

Universidade Federal de Juiz de Fora
Instituto de Ciências Biológicas

CAROLINA MARINHO DE ASSUNÇÃO

**EFEITO DO RESVERATROL NA CRIOPRESERVAÇÃO DO SÊMEN
BOVINO**

Juiz de Fora, 2016

CAROLINA MARINHO DE ASSUNÇÃO

**EFEITO DO RESVERATROL NA CRIOPRESERVAÇÃO DO SÊMEN
BOVINO**

Dissertação de Mestrado do Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, para obtenção do Título de Mestre em Ciências Biológicas na área de Genética e Biotecnologia.

Orientador: Luiz Sérgio de Almeida Camargo

Juiz de Fora, 2016

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Juiz de Fora, e ao Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas, pela oportunidade de crescimento profissional e pessoal.

À minha família, por serem a força que carrego em mim. Em especial meu pai, mãe e minha irmã que estão sempre ao meu lado.

Ao meu orientador Luiz Sérgio pela confiança, suas boas ideias e sua colaboração intelectual.

Aos meus amigos que me apoiam sempre.

Aos amigos do Laboratório de Reprodução Animal de Embrapa Gado de Leite pela parceria e ajuda sempre.

Ao pessoal do Campo Experimental da Embrapa em Coronel Pacheco

Aos colegas da Pro Criar pelo apoio.

Às agências financiadoras de pesquisa FAPEMIG, CNPq e CAPES.

À todos aqueles que de alguma forma colaboraram para construção deste trabalho.

RESUMO

Apesar da grande aplicação do sêmen congelado na bovinocultura, a criopreservação ainda resulta em considerável diminuição da viabilidade e fertilidade espermática. Diversos fatores são responsáveis por essa perda, sendo importante ressaltar os danos causados ao espermatozoide pelo estresse oxidativo. O objetivo do trabalho foi avaliar o efeito antioxidante resveratrol na criopreservação de sêmen bovino. Foram utilizados oito touros holandeses selecionados previamente por exame andrológico. O sêmen foi diluído em meio Tris-gema-glicerol e divididos nos grupos: R0 (controle- sem antioxidante), R1 (50 μ M de resveratrol), R2 (100 μ M de resveratrol) e R3 (1000 μ M de resveratrol). Os espermatozoides após o descongelamento foram avaliados através da análise de motilidade e vigor espermáticos por microscopia de contraste de fase, parâmetros cinéticos por sistema automatizado (CASA), integridade de membrana plasmática e acrossomal, função mitocondrial e fertilidade *in vitro*. Os dados foram analisados por ANOVA e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey-Kramer e Student-Newman-Keuls ao nível de significância de 5% através dos programas *Statistical Analysis System* (SAS Institute, Cay, NC, USA) e Graph Pad Prism versão 5 (Graph Pad Software, California, Estados Unidos). Na análise de motilidade do sêmen por microscopia óptica observou-se maior média ($P < 0,05$) do tratamento R1 em relação a R3, não sendo estes diferentes ($P > 0,05$) do controle e de R2. Entretanto, os resultados da análise de motilidade progressiva pelo CASA mostraram que o tratamento com resveratrol 50 μ M apresentou melhor ($P < 0,05$) resultado em relação ao controle e outros tratamentos. Os dados dos parâmetros cinéticos do CASA também revelaram um número maior de espermatozoides com trajetória linear no grupo R1. Há também mais células com membrana plasmática íntegra no grupo tratado (R1) em relação ao controle. Na análise de função mitocondrial e na produção *in vitro* de embriões não houve diferença entre controle e tratamento ($P > 0,05$). Conclui-se que o resveratrol na concentração de 50 μ M protege a membrana plasmática de células espermáticas e melhora parâmetros cinéticos do sêmen sem alterar a capacidade fecundante do espermatozoide.

Palavras-chave: Antioxidante, congelamento, espermatozoide, estresse oxidativo, touros.

ABSTRACT

Despite the wide application of frozen semen in livestock, cryopreservation yet results in decrease in viability and fertility of sperm. Several factors are responsible for this loss as injuries caused on sperm by oxidative stress. The aim of the study was to evaluate the antioxidant effect of resveratrol on cryopreservation of bovine sperm. We used eight Holstein bulls selected previously by andrological exam. Semen was diluted in Tris-yolk-glycerol extender and distributed in groups: R0 (control - no antioxidant), R1 (50 μ M resveratrol), R2 (100 μ M resveratrol) and R3 (1000 μ M resveratrol). Motility and vigorous thawed bull sperm were evaluated by phase contrast microscopy and kinetics parameters by an automated system (CASA). Plasmatic and acrosomal membrane integrity, mitochondrial function, and *in vitro* fertilization were also evaluated in thawed sperm. The data were analyzed by ANOVA and averages were compared by Tukey-Kramer and Student-Newman-Keuls tests by the Statistical Analysis System (SAS Institute, Cay, NC, USA) and Graph Pad Prism versão 5 (Graph Pad Software, California, Estados Unidos). The level of 5% was considered significant. With optical microscopy was observed higher sperm motility in treatment R1 than R3, and they were not different ($P > 0.05$) to control and R2. However, the results of progressive motility analysis by CASA showed that treatment with 50 μ M resveratrol had better ($P < 0.05$) results than control and other treatments. The data of the kinetic parameters of CASA also revealed greater ($P < 0.05$) number of spermatozoa with linear trajectory in R1 treatment. There is also more ($P < 0.05$) cells with plasma membrane intact in R1 compared to the control. In mitochondrial function analysis and *in vitro* embryo production no difference was found between treatment and control ($P > 0.05$). We conclude that the resveratrol 50 μ M concentration protects the sperm cell plasmatic membrane and improves kinetic parameters without affect fertilization potential of spermatozoa.

Keywords: Antioxidant, freezing, sperm, oxidative stress, bulls.

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Figura 1. Esquema do espermatozoide mamífero e suas principais estruturas.....	17
Figura 2. Molécula do Resveratrol na conformação trans-resveratrol (A) e trans resveratrol cis-resveratrol (B).....	27
Figura 3. Delineamento experimental.....	35
Figura 4. Touro <i>Bos taurus</i> da raça Holandesa utilizado no experimento.....	37
Figura 5. Classificação das células espermáticas de acordo com a coloração fluorescente emitida no protocolo de associação de PI e FITC-PSA.....	40
Figura 6. Classificação das células espermáticas de acordo com a coloração fluorescente emitida no protocolo de associação de Mitrotracker Red (MITO).....	41
Tabela 1. Médias de turbilhonamento (0-5), motilidade total, vigor (0-5), volume e concentração.....	46
Tabela 2. Médias de motilidade total pós-resfriamento (MOT PR), motilidade total pós-descongelamento (MOT PD), vigor pós-resfriamento (VIG PR) e vigor pós-descongelamento (VIG PD) avaliados por microscopia de contraste de fase.....	47
Tabela 3. Médias de motilidade progressiva (%) e motilidade total de espermatozoides (%) avaliadas por sistema computadorizado (CASA).....	48
Tabela 4. . Médias de velocidade média (VAP), velocidade linear (VSL) e velocidade curvilínea (VCL) avaliadas por sistema computadorizado (CASA).....	48

Tabela 5. Médias linearidade (LIN), retilinearidade (STR), deslocamento lateral da cabeça (ALH) e frequência de batimento flagelar (BCF) avaliadas por sistema computadorizado (CASA).....	48
Tabela 6. Médias de motilidade total pós-resfriamento (MOT PR), motilidade pós-descongelamento (MOT PD), vigor pós-resfriamento (VIG PR) e vigor pós-descongelamento (VIG PD) avaliados por microscopia de contraste de fase.....	49
Tabela 7. Médias de motilidade progressiva e motilidade total de espermatozóides avaliadas por sistema computadorizado (CASA).....	50
Tabela 8. Médias de velocidade curvilínea (VCL), velocidade média (VAP) e deslocamento lateral da cabeça (ALH) avaliadas por sistema computadorizado (CASA).....	51
Figura 7. Médias de velocidade linear (VSL) avaliada por sistema computadorizado (CASA) para os touros 2175, 3110, 3138, 3141, 3101, 3118, 3204, 3202 e os grupos R0, R1, R2, R3.....	52
Figura 8. Médias de linearidade (LIN) avaliada por sistema computadorizado (CASA) para os touros 2175, 3110, 3138, 3141, 3101, 3118, 3204, 3202 e os grupos R0, R1, R2, R3.....	53
Figura 9. Médias de retinencialidade (STR) avaliada por sistema computadorizado (CASA) para os touros 2175, 3110, 3138, 3141, 3101, 3118, 3204, 3202 e os grupos R0, R1, R2, R3.....	54
Figura 10. Médias de frequência de batimento flagelar (BCF) (Hz) avaliada por sistema computadorizado (CASA) para os touros 2175, 3110, 3138, 3141, 3101, 3118, 3204, 3202 e os grupos R0, R1, R2, R3.....	56

Tabela 9. Médias da porcentagem de espermatozoides bovinos que apresentavam baixo potencial de membrana mitocondrial (BPM) e alto potencial de membrana mitocondrial (APM) após o descongelamento.....57

Tabela 10. Médias da porcentagem de espermatozoides bovinos que apresentavam membrana plasmática e acrossoma intacto (MIAI), membrana plasmática intacta com acrossoma lesado (MIAL), membrana plasmática lesada e acrossoma intacto (MLAI), membrana plasmática e acrossoma lesados (MLAL) após o descongelamento.....57

Figura 11. A) Quantidade de espermatozoides com membrana plasmática lesada para os grupos R0 e R1 B) Quantidade de espermatozoides com acrossoma lesado para os grupos R0 e R1.....58

Tabela 11. Médias das taxas de embriões clivados (D3) e taxas de blastocistos (D7 e D8) na fertilização *in vitro* para os touros 2175, 3110, 3138 e 3202.....59

Tabela 12. Médias das taxas de embriões clivados (D3) e taxas de blastocistos (D7 e D8) na fertilização *in vitro* para os grupos R0 e R159

LISTA DE ABREVIATURAS

ALH - amplitude de deslocamento lateral da cabeça

ATP - Trifosfato de adenosina

BCF - frequência de batimento flagelar

CA - catalase

CASA - *Computer Assisted Sperm Analysis*

CIV - Cultivo *in vitro*

DMSO - Dimetilsulfóxido

DNA - ácido desoxirribonucleico

DPPH - 2,2 - difenil- 1- picril-hidrazila

ERO - Espécies reativas de oxigênio

FITC-PSA - *Pisum sativum* conjugada com isotiocionato de fluoresceína

FIV - Fertilização *in vitro*

FSH - Hormônio folículo estimulante

GSH - glutationa redutase

GST - glutationa-S-transferase

LDL - lipoproteína de baixa densidade

LIN - índice de linearidade

MIAI - Membrana plasmática e acrossoma intacto

MIAL - Membrana plasmática intacta com acrossoma lesado

MITO - Mitotraker Red

MIV - Maturação *in vitro*

MLA I- Membrana plasmática lesada e acrossoma intacto

AL - Membrana plasmática e acrossoma lesados.

MP - Membrana plasmática

NADPH - Fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina

PI – Iodeto de propídio

PIVE – Produção *in vitro* de embriões

RNAm – Ácido ribonucleico mensageiro

SOD - superóxido dismutase

STR - retilinearidade

TBARS - ácido tiobarbitúrico

TCM - *Tissue Culture Medium*

TG - TRIS-gema-glicerol

VAP - velocidade média de percurso

VCL - velocidade curvilínea

VSL - velocidade linear

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
2. REVISÃO DE LITERATURA	17
2.1. ESTRUTURA DO ESPERMATOZÓIDE.....	17
2.1.1. CABEÇA.....	17
2.1.2. CAUDA.....	18
2.1.3. MEMBRANA PLASMÁTICA.....	19
2.2. CRIOPRESERVAÇÃO E ESTRESSE OXIDATIVO	20
2.2.1. CRIOPRESERVAÇÃO E CRIOINJÚRIAS.....	20
2.2.2. ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO E ESTRESSE OXIDATIVO.....	22
2.2.3. DANOS ESPERMÁTICOS CAUSADOS PELO ESTRESSE OXIDATIVO.....	23
2.2.4. ANTIOXIDANTES.....	25
2.3. RESVERATROL.....	26
2.3.1. PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS.....	26
2.3.2. MECANISMO DE AÇÃO ANTIOXIDANTE.....	28
2.3.3. RESVERATROL E A CÉLULA ESPERMÁTICA.....	30
3. HIPOTESE	32
4. OBJETIVOS	33
4.1. GERAL.....	33
4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	33
5. MATERIAL E MÉTODOS	34
5.1. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....	34
5.1.1. EXPERIMENTO 1 – CRIOPRESERVAÇÃO DO SÊMEN COM DIMETILSULFÓXIDO.....	34
5.1.2. EXPERIMENTO 2 - CRIOPRESERVAÇÃO DO SÊMEN COM RESVERATROL.....	34
5.2. LOCAL EXPERIMENTAL.....	35

