

**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 ÁCIDO DOCOSAHEXAENOICO NO MEIO
DILUIDOR**

Caline Santana da França

**CRUZ DAS ALMAS - BAHIA
2019**

CRIOPRESERVAÇÃO DE SÊMEN CAPRINO COM INCLUSÃO DE ÁCIDO DOCOSAHEXAENOICO NO MEIO DILUIDOR

Caline Santana da França

Médica Veterinária

Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, 2016.2

Dissertação apresentada ao Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, como requisito parcial para a obtenção do Título de Mestre em Ciência Animal em Produção e Manejo de Ruminantes.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Larissa Pires Barbosa

Co-orientadora: Prof^a. Dr^a Ana Lúcia Almeida Santana

**CRUZ DAS ALMAS - BAHIA
2019**

FICHA CATALOGRÁFICA

F814c	<p data-bbox="635 1391 1252 1536">França, Caline Santana da. Criopreservação de sêmen caprino com inclusão de ácido docosahexaenoico no meio diluidor / Caline Santana da França._ Cruz das Almas, BA, 2019. 69f.; il.</p> <p data-bbox="679 1563 1150 1619">Orientadora: Larissa Pires Barbosa. Coorientadora: Ana Lúcia Almeida Santana.</p> <p data-bbox="635 1646 1252 1727">Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Centro de Ciências Agrárias Ambientais e Biológicas.</p> <p data-bbox="635 1753 1252 1865">1.Caprino – Reprodução animal. 2.Caprino – Criopreservação. 3.Ômega-3 – Avaliação. I.Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas. II.Título.</p> <p data-bbox="1015 1892 1198 1924">CDD: 636.39082</p>
-------	--

Ficha elaborada pela Biblioteca Universitária de Cruz das Almas – UFRB.
Responsável pela Elaboração – Antonio Marcos Sarmiento das Chagas (Bibliotecário – CRB5 / 1615).
Os dados para catalogação foram enviados pela usuária via formulário eletrônico.

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

**CRIOPRESERVAÇÃO DE SÊMEN CAPRINO COM INCLUSÃO DE
ÁCIDO DOCOSAHEXAENOICO NO MEIO DILUIDOR**

Comissão Examinadora:
Caline Santana da França

Prof^a. Dr^a. Larissa Pires Barbosa
Universidade Federal do Recôncavo da Bahia
Orientadora

Prof^a. Dr^a. Ana Karina da Silva Cavalcante
Universidade Federal do Recôncavo da Bahia
Examinador Externo

Dr^a. Rosileia Silva Souza
Universidade Federal do Recôncavo da Bahia
Examinador Externo

**Cruz das Almas - BAHIA
2019**

AGRADECIMENTOS

À Deus por me conceder mais esse presente, por não me deixar desistir e colocar pessoas amigas quando achei que não conseguiria mais caminhar. Eu te agradeço Pai, por teu amor infinito, eu não sou digna de tanto. EU TE AMO!

À minha família pelo incentivo e apoio, por vibrar a cada conquista minha, pelo amor e orações, imprescindíveis para realização dos meus sonhos. OBRIGADA!

Ao meu namorado Geanluca, pelo incentivo, por aquele abraço apertado que me trazia conforto quando estava cansada e precisava recarregar as energias. Obrigada meu bem!

À minha orientadora, Dr^a Larissa Pires Barbosa, por toda paciência, incentivo, apoio, carinho, atenção e compreensão. Obrigada prof. por acreditar em mim, mesmo eu achando que não seria capaz.

À minha co-orientadora, Dr^a Ana Lúcia Almeida Santana. A gratidão é um sentimento muito bonito, e é o que sinto quando me vêm a memória, além de um carinho tão grande que me emociona, você foi um anjo que Deus nos enviou para fazer parte das nossas vidas, falo em nome de toda família NERA, nós fomos muito felizes em ter convivido e aprendido tanto em tão pouco tempo. Obrigada Aninha, sua ajuda foi fundamental!

Ao professor, Dr. Rodrigo Bittencourt foi primordial para realização do experimento. A Dr^a Paola Snoeck por ceder o laboratório para realização dos testes complementares.

Ao meu grande amigo William, muito obrigada por cada palavra de conforto, incentivo e ajuda nos testes complementares, você é especial! Te amo!

Ao grupo NERA, essa realização só foi possível graças a ajuda, força e garra de vocês. Tenho lembranças lindas de cada etapa desse experimento, dos sorrisos, resenhas, tombos, Poliana que o diga rrsrrsrs, foram três, mas sei que os meus ficarão na história rrsrrs. Rone e Lai, obrigada por me receber em sua casa para agilizar os testes complementares, além de toda ajuda, muito obrigada por tudo que fizeram por mim.

À Claudinéia e Bianor, sou muito grata! Obrigada por permitir que esse experimento fosse realizado na BANTU agropecuária. Tenho um carinho muito especial por vocês. Cau você foi essencial!

Aos meus amigos do mestrado, Thaís, Laiza, Dedel, Carla, Géssica, foi muito bom compartilhar todas as emoções do mestrado com vocês.

À CAPES pela concessão da bolsa de mestrado!

Enfim, sou grata a tudo que Deus me confiou. Meus sinceros agradecimentos a todos que contribuiriam direta ou indiretamente nessa caminhada.

CRIOPRESERVAÇÃO DE SÊMEN CAPRINO COM INCLUSÃO DE ÁCIDO DOCOSAHEXAENOICO NO MEIO DILUIDOR

RESUMO: O estudo teve como objetivo avaliar o efeito e determinar o melhor nível de inclusão de ácido docosahexaenoico no diluidor para criopreservação de sêmen caprino. O experimento foi realizado na cidade de Itaberaba - Bahia, no período de abril a maio de 2018. Foram utilizados cinco machos sexualmente maduros submetidos à coleta de sêmen pela técnica da vagina artificial, com intervalo de vinte e quatro horas entre as coletas, totalizando 10 coletas viáveis por animal. Após avaliação dos aspectos físicos dos ejaculados, estes foram agrupados para formação de um *pool*, seguido do fracionamento em quatro alíquotas diluídas em meio Tris gema contendo níveis de ácido docosahexaenoico, sendo: 0; 30; 45 e 60ng.mL⁻¹, acrescido de 0,4mmol de alfa-tocoferol, ambos diluídos em uma solução de 0,05% de etanol. Foi utilizado um delineamento inteiramente casualizado. Após diluição com concentração final de 150x10⁶ espermatozoides por dose, o sêmen foi envasado em palhetas de 0,25mL e criopreservado em máquina de criopreservação (TK 3000®). Palhetas de cada tratamento foram descongeladas a 37°C por 30 segundos, para a realização das avaliações físicas de motilidade e vigor pós-descongelamento e dos testes complementares para avaliação da: cinética espermática por meio do (*Computer-assisted semen analysis* – CASA); integridade funcional de membrana plasmática, pelo teste hiposmótico; integridade das membranas plasmáticas e acrossomal, por meio de sondas de epifluorescência; atividade mitocondrial e compactação de cromatina. Os dados foram avaliados quanto a normalidade pelo teste de Shapiro-Wilk, para variáveis que apresentaram distribuição normal, os dados foram submetidos à Análise de Variância e Teste de Regressão, e para as variáveis que não apresentaram distribuição normal, os dados foram avaliados pelo teste Kruskal Wallis, adotando nível de significância de 5%. Não houve diferença para motilidade espermática progressiva (51,48±7,81%) e vigor espermático (2,10±0,64) pós-descongelamento. Não houve diferença para os parâmetros de cinética espermática CASA: MT (79,17±17,31%), MP (14,04±5,73%), VCL (58,82±6,35µm/s), VSL (22,49±3,63µm/s), VAP (35,17±4,52µm/s), LIN (38,69±5,79%), STR (63,99±6,64%), WOB (59,68±2,99%); HOST reativos (69,66±9,76%) e não reativos (30,01±8,66%); integridade de membrana plasmática e acrossomal por CFDA/IP: íntegros (29,86±7,57%), lesados (48,39±7,95%) e semilesados (21,74±7,46); potencial mitocondrial: Classe I (72,75±9,81%), Classe II (10,93±4,64%), Classe III (9,83±5,11%) e Classe IV (6,46±7,25%); compactação de cromatina íntegra (96,87±4,37%) e fragmentada (2,95±2,40%). Concluiu-se que a inclusão de até 60ng.mL⁻¹ de ácido docosahexaenoico não promoveu melhora nos parâmetros de qualidade seminal de caprinos pós-descongelamento, no entanto a sua toxicidade não foi constatada.

Palavras chave: CASA; Espermatozoides; Lipídios; Membrana plasmática; Ômega 3

CRYOPRESERVATION OF CAPPINE SEMEN WITH INCLUSION OF DOCOSAHEXAENOIC ACID IN THE MEDIUM DILUIDER

ABSTRACT: The objective of this study was to evaluate the effect and to determine the best level of inclusion of docosahexaenoic acid in the diluent for cryopreservation of goat semen. The experiment was carried out in the city of Itaberaba, Bahia, from April to May 2018. Five sexually mature males were submitted to semen collection using the artificial vagina technique, with a twenty four hour interval between collections, totaling 10 viable collections per animal. After evaluation of the physical aspects of the ejaculates, these were pooled to form a pool, followed by fractionation in four aliquots diluted in Tris gem medium containing docosahexaenoic acid levels, being: 0; 30; 45 and 60ng.mL⁻¹, plus 0.4 mmol of alpha-tocopherol, both diluted in a 0.05% ethanol solution. A completely randomized design was used. After dilution with final concentration of 150x10⁶ spermatozoa per dose, the semen was filled in 0.25mL vane and cryopreserved in a cryopreservation machine (TK 3000®). Reeds of each treatment were thawed at 37°C for 30 seconds to perform the physical evaluations of post-thawing motility and vigor and complementary tests to evaluate the sperm kinetics through the Computer-assisted semen analysis (CASA); functional integrity of the plasma membrane by the hyposmotic test; integrity of plasma and acrosomal membranes by means of epifluorescence probes; mitochondrial activity and chromatin compaction. The data were evaluated for normality by the Shapiro-Wilk test, for variables that presented normal distribution, the data were submitted to Analysis of Variance and Regression Test, and for the variables that did not present normal distribution, the data were evaluated by the test Kruskal Wallis, adopting a significance level of 5%. There was no difference for progressive sperm motility (51.48 ± 7.81%) and sperm vigor (2.10 ± 0.64) after thawing. There were no differences in the parameters of spermatozoa CASA: MT (79.17 ± 17.31%), MP (14.04 ± 5.73%), VCL (58.82 ± 6.35 μm / s), VSL), VAP (35.17 ± 4.52μm / s), LIN (38.69 ± 5.79%), STR (63.99 ± 6.64%), WOB (22.49 ± 3.63μm / 59.68 ± 2.99%); Reactive HOST (69.66 ± 9.76%) and non-reactive HOST (30.01 ± 8.66%); Plasma and acrosomal membrane integrity by CFDA / IP: intact (29.86 ± 7.57%), damaged (48.39 ± 7.95%) and semiluted (21.74 ± 7.46); mitochondrial potential: Class I (72,75 ± 9,81%), Class II (10,93 ± 4,64%), Class III (9,83 ± 5,11%) and Class IV (6,46 ± 7%). , 25%); compaction of whole chromatin (96.87 ± 4.37%) and fragmented (2.95 ± 2.40%). It was concluded that the inclusion of up to 60ng.mL⁻¹ of docosahexaenoic acid did not promote improvement in seminal quality parameters of post-thawing goats, however their toxicity was not confirmed.

Key words: Freezing; Lipids; Plasma membrane; Spermatozoa; Omega 3

LISTA DE FIGURA - CAPÍTULO 1

- Figura 1 - Espermatozoides de caprinos submetidos ao Teste Hiposmótico. 1 - Membrana plasmática íntegra; 2 – Membrana plasmática lesionada..... 40
- Figura 2 - Espermatozoides de caprinos submetidos ao Teste de integridade de membrana plasmática e acrossomal por meio de epifluorescência CFDA/IP 1 – Membrana plasmática e acrossomal íntegra; 2 – Membrana plasmática e acrossomal lesionada; 3 – Membrana plasmática lesionada e acrossomal íntegra 42
- Figura 3 - Espermatozoides de caprinos corados com 3,3'- diaminobenzidine (DAB) para avaliação da atividade mitocondrial. 1 - classe I; 2 - classe II; 3 - classe III; 4 - classe IV 43

LISTA DE TABELAS - CAPÍTULO 1

- Tabela 1 - Motilidade espermática progressiva e vigor espermático pós-descongelamento no Teste de Termorresistência (TTR) do sêmen de caprinos criopreservado com níveis de DHA no diluidor..... 37
- Tabela 2 - Valores de cinética espermática avaliadas no sistema computadorizado de análise do movimento espermático - CASA do sêmen de caprinos criopreservado com níveis de ácido docosahexaenoico (DHA) no diluidor 38
- Tabela 3 -Teste Hiposmótico do sêmen de caprinos criopreservado com níveis de ácido docosahexaenoico (DHA) no diluidor..... 41
- Tabela 4 - Resultados das análises pós descongelamento referentes a integridade de membrana plasmática e acrossomal, após avaliação pela epifluorescência CFDA/IP 41
- Tabela 5 - Teste de atividade mitocondrial do sêmen de caprinos criopreservado com níveis de ácido docosahexaenoico (DHA) no diluidor 43
- Tabela 6 - Análise da compactação da cromatina espermática do sêmen de caprinos criopreservado com níveis de ácido docosahexaenoico (DHA) no diluidor 44

LISTA DE ABREVIÇÕES

μM	Micromolar
μL	Microlitro
%	Porcentagem
$^{\circ}\text{C}$	Graus Celsius
ANOVA	Análise de variância
ATP	Adenosina Trifosfato
CASA	Computer-assisted Sperm Analysis – Análise espermática assistida por computador
CBRA	Colégio Brasileiro de Reprodução Animal
CFDA	Diacetato de carboxifluoresceína
DAB	3,3'- diaminobenzidine
DHA	Ácido docosahexaenoico
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
FITC	Isotiocianato de fluoresceínas
g	Gramas
HOST	Teste Hiposmótico
IP	Iodeto de propídeo
IATF	Iseminação artificial em tempo fixo
LIN	Linearidade
mmol	Milimol
mOmol	Miliosmol
MP	Motilidade progressiva
MT	Motilidade total
PIV	Produção <i>in vitro</i>
PNA	Peanut Agglutinin
PSA	Pisum Sativum Agglutinin
PUFAS	Ácidos graxos poli-insaturados
ROS	Espécies reativas de oxigênio
STR	Retilineariedade
VAP	Velocidade média do trajeto
VCL	Velocidade curvilínea

VSL	Velocidade linear progressiva
WOB	Índice de Oscilação

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	1
2 HIPÓTESE	3
3 OBJETIVOS	4
3.1 Objetivo geral.....	4
3.2 Objetivos específicos.....	4
4.1 Criopreservação seminal em caprinos	5
4.2 Ácidos graxos poli-insaturados na qualidade seminal	8
4.3 Análises espermáticas <i>in vitro</i> pós-descongelamento	11
5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	20
CAPÍTULO 1 – ARTIGO 1	28
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS	50
ANEXOS	51

1 INTRODUÇÃO

A criopreservação do sêmen é uma biotecnologia importante dentro dos programas de reprodução animal e sua eficiência está em manter a integridade funcional das células espermáticas e proporcionar adequadas taxas de fertilidade em protocolos de inseminação artificial (OLIVEIRA *et al.*, 2011). Todavia, o processo de criopreservação seminal induz a ocorrência de crioinjúrias, culminando na diminuição parcial ou total de sua viabilidade e capacidade fecundante, devido aos danos bioquímicos, funcionais e ultraestruturais causados às células espermáticas (LEBOUF *et al.*, 2000).

Os danos causados à membrana plasmática durante o processo de criopreservação ocorrem na fase de transição do seu estado líquido para o estado cristalino. Devido ao resfriamento, ocorrem mudanças na forma estrutural das moléculas de fosfolipídios, as quais impossibilitam a movimentação aleatória das proteínas, resultando em aumento de permeabilidade da membrana e decréscimo da atividade metabólica (AMANN e PICKETT, 1987).

Diante disso, para melhor proteção dos espermatozoides, frente ao processo de criopreservação, tem sido adicionado ao meio diluidor substâncias que possam conferir maior resistência às células espermáticas e assim diminuir os efeitos deletérios do congelamento e descongelamento.

Os lipídios exercem um papel importante nas características de motilidade, fluidez da membrana espermática e capacidade de fertilização. Estudos têm demonstrado que a membrana plasmática espermática contém altos níveis de ácidos graxos poli-insaturados (PUFAs), principalmente ácido docosahexaenoico (DHA), os quais foram relacionados a espermatozoides íntegros e com alta capacidade de fertilidade (BRINSKO *et al.*, 2005).

A inclusão de PUFAs diretamente ao meio diluidor pode ser uma alternativa viável e prática para minimizar as crioinjúrias às células espermáticas. Tem sido proposto que a adição de uma fonte de ácidos graxos poli-insaturados da série ômega 3 ao meio diluidor promove melhorias importantes na qualidade espermática pós-descongelamento, pois a sua incorporação à membrana

plasmática melhora a capacidade de criotolerância, diminuindo os danos causados aos espermatozoides (ANSARI *et al.*, 2012).

Neste contexto, o estudo tem como objetivo avaliar o efeito e determinar o melhor nível de inclusão de DHA, no diluidor, para criopreservação de sêmen caprino.

2 HIPÓTESE

A inclusão de DHA no diluidor para criopreservação de sêmen caprino melhora a sua qualidade pós-descongelamento.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar o efeito e determinar o melhor nível de inclusão de DHA no meio diluidor para criopreservação de sêmen caprino.

3.2 Objetivos específicos

Avaliar a inclusão de níveis de DHA no meio diluidor de sêmen caprino e seus efeitos sobre a motilidade e vigor pós-descongelamento, cinética espermática, avaliar também seus efeitos sobre a integridade das membranas plasmática e acrossomal, bem como, o potencial mitocondrial e danos causados ao DNA.

