

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PAMPA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL

EFEITO DO RESVERATROL NA CRIOPRESERVAÇÃO DE SÊMEN DE
GARANHÕES DA RAÇA CRIOLA

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

NATAN DA CRUZ DE CARVALHO

Uruguaiana, RS, Brasil

2020

NATAN DA CRUZ DE CARVALHO

**EFEITO DO RESVERATROL NA CRIOPRESERVAÇÃO DE SÊMEN DE
GARANHÕES DA RAÇA CRIOLA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação *Strictu sensu* em Ciência Animal da Universidade Federal do Pampa, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

Orientador: Prof.^a Dra. Daniela dos Santos Brum

Uruguaiana

2020

Ficha catalográfica elaborada automaticamente com os dados fornecidos
pelo(a) autor(a) através do Módulo de Biblioteca do
Sistema GURI (Gestão Unificada de Recursos Institucionais) .

C331e Carvalho, Natan da Cruz de

Efeito do Resveratrol na criopreservação de sêmen de
garanhões da raça Crioula / Natan da Cruz de Carvalho.
65 p.

Dissertação(Mestrado)-- Universidade Federal do Pampa,
MESTRADO EM CIÊNCIA ANIMAL, 2020.

"Orientação: Daniela dos Santos Brum".

1. Sêmen equino. 2. Congelamento. 3. Antioxidante. 4.
Espécies reativas de oxigênio. 5. Cavalo Crioulo. I. Título.

NATAN DA CRUZ DE CARVALHO

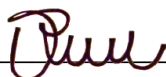
**EFEITO DO RESVERATROL NA CRIOPRESERVAÇÃO DE SÊMEN DE
GARANHÕES DA RAÇA CRIOLA**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-graduação *Stricto sensu* em Ciência Animal da Universidade Federal do Pampa, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Ciência Animal.

Área de concentração: Reprodução e Produção Animal.

Dissertação defendida e aprovada em 13 de março de 2020.

Banca examinadora:



Dra. Daniela dos Santos Brum

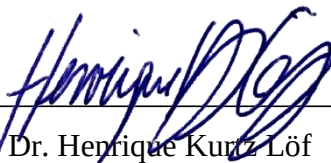
Orientadora

Universidade Federal do Pampa - UNIPAMPA



Dr. Fabricio Desconsi Mozzaquatro

Universidade Federal do Pampa - UNIPAMPA



Dr. Henrique Kurtz Löff

Central de Reprodução Equina - LÖF

AGRADECIMENTOS

A profa. Dra. Daniela dos Santos Brum, pelas orientações, pelos valorosos ensinamentos pessoais e profissionais, pela generosidade e todas as oportunidades que me foram concebidas.

Aos professores Dr. Fábio Leivas, Dra. Francielli Cibir e Dra. Janislene Trentin pelas contribuições na projeção e/ou desenvolvimento deste trabalho.

Às ilustres petianas, colegas e amigas, Karine Mattos e Daniele Missio, pelo comprometimento e constante aprendizado conjunto.

Ao meu contemporâneo colega de pós-graduação, Lucas Dacampo, pela irradiação de positividade e convivência amistosa.

Aos meus pais, Jadir e Andreia Carvalho por persistirem e me garantirem o seguro caminho do estudo; e por guardarem nosso tesouro mais valioso, meu filho, Lorenzo Carvalho.

A minha companheira, Talita Alves, pelo apoio e incentivo à continuidade nos momentos de adversidades.

A Unipampa, ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal e Laboratório de Biotecnologia da Reprodução por terem me acolhido.

Ao Dr. Henrique Löff e colaboradores da LÖF Reprodução Equina, pela confiança e oportunidades de desenvolvimento profissional e científico.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo investimento institucional ao aperfeiçoamento científico.

Muito obrigado.

*“... Salve aquele que, sempre que precisei,
ofereceu-me uma lança ou uma espada...”*

Autor desconhecido

RESUMO

A possibilidade de transportar material genético por longas distâncias torna o uso de sêmen congelado altamente necessário para a indústria equina, mas os baixos índices de fertilidade decorrentes de danos celulares pelo processamento limitam sua utilização. Os fatores que ocasionam estes danos são diversos, entre eles, destaca-se a produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) e o estresse oxidativo. A adição de antioxidantes no diluente pode minimizar estes danos, preservando parâmetros espermáticos e incrementando a fertilidade do sêmen congelado. O Resveratrol (RSV) é um polifenol derivado de plantas e apresenta algumas propriedades biológicas, entre elas, o efeito antioxidante em diversos sistemas. Deste modo, o objetivo do presente trabalho foi avaliar a ação de RSV adicionado ao diluente para congelamento de sêmen de garanhões da raça Crioula sobre a viabilidade espermática e o estresse oxidativo. Para tal, doze ejaculados ($n =$ quatro garanhões, três ejaculados cada), coletados com vagina artificial, foram diluídos até a concentração de 50×10^6 sptz/mL e fracionados em duas alíquotas. As alíquotas foram centrifugadas a 500G por 15min, o sobrenadante descartado e os pellets ressuspensos e ajustados na concentração de 200×10^6 sptz/mL com diluente de congelamento: Botucurio® sem suplementação (Controle), ou suplementado com $10 \mu\text{M}$ RSV. Após a manutenção do sêmen em nitrogênio líquido, duas palhetas de cada grupo foram descongeladas e submetidas a avaliações de cinética espermática, longevidade, morfologia, integridade de membrana plasmática, acrossomal e potencial de membrana mitocondrial, produção de ERO e potencial antioxidante total. Com este estudo, conclui-se que a adição de $10 \mu\text{M}$ de RSV em diluente de congelamento não influenciou nos parâmetros cinéticos, bioquímicos e funcionais de espermatozoides descongelados de garanhões da raça Crioula. Mais estudos devem ser realizados para definição de perfis de estresse oxidativo e concentrações adequadas para preservação da qualidade do sêmen descongelado.

Palavras-chave: antioxidante, CASA, congelamento, equino, espermatozoide.

ABSTRACT

The possibility of transporting genetic material over long distances makes the use of frozen semen highly necessary for the equine industry, but the low fertility rates resulting from cellular damage by processing limit its use. The factors that because damages are diverse, among them, the production of reactive oxygen species (ROS) and oxidative stress stand out. The addition of antioxidants in the diluent can decrease damages, preserving sperm parameters and increasing the fertility of frozen semen. Resveratrol (RSV) is a polyphenol derived from plants and has some biological properties, including antioxidant effect in several systems. Thus, the aim of this study was to check the action of RSV added to the diluent for freezing the semen of stallions of the Crioula breed on sperm viability and oxidative stress. For this purpose, four Cioulos stallions, with known fertility, had semen collected three times during the breeding season. The semen free of gel fraction was diluted and fractionation in two aliquots, one frozen in Botucio® diluent without any supplementation (control), and the other in diluent supplemented with 10 μ M RSV. After maintaining the semen in liquid nitrogen, two straws from each group were thawed and subjected to evaluations of sperm kinetics, longevity, morphology, plasma membrane integrity, acrosomal and mitochondrial membrane potential, ROS production and total antioxidant potential. With this study, it we concluded that the addition of 10 μ M of RSV in freezing diluent did not influence the kinetic, biochemical and functional parameters of thawed sperm from Crioulos stallions. Further studies should be carried out to define oxidative stress profiles and adequate concentrations to preserve the quality of thawed semen.

Keywords: antioxidant, CASA, freezing, equine, spermatozoa.

LISTA DE ABREVIATURAS

ALH - Amplitude de deslocamento lateral da cabeça

ATP - Trifosfato de Adenosina

BCF - Frequência de batimento flagelar cruzado

Ca^{2+} - Íon Cálcio

CAT - Catalase

CASA - Computer Assisted Semen Analysis

DNA - Ácido Desoxirribonucleico

ERO - Espécies Reativas de Oxigênio

Fe^{2+} - Íon Ferroso

FeTPPS - 5,10,15,20 - Tetraquis (4-sulfonatofenil) Porfirinato Ferro (III)

FIV - Fecundação in vitro

FRAP - Poder antioxidante redutor férrico

GPx-GR - Sistema Glutathione Peroxidase – Glutathione Redutase

GSH – Glutathione Reduzida

H_2O_2 – Peróxido de Hidrogênio

LIN - Linearidade

LPO – Lipoperoxidação Lipídica

MnTBAP - Metaloporfirina Mn (III) Tetraquis (Ácido Benzoico 4-70) Porfirina

NADH - Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo

NADPH - Fosfato de Dinucleótido de Nicotinamida e Adenina

O₂ – Oxigênio Molecular

O₂⁻ - Ânion Superóxido

OH – Radical Hidroxil

PM - Motilidade progressiva

RSV - Resveratrol

SCA - Sperm Class Analyzer

SOD – Superóxido Dismutase

SPTZ - espermatozoides

STR - Retilinearidade

TBARS - Espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico

VAP - Velocidade média da trajetória

VCL - Velocidade curvilínea

VSL - Velocidade linear progressiva

X-XO – Sistema Xantina – Xantina Oxidase

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – Valores médios de motilidade total de sêmen congelado com diluente Botucurio® sem adição de antioxidante (Controle), ou com adição de 10 µM de Resveratrol (RSV), proveniente de garanhões da raça Crioula. As avaliações foram realizadas com intervalos de trinta minutos (0, 30, 60, 90 e 120) durante incubação em banho-maria a 37°C ($P > 0,05$). ...49

FIGURA 2 - Valores médios de Motilidade Total com intervalos de trinta minutos (0, 30, 60, 90 e 120), durante duas horas de incubação a 38°C de doze amostras de sêmen congelado provenientes de quatro garanhões da raça Crioula. As diferenças estatísticas ($P < 0,05$) entre os indivíduos foram destacadas por letras diferentes em relação ao tempo de avaliação.50

FIGURA 3 - Valores médios de Motilidade Progressiva com intervalos de trinta minutos (0, 30, 60, 90 e 120), durante duas horas de incubação a 37°C de doze amostras de sêmen congelado provenientes de quatro garanhões da raça Crioula. As diferenças estatísticas ($P < 0,05$) entre os indivíduos foram destacadas por letras diferentes em relação ao tempo de avaliação.51

LISTA DE TABELAS

Tabela 1– Parâmetros de cinética espermática (média $\pm$ erro padrão) após descongelamento (tempo 0 min) e após 120 min de incubação a 37°C (longevidade), de sêmen congelado com diluente Botucrio® sem adição de antioxidante (Controle); ou com adição de 10 μ M de Resveratrol (RSV), proveniente de garanhões da raça Crioula ($P > 0,05$).	47
Tabela 2– Parâmetros de funções bioquímicas e funcionais (média $\pm$ erro padrão) de sêmen congelado com diluente Botucrio® sem adição de antioxidante (C); ou com adição de 10 μ M de Resveratrol (RSV), proveniente de garanhões da raça Crioula ($P > 0,05$).	48

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	12
2. REVISÃO DE LITERATURA	14
2.1. Formação de espécies reativas de oxigênio e o estresse oxidativo	14
2.2. Danos decorrentes do processamento da criopreservação	18
2.3. Suplementação de antioxidantes em diluentes de congelamento	20
2.4. Resveratrol como agente antioxidante, propriedades e mecanismo de ação.....	23
3 OBJETIVO.....	26
3.1 Objetivo geral	26
3.2 Objetivos específicos.....	26
4 ARTIGO CIENTÍFICO	27
Effect of Resveratrol on cryopreservation of semen from Crioulos stallions.....	28
RESUMO	28
ABSTRACT	29
INTRODUÇÃO	29
RESULTADOS.....	33
DISCUSSÃO	34
CONCLUSÃO	39
AGRADECIMENTO (S).....	39
REFERÊNCIAS	40
5 CONCLUSÃO	52
6 PERSPECTIVAS	53
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	54

1. INTRODUÇÃO

O Brasil apresenta o quarto maior rebanho equino do mundo (FAO, 2016), com aproximadamente 5,5 milhões de cabeças, dentre estes, cerca de 700 mil animais são registrados em algum serviço genealógico oficial (IBGE, 2017). O Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística aponta que o estado do Rio Grande do Sul ocupa a 3ª posição entre os maiores rebanhos do país, onde predomina a raça Crioula. Anualmente, a atividade equestre movimenta mais de 16 bilhões de reais, conferindo ao mercado equestre uma grande responsabilidade social, pois gera 610 mil empregos diretos e 2.430 mil empregos indiretos, sendo responsável por mais de três milhões de postos de trabalho (MAPA, 2016). Com o crescente desenvolvimento econômico da equinocultura, e sabendo que a base de um sistema de alta produção é a reprodução, destaca-se a importância da utilização de biotecnologias reprodutivas para acelerar o processo de melhoramento e multiplicação de genéticas superiores.

Ao se tratar de equinos, a biotecnologia assume uma importância ainda maior na cadeia produtiva, pois se trabalha com um grande número de animais idosos nos programas de melhoramento animal, justamente pela forma tardia em que se tem a comprovação de mérito genético destes animais em relação a outras espécies (ALVARENGA; PAPA, 2009). Entre as biotécnicas relacionadas ao macho, está a utilização do sêmen refrigerado e congelado, que juntamente com a liberação da sua utilização por praticamente todas as associações de criadores de raças puras, propiciam rápida disseminação de material genético por longas distâncias. Esse fato é de extrema importância, pois reduz consideravelmente o custo e riscos de transporte de éguas e potros, além de maximizar a utilização de garanhões importantes e prevenir doenças sexualmente transmissíveis (NUNES et al., 2008).

Apesar das inúmeras vantagens, o processo de congelamento e descongelamento do sêmen reduz consideravelmente as taxas de fecundação. Perdas de 40 a 50% dos espermatozoides durante o processo de congelamento e descongelamento são relatadas, sendo estes prejuízos desencadeados por alterações na estabilidade e integridade da membrana, estresse oxidativo, e dano de estrutura nuclear (WATSON, 2000). Para que o espermatozoide desenvolva adequadamente suas funções, desde a movimentação pela tuba uterina até a fecundação, é imprescindível a utilização da energia que é produzida nas mitocôndrias, no entanto, o processo de congelamento também é responsável por disfunções mitocondriais, sendo a principal fonte de espécies reativas de oxigênio (ERO) (SCHOBER et al., 2007). A

produção excessiva de ERO danifica a membrana plasmática, contribui com a perda de motilidade espermática, e consequentemente, reduz a capacidade fecundante (AURICH, 2005). A suplementação com agentes antioxidantes no diluente de sêmen tem o intuito de minimizar os danos provocados pelo processo de criopreservação (SHIMOKAWA et al., 2012; WHITE, 1993), que por si só, é um agravante do estresse oxidativo (CURRY, 2000).