5.3. SELEÇÃO DOS ANIMAIS - EXAME ANDROLÓGICO.....	36
5.4. COLETA E CRIOPRESERVAÇÃO DO SÊMEN.....	36
5.4.1. ANIMAIS E MANEJO.....	36
5.4.2. COLETA E AVALIAÇÃO DA QUALIDADE DO SÊMEN <i>IN NATURA</i>	37
5.4.3. CRIOPRESERVAÇÃO DO SÊMEN COM RESVERATROL.....	37
5.5. ANÁLISE DO SÊMEN.....	38
5.5.1. ANÁLISE SUBJETIVA DA MOTILIDADE E VIGOR.....	38
5.5.2. ANÁLISE COMPUTADORIZADA DOS PARÂMETROS CINÉTICOS ESPERMÁTICOS (CASA).....	39
5.5.3. AVALIAÇÃO DA INTEGRIDADE DAS MEMBRANAS PLASMÁTICAS E ACROSSOMAL.....	39
5.5.4. AVALIAÇÃO DA FUNÇÃO MITOCONDRIAL.....	40
5.6. AVALIAÇÃO DO EFEITO DO RESVERATROL (50µM) SOBRE A FERTILIDADE DO SÊMEN–PRODUÇÃO <i>IN VITRO</i> DE EMBRIÕES.....	41
5.6.1. SELEÇÃO DOS TOUROS PARA FERTILIZAÇÃO <i>IN VITRO</i>	41
5.6.2. OBTENÇÃO DOS OVÁRIOS E MATURAÇÃO <i>IN VITRO</i> (MIV)	42
5.6.3. FECUNDAÇÃO <i>IN VITRO</i>	42
5.6.4. CULTIVO <i>IN VITRO</i>	43
5.6.5. AVALIAÇÃO DO DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO.....	43
5.7. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	43
6. RESULTADOS.....	45
6.1. AVALIAÇÃO DA QUALIDADE DO SÊMEN <i>IN NATURA</i> E TAXA DE QUEDA DE MOTILIDADE.....	45
6.2. AVALIAÇÃO DO DIMETILSULFÓXIDO NA CRIOPRESERVAÇÃO.....	47
6.2.1. ANÁLISE DO SÊMEN POR MICROSCOPIA ÓPTICA.....	47
6.2.2. ANÁLISE DO SÊMEN ATRAVÉS DO SISTEMA COMPUTADORIZADO.....	47
6.3. AVALIAÇÃO DO EFEITO DO RESVERATROL NOS PARÂMETROS CINÉTICOS DO SÊMEN CRIOPRESERVADO.....	49
6.3.1. ANÁLISE DO SÊMEN POR MICROSCOPIA ÓPTICA.....	49

6.3.2. ANÁLISE DO SÊMEN ATRAVÉS DE SISTEMA COMPUTADORIZADO.....	50
6.4. AVALIAÇÃO DO EFEITO DO RESVERATROL SOBRE INTEGRIDADE DE MEMBRANA PLASMÁTICA, ACROSSOMAL E FUNÇÃO MITOCONDRIAL.....	57
6.5. AVALIAÇÃO DO EFEITO DO RESVERATROL SOBRE A FERTILIDADE DO SÊMEN ATRAVÉS DA PRODUÇÃO IN VITRO DE EMBRIÕES.....	58
7. DISCUSSÃO.....	60
8 . CONCLUSÃO.....	68
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	69

1. INTRODUÇÃO

Uma forma de aumentar a eficiência reprodutiva e o mérito genético do rebanho é através do uso de biotecnologias como inseminação artificial e fertilização *in vitro*, nas quais o sêmen congelado é essencial (HAFEZ, 2004). No Brasil, em 2014, o mercado de sêmen bovino comercializou pouco mais de 12 milhões de doses e movimentou cerca de 250 milhões de reais (ASBIA, 2014). Entretanto, apesar da grande utilização do sêmen criopreservado, a técnica ainda possui limitações. Os protocolos de criopreservação existentes possuem baixa eficiência e causam uma queda de aproximadamente 50% da viabilidade dos espermatozoides e consequente diminuição da fertilidade da amostra (BILODEAU et al, 2002).

Diversas podem ser as causas dos danos espermáticos ocorridos durante o processo de criopreservação, como por exemplo, o estresse oxidativo (RASUL et al., 2001, WATSON, 2000). O estresse oxidativo leva à diminuição da motilidade, da viabilidade, da produção de energia e integridade do DNA e também a peroxidação lipídica das membranas, causando danos irreversíveis à célula, que podem culminar na perda da sua função (STRADAIOLI, 2007).

Em condições naturais de acasalamento, os espermatozoides estão em ambiente anaeróbico, por isso os potenciais danos causados pelas espécies reativas de oxigênio (ERO's) são reduzidos. Porém, quando o sêmen é manipulado para congelamento, ele é exposto ao oxigênio e vários passos no seu processamento podem levar ao aumento na produção de ERO's e redução dos antioxidantes naturais, que, conseqüentemente, levam a condições de estresse oxidativo (MAIA, 2006).

Atualmente, a adição de diferentes tipos de antioxidantes aos meios tem se tornado uma prática comum no combate aos danos oxidativos causados as células espermáticas durante o congelamento/descongelamento. Alguns trabalhos demonstraram que o uso de antioxidantes melhorou parâmetros de qualidade de espermatozoides bovinos (BUCAK et al., 2014; BRANCO et al., 2010), equinos (FRANCO et al., 2014), ovinos (TOWHIDI et al, 2013; SILVA et al, 2013).

O resveratrol é encontrado em diversas espécies de plantas e entre suas propriedades farmacológicas está a atividade antioxidante (RASTIJA e MEDIC-SARIC, 2009). Poucos estudos foram realizados utilizando o resveratrol na

criopreservação de sêmen. Os trabalhos existentes foram desenvolvidos utilizando espécies, concentrações e protocolos de congelamento diferentes (BUCAK et al., 2014; GARCEZ et al., 2010; SILVA et al., 2012). Assim, há necessidade de mais estudos para definir se o antioxidante irá trazer benefícios à técnica e também para validação de uma melhor concentração. Neste contexto, o presente trabalho tem como objetivo avaliar o efeito de diferentes concentrações de resveratrol no meio diluente para congelamento sobre a qualidade e fertilidade da célula espermática.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Estrutura do espermatozóide

O espermatozoide é o gameta masculino, uma célula pequena, compacta, móvel e altamente especializada que tem como função a fecundação do oócito e consequente formação do zigoto (ALBERTS, 2010). As células espermáticas são formadas dentro dos túbulos seminíferos, localizados nos testículos, através de um processo de diferenciação celular complexo, denominado espermatogênese, no qual células diploides primordiais (espermatogônias) são transformadas, através de divisões meióticas, em células haploides especializadas (espermatozoides) (CHENOWETH e LORTON, 2014).

Os espermatozoides maduros são divididos em duas regiões morfológica e funcionalmente diferentes: a cabeça e a cauda (ou flagelo) (ALBERTS, 2010) (Figura 1). Segundo Mortimer (1997) a função principal da cabeça do espermatozoide é a liberação do genoma paterno para o oócito; enquanto a do flagelo é promover motilidade à célula para permitir sua passagem pelo trato reprodutivo feminino e penetração através da zona pelúcida do oócito.

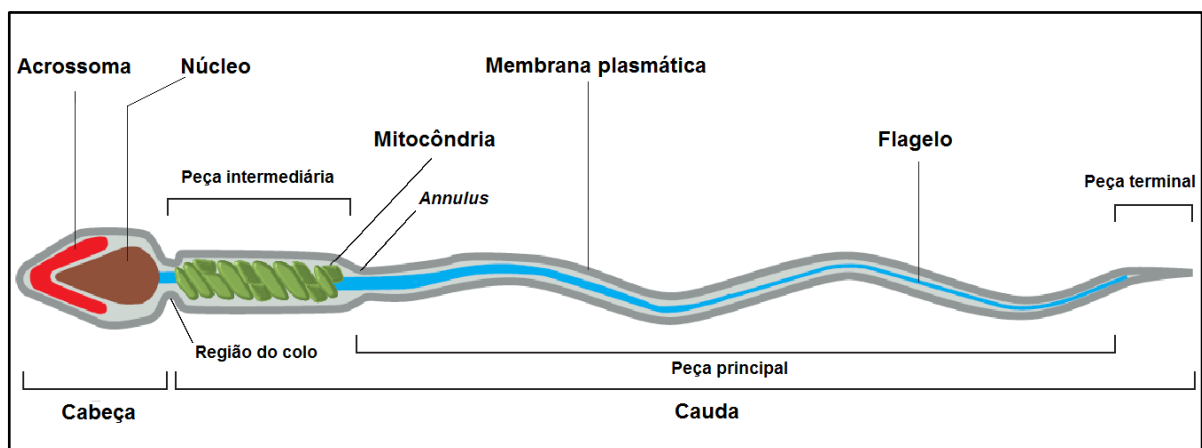


Figura 1. Esquema do espermatozoide mamífero e suas principais estruturas (Adaptado ALBERTS, 2010).

2.1.1. Cabeça

A cabeça do espermatozoide constitui seu maior volume. Entretanto, o formato e a dimensão variam de acordo com a espécie. Em bovinos e humanos, por

exemplo, se apresenta na forma oval e achatada, enquanto em ratos tem formato de gancho (HAFEZ, 2004). Na cabeça do espermatozoide está localizado o núcleo, o acrossoma e pequenas quantidades de estruturas do citoesqueleto e citoplasma (EDDY e O'BRIEN, 1994).

O núcleo equivale a um terço do peso do espermatozoide, preenchendo uma parte significativa da cabeça. Nesta estrutura, encontra-se o material genético da célula envolvido pelo envelope nuclear. Diferente das células somáticas, o espermatozoide é uma célula haploide, ou seja, que contém apenas um membro de cada par de cromossomos paternos (ALBERTS, 2010).

O DNA espermático apresenta-se de forma altamente compactada, o que minimiza o volume para transporte e inibe a transcrição (CHENOWETH e LORTON, 2014). Essa alta compactação do DNA é promovida por nucleoproteínas especiais denominadas protaminas. Durante a espermatogênese em mamíferos, histonas somáticas são substituídas por protaminas, que geram uma maior estabilidade a cromatina (BLOCH, 1969).

O acrossoma é uma vesícula grande que contém enzimas hidrolíticas como a hialuronidase e a acrosina, que auxiliarão na penetração do espermatozoide no oócito. Esta vesícula se dispõe sobre o núcleo como uma capa e é contida pela membrana acrossomal interna e externa. A membrana acrossomal interna fica em contato com o envoltório nuclear, enquanto a externa fica em contato com a membrana plasmática. Durante a reação acrossomica, as membranas externa e plasmática se fundem formando vesículas que liberam o conteúdo acrossomal (HAFEZ, 2004).

2.1.2. Cauda

A cauda espermática é um flagelo longo que possui a função de atribuir movimento ao espermatozoide, dando-lhe impulso em direção ao oócito e auxiliando na sua passagem através da zona pelúcida (ALBERTS, 2010). Internamente, a cauda é constituída pelo axonema, uma estrutura especializada do citoesqueleto, que deriva do corpo basal situado atrás do núcleo e que é responsável pela motilidade espermática. O axonema é formado por nove microtúbulos duplos localizados na periferia do cilindro e por mais dois microtúbulos simples centrais

(COSSON, 1996; EDDY e O'BRIEN, 1994; ŌURA e TOSHIMORI, 1990). O dobramento ativo do flagelo é resultado da hidrólise de ATP por proteínas motoras chamadas de dineínas, que causa o deslizamento dos pares de microtúbulos adjacentes entre si. O ATP é produzido por um grande número de mitocôndrias altamente especializadas que estão concentradas na peça intermediária (Figura 1) (ALBERTS, 2010).

Segundo Hafez (2004) a cauda do gameta masculino em bovinos é constituída por colo (liga a cauda à cabeça do espermatozoide), peça intermediária, principal e terminal (Figura 1). O colo ou peça de conexão forma uma placa basal que se ajusta dentro de uma depressão na superfície posterior do núcleo. A peça intermediária se estende do colo até o *annulus*, em que se conecta com a peça principal (MORTIMER, 1997; ŌURA e TOSHIMORI, 1990). A peça principal, que continua posteriormente do *annulus* até a parte terminal da cauda, é composta centralmente pelo axonema e sua associação de fibras grosseiras. A peça terminal, posterior ao final da camada fibrosa, contém apenas o axonema central, recoberto por membrana plasmática (HAFEZ, 2004).

2.1.3 Membrana plasmática

As membranas biológicas são importantes na delimitação das células em relação ao seu ambiente externo e também na sua compartimentalização, mantendo as diferenças do conteúdo de cada organela com o citosol. As membranas são formadas basicamente por uma bicamada lipídica com proteínas, organizadas em forma de mosaico fluído (SINGER e NICOLSON, 1972).

De acordo com Alberts (2010) existem três membranas principais e funcionalmente importantes nos espermatozoides: nuclear, acrossomal e plasmática. A membrana nuclear ou envoltório nuclear, típica de célula eucariota, é responsável pela separação do núcleo altamente compactado do espermatozoide e seu citosol, controlando a troca de material (RNAm e proteínas) entre as duas estruturas. A membrana acrossomal envolve todo o acrossoma, isolando e concentrando na região apical um conteúdo de proteínas especializadas que auxiliarão na fecundação do oócito. Já a membrana plasmática envolve todo o espermatozoide e é seu componente mais externo, sendo responsável pela proteção da célula, transporte de

moléculas entre o meio extracelular e intracelular, controle osmótico e sinalização celular.

A membrana plasmática é uma estrutura de extrema importância para a fertilidade do espermatozoide. Estudos mostram que alterações dessa estrutura parecem estar relacionadas com a diminuição da fertilidade do sêmen (EDDY e O'BRIEN, 1994; ÔURA e TOSHIMORI, 1990). A composição de lipídios e proteínas da membrana plasmática do espermatozoide é diferente de células somáticas e está intimamente relacionada com sua função e resistência (TAPIA et al, 2012). Geralmente, os espermatozoides possuem uma membrana plasmática rica em ácidos graxos insaturados, o que lhe confere ótima fluidez, aumentando sua elasticidade e resistência a mudanças de volume. Entretanto, essas insaturações tornam as células espermáticas mais vulneráveis à ação de espécies reativas de oxigênio (ERO's), sendo assim, mais susceptíveis a lipoperoxidação (WATHES et al, 2007).