4 REVISÃO DE LITERATURA

4.1 Criopreservação seminal em caprinos

A criopreservação é uma técnica de armazenamento a longo prazo, para preservar células ou fragmentos de órgãos, dentre eles gametas, embriões ou tecidos gonadais (YON *et al.*, 2016). Com uma série de aplicações clínicas e na pesquisa, contribui para o aumento na produção de animais de alto valor genético; conservação de espécies ameaçadas de extinção, com a formação dos bancos de germoplasma; produção de animais transgênicos; entre outras finalidades (ANDRABI e MAXWELL, 2007; BARBAS e MASCARENHAS, 2009).

Esta técnica viabiliza outras biotecnologias da reprodução, pois permite, por exemplo, no caso de sêmen criopreservado, ser utilizado posteriormente para diversos fins, como na inseminação artificial convencional (IA), inseminação artificial em tempo fixo (IATF), produção de embriões *in vitro* (PIV), que são de grande importância para o melhoramento genético animal (KONYALI *et al.*, 2013).

O processo de criopreservação do sêmen consiste na redução de temperatura, desidratação celular, congelamento e descongelamento do meio extra e intracelular. Danos celulares de diferentes graus são induzidos a cada fase, e o estado funcional das células é comprometido, resultando no acúmulo de lesões ao longo do processo (MEDEIROS *et al.*, 2002).

O choque pelo frio, estresse osmótico e formação de cristais de gelo intracelulares, são alguns dos fatores responsáveis por esses danos (YON *et al.*, 2016). Além disso, numerosos estudos indicam que o congelamento e descongelamento dos espermatozoides desencadeiam a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) (TOWHIDI e PARQUES, 2012; JAFAROGHLI *et al.*, 2014; JAMADI *et al.*, 2017). Segundo Gibb *et al.* (2013), a produção de elevadas concentrações de ROS no sêmen pode afetar o metabolismo energético, a motilidade, a viabilidade e a integridade do DNA dos espermatozoides de várias espécies.

No início do processo de criopreservação o sêmen sai da temperatura ambiente até alcançar a temperatura de 5°C, neste momento a água intra e extracelular permanecem super-refrigerada e não cristaliza. No entanto, na continuação do processo, entre as temperaturas de -5 a -10°C, começam a se formar cristais de gelo no meio extracelular, fazendo com que o meio externo se torne hiperosmótico em relação ao meio intracelular que permanece super-refrigerado, ocorrendo troca de água para manter o equilíbrio entre o meio extracelular e o intracelular, ocasionando a desidratação celular (SOARES e GUERRA, 2009).

A formação de cristais de gelo no espaço extracelular cria um gradiente osmótico entre a solução intracelular inicialmente isotônica e a solução congelada extracelular que se encontra concentrada. Dependendo da velocidade de refrigeração, a água se move através da membrana e se une à fase congelada do meio extracelular, ou irá congelar, formando gelo no interior da célula. Nos casos em que há formação de cristais de gelo intracelular, as células se tornam osmoticamente inativas ou lisadas devido à perda da integridade da membrana (DENVIREDDY *et al.*, 2002). Diante desse contexto, Soares e Guerra (2009) sugeriram que a curva de congelamento deve ser lenta para evitar a formação de gelo intracelular, e rápida o suficiente para não permitir o contato da célula desidratada com o meio hiperosmótico.

A desidratação severa promove desnaturação de macromoléculas e encolhimento excessivo da célula, determinando colapso da membrana (MEDEIROS, 2002). Entretanto, é necessário que ocorra a desidratação celular, pois diminui a probabilidade de formar grandes cristais de gelo, o que causaria danos às estruturas internas e a membrana plasmática (PURDY, 2006).

O processo de criopreservação pode ser feito de forma automatizada, o que permite o controle sobre as taxas de decréscimo da temperatura por meio da utilização de curvas padronizadas para a maioria das espécies domésticas. Estas podem ser programadas, por exemplo, de 4 a -5°C (reduzindo 4°C/min.), de -5 a -110°C (reduzindo 25°C/min) e de -110 a -140°C (reduzindo 35°C/min), quando as palhetas de sêmen podem ser mergulhadas em nitrogênio líquido (PURDY, 2006).

A eficiência da criopreservação do sêmen está relacionada a sua capacidade de manter uma população espermática com integridade funcional e proporcionar adequadas taxas de fertilidade em programas de IA (OLIVEIRA *et al.*, 2011). No entanto, diversas alterações bioquímicas e funcionais ocorrem nos espermatozoides durante o processo de congelamento e descongelamento que resultam em crioinjúrias, como a perda da motilidade, danos a membrana plasmática, acrossomal e fragmentação do DNA (ALCAY *et al.*, 2016).

Esses danos ocorrem porque os fosfolipídios, cujas cadeias de ácidos graxos são em sua maior parte poli-insaturadas, quando submetidos à diminuição da temperatura, assumem uma forma cônica, denominada de forma “hexagonal II” ou micela invertida na qual as extremidades hidrofóbicas são externas e as hidrofílicas internas. Quando a membrana está em transição da fase fluida para a fase cristalina, para muitos lipídios, a formação dessa micela invertida é transitória, entretanto, para certos fosfolipídios, esta estrutura persiste. Tendo como consequência, o aumento da permeabilidade da membrana, com o estabelecimento de canais que permitem a entrada de íons e pequenas moléculas, desestabilizando a membrana e, assim, causando danos irreparáveis à célula (WATSON, 1995).

Para reduzir os efeitos das crioinjúrias às células espermáticas, é necessário que o diluente seminal contenha substâncias que mantenham a viabilidade espermática durante o processo de congelamento e descongelamento (ROOF *et al.*, 2012).

O diluente para criopreservação seminal deve fornecer aos espermatozoides fonte de energia; proteger contra os danos gerados pelas variações de temperatura; manter o pH adequado; inibir o crescimento bacteriano; permitir que as células percam água por osmose no processo de congelamento (desidratação celular), inibindo a formação de grandes cristais de gelo intracelulares, fornecendo assim, condições ideais para que as células permaneçam com qualidade e viabilidade após o processo de congelamento e descongelamento (SILVA e GUERRA, 2011).

Nos últimos anos, estudos com vários protocolos e meios diluidores para criopreservação foram desenvolvidos por meio da incorporação de diferentes

crioprotetores (MARA *et al.*, 2007; KONALI *et al.*, 2013; CHELUCCI *et al.*, 2015), ácidos graxos poli-insaturados do tipo ômega 3 e ômega 6, (SAFARINEJAD e SAFARINEJAD, 2012; YAN *et al.*, 2013; FAIR *et al.*, 2014) e antioxidantes (BEZERRA *et al.*, 2011; CALVO *et al.*, 2015; JAMADI *et al.*, 2017), para preservar o sêmen de diferentes espécies de mamíferos.

Contudo, pesquisas devem ser direcionadas para determinar uma fonte ideal e nível adequado de suplementação dos meios diluidores que melhorem as características do sêmen criopreservado.

4.2 Ácidos graxos poli-insaturados na qualidade seminal

Assim como todas as células de mamíferos, os espermatozoides possuem a membrana plasmática constituída por uma bicamada fosfolipídica de PUFAs (FAIR *et al.*, 2014), predominando os PUFAs de cadeia longa da família ômega 3, em particular o DHA (BRINSKO *et al.*, 2005).

O DHA possui 22 átomos de carbono e seis duplas ligações o que confere maior fluidez a membrana plasmática. No entanto, os mamíferos não conseguem sintetizar ácidos graxos da família ômega 3 ou 6, devido à falta de enzimas dessaturase de ácidos graxos apropriadas. Portanto, o ácido linoleico (C18:2 - ômega 6) e o ácido linolênico (C18:3 - ômega 3) precisam ser fornecidos na dieta, já que esses PUFAs são essenciais para inúmeros processos, incluindo o crescimento geral, desenvolvimento do cérebro, visão e sistema reprodutivo (KOCHHAR, 2002).

Os ácidos graxos acumulam-se nas células testiculares através de dois processos distintos: difusão passiva através da bicamada lipídica e/ou transporte facilitado pela proteína mediada pela glicoproteína CD36, que é amplamente expressa em células de Sertoli (GILLOT *et al.*, 2005).

Os lipídios são fundamentais e funcionam como fonte de energia para as células de Sertoli, e também são utilizados na remodelação de membranas de células germinativas em desenvolvimento. As células germinativas apresentam

altos níveis de PUFAs, no entanto, são incapazes de sintetizá-los, dependendo da sua captação (RATO *et al.*, 2014).

Os PUFAs estão envolvidos em modificações físico-químicas da cabeça dos espermatozoides durante a capacitação (SALICIONI *et al.*, 2007) e dão à membrana espermática a fluidez necessária para participarem dos eventos de fusão associados à fecundação (LENZI *et al.*, 2000). Pressupõe-se que a presença destes PUFAs de cadeia longa promove uma maior fluidez a membrana plasmática devido às duplas ligações (TOWHIDI e PARQUES, 2012).

O DHA é rapidamente incorporado numa variedade de células, principalmente em fosfolípidos da membrana plasmática e mitocôndrias. Entretanto, não é distribuído igualmente em todas as classes de fosfolípidos, sendo incorporado principalmente, em aminofosfolípidos, e sua maior parte em fosfatidiletanolamina e em menor proporção na fosfatidilserina (MARSZALEK; LODISH, 2005).

Os benefícios da incorporação do DHA são refletidos principalmente com o aumento da motilidade dos espermatozoides através do aumento da fluidez da membrana (ANSARI *et al.*, 2012). Por outro lado, o aumento do PUFAs leva a uma maior susceptibilidade a peroxidação lipídica causando modificações na membrana plasmática do espermatozoide durante o processo de criopreservação (BUCAK *et al.*, 2010). Nesse sentido, o sistema antioxidante exerce um papel importante no equilíbrio entre a presença de ROS e a função antioxidante. Assim, um nível mais elevado de antioxidante pode ser benéfico quando altas concentrações de PUFAs são utilizadas.

Dentro do sistema antioxidante do espermatozoide, a vitamina E é o principal antioxidante natural lipídico-solúvel presente nas membranas celulares e desempenha um papel crucial na quebra da reação em cadeia da peroxidação, iniciada por ROS (GLIOZZI *et al.*, 2009).

Os ácidos graxos poli-insaturados contêm uma configuração em que o hidrogênio no átomo de carbono adjacente à dupla ligação é facilmente removido, resultando na formação de ROS (BANSAL e BILASPURI, 2009, 2010). Os elétrons livres reajustam-se, e é adicionado oxigênio para formar um peróxido. Os peróxidos podem romper-se para formar dois oxidantes, resultando

numa reação de cadeia autopropagadora, levando a perda da permeabilidade da membrana e conseqüentemente da função espermática.

Os tocoferóis atuam na remoção dos radicais peroxil formados antes que estes oxidem os ácidos graxos. O grupo hidroxila presente no tocoferol doa seu átomo de hidrogênio para o radical peroxil, convertendo-o em peróxido. A ação do tocoferol como antioxidante é complementada pela presença de glutathione-peroxidase no componente solúvel da célula. A glutathione-peroxidase catalisa a conversão de peróxidos orgânicos e peróxidos de hidrogênio em álcoois ou água, evitando, assim, que os peróxidos lesem componentes celulares. A adição de ácidos graxos poli-insaturados da série ômega 3 e ômega 6 ao meio diluidor tem sido alvo de pesquisa em diversas espécies a fim de avaliar seus efeitos na qualidade de espermatozoides congelados/descongelados (ANSARI *et al.*, 2012; ABDI-BENEMAR *et al.*, 2015; KAKA *et al.*, 2015; LIU *et al.*, 2017).

De acordo com Ansari *et al.* (2012), a adição de uma fonte de ácidos graxos poli-insaturados da série ômega 3 ao meio diluidor, aumentou a viabilidade espermática por meio de alterações na composição lipídica das membranas após o congelamento de sêmen caprino.

Abdi-Benemar *et al.* (2015) obtiveram resultados satisfatórios para motilidade e viabilidade espermática, integridade das membranas e também maiores taxas de concepção com a inclusão de 0,30g de óleo de peixe no diluente seminal de ovinos.

A relação entre os ácidos graxos da série ômega 3 e ômega 6 pode ser o principal responsável pelo aumento da qualidade do sêmen *in natura*, uma vez que a fluidez da membrana dos espermatozoides está diretamente relacionada à sua composição lipídica (MALDJIAN *et al.*, 2003).

Em touros, a proporção de ácidos graxos ômega 3 nos espermatozoides diminui com a idade, contribuindo para aumentar sua susceptibilidade à crioinjúrias (ARGOV-ARGAMAN *et al.*, 2013). Ao longo dos anos vêm sendo realizadas pesquisas para promover melhorias na qualidade espermática suplementando animais com dietas enriquecidas com PUFA's como fonte de DHA, em diferentes espécies como: caprinos (SOUZA, 2013), frangos (CEROLINI *et al.*, 2006), perus (ZANIBONI *et al.*, 2006), ovinos (JAFAROGHLI

et al., 2014; FAIR *et al.*, 2014; ESMAEILI *et al.*, 2014), bovinos (MOALLEM *et al.*, 2015; GÜRLER *et al.*, 2015; KHOSHVAGHT *et al.*, 2016), coelhos (GLIOZZI *et al.*, 2009; MOURVAKI *et al.*, 2010) e suínos (ESTIENNE *et al.*, 2008; YESTE *et al.*, 2011; LIU *et al.*, 2017).

A inclusão de PUFA's ao meio diluidor foi realizado por Kaka *et al.* (2015), estes autores obtiveram maiores porcentagens de motilidade espermática progressiva, morfologia normal, viabilidade, integridade acrossomal e da membrana plasmática, com adição de 5ng.mL^{-1} de ácido alfa linolênico no diluidor seminal de bovinos, quando comparados aos outros grupos suplementados e o controle.

Towhidi *et al.* (2013) avaliaram os efeitos da adição de níveis de ácido graxo ômega 3 (0; 0,1; 1 e 10ng.mL^{-1}) e alfa-tocoferol (0; 0,1 e 0,2mM) no diluidor de sêmen de ovinos, encontraram melhores resultados para motilidade progressiva nos níveis 1ng.mL^{-1} de ômega 3 e 0,1mM alfa-tocoferol em comparação com outros grupos tratados.

Segundo Ansari *et al.* (2012), na espécie caprina a adição de 10ng.mL^{-1} de uma fonte de ômega 3 e 0,2mmol de vitamina E ao meio diluidor seminal melhora a motilidade progressiva pós descongelamento devido a incorporação de DHA na membrana das células, o qual promoveu proteção aos espermatozoides frente ao processo de criopreservação.

Kaeoket *et al.* (2010) utilizaram como fonte de DHA o óleo de peixe, com inclusão de 0; 0,13; 0,29 e 0,45g no diluidor seminal de suínos e obtiveram maior motilidade progressiva, viabilidade e integridade acrossomal nos grupos suplementados com óleo de peixe em comparação ao grupo controle.

Todavia, pesquisas que relacionem qualidade seminal com a inclusão de DHA diretamente aos meios diluidores de sêmen caprino ainda são necessárias, existem poucas informações na literatura voltadas para a espécie que indiquem um nível adequado, com isso, justifica-se a realização de estudos que avaliem os efeitos dessa suplementação.

4.3 Análises espermáticas *in vitro* pós-descongelamento

O congelamento promove ou causa danos na função espermática, afetando os processos necessários para a fertilização do oócito. Durante a criopreservação, os espermatozoides são expostos a estresse físico e químico que resulta em alterações na composição lipídica da membrana, motilidade espermática, viabilidade e estado acrossômico (GADEA *et al.*, 2013). Todas estas alterações reduzem a capacidade do espermatozoide de fertilizar o oócito após a criopreservação (BARBAS e MASCARENHAS, 2009).

Desta forma, testes *in vitro* são adotados na rotina laboratorial para determinação da qualidade do sêmen a ser utilizado em IA ou na PIV, devido à relação existente entre qualidade do material seminal e fertilidade (BICUDO *et al.*, 2007).

Normalmente as avaliações laboratoriais realizadas com o objetivo de estimar o potencial de fertilização de uma partida de sêmen são: motilidade espermática (%); vigor espermático (1-5); concentração espermática (milhões/dose); anormalidades espermáticas (%) e teste de membrana plasmática e acrossomal. No entanto, nos últimos anos têm sido adotadas também técnicas computadorizadas de avaliação do movimento espermático, testes de incubação e separação espermática e análise morfofuncional por meio de sondas fluorescentes para o acesso ao potencial de fertilização das amostras de sêmen criopreservado (WALTHERS *et al.*, 2004; RODRIGUEZ-MARTINEZ, 2007; RODRIGUEZ-MARTINEZ e BARTH, 2007).

O Teste Hiposmótico (HO) ou *Hypoosmotic Swelling Test* (HOST) avalia a integridade e funcionalidade da membrana espermática e foi proposto pela primeira vez por Jeyendran *et al.* (1984) em espermatozoides humanos. A integridade de membrana plasmática do espermatozoide tem grande importância para que ocorra os diversos eventos fisiológicos durante a fertilização do oócito que incluem a capacitação e reação acrossômica, ligação com a zona pelúcida e fusão dos gametas (SNOECK *et al.*, 2014).

O HO é simples, de fácil execução e interpretação, tem sido empregado em vários estudos para avaliar a integridade de membrana de espermatozoides de várias espécies, como: bovinos (MARTINS *et al.*, 2011); equinos (YEST *et al.*,

2015); ovinos (ALCAY *et al.*, 2015); caninos (LOPES *et al.*, 2015) e também caprinos (MEMON *et al.*, 2012).

Ao realizar o HO, as amostras seminais são expostas a soluções hiposmóticas e incubadas em banho maria a 37°C por determinado tempo. Nestas condições, por osmose ocorre passagem de água através da membrana até que seja estabelecido o equilíbrio entre os meios intra e extracelular, se a membrana espermática estiver íntegra ocorre o intumescimento da célula devido ao influxo de água predominantemente na região das fibras da cauda provocando seu enrolamento ou dobramento (GOERICKE-PESCH e FAILING, 2013). Após incubação, as lâminas são examinadas sob um microscópio de contraste de fase e os espermatozoides são classificados quanto a presença ou não de cauda enrolada, ou seja, reativos e não reativos ao HO (EMERICK *et al.*, 2011).

