado o texto do artigo em Word e em pdf no campo apropriado.
- Fotografias, desenhos e gravuras devem ser inseridas no texto e também enviadas, em separado, em arquivo com extensão jpg em alta qualidade (mínimo 300dpi), zipado, inserido no campo próprio.
- Tabelas e gráficos não se enquadram no campo de arquivo zipado, devendo ser inseridas no corpo do artigo.
- É de exclusiva responsabilidade de quem submete o artigo certificar-se de que cada um dos autores tenha conhecimento e concorde com a inclusão de seu nome no mesmo submetido.
- O ABMVZ comunicará, via eletrônica, a cada autor, a sua participação no artigo. Caso pelo menos um dos autores não concorde com sua participação como autor, o artigo será considerado como desistência de um dos autores e sua tramitação encerrada.

Tipos de artigos aceitos para publicação:

▪ Artigo científico

É o relato completo de um trabalho experimental. Baseia-se na premissa de que os resultados são posteriores ao planejamento da pesquisa.

Seções do texto: Título (português e inglês), Autores e Filiação, Resumo, Abstract, Introdução, Material e Métodos, Resultados, Discussão (ou Resultados e Discussão), Conclusões, Agradecimentos (quando houver) e Referências.

O número de páginas não deve exceder a 15, incluindo tabelas e figuras.

O número de Referências não deve exceder a 30.

▪ **Relato de caso**

Contempla principalmente as áreas médicas, em que o resultado é anterior ao interesse de sua divulgação ou a ocorrência dos resultados não é planejada.

Seções do texto: Título (português e inglês), Autores e Filiação, Resumo, Abstract, Introdução, Casuística, Discussão e Conclusões (quando pertinentes), Agradecimentos (quando houver) e Referências.

O número de páginas não deve exceder a 10, incluindo tabelas e figuras.

O número de Referências não deve exceder a 12.

▪ **Comunicação**

É o relato sucinto de resultados parciais de um trabalho experimental, dignos de publicação, embora insuficientes ou inconsistentes para constituírem um artigo científico.

O texto, com título em português e em inglês, Autores e Filiação deve ser compacto, sem distinção das seções do texto especificadas para “Artigo científico”, embora seguindo aquela ordem. Quando a Comunicação for redigida em português deve conter um “Abstract” e quando redigida em inglês deve conter um “Resumo”.

O número de páginas não deve exceder a 8, incluindo tabelas e figuras.

O número de Referências não deve exceder a 12.

Preparação dos textos para publicação

Os artigos devem ser redigidos em português ou inglês, na forma impessoal. Para ortografia em inglês recomenda-se o *Webster's Third New International Dictionary*. Para ortografia em português adota-se o *Vocabulário Ortográfico da Língua Portuguesa*, da Academia Brasileira de Letras.

Formatação do texto

▪ O texto **NÃO** deve conter subitens em qualquer das seções do artigo e deve ser apresentado em Microsoft Word, em formato A4, com margem 3cm (superior, inferior, direita e esquerda), em fonte Times New Roman tamanho 12 e em espaçamento entrelinhas 1,5, em todas as páginas e seções do artigo (do título às referências), com linhas numeradas.

- Não usar rodapé. Referências a empresas e produtos, por exemplo, devem vir, obrigatoriamente, entre parêntesis no corpo do texto na seguinte ordem: nome do produto, substância, empresa e país.

Seções de um artigo

- **Título.** Em português e em inglês. Deve contemplar a essência do artigo e não ultrapassar 150 dígitos.
- **Autores e Filiação.** Os nomes dos autores são colocados abaixo do título, com identificação da instituição a que pertencem. O autor para correspondência e seu e-mail devem ser indicados com asterisco.