O resveratrol (RSV) é um polifenol encontrado em diversas espécies de plantas, entre elas, a uva. O interesse por seus efeitos benéficos começou a partir de um fenômeno chamado “paradoxo francês”, que descreve a baixa incidência de cardiopatias na França em comparação com outros países, mesmo associando dieta rica em gorduras e pouco exercício (NEVES et al., 2012; RICHARD, 1987). Desde então, o RSV tem sido alvo de pesquisas que comprovam diversas propriedades biológicas, entre elas, o efeito antioxidante (OLAS et al., 2006), sendo comprovadamente um eficiente eliminador de radicais hidroxila, superóxido e radicais livres induzidos por metais, atuando na proteção contra danos de peroxidação lipídica e fragmentação de DNA (LEONARD et al., 2003). Dentre os diversos sistemas orgânicos em que as ações do RSV já foram estudadas, vem se tornando frequente sua avaliação na preservação da qualidade de espermatozoides, como sêmen ovino refrigerado (SARLÓS et al., 2002) e congelado (SILVA et al., 2012); prévia incubação e criopreservação de sêmen humano (BRANCO et al., 2010; TSONEV et al., 2018) congelamento de sêmen bovino (BUCAK et al., 2015); refrigeração (GADANI et al., 2017) e diluente de descongelamento (RIGO et al., 2016) de sêmen de javalis; em congelamento de sêmen bubalino (LONGOBARDI et al., 2017); congelamento de sêmen de galos (NAJAFI et al., 2019); e também em refrigeração (MATHENY et al., 2015) e congelamento (GIARETTA et al., 2014; NOURI et al., 2018) de sêmen equino.

Considerando o estresse oxidativo como fator primordial na queda da qualidade do sêmen congelado e um forte limitante na utilização desta biotécnica em equinos, o uso do RSV como agente antioxidante pode ser uma alternativa na preservação da fertilidade de espermatozoides descongelados. Baseado nos resultados promissores encontrados por NOURI et al. (2018) com garanhões de baixa qualidade seminal, o presente trabalho tem como objetivo verificar o efeito da suplementação de 10 μ M de RSV em diluente de congelamento sobre parâmetros cinéticos, funcionais e bioquímicos de espermatozoides descongelados de garanhões com histórico de boa qualidade seminal na raça Crioula.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Formação de espécies reativas de oxigênio e o estresse oxidativo

O crescente interesse e padronização de avaliações complementares de sêmen apontam que o estado redox do gameta masculino pode ser responsável pela etiologia da infertilidade, mesmo que de forma parcial. Desta maneira, o reconhecimento dos processos bioquímicos que ocorrem na fertilização podem auxiliar no diagnóstico de casos complexos (FRACZEK; KURPISZ, 2005). Como todas as células aeróbicas, os espermatozoides enfrentam constantemente o paradoxo do oxigênio, necessário para a manutenção de funções fisiológicas, mas potencialmente tóxico pela formação de ERO (BALL et al., 2001; BAUMBER et al., 2000). Segundo FRACZEK & KURPISZ (2005), o processo de aquisição do potencial fecundante dos espermatozoides é vinculado ao metabolismo de oxigênio (O_2), associado a processos oxidativos com produção de ânion superóxido (O_2^-) e, consequentemente, de peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Baixas concentrações destes bioprodutos são essenciais para funções vitais na fecundação, como a capacitação e fusão de gametas masculinos e femininos (AITKEN; DREVET, 2020; DE LAMIRANDE et al., 1997; DE LAMIRANTE; CAGNON, 1992).

A origem mais clássica entre os mecanismos de produção de ERO é o extravasamento de elétrons do complexo I e II da cadeia transportadora de elétrons mitocondrial (AITKEN; DREVET, 2020; DE LAMIRANDE et al., 1997). O radical de partida, gerado a partir de uma simples redução de elétron do oxigênio molecular (O_2), é o O_2^- . Sua produção é aumentada na presença de criodanos, espermatozoides mortos ou morfologicamente anormais, células com citoplasma residual ou anormalidade em peça intermediária (BALL; VO; BAUMBER, 2001). SABEUR & BALL (2006) executaram um experimento com o intuito de identificar a origem da formação de O_2^- em espermatozoides equinos. A produção de O_2^- foi induzida por nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzida (NADH) e fosfato de nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzida (NADPH). Seus resultados indicam que a geração de O_2^- também está associada à reação de NADPH oxidase, localizada na membrana espermática (BALL, 2014), e não só como subproduto por via da respiração mitocondrial. Em humanos, a contaminação de leucócitos é uma frequente fonte de produção de ERO, achado incomum em sêmen equino, a não ser que ocorram infecções do trato genital. BAUMBER et al. (2002) constataram aumento

nas concentrações de H_2O_2 quando espermatozoides equinos foram incubados na presença de neutrófilos, acarretando em prejuízo significativo da motilidade. Contudo, este efeito só foi notado quando a taxa de espermatozoide para leucócitos polimorfonucleares foi de 5:1 ou 2,5:1, o que sugere que uma contaminação relativamente grande deva ocorrer para que se encontre os efeitos adversos sobre a motilidade.

Existem diversas teorias sobre os mecanismos pelos quais as ERO atuam na função espermática, no entanto, o mecanismo mais promissor envolve a fosforilação da tirosina. AITKEN et al. (1995) demonstraram que a incubação de espermatozoides humanos com NADPH foi associado com a capacitação e um aumento expressivo do número e intensidade de proteínas fosfotirosil, efeito que poderia ser suprimido com a adição de catalase (CAT), mas não de superóxido dismutase (SOD). O estudo de BAUMBER et al. (2003a) apoia os resultados de AITKEN et al. (1995), onde o H_2O_2 parece ser o agente primário envolvido no aumento da fosforilação da tirosina associado à capacitação espermática. A fosforilação oxidativa que ocorre nas mitocôndrias, envolve a transferência de átomos de hidrogênio para O_2 por sistemas de oxidação e redução. A energia liberada durante este processo é utilizada para a produção de ATP. Alguns elétrons podem ser perdidos durante esse fluxo através da cadeia respiratória, e como resultado deste vazamento de elétrons podem surgir grandes quantidades de O_2^- . A quantidade de O_2^- formado na cadeia respiratória depende principalmente da disponibilidade de O_2 . A existência de NADPH oxidase para a formação de ERO evidencia que estes bioprodutos tenham um papel fisiológico, sendo constatado aumento dos seus níveis durante o processo de capacitação e exostose acrossomal (DE LAMIRANDE; CAGNON, 1995). Inspirado em estudos realizados em humanos, BAUMBER et al. (2003a) avaliaram o sêmen equino induzindo a formação de ERO através do sistema Xantina – Xantina Oxidase (X-XO), e observaram um aumento na fosforilação da tirosina quando comparado ao grupo controle. Observaram ainda, que a adição de CAT previne o aumento da fosforilação da tirosina induzido por X-XO, efeito não observado com a adição de SOD. Com este resultado, é reforçada a teoria de que o O_2^- seja imediatamente dismutado em H_2O_2 pela SOD (BURNBAUGH; SABEUR; BALL, 2007). Através de vários estudos, foi comprovado que as enzimas SOD e CAT podem prevenir a exostose acrossomal induzida após a incubação de espermatozoides com os sistemas geradores de radicais livres, indicando a participação do O_2^- e H_2O_2 na promoção da capacitação espermática (AITKEN et al., 1998; DE LAMIRANDE et al., 1997).

O H_2O_2 é relativamente estável, embora não seja um radical livre, tem capacidade de se difundir através de membranas, tornando-o ainda mais tóxico à célula espermática (BALL; VO; BAUMBER, 2001; BAUMBER et al., 2000). Esta ERO também reage facilmente com metais como ferro, cobre, cobalto, manganês e cromo na reação de Fenton; e O_2^- na reação de Haber-Weis. BALL et al. (2001) relataram uma elevação nos níveis de produção de H_2O_2 em espermatozoides equinos incubados em condições aeróbicas, à medida que aumenta a concentração espermática do meio. O aumento de H_2O_2 resulta em diminuição da motilidade espermática sem redução significativa na viabilidade, integridade acrossomal ou potencial de membrana mitocondrial (BAUMBER et al., 2000). Isso explica que a motilidade espermática pode ser afetada por via de ações de ERO independentes de peroxidação lipídica (LPO) e funções dependentes de membrana. Portanto, a motilidade de espermatozoides equinos é um indicador mais sensível de estresse oxidativo do que a viabilidade, integridade acrossomal, LPO e potencial de membrana mitocondrial. Outro efeito citopático das ERO é a fragmentação de DNA, a exposição a concentrações crescentes de ERO geradas pelo sistema X-XO resultaram em danos dose-dependentes detectados pelo ensaio de cometa (BAUMBER et al., 2003b). Estes danos foram bloqueados na presença de CAT ou glutathiona reduzida (GSH), mas não na presença de SOD, indicando que o H_2O_2 é o principal responsável por estes danos. De acordo com a revisão de FRACZEK & KURPISZ et al. (2005), o produto das reações de H_2O_2 é o radical hidroxil (OH), que também apresenta propriedades pró-oxidantes muito fortes. O que limita esta reação é a disponibilidade de íons Ferro (III), que são regenerados pelo próprio O_2^- através de uma reação de redução, formando Ferro (II) e O_2 . Ainda existem outros redutores dessa reação, como ascorbato, NADPH, glutathiona reduzida, cisteína e grupos tiol-protease.

O estresse oxidativo denota uma condição associada a um aumento da taxa de dano celular induzido pelo excesso da produção de ERO, pela diminuição da capacidade antioxidante, ou uma combinação dos dois. O espermatozoide e o plasma seminal produzem enzimas antioxidantes de baixo peso molecular que degradam ERO, evitando possíveis danos celulares oriundos de superprodução e estresse oxidativo. Existem três principais sistemas enzimáticos, SOD, CAT, e o sistema glutathiona peroxidase - glutathiona redutase (GPx – GR). Vários outros componentes do plasma seminal também podem agir como agentes antioxidantes, como a vitamina E, vitamina C, urato, albumina, taurina e hipotaurina

(BAUMBER et al., 2000). Juntos, esses agentes de baixo peso molecular compõem a capacidade antioxidante total do plasma seminal.

A SOD é uma enzima catalisadora encontrada no sêmen de mamíferos. O citoplasma apresenta SOD com cobre e com zinco, e suas isoenzimas do fluido seminal são de origem prostática. Existe uma relação direta entre a atividade de SOD no sêmen e preservação da sua motilidade espermática, inibindo a destruição das membranas biológicas (KOBAYASHI et al., 1991). A CAT tem especificidade para o H_2O_2 , aumentando apenas em condições elevadas de seu substrato ou quando a SOD é superexpressa, com consequente aumento da liberação de H_2O_2 . Juntamente com a SOD, a CAT tem origem prostática e age protegendo a célula espermática contra os efeitos deletérios das reações do metabolismo de O_2 (BAKER et al., 1996). Outra enzima que protege as células contra o efeito tóxico do H_2O_2 é a glutathione peroxidase (GPx), catalisando a redução do H_2O_2 e se tornado glutathione reduzida (GSH). Essa enzima tem maior afinidade ao H_2O_2 do que a CAT, o que sugere que seu papel mais importante ocorra em situações onde o H_2O_2 se apresente em baixas concentrações. Tanto a atividade de SOD, quanto de CAT foram claramente determinadas no plasma seminal equino (BALL et al., 2000; BAUMBER; BALL, 2005). A atividade específica da SOD e GPx também foram encontradas em tecidos homogeneizados de espermatozoides, ampolas, glândulas bulbouretrais, glândulas vesiculares, fluidos da cauda do epidídimo, testículos e próstatas de equinos (BAUMBER; BALL, 2005). Os resultados evidenciaram que estas enzimas contribuem com a degradação de ERO por meio do plasma seminal, e que existe variabilidade individual significativa das suas atividades entre garanhões.

É importante considerar que a formação de baixos níveis de ERO são fundamentais na regulação de importantes eventos intracelulares que antecedem a fecundação, entretanto, níveis altos de ERO promovem o estresse oxidativo, que tem sido associado a danos de integridade estrutural e funcional de espermatozoides, danos à cromatina, à proteínas e lipídios de membrana. Enquanto os espermatozoides possuem defesa limitada ao pequeno volume citoplasmático, o plasma seminal se torna uma fonte rica de agentes antioxidantes. As biotecnologias aplicadas ao sêmen equino, incluindo remoção de plasma seminal, centrifugação, refrigeração e reaquecimento, contribuem com danos celulares em virtude do armazenamento e exposição a O_2 , gerando níveis de ERO superiores à sua capacidade antioxidante e consequentemente, afetando adversamente o restante de células viáveis por via de estresse oxidativo. A adição de agentes antioxidantes que substituam a função do plasma

seminal em biotécnicas reprodutivas pode ser uma alternativa para melhorar preservar a viabilidade de espermatozoides durante o armazenamento.

2.2. Danos decorrentes do processamento da criopreservação

Estima-se que apenas 24% dos garanhões produzam ejaculados aceitáveis para congelamento, e ainda que protocolos adequados de processamento sejam adotados, a fertilidade do sêmen congelado atinge apenas 40% a 50% do equivalente ao sêmen fresco (LINFOR; POMMER; MEYERS, 2002). Muitos espermatozoides, ainda que mantenham sua motilidade e integridade de membrana, sofrem danos parciais decorrentes da exposição às variações de osmolaridade e temperatura, prejudicando severamente seu potencial fecundante (BALL, 2008). Estas células podem apresentar certo grau de vazamento mitocondrial, com metabolismo celular reduzido e maiores perdas de energia, afetando negativamente a sua longevidade (MARTIN et al., 2007). Esta condição é um fator limitante em espécies nos quais fêmeas apresentem uma longa duração de estro, como equinos, de modo que o período entre a inseminação e a ovulação não possa exceder o tempo de viabilidade dos espermatozoides descongelados para que ocorra a fecundação. Em espécies de cio mais curto, como vacas, o sêmen descongelado é amplamente utilizado com sucesso porque a viabilidade do espermatozoide criopreservado pode ser facilmente compensada com uma inseminação próxima do momento da ovulação, sem a necessidade de procedimentos onerosos e dispendiosos (CURRY, 2000).