Memon *et al.* (2012), ao avaliar a integridade espermática de sêmen caprino criopreservado por meio do HO, encontraram média de $58,10 \pm 1,53\%$ espermatozoides com membrana íntegra. Já Büyükleblebici *et al.* (2014) encontraram médias de $48,0 \pm 4,39\%$ e $49,9 \pm 3,22\%$ de células reativas ao teste em meio a base de tris gema, utilizando 3 e 6% de glicerol no diluidor do sêmen caprino, respectivamente. No entanto, Salmani *et al.* (2014) obtiveram média de $64,9 \pm 1,7\%$ de espermatozoides reativos ao HO após descongelamento de sêmen criopreservado em meio a base de tris gema utilizando 5% de glicerol.

Diante disso, o Teste HO mostra-se então uma ferramenta complementar sensível e importante de ser realizada para determinar a integridade da membrana plasmática, pois as injúrias causadas aos espermatozoides, principalmente a formação dos cristais de gelo conferem danos irreversíveis aos espermatozoides (EMERICK *et al.*, 2011; OLIVEIRA *et al.*, 2013).

A avaliação da integridade de membrana acrossomal é essencial para determinar a capacidade fecundante de uma amostra de sêmen, de forma que, o dano parcial ou total leva a incapacidade para fertilizar, pois a integridade do acrossoma, bem como suas enzimas, são fundamentais para que ocorra a fecundação (LESSARD *et al.*, 2011). Com o avanço dos estudos relacionados a qualidade seminal, vários são os protocolos para avaliação do estado

acrossomal nas diversas espécies domésticas, existem desde técnicas de coloração simples como: Vermelho Congo (CEROVSKY, 1976); Pope (POPE *et al.*, 1991); Trypan blue/Giemsa (DIDION *et al.*, 1989) e coloração com utilização de várias sondas fluorescentes (SILVA e GUERRA, 2011).

A avaliação da integridade acrossomal por meio da técnica de coloração pelo Vermelho Congo (CEROVSKY, 1976) é de simples execução e permite a identificação de forma detalhada das patologias do acrossoma por meio da microscopia de luz (SOMFAI *et al.*, 2002). Inicialmente deve ser preparado esfregaços seminais em lâmina de vidro, os quais devem secar ao ar. Para coloração das células espermáticas, as lâminas são imersas em solução aquosa saturada de vermelho congo por um minuto, lavadas suavemente e secas 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: integro; heterogêneo; em destacamento; destacado; entre outros (MURADÁS *et al.*, 2006).

Del Valle *et al.* (2013), estudando a inclusão de óleo de coco e óleo de palma em diluidor de sêmen ovino, não obtiveram diferenças nas porcentagens de espermatozoides com membrana acrossomal íntegras entre o grupo controle e tratado. Bittencourt *et al.* (2006), avaliando diferentes tempos de equilíbrio 1, 2, 3 e 4 horas, obtiveram menores médias de defeitos acrossomais no tempo de equilíbrio de 2h (G2) $08,42 \pm 08,34$ quando comparado aos grupos com períodos de equilíbrio superiores 3h (G3) e 4h (G4), com médias de $20,42 \pm 06,29$ e $24,71 \pm 09,19$, respectivamente.

A coloração Trypan blue/Giemsa, descrita por Didion *et al.* (1989), é outra possibilidade de avaliação da integridade acrossomal e viabilidade espermática. O Trypan blue cora em azul os espermatozoides mortos, com membrana lesada, enquanto espermatozoides intactos (vivos) não se coram. O Giemsa indica ausência ou presença do acrossomo, corando em roxo ou rosa escuro o

acrossomo íntegro. Esses corantes têm sido usados com bons resultados para avaliação da integridade acrossomal em equinos (SERAFINI *et al.*, 2014), bovinos (MARINHO *et al.*, 2016), ovinos (LIMA *et al.*, 2010) e caprinos (MALIK *et al.*, 1997). Segundo Didion *et al.* (1989), espermatozoides corados por Trypan blue/Giemsa são classificados em quatro categorias: a) vivo com acrossomo intacto; b) morto com acrossomo intacto; c) vivo sem acrossomo; e d) morto sem acrossomo.

De acordo com Pope *et al.* (1991), a integridade acrossomal pode ser ainda avaliada pela técnica de coloração Pope a qual é composta de 1% do corante *Fast Green* e do Rosa Bengala, é um método simples e rápido, para sua realização uma alíquota de sêmen deve ser misturada ao corante na proporção de 1:1, e após, fazer esfregaço em lâminas de microscopia. As análises das lâminas podem ser feitas em microscópio de luz em aumento de 1.000x, classificando em: a) Acrossoma íntegro: coloração lilás e b) Acrossoma não íntegro: coloração rosa. A coloração Pope tem sido realizada com sucesso em: bovinos (RODRIGUES *et al.*, 2015), gatos domésticos (VILLAVERDE *et al.*, 2008) e ovinos (SOUZA *et al.*, 2015)

Na mitocôndria está a maior parte do ATP necessário ao metabolismo total do espermatozoide, incluindo aquele necessário à motilidade e vigor (BATISTA e GUERRA, 2010). As mitocôndrias espermáticas estão dispostas ao longo da peça intermediária, tendo como principal função realizar a fosforilação oxidativa e produzir ATP como fonte de energia metabólica, sendo essencial para a suplementação de ATP para o batimento flagelar, possibilitando a propulsão dos espermatozoides (SILVA e GADELLA, 2006).

A atividade mitocondrial pode ser determinada a partir da aplicação da técnica desenvolvida por Hrudka (1987), baseada na oxidação do 3,3'-diaminobenzidine (DAB). Por meio de uma reação em cadeia no Complexo Citocromo C, o DAB é polimerizado e se deposita na bainha mitocondrial, ou seja, ao longo da peça intermediária dos espermatozoides, de modo que quanto maior a atividade mitocondrial na peça intermediária maior será a deposição do corante sobre a mesma, sendo esta reação observada em microscópio de contraste de fase pela visualização de uma cor castanha (cromógeno).

Este teste 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.

Para determinação da atividade mitocondrial avalia-se 200 espermatozoides por lâmina sob microscopia de luz em objetiva de 100x, sob óleo de imersão 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) (HRUDKA, 1987; CAVALCANTE *et al.*, 2005).

Cavalcante *et al.* (2005), trabalhando com sêmen de caprinos, e aplicando o método descrito por Hrudka (1987) de avaliação da atividade mitocondrial, obtiveram índices de atividade citoquímica de amostras após descongelamento de 66,00% e 67,25%, para raças Boer e Alpina, respectivamente, indicando que mais da metade das mitocôndrias estão ativas nos espermatozoides, o que é compatível para suportar o percentual de motilidade espermática quando avaliada após o descongelamento.

Losano *et al.* (2015) também avaliaram a atividade mitocondrial por meio da técnica descrita Hrudka (1987) em espermatozoides de touros e obtiveram porcentagem de atividade mitocondrial de classe I (peça intermediária totalmente corada) de $66,50 \pm 6,00$.

Com o avanço nas biotécnicas aplicadas à reprodução animal novos métodos estão sendo aplicados para avaliar a qualidade seminal. Dessa forma, muitos aspectos relacionados a funcionalidade espermática têm sido monitorados por meio de sondas fluorescentes que permitem estimar simultaneamente, em microscopia de epifluorescência, ou citometria de fluxo, o potencial das membranas plasmáticas, acrossômica, mitocondrial, o índice de fragmentação de DNA, entre outros (ARRUDA *et al.*, 2010).

Várias sondas fluorescentes têm sido usadas para análise da integridade de membrana em espermatozoides de caprinos, como: diacetato de carboxifluoresceína (CFDA) em combinação com iodeto de propídio (IP)

(COLETO *et al.*, 2002); SYBR[®]14 em combinação com IP (PETERSON *et al.*, 2007) e Hoechst 33258 (MARCO-JIMÉNEZ *et al.*, 2006).

De acordo com Medina *et al.* (2000), o CFDA é um éster não polar, não fluorescente, permeável à membrana plasmática que dentro da célula é hidrolisado por esterases inespecíficas, resultando em um composto fluorescente e impermeável à membrana plasmática intacta que o adsorve e fluoresce em verde. Já o IP tem afinidade com o DNA, mas é impermeável a membrana íntegra. Desta forma, uma vez que a membrana esteja lesionada o IP cora a região nuclear em vermelho devido a sua ligação ao núcleo celular.

Vidal *et al.* (2013) avaliaram a integridade da membrana do espermatozoide utilizando a combinação de iodeto de propídio (PI) e diacetato de carboxifluoresceína (CFDA) em caprinos, foram avaliadas 200 células sob microscopia de epifluorescência utilizando excitação de DBP 485/20nm e filtros de emissão de DBP 580-630nm com uma ampliação de 400x. Estes corantes emitem fluorescência verde (CFDA) indicando membrana intacta, e a fluorescência vermelha (IP) indicando membrana lesada. Os mesmos autores não obtiveram diferença para integridade de membrana de amostras de sêmen congeladas em meio Tris mais lecitina de soja a 0,04% ou 0,016% das amostras congeladas com leite desnatado, $39,67 \pm 16,72$; $38,08 \pm 19,31$ e $45,17 \pm 14,74$, respectivamente.

Marco-Jiménez *et al.* (2006) avaliaram a viabilidade da membrana utilizando Bisbenzimidazolo Hoechst 33258. Esse corante marca os espermatozoides não viáveis (mortos) em azul brilhante, enquanto que as células viáveis não são coradas. Estes autores concluíram que a criopreservação provocou a perda da integridade da membrana, média de $25,6 \pm 1,4$ quando comparado ao sêmen fresco obtendo média de $79,9 \pm 1,8$.

Peterson *et al.* (2007), usando SYBR[®]14 em combinação com IP, avaliaram a integridade de membrana plasmática de espermatozoides caprinos da raça Saanen em citômetro de fluxo, e concluíram existir correlação entre a proporção de células com membranas intactas e a quantidade de espermatozoides móveis armazenados a 18° e 4°C ($r = 0,77$ e $0,98$, respectivamente).

Assim como na integridade de membrana plasmática, a integridade acrossomal pode ser mensurada por diferentes sondas fluorescentes, porém as mais comumente usadas em caprinos são aqueles que utilizam isotiocianato de fluoresceínas (FITC) conjugadas a lecitinas, tais como: *Peanut Agglutinin* (FITC-PNA) ou *Pisum Sativum Agglutinin* (SILVA e GADELLA, 2006).

Em estudo, Eiman *et al.* (2011) utilizaram o FITC-PNA para avaliar a integridade acrossomal em amostras de sêmen caprino com diferentes níveis 0; 0,1; 0,2; 0,3 e 0,4M de Arbutin (4-hidroxifenil-glucopiranosido), com o objetivo de avaliar seu efeito sobre a estabilidade lipídica. Estes mesmos autores concluíram que a inclusão de 0,4M de arbutin melhora a porcentagem de acrossoma intacto. Recentemente, Alcay *et al.* (2017) avaliaram a integridade do acrossoma por meio da sonda *Pisum Sativum Agglutinin* (FITC-PSA) e obtiveram porcentagem de $31,20 \pm 3,27$ de acrossoma defeituoso em sêmen de caprino pós-descongelamento.

Diversas técnicas são realizadas para prevê a fertilidade do sêmen *in vitro*, com a finalidade de garantir a utilização de sêmen de qualidade após o processo de criopreservação. De acordo com Batista e 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.

Para driblar os efeitos das avaliações subjetivas do sêmen que tem valor preditivo de fertilidade limitado, alguns sistemas de análise computadorizado de avaliação espermática vem sendo proposto (VERSTEGEN *et al.*, 2002; MATOS *et al.*, 2008). *Computer-assisted Sperm Analysis* (CASA) é um método que se baseia na captura e processamento de diversas fotos das células espermáticas, resultando na trajetória precisa de cada espermatozoide (BERGSTEIN *et al.*, 2014) dando condição de identificar as subpopulações dos espermatozoides de cada ejaculado (KATHIRAVAN *et al.*, 2011). Além de verificar os efeitos de vários procedimentos *in vitro* sobre a motilidade espermática (PERUMAL *et al.*, 2014).

Diversas variáveis são analisadas, tais como: motilidade total; motilidade progressiva; velocidade curvilínea (VCL) é a velocidade da trajetória real do espermatozoide; velocidade linear progressiva (VSL), é a velocidade média em

função da linha reta estabelecida entre o primeiro e o último ponto da trajetória do espermatozoide; velocidade média da trajetória (VAP), é a velocidade da trajetória média do espermatozoide; linearidade (LIN), é a relação percentual entre a (VSL) e a (VCL); retilinearidade (STR), é a relação percentual entre (VSL) e (VAP).

Estima a proximidade do percurso da célula a uma linha reta; amplitude de deslocamento lateral de cabeça (ALH), é a amplitude do deslocamento médio da cabeça do espermatozoide em sua trajetória real; frequência de batimento flagelar cruzado (BCF), número de vezes que a cabeça do espermatozoide cruza a direção do movimento (KATHIRAVAN *et al.*, 2011). Esses parâmetros são importantes e tem relação com a capacidade das células espermáticas na progressão do muco cervical e na interação com o oócitos (VERSTEGEN *et al.*, 2002).

Sundararaman e Edwin (2008) verificaram que o sistema CASA é capaz de avaliar a deterioração da qualidade do sêmen de caprinos em termos de características de motilidade dos espermatozoides durante o processamento de sêmen para criopreservação e as diferenças entre amostras de alta e baixa qualidade durante o processo. Outra utilidade desse sistema é avaliação do efeito de diversas fontes de crioprotetores que são adicionados aos diluidores e quais parâmetros de cinética podem ser influenciados de acordo a substância empregada (BEZERRA *et al.*, 2011).

De acordo com Cox *et al.* (2006), melhores parâmetros de velocidade curvilínea, velocidade média da trajetória e velocidade linear progressiva em ejaculados caprinos, foram relacionados a uma maior capacidade de penetração do muco cervical homólogo *in vitro* quando comparados com ejaculados de qualidade inferior.

5 REFERÊNCIAS

- ABDI-BENEMAR, H.; JAFAROGHLI, M.; KHALILI, B.; ZAMIRI, M.J.; EZAZI, H.; SHADPARVAR, A.A. 2015. Supplementation of the extender containing egg yolk and α -tocopherol on the freezability and post-thawing fertility of ram semen. **Small Ruminant Research** 130: 166-170.
- ALCAY, S.; BERKTOKER, M.; GOKCE, E.; USTUNER, B.; TEKINONDER, N.; SAGIRKAYA, H.; NUR, Z.; KEMALSOYLU, M. 2015. Successful ram semen cryopreservation with lyophilized egg yolk-based extender. **Cryobiology** 71: 329-333.
- ALCAY, S.; TOKER, M.B.; ONDER, N.T.; GOKCE, E. 2017. Royal jelly supplemented soybean lecithin-based extenders improve post-thaw quality and incubation resilience of goat spermatozoa. **Cryobiology** 74: 81-85.
- ALCAY, S.; USTUNER, B.; NUR, Z. 2016. Effects of low molecular weight cryoprotectants on the post-thaw ram sperm quality and fertilizing ability. **Small Ruminant Research** 136: 59-64.
- AMANN, R.P.; PICKETT, B.W. 1987. Principles of cryopreservation and a review of cryopreservation of stallion spermatozoa. 1987. **Journal of Equine Veterinary Science**. 7: 145-173.
- ANDRABI, S.M.; MAXWELL, W.M. 2007. A review on reproductive biotechnologies for conservation of endangered mammalian species. **Animal Reproduction Science** 99: 223-243.
- ANSARI, M.; TOWHIDI, A.; SHAHRBABAK, M.M.; BAHREINI, M. 2012. Docosahexaenoic acid and alpha-tocopherol improve sperm cryosurvival in goat. **Slovak Journal of Animal Science** 45: 7-13.
- ARGOV-ARGAMAN, N.; MAHGREFTHE, K.; ZERON, Y.; ROTH, Z. 2013. Variation in lipid profiles within semen compartments--the bovine model of aging. **Theriogenology** 80: 712-721.
- ARRUDA, R.P.; ANDRADE, A.F.C.; ZAFFALON, F.G.; CELEGHINI, E.C.C.; NASCIMENTO, J.; TARRAGÓ, O.F.B.; MARTINS, S.M.M.K.; ALONSO, M.A. 2010. Addition of seminal plasma reduces tyrosine phosphorylation in post-thawed equine sperm. **Animal Reproduction** 7: 285-285.
- BARBAS, J.P.; MASCARENHAS, R.D. 2009. Cryopreservation of domestic animal sperm cells. **Cell and Tissue Banking** 10: 49-62.
- BATISTA, A. M.; GUERRA, M. M. P. 2010. Novas técnicas para avaliação da qualidade do sêmen caprino. **Revista Brasileira de Reprodução Animal** 34: 125-132.
- BERGSTEIN, T.G.; WEISS, R.R.; BICUDO, S.D. 2014. Técnicas de análise de sêmen. **Revista Brasileira de Reprodução Animal, Belo Horizonte** 38: 189-194.
- BEZERRA F.S.B.; CASTELO T.S.; ALVES H.M.; OLIVEIRA I.R.S.; LIMA G.L.; PEIXOTO G.C.X.; BEZERRA A.C.S.D.; SILVA A.R. 2011. Objective assessment of the cryoprotective effects of dimethylformamide for freezing goat sêmen. **Cryobiology** 63: 263-266.
- BICUDO, S.D.; AZEVEDO, H.C.; MAIA, S.M.; GREEN, R.E.; RODELLO, L.; MEIRA, C. 2007. Avanços na criopreservação do sêmen ovino visando sua aplicação em programas de inseminação artificial e em biotecnologias com embriões. **Acta Scientiae Veterinariae** 35: 787-798.
- BITTENCOURT, R. F.; RIBEIRO FILHO, A. L.; ALVES, S. G. G.; BISCARDE, C. E.; VASCONCELOS, M. F.; OBA, E. 2006. O efeito do tempo de equilíbrio sobre a qualidade do sêmen caprino criopreservado. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal** 7: 27-37.
- BRINSKO, S.P.; VARNER, D.D.; LOVE, C.C.; BLANCHARD, T.L.; DAY, B.C.; WILSON, M. E. 2005. Effect of feeding a DHA-enriched nutraceutical on the quality of fresh, cooled and frozen stallion semen. **Theriogenology** 63:1519-1527.