2.2. Criopreservação e estresse oxidativo

2.2.1. Criopreservação e crioinjúrias

Segundo Castelo et al. (2008), os ejaculados da maioria dos animais domésticos contêm maior quantidade de espermatozoides do que o necessário para a fecundação. Desta forma, a criopreservação do sêmen aparece como uma ótima alternativa para conservação e aproveitamento do material genético do macho. O sêmen congelado, aliado a biotecnologias reprodutivas, tem sido aplicado em programas de melhoramento genético animal, na preservação de espécies ou raças, criação de bancos de germoplasma e multiplicação de indivíduos (AMANN e PICKET, 1987; HAMMERSTED et al., 1990).

A criopreservação busca a suspensão do metabolismo espermático e a manutenção de suas características por um período de tempo prolongado. O sucesso da técnica depende da manutenção do potencial fertilizante dos espermatozoides, que devem apresentar integridade e funcionalidade das diferentes estruturas celulares (AMANN e PICKET, 1987; HAMMERSTED et al., 1990). Entretanto, embora seja um procedimento rotineiro na indústria da inseminação

artificial, os protocolos de congelamento utilizados ainda são pouco eficientes e resultam em uma queda de aproximadamente 50%-60% nos índices de motilidade pós-descongelamento (BILODEAU et al, 2002).

O protocolo de criopreservação do sêmen bovino é um processo complexo dividido em cinco passos distintos: diluição, resfriamento, congelamento, armazenamento e descongelamento. O processo apresenta fatores potencialmente prejudiciais aos espermatozoides, como mudanças bruscas de temperatura (choque-térmico), oscilações de pH e osmolaridade gerando lesões diretas, que afetam estruturalmente as organelas (ruptura de membranas), ou indiretas, provocando alterações metabólicas (RASUL et al, 2001, WATSON, 2000).

O resfriamento do sêmen (da temperatura corpórea até temperaturas próximas a 5°C) induz a um estresse letal para algumas células. Esse processo chamado de choque frio é um ponto crítico da criopreservação, uma vez que resulta em mudanças na bioquímica e no funcionamento dos espermatozoides como: redução da taxa de glicólise, alteração da respiração celular (produção excessiva de espécies reativas de oxigênio), aumento da degeneração do DNA e liberação de material intracelular (WATSON, 2000).

Durante a criopreservação, as alterações metabólicas, ocorridas nas células, geram aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (ERO's). As fontes de ERO's no sêmen são o metabolismo oxidativo de espermatozoides vivos, células do sistema imune e também células mortas que tiveram seu conteúdo exposto (AITKEN et al., 1995). Além disso, quando o sêmen é manipulado para congelamento, ele é exposto ao oxigênio e vários passos no seu processamento podem levar a produção de ERO's, bem como redução dos antioxidantes naturais.

Outra dificuldade relacionada à técnica de criopreservação é sua padronização. Diferenças de sensibilidade ao congelamento entre espécies e indivíduos e também variações entre ejaculados de um mesmo animal trazem um obstáculo no emprego dos protocolos de criopreservação (HAFEZ, 2004). Essas variações podem ocorrer principalmente por causa das diferenças de composição lipídica da membrana plasmática que torna alguns animais menos ou mais tolerantes à criopreservação. As causas dessas diferenças podem ser diversas, dentre elas fatores genéticos, nutricionais, climáticos, fisiológicos, idade, estresse entre outros. Essas falhas e oscilações dos protocolos de congelamento geram

inconstância nos índices de fecundação obtidos pelo sêmen congelado, tanto no uso da IA quanto na FIV, causando dificuldades na implementação dessas biotécnicas reprodutivas (BORGES et al., 2011).

Diversas podem ser as causas dos danos espermáticos ocorridos durante o processo de criopreservação, como, por exemplo, o estresse oxidativo, químico, osmótico, térmico e mecânico, que causam lesões celulares diretas ou indiretas (RASUL et al., 2001, WATSON, 2000). Vários trabalhos foram realizados testando diferentes protocolos e diluentes para criopreservação, mas desde a descoberta do glicerol e do dimetil-sulfóxido como crioprotetores, pouco progresso no congelamento de sêmen foi realizado (LOVELOCK e BISHOP, 1959; POLGE, 1949; WOODS et al., 2004).

Os meios de diluição são essenciais para manutenção da viabilidade da célula espermática, já que interagem com o sêmen e proporcionam proteção aos diferentes compartimentos celulares durante o congelamento. Esses meios são responsáveis por fornecer nutrientes, evitar alterações do pH, assegurar a pressão osmótica adequada, impedir o crescimento de bactérias e proteger os espermatozóides do choque térmico. Os compostos principais dos diluentes são fontes energéticas, crioprotetores, soluções tampões e antibióticos (GRAHAM, 1996).

Uma grande variedade de diluentes tem sido usada em protocolos de criopreservação, mas os componentes básicos são sempre os mesmos na maioria dos casos (GRAHAM, 1996). Mais recentemente, a adição de diferentes tipos de antioxidantes aos diluentes tem se tornado uma prática comum, a fim de combater os danos oxidativos causados às células espermáticas durante processo de congelamento/descongelamento (BAUMBER et al., 2002; BILODEAU et al., 2002; KRZYZOSIAK et al., 2000; MAXWELL E STOJANOV, 1996; UPRETI et al., 1998)

2.2.2. Espécies reativas de oxigênio e estresse oxidativo

As espécies reativas de oxigênio (ERO's) podem ser gerados pela ação direta de alguma fonte de energia externa (luz, calor e radiação) ou interna (metabolismo oxidativo celular) (OCHSENDORF, 1999). Quimicamente, são átomos, moléculas ou íons que apresentam um elétron desemparelhado, reativo e instável, o qual, para

alcançar a estabilidade, tende a reagir com qualquer molécula intracelular podendo causar danos às células (SOUZA e FERREIRA, 2007). As ERO's comuns em sistemas biológicos são o radical livre superóxido, radical hidroxil, peróxido de hidrogênio e oxigênio singlete (OCHSENDORF et al., 1999).

O estresse oxidativo é a condição na qual ocorre um desequilíbrio na produção de espécies reativas de oxigênio ou na capacidade de remoção dos agentes oxidativos, gerando um acúmulo de ERO's. A maioria dos seres vivos possui eficiente sistema de proteção antioxidante capaz de neutralizar os efeitos maléficos ocasionados pelas espécies reativas de oxigênio formadas durante o metabolismo celular, mas, em condições de estresse, estes sistemas podem ser insuficientes na defesa da célula (MAIA, 2006).

2.2.3. Danos espermáticos causados pelo estresse oxidativo

A integridade do DNA é fundamental para a reprodução, bem como para a qualidade de vida da prole. Em particular, os danos no núcleo espermático podem ter efeitos negativos profundos sobre o resultado da fertilização. Os danos de DNA espermático não necessariamente impedem que o espermatozoide fecunde o oócito; entretanto, podem causar perda embrionária por apoptose (SIMÕES, 2010). Devido à ausência de atividade de reparação do espermatozoide maduro, que é quiescente, este está facilmente sujeito a danos oxidativos nucleares (NOBLANC, 2013).

A membrana plasmática (MP) dos espermatozoides é extremamente importante, pois, além de ter papel de proteger e isolar o meio intracelular do meio extracelular, desempenha uma função crucial durante a capacitação do espermatozoide, interação espermatozoide-oócito e fertilização (TAPIA et al., 2012). A composição lipídica da membrana plasmática dos espermatozoides difere das células somáticas (FLESCH e GADELLA, 2000). Em diferentes espécies de mamíferos, mais de 60% dos lipídeos presentes na membrana plasmática das células espermáticas são ácidos graxos insaturados, o que lhe confere ótima fluidez, aumentando sua elasticidade e resistência para mudanças de volume (VALENÇA e GUERRA, 2007). Entretanto, essas insaturações tornam as células espermáticas mais susceptíveis ao ataque de ERO's, levando a lipoperoxidação de membranas (WATHES et al., 2007)

A lipoperoxidação é definida como a deterioração oxidativa de lipídios poli-insaturados. Ácidos graxos poli-insaturados são aqueles que contêm duas ou mais duplas ligações carbono-carbono ($H_2C=CH_2$). O processo de lipoperoxidação das membranas celulares acarreta alterações na sua estrutura e permeabilidade, levando à perda da seletividade iônica, liberação do conteúdo de organelas e formação de produtos citotóxicos, culminando com a morte celular (FERREIRA E MATSUBARA, 1997; HALLIWELL E GUTTERIDGE, 1999).

No sêmen humano, espermatozoides defeituosos ou menos resistentes ao estresse oxidativo apresentam níveis de lipoperoxidação mais altos que os observados em espermatozoides funcionais (AITKEN et al., 1993; MISRO et al., 2004, SHAMSI et al., 2009). Aitken et al. (1993) observaram uma relação direta entre os níveis de lipoperoxidação no sêmen humano e a morfologia do espermatozoide, as características do movimento espermático e a capacidade de fusão espermatozoide-ovócito.

No sêmen bovino, Beorlegui et al. (1997) observaram uma correlação negativa entre a produção de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) e a motilidade espermática. As amostras de sêmen com menor motilidade e vigor apresentaram maior susceptibilidade à lipoperoxidação. O grupo também observou que os espermatozoides do sêmen sensível a lipoperoxidação possuíam menor capacidade de sofrer reação acrossomal induzida pelo cálcio ionóforo, quando comparados com aqueles com menores níveis de peroxidação lipídica. Esses dados demonstram que lipoperoxidação causa danos à membrana plasmática e que os espermatozoides com maior integridade de membrana plasmática têm maior capacidade de passar pela reação acrossomal, possivelmente devido à preservação da sua regularidade funcional.

O sistema intracelular de defesa antioxidante do espermatozoide é fraco, uma vez que o mesmo possui pequeno volume de citoplasma, tendo, assim, quantidade reduzida de antioxidantes endógenos que teoricamente os protegeriam contra ERO's (CARVALHO et al., 2002). Em processos normais os antioxidantes naturais presentes no plasma seminal são responsáveis pela proteção da célula espermática contra danos oxidativos. Entretanto, durante o congelamento, a lavagem adotada no processamento do sêmen ou sua diluição, remove parte da sua capacidade

protetora, diminuindo consideravelmente o efeito benéfico do antioxidante natural (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1999).

Além dos efeitos deletérios diretos das ERO's sobre os espermatozoides, estes também podem causar prejuízos aos componentes do sêmen. O líquido seminal é constituído de vários compostos orgânicos (proteínas, aminoácidos, carboidratos e lipídios), que são derivados do epidídimo e glândulas acessórias. Esses compostos apresentam diversas atividades biológicas relacionadas à fecundação, cuja inativação pode levar a uma diminuição das taxas de fecundidade (CHENOWETH e LORTON, 2014). Portanto, o estresse oxidativo é considerado um limitante para a técnica de criopreservação podendo em alguns casos comprometer o congelamento. Por isso, atualmente, muitos grupos de pesquisa tem se concentrado em estudar os efeitos das espécies reativas de oxigênio sobre os espermatozoides (BORGES et al., 2011).

2.2.4. Antioxidantes

Um antioxidante pode ser definido como uma substância que, presente em baixas concentrações quando comparadas àquela do substrato oxidável, diminui ou previne, significativamente, a oxidação daquele substrato. Em condições normais, os antioxidantes convertem ERO's em água no intuito de prevenir o acúmulo destes compostos. Existem dois tipos de sistemas antioxidantes: os antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1999).

Os antioxidantes enzimáticos são conhecidos como antioxidantes naturais, produzidos pelas próprias células. Eles neutralizam as espécies reativas de oxigênio excessivas e previnem danos da estrutura celular. São compostos pelas enzimas: superóxido dismutase (SOD); catalase (CAT), peroxirredoxinas (Prx), glutathione (GSH), glutathione redutase (GR) e glutathione peroxidase (GPx) (MAIA e BICUDO, 2009). Já os antioxidantes não enzimáticos são conhecidos como antioxidantes sintéticos ou suplementos da dieta. São compostos por um grande número de substâncias de baixo peso molecular, incluindo o ácido ascórbico, o tocoferol, diferentes compostos de selênio, ubiquinonas (coenzima Q), ácido úrico, ácido α -lipoico, zinco, taurinas, hipotaurinas, glutathiones, betacaroteno, caroteno e resveratrol (NORDBERG e ARNÉR, 2001; MAIA, 2006; FOOTE et al., 2002). Esse

sistema pode atuar de duas formas: como removedor dos agentes oxidativos, antes que ele cause lesão, ou mesmo como reparador da lesão ocorrida na molécula-alvo (MAIA e BICUDO, 2009).

2.3. Resveratrol

O aumento da curiosidade sobre resveratrol e seus potenciais benefícios para a saúde começou com um fenômeno denominado o "paradoxo francês", que se tornou um fascínio para profissionais de saúde e pesquisadores (NEVES et al., 2012). O "paradoxo francês" descreve a taxa extremamente baixa incidência de doença cardiovascular na França em comparação com outros países europeus, mesmo com uma dieta rica em gordura e pouco ou nenhum exercício. Estudos epidemiológicos indicam que os polifenóis presentes no vinho tinto podem ter sido responsáveis pelos efeitos cardioprotetores experimentados pelos franceses (RICHARD, 1987). O Resveratrol, em seguida, tornou-se um tema de estudo para os potenciais benefícios cardiovasculares, mas os benefícios adicionais estão se tornando aparente em estudos recentes (KROON et al., 2010) .