Durante anos, assumiu-se que a curta viabilidade de espermatozoides após o descongelamento fosse devido à capacitação prematura (WATSON, 2000), um processo de desestabilização da membrana que culmina com a reação acrossomal e morte celular de espermatozoides não fecundados (HARRISON, 1996). A evidência que sustentava esta teoria estava atribuída ao influxo intracelular de íon cálcio (Ca^{2+}) facilitado pelo dano de membrana decorrente das alterações de temperatura e osmolaridade do processamento (POMMER; MEYERS, 2002). Posteriormente, descobriu-se que o processo é um fenômeno diferente (BRAVO et al., 2005), relacionado ao envelhecimento celular prematuro induzido pela criopreservação e seus danos mitocondriais (ORTEGA FERRUSOLA et al., 2009). Provavelmente este engano ocorreu pela extensa utilização da coloração de CTC, cuja função ainda não é completamente compreendida, mas constata-se alterações nas concentrações de

Ca^{2+} intracelular (BRAVO et al., 2005), levando credibilidade a teoria errônea da criocapacitação. Diversos experimentos evidenciam que a criopreservação leva ao aumento da concentração de Ca^{2+} intracelular, reduz o potencial de membrana mitocondrial, assim como os níveis de ATP e ainda induz a liberação de fatores pró-apoptóticos no citoplasma (ORTEGA FERRUSOLA et al., 2009). Existem outros fatores relacionados com a verdadeira capacitação espermática como padrões de remodelação da membrana plasmática e vias de transdução para fosforilação da tirosina que não ocorrem de forma similar durante a criopreservação (THOMAS; MEYERS; BALL, 2006). Essas evidências afirmam a teoria de que os espermatozoides que resistem ao processo pós-descongelamento sofrem danos mitocondriais que resultam em características similares à capacitação, mas por mecanismos distintos que não compatíveis a criocapacitação. Além disso, estudos *in vitro* demonstram que a ligação às células epiteliais do oviduto prolonga a vida útil de espermatozoides, mas o epitélio se liga preferencialmente a espermatozoides não capacitados (THOMAS; BALL; BRINSKO, 1995). Se a capacitação reduz a capacidade dos espermatozoides se ligarem ao epitélio do oviduto, logicamente, este fator também contribui com a queda de fertilidade e menor tempo de viabilidade do sêmen congelado.

Na simples avaliação morfológica após o descongelamento destacam-se alterações de peça intermediária, marcadas pelo moderado inchaço na região das mitocôndrias, confirmando que estas organelas são um alvo potencial dos significativos danos decorrentes do processamento (BRUM; SABEUR; BALL, 2008). Além disso, os danos em peça intermediária induzidos pela criopreservação também são correlacionados com o aumento da taxa de LPO (BAUMBER et al., 2000). Em células somáticas, o inchaço celular induzido pela hiperosmolaridade pode ativar a fosfolipase A2 associada à membrana, que causa a formação de ácidos graxos poliinsaturados livres como ácido aracnoico, e subsequentemente ativa a NADPH oxidase, aumentando a produção de O_2^- (LAMBERT; PEDERSEN; POULSEN, 2006). Esta alteração de permeabilidade de membrana para NAPH, catalisando a produção de O_2^- e sua subsequente dismutação em H_2O_2 desencadeia o início do ciclo de reações que configuram o estresse oxidativo (BALL; VO; BAUMBER, 2001).

Certos níveis de estresse oxidativo permitem que espermatozoides sofram lesão de DNA e ainda assim fecundem atingindo resultados de fertilidade aceitáveis, no entanto, como a célula espermática tem pouco potencial de reparação de DNA, o prejuízo é notado somente durante o desenvolvimento embrionário (AHMADI; NG, 1999; MORRIS, 2002). A adição de

alguns antioxidantes ou depuradores de enzimas em diluentes para congelamento foram testados e não reduziram o nível de fragmentação de DNA subsequente ao processo de criopreservação de sêmen equino. Enquanto isso, no mesmo estudo, a adição de SOD no diluente elevou significativamente o nível de fragmentação de DNA, sugerindo que o H_2O_2 é o principal agente indutor de danos de DNA pela maior taxa de conversão de O_2^- em H_2O_2 (BAUMBER; BALL; LINFOR, 2005). Os danos de fragmentação de DNA em sêmen equino são claramente relatados a partir da exposição a ERO exógeno, mas também ao simples processo de criopreservação (BAUMBER et al., 2003b). Dentre os experimentos realizados por BAUMBER et al. (2003), foi possível constatar o aumento significativo da fragmentação de DNA em espermatozoides incubados com o sistema X-XO, assim como este aumento também foi observado após o processo de criopreservação quando comparado ao sêmen fresco e apenas processado. Corroborando com esta hipótese, a fragmentação de DNA é incrementada de forma linear com o crescente número de ciclos de congelamento e descongelamento de sêmen (LINFOR; POMMER; MEYERS, 2002). Algumas vezes o dano de DNA induzido por ERO pode ocorrer antes mesmo de qualquer outra alteração rotineiramente mensurável, como por exemplo, motilidade ou até mesmo a fusão de gametas in vitro (AITKEN et al., 1998; RESTREPO; PIZARRO; ROJANO, 2019). Além disso, os espermatozoides que apresentam grau moderado de dano de DNA são mais propensos a se ligarem ao oócito devido aos efeitos positivos do baixo nível de oxidação e estresse na capacitação espermática, incrementando os riscos de mortalidade embrionária precoce (AHMADI; NG, 1999).

2.3. Suplementação de antioxidantes em diluentes de congelamento

A partir das limitações relatadas para a criopreservação de sêmen equino, surgiram muitas tentativas de utilização de antioxidantes como aditivos ao diluente de congelamento visando conservar a qualidade do sêmen descongelado. BAUMBER, BALL & LINFOR (2005) suplementaram o diluente (INRA 82+2,5% glicerol) com diferentes concentrações de antioxidantes enzimáticos (200 U/mL de SOD, 200 de U/mL CAT e 10 mM GSH) e compostos não enzimáticos (10 mM de ácido ascórbico e 1mM de α -tocoferol). A adição dos antioxidantes não melhorou a motilidade, fragmentação do DNA, integridade acrossomal, viabilidade ou potencial de membrana mitocondrial após o descongelamento. Pelo contrário, a SOD elevou a fragmentação de DNA, provavelmente devido ao estresse adicional causado

pela dismutação de O_2^- em H_2O_2 ; e o veículo (etanol 0,5%) utilizado para dissolução do α -tocoferol e ácido ascórbico resultou em redução significativa do percentual de espermatozoides vivos com acrossoma intacto em relação às amostras do grupo controle. Curiosamente, tanto a SOD, quanto o ácido ascórbico isoladamente já haviam provado efeitos benéficos sobre a fragmentação de DNA em espermatozoides humanos durante incubação na técnica de percoll (HUGHES et al., 1998). A GSH e a CAT, investigadas anteriormente pelo mesmo grupo de pesquisa (BAUMBER et al., 2003b), também haviam apresentado resultados benéficos contra a fragmentação de DNA induzida em espermatozoides incubados a 38° por 1 hora em diluente de sêmen equino (E-Z Mixin®). Os autores ainda relatam a possibilidade de que a gema de ovo, base do diluente utilizado no presente estudo, possa ter fornecido proteção antioxidante suficiente e a suplementação subsequente não tenha oferecido nenhum benefício adicional. Em contrapartida, DE OLIVEIRA et al. (2013) encontraram resultados satisfatórios na suplementação de 2,5 mM de Glutathione em diluente Botucurio® (Botufarma, Botucatu, Brasil), que também é a base de gema de ovo, preservando a motilidade total, motilidade progressiva, viabilidade e integridade de membrana plasmática.

O α -tocoferol é considerado o principal protetor de membrana contra ROS e LPO (AGARWAL; SALEH; BEDAIWY, 2003; DAD et al., 2006), e embora não tenha apresentado bons resultados na investigação de BAUMBER, BALL & LINFOR (2005), a suplementação de 2mM em diluente Ghent® (Minitube, Iberia, Espanha) relatada por DE VASCONCELOS FRANCO et al. (2016) revelou dados motivadores. Foi constatada redução da taxa de LPO, mas não houve alteração na viabilidade espermática e potencial de membrana mitocondrial. Quando utilizada uma taxa de resfriamento moderada previamente ao congelamento, houve um maior percentual de fertilização in vitro (FIV) heteróloga comparada ao grupo controle. Em taxa de refrigeração lenta, não foram observadas diferenças significativas em relação à taxa de fertilização entre o diluente suplementado ou diluente controle. Portanto, parece que o α -tocoferol foi capaz de proteger os espermatozoides contra danos oxidativos durante o congelamento, melhorando a taxa de FIV heteróloga, mas foi dependente da dose, composição do diluente, veículo, e taxa de resfriamento.

Motivados pelos danos mitocondriais e LPO induzida pela criopreservação, associado à reconhecida capacidade de eliminação de ERO mitocondriais da melatonina (MILCZAREK et al., 2010; PETROSILLO et al., 2009), BALAO DA SILVA et al. (2011) investigaram seu efeito na incubação de espermatozoides equinos em meio INRA 96 suplementado com

diferentes concentrações deste antioxidante (0, 50 pm, 100 pm, 200 pm, 1 μ M). Ao final do período de três horas de incubação a 37°C na concentração de 1 μ M de melatonina, o percentual de espermatozoides com alto potencial de membrana mitocondrial aumentou significativamente. Além disso, também foi observada uma redução significativa na LPO, confirmando o potente efeito antioxidante sobre as mitocôndrias espermáticas. Embora já tenham sido identificados e classificados como MT1 e MT2 em outras espécies (FUJINOKI, 2008; VAN VUUREN et al., 1992), BALAO DA SILVA et al. (2011) não conseguiram encontrar receptores específicos para melatonina em espermatozoides equinos, atribuindo seus efeitos benéficos a sua capacidade de eliminação de ERO já documentada a nível mitocondrial (GARCÍA et al., 1999; MILCZAREK et al., 2010).

Mais recentemente, CONTRERAS et al. (2019) também testaram a suplementação de diferentes antioxidantes no diluente de congelamento Equifreeze 1 step® (Minitube, Tiefenbach, Alemanha) inclusive após o descongelamento. A suplementação com MnTBAP no diluente pré-congelamento apresentou efeito antioxidante superior aos tratamentos com N-acetilcisteína, FeTPPS e controle. O MnTBAP é uma metaloporfirina sintética que penetra facilmente através das células membranas, possui atividades semelhantes a SOD e CAT (CUZZOCREA et al., 1999). Foi capaz de aumentar a viabilidade, motilidade total e potencial de membrana mitocondrial no sêmen descongelado. Além disso, protegeu os espermatozoides contra a criocapacitação e foi mais eficiente no controle da produção de ERO, principalmente O_2^- . O MnTBAP também já havia sido utilizado com efeitos positivos na taxa de fertilidade *in vivo* após IA e *in vitro* em alguns parâmetros de qualidade espermática de garanhões (CONTRERAS et al., 2019; SHOJAEIAN; NOURI; KOHRAM, 2018). Após a realização de FIV heteróloga, e a avaliação de ligação à ZP sugere que os espermatozoides criopreservados com MnTBAP apresentem maior funcionalidade, já que o número de células ligadas aos oócitos bovinos foi significativamente maior que o grupo controle. A N-acetilcisteína, reduz a produção de concentrações intracelulares de H_2O_2 , e reage de forma relativamente lenta com o O_2^- (OWADA et al., 2013). Sua reação lenta com o O_2^- , que foi o principal ERO detectado no estudo de TREULEN et al. (2019), talvez seja a razão de seu resultado insatisfatório, onde os danos à membrana plasmática e potencial de membrana mitocondrial foram maiores após o descongelamento, e continuaram durante a incubação do sêmen descongelado.

A Quercetina é um antioxidante do grupo flavonoide, capaz de estabilizar a produção de ERO e reduzir a ocorrência de LPO, suprimindo a formação de O_2^- , quelatos de ferro e

radicais peroxilipídicos (AFANAS'EV et al., 1989). RESTREPO, MONTOYA & ROJANO (2016) avaliaram a adição de 100 µg de Quercetina em diluente Equiplus® (Minitube) suplementado com dimetilformamida e gema de ovo sobre a qualidade do sêmen descongelado. A Quercetina elevou a capacidade antioxidante total, e não apresentou diferença na integridade de membrana plasmática ou morfologia espermática. No entanto, reduziu a motilidade total, progressiva, integridade estrutural e funcional da membrana plasmática do sêmen descongelado. Entre as possíveis causas do efeito negativo na motilidade, os autores apontam o declínio da atividade de Ca^{2+} ATPase já observada em espermatozoides humanos (KHANDUJA; VERMA; BHARDWAJ, 2001). Em outro estudo realizado por GIBB et al. (2013), a adição de 0,15 mM de Quercetina em diluente Keney modificado melhorou a motilidade e a capacidade de ligação a zona pelúcida de oócitos bovinos, além de reduzir a taxa de fragmentação do DNA avaliada no sêmen sexado e descongelado. Resultados positivos também foram encontrados por SILVA et al. (2018), onde avaliaram o impacto da suplementação de 20 µg de Quercetina por mL de diluente Botucrío® sobre a taxa de fertilidade de garanhões considerados sensíveis ao congelamento. A suplementação aumentou a fertilidade do sêmen descongelado (54%; 14/26) quando comparado ao grupo controle (23%; 6/26), mostrando que a Quercetina é uma molécula considerável para reduzir os danos sofridos durante a criopreservação em garanhões, especialmente aqueles considerados sensíveis ao processamento da técnica.

A falta de uniformidade entre estudos, diferentes doses utilizadas, influência da composição dos diluentes, variabilidade racial, e a discrepância de dados sobre os efeitos da adição de antioxidantes para criopreservação dificultam a atribuição de conclusões sólidas a respeito destes compostos e seu real efeito na fertilidade. Portanto, mais estudos devem ser realizados para avaliar a aplicação clínica de antioxidantes e o efeito de suas combinações sobre a variabilidade racial e individual da espécie equina, visando estabelecer condições para o emprego consciente de novas tecnologias e resultados promissores no uso do sêmen congelado.

2.4. Resveratrol como agente antioxidante, propriedades e mecanismo de ação

O RSV é um polifenol encontrado em diversas espécies de plantas, entre elas, a uva. O interesse por seus efeitos benéficos a saúde começou a partir de um fenômeno chamado

“paradoxo francês”, que descreve a baixa incidência de cardiopatias na França em comparação com outros países, mesmo associando dieta rica em gorduras e pouco exercício (NEVES et al., 2012; RICHARD, 1987). Desde então, o RSV tem sido alvo de pesquisas que comprovam diversas propriedades biológicas, entre elas, o efeito antioxidante (OLAS et al., 2006). O reconhecimento do RSV como antioxidante natural foi inicialmente esclarecido por ZINI et al. (1999), sugerindo três mecanismos de ação: competição com a coenzima Q reduzindo o complexo da cadeia oxidativa, eliminação de O_2^- formado nas mitocôndrias, e inibição da LPO induzida pela reação de Fenton. A velocidade constante de reação do RSV com o radical OH foi relatada por LEONARD et al. (2003), esta propriedade é importante para comparação de propriedades antioxidantes com outros agentes já estabelecidos. Usando a reação de Fenton, que envolve Fe^{2+} e H_2O_2 para geração de OH, os autores revelaram que o RSV é um eficiente eliminador de OH com uma taxa de reação constante significativa, pouco menor que os agentes conhecidos como ácido ascórbico e GSH. As propriedades antioxidantes do RSV também foram confirmadas por MARTINEZ & MORENO (2000), onde demonstraram um potencial efeito inibidor da produção de O_2^- e H_2O_2 estimulado por lipopolissacarídeos em macrófagos. Dentre os diversos sistemas orgânicos em que as ações do RSV já foram estudadas, vem se tornando frequente sua avaliação na preservação da qualidade do sêmen.