Nota:

1. o texto do artigo em Word deve conter o nome dos autores e filiação.
 2. o texto do artigo em pdf **NÃO** deve conter o nome dos autores e filiação.
- **Resumo e Abstract.** Deve ser o mesmo apresentado no cadastro contendo até 2000 dígitos incluindo os espaços, em um só parágrafo. Não repetir o título e não acrescentar revisão de literatura. Incluir os principais resultados numéricos, citando-os sem explicá-los, quando for o caso. Cada frase deve conter uma informação. Atenção especial às conclusões.
 - **Palavras-chave e Keywords.** No máximo cinco.
 - **Introdução.** Explicação concisa, na qual são estabelecidos brevemente o problema, sua pertinência e relevância e os objetivos do trabalho. Deve conter poucas referências, suficientes para balizá-la.
 - **Material e Métodos.** Citar o desenho experimental, o material envolvido, a descrição dos métodos usados ou referenciar corretamente os métodos já publicados. Nos trabalhos que envolvam animais e/ou organismos geneticamente modificados deverá constar, obrigatoriamente, o número do protocolo de aprovação do Comitê de Bioética e/ou de Biossegurança, quando for o caso.
 - **Resultados.** Apresentar clara e objetivamente os resultados encontrados.
 - **Tabela.** Conjunto de dados alfanuméricos ordenados em linhas e colunas. Usar linhas horizontais na separação dos cabeçalhos e no final da tabela. O título da tabela recebe inicialmente a palavra Tabela, seguida pelo número de ordem em algarismo arábico e ponto (ex.: Tabela 1.). No texto a tabela deve ser referida como Tab seguida de ponto e do número de ordem (ex.: Tab. 1), mesmo quando

se referir a várias tabelas (ex.: Tab. 1, 2 e 3). Pode ser apresentada em espaçamento simples e fonte de tamanho menor que 12 (o menor tamanho aceito é 8). A legenda da Tabela deve conter apenas o indispensável para o seu entendimento. As tabelas devem ser, obrigatoriamente, inseridas no corpo do texto preferencialmente após a sua primeira citação.

- **Figura.** Compreende qualquer ilustração que apresente linhas e pontos: desenho, fotografia, gráfico, fluxograma, esquema, etc. A legenda recebe inicialmente a palavra Figura, seguida do número de ordem em algarismo arábico e ponto (ex.: Figura 1.) e é referida no texto como Fig seguida de ponto e do número de ordem (ex.: Fig.1), mesmo se referir a mais de uma figura (ex.: Fig. 1, 2 e 3). Além de inseridas no corpo do texto, fotografias e desenhos devem também ser enviadas no formato jpg com alta qualidade, em um arquivo zipado, anexado no campo próprio de submissão na tela de registro do artigo. As figuras devem ser, obrigatoriamente, inseridas no corpo do texto preferencialmente após a sua primeira citação.

Nota:

- Toda tabela e/ou figura que já tenha sido publicada deve conter, abaixo da legenda, informação sobre a fonte (autor, autorização de uso, data) e a correspondente referência deve figurar nas Referências.
- **Discussão.** Discutir somente os resultados obtidos no trabalho. (Obs.: As seções Resultados e Discussão poderão ser apresentadas em conjunto a juízo do autor, sem prejudicar qualquer das partes e sem subitens).
- **Conclusões.** As conclusões devem apoiar-se nos resultados da pesquisa executada e serem apresentadas de forma objetiva, **SEM** revisão de literatura, discussão, repetição de resultados e especulações.
- **Agradecimentos.** Não obrigatório. Devem ser concisamente expressados.
- **Referências.** As referências devem ser relacionadas em ordem alfabética, dando-se preferência a artigos publicados em revistas nacionais e internacionais, indexadas. Livros e teses devem ser referenciados o mínimo possível, portanto, somente quando indispensáveis. São adotadas as normas gerais ABNT, **adaptadas** para o ABMVZ conforme exemplos:

Como referenciar:

1. Citações no texto

- A indicação da fonte entre parênteses sucede à citação para evitar interrupção na sequência do texto, conforme exemplos:
 - ✓ autoria única: (Silva, 1971) ou Silva (1971); (Anuário..., 1987/88) ou Anuário... (1987/88)
 - ✓ dois autores: (Lopes e Moreno, 1974) ou Lopes e Moreno (1974)
 - ✓ mais de dois autores: (Ferguson *et al.*, 1979) ou Ferguson *et al.* (1979)
 - ✓ mais de um artigo citado: Dunne (1967); Silva (1971); Ferguson *et al.* (1979) ou (Dunne, 1967; Silva, 1971; Ferguson *et al.*, 1979), sempre em ordem cronológica ascendente e alfabética de autores para artigos do mesmo ano.