- BUCAK, M.N.; SARIÖZKANB, S.; TUNCER, P.B. 2010. The effect of antioxidants on post-thawed Angora goat (*Capra hircus ancyrensis*) sperm parameters, lipid peroxidation and antioxidant activities. **Small Ruminant Research** 89: 24-30.
- BÜSTÜNER, B.; NUR, Z; ALÇAY, S.; TOKER, M.B; SAĞIRKAYA, H.; SOYLU, M.K. 2015. Effect of freezing rate on goat sperm morphology and DNA integrity. **Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences** 39: 110-114.
- BÜYÜKLEBLEBİCİ, S.; TUNCER, P.B.; TAŞDEMİR, U.; ÖZGÜRTAŞ, T.; DURMAZ, E.; BÜYÜKLEBLEBİCİ, O. 2014. The Comparison of Three Different Cryoprotectants in Cryopreservation of Angora Goat Semen. **Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi** 20: 613-619.
- CALVO, G.L.; GATICA; M.C.; MORENO; J.; GUZMÁN; J.L.; ZARAZAGA, L.A. 2015. Exogenous melatonin does not improve the freezing of goat semen Blanca Andaluza compared to exposure to two months of short days. **Animal reproduction Science** 157: 24-32.
- CAVALCANTE, T. V.; ESPER, C. R.; FERREIRA, J. L. DIAS, F.E.F.; AZEVEDO, H.C.; CORDEIRO, M.F.; SOUZA, J.A.T. 2005. Avaliação da atividade mitocondrial em espermatozoides pós-colheita e pós-descongelamento de caprinos das raças boer e alpina durante as estações reprodutiva e não reprodutiva. **Arquivos of Veterinary Science** 10: 89-93.
- CEROLINI, S.; ZANIBONI, L.; MALDJIAN, A.; GLIOZZI, T. 2006. Effect of docosahexaenoic acid and alpha-tocopherol enrichment in chicken sperm on semen quality, sperm lipid composition and susceptibility to peroxidation. **Theriogenology** 66: 877-886.
- CEROVSKY, J. A. 1976. A new staining procedure for boar spermatozoa. **Zivocisna Vyroba** 21: 351-362.
- CHELUCCI, S.; PASCIU, V.; SUCCU, S.; ADDIS, D.; LEONNI, G.G.; MANCA, M.E.; NAITANA, S.; BERLINGUE, F. 2015. Soybean lecithin supplement preserves sperm membrane integrity and fertilization potential during cryopreservation of goat semen. **Theriogenology** 68: 1064-1074.
- COLETO, Z.F.; GUERRA, M.M.P.; BATISTA, A.M. 2002. Avaliação do sêmen congelado de caprinos com drogas fluorescentes. **Revista Brasileira de Medicina Veterinaria** 24: 101-104.
- COX, J.F.; ALFAROA, V.; MONTENEGROA, V.; MARTINEZ H.R. 2006. Computer-assisted analysis of sperm motion in goats and its relationship with sperm migration in cervical mucus. **Theriogenology** 66:860-867.
- DEL VALLE, I.; SOUTER, A.; MAXWELL, W.M.C.; MUINO-BLANCO, T.; CEBRIÁN-PÉREZ, J.A. 2013. Function of ram spermatozoa frozen in diluents supplemented with casein and vegetable oils. **Animal Reproduction Science** 138: 213-219.
- DIDION, B.A.; DOBRINSKI, J.R.; GILES, J.R.; GRAVES, C.N. 1989. Staining procedure to detect viability and the true acrosome reaction in spermatozoa of various species. **Gamete Research** 22: 51-57.
- DORADO, J.; RODRÍGUEZ, I.; HIDALGO, M. 2007. Cryopreservation of goat spermatozoa: Comparison of two freezing extenders base don post-thaw sperm quality and fertility rates after artificial insemination. **Theriogenology** 68: 168-177.
- DORADO, J.; HIDALGO, M.; MUÑOZ, M.; RODRÍGUEZ. 2009. Assessment of goat semen freezability according to the spermatozoa characteristics from fresh and frozen sample. **Animal Reproduction Science** 112: 150–157.
- DORADO, J.; RODRIGUEZ, I.; HIDALGO, M.; SANZ, J. 2005. Computer-assisted analysis of goat sperm motility and velocity before and after cryopreservation. **Reproduction in Domestic Animals** 40: 401-402.
- EMERICK, L. L.; DIAS, J.C.; FILHO, V.R.V.; SILVA, M.A.; ANDRADE, V.J.; LEITE, T.J.; MARTINS, M.J.A. 2011. Avaliação da integridade de membrana em espermatozoide bovino criopreservado para prever o índice de prenhez. **Ciência Animal Brasileira** 12: 536-546.

- ESMAEILI, V.; SHAHVERDI, A.H.; ALIZADEH, A.R.; ALIPOUR, H.; CHEHRAZI, M. 2014. Saturated, omega-6 and omega-3 dietary fatty acid effects on the characteristics of fresh, frozen-thawed semen and blood parameters in rams. **Andrologia** 46: 42-49.
- ESTIENNE, M.J.; HARPER, A.F.; CRAWFORD, R.J. 2008. Dietary supplementation with a source of omega-3 fatty acids increases sperm number and the duration of ejaculation in boars. **Theriogenology** 70: 70-76.
- FAIR, S.; DOYLE, D.N.; DISKIN, M.G.; HENNESSY, A.A.; KENNY, D.A. 2014. The effect of dietary n-3 polyunsaturated fatty acids supplementation of rams on semen quality and subsequent quality of liquid stored semen. **Theriogenology** 81: 210-219.
- GADEA, J.; GUMBAO, D.; GIMÉNEZ, B.G.; GARDÓN, J.C. 2013. Supplementation of the thawing medium with reduced glutathione improves function of frozen-thawed goat spermatozoa. **Biology Reproduction** 13: 24-33.
- GIBB, Z.; BUTLER, T.J.; MAXWELL, W.M.C.; GRUPEN, C.G. 2013. Quercetin improves the postthaw characteristics of cryopreserved sex-sorted and non sorted stallion sperm. **Theriogenology** 79: 1001-1009.
- GILLOT, I.; PIETRI, C. J.; GOUNON, P.; LUQUET, S.; RASSOULZADEGAN, M.; GRIMALDI, P.; VIDAL, F. 2005. Germ cells and fatty acids induce translocation of CD36 scavenger receptor to the plasma membrane of Sertoli cells. **Journal of Cell Science** 118: 3027-3035.
- GLIOZZI, T.M.; ZANIBONI, L.; MALDJIAN, A.; LUZI, F.; MAERTENS, L.; CEROLINI, S. 2009. Quality and lipid composition of spermatozoa in rabbits fed DHA and vitamin E rich diets. **Theriogenology** 71: 910-919.
- GOERICKE, P.S.; FAILING, K. 2013. Retrospective analysis of canine semen evaluations with special emphasis on the use of the hypoosmotic swelling (HOS) test and acrosomal evaluation using Spermac®. **Reproduction in Domestic Animals** 48: 213-217.
- GÜRLER, H.; CALISICI, O.; CALISICI, D.; BOLLWEIN, H. 2015. Effects of feeding omega-3-fatty acids on fatty acid composition and quality of bovine sperm and on antioxidative capacity of bovine seminal plasma. **Animal Reproduction Science** 160: 97-104.
- HARRISON, R.A.P.; VICKERS, S.E. 1990. Use of fluorescent probes to assess membrane integrity in mammalian spermatozoa. **Journal of Reproduction and Fertility** 88: 343-352.
- HEMACHAND, T.; SHAHA, C. 2003. Functional role of sperm surface glutathione S-transferases and extracellular glutathione in the haploid spermatozoa under oxidative stress. **FEBS Letters** 538: 14-18.
- HOLST, B.S.; LARSSON, B.; LINDE-FORSBERG, C.; RODRIGUEZ MARTINEZ, H. 2000. Sperm binding capacity and ultrastructure of the zona pellucida of stored canine oocytes. **Journal of Reproduction and Fertility** 119: 77-83.
- HRUDKA, F. 1987. Cytochemical and ultracytochemical demonstration of cytochrome-c oxidase in spermatozoa and dynamics of changes accompanying ageing or induced by stress. **International Journal of Andrology** 10: 809-828.
- JAFAROGHLI, M.; ABDI-BENEMAR, H.; ZAMIRI, M.J.; KHALILI, B.; FARSHAD, A.; SHADPARVAR, A.A. 2014. Effects of dietary n-3 fatty acids and vitamin C on semen characteristics, lipid composition of sperm and blood metabolites in fat-tailed Moghani rams. **Animal Reproduction Science** 147: 17-24.
- JAMADI, A.S.; AHMAD, E.; ANSARI, M.; KOHRAM, H. 2017. Antioxidant effect of quercetin on an extender containing DMA or glycerol on the freezing capacity of goat semen. **Cryobiology** 75:15-20.
- JAMADI, A.S.; KOHRAM, H.; ZAREH-SHAHNE A.; DEGHANIZADEH P.; AHMAD E. 2016. Effect of various concentrations of butylated hydroxyanisole and butylated hydroxytoluene on freezing capacity of Turkman stallion sperm. **Animal Reproduction Science** 170: 108–113.

- JEYENDRAN, R.S. 1984. Development of an assay to assess the functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to other semen characteristics. **Journal Reproduction Fertility** 70: 219-228.
- KAEOKET, K.; SANG-URAI, P.; THAMNIYOM, A.; CHANAPIWAT, P.; TECHAKUMPHU, M. 2010. Effect of docosahexaenoic acid on quality of cryopreserved boar semen in different breeds. **Reproduction in Domestic Animals** 45: 458-463.
- KAKA, A.; WAHID, H.; ROSNINA, Y.; YIMER, N.; KHUMRAM, A.M.; SARSAIFI, K.; BEHAN, A.A.; KAKÁ, U.; EBRAHIMI, M. 2015. α -Linolenic acid supplementation in BioXcell® extender can improve the quality of post-cooling and frozen-thawed bovine sperm. **Animal reproduction science** 153: 1-7.
- KAMIMURA, C. F.; JACOMINI, J. O.; BELETTI, M. E. 2010. Alterações de cromatina em 596 espermatozoides de ovinos e caprinos avaliadas por azul de toluidina e alaranjado 597 de acridina. **Ciência e Agrotecnologia** 34: 212-219.
- KATHIRAVAN, P.; KALATHARAN, J.; KARTHIKEYA, G.; RENGARAJAN, K.; KADIRVEL, G. 2011. Objective sperm motion analysis to assess dairy bull fertility using computer-aided system-a review. **Reproduction Domestic Animal** 46:165-172.
- KHOSHVAGHT, A.; TOWHIDI, A.; ZARE-SHAHNEH, A.; NORUOZI, M.; ZHANDI, M.; DAVACHI, N.D.; KARIMI, R. 2016. Dietary n-3 PUFAs improve fresh and post-thaw semen quality in Holstein bulls via alteration of sperm fatty acid composition. **Theriogenology** 85: 807-812.
- KOCHHAR, P., eds. 2002. Bioquímica lipídica. Uma introdução. **Int. J. Food. Sci. Technol.** 37: 899- 900.
- KONYALI, C.; TOMAS, C.; BLANCH, E.; GÓMEZ, E.A.; GRAHAM, J.K; MOCE, E. 2013. Optimization of conditions for the treatment of goat semen with cholesterol loaded cyclodextrins before freezing to improve cryosurvival. **Cryobiology** 67: 124-131.
- LEBOEUF, B.; RESTALL, B.; SALAMON, S. 2000. Production and storage of goat semen for artificial insemination. **Animal Reproduction Science** 62: 113-141.
- LENZI, A.; GANDINI, L.; MARESCA, V.; RAGO, R.; SGRÒ, P.; DONDERO, F.; PICARDO, M. 2000. Fatty acid composition of spermatozoa and immature germ cells. **Molecular Human Reproduction** 6: 226-231.
- LESSARD, C.; SIQUEIRA, L.G.; D'AMOURS, O.; SULLIVAN, R.; LECLERC, P.; PALMER, C. 2011. Infertility in a beef bull due to a failure in the capacitation process. **Theriogenology** 76: 891-899.
- LIMA, L.F.; MOURA, P.; PASSOS, P.I.B.; LEAL, D.R.; RUMPF, R.; NEVES, J.P. 2010. Influência de sistemas de refrigeração sobre a qualidade do sêmen ovino criopreservado em palhetas. **CiênciaAnimalBrasileira** 11: 835-844.
- LIU, Q.; ZHOU, Y.F.; DUAN, R.J.; WEI, H.K.; PENG, J.; JIANG, S.W. 2017. Dietary n-6:n-3 ratio and Vitamin E improve motility characteristics in association with membrane properties of boar spermatozoa. **Asian Journal of Andrology** 19: 223-229.
- LOPES, G.; SOARES, L.; FERREIRA, P.; ROCHA, A. 2015. Tris-egg yolk-glycerol (TEY) extender developed for freezing dog semen is a good option to cryopreserve bovine epididymal sperm cells. **ReproductioninDomestic Animals** 50: 97-103.
- LOSANO, J.D.; ANGRIMANI, D.S.; PEREIRA, R.J.; ROCHA, A.M.; CRISCUOLO, T.S.; BARNABE, V.H.; BARNABE, R.C.; MENDES, C.M.; ASSUMPÇÃO, M.E.; NICHI, M. 2015. Utilisation of sperm-binding assay combined with computer-assisted sperm analysis to evaluate frozen-thawed bull semen. **Andrologia** 47: 77-84.
- MAIA, M.S.; BICUDO, S.D. 2009. Radicais livres, antioxidantes e função espermática em mamíferos: uma revisão. **Revista Brasileira de Reprodução Animal** 33: 183-193.
- MALDJIAN, A.; PENNY, P.C.; NOBLE, R.C. 2003. Docosohexaenoic acid-rich marine oils and improved reproductive efficiency in pigs. **Male fertility and lipid metabolism** :60-72.

MALIK, R.K.; LOHAN, I.S.; DHANDA, O.P.; TULI, R.K. 1997. Test for the acrosomal reaction of goat spermatozoa treated with heparin. **Small Ruminant Research** 26: 163-166.

Manual para exame andrológico e avaliação do sêmen animal. 2013. **Colégio Brasileiro de Reprodução Animal**. 3 edição. CBRA, Belo Horizonte.

MARA, L.; DATTENA, M.; PILICHI, S.; SANNA, D.; BRANCA, A.; CAPPAL, P. 2007. Effect of different diluents on goat semen fertility. **Animal Reproduction Science** 102: 152-157.

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

MARINHO, W.A.S.; HATAMOTO-ZERVOUDAKIS, L.K.; ZERVOUDAKIS, J.T.; ARGUELLO, F.A.P.B.; TSUNEDA, B.H.; DUARTE JUNIOR, M.F. TSUNEDA, P.P.; BARBOSA, E.A. 2016. Características seminais e de membrana espermática em touros suplementados com tocoferol. **Revista Brasileira de saúde e Produção Animal** 17: 322-330.

MARTINS, L. F.; PINHO, R.O.; PARAIZO, R.M.; OLIVEIRA, R.R.; CASTILHO, E.F.; GUIMARÃES, J.D. 2011. Avaliação de diferentes osmolaridades de soluções hiposmóticas e tempos de incubação no teste hiposmótico do sêmen de touros Nelore. **Revista Brasileira de Zootecnia** 40: 1519-1525.

MATOS, D.L.; ARAÚJO, A.A.; ROBERTO, I.G.; TONIOLLI, R. 2008. Análise computarizada de espermatozoides: revisão de literatura. **Revista Brasileira de Reprodução Animal** 32: 225-232.

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

MEMON, A. A.; WAHID, H.; ROSNINA, Y.; GOH, Y.M.; EBRAHIMI, M.; NADIA, F.M. 2012. 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** 136: 55-60.

MOALLEM, U.; NETA, N.; ZERON, Y.; ZACHUT, M.; ROTH, Z. 2015. Dietary α -linolenic acid from flaxseed oil or eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids from fish oil differentially alter fatty acid composition and characteristics of fresh and frozen-thawed bull semen. **Theriogenology** 83 :1110-1120.

MOURVAKI, E.; CERDINALI, R.; UM, D.B.; CORAZZI, G.; CASTELINI, C. 2010. Effects of flaxseed dietary supplementation on sperm quality and on lipid composition of sperm subfractions and prostatic granules in rabbit. **Theriogenology** 73: 629-637.

MURADÁS, P. R.; WEISS, R.R.; KOZICKI, L.C.; GRANEMANN, I.W.; SANTOS, I.W.; PIMPÃO, C.T. 2006. Alguns parâmetros de viabilidade de espermatozoides equinos colhidos por vagina artificial e por lavagem da cauda do epidídimo. **Archives of Veterinary Science** 11: 69-74.

OLIVEIRA, I. R. S.; ALVES, H.M.; THIBÉRIO, S.C.; BEZERRA, F.S.C.; BEZERRA, A.C.D.; SILVA, A.R. 2013. Correlações entre o teste hiposmótico e a avaliação clássica do sêmen de caprinos. **Ciência Animal Brasileira** 14: 216-221.

OLIVEIRA, R.R.; RATES, D.M.; PUGLIESI, G.; KER, P.G; ARRUDA, R.P.; MORAES, E.A.; CARVALHO, G.R. 2014. Use of Cholesterol-Loaded Cyclodextrin in Donkey Semen Cryopreservation Improves Sperm Viability but Results in Low Fertility in Mares. **Reproduction in Domestic Animals** 49: 845-850.

OLIVEIRA, R.V.; NUNES, J.F.; SALGUEIRO, C.C.M.; CAVALCANTE, J.M.M.; BRASIL, O.O.; MOURA, A.A.A.N. 2011. 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** 6: 1295-1302.

PERUMAL, P.; SRIVASTAVA, S. K.; GHOSH.; BARUAH, K.K. 2014. Computer-Assisted Sperm Analysis of Freezable and Nonfreezable Mithun (*Bos frontalis*) Semen. **Journal of Animals**.