Na espécie ovina, a suplementação de 15 μ g de RSV em diluente apresentou inibição da LPO em sêmen refrigerado por 24 horas (SARLÓS et al., 2002), embora existam evidências de redução do potencial de membrana mitocondrial com concentrações entre 0 a 20 μ g/mL em diluente de sêmen congelado nesta mesma espécie (SILVA et al., 2012). O congelamento sêmen humano com adição de 10 mM de RSV em diluente de congelamento, apresentou reduções de fragmentação de DNA no sêmen descongelado (BRANCO et al., 2010). Enquanto isso, o mesmo grupo de pesquisa constatou redução da peroxidação lipídica do sêmen descongelado humano, utilizando diluentes suplementados com 0,1, 1,0 e 10 mM de RSV (GARCEZ et al., 2010). Já na espécie bovina, relatou-se elevação nas taxas de motilidade total e progressiva, aumento da atividade mitocondrial e redução do percentual de células com DNA fragmentado suplementando diluente de congelamento com 1 mM de RSV (BUCAK et al., 2015). Ainda em bovinos, constatou-se melhora em alguns parâmetros de cinética espermática e elevação do número de espermatozoides com membrana plasmática íntegra, quando o diluente foi suplementado com 50 μ M de RSV (ASSUNÇÃO, 2016).

O RSV também foi avaliado no sêmen equino refrigerado (GIARETTA et al., 2014), onde o diluente Kenney foi suplementado com 10, 20, 40 e 80 μM de RSV, avaliando parâmetros de qualidade espermática imediatamente e 24h pós refrigeração. Não houve diferença no momento inicial, mas as 24h foi evidente a queda de espermatozoides viáveis com alto potencial mitocondrial nos grupos 40 e 80 μM comparados ao controle. Quedas significativas de cinética espermática também foram observadas no grupo 80 μM comparado aos grupos de controle e 20 μM . Os autores consideram que as concentrações de 40 e 80 μM possam causar danos funcionais aos espermatozoides, agindo como fator pró-oxidante. Na suplementação do diluente de congelamento (MATHENY et al., 2015), os dados mostram que concentrações de 1 e 10 mM de RSV podem ser eficientes para minimizar a produção de ERO, mas não preserva a motilidade ou viabilidade espermática, indicando ainda um possível efeito citotóxico, supostamente pela utilização de doses muito elevadas. Mais recentemente, NOURI et al. (2018) selecionaram garanhões da raça árabe com baixa qualidade espermática e testaram concentrações de 5 μM , 10 μM e 20 μM em diluente de congelamento. A dose mais baixa, não influenciou em nenhum dos parâmetros avaliados, enquanto a dose mais alta apresentou efeito deletério sobre a motilidade total. No entanto, resultados promissores foram obtidos com o uso de 10 μM , agindo positivamente sobre a motilidade total e progressiva, integridade de membrana plasmática, viabilidade, potencial de membrana mitocondrial, produção de ERO e fragmentação de DNA.

Com base nas baixas taxas de fertilidade obtidas com o uso de sêmen congelado equino, em grande parte por danos inerentes às condições de estresse oxidativo, mais estudos são necessários para a identificação de componentes antioxidantes eficazes em diluentes no processo de criopreservação. Finalmente, deve-se notar que de acordo com a concentração de RSV, sua propriedade deve assumir um perfil antioxidante, imparcial ou pró-oxidante. Dessa forma, resultados divergentes com o RSV e gametas masculinos podem ser atribuídos a vários fatores, incluindo espécie, raça, composição de diluentes, protocolos de congelamento, e até mesmo variabilidade individual.

3 OBJETIVO

3.1 Objetivo geral

Investigar o efeito da suplementação de Resveratrol sobre o protocolo de congelamento de sêmen de garanhões da raça Crioula.

3.2 Objetivos específicos

Avaliar o(a):

Efeito da adição de RSV em diluente de congelamento de sêmen equino sobre os parâmetros de cinética e longevidade dos espermatozoides descongelados.

Eficácia da adição de RSV no diluente de congelamento de sêmen equino sobre a preservação da morfologia; integridade de membrana plasmática, acrossomal; e potencial de membrana mitocondrial dos espermatozoides descongelados;

Impacto da adição de RSV no diluente de congelamento de sêmen equino sobre o estresse oxidativo de espermatozoides descongelados;

4 ARTIGO CIENTÍFICO

Os resultados que fazem parte desta dissertação estão apresentados sob a forma de artigo científico. As seções *Material e Métodos*, *Resultados*, *Discussão e Referências Bibliográficas* encontram-se no próprio manuscrito, que está apresentado da mesma forma que será submetido ao periódico ***Ciência Rural***.

Efeito do Resveratrol na criopreservação de sêmen de garanhões da raça Crioula

Effect of Resveratrol on cryopreservation of semen from Crioulos stallions

Natan da Cruz de Carvalho¹ Lucas Dalle Laste Dacampo¹ Daniele Missio² Karine Mattos³ Henrique Kurtz Löff⁴ Janislene Mach Trentin¹ Fábio Gallas Leivas¹ Francielli Weber Santos Cibir¹ Daniela dos Santos Brum¹

RESUMO

Este estudo teve como objetivo avaliar o efeito da adição de Resveratrol (RSV) em diluente para congelamento sobre parâmetros cinéticos, funcionais e bioquímicos de espermatozoides descongelados de garanhões da raça Crioula. Doze ejaculados (n = quatro garanhões, três ejaculados cada), coletados com vagina artificial, foram diluídos até a concentração de 50×10^6 spz/mL e fracionados em duas alíquotas. As alíquotas foram centrifugadas a 500 x G por 15min, o sobrenadante descartado e os pellets ressuspensos e ajustados na concentração de 200×10^6 spz/mL com diluente de congelamento: Botucurio® sem suplementação (Controle), ou suplementado com 10 μ M RSV. Após o congelamento e descongelamento, foram avaliados os seguintes parâmetros: cinética espermática; longevidade; morfologia; integridade de membrana plasmática, acrossomal e potencial de membrana mitocondrial; produção de espécies reativas de oxigênio e potencial antioxidante total. Com este estudo, concluiu-se que a adição de 10 μ M RSV em diluente de congelamento

¹ Laboratório de Biotecnologia da Reprodução, Universidade Federal do Pampa (UNIPAMPA), Uruguai, RS, Brasil. 97501-970, Uruguai, RS, Brasil. E-mail: danielabrum@unipampa.edu.br. Autor para correspondência.

² Laboratório de Biotecnologia e Reprodução, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Santa Maria, RS, Brasil.

³ Departamento de Medicina Molecular, Universidade Laval (ULaval), Québec, Canadá.

⁴ LÖF Reprodução Equina, Uruguai, RS, Brasil.

Botucurio® não influenciou na qualidade do sêmen de garanhões da raça Crioula após o congelamento.

Palavras-chave: equino, antioxidante, CASA, congelamento, espécies reativas de oxigênio, RSV, cavalo crioulo.

ABSTRACT

This study had the aim to check the effect of adding Resveratrol (RSV) in semen freezing extender on kinetic, functional and biochemical parameters of thawed sperm from Crioulos stallions. Twelve ejaculates (n = four stallions, three ejaculates each), collected with artificial vagina, were diluted to a concentration of 50×10^6 sperm/mL and fractionated in two aliquots. The fractions were centrifuged at $500 \times G$ for 15min, and the pellets were resuspended and adjusted to a concentration of 200×10^6 sperm/mL in two freezing extender treatments: Botucurio® without any supplementation (control), or supplemented with $10 \mu M$ RSV. After freezing and thawing, the following parameters were evaluated: sperm kinetics; longevity; morphology; plasmatic, acrosomal membrane integrity and mitochondrial membrane potential; production of reactive oxygen species and total antioxidant potential. With this study, we concluded that the addition of $10 \mu M$ RSV in Botucurio® freezing extender did not influence the quality of thawed semen of Crioulos stallions.

Key-words: equine, antioxidant, CSA, freezing, reactive oxygen species, RSV, Crioulo horse.

INTRODUÇÃO

Apesar das inúmeras vantagens, o processo de congelamento e descongelamento do sêmen reduz consideravelmente as taxas de fecundação. Perdas de 40 a 50% dos

espermatozoides durante o processo de congelamento e descongelamento são relatadas, estes prejuízos são desencadeados por alterações na estabilidade e integridade da membrana, estresse oxidativo, e dano de estrutura nuclear (WATSON, 2000). Para que o espermatozoide desenvolva adequadamente suas funções, desde a movimentação pela tuba uterina até a fecundação, é imprescindível a utilização da energia que é produzida nas mitocôndrias, no entanto, o processo de congelamento também é responsável por disfunções mitocondriais, sendo a principal fonte de espécies reativas de oxigênio (ERO) (SCHOBER et al., 2007). A produção excessiva de ERO danifica a membrana plasmática, contribui com a perda de motilidade espermática, e consequentemente, reduz a capacidade fecundante (AURICH, 2005). A suplementação com agentes antioxidantes no diluente de sêmen tem o intuito de minimizar os danos provocados pelo processo de criopreservação (SHIMOKAWA et al., 2012; WHITE, 1993), que por si só, é um agravante do estresse oxidativo (CURRY, 2000).

O Resveratrol (RSV) é um polifenol encontrado em diversas espécies de plantas, entre elas, a uva. O interesse por seus efeitos benéficos a saúde começou a partir de um fenômeno chamado “paradoxo francês”, que descreve a baixa incidência de cardiopatias na França em comparação com outros países, mesmo associando dieta rica em gorduras e pouco exercício (NEVES et al., 2012; RICHARD, 1987). Desde então, o RSV tem sido alvo de pesquisas que comprovam diversas propriedades biológicas, entre elas, o efeito antioxidante (OLAS et al., 2006), sendo comprovadamente um eficiente eliminador de radicais hidroxila, superóxido e radicais livres, atuando na proteção contra danos de peroxidação lipídica e fragmentação de DNA (LEONARD et al., 2003). Dentre os diversos sistemas orgânicos em que as ações do RSV já foram estudadas, vem se tornando frequente sua avaliação na preservação da qualidade de espermatozoides, como sêmen ovino refrigerado (SARLÓS et al., 2002) e congelado (SILVA et al., 2012); prévia incubação e criopreservação de sêmen humano (BRANCO et al., 2010; GARCEZ et al., 2010; TSONEV et al., 2018) congelamento de sêmen bovino (BUCAK et al., 2015); refrigeração (GADANI et al., 2017) e diluente de descongelamento (RIGO et al., 2016) de sêmen de javalis; em congelamento de sêmen bubalino (LONGOBARDI et al., 2017); congelamento de sêmen de galos (NAJAFI et al., 2019); e também em refrigeração (MATHENY et al., 2015) e congelamento (GIARETTA et

al., 2014; NOURI et al., 2018) de sêmen equino. Considerando o estresse oxidativo como fator primordial na queda da qualidade do sêmen congelado e uma forte limitação da utilização desta técnica, o uso do RSV como agente antioxidante no diluente para criopreservação de sêmen pode ser uma alternativa na preservação de parâmetros cinéticos, funcionais e bioquímicos de espermatozoides equinos descongelados. A partir do exposto, o presente trabalho tem como objetivo verificar o efeito da suplementação de 10 μ M de RSV em diluente de congelamento sobre parâmetros cinéticos, funcionais e bioquímicos de espermatozoides descongelados de garanhões com histórico de boa qualidade seminal na raça Crioula.

MATERIAL E MÉTODOS

Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética para Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal do Pampa (número de protocolo: 028/2018). Reagentes e produtos químicos com fontes não mencionadas no trabalho foram adquiridos na Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, EUA).

Com o auxílio de vagina artificial modelo Missouri, foram coletados doze ejaculados de quatro garanhões (três ejaculados cada) da raça Crioula, com idade entre cinco e quinze anos, em regime de coleta durante estação reprodutiva na América do Sul. Imediatamente após a coleta, o sêmen foi avaliado e diluído em Botusêmen® até a concentração de 50×10^6 spz/mL, e em seguida, duas amostras de 30 mL em tubos graduados foram transportadas ao laboratório em caixa térmica refrigerada a 15°C (máximo de 30 minutos) para posterior processamento. Para este estudo, foram utilizados apenas ejaculados que atendessem os parâmetros mínimos de volume livre da fração gel ≥ 30 mL, motilidade total $\geq 70\%$, concentração $\geq 100 \times 10^6$ spz/mL e ausência de alterações físicas macroscópicas.

As amostras foram centrifugadas a 500 x G por 15 min, o sobrenadante foi eliminado e o pellet ressuspendido e ajustado para concentração de 200×10^6 spz/mL em diluente: Botucurio® sem suplementação (Controle) ou, Botucurio® suplementado com 10 μ M de RSV.

Posteriormente, as amostras foram envasadas em palhetas de 0,5 mL, congeladas em máquina automatizada TK 3000 (TK tecnologia em congelação, Ltda., Minas Gerais, Brasil) e depois imersas em nitrogênio líquido.

Para avaliação, duas palhetas de cada grupo/partida foram descongeladas em banho-maria a 37°C por 30 segundos. As seguintes variáveis foram examinadas: cinética espermática; morfologia; longevidade; integridade de membrana plasmática, acrossomal e potencial de membrana mitocondrial; produção de espécies reativas de oxigênio; e potencial antioxidante total.

A cinética espermática foi avaliada pelo software Assisted Semen Analysis (SCA, versão 5.1; Microptic, Barcelona, Espanha). Espermatozoides que apresentaram linearidade (STR) acima de 80% foram considerados progressivos. Os seguintes parâmetros foram analisados: motilidade total (TM; %), motilidade progressiva (PM; %), velocidade retilínea (VSL; $\mu\text{m/s}$), velocidade curvilínea (VCL; $\mu\text{m/s}$), velocidade média do trajeto (VAP; $\mu\text{m/s}$), retilinearidade (STR; %), linearidade (LIN; %), amplitude de batimento lateral de cabeça (ALH; μm), frequência de batimento flagelar cruzado (BCF; Hz), e percentual de espermatozoides com movimentos rápidos (Hyperactivity; %). Para longevidade, alíquotas de 200 μL de sêmen foram mantidas em banho-maria a 38 ° C, e os valores de cinética espermática registrados ao final de duas horas (SIEME, 2009).