O resveratrol (trans-3,5,4-trihidroxi-trans-estilbeno) é um polifenol encontrado em diversas espécies de plantas, entre elas, uvas, amoras, pinhão e amendoim (BURNS et al., 2002). Estudos *in vitro* e *in vivo* sugerem que o resveratrol possui diversas propriedades biológicas como, por exemplo, eficácia antioxidante, anti-inflamatória, anti-fúngica, anti-carcinogênica e inibidora da agregação plaquetária (JUNG et al., 2007; LI et al., 2010; MARTÍN et al., 2006; OLAS e WACHOWICZ, 2005; RASTIJA e MEDIC-SARIC, 2009). Por esta razão, a molécula de resveratrol tem sido considerada interessante como agente bioativo em alimentos e produtos farmacêuticos (BURNS et al., 2002).

2.3.1 Propriedades Físico-Químicas

Substâncias polifenólicas constituem um dos maiores e mais onipresentes grupos de compostos fitoquímicos e são sintetizados para proteção das plantas contra estresse fotossintético, espécies reativas de oxigênio e animais herbívoros. Milhares de moléculas apresentam estrutura polifenólica, ou seja, várias hidroxilas

ligadas diretamente a anéis aromáticos. Estes compostos podem ser classificados em diferentes grupos, em função do número de grupamentos fenólicos e dos elementos estruturais que ligam estes anéis uns aos outros, tendo-se então: ácidos fenólicos, flavonóides, estilbenos e lignanos (MANACH et al., 2004),

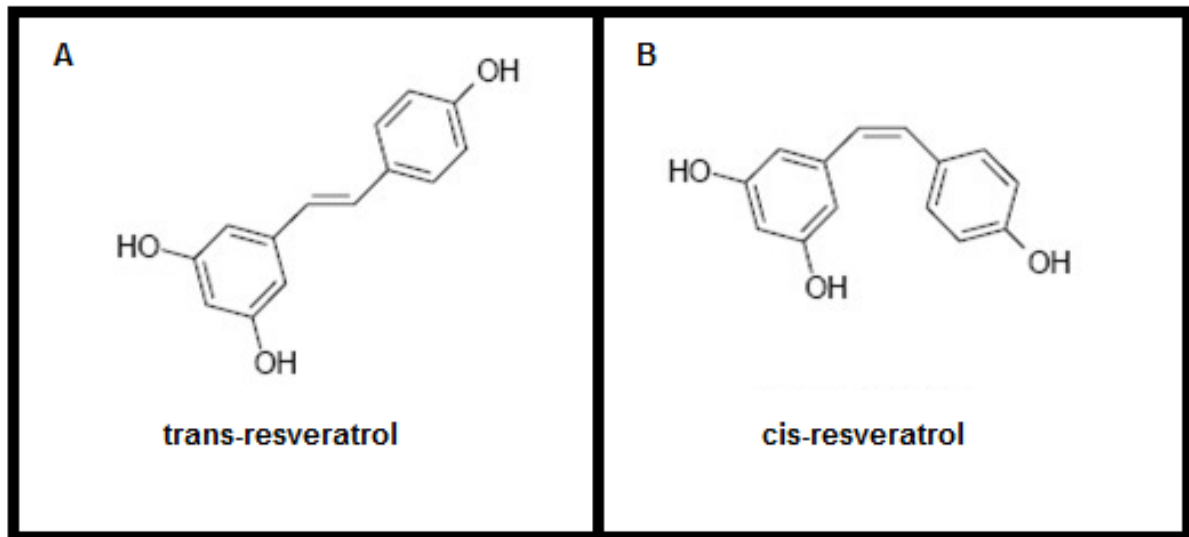


Figura 2: Molécula do Resveratrol na conformação trans-resveratrol (A) e trans-resveratrol cis-resveratrol (B). Modificado: <http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/resveratrol>.

Os estilbenos constituem um grupo de polifenóis amplamente distribuídos no reino vegetal e entre eles está o resveratrol (3,5,4'-trihidroxiestilbeno) (MANACH et al., 2004). A fórmula molecular do resveratrol é $C_{14}H_{12}O_3$ e sua estrutura consistem em dois anéis fenólicos unidos por uma ligação dupla, que permitem orientação cis ou trans. O trans-resveratrol é forma mais estável obtida sinteticamente e encontra-se disponível comercialmente, enquanto a forma cis pode ser obtida por radiação ultravioleta (Figura 2) (SAUTTER, 2005).

O resveratrol possui baixa solubilidade e estabilidade em água (0,03g/L), o que dificulta sua aplicação em sistemas biológicos, limitando a concentração a ser utilizada. O antioxidante é altamente solúvel em compostos orgânicos como etanol (50g/L) e dimetilsulfoxido (16g/L), que são substâncias normalmente tóxicas as células e devem ser utilizadas em baixas porcentagens. Assim, para uso do resveratrol em sistemas de cultivo celular, que possuem como base meio aquoso, é necessário também controlar as concentrações dos seus solventes. Atualmente, muitos trabalhos têm sido realizados no sentido de melhorar a solubilidade do

resveratrol em água com formulações nanoestruturadas e também com produção de alguns análogos (HARIKUMAR e AGGARWALL, 2008).

2.3.2. Mecanismo de ação antioxidante

A diversidade dos efeitos biológicos observados para o resveratrol consiste na capacidade deste de afetar diversos alvos moleculares. Segundo Pacholec et al., (2010) o resveratrol atua como uma molécula “promíscua”, ativando diversos transportadores, receptores, enzimas e íons, sendo que sua ação efetiva depende do tipo celular e do estado metabólico da célula afetada.

Estudos demonstram que o resveratrol pode interagir diretamente com a proteína quinase C (SLATER et al., 2003), aromatase (NEVES et al., 2007), albumina (BELGUENDOZ et al., 1998), DNA topoisomerase II (JO et al., 2006), ácidos nucleicos (USHA et al., 2005), DNA polimerase α e δ , regulando inúmeros processos celulares como potencial de membrana, transcrição de DNA, atividade enzimática, secreção de moléculas, apoptose, atividade mitocondrial e homeostase intracelular de íons (HARIKUMAR e AGGARWALL, 2008).

O resveratrol possui atividade antioxidante comprovada. Os primeiros autores a demonstrarem esse efeito da molécula foram Frenkel et al. (1995) que utilizaram o isômero trans-resveratrol em diferentes ensaios antioxidantes, tais como 2,2 - difenil- 1- picril-hidrazila (DPPH), ensaio de eliminação de ERO's, atividade antioxidante total, peroxidação lipídica, atividade de potência redutora e ensaio ativo de eliminação de peróxido de hidrogênio. Os resultados mostraram que a eliminação de ERO's DPPH com resveratrol na quantidade de 2 μ M foram superiores ao grupo controle (FRENKEL et al., 1995).

Olas e Wachowicz (2005), investigando a influência do trans-resveratrol na produção de ERO's em plaquetas do sangue de suínos ativadas por lipopolissacarídeo, verificou que o antioxidante (6,25-100 μ g / ml) inibiu a geração de ERO's em plaquetas sanguíneas. As plaquetas incubadas com 25 μ g/ml do fármaco demonstraram a mais forte inibição da produção de espécies reativas de oxigênio (OLAS e WACHOWICZ, 2005). Em outro estudo realizado por Mizutani et al. (2001) foi revelado que o resveratrol reduz significativamente marcadores de estresse oxidativo, como albumina glicada no soro e 8-hidroxi-guanosina, na urina de ratos hipersensíveis a acidente vascular cerebral.

Alguns autores propuseram que a atividade antioxidante do resveratrol pode ser dada pela regulação e/ou modulação de cascatas sinalizadoras intracelulares e também remoção de ERO's, quelação de metais e modulação de enzimas. Entretanto, o mecanismo de ação antioxidante exato do resveratrol ainda não está completamente elucidado (MCCALLEY, 2014).

Em 2003, Yen et al. mostraram que o resveratrol, em concentrações de 10-100 mM, exerce grande proteção contra dano oxidativo causado pelo peróxido de hidrogênio através de um aumento dos níveis de glutathiona reduzida (um importante antioxidante não-enzimático intracelular). Já Cao e Li (2004), pesquisando algumas desordens cardiovasculares, demonstraram que baixas concentrações resveratrol podem induzir a expressão de certo número de antioxidantes endógenos e enzimas de fase 2 (incluindo superóxido dismutase (SOD), catalase (CA), glutathiona redutase (GSH), glutathiona-S-transferase (GST), e NAD (P) H, quinona oxidoreductase 1), levando a um aumento da resistência de células cardíacas à lesão induzidas por ROS.

Devido ao caráter lipofílico do resveratrol, outra ação importante reportada pela molécula é a defesa de membranas contra a peroxidação lipídica. Estudos revelaram que a peroxidação lipídica afeta gravemente biomembranas levando a alteração da sua integridade, fluidez e permeabilidade (GREENBERG et al., 2008; WEST e MARNETT, 2006). Um estudo demonstrou que, após o consumo de resveratrol na dieta, houve um aumento mensurável no nível de antioxidantes do plasma e diminuição da peroxidação lipídica no sangue de pacientes (WENZEL et al., 2005). Além disso, também foi relatado que o resveratrol foi capaz de reduzir a quantidade de ERO's intracelular e evitar a oxidação da LDL em células endoteliais (DELMAS et al., 2005).

Em resumo, o resveratrol possui efeito antioxidante forte, podendo proporcionar uma proteção eficaz contra o estresse oxidativo (FRENKEL et al., 1995). Entretanto, por ser uma molécula de ação ampla seu efeito irá depender da dose, do tempo de exposição e mesmo do tecido alvo (PACHOLEC et al, 2010). Ainda não há um consenso entre autores sobre as doses ideais para efeito antioxidante (BRANCO et al., 2010; BUCAK et al, 2014; GARCEZ et al., 2010; SILVA et al, 2012) . Desta forma, são necessários mais estudos com o resveratrol para estabelecer estas questões.

2.3.3. Resveratrol e a célula espermática

O resveratrol, recentemente, vem sendo aplicado em biotécnicas reprodutivas, como na criopreservação do sêmen com o objetivo de combater efeitos do estresse oxidativo gerados durante o processo de congelamento (BRANCO et al., 2010; GARCEZ et al., 2010). Em humanos, por exemplo, observou-se que uma concentração de 10 mM de resveratrol foi eficiente para diminuir os danos causados ao DNA do espermatozoide pelo processo de criopreservação. Além disso, a utilização de resveratrol não induziu qualquer alteração na concentração espermática ou morfologia pós-descongelamento. Entretanto, o antioxidante não foi capaz de prevenir a queda da motilidade induzida pelo congelamento (BRANCO et al., 2010).

Garcez et al. (2010), também estudando o congelamento de sêmen humano, observaram que o antioxidante preveniu a peroxidação lipídica em espermatozoides. Em contrapartida, verificaram que o antioxidante causou uma diminuição de motilidade no sêmen quando comparado com o controle. Os autores atribuíram esse efeito ao fato do resveratrol ser conhecido como um inibidor específico da COX1, uma enzima envolvida na síntese das séries de prostaglandinas-2, que são positivamente correlacionados com a motilidade do espermatozoide (GARCEZ et al., 2010). Um estudo, que corrobora os dados encontrados por Garcez et al. (2010), mostraram que as mesmas concentrações de 0,1, 1 e 10 mM de resveratrol foram capazes de diminuir progressivamente a motilidade do sêmen de peru, quando o mesmo era incubado por 5 minutos à temperatura de 41°C (KENNEDY et al, 2003).

Sarlós et al. (2002) também observaram que o resveratrol diminuía a peroxidação lipídica nas concentrações de 15 e 20 µg/ml, quando o sêmen de bode era incubado por 120 minutos a 37°C. Além disso, verificaram que os grupos com antioxidante tiveram uma alta proporção de espermatozoides móveis e também menos defeitos acrossomais que o grupo controle. Silva et al., (2012) mostraram que as concentrações de 5, 10, 15 e 20 µg/mL de resveratrol adicionadas ao diluente para criopreservação não foram eficientes na restauração da motilidade, vigor, integridade do acrossoma ou membrana plasmática, quando comparadas ao controle (sem antioxidante) em sêmen de bode. Mas para concentração mais alta, utilizada de 20 µg/mL, houve uma diminuição de atividade mitocondrial, o que

indicava certa toxicidade do resveratrol sobre a célula espermática nesta concentração.

Já no trabalho de Bucak et al., (2014), realizado em bovinos, uma concentração de 1mM de resveratrol no diluente foi eficiente, aumentando motilidade progressiva, atividade mitocondrial e diminuindo os danos ao DNA. Mas, para parâmetros como integridade de acrossoma, viabilidade e estresse oxidativo no espermatozoide, não houve diferença entre o resveratrol e o tratamento controle.

Existem diferenças na composição lipídica da membrana plasmática entre as espécies, raças e ainda entre indivíduos da mesma espécie, o que pode explicar o maior ou menor efeito protetor de um diluidor ou antioxidante aos espermatozoides de um determinado indivíduo (HOLT, 2000). Poucos estudos foram realizados utilizando o resveratrol como antioxidante no diluente para criopreservação de sêmen bovino (BRANCO et al., 2010; BUCAK et al., 2014; GARCEZ et al., 2010; SILVA et al., 2014; SARLÓS et al., 2002). Além disso, os estudos que existem foram desenvolvidos em espécies de animais diferentes e utilizando diversas concentrações do antioxidante. Desta forma, os dados obtidos são divergentes e ainda pouco conclusivos.