- *Citação de citação*. Todo esforço deve ser empreendido para se consultar o documento original. Em situações excepcionais pode-se reproduzir a informação já citada por outros autores. No texto, citar o sobrenome do autor do documento não consultado com o ano de publicação, seguido da expressão **citado por** e o sobrenome do autor e ano do documento consultado. Nas Referências, deve-se incluir apenas a fonte consultada.

- *Comunicação pessoal*. Não fazem parte das Referências. Na citação coloca-se o sobrenome do autor, a data da comunicação, nome da Instituição à qual o autor é vinculado.

2. Periódicos (até 4 autores, citar todos. Acima de 4 autores citar 3 autores *et al.*):

ANUÁRIO ESTATÍSTICO DO BRASIL. v.48, p.351, 1987-88.

FERGUSON, J.A.; REEVES, W.C.; HARDY, J.L. Studies on immunity to alphaviruses in foals. *Am. J. Vet. Res.*, v.40, p.5-10, 1979.

HOLENWEGER, J.A.; TAGLE, R.; WASERMAN, A. et al. Anestesia general del canino. *Not. Med. Vet.*, n.1, p.13-20, 1984.

3. Publicação avulsa (até 4 autores, citar todos. Acima de 4 autores citar 3 autores *et al.*):

DUNNE, H.W. (Ed). Enfermedades del cerdo. México: UTEHA, 1967. 981p.

LOPES, C.A.M.; MORENO, G. Aspectos bacteriológicos de ostras, mariscos e mexilhões. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, 14., 1974, São Paulo. *Anais...* São Paulo: [s.n.] 1974. p.97. (Resumo).

MORRIL, C.C. Infecciones por clostridios. In: DUNNE, H.W. (Ed). Enfermedades del cerdo. México: UTEHA, 1967. p.400-415.

NUTRIENT requirements of swine. 6.ed. Washington: National Academy of Sciences, 1968. 69p.

SOUZA, C.F.A. *Produtividade, qualidade e rendimentos de carcaça e de carne em bovinos de corte*. 1999. 44f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

4. Documentos eletrônicos (até 4 autores, citar todos. Acima de 4 autores citar 3 autores *et al.*):

QUALITY food from animals for a global market. Washington: Association of American Veterinary Medical College, 1995. Disponível em: <<http://www.org/critca16.htm>>. Acessado em: 27 abr. 2000.

JONHNSON, T. Indigenous people are now more combative, organized. Miami Herald, 1994. Disponível em: <<http://www.summit.fiu.edu/MiamiHerld-Summit-RelatedArticles/>>. Acessado em: 5 dez. 1994.

Nota:

- Artigos que não estejam rigorosamente dentro das normas acima não serão aceitos para avaliação.
- O Sistema reconhece, automaticamente, como “Desistência do Autor” artigos em diligência e/ou “Aguardando liberação do autor”, que não tenha sido respondido no prazo dado pelo Sistema.

Taxas de submissão e de publicação:

- **Taxa de submissão.** A taxa de submissão de R\$50,00 deverá ser paga por meio de boleto bancário emitido pelo sistema eletrônico de submissão de artigos. Ao solicitar o boleto bancário, o autor informará os dados para emissão da nota fiscal. Somente artigos com taxa paga de submissão serão avaliados. Caso a taxa não seja quitada em até 30 dias será considerado como desistência do autor.
- **Taxa de publicação.** A taxa de publicação de R\$150,00, por página, por ocasião da prova final do artigo. A taxa de publicação deverá ser paga por meio de boleto bancário emitido pelo sistema eletrônico de submissão de artigos. Ao solicitar o boleto bancário, o autor informará os dados para emissão da nota fiscal.

Recursos e diligências:

- No caso de o autor encaminhar resposta a diligências solicitadas pelo ABMVZ, ou documento de recurso, o mesmo deverá constar como a(s) primeira(s) página(s) do texto do artigo somente na versão em Word.
- No caso de artigo não aceito, se o autor julgar pertinente encaminhar recurso, o mesmo deve ser feito pelo e-mail abmvz.artigo@abmvz.org.br.