Para morfologia espermática, uma alíquota de sêmen foi fixada em formaldeído 4% na proporção 1:20. As alterações morfológicas dos espermatozoides foram quantificadas por meio de preparação úmida em microscópio de contraste de fase, com aumento de 1000 x, onde 200 células de cada tratamento foram contadas e seus defeitos classificados quanto a patologias de cabeça, peça intermediária e cauda (BLOM, 1973).

A integridade das membranas plasmática, acrossomal e potencial de membrana mitocondrial foram avaliadas simultaneamente de acordo com o protocolo descrito por

NASCIMENTO et al. (2008) e CELEGHINI et al. (2010), pela associação das sondas iodeto de propídio (PI), aglutinina de *Pisum sativum* conjugada com isotiocionato de fluoresceína (FITC – PSA) e Tetraetilbenzimidazolil carbocianina (JC-1).

Os níveis de espécies reativas foram determinados por um método espectrofluorimétrico, usando 2', 7'-diclorofluoresceína diacetato (DCF-D) (LOETCHUTINAT et al., 2005). As amostras foram incubadas no escuro com 5 µL de DCF-D (1mM). Foi monitorada a oxidação da DCF-D para diclorofluoresceína (DCF) fluorescente pelas espécies reativas. A emissão da intensidade de fluorescência foi realizada em 520 nm (com excitação de 488 nm) 60 minutos após a adição da DCF-D, em Espectrofluorímetro Shimadzu modelo RF-5301PC. Os resultados foram expressos em UF (unidades de fluorescência).

O potencial antioxidante total foi determinado através do potencial antioxidante redutor férrico (FRAP). Neste ensaio, os antioxidantes presentes na amostra foram avaliados como redutores do Fe⁺³ a Fe⁺², o qual é quelado pela 2,4,6-Tri (2-piridil)-s-triazina (TPTZ) para formar o complexo Fe⁺²-TPTZ com absorção máxima em 593 nm (BENZIE; STRAIN, 1996).

Todas as variáveis contínuas foram testadas para normalidade utilizando o teste de Shapiro Wilk e, quando necessário, foi aplicado um método de normalização de acordo com a distribuição dos dados. O efeito dos tratamentos nas diferentes variáveis contínuas foi determinado pelo Test T Student. A longevidade foi analisada utilizando ANOVA para dados repetidos. Para todas as análises foi considerado como nível de significância $P \leq 0,05$.

RESULTADOS

Os resultados de cinética espermática imediatamente após o descongelamento e após 120 min de incubação em banho maria à 38°C (longevidade), entre grupo Controle e Resveratrol (RSV), estão demonstrados na tabela 1. A suplementação do diluente para

congelamento Botucio® com RSV nas condições avaliadas não influenciou os parâmetros de cinética espermática, tão pouco alterou a longevidade dos espermatozoides. Na figura 1, é evidenciado o decréscimo das médias de motilidade total durante a incubação em banho-maria a 38°C. As avaliações de cinética espermática após o descongelamento foram realizadas com intervalos de 30 minutos, durante o período de duas horas, e constatou-se que o RSV não foi capaz de preservar a qualidade espermática em nenhum período avaliado. Não havendo diferença em relação aos grupos controle e RSV, as figuras 2 e 3 apresentam as médias dos valores de motilidade total e progressiva, de cada garanhão, durante a avaliação de longevidade. A intensidade do declínio dos valores de motilidade ao longo do tempo mostra uma importante variabilidade individual, onde a criotolerância do sêmen dos garanhões A e D é superior aos garanhões B e C, mas ainda assim não foi observada ação significativa do RSV sobre estes parâmetros em relação aos cavalos com espermatozoides tolerantes ou mais sensíveis ao congelamento.

Os parâmetros de morfologia espermática, integridade de membrana plasmática e acrossomal, potencial de membrana mitocondrial, produção de ERO e potencial antioxidante total entre grupo Controle e RSV estão representados na tabela 2. Não foram observadas influências estatisticamente significativas quando comparadas as médias entre os grupos.

DISCUSSÃO

Apesar das inúmeras vantagens, o processo de congelamento de sêmen reduz consideravelmente a qualidade e tempo sobrevivência de espermatozoides no trato reprodutivo da fêmea (ORTEGA FERRUSOLA et al., 2009). Na peça intermediária dos espermatozoides, encontram-se mitocôndrias, que geram energia a partir de reservas intracelulares de ATP responsáveis pela motilidade espermática (GARNER; HAFEZ, 2016).

O congelamento induz danos axonemais, resultando em declínio de motilidade, de potencial de membrana mitocondrial e de integridade morfológica (DE LAMIRANTE; CAGNON, 1992). Estes prejuízos decorrentes de danos letais e subletais nas células espermáticas são desencadeados por alterações de membrana, estresse oxidativo e dano nuclear (WATSON, 2000). Devido a isso, entre as alternativas para a proteção dos espermatozoides durante a criopreservação, relata-se a suplementação de diluentes de sêmen com moléculas antioxidantes (BAUMBER; BALL; LINFOR, 2005; CONTRERAS et al., 2019).

Devido ao crescente interesse e reconhecimento das propriedades biológicas do RSV como antioxidante natural (OLAS et al., 2006; ZINI et al., 1999), o presente estudo avaliou a influência da sua suplementação em diluente de congelamento sobre a qualidade de espermatozoides equinos descongelados. Embora o efeito da suplementação de RSV em diluente de congelamento tenha sido verificado em várias espécies, inclusive equinos (BUCAK et al., 2015; LONGOBARDI et al., 2017; LV et al., 2019; NAJAFI et al., 2019; NOURI et al., 2018; SILVA et al., 2012; TSONEV et al., 2018), este é o primeiro estudo que estuda seu potencial efeito com garantias de boa qualidade seminal, considerando os parâmetros mínimos desejáveis pelo Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (2013). A concentração de RSV selecionada para este estudo foi baseada no resultado promissor obtido com garantias de baixa qualidade seminal da raça Árabe (NOURI et al., 2018).

A motilidade espermática está intimamente relacionada à eficiência reprodutiva, e pode ser um indicador confiável na avaliação da qualidade do sêmen congelado e seu potencial de fertilização (MORTIMER, 2000). Em nosso estudo, a suplementação de 10 μ M de RSV no diluente de congelamento não influenciou na perda de motilidade espermática após o processo de congelamento e descongelamento. Resultados similares foram encontrados utilizando modelos humanos (GARCEZ et al., 2010), bubalinos (LONGOBARDI et al., 2017) e ovinos (SILVA et al., 2012). Efeitos positivos sobre a preservação da motilidade total ou

progressiva foram observados em touros, homens, garanhões, galos e bodes (BUCAK et al., 2015; LV et al., 2019; NAJAFI et al., 2019; NOURI et al., 2018; TSONEV et al., 2018). LAGOUGE et al. (2006) provaram que os efeitos de pequenas concentrações de RSV estavam associados à indução de genes responsáveis pela fosforilação oxidativa e biogênese mitocondrial, promovendo funções mitocondriais, sugerindo que pequenas concentrações de RSV poderiam aumentar o metabolismo energético dos gametas e melhorar sua vitalidade. Em contrapartida, altas concentrações de RSV podem levar a produção de ERO e quinonas citotóxicas como resultado de um processo auto-oxidativo (KLAUS et al., 2010), e essa forma oxidada pode gerar complexos com cobre que induzem a fragmentação de DNA (HADI et al., 2010). O efeito deletério de altas doses de RSV em sêmen congelado foi relatado por alguns autores em parâmetros como motilidade espermática, potencial de membrana mitocondrial e fragmentação de DNA (BUCCI et al., 2018; GARCEZ et al., 2010; SILVA et al., 2012).

Dentre as variáveis que dificultam a comparação entre diferentes estudos, estão o tempo de incubação do sêmen com o RSV e o momento da avaliação espermática. Ainda não foi elucidado em que momento o RSV age na célula e contribui efetivamente para a preservação da qualidade seminal. Os experimentos que apresentam efeitos positivos do RSV sobre a motilidade total relatam protocolos com um período de equilíbrio térmico variável entre duas a cinco horas, sob temperaturas entre 4 e 5 °C, no qual o RSV permanece em contato com o sêmen previamente à imersão das amostras em nitrogênio líquido (BUCAK et al., 2015; LV et al., 2018; NAJAFI et al., 2019). A avaliação espermática nestes relatórios se deu imediatamente após o descongelamento das palhetas em banho-maria a 37 graus por 20 a 30 segundos. Na espécie equina, além de ocorrer centrifugação e remoção do plasma seminal, o tempo de equilíbrio térmico e consequentemente exposição ao diluente com RSV é consideravelmente menor. No estudo relatado por NOURI et al. (2018), a taxa de refrigeração permitiu a manutenção do RSV (10 µM) com o sêmen por um período aproximado de 37 min,

e os resultados mostram elevação da motilidade total em relação ao grupo controle ($43,85 \pm 3,80\%$ e $40,27 \pm 2,96\%$; $p < 0,05$). Em nossa pesquisa, a taxa de refrigeração ocorreu em um período ainda menor (27 min), e não foi constatada nenhuma influência significativa na motilidade total entre os grupos. Assim como NOURI et al. (2018), as palhetas do presente estudo foram descongeladas em banho-maria a 37°C por 30 segundos. Porém, enquanto o estudo previamente citado realizou uma única avaliação 10 min após o descongelamento, nossas amostras foram avaliadas imediatamente (0 min), e repetidamente a cada 30 min após o descongelamento (30, 60, 90 e 120 min), não havendo influência significativa em qualquer tempo avaliado (Figura 1).

Sabendo que a criopreservação induz a elevação de anormalidades morfológicas em relação ao sêmen fresco (BRUM; SABEUR; BALL, 2008), nosso estudo revela que não houve influência do RSV sobre a preservação da morfologia espermática, assim como relatado em humanos, galos e bodes (LV et al., 2019; NAJAFI et al., 2019; TSONEV et al., 2018), com exceção da dose de 250 μm em sêmen de bodes que acarretou no aumento do percentual de espermatozoides anormais.

A integridade de membrana plasmática, acrossomal e potencial de membrana mitocondrial também são parâmetros importantes associados à criodanos e potencial fecundante de espermatozoides (SILVA; GADELLA, 2006). Assim como relatado com baixas doses de RSV em carneiros (SILVA et al., 2012), nenhum destes parâmetros foi influenciado em nosso estudo. Claramente, estudos prévios apontaram efeito protetor à integridade de membrana plasmática (LONGOBARDI et al., 2017; LV et al., 2019; NAJAFI et al., 2019; NOURI et al., 2018), provavelmente relacionado à alta capacidade de atingir membranas rígidas peroxidadas e aumentar a fluidez da membrana, interagindo com os radicais da bicamada lipídica alterada (TADOLINI et al., 2000), mantendo a integridade e equilíbrio iônico da membrana celular (BRITTES et al., 2010). Devido a essa ação, o RSV

pode preservar a motilidade e proteger a célula contra a peroxidação lipídica, preservando a cromatina e as membranas plasmáticas (COLLODEL et al., 2011). Semelhante a ação do colesterol em membranas biológicas, o RSV contribui para a regulação da estrutura e fluidez da membrana, influenciando na atividade de suas proteínas e, portanto, controlando as vias de sinalização celular (NEVES et al., 2012). As mitocôndrias são as principais organelas responsáveis pela síntese de ATP e produção de ERO, resultados do processo de fosforilação oxidativa. Danos mitocondriais interrompem a produção de ATP e elevam a produção de ERO, acarretando em estresse oxidativo e declínio da qualidade espermática (HUSSAIN et al., 2018; MORTIMER, 2000; RAVAGNAN; ROUMIER; KROEMER, 2002). Os estudos que apresentam efeito protetor do RSV sobre o potencial de membrana mitocondrial (BUCAK et al., 2015; LV et al., 2019; NAJAFI et al., 2019; NOURI et al., 2018), associam este efeito à própria relação da função mitocondrial com a motilidade e viabilidade espermática (KASAI et al., 2002). Em todos os experimentos previamente relatados com sêmen congelado, o RSV não alterou a integridade acrossomal dos espermatozoides (BUCAK et al., 2015; BUCCI et al., 2018; GADANI et al., 2017; SILVA et al., 2012), com exceção de LV et al. (2019) que constatou efeito benéfico em caprinos. Provavelmente, as concentrações entre 10 e 50 μ M utilizadas por LV et al. (2019) tenham afetado o influxo de cálcio, mantendo a concentração de ATP (MARTÍN-HIDALGO et al., 2013), impedindo a capacitação prematura e a reação do acrossomal (LI et al., 2018; SARLÓS et al., 2002), melhorando motilidade em decorrência da economia de seu conteúdo limitado de energia.

Apesar do RSV ser um potente neutralizador de ERO (LEONARD et al., 2003), mas em conformidade com os resultados observados por LONGOBARDI et al. (2017), tanto a produção de ERO quanto o potencial antioxidante total do sêmen descongelados não foram alterados pela adição de RSV. Contrastando nossos resultados, com doses de 10 e 50 μ M, LV et al. (2019) observaram proteção do RSV contra estresse oxidativo utilizando a detecção de

H2DCFDA em sêmen caprino descongelado, provavelmente pela baixa concentração de peróxidos resultante do potencial de remoção de ERO atribuído ao RSV (DELMAS; JANNIN; LATRUFFE, 2005; GARCEZ et al., 2010).

Finalmente, deve-se notar que de acordo com a concentração de RSV, sua propriedade deve assumir um perfil antioxidante, imparcial ou pró-oxidante. Dessa forma, resultados divergentes com o RSV e gametas masculinos podem ser atribuídos a associação de vários fatores, incluindo composição de diluentes, presença de plasma seminal, protocolos de congelamento, espécies, raças e até mesmo variabilidade individual. Portanto, estudos voltados à determinação prévia de perfis de estresse oxidativo devem ser realizados buscando diluentes e concentrações de compostos antioxidantes adequadas para cada condição.

CONCLUSÃO

Este estudo demonstrou que a adição de Resveratrol na concentração de 10 μ M em diluente de congelamento Botucrio® não influencia na qualidade de sêmen descongelado de garanhões da raça Crioula. A utilização de garanhões férteis em nossa pesquisa e a concentração de 10 μ M de Resveratrol podem explicar os resultados encontrados. Em decorrência da variabilidade racial e individual entre garanhões, mais estudos devem ser realizados para definição de perfis de estresse oxidativo e seleção de concentrações adequadas para preservação da qualidade do sêmen descongelado condições específicas.

AGRADECIMENTO (S)

Os autores agradecem a LÖF Reprodução Equina pela disponibilidade dos animais; a Botupharma (Botucatu, Brasil) pelo provimento de diluentes; a Universidade Federal do Pampa e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo financiamento deste projeto.