- PETERSON, K.; KAPPEN, M.; URSEM, P.J.F.; NÖTHLING, J.O.; COLENBRANDER, B.; GADELLA, B.M. 2007. Microscopic and flow cytometric semen assessment of Dutch AI-bucks: effect of semen processing procedures and their correlation to fertility. **Theriogenology** 67:863-871.
- POPE, C. E.; ZHANG, Y. Z.; DRESSER, B. L. 1991. A simple staining method for evaluating acrosomal status of cat spermatozoa. **Journal of Zoo and Wildlife Medicine** 22: 87-95.
- PURDY, P.H. 2006. A review on goat sperm cryopreservation. **Small Ruminant Research** 63: 215-225.
- RATO, L.; ALVES, M.G.; CAVACO, J.E.; OLIVEIRA, P.F. 2014. High-energy diets: a threat for male fertility? **Obesity Reviews** 15: 996-1007.
- RODRIGUES, M.P.; TARRAGÓ, O.F.B.; ARRUDA, R.P.; OLIVEIRA, L.Z.; BERTOLLA, L.P.; NICHI, M.; BARNABE, V.H. 2015. Perfil oxidativo e funcional de sêmen bovino criopreservado em diferentes estações do ano. **Brazilian Journal Veterinary Research and Animal Science** 52: 134-140.
- RODRIGUEZ-MARTINEZ H. 2007. State of art in farm sperm evaluation. **Reproduction Fertility and Development** 19: 91-101.
- RODRIGUEZ-MARTINEZ, H.; BARTH, A.D. 2007. In vitro evaluation of sperm quality related to in vivo function and fertility. **Reproduction in Domestic Animals**. 6: 39-54.
- ROOF, D. J.; BOWLEY, S.; PREÇO, L.L.; MATSAS, D.J. 2012. Comparison of two commercial extenders for cryopreservation of goat semen without sperm washing. **Theriogenology** 77: 412-420.
- ROTH, T.L.; WEISS, R.B.; BUFF, J.L.; BUSH, L.M.; WILDT, D.E.; BUSH M. 1998. Heterologous in vitro fertilization and sperm capacitation in an endangered African antelope, the Scimitar-Horned Oryx (*Oryx dammah*). **Biology of Reproduction** 58: 475-482.
- SAFARINEJAD, M.R.; SAFARINEJAD, S. 2012. The roles of omega-3 and omega-6 fatty acids in idiopathic male infertility. **Asian Journal of Andrology** 14: 514-515.
- SALICIONI, A.M.; PLATT, M.D.; WERTHEIMER, E.V.; ARCELAY, E; ALLAIRE, A; SOSNIK, J; VISCONTI, P.E. 2007. Signalling pathways involved in sperm capacitation. **Society of Reproduction and Fertility supplement** 65: 245-259.
- SALMANI, H.; TOWHIDI, A.; ZHANDI, M.; BAHREINI, M.; SHARAFI, M. 2014. *In vitro* assessment of soybean lecithin and egg yolk based diluents for cryopreservation of goat semen. **Cryobiology** 68: 276-380.
- SERAFINI, R.; LONGOBARDI, V.; SPADETTA, M.; NERI, D.; ARIOTA, B.; GASPARRINI, B.; DI PALO, R. 2014. Trypan Blue/Giemsa Staining to Assess Sperm Membrane Integrity in Salernitano Stallions and its Relationship to Pregnancy Rates. **Reproduction in Domestic Animals** 49: 41-47.
- SHEVCHENKO, A.; SIMONS, K. 2010. Lipidomics: coming to grips with lipid diversity. **Nature Reviews Molecular Cell Biology** 11: 593–598.
- SILVA, P. F. N.; GADELLA, B. M. 2006. Detection of damage in mammalian sperm cells. **Theriogenology** 65: 958-978.
- SILVA, S V.; GUERRA, M.M.P. 2011. Efeitos da criopreservação sobre as células espermáticas e alternativas para redução das crioinjúrias. **Revista Brasileira de Reprodução Animal** 35: 370-384
- SINOWATZ, F.; WESSA, E.; NEUMULLER, C.; PALMA, G. 2003. On the species specificity of spermatic binding and spermatic penetration of the zona pellucida. **Reproduction in Domestic Animal** 38: 141-146.
- SLAVIK, T.; FULKA, J. 1992. In vitro fertilization of intact sheep and cattle oocytes with goat spermatozoa. **Theriogenology** 38: 721-726.

- SNOECK, P.P.N.; MELO, M.I.V.; ALVES, S.G.G.; BITTENCOURT, R.F.; FILHO, A.L.R.; CHALHOUB, M.; HENRY, M. 2014. Qual é o teste hiposmótico mais indicado para avaliar a integridade funcional de espermatozoides equino criopreservados? **Rev. Bras. Med. Vet.** 36: 355-361.
- SOARES, A.T.; GUERRA, M.M.P. 2009. Efeitos da criopreservação sobre a viabilidade espermática. **Tecnologia. & Ciência. Agropecuária** 3: 53-63.
- SOMFAI, T.; BODÓ, S.; NAGY, S.; GÓCZA, E.; IVÁNCSICS, J.; KOVÁCS, A. 2002. Simultaneous evaluation of viability and acrosome integrity of mouse spermatozoa using light microscopy. **Biotechnic & Histochemistry**, 77: 117-120.
- SOUZA, R.S. 2013. Perfil metabólico, qualidade e congelabilidade seminal de reprodutores caprinos suplementados com semente de linhaça (*Linum usitatissimum*) na dieta. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal), Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Bahia.
- SOUZA, W.L.; COSTA, J.M.S.; MORAES, E.A.; COELHO, V.G.; MAGALHÃES, L.M.V.; OLIVEIRA, R.P. 2015. Avaliação da integridade acrossomal de espermatozoides de carneiros tratados com melatonina antes da criopreservação. **Ciência Veterinária nos Trópicos** 18: 241-244.
- SUNDARAMAN, M.N.; EDWIN, M.J. 2006. Cryopreservation of Boer goat spermatozoa during cryopreservation cycle. **Journal veterinary research** 10: 117-124.
- SUNDARAMAN, M.N.; EDWIN, M.J. 2005 Evaluation of pre-freeze and post-thaw sperm motion characteristics of goat spermatozoa by computer-assisted semen analysis. **Indian Journal Small Ruminant** 11: 92-95.
- SUNDARARAMAN, M.N.; EDWIN, M.J. 2008. Changes in Motility Characteristics of Goat Spermatozoa During Glycerol-Equilibration and the Relevance to Cryopreservation. **Asian Journal of Cell Biology**, 3: 22-33.
- TABERNER, E.; MORATÓ, R.; MOGAS, T.; MIRÓ, J. 2010. Ability of Catalanian donkey sperm to penetrate zona pellucida-free bovine oocytes matured in vitro. **Animal Reproduction Science** 118: 354-361.
- TAKAHASHI, K.; KIKUCHI, K.; UCHIDA, Y.; KITAIAMA, S.K.; SUZUKI, R.; SATO, R.; TOMA, K.; GESHI, M.; AKAGI, S.; NAKANO, M.; YONEZAWA, N. 2013. Sperm binding to the Pellucid Zone mediated by sperm-binding proteins is not species specific in vitro between pigs and cattle. **Biomolecules** 3: 85-107.
- TOWHIDI, A.; PARQUES, J.E. 2012. 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 Genectis** 29: 1051-1056.
- TOWHIDI, A.; ZEINOALDINI, S.; ARDEBILI, R.; DAVACHI, N.D.; NASIRI, A.H. 2013. Combined n-3 Fatty Acids and α -Tocopherol Supplementation Improved the Ovine Sperm Cryosurvival. **Iranian Journal of Biotechnology** 11: 238-43.
- TSAKMAKIDIS, I.A. 2010. Ram semen evaluation: Development and efficiency of modern techniques. **Small Ruminant Research** 92: 126-130.
- VERSTEGEN, J.; IGUER-OUADA, M.; ONCLIN, K. 2002. Computer assisted semen analyzers in andrology research and veterinary practice. **Theriogenology** 57: 149-79
- VIDAL, A.H.; BATISTA, A.M.; DA SILVA, E.C.B.; GOMES, W.A.; PELINCA, M.A.; SILVA, S.V.; GUERRA, M.M.P. 2013. Soybean lecithin-based extender as an alternative for goat sperm cryopreservation. **Small Ruminant Research** 109: 47-51.
- VILLAVERDE, A.I.S.B.; MELO, C.M.; CORRENTE, J.E.; PAPA, F.O.; LOPES, M.D. 2008. Comparação entre dois métodos de coloração para análise morfológica e acrossomal de espermatozoides de gato doméstico (*felis catus*). **Ciência Animal Brasileira** 9: 686-692
- WALTERS, A.H.; EYESTONE, W.E.; SAAKE, R.G.; PEARSON, R.E.; GWAZDAUSKAS, F.C. 2004. Sperm morphology and preparation method affect bovine embryonic development. **Journal Andrology** 25: 554-563

YAN, L.; BAI, X.L.; FANG.; CHE, L.Q.; XU, S.Y.; WU, D. 2013. Effect of different dietary omega-3/omega-6 fatty acid ratios on reproduction in male rats. **Lipids in Health Disease** 12: 1-9.

YESTE, M.; ESTRADA, E.; ROCHA, L.G.; MARÍN, H.; RODRÍGUEZ-GIL, J.E.; MIRÓ, J. 2015. Cryotolerance of stallion spermatozoa is related to ROS production and mitochondrial membrane potential rather than to the integrity of sperm nucleus. **Andrology** 3: 395-407.

YON, S.J.; RAHMAN, M.D; KWON, W.S.; PARK, Y.J.; PANG, M.G. 2016. The addition of cryoprotectants significantly alters the epididymal sperm proteome. **Plos One** 3: 1-15

ZANIBONI, L.; RIZZI, R.; CEROLINI, S. 2006. Combined Effect of DHA and a-tocopherol Enrichment on Sperm Quality and Fertility in the Turkey. **Theriogenology** 65: 1813-1827.

CAPÍTULO 1 – ARTIGO 1

Artigo a ser submetido ao comitê editorial do periódico científico Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia, quails B2 na Área de Zootecnia/Recursos Pesqueiros.

**Ácido docosaexaenóico associado à vitamina E no meio diluidor para
criopreservação de sêmen caprino**

**Vitamin E associated docosahexaenoic acid in the diluent medium for
cryopreservation of goat semen**

Caline Santana da França; Larissa Pires Barbosa; Ana Lúcia Almeida Santana; Rosileia Silva Souza; Rodrigo Freitas Bittencourt; Paola Pereira das Neves Snoeck; Poliana Almeida Bezerra; Laiara Fernandes Rocha; William Morais Machado.

Universidade Federal do Recôncavo da Bahia – UFRB, Cruz das Almas - Bahia

Universidade Federal da Bahia – UFBA, Salvador - Bahia

Universidade Estadual de Santa Cruz – UESC, Ilhéus - Bahia

* Autor para correspondência. E-mail: francaes@outlook.com

RESUMO

O estudo teve como objetivo avaliar o efeito e determinar o melhor nível de inclusão de ácido docosahexaenoico no diluidor para criopreservação de sêmen caprino. Foram utilizados cinco machos Boer submetidos a 10 coletas viáveis por animal. Após avaliação os ejaculados foram agrupados (*pool*), fracionados em meio Tris gema, sendo: 0; 30; 45 e 60ng.mL⁻¹ de ácido docosahexaenoico acrescido de 0,4mmol de alfa-tocoferol. O sêmen foi criopreservado em máquina de congelamento TK 3000[®]. Os dados foram avaliados por Análise de Regressão a 5% de significância. No TTR não houve diferença (P>0,05) para motilidade e vigor espermáticos entre os tempos cinco e 180min, com médias inicial e final de (51,48±7,81%) e (1,00±7,75%) para motilidade e (2,10±0,64) e (0,10±0,17) para vigor; cinética espermática: MT (79,17±17,31%), MP (14,04±5,73%), VCL (58,82±6,35µm/s), VSL (22,49±3,63µm/s), VAP (35,17±4,52µm/s), LIN (38,69±5,79%), STR (63,99±6,64%), WOB (59,68±2,99%); hiposmótico, média de (69,66±9,76%) de espermatozoides reativos; integridade de membrana plasmática e acrossomal: média de (29,86±7,57%) de espermatozoides íntegros; potencial mitocondrial: Classe I (72,75±9,81%) e compactação de cromatina, média de (96,87±4,37%) de cromatina íntegra. Desta forma, a inclusão de até 60ng.mL⁻¹ de ácido docosahexaenoico não promoveu melhora nos parâmetros de qualidade seminal de caprinos pós-descongelamento, no entanto a sua toxicidade não foi constatada.

Palavras chave: CASA, espermatozoides, lipídios, membrana plasmática, ômega 3

ABSTRACT

The objective of this study was to evaluate the effect and to determine the best level of inclusion of docosahexaenoic acid in the diluent for cryopreservation of goat semen. Five Boer males were submitted to 10 viable collections per animal. After evaluation the ejaculates were pooled, fractionated in Tris gem medium, being: 0; 30; 45 and 60ng.mL⁻¹ of docosahexaenoic acid plus 0.4 mmol of alpha-tocopherol. The semen was cryopreserved in TK 3000® freezing machine. The data were evaluated by Regression Analysis at 5% of significance. In the TTR there was no difference ($P > 0.05$) for sperm motility and vigor between the five and 180min times, with initial and final means of ($51.48 \pm 7.81\%$) and ($1.00 \pm 7.75\%$) for motility and (2.10 ± 0.64) and (0.10 ± 0.17) for vigor; spermatic kinetics: MT ($79.17 \pm 17.31\%$), MP ($14.04 \pm 5.73\%$), VCL ($58.82 \pm 6.35 \mu\text{m} / \text{s}$), VSL ($22.49 \pm 3.63 \mu\text{m} / \text{s}$), VAP ($35.17 \pm 4.52 \mu\text{m} / \text{s}$), LIN ($38.69 \pm 5.79\%$), STR ($63.99 \pm 6.64\%$), WOB ($59.68 \pm 2.99\%$); hyposmotic, mean ($69.66 \pm 9.76\%$) of reactive spermatozoa; plasma and acrosomal membrane integrity: mean ($29.86 \pm 7.57\%$) of intact spermatozoa; mitochondrial potential: Class I ($72.75 \pm 9.81\%$) and chromatin compaction, mean ($96.87 \pm 4.37\%$) of whole chromatin. Thus, the inclusion of up to 60ng.mL⁻¹ of docosahexaenoic acid did not promote improvement in seminal quality parameters of post-thawing goats, however their toxicity was not observed.

Key words: CASA, spermatozoa, lipids, plasma membrane, omega 3

INTRODUÇÃO

A membrana plasmática é uma estrutura altamente dinâmica que envolve toda a superfície do espermatozoide, mas embora seja contínua, difere regionalmente. A composição lipídica da membrana plasmática dos espermatozoides é um dos principais determinantes da capacidade de criopreservação. Em diferentes espécies de mamíferos, até 60% do fosfolípido ligado ao total de ácidos graxos das células são ácidos graxos poli-insaturados (PUFAs) de cadeia longa, especialmente o ácido docosahexaenoico (DHA) (Flesch e Gadella, 2000).

A fluidez da membrana está associada à disponibilidade de DHA, essencial para a motilidade da cauda do espermatozoide (Towhide *et al.*, 2013). Desta forma a concentração de DHA na membrana plasmática tem sido positivamente associada a melhora da motilidade espermática em humanos (González-ravina *et al.*, 2018) e animais (Losano *et al.*, 2018), e isto está relacionado a presença das duplas ligações.

A adição de uma fonte de PUFAs ao meio diluidor parece ser benéfica ao espermatozoide, conferindo maior proteção durante o processo de criopreservação. A maior fluidez e flexibilidade da membrana plasmática aumentam a tolerância ao congelamento e à prevenção da ruptura da membrana da célula espermática pela formação de cristais de gelo durante o processo de congelamento e descongelamento (Ansari *et al.*, 2012)

Estudos relatam efeitos vantajosos na suplementação *in vitro* de algumas fontes de PUFAs no meio de congelamento, como o óleo de peixe que é rico em DHA (Del Valle *et al.*, 2013; Machado *et al.*, 2018), ácido alfa-linolênico (Kaka *et al.*, 2015; Nasiri *et al.*, 2012) e ácido linoleico (Takahashi *et al.*, 2012), esses aditivos demonstram ser uma alternativa promissora como componente em diluentes seminais.

No entanto é importante ressaltar que a inclusão de uma fonte de PUFAs deve estar associada a um antioxidante devido à susceptibilidade das duplas ligações do DHA a ação das espécies reativas de oxigênio (ROS). Neste contexto, o estudo tem como objetivo avaliar o efeito e determinar o melhor nível de inclusão de DHA, no diluidor, para criopreservação de sêmen caprino.

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido na fazenda Agropecuária BANTU no município de Itaberaba/Bahia, no período de abril a maio de 2018 e as análises seminais no Laboratório de Reprodução Animal do Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia em Cruz das Almas – Ba e no Laboratório de Reprodução Animal da Universidade estadual de Santa Cruz em Ilhéus – BA.

O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética de no Uso dos Animais (CEUA) da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, sob número de protocolo 23007.011081/2017-65.

Foram utilizados cinco machos adultos da raça Boer, com idade média de $2,75 \pm 1,50$ anos, selecionados mediante exame andrológico prévio, seguindo as normas do Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA, 2013). Os animais foram mantidos em sistema intensivo de produção, recebendo feno de capim-Buffel (*Cenchrus ciliaris* L.) e mistura concentrada à base de farelos de milho e soja, formulada segundo o NRC (2007), e água *ad libitum*.

As coletas seminais foram realizadas pelo método de vagina artificial, utilizando-se uma fêmea em estro como manequim, com intervalo de 24 horas entre as coletas, totalizando 10 coletas viáveis. Após a coleta, os ejaculados foram avaliados quanto aos aspectos físicos (volume seminal, aspecto seminal, turbilhonamento espermático, motilidade espermática progressiva e vigor espermático) em microscopia de interferência diferencial de fase (Olympus®, Tóquio, Japão). As amostras com motilidade $\geq 70\%$ e vigor espermático ≥ 3 , foram agrupadas para formação de um *pool* e uma amostra retirada para avaliação da morfologia e determinação da concentração espermática (CBRA, 2013).