3. HIPOTESE

- 1) A adição de antioxidante ao diluidor diminui os danos causados pelo estresse oxidativo gerado durante o processo de criopreservação.
- 2) A proteção antioxidante aprimora parâmetros cinéticos e morfofuncionais do sêmen pós-descongelamento.
- 3) A proteção antioxidante melhora a qualidade do sêmen pós-descongelamento e conseqüentemente sua fertilidade.

4. OBJETIVOS

4.1. Geral:

Investigar o efeito do resveratrol no meio diluente para congelamento sobre a qualidade e fertilidade do sêmen de touros da raça *Bos taurus*.

4.2. Objetivos específicos:

Avaliar o efeito do antioxidante resveratrol nas concentrações 50, 100 μM e 1000 μM no meio diluente para congelamento do sêmen de touros da raça *Bos taurus* sobre:

- a) Parâmetros cinéticos de espermatozoides bovinos criopreservados
- b) Integridade da membrana plasmática e acrossomal e a função mitocondrial de espermatozoides bovinos criopreservados
- c) Fertilidade do sêmen através da produção *in vitro* de embriões

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1. Delineamento experimental

5.1.1. Experimento 1 – Criopreservação do sêmen com dimetilsulfóxido

O resveratrol tem baixa solubilidade em água e, por isso, deve ser diluído em solventes orgânicos como, por exemplo, o dimetilsulfóxido. Assim, para avaliar se havia alguma influência dessa substância na criopreservação, o sêmen foi congelado sem e com dimetilsulfóxido (DMSO, Sigma, St Louis). A concentração foi ajustada para 0,1%, descrita em outros trabalhos como não nociva aos espermatozoides (MEAMAR, 2012). O sêmen foi congelado em um total de 10 palhetas por ejaculado na concentração de 40 milhões de espermatozoides viáveis por palheta no volume 250 μ L. Foram coletados pelo menos 2 ejaculados de cada touro e distribuídos conforme os seguintes tratamentos:

- R00 (controle do diluente): sêmen diluído em meio TRIS-gema-glicerol sem de DMSO
- R0 (controle de DMSO): sêmen diluído em meio TRIS-gema-glicerol e 0,1% de DMSO

5.1.2. Experimento 2 - Criopreservação do sêmen com resveratrol

Foram congeladas 20 palhetas por ejaculado na concentração de 40 milhões de espermatozoides viáveis por palheta de volume 250 μ L. Para diluição do resveratrol em todos os tratamentos foi utilizada uma concentração final de 0,1% de DMSO no sêmen com diluente. Foram coletados pelo menos 3 ejaculados de cada touro para cada concentração, distribuídos conforme os seguintes tratamentos (figura 3):

- R0 (controle): amostra de sêmen diluído em meio TRIS-gema-glicerol sem resveratrol
- R1: amostra de sêmen diluído em meio TRIS-gema-glicerol acrescido de 50 μ M (11,41 μ g/mL) de resveratrol.

- R2: amostra de sêmen diluído em meio TRIS-gema-glicerol acrescido de 100 μ M (22,82 μ g/mL) de resveratrol
- R3: amostra de sêmen diluído em meio TRIS-gema-glicerol acrescido de 1000 μ M (228,2 μ g/mL) de resveratrol

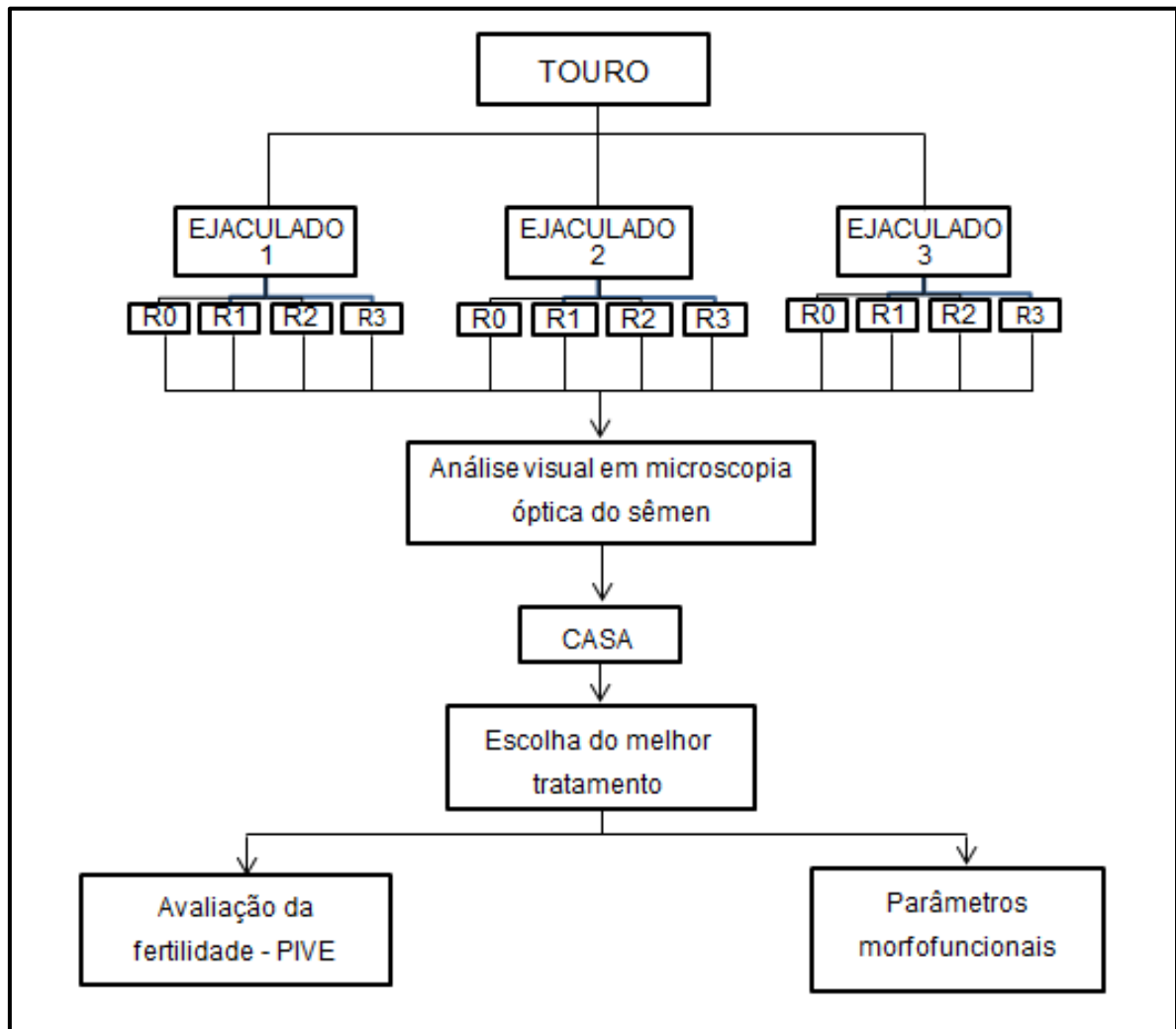


Figura 3. Delineamento experimental

5.2. LOCAL EXPERIMENTAL

As atividades experimentais de coleta, processamento e criopreservação de amostras de sêmen foram feitas na Embrapa Gado de Leite no Campo Experimental José Henrique Bruschi – CEJHB em Coronel Pacheco, Minas Gerais (MG). As atividades experimentais relacionadas à avaliação de motilidade e vigor pós-descongelamento, integridade da membrana plasmática e acrossomal e a função

mitocondrial dos espermatozoides foram realizadas no Laboratório de Reprodução Animal da Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora, MG. A análise computadorizada do sêmen (CASA) foi realizada na Universidade Federal Fluminense (UFF).

5.3. Seleção dos animais - exame andrológico

O exame andrológico foi realizado para seleção dos touros, que foram utilizados no experimento. A coleta do sêmen foi feita com auxílio de eletroejaculador. No exame andrológico, foram avaliadas as características anatômicas do sistema reprodutor masculino e do ejaculado conforme parâmetros do Manual de Exame Andrológico e Avaliação de Sêmen Animal (CBRA, 2013). Foram selecionados 8 touros para o experimento.

5.4. Coleta e criopreservação do sêmen

5.4.1. Animais e manejo

Foram utilizados oito touros da raça holandesa (figura 4) com idades entre 22 e 32 meses ($24,42 \pm 2,68$ meses), selecionados previamente por exame andrológico. Os animais selecionados foram aqueles que obtiveram menos de 30% de patologias espermáticas totais (menos de 20% de defeitos maiores e menos de 10% de defeitos menores). Os animais que apresentaram algum tipo de patologia anatômica foram automaticamente descartados para o experimento. O controle de ectoparasitas e endoparasitas, bem como as vacinações obrigatórias, foram realizados regularmente seguindo o calendário profilático sanitário da Embrapa Gado de Leite. Os touros foram mantidos em baias individuais sob as mesmas condições ambientais e alimentação durante todo o experimento e seguindo as normas de manejo de bovinos adotado pelo CEJHB. Os procedimentos experimentais foram aprovados sob o protocolo 04/2015 pelo CEUA da Embrapa Gado de Leite.



Figura 4. Touro *Bos taurus* da raça Holandesa utilizado no experimento.

5.4.2. Coleta e avaliação da qualidade do sêmen *in natura*

Os animais foram previamente adaptados à coleta de sêmen por meio de eletroejaculador. Antes do início da coleta, a região externa do prepúcio foi higienizada com água e sabão neutro e a região interna foi lavada com solução fisiológica (Cloreto de sódio 0,9%). Durante o experimento, foram coletados ejaculados dos oito touros no mesmo dia. Após a coleta, o sêmen foi imediatamente levado ao laboratório e mantido em banho-maria a 37°C até seu processamento final, para evitar choque-térmico e alterações das suas características seminais. Na avaliação dos ejaculados, foram consideradas as características macro e microscópicas de acordo com parâmetros do Manual de Exame Andrológico e Avaliação de Sêmen Animal (CBRA, 2013). Um total de quatro coletas foi realizado em intervalos de 7 a 15 dias. Congelaram apenas ejaculados com motilidade acima de 60%, vigor acima de 3, concentração mínima de 5×10^8 espermatozoides/ml e volume acima de 2 mL.

5.4.3. Criopreservação do sêmen com resveratrol

Após coleta e avaliação do sêmen conforme item 5.5, o ejaculado foi diluído e distribuído pelos tratamentos do Experimento 1 (R00 [amostra de sêmen diluído em

meio TRIS-gema-glicerol sem DMSO] e R0 [amostra de sêmen diluído em meio TRIS-gema-glicerol com 0,1% de DMSO] ou do Experimento 2 (R0, R1[amostra de sêmen diluído em meio TRIS-gema-glicerol acrescido de 50 μ M de resveratrol], R2 [amostra de sêmen diluído em meio TRIS-gema-glicerol acrescido de 100 μ M de resveratrol] e R3 [amostra de sêmen diluído em meio TRIS-gema-glicerol acrescido de 1000 μ M de resveratrol]). O diluente TRIS-gema-glicerol (ácido cítrico 1,5 g; tris-hidroximetil-aminometano 2,42 g; glicose 1,25 g; penicilina G potássica 100,000UI; sulfato de estreptomicina 0,1 g; glicerol 6%, gema de ovo 20 ml; água destilada q.s.p 100 ml) foi previamente preparado no Laboratório de Reprodução Animal da Embrapa Gado de Leite e mantido em freezer a -20°C .

Logo em seguida, o sêmen diluído, de acordo com os tratamentos, foi submetido ao resfriamento, na qual foi mantido por 4 horas em geladeira à 4°C . Após o resfriamento, a motilidade e vigor do sêmen foram avaliadas e o mesmo envasado em palhetas de 0,25 mL em uma concentração de 40 milhões de espermatozoides viáveis por palheta, mantendo-se a temperatura de aproximadamente 4°C . As palhetas, então, foram transferidas para uma grade a 5 cm do nível do nitrogênio líquido, onde permaneceram por 15 minutos até serem imersas em nitrogênio líquido. Por fim, as palhetas foram acondicionadas em botijão de nitrogênio até o momento de sua utilização. Foram coletados pelo menos 3 ejaculados de cada touro para cada concentração e congeladas 20 palhetas por ejaculado. O sêmen foi descongelado após 20 dias de armazenamento.

5.5. Análise do sêmen

5.5.1. Análise subjetiva da motilidade e vigor

As amostras de sêmen foram descongeladas por imersão das palhetas em banho-maria à temperatura de 37°C , durante 30 segundos. A avaliação da motilidade foi realizada em microscópio com contraste de fase (Nikon Instruments, E100, Florida, Estados Unidos) por um único técnico, sendo uma amostra de 10 μ L de sêmen examinada em aumento 200X, entre lâmina e lamínula e vários campos foram observados. Todas as três partidas (ejaculados) de cada touro foram

analisadas.

5.5.2. Análise computadorizada dos parâmetros cinéticos espermáticos (CASA)

A amostra do sêmen foi descongelada em banho-maria a 37°C por 30 segundos em seguida foi retirada uma alíquota de 10 µL da amostra e colocada entre lâmina e lamínula previamente aquecida a 37°C. O programa utilizado foi Sperm Class Analyzer (SCA Evolution, Microptic, Barcelona, Espanha) previamente ajustado para análise do sêmen bovino. Este programa realiza a análise do movimento espermático através da imagem capturada por um microscópio acoplado a um computador. Realizou-se a escolha manual dos campos de leitura, sendo selecionados os 5 melhores campos por amostra.

As características de movimento espermático analisadas foram: motilidade progressiva (%), motilidade total (%), VAP (velocidade média de percurso µm/s), VSL (velocidade linear, µm/s), VCL (velocidade curvilínea, µm/s), ALH (amplitude de deslocamento lateral da cabeça, µm), LIN (índice de linearidade, $LIN = [VSL/VCL] \times 100$), STR (retilinearidade, $STR = [VSL/VAP] \times 100$), BCF (frequência de batimento flagelar) dos espermatozoides. Foram feitas as análises dos três ejaculados de cada animal em triplicata.