DECLARAÇÃO DE CONFLITO DE INTERESSE

Os autores não têm conflito a declarar.

CONTRIBUIÇÕES DOS AUTORES

NCC, DM, FGL, FWSC e DSB conceberam e projetaram experimentos. NCC, DM, LDLD, KM e FWSC realizaram o experimento e as análises laboratoriais. HKL supervisionou e coordenou o experimento com os animais. DM e LDLD realizaram análises estatísticas de dados experimentais. NCC, DSB e JMT prepararam o rascunho do manuscrito. Todos os autores revisaram criticamente o manuscrito e aprovaram a versão final.

REFERÊNCIAS

- AURICH, C. Factors affecting the plasma membrane function of cooled-stored stallion spermatozoa. **Animal Reproduction Science**, v. 89, n. 1- 4 SPEC. ISS., p. 65–75, 2005.
- BAUMBER, J.; BALL, B. A.; LINFOR, J. J. Assessment of the cryopreservation of equine spermatozoa in the presence of enzyme scavengers and antioxidants. **American Journal of Veterinary Research**, v. 66, n. 5, p. 772–779, 2005.
- BENZIE, I. F. F.; STRAIN, J. J. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: The FRAP assay. **Analytical Biochemistry**, v. 239, n. 1, p. 70–76, 1996.
- BLOM, E. The ultrastructure of some characteristic sperm defects and a proposal for a new classification of the bull spermogram. **Nordisk veterinærmedicin**, v. 25, n. 7, p. 383—391, 1973.

BRANCO, C. S. et al. Resveratrol and ascorbic acid prevent DNA damage induced by cryopreservation in human semen. **Cryobiology**, v. 60, p. 235–237, 2010.

BRITTES, J. et al. Effects of resveratrol on membrane biophysical properties: Relevance for its pharmacological effects. **Chemistry and Physics of Lipids**, v. 163, n. 8, p. 747–754, 2010.

BRUM, A. M.; SABEUR, K.; BALL, B. A. Apoptotic-like changes in equine spermatozoa separated by density-gradient centrifugation or after cryopreservation. **Theriogenology**, v. 69, n. 9, p. 1041–1055, 2008.

BUCAK, M. N. et al. Lycopene and resveratrol improve post-thaw bull sperm parameters: Sperm motility, mitochondrial activity and DNA integrity. **Andrologia**, v. 47, p. 545–552, 2015.

BUCCI, D. et al. Combined effects of resveratrol and epigallocatechin-3-gallate on post thaw boar sperm and IVF parameters. **Theriogenology**, v. 117, p. 16–25, 2018.

CELEGHINI, E. C. C. et al. Damage assessment of the equine sperm membranes by fluorimetric technique. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 53, n. 6, p. 1285–1292, 2010.

COLLODEL, G. et al. Effect of trans-resveratrol on induced oxidative stress in human sperm and in rat germinal cells. **Reproductive Toxicology**, v. 31, n. 2, p. 239–246, 2011.

CBRA, Colégio Brasileiro de Reprodução Animal. **Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal**. 3. Ed. Belo Horizonte. p. 43-46, 2013.

CONTRERAS, M. J. et al. Cryopreservation of stallion semen: Effect of adding antioxidants to the freezing medium on sperm physiology. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 55, n. 2, p. 229–239, 2019.

CORMIER, N.; SIRARD, M.-A.; BAILEY, J. L. Premature capacitation of bovine spermatozoa is initiated by cryopreservation. **Journal of andrology**, v. 18, n. 4, p. 461–468,

1997.

CURRY, M. R. Cryopreservation of semen from domestic livestock. **Reviews of Reproduction**, v. 5, n. 1, p. 46–52, 2000.

DE LAMIRANTE, E.; CAGNON, C. Reative oxygen species and human spermatozoa I. Effects on motility os intact spermatozoa and on sperm axonemes. **Society**, v. 13, n. 5, p. 368–378, 1992.

DELMAS, D.; JANNIN, B.; LATRUFFE, N. Resveratrol: natural properties against atherosclerosis, associated pro- inflammatory effects and aging Dominique Delmas, Brigitte Jannin and Norbert Latruffe. **Molecular Nutrition & Food Research**, v. 49, n. 5, p. 377–395, 2005.

GADANI, B. et al. Resveratrol and Epigallocatechin-3-gallate addition to thawed boar sperm improves in vitro fertilization. **Theriogenology**, v. 90, p. 88–93, 2017.

GAMBINI, J. et al. Properties of Resveratrol: In Vitro and In Vivo Studies about Metabolism, Bioavailability, and Biological Effects in Animal Models and Humans. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2015, p. 13, 2015.

GARCEZ, M. E. et al. Effects of resveratrol supplementation on cryopreservation medium of human semen. **Fertility and Sterility**, v. 94, n. 6, p. 2118–2121, 2010.

GARNER, D. L.; HAFEZ, E. S. E. Spermatozoa and Seminal Plasma. In: HAFEZ, B.; HAFEZ, E. S. E. (Eds.). . **Reproduction in Farm Animals**. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2016. p. 96–109.

GIARETTA, E. et al. Is Resveratrol Effective in Protecting Stallion Cooled Semen? **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 34, p. 1307–1312, 2014.

HADI, S. M. et al. Resveratrol mobilizes endogenous copper in human peripheral lymphocytes leading to oxidative DNA breakage: A putative mechanism for chemoprevention of cancer. **Pharmaceutical Research**, v. 27, n. 6, p. 979–988, 2010.

HUSSAIN, M. et al. Additives used in semen preservation in animals : A short review.

International Journal of Chemical Studies, v. 6, n. 5, p. 354–361, 2018.

KASAI, T. et al. Relationship between sperm mitochondrial membrane potential , sperm motility , and fertility potential. **Asian Journal of Andrology**, v. 4, p. 97–103, 2002.

KLAUS, V. et al. 1,4-Naphthoquinones as inducers of oxidative damage and stress signaling in HaCaT human keratinocytes. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 496, n. 2, p. 93–100, 2010.

LAGOUGE, M. et al. Resveratrol Improves Mitochondrial Function and Protects against Metabolic Disease by Activating SIRT1 and PGC-1 α . **Cell**, v. 127, n. 6, p. 1109–1122, 2006.

LEONARD, S. S. et al. Resveratrol scavenges reactive oxygen species and effects radical-induced cellular responses. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 309, p. 1017–1026, 2003.

LI, C. Y. et al. Resveratrol significantly improves the fertilisation capacity of bovine sex-sorted semen by inhibiting apoptosis and lipid peroxidation. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 1–10, 2018.

LI, Y. **Antioxidants in Biology and Medicine: Essentials, Advances, and Clinical Applications**. New York: Nova Science Publishers, Inc., 2011.

LOETCHUTINAT, C. et al. Spectrofluorometric determination of intracellular levels of reactive oxygen species in drug-sensitive and drug-resistant cancer cells using the 2',7'-dichlorofluorescein diacetate assay. **Radiation Physics and Chemistry**, v. 72, n. 2–3, p. 323–331, 2005.

LONGOBARDI, V. et al. Resveratrol prevents capacitation-like changes and improves in vitro fertilizing capability of buffalo frozen-thawed sperm. **Theriogenology**, v. 88, p. 1–8, 2017.

LV, C. et al. Improving the quality of cryopreserved goat semen with a commercial bull

extender supplemented with resveratrol. **Animal Reproduction Science**, v. 208, p. 106127, 2019.

MARTÍN-HIDALGO, D. et al. The Effect of Resveratrol on the Quality of Extended Boar Semen During Storage at 17°C. **Journal of Agricultural Science**, v. 5, n. 8, p. 231–242, 2013.

MATHENY, K. et al. Posters 140 Effects of resveratrol on post-thaw quality of stallion sperm. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 35, p. 437–445, 2015.

MORTIMER, S. T. CASA — Practical Aspects Andrology Lab Corner. **Journal of Andrology**, v. 21, p. 515–524, 2000.

NAJAFI, A. et al. Effect of resveratrol-loaded nanostructured lipid carriers supplementation in cryopreservation medium on post-thawed sperm quality and fertility of roosters. **Animal Reproduction Science**, v. 201, p. 32–40, 2019.

NASCIMENTO, J. et al. Effects of Sperm Concentration and Straw Volume on Motion Characteristics and Plasma, Acrosomal, and Mitochondrial Membranes of Equine Cryopreserved Spermatozoa. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 28, n. 6, p. 351–358, 2008.

NEVES, A. et al. Resveratrol in Medicinal Chemistry: A Critical Review of its Pharmacokinetics, Drug-Delivery, and Membrane Interactions. **Current Medicinal Chemistry**, v. 19, n. 11, p. 1663–1681, 2012.

NOURI, H. et al. Using Resveratrol and Epigallocatechin-3-Gallate to Improve Cryopreservation of Stallion Spermatozoa With Low Quality. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 70, p. 18–25, 2018.

OLAS, B. et al. Resveratrol, a natural phenolic compound may reduce carbonylation proteins induced by peroxynitrite in blood platelets. **General Physiology and Biophysics**, v. 25, n. 2, p. 215–222, 2006.

- ORTEGA FERRUSOLA, C. et al. Lipid peroxidation, assessed with BODIPY-C 11, increases after cryopreservation of stallion spermatozoa, is stallion-dependent and is related to apoptotic-like changes. **Reproduction**, v. 138, p. 55–63, 2009.
- RAVAGNAN, L.; ROUMIER, T.; KROEMER, G. Mitochondria, the killer organelles and their weapons. **Journal of Cellular Physiology**, v. 192, n. 2, p. 131–137, 2002.
- RICHARD, J. L. Coronary risk factors. The French paradox. **Archives des maladies du coeur et des vaisseaux**, v. 80 Spec No, p. 17–21, 1987.
- RIGO, V. et al. Addition of resveratrol in boar insemination doses: impact on sperm membrane integrity and lipid peroxidation. **International Symposium on Animal Biology of Reproduction Anim. Reprod**, v. 14, n. 1, 2016.
- SARLÓS, P. et al. Comparative evaluation of the effect of antioxidants in the conservation of ram semen. **Acta Veterinaria Hungarica**, v. 50, n. 2, p. 235–245, 2002.
- SCHOBBER, D. et al. Influence of cryopreservation on mitochondrial functions in equine spermatozoa. **Theriogenology**, v. 68, p. 745–754, 2007.
- SHIMOKAWA, K. et al. Improvement of the post-thaw qualities of Okinawan native Agu pig sperm frozen in an extender supplemented with antiapoptotic PTD-FNK protein. **Theriogenology**, v. 78, n. 7, p. 1446–1455, 2012.
- SIEME, H. Semen Evaluation. In: SAMPER, J. C. (Ed.). . **Equine Breeding Management and Artificial Insemination**. 2. ed. St. Louis, Missouri: Elsevier, 2009. p. 57–74.
- SILVA, E. C. B. et al. Effect of antioxidants resveratrol and quercetin on in vitro evaluation of frozen ram sperm. **Theriogenology**, v. 77, n. 8, p. 1722–1726, 2012.
- SILVA, P. F. N.; GADELLA, B. M. Detection of damage in mammalian sperm cells. **Theriogenology**, v. 65, n. 5 SPEC. ISS., p. 958–978, 2006.
- SOLEAS, G. J.; DIAMANDIS, E. P.; GOLDBERG, D. M. Resveratrol: A Molecule whose time has come? And gone? **Clinical Biochemistry**, v. 30, n. 2, p. 91–113, 1997.

TADOLINI, B. et al. Resveratrol inhibition of lipid peroxidation. **Free Radical Research**, v. 33, n. 1, p. 105–114, 2000.

TSONEV, P. et al. The positive effect of resveratrol on motility and DNA fragmentation of human spermatozoa during cryopreservation. **Youth Scientific Conference “Kliment’s Days”**, v. 103, n. 4, p. 22–28, 2018.

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

WHITE, I. G. 1993_White_Englelen.pdf. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 6, n. 5, p. 639–658, 1993.

ZINI, R. et al. Effects of resveratrol on the rat brain respiratory chain. **Drugs under experimental and clinical research**, v. 25, n. 2–3, p. 87–97, 1999.

Tabela 1– Parâmetros de cinética espermática (média $\pm$ erro padrão) após descongelamento (tempo 0 min) e após 120 min de incubação a 37°C (longevidade), de sêmen congelado com diluente Botucurio® sem adição de antioxidante (Controle); ou com adição de 10 μ M de Resveratrol (RSV), proveniente de garanhões da raça Crioula ($P > 0,05$).

Parâmetros	0 min		120 min	
	C	RSV	C	RSV
TM (%)	59,63 $\pm$ 4,09	57,83 $\pm$ 4,32	19,60 $\pm$ 2,81	17,13 $\pm$ 2,47
PM (%)	34,76 $\pm$ 3,43	36,00 $\pm$ 4,04	10,39 $\pm$ 1,58	8,69 $\pm$ 1,38
VCL (μ m/s)	68,17 $\pm$ 3,82	70,26 $\pm$ 2,93	51,97 $\pm$ 1,38	50,00 $\pm$ 1,22
VSL (μ m/s)	43,37 $\pm$ 2,25	46,20 $\pm$ 2,29	81.7 $\pm$ 21.8	83.6 $\pm$ 17.3
VAP (μ m/s)	57,03 $\pm$ 3,47	59,35 $\pm$ 3,09	40,89 $\pm$ 1,48	38,37 $\pm$ 1,30
LIN (%)	66,34 $\pm$ 1,48	67,09 $\pm$ 1,70	66,92 $\pm$ 2,68	64,32 $\pm$ 2,35
STR (%)	79,43 $\pm$ 1,40	79,61 $\pm$ 1,01	85,04 $\pm$ 2,15	83,40 $\pm$ 1,88
ALH (μ m)	2,04 $\pm$ 0,07	2,01 $\pm$ 0,08	2,05 $\pm$ 0,08	2,06 $\pm$ 0,07
BCF (Hz)	7,83 $\pm$ 0,22	7,86 $\pm$ 0,21	9,80 $\pm$ 0,47	9,82 $\pm$ 0,41
Hyperactivity (%)	4,55 $\pm$ 0,65	4,67 $\pm$ 0,62	1,58 $\pm$ 0,31	1,33 $\pm$ 0,27

Motilidade total (TM), motilidade progressiva (PM), velocidade curvilínea (VCL), velocidade retilínea (VSL), velocidade média do trajeto (VAP), linearidade (LIN), retilinearidade (STR), amplitude de batimento lateral de cabeça (ALH), frequência de batimento flagelar cruzado (BCF), e percentual de espermatozoides com movimentos rápidos (Hyperactivity).