Para avaliação da morfologia espermática, uma alíquota de 20 μ L de sêmen foi preservada em 1mL de citrato formolizado a 4%, utilizando-se a técnica de preparação úmida sob microscopia de interferência diferencial de fase, com aumento de 400 vezes, 200 células serão contadas e avaliadas quanto aos defeitos maiores, menores e totais (CBRA, 2013)

A concentração espermática foi avaliada após diluição de 10 μ L de sêmen em 4mL de citrato formolizado a 4% e posterior contagem dos espermatozoides em câmara de

Neubauer com uso de microscopia de interferência diferencial, sob aumento de 400 vezes (CBRA, 2013).

Após a formação do *pool*, este foi reavaliado quanto aos aspectos físicos, as amostras que apresentaram valores dentro dos padrões exigidos pelo CBRA (2013) foram diluídas e fracionadas em quatro grupos (G) contendo níveis de ácido docosahexaenoico: G1: 0ng.mL⁻¹; G2: 30ng.mL⁻¹; G3: 45ng.mL⁻¹ e G4: 60ng.mL⁻¹, acrescido de 0,4mmol de alfa-tocoferol, diluído em solução de etanol a 0,05% no diluidor Tris-gema (ROBERTS, 1986).

A solução estoque de DHA (Sigma-Aldrich[®], Brasil, Ltda) foi calculada considerando seu peso molecular de 328,49g/mol e diluída em 100mL de solução de etanol a 0,05%. Para cada grupo foi acrescido 0,4mmol de alfa-tocoferol (Sigma-Aldrich[®], Brasil) diluído em solução de etanol a 0,05%.

Após diluição final para obtenção da concentração de 150x10⁶ espermatozoides por dose, o sêmen foi envasado em palhetas de 0,25mL e criopreservado em máquina de criopreservação (TK 3000[®]) em duas etapas, sendo a primeira referente à curva positiva (resfriamento a 0,25°C/min até alcançar +5°C iniciando em 32°C) e a segunda referente à curva negativa, dividida em duas fases: congelamento a partir de +5°C, em uma velocidade de 10°C/min e 5°C/min até atingir -120°C. Com o fim do processo de congelamento as palhetas foram submersas em nitrogênio líquido, acondicionadas em raques e armazenadas em botijão criogênico (-196°C) e em seguida armazenadas até a avaliação. Para avaliação de motilidade e vigor pós-descongelamento, as palhetas foram descongeladas em banho-maria 37°C por 30 segundos.

A cinética espermática foi avaliada pelo *Computer Assisted Sperm Analysis - SCA*[®] (CASA). As palhetas foram rediluídas para obter uma concentração final de 50x10⁶/mL. Os padrões utilizados para o ajuste do equipamento foram baseados nas recomendações do programa *Sperm Class Analyser*[®] (Microptics S.L, v.5.2, Barcelona, Espanha) para análise de espermatozoide caprino, conforme a seguir: 25 imagens/segundo com 25Hz; tamanho de partícula capturado entre 3 e 70µm/m²; espermatozoides considerados lentos <10µm/s, médios de 45 a 75µm/s e rápido acima de 75µm/s. Foram avaliados os seguintes parâmetros: Motilidade total (MT, %), motilidade progressiva (MP, %), Velocidade média do trajeto (VAP, µm/s), Velocidade Curvilinear

(VCL, $\mu\text{m/s}$), Velocidade Linear Progressiva (VSL, %), Retilineariedade (STR, %), Linearidade (LIN, %) e o Índice de Oscilação (WOB, %).

A integridade funcional da membrana plasmática foi avaliada pelo Teste Hiposmótico (HOST), utilizando-se 1mL de solução hiposmótica contendo frutose (100mOsmol/Kg), acrescida de 10 μL de sêmen de cada partida e incubada por 30 minutos em banho-maria a 37°C. Para quantificação do HOST, 200 células espermáticas foram classificadas em microscopia de contraste de fase, com aumento de 1000 vezes, sob imersão, quanto à presença ou não de cauda dobrada, segundo descrito por Kumi-Diaka (1993). O cálculo do número de espermatozoides reativos ao HOST foi realizado por intermédio da fórmula citada por Melo e Henry (1999). $\text{HOST\%} = (\% \text{ de alterações na região da cauda após o HOST}) - (\% \text{ de alterações na região da cauda antes do HOST})$.

A integridade estrutural das membranas, plasmática e acrossomal, foi avaliada utilizando um microscópio fluorescente (400X; Olympus® BX 51) após a coloração do espermatozoide com corantes fluorescentes diacetato de carboxifluoresceína (CFDA) e iodeto de propídio (IP) de acordo com o método de Harrison e Vickers (1990). A coloração com CFDA foi avaliada usando o conjunto padrão de filtro de fluoresceína, enquanto a coloração com IP foi avaliada usando o conjunto padrão de filtros de rodamina. Foram analisados 200 espermatozoides por amostra.

A atividade mitocondrial dos espermatozoides foi avaliada por meio da incubação de 20 μL de cada amostra descongelada com 20 μL de 3,3'-diaminobenzidine (DAB) (Sigma-Aldrich®, Brasil, Ltda) 1mg/mL de fosfato salino tamponado (PBS) a 37°C, por 60 minutos na ausência de luz. Após incubação, foram feitos esfregaços, os quais foram fixados em formaldeído a 10% por 10 minutos, lavados em água destilada e secados ao ar sob proteção de luz. Em microscópio de interferência diferencial de fase (Olympus®, Tóquio, Japão), sob aumento de 1.000 vezes, 200 espermatozoides por lâmina foram avaliados e classificados segundo Hrudka (1987), de acordo com a deposição do corante na peça intermediária 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).

Para análise da compactação da cromatina espermática utilizou-se o protocolo de Beletti e Mello (2004). Foram confeccionados esfregaços com uma alíquota de cada palheta descongelada, após secagem em temperatura ambiente, os esfregaços foram

fixados em solução Carnoys durante 1 minuto e, em seguida, em etanol 70%, durante 3 minutos. Realizou-se uma hidrólise com ácido clorídrico 4N por 15 minutos, lavagem em água destilada e secagem em temperatura ambiente. Para coloração dos esfregaços uma gota de solução do corante azul de toluidina a 0,025% em tampão McIlvaine, pH 4,0, foi depositada entre lâmina e lamínula (Mello, 1982). Foram avaliados 500 espermatozoides por lâmina em microscopia de luz, sob objetiva de imersão de 1000 vezes e classificados quanto: cromatina íntegra (região da cabeça corada em azul claro); cromatina fragmentada (região da cabeça corada em azul escuro ou violeta). Todos os testes foram realizados pelo mesmo observador e avaliados subjetivamente.

Foi utilizado o delineamento inteiramente casualizado (DIC). Os dados foram avaliados quanto à normalidade por meio do teste de Shapiro-Wilk. As variáveis que apresentaram distribuição normal foram analisadas por ANOVA e o Teste de Regressão e os dados não-paramétricos foram avaliados pelo teste Kruskal Wallis a 5% de significância. Foi utilizado o programa SPSS versão 23 (1989 – 2015).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Não houve diferença para motilidade espermática progressiva ($51,48 \pm 7,81\%$) ($P=0,238$) e vigor espermático ($2,10 \pm 0,64$) ($P=0,976$) pós-descongelamento, avaliados em microscopia de contraste de fase, entre os tratamentos e entre os tempos cinco e 180min, com média inicial e final de $69,25 \pm 5,95\%$ e $1,00 \pm 7,75\%$; para motilidade e de $2,60 \pm 0,54$ e $0,10 \pm 0,17$; para vigor, em teste de termorresistência lento (Tab. 1).

Tabela 1 - Motilidade espermática progressiva e vigor espermático pós-descongelamento no Teste de termorresistência lento (TTR) do sêmen de caprinos criopreservado com níveis de ácido docosahexaenoico (DHA) no diluidor

Parâmetros	Níveis de DHA ng.mL ⁻¹				
	0 (C)	30	45	60	TOTAL
Motilidade Espermática Progressiva (%)					
Sêmen fresco	86,00±3,16	86,00±3,16	86,00±3,16	86,00±3,16	86,00±3,16
Mot pós-desc.	48,00±9,18	52,77±7,54	53,50±7,47	51,66±7,07	51,48±7,81
TTR Mot 5'	71,00±4,18	71,00±8,94	66,00±4,18	69,00±6,51	69,25±5,95
TTR Mot 60'	44,00±14,31	46,00±8,21	46,00 ±8,94	50,00±6,12	46,50±9,40
TTR Mot 120'	18,20±16,54	22±13,03	23,00±12,04	20,00±10,60	20,75±13,05
TTR Mot 180' ¹	1,00±8,00 ¹	1,00±5,00 ¹	1,00±5,00 ¹	1,00±13,00 ¹	1,00±7,75 ¹
Vigor Espermático (0 a 5)					
Sêmen fresco	3,85±0,24	3,85±0,24	3,85±0,24	3,85±0,24	3,85±0,24
Vig pós-desc.	2,00±0,74	2,16±0,55	2,05±0,68	2,22±0,61	2,10±0,64
TTR Vig 5'	2,60±0,74	2,50±0,61	2,60 ±0,41	2,90 ±0,41	2,60±0,54
TTR Vig 60'	1,40±0,74	1,60±0,54	1,50±0,35	1,80±0,57	1,50±0,55
TTR Vig 120' ¹	0,10±0,65 ¹	0,50±0,45 ¹	0,50±0,45 ¹	0,50±0,45 ¹	0,40±0,50 ¹
TTR Vig 180' ¹	0,10±0,30 ¹	0,10±0,05 ¹	0,10±0,05 ¹	0,10±0,30 ¹	0,10±0,17 ¹

C= Controle; TTR = Teste de Termorresistência; Mot = Motilidade espermática; Vig= Vigor espermático. Os dados foram analisados por ANOVA e Análise de Regressão e para dados não-paramétricos o teste Kruskal Wallis a 5% de significância. Os dados referem-se às médias±desvio padrão e (¹) refere-se à mediana±amplitude interquartil. Não houve diferença estatística ($P>0,05$).

Os resultados de motilidade e vigor espermático pós-descongelamento apresentam-se dentro dos parâmetros preconizados pelo CBRA (2013) para sêmen

caprino criopreservado, sendo motilidade espermática progressiva igual ou superior a 30% e vigor espermático igual ou superior a 2,0; após descongelamento.

Os níveis de DHA adicionados ao meio diluidor Tris-Gema não alteraram a resistência espermática, pois não foram eficientes em promover maiores valores de motilidade e vigor espermático pós-descongelamento ou durante o TTR, quando comparados ao tratamento controle. Foi utilizado uma fonte purificada de DHA, a qual as concentrações utilizadas como suplemento ao meio diluidor seminal podem ter sido inferiores as necessárias para fornecer melhor proteção aos espermatozoides e maior fluidez da membrana por meio da sua incorporação.

Segundo Ansari *et al.* (2012) a adição de 10ng mL^{-1} de uma fonte de ômega 3, como precursora de DHA, adicionada ao meio diluidor seminal de caprinos melhorou a motilidade espermática devido a sua incorporação a membrana plasmática das células, a qual promoveu proteção aos espermatozoides frente ao processo de criopreservação. No entanto, Kaka *et al.* (2015) encontraram melhores valores para motilidade e vigor espermático trabalhando com uma dose mais baixa, 5ng.mL^{-1} de uma fonte de ômega 3 adicionado ao diluidor seminal de bovinos.

Não houve diferença para os parâmetros de cinética espermática avaliados por meio do CASA ($P>0,05$) (Tab. 2).

Tabela 2 - Valores de cinética espermática avaliada no sistema computadorizado de análise do movimento espermático - CASA do sêmen de caprinos criopreservado com níveis de ácido docosahexaenoico (DHA) no diluidor

Parâmetros	Níveis de DHA (ng.mL^{-1})				
	0 (C)	30	45	60	TOTAL
MT (%) ¹	80,50±19,25 ¹	81,90±19,75 ¹	78,80±8,95 ¹	75,50±21,30 ¹	79,17±17,31 ¹
MP (%)	14,11±5,39	14,14±5,05	13,58±6,17	14,36±6,31	14,04±5,73
VCL ($\mu\text{m/s}$)	58,08±8,14	60,04±6,28	56,15±2,72	61,04±8,29	58,82±6,35
VSL ($\mu\text{m/s}$)	22,46±4,07	22,81±3,17	21,68±3,57	23,02±3,71	22,49±3,63
VAP ($\mu\text{m/s}$)	34,62±5,79	35,93±4,80	33,28±2,28	36,88±5,24	35,17±4,52
LIN (%)	38,74±4,97	38,03±4,20	40,01±8,24	37,98±5,76	38,69±5,79
STR (%)	65,00±5,98	63,64±6,23	64,64±7,34	62,68±7,04	63,99±6,64
WOB (%)	59,47±2,82	59,75±2,56	59,11±3,74	60,40±2,87	59,68±2,99

C= Controle; MT= Motilidade Total; MP= Motilidade Progressiva; VCL= Velocidade Curvilínea; VSL= Velocidade Linear Progressiva; VAP= Velocidade de Trajeto; LIN= Linearidade; STR= Retilinearidade; WOB= Índice de Oscilação ou Wobble (VAP/VCL) x 100. Os dados foram analisados por ANOVA e Análise de Regressão a 5% de significância. 1= Os dados referem-se à Mediana±Amplitude interquartil. Os dados referem-se às médias±desvio padrão. Não houve diferença estatística ($P>0,05$).

Para motilidade total foi encontrado valor médio de $79,17 \pm 17,31\%$ ($P=0,824$), resultados semelhantes foram encontrados por Soares *et al.* (2011), com sêmen criopreservado de caprino com meio a base de Tris-Gema com média para MT de $77,22 \pm 18,56\%$ e $26,26 \pm 12,21\%$, para MP. Valores abaixo destes foram encontrados por Oliveira *et al.* (2011), utilizando um meio a base de Tris-Gema para criopreservação de sêmen caprino com média de $54,6 \pm 16,3\%$ para MT. No entanto, os mesmos autores encontraram uma média de $30,9 \pm 12,5\%$ para MP, valores superiores ao presente estudo com média de $14,04 \pm 5,73\%$ ($P=0,988$). Segundo Sundaraman e Edwin (2006), o processo de criopreservação do sêmen caprino tem um efeito deletério sobre as motilidades total e progressiva e sobre a velocidade de trajeto.

Os valores de velocidade curvilínea (VCL), velocidade linear progressiva (VSL) e velocidade de trajeto (VAP) foram respectivamente, $58,82 \pm 6,35 \mu\text{m/s}$ ($P=0,862$); $22,49 \pm 3,63 \mu\text{m/s}$ ($P=0,959$); $35,17 \pm 4,52 \mu\text{m/s}$ ($P=0,845$). Dorado *et al.* (2009), avaliando a cinética espermática de ejaculados caprinos com motilidade total $\leq 91\%$ após criopreservação obtiveram valores de VCL de $126,35 \mu\text{m/s}$, VSL de $81,61 \mu\text{m/s}$ e VAP de $92,36 \mu\text{m/s}$.

Verstegen *et al.* (2002), na tentativa de correlacionar os parâmetros do CASA com a taxa de fertilização, verificaram que os valores de VAP, VSL e VCL são significativamente maiores em amostras que produzem mais de 50% de oócitos fertilizados do que naquelas em que a taxa de fertilização de oócito é menor que 50%. Esses dados corroboram com os encontrados por Cox *et al.* (2006) constataram haver alta correlação entre os valores da velocidade curvilínea, da velocidade média da trajetória e da velocidade em linha reta com a eficiência de migração dos espermatozoides de caprinos das raças Saanen, British Alpine e Boer através do muco cervical.

A linearidade espermática é outra variável gerada pelo sistema CASA que parece ter correlação com a fertilidade (Verstegen *et al.*, 2002), no presente estudo a média para linearidade foi de $38,69 \pm 5,79\%$ ($P=0,899$). Em caprinos espermatozoides com velocidade eficiente na migração do muco cervical *in vitro* apresentam linearidade $>50\%$ (Cox *et al.*, 2006).

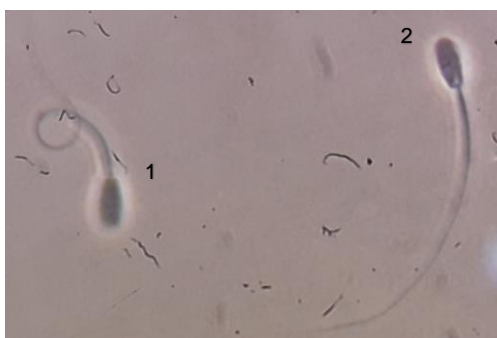
Os baixos percentuais dos parâmetros gerados pelo CASA encontrados neste estudo podem estar relacionados a possíveis desequilíbrios entre as espécies reativas de oxigênio (ROS) e a concentração de antioxidante durante o processo de congelamento, o

qual pode ter comprometido a fisiologia e a viabilidade das células espermáticas (Apriokur, 2013).

De acordo com Amann e Katz (2004), os dados obtidos pelo sistema CASA permitem a detecção de súbitas mudanças na cinética espermática e, dessa forma, melhoram a avaliação do uso de novos processos de criopreservação, refrigeração, bem como de sêmen fresco em relação aos tratamentos laboratoriais, como diluidores, crioprotetores e outros processos. Por isso, tem sido sugerido que os procedimentos de congelamento e descongelamento reduzem a cinemática dos espermatozoides caprinos, mensurados objetivamente por métodos computadorizados (Dorado *et al.*, 2005; Sundaraman e Edwin, 2005; Dorado *et al.*, 2007).

Não houve diferença para o teste de integridade funcional de membrana (HOST) do sêmen de caprinos criopreservado com níveis de DHA no diluidor, apresentando médias de $69,66 \pm 9,76\%$ ($P=0,441$) para espermatozoides reativos e $30,01 \pm 8,66\%$ para não reativos ($P=0,660$) (Tab. 3) (Fig. 1). Machado *et al.* (2018), utilizando um meio diluidor a base de Citrato-Gema enriquecido com níveis de óleo de peixe para criopreservação de sêmen caprino também não obtiveram melhora no teste hiposmótico.