5.5.3. Avaliação da integridade das membranas plasmáticas e acrossomal

A integridade das membranas plasmáticas e acrossomal foram avaliadas de acordo com protocolos descritos por ARRUDA e CELEGHINI (2003), pela associação das sondas iodeto de propídio (PI; Sigma, 28707-5, St Louis, EUA), aglutinina de *Pisum sativum* conjugada com isotiocionato de fluoresceína (FITC-PSA; Sigma L-0770, St Louis, EUA). A amostra de sêmen foi descongelada em banho-maria a 37°C por 30 segundos em seguida lavada em 2 mL de TALP-HEPES submetidas à centrifugação de 3200 rpm durante 3 minutos. Em seguida, a amostra foi diluída em mesmo meio para uma concentração de 40 milhões de espermatozoides/mL. Uma alíquota de 150µL foi retirada e transferida para tubo eppendorf e adicionado 3µL de PI (2 mg/mL) e 50µL de FITC-PSA (100 µg/mL).

Após 8 minutos de incubação a 37°C a leitura foi realizada imediatamente sob microscopia de epifluorescência (Zeiss, axiophot trinocular, California, Estados Unidos) em filtro com excitação de 460-570 nm e emissão de 460-610 nm. Foram feitas análises apenas do controle R0 e do tratamento R1 (tratamento escolhido como melhor no nosso trabalho), sendo contadas 100 células para cada repetição num total de três repetições. Os espermatozoides foram classificados de acordo com a fluorescência emitida por cada sonda utilizada (PI, FITC-PSA), que resultaram em quatro categorias de células descritas na Figura 5.





CÉLULA ESPERMÁTICA	PI	FITC-PSA	ESPERMATOZOIDE
Membrana plasmática e acrossomo intacto (MAI)	-	-	
Membrana plasmática intacta com acrossomo lesado (MIAL)	-	+	
Membrana plasmática lesada e acrossomo intacto (MLAI)	+	-	
Membrana plasmática e acrossomo lesados (MLAL)	+	+	

Figura 5. Classificação das células espermáticas de acordo com a coloração fluorescente emitida no protocolo de associação de PI e FITC-PSA.

5.5.4. Avaliação da função mitocondrial

A integridade da função mitocondrial foi avaliada de acordo com protocolo descrito por CELEGHINI (2005). Foi utilizada a sonda Mitotracker Red (Sigma, MP07510, St Louis, EUA). A amostra de sêmen foi descongelada em banho-maria a 37°C por 30 segundos em seguida lavada em 2 mL de TALP-HEPES submetidas à centrifugação de 3200 rpm durante 3 minutos. Subsequindo, a amostra foi diluída em mesmo meio para uma concentração de 40 milhões de espermatozoides/mL.

Uma alíquota de 100 μ L foi retirada e colocada em tubo tipo eppendorf e então adicionado 0,25 μ L de Mitotracker Red (1mM). Após 8 minutos de incubação 37°C, a leitura foi realizada imediatamente sob microscopia de epifluorescência (Zeiss, axiophot trinocular, California, Estados Unidos) em filtro com excitação de 460-570 nm e emissão de 460-610 nm. Foram feitas análises apenas do controle R0 e do tratamento R1 (tratamento que obteve resultados mais promissores, conforme verificado no item 6), sendo contadas 100 células para cada repetição num total de três repetições. Os espermatozoides foram classificados de acordo com a fluorescência emitida pela sonda utilizada Mitotracker Red, que resultaram em duas categorias de células descritas na figura 6.



CÉLULA ESPERMÁTICA	MITO	ESPERMATOZOIDE
Baixo potencial de membrana mitocondrial (BPM)	-	
Alto potencial de membrana mitocondrial (APM)	+	

Figura 6. Classificação das células espermáticas de acordo com a coloração fluorescente emitida no protocolo de associação de Mitotracker Red (MITO).

5.6. Avaliação do efeito do resveratrol (50 μ m) sobre a fertilidade do sêmen – produção *in vitro* de embriões

5.6.1. Seleção dos touros para fertilização *in vitro*

Os touros usados na produção *in vitro* de embriões foram selecionados por sua média de motilidade pós-descongelamento antes de serem submetidos aos tratamentos. Foram escolhidos dois touros com as maiores médias de motilidade, um com valor intermediário e outro com a pior média. Na PIVE, foi comparado o controle R0 e o tratamento R1 (escolhido como melhor tratamento). Foram testados dois touros simultaneamente por bateria de FIV. A taxa de clivagem dos embriões no

dia 3 (D3) e número e o estágio de desenvolvimento de blastocistos nos dias 7 (D7) e 8 (D8) foram avaliadas. Realizaram-se quatro repetições para cada animal.

5.6.2. Obtenção dos ovários e maturação *in vitro* (MIV)

Ovários de vacas predominantemente mestiças (Holandês-zebuínos) oriundas de rebanhos de Juiz de Fora e região foram coletados no matadouro. Os ovários foram obtidos logo após o abate e transportados para o laboratório em solução fisiológica, acrescida de penicilina e estreptomicina à temperatura de 37° C para a aspiração de oócitos imaturos e MIV. Foram aspirados folículos visíveis com diâmetro de 2 a 8 mm.

Após decantação do fluido folicular aspirado em tubo tipo Falcon de 50mL (10-15 min), o sedimento foi lavado em meio TALP-HEPES e a seleção morfológica dos oócitos realizada (COSTA et al., 1997). A MIV de todos os oócitos foi feita em placa de 4 poços contendo 400 µL de meio *Tissue Culture Medium* (TCM 199 – Invitrogen, Califórnia, EUA) suplementado com 2 µg/mL de hormônio folículo estimulante (FSH; Pluset, Barcelona, Espanha) e 10% de soro de vaca em cio. Para a MIV, os oócitos foram mantidos em incubadora com 5% de CO₂, ar atmosférico, umidade acima de 95% e 38,5° C, por 24 h. Em cada poço, foram maturadas entre 40-60 estruturas.

5.6.3 Fecundação *in vitro*

Após 24 h de MIV, os oócitos foram fecundados *in vitro* com sêmen de dois touros diferentes, divididos em grupo controle (R0) e R1, totalizando 4 grupos por bateria de FIV, conforme descrito:

- Touro 1: R0 (controle) - amostra de sêmen diluído em meio TRIS-gema-glicerol sem resveratrol
- Touro 1: R1 - amostra de sêmen diluído em meio TRIS-gema-glicerol acrescido de 50 µM (11,41µg/mL) de resveratrol.
- Touro 2: R0 (controle) - amostra de sêmen diluído em meio TRIS-gema-glicerol sem resveratrol

- Touro 2: R1 - amostra de sêmen diluído em meio TRIS-gema-glicerol acrescido de 50 μM (11,41 $\mu\text{g}/\text{mL}$) de resveratrol.

Para a seleção dos espermatozoides, usou-se o método do gradiente de Percoll (Nutricell, São Paulo, Brasil) com as concentrações de 45% e 90% (PARRISH, KROGENAES e SUSKO-PARRISH, 1995). A FIV foi realizada em gotas de 100 μl de meio FERT-TALP, acrescido de 10 UI/mL de heparina com uma concentração espermática de 2,0 milhões de espermatozoides/mL, cobertas com óleo mineral e mantidas por período de aproximadamente 20h em estufa incubadora com 5% de CO_2 , umidade acima de 95%, a 38,5 °C. Cada gota de fecundação continha aproximadamente 30 oócitos, mantendo-se a distinção dos grupos.

5.6.4. Cultivo *in vitro*

Após a fecundação, os presumíveis zigotos foram desnudos e lavados em meio TALP-HEPES previamente aquecido a 37°C. Todos os embriões foram cultivados em placas de 4 poços contendo 400 μL de meio CR2aa suplementado com 2,5% de soro fetal bovino e cobertos com 200 μL de óleo mineral e mantidos em incubadora com 5% de CO_2 , 5% de O_2 , 90% N_2 , umidade de 95% a 38,5 °C, por 8 dias.

5.6.5. Avaliação do desenvolvimento embrionário

Verificou-se a taxa de clivagem dos embriões no dia 3 (D3) (72 horas pós-fertilização). O número e o estágio de desenvolvimento de blastocistos foram avaliados nos dias 7 (D7) e 8 (D8).

5.7. Análise estatística

Os dados motilidade e vigor, obtidos por microscopia óptica, integridade das membranas plasmáticas e acrossomal e função mitocondrial, foram analisados por ANOVA, usando o procedimento GLM do Software *Statistical Analysis System* (SAS, Carolina do Norte, Estados Unidos) e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey-Kramer. Analisaram-se os dados para avaliação dos aspectos físicos do

sêmen por ANOVA e as médias comparadas por teste de Tukey-Kramer através do programa Graph Pad Prism versão 5 (Graph Pad Software, California, Estados Unidos). A variação dos dados de motilidade progressiva, motilidade total, VAP, VSL, VCL, ALH, LIN, STR e BCF obtidos por CASA foram analisados por *restricted maximum likelihood* (REML) usando o procedimento Mixed do *Statistical Analysis System* (SAS, Carolina do Norte, Estados Unidos) e as médias contrastadas pelo teste de Tukey-Kramer. Na fecundação *in vitro* os dados de clivagem, blastocisto no D7 e no D8 foi analisado por ANOVA usando o procedimento GLM do Software *Statistical Analysis System* (SAS, Carolina do Norte, Estados Unidos) e as médias foram comparadas pelo teste de Student-Newman-Keuls. Em todas as análises foram considerados efeitos de touro, de dose de resveratrol e a interação entre eles. Considerou-se o nível de significância de 5%. Os resultados são apresentados como média \pm erro-padrão da média (EPM).

6. RESULTADOS

6.1 Avaliação da qualidade do sêmen *in natura* e taxa de queda de motilidade

Na tabela 1, encontram-se os resultados das avaliações de aspectos físicos e do movimento espermático no sêmen *in natura*. As médias foram comparadas e não observou-se diferença significativa ($P>0,05$) para resultados de vigor, volume, concentração espermática e taxa de queda de motilidade entre os touros. Entretanto, para os dados de turbilhonamento, motilidade à fresco e pós-descongelamento, verificou-se diferença entre as médias dos animais ($P<0,05$).

No parâmetro de turbilhonamento, os touros 2175, 3101, 3202, 3118, 3141, 3138 e 3204 apresentaram resultados estatisticamente semelhantes entre si. O touro 3110 obteve uma maior média ($P<0,05$) em relação aos touros 3118, mas não foi diferente estatisticamente ($P>0,05$) dos outros animais (Tabela 1).

Os dados de motilidade espermática mostraram que o touro 2175 obteve resultado superior a, sendo estatisticamente semelhante aos outros animais. Os touros 3118, 3202 e 3204 também não apresentaram médias diferentes dos animais 3110, 3101 e 3138 foram semelhantes entre si ($P>0,05$) e superiores aos touros 3118, 3204 e 3202. Para dados relacionados ao vigor espermático, os touros 2175 e 3110 apresentaram melhores ($P<0,05$) resultados em relação aos 3118, 3141, 3138 e 3204, e não foram diferentes dos demais. Os touros 3101 e 3202 foram semelhantes entre si e mostraram melhores ($P<0,05$) resultados que 3118, 3141 e 3204 (Tabela 1). Resumidamente, os touros 3110 e 2175 apresentaram os melhores resultados de turbilhonamento, motilidade e vigor no sêmen fresco, enquanto os 3110, 3101, 3138 e 3141.

Não houve diferença significativa ($P>0,05$) para taxa de queda de motilidade entre os oito animais. Entretanto, para motilidade pós-descongelamento, o touro 3101 apresentou melhor ($P<0,05$) resultado de motilidade em relação a 3202. Os animal 3110, 3138, 3141, 3101, 3118, 3204 foram semelhantes ($P>0,05$) entre si e não foram diferentes dos touros 3101 e 3202.

Tabela 1. Médias de turbilhonamento (0-5), motilidade total, vigor (0-5), volume e concentração para sêmen *in natura* e motilidade e taxa de queda de motilidade para sêmen pós- descongelamento.