Tabela 2– Parâmetros de funções bioquímicas e funcionais (média $\pm$ erro padrão) de sêmen congelado com diluente Botucio® sem adição de antioxidante (C); ou com adição de 10 μ M de Resveratrol (RSV), proveniente de garanhões da raça Crioula ($P > 0,05$).

	C	RSV
Integridade de membrana plasmática (%)	54,02 $\pm$ 2,73	44,92 $\pm$ 12,26
Integridade de acrossoma (%)	78,68 $\pm$ 4,42	78,82 $\pm$ 3,44
Potencial de membrana mitocondrial (%)	36,71 $\pm$ 4,63	36,42 $\pm$ 9,53
ROS	25,23 $\pm$ 0,89	25,54 $\pm$ 0,89
FRAP	339,10 $\pm$ 9,96	365,20 $\pm$ 9,96
Defeitos maiores (%)	12,74 $\pm$ 1,22	12,91 $\pm$ 1,22
Defeitos menores (%)	8,98 $\pm$ 0,77	9,48 $\pm$ 0,77

Produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), potencial antioxidante redutor férrico (FRAP).

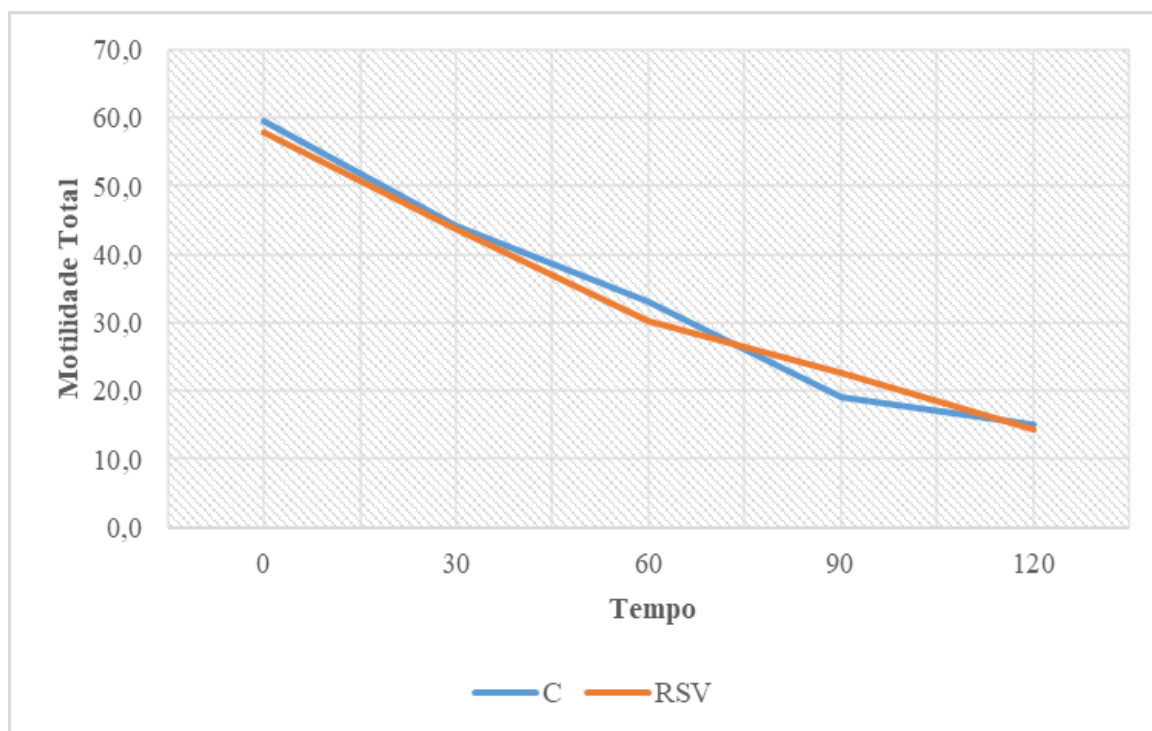


FIGURA 1 – Valores médios de motilidade total de sêmen congelado com diluente Botucurio® sem adição de antioxidante (Controle), ou com adição de 10 μM de Resveratrol (RSV), proveniente de garanhões da raça Crioula. As avaliações foram realizadas com intervalos de trinta minutos (0, 30, 60, 90 e 120) durante incubação em banho-maria a 37°C ($P > 0,05$).

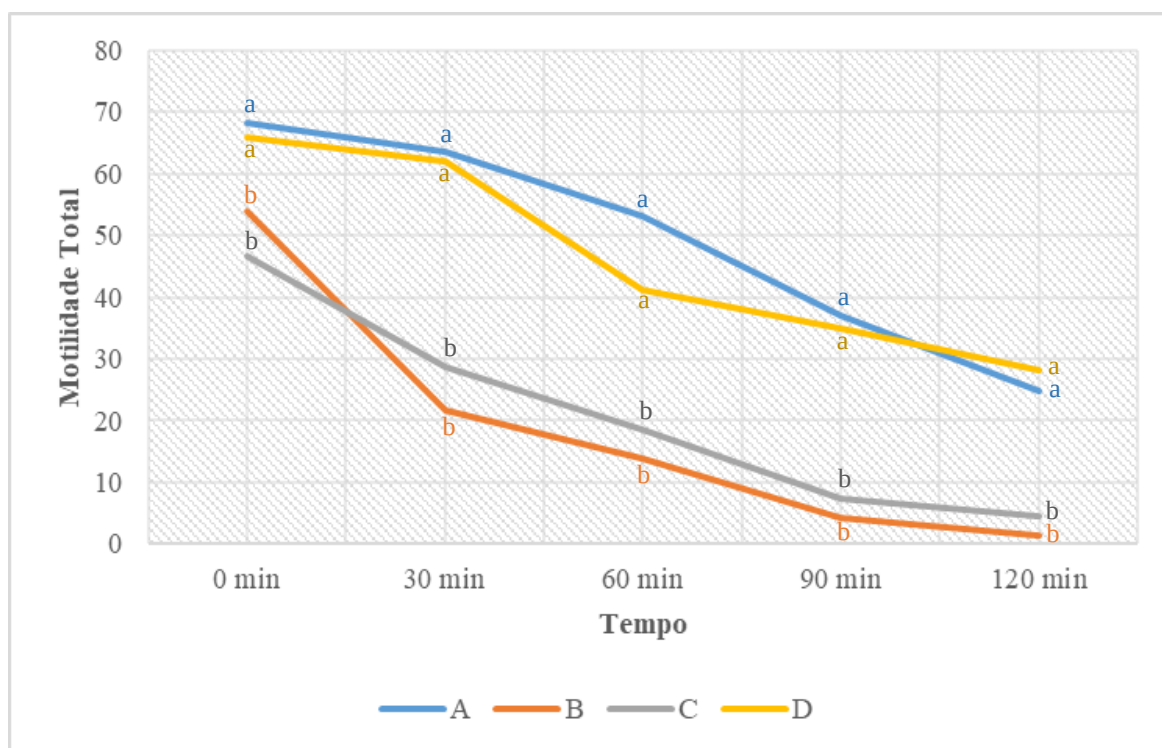


FIGURA 2 - Valores médios de Motilidade Total com intervalos de trinta minutos (0, 30, 60, 90 e 120), durante duas horas de incubação a 38°C de doze amostras de sêmen congelado provenientes de quatro garanhões da raça Crioula. As diferenças estatísticas ($P < 0,0001$) entre os indivíduos foram destacadas por letras diferentes em relação ao tempo de avaliação.

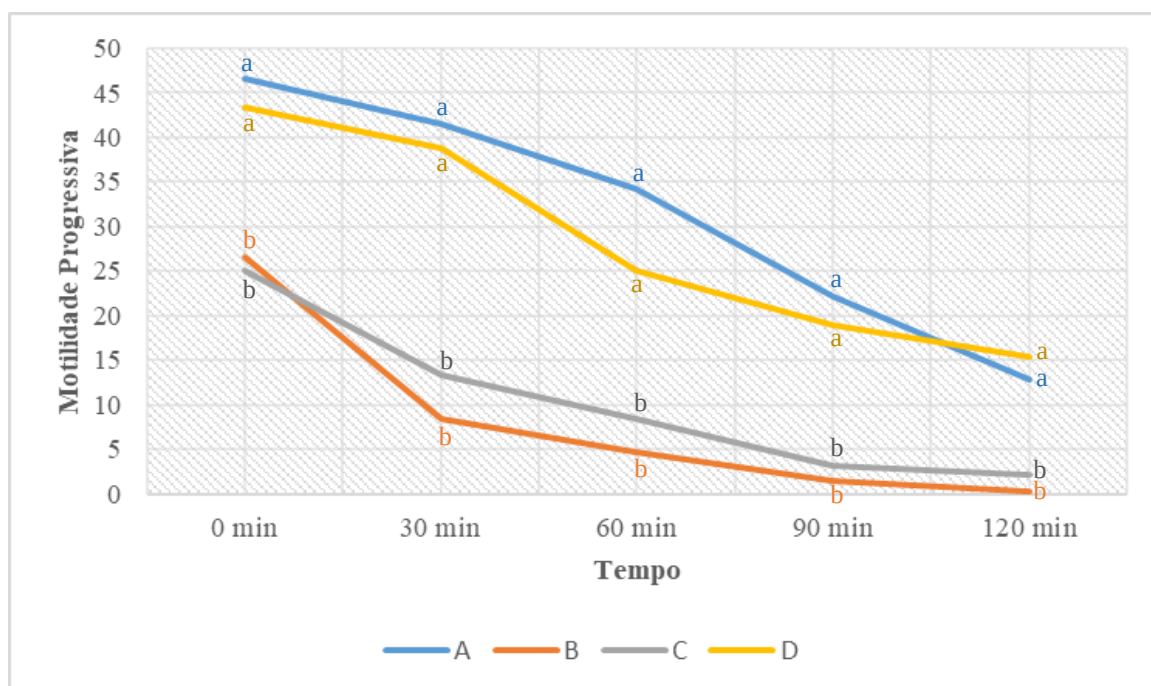


FIGURA 3 - Valores médios de Motilidade Progressiva com intervalos de trinta minutos (0, 30, 60, 90 e 120), durante duas horas de incubação a 37°C de doze amostras de sêmen congelado provenientes de quatro garanhões da raça Crioula. As diferenças estatísticas ($P < 0,0001$) entre os indivíduos foram destacadas por letras diferentes em relação ao tempo de avaliação.

5 CONCLUSÃO

- A adição de 10 μ M de RSV no diluente para congelamento Botucurio® não alterou os parâmetros de cinética e longevidade, não apresentou eficácia sobre a preservação da morfologia, integridade de membrana plasmática, acrossomal e potencial de membrana mitocondrial, e tão pouco influenciou as condições de estresse oxidativo de espermatozoides descongelados. Portanto, nas condições avaliadas, o RSV não influencia na qualidade de sêmen descongelado de garanhões da raça Crioula.
- Devido à grande variabilidade individual encontrada nos parâmetros seminais dos garanhões estudados, se faz necessária a realização de estudos com um maior número de indivíduos e repetições para determinação de conclusões definitivas sobre o efeito do RSV na congelabilidade de espermatozoides.

6 PERSPECTIVAS

- Os garanhões utilizados nesta pesquisa foram animais adultos, da raça Crioula, com parâmetros de motilidade seminal desejáveis em exame andrológico. Mais estudos podem ser realizados verificando o efeito de outras doses e a suplementação do sêmen de garanhões desta raça com baixa qualidade seminal.
- Baseado nos resultados divergentes apresentados por modelos experimentais semelhantes em diferentes pesquisas, estudos que determinem o perfil oxidativo do ejaculado de garanhões podem ser úteis para justificar a adequação de diferentes doses de RSV conforme a demanda antioxidante em indivíduos da mesma espécie, ou raça.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AFANAS'EV, I. B. et al. Chelating and free radical scavenging mechanisms of inhibitory action of rutin and quercetin in lipid peroxidation. **Biochemical Pharmacology**, v. 38, n. 11, p. 1763–1769, 1989.

AGARWAL, A.; SALEH, R. A.; BEDAIWY, M. A. Role of reactive oxygen species in the pathophysiology of human reproduction. **Fertility and Sterility**, v. 79, n. 4, p. 829–843, 2003.

AHMADI, A.; NG, S. C. Fertilizing ability of DNA-damaged spermatozoa. **Journal of Experimental Zoology**, v. 284, n. 6, p. 696–704, 1999.

AITKEN, R. J. et al. Redox regulation of tyrosine phosphorylation in human spermatozoa and its role in the control of human sperm function. **Journal of Cell Science**, v. 108, n. 5, p. 2017–2025, 1995.

_____. et al. A novel signal transduction cascade in capacitating human spermatozoa characterised by a redox-regulated , cAMP-mediated induction of tyrosine phosphorylation. **Journal of Cell Scien**, v. 656, p. 645–656, 1998.

_____.; DREVET, J. R. The importance of oxidative stress in determining the functionality of mammalian spermatozoa: A two-edged sword. **Antioxidants**, v. 9, n. 2, p. 18, 2020.

ALVARENGA, M. A.; PAPA, F. O. Principais distúrbios reprodutivos observados em

garanhões no Brasil. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, n.6, p. 204–209, 2009.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE CRIADORES DE CAVALOS CRIoulos. **Regulamento do Registro Genealógico da Raça equina Crioula**: capítulo VIII, seção I. Brasil, 2020.

ASSUNÇÃO, C. M. **EFEITO DO RESVERATROL NA CRIOPRESERVAÇÃO DO SÊMEN BOVINO**. [s.l.] Universidade Federal de Juiz de Fora, 2016.

AURICH, C. Factors affecting the plasma membrane function of cooled-stored stallion spermatozoa. **Animal Reproduction Science**, v. 89, p. 65–75, 2005.

BAKER, H. G. et al. Protective effect of antioxidants on the impairment of sperm motility by activated polymorphonuclear leukocytes. **Fertility and Sterility**, v. 65, n. 2, p. 411–419, 1996.

BALAO DA SILVA, C. M. et al. Melatonin reduces lipid peroxidation and apoptotic-like changes in stallion spermatozoa. **Journal of Pineal Research**, v. 51, n. 2, p. 172–179, 2011.

BALL, B. A. et al. Catalase activity in equine semen. **American Journal of Veterinary Research**, v. 61, n. 9, p. 1026–1030, 2000.

_____. et al. Effect of antioxidants on preservation of motility, viability and acrosomal integrity of equine spermatozoa during storage at 5°C. **Theriogenology**, v. 56, p. 577–589, 2001.

_____.; VO, A. T.; BAUMBER, J. Generation of reactive oxygen species by Equine Spermatozoa. **American Journal of Veterinary Research**, v. 62, n. 4, p. 508–515, 2001.