Figura 1 - Espermatozoides de caprinos submetidos ao Teste Hiposmótico. 1 - Membrana plasmática íntegra; 2 – Membrana plasmática lesionada



Fonte: Arquivo pessoal

No entanto, Abdi-Benemar *et al.* (2015), também utilizando em seu estudo, o óleo de peixe como fonte de DHA nas concentrações de 0,15; 0,30; 0,45 g e $150\mu\text{M}$ de vitamina E diretamente no diluente para criopreservar o sêmen de reprodutores ovinos, obtiveram melhores resultados suplementando até o nível de 0,30g de óleo de peixe para integridade de membrana plasmática ($50,74 \pm 0,92\%$).

Tabela 3 -Teste Hiposmótico do sêmen de caprinos criopreservado com níveis de ácido docosahexaenoico (DHA) no diluidor

HOST (%)	Níveis de ácido docosahexaenoico (DHA) (ngmL ⁻¹)				
	0 (C)	30	45	60	Total
Reativos	67,45±7,01	71,10±8,64	68,00±12,05	72,10±11,34	69,66±9,76
Não reativos	32,55±7,06	28,90±8,64	30,40±8,86	28,55±10,09	30,01±8,66

C= Controle; HOST=Teste de Hiposmótico. Os dados foram analisados por ANOVA e Análise de Regressão a 5% de significância. Os dados referem-se às médias±desvio padrão. Não houve diferença estatística (P>0,05).

A presença de DHA na membrana espermática aumenta a tolerância criogênica e mantém as propriedades fisiológicas da bicamada lipídica (Kaka *et al.*, 2015). No entanto a combinação de DHA com a vitamina E no presente estudo não foram eficazes em proporcionar maior crio-resistência ao sêmen caprino.

Isso pode ser justificado devido à baixa concentração do DHA na membrana plasmática do espermatozoide após o descongelamento. Towhide *et al.* (2013) avaliaram a incorporação de uma fonte de ômega 3 no diluidor de sêmen ovino e observaram que houve incorporação do DHA no sêmen antes do congelamento, no entanto após o descongelamento houve uma redução significativa na concentração. Segundo o mesmo autor, em decorrência da produção excessiva de ROS durante a criopreservação.

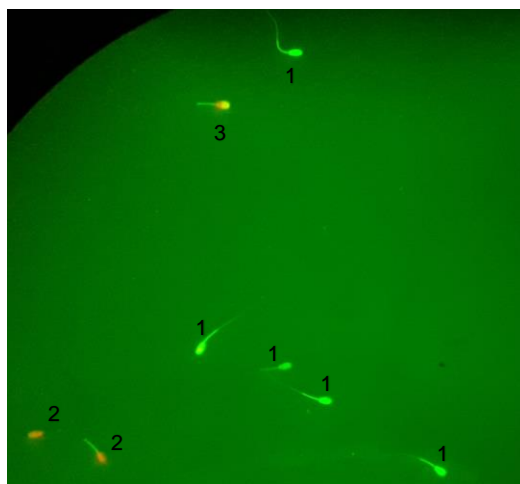
Não houve diferença para o teste de integridade de membrana plasmática e acrossomal avaliados por meio das sondas diacetato de 6-carboxifluoresceína/iodeto de propídeo (CFDA/IP) do sêmen de caprinos criopreservados com níveis de DHA no diluidor, apresentando médias de 29,86±7,57% (P=0,622) para espermatozoides íntegros, 48,39±7,95% (P=0,317) para lesados e 21,74±7,46% (P=0,854) para semilesados (P=0,635) (Tab. 4) (Fig. 2).

Tabela 4 - Resultados das análises pós descongelamento referentes a integridade de membrana plasmática e acrossomal, após avaliação pela epifluorescência CFDA/IP

(%)	Níveis de DHA (ngmL ⁻¹)				
	0 (C)	30	45	60	TOTAL
Íntegro	30,82±7,71	32,88±8,21	28,70±10,75	27,05±8,39	29,86±7,57
Lesado	46,50±9,68	44,77±8,75	51,05±6,45	51,27±6,94	48,39±7,95
Semilesado	22,72±9,56	22,33±10,61	20,25±8,19	21,66±8,50	21,74±7,46

C= Controle. Os dados foram analisados por ANOVA e Análise de Regressão a 5% de significância. Os dados referem-se às médias±desvio padrão. Não houve diferença estatística (P>0,05).

Figura 2 – Espermatozoides de caprinos submetidos ao Teste de integridade de membrana plasmática e acrossomal por meio de epifluorescência CFDA/IP 1 – Membrana plasmática e acrossomal íntegra; 2 – Membrana plasmática e acrossomal lesionada; 3 – Membrana plasmática lesionada e acrossomal íntegra



Fonte: Arquivo pessoal

Quando o CFDA é associado ao IP, três populações de células podem ser identificadas, como descrito por Harrison e Vickers (1990): vivas, se coram em verde; mortas, em vermelho e uma terceira população se cora com ambos, acrossomo em verde e núcleo em vermelho e são consideradas lesadas com acrossomo intacto. Os achados deste estudo são semelhantes ao de Del Valle *et al.* (2013), utilizando níveis de óleos vegetais (óleo de coco ou óleo de palma) no diluidor de sêmen ovino, não encontraram diferença para a integridade de membrana plasmática e acrossomal, analisadas por meio das sondas FITC-PNA/PI através de citometria de fluxo.

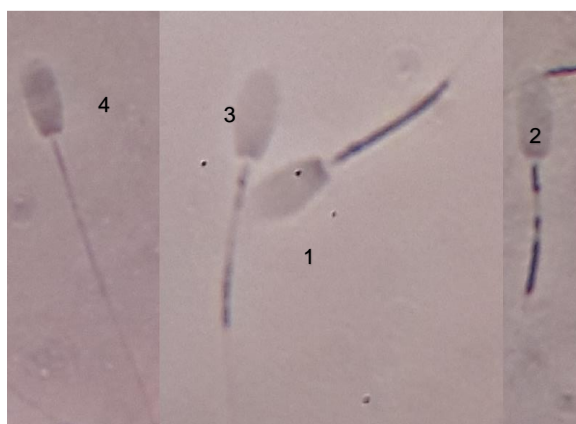
Segundo Towhide *et al.* (2013), 99% do conteúdo de DHA está presente na cauda do espermatozoide e não na cabeça. O que pode justificar a ausência de resultados em termos de melhora nos danos a membrana acrossomal neste estudo.

Os benefícios da incorporação do DHA são refletidos principalmente com o aumento da motilidade dos espermatozoides através do aumento da fluidez da membrana (Ansari *et al.*, 2012). Por outro lado, o aumento do PUFAs leva a uma maior susceptibilidade a peroxidação lipídica causando modificações na membrana plasmática do espermatozoide durante o processo de criopreservação (Bucak *et al.*, 2010). Nesse sentido, o sistema antioxidante exerce um papel importante no equilíbrio entre a presença

de ROS e a função antioxidante. Assim, um nível mais elevado de antioxidante pode ser benéfico quando altas concentrações de PUFA são utilizadas.

Não houve diferença para o teste de atividade mitocondrial nas classes I, II, III e IV ($P>0,05$) do sêmen de caprinos criopreservado com níveis DHA no diluidor, apresentando médias de: $72,75\pm 9,81$ ($P=0,358$); $10,93\pm 4,64$ ($P=0,130$); $9,83\pm 5,11$ ($P=0,859$) e $6,46\pm 7,25\%$ ($P=0,745$), respectivamente (Tab. 5) (Fig. 3).

Figura 3 – Espermatozoides de caprinos corados com 3,3'-diaminobenzidina (DAB) para avaliação da atividade mitocondrial. 1 - classe I; 2 - classe II; 3 - classe III; 4 - classe IV



Fonte: Arquivo pessoal

Tabela 5 - Teste de atividade mitocondrial do sêmen de caprinos criopreservado com níveis de ácido docosahexaenoico (DHA) no diluidor

Mitocôndria (%)	Níveis de DHA (ngmL ⁻¹)				
	0 (C)	30	45	60	TOTAL
Classe I	70,85±6,06	73,44±14,64	76,95±9,08	69,77±9,48	72,75±9,81
Classe II	11,70±2,88	10,33±6,45	8,65±4,27	13,05±4,99	10,93±4,64
Classe III	9,90±4,31	9,77±6,19	8,80±4,24	10,88±5,73	9,83±5,11
Classe IV	7,55±6,33	6,44±7,18	5,60±5,56	6,27±9,96	6,46±7,25

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. C= Controle. Os dados foram analisados por ANOVA e Análise de Regressão a 5% de significância. Os dados referem-se às médias±desvio padrão. (*). Não houve diferença significativa ($P>0,05$).

O potencial mitocondrial tem uma forte correlação com o potencial energético da célula e com a motilidade, logo está correlacionado com a fertilidade (Tsakmakidis *et al.*, 2010). Estes dados corroboram com os achados por Hemachand e Shaha (2003) e Marco-Jiménez *et al.* (2006), trabalhando com espermatozoides caprinos, relataram haver relação entre o padrão de coloração da sonda fluorescente JC-1 e a motilidade

espermática. Segundo Cavalcante *et al.* (2005), após o descongelamento o índice de atividade citoquímica para raças Boer e Alpina, foram respectivamente, 66,00 e 67,25%, presumindo que mais da metade das mitocôndrias estão ativas nos espermatozoides após o descongelamento, o que é compatível para suportar o percentual de motilidade espermática quando avaliada após a descongelação.

Não houve diferença para a análise da compactação da cromatina ($P>0,05$) do sêmen de caprinos criopreservado com níveis de DHA no diluidor, apresentando médias de $96,87\pm 4,37\%$ ($P=0,574$) para cromatina íntegra e $2,95\pm 2,40\%$ ($P=0,635$) para cromatina fragmentada (Tab. 6). Esses dados mostram que o protocolo de criopreservação e o diluente utilizado independente da inclusão de DHA neste estudo foi eficiente e não promoveu danos ao DNA. Visto que, de acordo com Kamimura *et al.* (2010), para o sêmen caprino antes de passar pelo processo de criopreservação a média de fragmentação de cromatina é de $1,54\pm 0,16\%$.

Tabela 6 - Análise da compactação da cromatina espermática do sêmen de caprinos criopreservado com níveis de ácido docosahexaenoico (DHA) no diluidor

Cromatina (%)	Níveis de DHA (ngmL^{-1})				
	0 (C)	30	45	60	TOTAL
Íntegra	$96,20\pm 4,20^1$	$97,20\pm 2,80^1$	$97,30\pm 6,60^1$	$96,80\pm 3,90^1$	$96,87\pm 4,37^1$
Fragmentada	$2,62\pm 2,11$	$3,66\pm 2,28$	$2,86\pm 3,05$	$2,66\pm 2,19$	$2,95\pm 2,40$

C= Controle. Os dados foram analisados através do teste não-paramétrico Kruskal Wallis a 5% de significância. Os dados referem-se à ⁽¹⁾ mediana±amplitude interquartil. Não houve diferença estatística ($P>0,05$).

Büstüner *et al.* (2015) avaliaram o efeito da taxa de congelamento na morfologia do sêmen caprino e na integridade do DNA. Os autores afirmaram que embora taxas de motilidade e integridade acrossomal nos grupos tenham sido semelhantes ($P> 0,05$), motilidade espermática e integridade acrossomal foram progressivamente reduzidos pelo processo de congelamento-descongelamento ($P <0,05$). No entanto não houve diferença significativa entre os estágios de congelamento em termos de fragmentação do DNA. Segundo Maia *et al.* (2009), o processo de criopreservação acarreta em estresse oxidativo à célula espermática, entretanto a adição de antioxidantes aos meios de congelação e refrigeração de sêmen ajuda a proteger o espermatozoide contra o dano induzido pelos radicais livres, pois em altas concentrações são prejudiciais às funções celulares, podendo danificar todos os tipos de biomoléculas, incluindo DNA, proteínas e lipídios.

CONCLUSÃO

Conclui-se que a inclusão de até 60ngmL^{-1} de ácido docosahexaenoico no meio diluidor não promoveu melhora nos parâmetros de qualidade seminal de caprinos pós-descongelamento, no entanto a sua toxicidade não foi constatada.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDI-BENEMAR, H.; JAFAROGHLI, M.; KHALILI, B. et al. Supplementation of the extender containing egg yolk and α -tocopherol on the freezability and post-thawing fertility of ram semen. *Small Ruminant Research*, v.130, p.166-170, 2015.
- AMANN, R.P.; KATZ, D.F. Reflections on CASA After 25 Years. *Journal of Andrology*, v. 25, p. 317-325, 2004.
- ANSARI, M.; TOWHIDI, A.; SHAHRBABAK, M.M.; BAHREINI, M. Docosahexaenoic acid and alpha-tocopherol improve sperm cryosurvival in goat. *Slovak Journal of Animal Science*, v.45, p.7-13, 2013.
- APRIOKUR, J.S. Pharmacology of free radicals and the impact of reactive oxygen species on the testis. *Journal Reproduction and Infertility*, v.14, 158-172, 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.
- BUCAK, M.N.; SARIÖZKANB, S.; TUNCER, P.B. The effect of antioxidants on post-thawed Angora goat (*Capra hircus ancyrensis*) sperm parameters, lipid peroxidation and antioxidant activities. *Small Ruminant Research*, v.89, p.24-30, 2010.
- BÜSTÜNER, B.; NUR, Z; ALÇAY, S. et al. Effect of freezing rate on goat sperm morphology and DNA integrity. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*, v.39, p.110-114, 2015.
- CAVALCANTE, T. V.; ESPER, C. R.; FERREIRA, J. L. Avaliação da atividade mitocondrial em espermatozoides pós-colheita e pós-descongelção de caprinos das raças boer e alpina durante as estações reprodutiva e não reprodutiva. *Arquives of Veterinary Science*, v.10, p.89-93, 2005.
- COX, J.F.; ALFAROA, V.; MONTENEGROA, V.; MARTINEZ H.R. Computer-assisted analysis of sperm motion in goats and its relationship with sperm migration in cervical mucus. *Theriogenology*, v.66, p.860-867, 2006..
- DEL VALLE, I.; SOUTER, A.; MAXWELL, W.M.C. Function of ram spermatozoa frozen in diluents supplemented with casein and vegetable oils. *Animal Reproduction Science*, v.138, p.213-219, 2013.

- DORADO, J.; RODRÍGUEZ, I.; HIDALGO, M. Cryopreservation of goat spermatozoa: Comparison of two freezing extenders base don post-thaw sperm quality and fertility rates after artificial insemination. *Theriogenology*, v.68, p.168-177, 2007.
- DORADO, J.; HIDALGO, M.; MUÑOZ, M.; RODRÍGUEZ et al. Assessment of goat semen freezability according to the spermatozoa characteristics from fresh and frozen sample. *Animal Reproduction Science*, v.112, p.150-157, 2009.
- DORADO, J.; RODRIGUEZ, I.; HIDALGO, M.; SANZ, J. Computer-assisted analysis of goat sperm motility and velocity before and after cryopreservation. *Reproduction in Domestic Animals*, v.40, p.401-402, 2005.
- FLESH, F.M.; GADELLA, B.M. Dynamics of the mammalian sperm plasma membrane in the process of fertilization. *Biochimica et Biophysica Acta*, v.1469, p.197-235, 2000.
- GONZÁLEZ-RAVINA, C.; AGUIRRE-LIPPERHEIDE, M.; PINTO, F. et al. Effect of dietary supplementation with a highly pure and concentrated docosahexaenoic acid (DHA) supplement on human sperm function. *Reproductive Biology*, v.18, p.282-288, 2018.
- HARRISON, R.A.P.; VICKERS, S.E. Use of fluorescent probes to acess membrane integrity in mammalian spermatozoa. *Journal of Reproduction and Fertility*, v.88 p.343-352, 1990.
- HEMACHAND, T.; SHAHA, C. Functional role of sperm surface glutathione S-transferases and extracellular glutathione in the haploid spermatozoa under oxidative stress. *FEBS Letters*, v.538, p.14-18, 2003.
- 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, p.809-828, 1987.
- KAKA, A.; WAHID, H.; ROSNINA, Y. et al. α -Linolenicacid 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 596 espermatozóides de ovinos e caprinos avaliadas por azul de toluidina e alaranjado 597 de acridina. *Ciência e Agrotecnologia*, v.34, p.212-219, 2010.
- KUMI-DIAKA, J. Subjecting canine semen to the hypo-osmotic test. *Theriogenology*, v.39, p.1279-1289, 1993.

- LOSANO, J.D.A.; ANGRIMANI, D.S.R.; RUI, B.R. et al. The addition of docosahexaenoic acid (DHA) and antioxidants (glutathione peroxidase and superoxide dismutase) in extenders to epididymal sperm cryopreservation in bulls. *Zygote*, v.26, p.199-206, 2018.
- MACHADO, W.M.; BARBOSA, L.P.; SOUZA, R.S. et al. Óleo de peixe associado ao ácido ascórbico no diluidor para criopreservação de sêmen caprino. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v.70, p.131-138, 2018.
- MAIA, M.S.; BICUDO, S.D. Radicais livres, antioxidantes e função espermática em mamíferos: uma revisão. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v.33, p.183-193, 2009.
- MARCO-JIMÉNEZ, F.; VIUDES-DE-CASTRO, M.P.; BALASCH, S. et al. Morphometric changes in goat sperm heads induced by cryopreservation. *Cryobiology*, v.52, p.295-304, 2006.
- MELLO, M.L.S. Induced metachromasy in bull spermatozoa. *Histochemistry*, v. 74, p. 387-392, 1982.
- MELO, M.I.V.; HENRY, M. Teste hiposmótico na avaliação do sêmen equino. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 51, p.71-78, 1999.
- NASIRI, A.H.; TOWHIDI, A.; ZEINOALDINI, S. Combined effect of DHA and α -tocopherol supplementation during bull semen cryopreservation on sperm characteristics and fatty acid composition. *Andrology*, v. 44, p. 550-555, 2012.
- OLIVEIRA, R.V.; NUNES, J.F.; SALGUEIRO, C.C.M. 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.6 p.1295-1302, 2011.
- ROBERTS, S. J. Veterinary obstetrics and genital diseases. 3.ed. Michigan: EdwardsBrothers, p.981, 1986.
- SOARES, A. T.; SILVA, S.V.; ALMEIDA, F.C. et al. Espermatozoides caprinos criopreservados em meio à base de leite desnatado acrescido de glutathiona reduzida. *Ciência Rural*, v. 41, p. 1991-1997, 2011.
- SUNDARAMAN, M.N.; EDWIN, M.J. Cryopreservation of Boer goat spermatozoa during cryopreservation cycle. *Journal veterinary research*, v.10 p.117-124, 2006.