TOURO	N	TURB (0-5)	MOT FR (%)	VIGOR (0-5)	VOL (mL)	CONC (milhões/mL)	MOT PD (%)	TQM (%)
2175	4	3,75±0,63 ^{ab}	85,00±3,53 ^a	4,25±0,25	12,5±0,50	488,8±226,3	40,00±10,00 ^{ab}	54,58±10,14
3138	4	3,00±0,35 ^{ab}	80,00±3,54 ^{ab}	3,75±0,32	8,00±1,47	175,0±56,3	42,5±4,78 ^{ab}	46,56±6,15
3110	4	3,87±0,37 ^a	78,75±3,15 ^{ab}	4,25±0,14	11,38±2,01	376,9±96,2	38,75±4,27 ^{ab}	50,42± 6,05
3101	4	3,50±0,20 ^a	77,50±3,22 ^{ab}	4,12±0,12	14,00±1,83	239,4±38,9	58,75±6,57 ^a	24,72± 6,46
3141	4	3,12±0,31 ^{ab}	76,25±3,15 ^{ab}	3,62±0,24	8,25±1,65	254,4±45,9	45,00±8,89 ^{ab}	40,30±12,53
3204	4	2,50±0,35 ^{ab}	71,25±1,25 ^b	3,62±0,31	12,50±0,87	208,1±38,3	30,00±8,89 ^{ab}	57,50±12,91
3202	4	3,5±0,20 ^{ab}	71,25±1,25 ^b	4,12±0,12	14,50±2,39	366,3±73,5	28,75±3,14 ^b	59,76±3,99
3118	4	2,12±0,31 ^b	67,50±2,50 ^b	3,50±0,00	11,75±1,89	207,5±38,0	36,25±2,39 ^{ab}	45,83±5,86
MÉDIA±EPM	-	3,172±0,15	75,94±1,29	3,91±0,08	11,61±0,65	289,5±35,36	38,75±2,57	46,98±3,29

Os resultados são apresentados como média±erro-padrão da média. a,b e c: letras diferentes indicam diferenças entre linhas (P<0,05; Tukey). TURB= Turbilhonamento/ MOT FR= Motilidade sêmen fresco/ VOL =VOLUME/ CONC. = Concentração total/ N= número de ejaculados/ MOT PD = motilidade pós-descongelamento/ TQM = Taxa de queda de motilidade

6.2. Avaliação do dimetilsulfóxido na criopreservação

6.2.1. Análise do sêmen em microscopia óptica

Os resultados da análise visual de motilidade e vigor do grupo R00 (amostra de sêmen diluído em meio TRIS-gema-glicerol sem DMSO) e o R0 (amostra de sêmen diluído em meio TRIS-gema-glicerol com 0,1% de DMSO) mostraram que não há diferença significativa entre as médias ($P>0,05$) pós-resfriamento e pós-descongelamento entre os grupos (Tabela 2). Também não houve interação entre touro e tratamento para esses parâmetros ($P>0,05$).

Tabela 2. Médias de motilidade total pós-resfriamento (MOT PR), motilidade total pós-descongelamento (MOT PD), vigor pós-resfriamento (VIG PR) e vigor pós-descongelamento (VIG PD) avaliados por microscopia de contraste de fase.

TTO	N de ejaculados	MOT PR (%)	MOT PD (%)	VIG PR	VIG PD
R0	32	59,69±1,92	38,75±2,22	3,06±8,35	3,02±8,25
R00	22	59,21±2,45	32,65±2,83	3,19±10,65	2,91±10,53

Não houve diferença significativa entre médias ($P>0,05$). Os resultados são apresentados como média±erro-padrão da média. TTO= tratamento.

6.2.2 Análise do sêmen através de Sistema Computadorizado

Conforme descrito no item 5.5.2 do material e métodos, as características de movimento espermático, analisadas por sistema computadorizado, foram: motilidade progressiva (%), a motilidade total (%), VAP (média velocidade de percurso $\mu\text{m/s}$), VSL (velocidade linear, $\mu\text{m/s}$), VCL (velocidade curvilínea, $\mu\text{m/s}$), ALH (amplitude de deslocamento lateral da cabeça, μm), LIN (índice de linearidade, $\text{LIN} = [\text{VSL}/\text{VCL}] \times 100$), STR (retilinearidade, $\text{STR} = [\text{VSL}/\text{VAP}] \times 100$), BCF (frequência de batimento flagelar) dos espermatozoides.

Não foi observada interação entre touro e tratamentos ($P>0,05$). Não houve diferença entre R00 e R0 ($P>0,05$) para nenhum dos parâmetros analisados pelo CASA (Tabelas 3, 4 e 5). Os resultados obtidos pelo sistema computadorizado confirmaram os dados da análise visual, mostrando que os grupos R00 e R0 são equivalentes quanto ao padrão de movimento espermático.

Tabela 3. Médias de motilidade progressiva (%) e motilidade total de espermatozoides (%) avaliadas por sistema computadorizado (CASA).

TTO	N de ejaculados	MOT PROGRESSIVA (%)	MOT TOTAL (%)
R0	32	29,40 ± 1,10	70,85 ± 1,94
R00	22	28,68 ± 1,54	68,37 ± 2,70

Não houve diferença significativa entre médias ($P>0,05$). Os resultados são apresentados como média±erro-padrão da média. TTO= tratamento.

Tabela 4. Médias de velocidade média (VAP), velocidade linear (VSL) e velocidade curvilínea (VCL) avaliadas por sistema computadorizado (CASA).

TTO	N de ejaculados	VCL ($\mu\text{m/s}$)	VSL ($\mu\text{m/s}$)	VAP ($\mu\text{m/s}$)
R0	32	52,11±0,95	23,90±0,58	32,55±0,66
R00	22	52,66±1,03	25,05±0,69	33,55±0,72

Não houve diferença significativa entre médias ($P>0,05$). Os resultados são apresentados como média±erro-padrão da média. TTO= tratamento.

Tabela 5. Médias linearidade (LIN), retilinearidade (STR), deslocamento lateral da cabeça (ALH) e frequência de batimento flageoçar (BCF) avaliadas por sistema computadorizado (CASA).

TTO	N de ejaculados	LIN (%)	STR (%)	ALH (μm)	BCF (Hz)
R0	32	40,77±0,79	63,10±0,68	2,36±0,04	6,31±0,13
R00	22	42,85±0,88	64,95±0,80	2,32±0,04	6,74±0,18

Não houve diferença significativa entre médias ($P>0,05$). Os resultados são apresentados como média±erro-padrão da média. TTO= tratamento.

Os resultados obtidos no presente trabalho, tanto para análise visual quanto para análise dos parâmetros do CASA, corroboram o que foi descrito por MEAMAR et al. (2012), que mostraram que a concentração de 0,1% de DMSO não altera os resultados da criopreservação de espermatozoides.

6.3. Avaliação do efeito do resveratrol nos parâmetros cinéticos do sêmen criopreservado

6.3.1 Análise do sêmen por microscopia óptica

Como uma avaliação preliminar dos efeitos do antioxidante resveratrol sobre a viabilidade da célula espermática, dados de motilidade e vigor pós-resfriamento (curva de resfriamento - após período de 4 horas que o sêmen permanece a temperatura de 4°C) e pós-descongelamento para os tratamentos e controles foram analisados.

Para os resultados de motilidade total pós-resfriamento, não foram observadas diferenças ($P>0,05$) entre as médias dos quatro grupos. Na motilidade pós-descongelamento, foi encontrado um contraste entre médias, no qual o grupo R1 apresentou motilidade maior ($P<0,05$) que o grupo R3, mas não foi significativamente diferente do R0 e R2 ($P>0,05$) (Tabela 6). Contudo, houve uma tendência ($P=0,0630$) de melhores resultados com R1 quando comparado com R0. Já os resultados da análise de vigor mostraram que não há diferença significativa ($P>0,05$) entre as médias de vigor pós-resfriamento e pós-descongelamento entre os grupos R0, R1, R2, R3 (Tabela 6). Não houve interação entre touro e tratamento para nenhum dos parâmetros observados ($P>0,05$).

Tabela 6. Médias de motilidade total pós-resfriamento (MOT PR), motilidade pós-descongelamento (MOT PD), vigor pós-resfriamento (VIG PR) e vigor pós-descongelamento (VIG PD) avaliados por microscopia de contraste de fase.

Tratamento	N de ejaculados	MOT PR (%)	MOT PD (%)	VIG PR	VIG PD
R0	32	59,69±1,92	38,75±2,22 ^{ab}	3,06±8,35	3,02±8,25
R1	24	62,71±2,22	47,91±2,57 ^a	3,31±9,65	3,23±9,54
R2	32	63,59±1,92	42,65±2,22 ^{ab}	3,39±8,35	3,06±8,25
R3	24	57,71±2,22	35,62±2,57 ^b	3,10±9,65	2,94±9,54

a,b. Letras superescritas diferentes indicam diferenças entre linhas ($P<0,05$). Os resultados são apresentados como média±erro-padrão da média.

6.3.2 Análise do sêmen através de Sistema Computadorizado

Para verificar com maior detalhe os efeitos do resveratrol, foi realizada análise do sêmen por sistema computadorizado (CASA). Conforme descrito no item 5.5.2 do material e métodos, os parâmetros avaliados por sistema computadorizado foram: motilidade progressiva (%), a motilidade total (%), VAP (velocidade média de percurso $\mu\text{m/s}$), VSL (velocidade linear, $\mu\text{m/s}$), VCL (velocidade curvilínea, $\mu\text{m/s}$), ALH (amplitude de deslocamento lateral da cabeça, μm), LIN (índice de linearidade, $\text{LIN} = [\text{VSL}/\text{VCL}] \times 100$), STR (índice de retilinearidade, $\text{STR} = [\text{VSL}/\text{VAP}] \times 100$) e BCF (frequência de batimento flagelar).

Na análise estatística, o efeito do ejaculado foi tratado como aleatório. Para os dados de VAP, VCL, ALH, motilidade progressiva e motilidade total não foi observada interação entre touro e tratamento. Desta forma, para estes parâmetros são mostradas as diferenças entre os grupos R0, R1, R2, R3 através das tabelas 7 e 8. Já para LIN, STR, VSL e BCF, houve interação entre touro e tratamento, sendo os dados representados através das figuras 7, 8, 9, 10.

Não houve diferença entre os quatro tratamentos no parâmetro de motilidade total ($P > 0,05$). Contudo, para a motilidade progressiva o tratamento R1, foi superior ($P < 0,05$) aos tratamentos R0 e R3 e semelhante à R2 ($P > 0,05$). O tratamento R2, por sua vez, não foi diferente do R0 e R3 (Tabela 7). Os resultados mostraram que há uma superioridade do tratamento de menor concentração de resveratrol sobre o controle (sem antioxidante). O tratamento R1 protegeu os espermatozoides e diminuiu a perda de motilidade progressiva ocorrida durante a criopreservação.

Tabela 7. Médias de motilidade progressiva e motilidade total de espermatozóides avaliadas por sistema computadorizado (CASA).

Tratamento	N de ejaculados	MOT PROGRESSIVA (%)	MOT TOTAL (%)
R0	32	29,88 \pm 1,07 ^b	71,47 \pm 1,90
R1	24	34,44 \pm 1,19 ^a	73,88 \pm 2,11
R2	32	32,48 \pm 1,07 ^{ab}	74,79 \pm 1,90
R3	24	28,62 \pm 1,25 ^b	70,67 \pm 2,22

a, b, c, d: letras superescritas diferentes indicam diferenças entre linhas ($P < 0,05$). Os resultados são apresentados como média \pm erro-padrão da média.

Na tabela 8, estão representados os dados de VAP, VCL e ALH. Para a velocidade curvilínea do espermatozoide (VCL), não houve diferença ($P>0,05$) entre os grupos R0, R1 e R2, sendo estes superiores ao tratamento de maior concentração, o R3. Entretanto, na velocidade média (VAP) a concentração de 50 μM (R1) obteve maior ($P<0,05$) resultado que o controle (R0) e os dois outros tratamentos R2 e R3. Observamos também que R2 foi melhor ($P<0,05$) do que R3, mas não diferente do controle ($P>0,05$). Os grupos R0 e R3 também foram semelhantes entre si ($P>0,05$).

O ALH é amplitude do deslocamento lateral da cabeça do espermatozoide e está relacionada com a linearidade do movimento (MATOS et al., 2008). Quanto maior ALH, maior será a oscilação da cabeça da célula espermática e o movimento será menos linear e progressivo. Assim, um baixo ALH indica uma melhor qualidade do sêmen. Conforme tabela 10, não houve diferença ($P<0,05$) entre R0, R1 e R2. O grupo R3 apresentou menor ($p<0,05$) ALH do que R0, mas foi semelhante ($p>0,05$) a R1 e R2.

Tabela 8. Médias de velocidade curvilínea (VCL), velocidade média (VAP) e deslocamento lateral da cabeça (ALH) avaliadas por sistema computadorizado (CASA).

Tratamento	N de ejaculados	VCL ($\mu\text{m/s}$)	VAP ($\mu\text{m/s}$)	ALH (μm)
R0	32	51,83 \pm 0,82 ^a	32,52 \pm 0,61 ^{bc}	2,34 \pm 0,03 ^a
R1	24	53,57 \pm 0,91 ^a	35,53 \pm 0,68 ^a	2,30 \pm 0,03 ^{ab}
R2	32	51,35 \pm 0,82 ^a	32,96 \pm 0,61 ^b	2,30 \pm 0,03 ^{ab}
R3	24	48,12 \pm 0,93 ^b	30,29 \pm 0,70 ^c	2,22 \pm 0,04 ^b

a,b,c: letras superescritas diferentes indicam diferenças entre linhas ($P<0,05$). Os resultados são apresentados como média \pm erro-padrão da média.

Houve interação ($P<0,05$) entre touro e tratamento para os dados de VSL. Não foi observado efeito ($P>0,05$) de tratamento para os touros 2175, 3202, 3204, 3110, 3138, 3141, 3118. Entretanto, houve diferença ($P<0,05$) entre os tratamentos R1 e R3 para o touro 3101, conforme observado na Figura 7.

Dentro dos tratamentos R0 e R2, os touros 2175 e 3110 obtiveram maior ($P<0,05$) média de VSL do que o touro 3202. Os outros animais não apresentaram diferenças entre si. No tratamento R1 não houve diferença ($P>0,05$) entre nenhum dos touros. Entretanto, para o grupo R3, os touros 2175, 3110 e 3138 obtiveram melhores ($P<0,05$) resultados de VSL do que o animal 3204. De modo geral, se

observa na Figura 7 que no tratamento R1 (com 50 μ M de resveratrol) houve um aumento da VSL para os touros, com exceção do touro 2175 e 3110.