_____. Oxidative stress, osmotic stress and apoptosis: Impacts on sperm function and preservation in the horse. **Animal Reproduction Science**, v. 107, n. 3–4, p. 257–267, 2008.

_____. Animal Andrology applications. Applied Andrology in Horses. In: CHENOWETH, P. J.; LORTON, S. P. (Eds.). **Animal Andrology: Theories and Applications**. Wallingford: Centre for Agriculture and Bioscience International (CABI) p. 254–296, 2014.

BAUMBER, J. et al. The Effect of Reactive Oxygen Species on Equine Sperm. **Journal of Andrology**, v. 21, n. 6, p. 895–902, 2000.

_____. et al. Generation of reactive oxygen species by equine neutrophils and their effect on motility of equine spermatozoa. **Theriogenology**, v. 57, n. 3, p. 1025–1033, 2002.

_____. et al. Reactive oxygen species promote tyrosine phosphorylation and capacitation in equine spermatozoa. **Theriogenology**, v. 60, n. 7, p. 1239–1247, 2003a.

_____. et al. Reactive Oxygen Species and Cryopreservation Promote DNA Fragmentation in Equine Spermatozoa. **Journal of Andrology**, v. 24, n. 4, p. 621–628, 2003b.

_____.; BALL, B. A. Determination of glutathione peroxidase and superoxide dismutase-like activities in equine spermatozoa , seminal plasma , and reproductive tissues. **American Journal of Veterinary Research**, v. 66, n. 8, p. 1415–1419, 2005.

_____.; BALL, B. A.; LINFOR, J. J. Assessment of the cryopreservation of equine spermatozoa in the presence of enzyme scavengers and antioxidants. **American Journal of Veterinary Research**, v. 66, n. 5, p. 772–779, 2005.

BRANCO, C. S. et al. Resveratrol and ascorbic acid prevent DNA damage induced by cryopreservation in human semen. **Cryobiology**, v. 60, p. 235–237, 2010.

BRAVO, M. M. et al. Changes in tyrosine phosphorylation associated with true capacitation and capacitation-like state in boar spermatozoa. **Molecular Reproduction and Development**, v. 71, n. 1, p. 88–96, 2005.

BRUM, A. M.; SABEUR, K.; BALL, B. A. Apoptotic-like changes in equine spermatozoa separated by density-gradient centrifugation or after cryopreservation. **Theriogenology**, v. 69, n. 9, p. 1041–1055, 2008.

BUCAK, M. N. et al. Lycopene and resveratrol improve post-thaw bull sperm parameters: Sperm motility, mitochondrial activity and DNA integrity. **Andrologia**, v. 47, p. 545–552, 2015.

BURNAUGH, L.; SABEUR, K.; BALL, B. A. Generation of superoxide anion by equine spermatozoa as detected by dihydroethidium. **Theriogenology**, v. 67, n. 3, p. 580–589, 2007.

CONTRERAS, M. J. et al. Cryopreservation of stallion semen: Effect of adding antioxidants to the freezing medium on sperm physiology. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 55, n. 2, p. 229–239, 2019.

CURRY, M. R. Cryopreservation of semen from domestic livestock. **Reviews of Reproduction**, v. 5, n. 1, p. 46–52, 2000.

CUZZOCREA, S. et al. Beneficial effects of Mn(III)Tetrakis (4-benzoic acid) porphyrin (MnTBAP), A Superoxid Dismutase mimetic, in carrageenan-induced pleurisy. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 26, n. 1/2, p. 25–33, 1999.

DAD, S. et al. Formation of singlet oxygen from solutions of vitamin E. **Free Radical Research**, v. 40, n. 3, p. 333–338, 2006.

DE LAMIRANTE, E.; CAGNON, C. Reative oxygen species and human spermatozoa I. Effects on motility os intact spermatozoa and on sperm axonemes. **Society**, v. 13, n. 5, p. 368–378, 1992.

_____.; CAGNON, C. Capacitation-associated of Superoxide Anion by human spermatozoa. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 18, n. 3, p. 487–495, 1995.

_____. et al. Reactive oxygen species and sperm physiology. **Reviews of Reproduction**, v. 2, p. 48–54, 1997.

DE OLIVEIRA, R. A. et al. Addition of glutathione to an extender for frozen equine semen. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 33, n. 12, p. 1148–1152, 2013.

DE VASCONCELOS FRANCO, J. S. et al. Effects of α -tocopherol and freezing rates on the quality and heterologous in vitro fertilization capacity of stallion sperm after cryopreservation. **Theriogenology**, v. 86, n. 4, p. 957–962, 2016.

FAO. **Live Animals**. Disponível em: <<http://www.fao.org/faostat/en/#data/QA>>. Acesso em: 21 mar. 2018.

FRACZEK, M.; KURPISZ, M. The redox system in human semen and peroxidative damage of spermatozoa. **Postepy Hig Med Dosw**, v. 59, p. 523–534, 2005.

FUJINOKI, M. Melatonin-enhanced hyperactivation of hamster sperm. **Reproduction**, v. 136, n. 5, p. 533–541, 2008.

GADANI, B. et al. Resveratrol and Epigallocatechin-3-gallate addition to thawed boar sperm improves in vitro fertilization. **Theriogenology**, v. 90, n. 1, p. 88–93, 2017.

GARCEZ, M. E. et al. Effects of resveratrol supplementation on cryopreservation medium of human semen. **Fertility and Sterility**, v. 94, n. 6, p. 2118–2121, 2010.

GARCÍA, J. J. et al. Role of pinoline and melatonin in stabilizing hepatic microsomal membranes against oxidative stress. **Journal of Bioenergetics and Biomembranes**, v. 31, n. 6, p. 609–616, 1999.

GIARETTA, E. et al. Is Resveratrol Effective in Protecting Stallion Cooled Semen? **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 34, p. 1307–1312, 2014.

GIBB, Z. et al. Quercetin improves the postthaw characteristics of cryopreserved sex-sorted and nonsorted stallion sperm. **Theriogenology**, v. 79, n. 6, p. 1001–1009, 2013.

HARRISON, R. A. P. Capacitation mechanisms, and the role of capacitation as seen in eutherian mammals. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 8, n. 4, p. 581–594, 1996.

HUGHES, C. M. et al. The effects of antioxidant supplementation during Percoll preparation on human sperm DNA integrity. **Human Reproduction**, v. 13, n. 5, p. 1240–1247, 1998.

IBGE. **Efetivo dos rebanhos por tipo de rebanho**. Disponível em: <<http://seriesestatisticas.ibge.gov.br>>. Acesso em: 25 maio. 2017.

KHANDUJA, K. L.; VERMA, A.; BHARDWAJ, A. Impairment of human sperm motility and viability by quercetin is independent of lipid peroxidation. **Andrologia**, v. 33, n. 5, p. 277–281, 2001.

KOBAYASHI, T. et al. Protective role of superoxide dismutase in human sperm motility: superoxide dismutase activity and lipid peroxide in human seminal plasma and spermatozoa. **Human Reproduction**, v. 6, n. 7, p. 987–991, 1991.

LAMBERT, I. H.; PEDERSEN, S. F.; POULSEN, K. A. Activation of PLA2 isoforms by cell swelling and ischaemia/hypoxia. **Acta Physiologica**, v. 187, n. 1–2, p. 75–85, 2006.

LEONARD, S. S. et al. Resveratrol scavenges reactive oxygen species and effects radical-induced cellular responses. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 309, p. 1017–1026, 2003.

LINFOR, J. J.; POMMER, A. C.; MEYERS, S. A. Osmotic stress induces tyrosine phosphorylation of equine sperm. **Theriogenology**, v. 58, n. 2–4, p. 355–358, 2002.

LONGOBARDI, V. et al. Resveratrol prevents capacitation-like changes and improves in vitro fertilizing capability of buffalo frozen-thawed sperm. **Theriogenology**, v. 88, p. 1–8, 2017.

MAPA. **Revisão do Estudo do Complexo do Agronegócio do Cavalo**. p. 54, 2016.

MARTIN, G. et al. Kinetics of occurrence of some features of apoptosis during the cryopreservation process of bovine spermatozoa. **Human Reproduction**, v. 22, n. 2, p. 380–388, 2007.

MARTINEZ, J.; MORENO, J. J. Effect of resveratrol, a natural polyphenolic compound, on reactive oxygen species and prostaglandin production. **Biochemical Pharmacology**, v. 59, n. 7, p. 865–870, 2000.

MATHENY, K. et al. Posters 140 Effects of resveratrol on post-thaw quality of stallion sperm. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 35, p. 437–445, 2015.

MILCZAREK, R. et al. Melatonin enhances antioxidant action of α -tocopherol and ascorbate against NADPH- and iron-dependent lipid peroxidation in human placental mitochondria. **Journal of Pineal Research**, v. 49, n. 2, p. 149–155, 2010.

MORRIS, I. D. The spectrum of DNA damage in human sperm assessed by single cell gel electrophoresis (Comet assay) and its relationship to fertilization and embryo development. **Human Reproduction**, v. 17, n. 4, p. 990–998, 2002.

NAJAFI, A. et al. Effect of resveratrol-loaded nanostructured lipid carriers supplementation

in cryopreservation medium on post-thawed sperm quality and fertility of roosters. **Animal Reproduction Science**, v. 201, p. 32–40, 2019.

NEVES, A. et al. Resveratrol in Medicinal Chemistry: A Critical Review of its Pharmacokinetics, Drug-Delivery, and Membrane Interactions. **Current Medicinal Chemistry**, v. 19, n. 11, p. 1663–1681, 2012.

NOURI, H. et al. Using Resveratrol and Epigallocatechin-3-Gallate to Improve Cryopreservation of Stallion Spermatozoa With Low Quality. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 70, p. 18–25, 2018.

NUNES, D. B. et al. Efficiency of short-term storage of equine semen in a simple-design cooling system. **Animal Reproduction Science**, v. 104, n. 2–4, p. 434–439, 2008.

OLAS, B. et al. Resveratrol, a natural phenolic compound may reduce carbonylation proteins induced by peroxynitrite in blood platelets. **General Physiology and Biophysics**, v. 25, n. 2, p. 215–222, 2006.

ORTEGA FERRUSOLA, C. et al. Lipid peroxidation, assessed with BODIPY-C 11, increases after cryopreservation of stallion spermatozoa, is stallion-dependent and is related to apoptotic-like changes. **Reproduction**, v. 138, p. 55–63, 2009.

OWADA, S. et al. Critical Role of H₂O₂ Generated by NOX4 during Cellular Response under Glucose Deprivation. **PLoS ONE**, v. 8, n. 3, 2013.

PETROSILLO, G. et al. Melatonin inhibits cardiolipin peroxidation in mitochondria and

prevents the mitochondrial permeability transition and cytochrome c release. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 47, n. 7, p. 969–974, 2009.

POMMER, A. C.; MEYERS, S. A. Tyrosine phosphorylation is an indicator of capacitation status in fresh and cryopreserved stallion spermatozoa. **Theriogenology**, v. 58, n. 2–4, p. 351–354, 2002.

RESTREPO, G.; MONTOYA, J. D.; ROJANO, B. Capacidad antioxidante y calidad post-descongelación de semen equino criopreservado con quercetina y ergotioneina Antioxidant capacity and post-thaw quality of stallion semen cryopreserved with quercetin and ergothioneine. v. 63, n. 3, 2016.

_____.; PIZARRO, E.; ROJANO, B. Antioxidant contribution of seminal plasma and its effect on the quality of frozen equine semen. **Revista de Investigaciones Veterinarias del Peru**, v. 30, n. 1, p. 276–287, 2019.

RICHARD, J. L. Coronary risk factors. The French paradox. **Archives des maladies du coeur et des vaisseaux**, v. 80 Spec No, p. 17–21, 1987.

RIGO, V. et al. Addition of resveratrol in boar insemination doses: impact on sperm membrane integrity and lipid peroxidation. **International Symposium on Animal Biology of Reproduction Anim. Reprod**, v. 14, n. 1, 2016.

SABEUR, K.; BALL, B. A. Detection of superoxide anion generation by equine spermatozoa. **American Journal of Veterinary Research**, v. 67, n. 4, p. 701–706, 2006.

SARLÓS, P. et al. Comparative evaluation of the effect of antioxidants in the conservation of ram semen. **Acta Veterinaria Hungarica**, v. 50, n. 2, p. 235–245, 2002.

SCHOBER, D. et al. Influence of cryopreservation on mitochondrial functions in equine spermatozoa. **Theriogenology**, v. 68, p. 745–754, 2007.

SHIMOKAWA, K. et al. Improvement of the post-thaw qualities of Okinawan native Agu pig sperm frozen in an extender supplemented with antiapoptotic PTD-FNK protein. **Theriogenology**, v. 78, n. 7, p. 1446–1455, 2012.

SHOJAEIAN, K.; NOURI, H.; KOHRAM, H. Does MnTBAP ameliorate DNA fragmentation and in vivo fertility of frozen-thawed Arabian stallion sperm? **Theriogenology**, v. 108, p. 16–21, 2018.

SILVA, E. C. B. et al. Effect of antioxidants resveratrol and quercetin on in vitro evaluation of frozen ram sperm. **Theriogenology**, v. 77, n. 8, p. 1722–1726, 2012.

SILVA, L. F. M. C. et al. Quercetin Promotes Increase in the Fertility Rate of Frozen Semen of Stallions Considered Sensitive to Freezing. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 66, n. 2014, p. 82, 2018.

THOMAS, A. D.; MEYERS, S. A.; BALL, B. A. Capacitation-like changes in equine spermatozoa following cryopreservation. **Theriogenology**, v. 65, n. 8, p. 1531–1550, 2006.

THOMAS, P. G. A.; BALL, B. A.; BRINSKO, S. P. Changes Associated with Induced Capacitation Influence the Interaction between Equine Spermatozoa and Oviduct Epithelial

Cell Monolayers. **Biology of Reproduction**, v. 52, n. monograph_series1, p. 697–705, 1995.

TREULEN, F. et al. Impact of post-thaw supplementation of semen extender with antioxidants on the quality and function variables of stallion spermatozoa. **Animal Reproduction Science**, v. 201, p. 71–83, 2019.

TSONEV, P. et al. The positive effect of resveratrol on motility and DNA fragmentation of human spermatozoa during cryopreservation. **Youth Scientific Conference “Kliment’s Days”**, v. 103, n. 4, p. 22–28, 2018.

VAN VUUREN, R. J. J. et al. Putative melatonin receptor in human spermatozoa. **Clinical Biochemistry**, v. 25, n. 2, p. 125–127, 1992.

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

WHITE, I. G. 1993_White_Englelen.pdf. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 6, n. 5, p. 639–658, 1993.

ZINI, R. et al. Effects of resveratrol on the rat brain respiratory chain. **Drugs under experimental and clinical research**, v. 25, n. 2–3, p. 87–97, 1999.