- SUNDARAMAN, M.N.; EDWIN, M.J. Evaluation of pre-freeze and post-thaw sperm motion characteristics of goat spermatozoa by computer-assisted semen analysis. *Indian Journal Small Ruminant*, v.,11, p.92-95, 2005.
- TAKAHASHI, T.; ITOH, R.; NISHINOMIYA, H. et al. Effect of linoleic acid albumin in a dilution solution and long-term equilibration for freezing of bovine spermatozoa with poor freezability. *Reproduction in Domestic Animals*, v.47, p.92-97, 2012.
- TOWHIDI, A.; PARQUES, 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 Genectis*, v.29, p.1051-1056, 2012.
- TOWHIDI, A.; ZEINOALDINI, S.; ARDEBILLI, R. et al. Combined n-3 Fatty Acids and $\hat{\pm}$ -Tocopherol Supplementation Improved the Ovine Sperm Cryosurvival. *Iranian Journal of Biotechnology*, v.11, p.238-43, 2013.
- TSAKMAKIDIS, I.A. Ram semen evaluation: Development and efficiency of modern techniques. *Small Ruminant Research*, v.92, p.126-130, 2010.
- VERSTEGEN, J.; IGUER-OUADA, M.; ONCLIN, K. Computer assisted semen analyzers in andrology research and veterinary practice. *Theriogenology*, v.57, p.149-79, 2002.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A inclusão de até 60ng.mL^{-1} de ácido docosahexaenoico e $0,4\text{mmol}$ de alfa-tocoferol no meio diluidor para criopreservação de sêmen caprino não promoveu melhora nos parâmetros de qualidade seminal pós-descongelamento, no entanto a sua toxicidade não foi constatada. Contudo, isso demonstra a importância de novos estudos com o intuito de avaliar o papel dos ácidos graxos poli-insaturados na manutenção e melhora da qualidade do sêmen criopreservado de caprinos.

ANEXOS

ANEXO A

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

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

ANEXO B**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 C

PREPARAÇÃO DA SOLUÇÃO TAMPÃO DE MCILVAINE (fosfato citrato) (FRADE, V.M.F. 2011)

Para a preparação da solução tampão de McIlvaine, 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 D

Soluções de estoque para a utilização na técnica de fluorescência para avaliação de integridade estrutural de membrana.

Solução estoque Iodeto de Propídio (IP)

Iodeto de Propídio 10mg

Solução Fisiológica 20mL

Solução estoque Diacetato de Carboxifluoresceína (CFDA)

Diacetato de Carboxifluoresceína 9,2mg

Dimetilsulfóxido 20mL

Solução estoque de Formaldeído

Formalina 40% 1mL

Solução fisiológica..... 79mL

Solução estoque de Citrato de Sódio

Citrato de Sódio..... 3g

Solução Fisiológica 100mL

ANEXO E

Solução de Trabalho para coloração de fluorescência CFDA/IP

Solução de Citrato de Sódio 3%.....	0,96mL
Solução de Formaldeído	10µl
Solução de Iodeto de Propídio	10µl
Solução de Carboxifluoresceína.....	20µl

ANEXO F

3,3'-diaminobenzidine (DAB) 1mg/mL de fosfato salino tamponado (PBS)

Solução tampão de fosfato de potássio-hidratado de sódio pH 7,4.

Solução para 100 mL

NaOH 0,1M 0,4g

H₂KPO₄ 0,1M 1,36086g

ANEXO G**NORMAS PARA ELABORAÇÃO DA DISSERTAÇÃO DO PROGRAMA DE MESTRADO EM CIÊNCIA ANIMAL****ITENS EXIGIDOS**

PARTE EXTERNA	
CAPA	Obrigatório
PARTE INTERNA – ELEMENTOS PRÉ-TEXTUAIS	
FOLHA DE ROSTO	Obrigatório
TÍTULO/RESUMO/PALAVRAS CHAVE	
TITLE/ABSTRACT/KEYWORDS	Opcional
LISTA DE ABREVIATURAS, FIGURAS, QUADROS E/OU TABELAS	
SUMÁRIO	Obrigatório
PARTE INTERNA – ELEMENTOS TEXTUAIS	
INTRODUÇÃO	Obrigatório
HIPÓTESE	
OBJETIVOS (GERAL E ESPECÍFICOS)	
REVISÃO DE LITERATURA	
MATERIAL E MÉTODOS	
RESULTADOS ESPERADOS	
PARTE INTERNA – ELEMENTOS PÓS-TEXTUAIS	
REFERÊNCIAS	Obrigatório
APÊNDICES	
ITENS EXIGIDOS	
CRONOGRAMA	
ORÇAMENTO	
IMPACTO CIENTÍFICO	Opcional
INFORMAÇÕES COMPLEMENTARES	

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 *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, ISSN 1678-4162 (online), é editado pela FEPMVZ Editora, CNPJ: 16.629.388 / 0001-24, e destina-se à publicação de artigos científicos. artigos sobre os temas da medicina veterinária, pecuária, tecnologia e inspeção de produtos de origem animal, aqüicultura e áreas afins.

Os artigos enviados para publicação são submetidos à aprovação do Corpo Editorial, com a ajuda de especialistas da área (relatores). Os artigos que precisam de revisão ou correções serão devolvidos aos autores. Os aceitos para publicação tornam-se propriedade do Arq. Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia (ABMVZ), citado como *Arq. Bras. Med. Veterinario. Zootec.* Os autores são responsáveis pelos conceitos e informações contidos nos artigos. É obrigatório que sejam originais, exclusivos e destinados exclusivamente à ABMVZ.

Reprodução de artigos publicados

A reprodução de qualquer artigo publicado é permitida desde que seja propriedade referenciada. Os resultados podem não ser usados comercialmente. A submissão e protocolo dos artigos é feita exclusivamente online, no endereço < <http://mc04.manuscriptcentral.com/abmvz-scielo> >.

Cópias não serão fornecidas. Os artigos estão disponíveis no seguinte endereço: www.scielo.br/abmvz

Diretrizes Gerais

- Toda a protocolização de artigos é feita exclusivamente pelo sistema de publicação online Scielo - ScholarOne, em <http://mc04.manuscriptcentral.com/abmvz-scielo>, sendo necessário cadastro no site.
- Leia “STEP A PASSO - SISTEMA DE SUBMISSÃO DE ARTIGOS ATRAVÉS DA SCHOLARONE”
- Toda a comunicação entre os diversos autores no processo de avaliação e publicação (autores, revisores e editores) será feita exclusivamente em formato eletrônico através do Sistema, sendo o autor automaticamente informado, via e-mail, de qualquer alteração no status do artigo.
- Figuras, figuras e desenhos devem ser inseridos no texto e, quando solicitados pela equipe editorial, devem ser enviados separadamente, em arquivo jpg em alta resolução (pelo menos 300dpi), zipados, inseridos em “Figura ou Imagem”.
- É de exclusiva responsabilidade de quem envia o artigo certificar que os autores estão cientes e concordam com a inclusão de seus nomes na submissão.
- A ABMVZ se comunicará eletronicamente com o autor do ensino sobre sua participação no artigo. Se pelo menos um autor não concordar com sua participação como autor, o artigo será considerado uma renúncia de um autor e o protocolo será encerrado.

Comitê de ética

É obrigatório anexar uma cópia em pdf do Certificado de aprovação do projeto de pesquisa que originou o artigo, emitido pelo CEUA (Comitê de Ética no Uso de Animais - Comitê de Ética para o Uso de Animais) em sua instituição, de acordo com a Lei 11.794. / 2008. O documento deve ser anexado ao “Comitê de Ética”. Esclarecemos que o número do Certificado de Aprovação deve ser mencionado na seção Material e Métodos.

Tipos de artigos aceitos para publicação

Artigo científico

Este é um relatório completo de um trabalho experimental. Baseia-se na premissa de que os resultados são posteriores ao planejamento da pesquisa.

Seções de texto: Título (Português e Inglês), Autores e Afiliação (somente na “Página de Título - etapa 6), Resumo, Introdução, Material e Métodos, Resultados, Discussão (ou Resultados e Discussão), Conclusões, Agradecimentos (quando aplicável) e Referências.

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

O número de referências não deve exceder 30.

Relato de caso

Contemplando principalmente as áreas médicas onde o resultado antecede o interesse em sua divulgação ou a ocorrência dos resultados não é planejada.

Seções de texto: Título (Português e Inglês), Autores e Afiliação (somente na “Página de Título” etapa 6), Resumo, Introdução, Casuística, Discussão e Conclusões (quando pertinente), Agradecimentos (quando aplicável) e Referências.

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

O número de referências não deve exceder 12.

Comunicação

Um breve relato de resultados parciais de um trabalho experimental, digno de publicação, embora insuficiente ou não consistente o suficiente para constituir um artigo científico.

O texto, com título em português e inglês, Autores e Afiliação (Somente na “Página de Título”, etapa 6) deve ser compacto, sem distinção de seções de texto especificadas para “artigo científico”, embora deva seguir essa ordem. Quando a comunicação é escrita em português, deve conter um resumo, e quando escrita em inglês deve conter um resumo.

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

O número de referências não deve exceder 12.

Elaboração de textos para publicação

Os artigos devem ser escritos em português ou inglês, de maneira impessoal.

Formatação de texto

O texto NÃO deve conter subitens em nenhuma seção e deve ser apresentado no Microsoft Word e anexado como “Documento principal”, em formato A4, com margem de 3cm (superior, inferior, esquerda e direita), em Fonte Times New Roman, tamanho 12 e espaçamento 1,5 em todas as páginas e seções do artigo (do título até as referências), com linhas numeradas .

Não use notas de rodapé. As referências a empresas e produtos, por exemplo, devem aparecer entre parênteses 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 50 palavras.

Autores e Afiliação. Os nomes dos autores são colocados abaixo do título, com identificação da instituição a que pertencem. O autor correspondente e seu email devem ser indicados com e asterisco, somente na “Página de título” (etapa 6) no Word.

Resumo e Abstract. Deve ser o mesmo apresentado no cadastro, com até 200 palavras e um parágrafo. Não repita o texto e não adicione revisão de literatura. Incluir os principais resultados numéricos, mencionando-os sem explicação, quando aplicável. Cada sentença deve conter uma informação completa.

Palavras-chave e palavras-chave. Até cinco e pelo menos dois *.

* na submissão use somente a palavra-chave (etapa 2) e no corpo do artigo mencione a palavra-chave (inglês) e palavra-chave (português), independentemente do idioma em que o artigo é submetido.

Introdução. Breve explicação em que o problema, sua pertinência e relevância, e os objetivos do trabalho são estabelecidos. Deve conter poucas referências, suficientes para defini-lo.

Material e Métodos. Mencione o desenho experimental, o material envolvido, a descrição dos métodos utilizados ou faça corretamente referência aos métodos já publicados. No trabalho que envolve animais e / ou organismos geneticamente modificados deve haver o número do Certificado de Aprovação CEUA. (verificar o item do Comitê de Ética).

Resultados. Apresentar os resultados encontrados de forma clara e objetiva.

Tabela. Grupo de dados alfanuméricos ordenados em linhas e colunas. Use linhas horizontais nos cabeçalhos de separação e no final da tabela. O título da tabela recebe a palavra Tabela, seguida de um numeral e período arábico (ex.: Tabela 1.). No texto, a tabela deve ser chamada de Tab, seguida de um período e um número de ordem (ex.: Tab. 1), mesmo quando se refere a várias tabelas (ex.: Tab. 1, 2 e 3). Pode ser apresentado com espaçamento simples e uma fonte abaixo do tamanho 12 (o menor tamanho aceito é 8). A legenda da tabela deve conter apenas aquilo que é indispensável para seu entendimento. As tabelas devem ser inseridas no corpo do texto, preferencialmente após a primeira citação.

Figura. Qualquer ilustração que apresente linhas e pontos: desenho, figura, gráfico, fluxograma, esquema, etc. A legenda inicialmente recebe a palavra Figura, seguida do numeral e período arábico (ex.: Figura 1.) e é referida na figura. texto como Fig seguido por um período e o número da ordem (ex.: Fig.1), mesmo quando se refere a mais de um valor (ex.: Fig. 1, 2 e 3). Além de serem inseridos no texto, as fotos e imagens devem ser enviadas em alta resolução jpg, em arquivo zipado, anexado no campo correto na tela de submissão para registro do artigo. As figuras devem ser inseridas no corpo do texto, preferencialmente após a primeira citação.

Nota: Toda tabela e / ou figura já publicada deve conter, abaixo da legenda, informações referentes à fonte (autor, autorização de uso, data) e a referência correspondente deve constar nas Referências.

Discussão. Discuta apenas os resultados obtidos no trabalho. (Obs.: As seções Resultados e Discussão podem ser apresentadas como uma de acordo com a preferência do autor, sem prejuízo das partes).

Conclusões. As conclusões devem ser apoiadas pelos resultados da pesquisa realizada e apresentadas de forma objetiva, SEM revisão de literatura, discussão, repetição de resultados ou especulação.

Agradecimentos. Opcional. Deve ser expresso brevemente.

Referências. As referências devem ser relacionadas em ordem alfabética, preferindo artigos publicados em revistas nacionais e internacionais, e indexados. Livros e teses devem ser referenciados o mínimo possível, e somente quando indispensáveis. As normas gerais da ABNT são adotadas, adaptadas para ABMVZ conforme os exemplos abaixo:

Como referenciar:

1. Citações no texto

A indicação da fonte entre parênteses vem antes da citação para evitar interrupções na seqüência do texto, conforme os exemplos:

Autor único: (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 ordem alfabética dos artigos para artigos do mesmo ano.

Citação de uma citação. Todo esforço deve ser feito para consultar o documento original. Em situações excepcionais, a reprodução de informações já citadas por outros autores pode ser reproduzida. No texto, cite o sobrenome do autor do documento não consultado com o ano de publicação, seguido da expressão citada e do último nome do autor e ano do documento consultado. Nas Referências apenas a fonte consultada deve ser mencionada.

Comunicação pessoal. Estas não fazem parte das Referências. A citação deve incluir o sobrenome do autor, a data da comunicação e o nome da instituição à qual o autor está vinculado.

2. Periódicos (até 4 autores, citam todos eles. Mais de 4 autores, citam 3 autores e outros):

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

FERGUSON, JA; REEVES, WC; HARDY, JL Estudos sobre imunidade a alfavírus em potros. *Sou. J. Vet. Res.*, V.40, p.5-10, 1979.

HOLENWEGER, JA; TAGLE, R.; WASERMAN, A. et al. Anestesia geral del canino. *Não. Med. Veterinario.*, n.1, p. 13-20, 1984.

3. Publicação única (até 4 autores, cite todos eles. Mais de 4 autores, cite 3 autores e outros):

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

LOPES, CAM; MORENO, G. Aspectos bacteriológicos de ostras, mariscos e mexilhões. Em: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, 14., 1974, São Paulo. Anais ... São Paulo: [sn] 1974. p.97. (Resumo).

MORRIL, CC Infecciones por clostridios. Em: DUNNE, HW (Ed). Enfermedades del cerdo. México: UTEHA, 1967. p.400-415.

Exigências nutricionais de suínos. 6.ed. Washington: Academia Nacional de Ciências, 1968. 69p.

SOUZA, CFA Produtividade, qualidade e rendimentos de carcaça e de carne em bovinos de corte. 1999. 44f. Dissertação de Mestrado em Medicina Veterinária - Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

4. Documentos eletrônicos (até 4 autores, citam todos eles. Mais de 4 autores, cite 3 autores e outros):

QUALIDADE alimentos de animais para um mercado global. Washington: Associação Americana de Medicina Veterinária, 1995. Disponível em: < <http://www.org/critca16.htm> >. Acessado em: 27 abr. 2000.

JONHNSON, T. Os povos indígenas são agora mais cambiantes, organizados. Miami Herald, 1994. Disponível em: < [http://www.summit.fiu.edu/ MiamiHerald-Summit-RelatedArticles /](http://www.summit.fiu.edu/MiamiHerald-Summit-RelatedArticles/) >. Acessado em: 5 dez. 1994.

Taxas de submissão e publicação

SOMENTE PARA ARTIGOS NACIONAIS

Taxa de inscrição: A taxa de inscrição é de R \$ 60,00, e deve ser paga através de boleto bancário emitido pelo sistema eletrônico Conveniar <http://conveniar.fepmvz.com.br/eventos/#servicos> (é necessário para completar um registraion). Somente artigos com uma taxa de envio paga serão avaliados. Se a taxa não for paga em até 30 dias, ela será considerada renúncia do autor.

Taxa de publicação: A taxa de publicação é de R \$ 150,00, por ritmo, após a prova final do artigo. A taxa de publicação deve ser paga através de depósito bancário, e os dados serão informados quando o artigo for aprovado.

OBS.: Quando a informação da nota fiscal for diferente da informação do autor do contato, um e-mail deve ser enviado para abmvz.artigo@abmvz.org.br comunicando tal necessidade.

SOMENTE PARA ARTIGOS INTERNACIONAIS

Taxa de submissão e publicação. A taxa de publicação é de US \$ 100,00 (cem dólares) por página e US \$ 50,00 (cinquenta dólares) para submissão do manuscrito e será cobrada do autor correspondente na prova final do artigo. A taxa de publicação deve ser paga através de boleto bancário emitido pelo sistema eletrônico de submissão de artigos. Ao solicitar o boleto bancário, o autor informará os dados a serem incluídos na emissão da fatura.

Recursos e diligências

Se o autor enviar a resposta às diligências solicitadas pela ABMVZ, ou a um documento de recurso, deverá ser anexado no Word, no item “Justificativa” (etapa 6), e também deverá ser enviado via email, a cargo do Comitê Editorial, para abmvz.artigo@abmvz.org.br .

Se o artigo não for aceito, o autor pode desejar enviar um recurso, e isso deve ser feito por e-mail, em abmvz.artigo@abmvz.org.br .