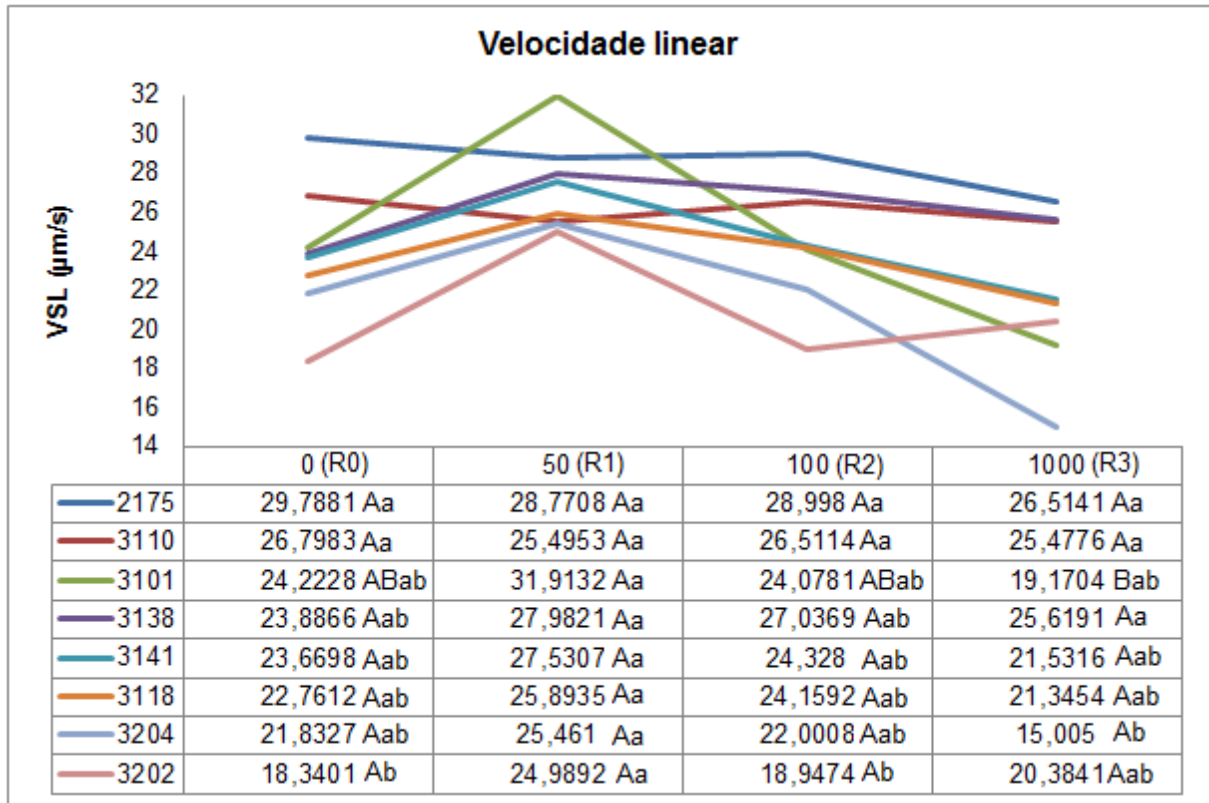


Figura 7. Médias de velocidade linear (VSL) avaliada por sistema computadorizado (CASA) para os touros 2175, 3110, 3138, 3141, 3101, 3118, 3204, 3202 e os grupos R0, R1, R2, R3. Os resultados são apresentados como média. a,b. Letras minúsculas diferentes indicam diferenças entre linhas. A, B. Letras maiúsculas diferentes indicam diferenças entre colunas ($P < 0,05$).

Por definição, o VCL é a trajetória real do espermatozoide, o VSL é a velocidade em linha reta e o VAP é a velocidade da trajetória média da célula espermática. Em casos em que a trajetória da cabeça espermática é muito regular e linear com pouco movimento lateral, VAP e VCL devem ser quase iguais a VSL (MATOS et al., 2008). Assim, para se obter o padrão do movimento espermático é feita a relação entre as velocidades. Dados de linearidade ($LIN = VSL/VCL$) e retilinearidade ($STR = VSL/VAP$) são calculados. Quanto mais próximo de 1 os valores de STR e LIN mais linear e retilíneo será o movimento espermático (MATOS et al., 2008).

Para os dados de linearidade, também houve interação entre touro e tratamento ($P < 0,05$). Conforme observado na Figura 8, não houve efeito ($P > 0,05$) de tratamento

para os touros 2175, 3202, 3101, 3110, 3138, 3141, 3118. Entretanto, para o touro 3204, o tratamento R1 foi superior ao R3 ($P < 0,05$).

Os resultados de LIN para dentro dos tratamentos R1 e R2 mostraram que o touro 2175 obteve maior ($p < 0,05$) média do que os touros 3202, 3118 e 3101, não sendo diferente dos demais. Entretanto, em R3, foi observado que o touro 2175 mostrou melhores ($p < 0,05$) resultados do que os animais 3101 e 3204. Além disso, também no grupo controle, o touro 3141 foi superior ($p < 0,05$) ao 3202. No tratamento R2, o animal 3204 teve resultados inferior ($p < 0,05$) ao 3138. No grupo R1, não houve diferença ($p > 0,05$) entre nenhum dos touros. Novamente, se observa na Figura 8 que no tratamento R1 houve um aumento da LIN para seis dos touros avaliados, exceto para os touros 2175 e 3138.

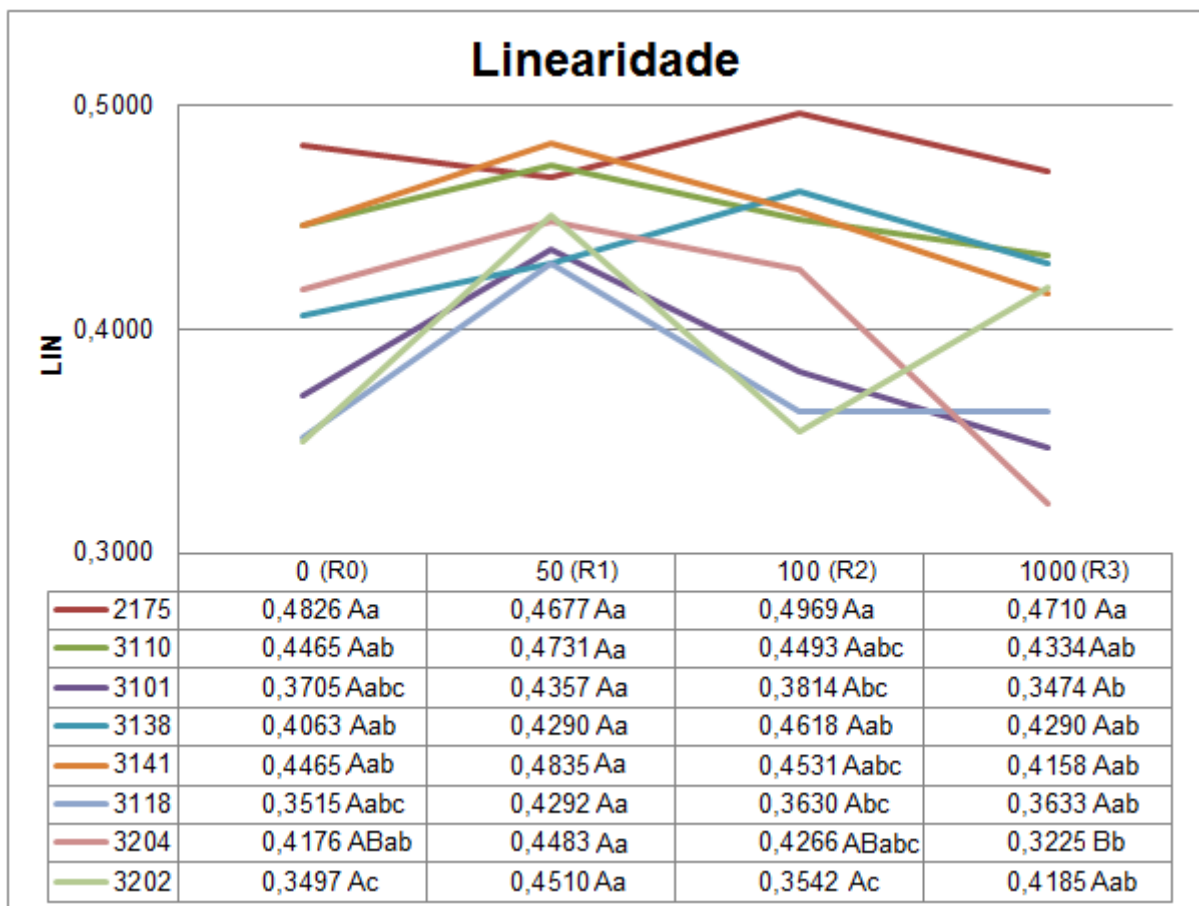


Figura 8. Médias de linearidade (LIN) avaliada por sistema computadorizado (CASA) para os touros 2175, 3110, 3138, 3141, 3101, 3118, 3204, 3202 e os grupos R0, R1, R2, R3. Os resultados são apresentados como média. a,b. Letras minúsculas diferentes indicam diferenças entre linhas. A, B. Letras maiúsculas diferentes indicam diferenças entre colunas ($P < 0,05$).

Os dados de retilinearidade também apresentaram interação ($P < 0,05$) entre touro e tratamento (Figura 9). Não houve efeito ($P > 0,05$) de tratamento para os touros 2175, 3202, 3101, 3110, 3138, 3141, 3118. Entretanto, o touro 3204 apresentou diferença ($P < 0,05$) entre controle e R3. O touro 2175, novamente, obteve melhores resultados, sendo superior ($P < 0,05$) aos animais 3101, 3118, 3138, 3202 no grupo controle. Este mesmo touro também foi superior ($P < 0,05$) aos touros 3101 e 3202 para o grupo R2 e melhor ($P < 0,05$) que os animais 3204 e 3101 para tratamento R3. O touro 3141 também retratou bons resultados sendo superior ($P < 0,05$) a 3202 para R0 e 3204 para R3. No tratamento R3, o animal 3204 apresentou menores resultados e foi inferior ($p < 0,05$) aos touros 3110, 2175, 3138, 3202 e 3141. No tratamento R1 não houve diferença ($p > 0,05$) entre os touros.

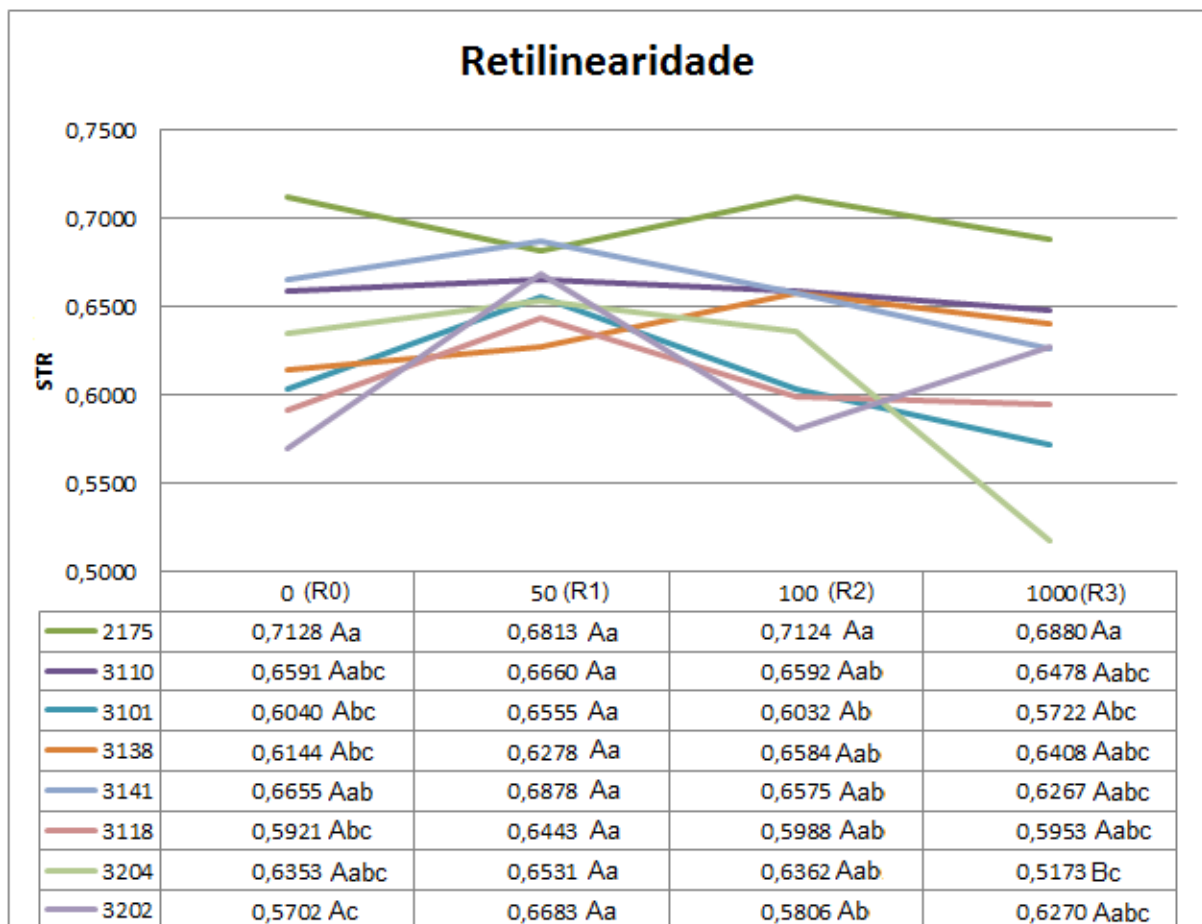


Figura 9. Médias de retinerialidade (STR) avaliada por sistema computadorizado (CASA) para os touros 2175, 3110, 3138, 3141, 3101, 3118, 3204, 3202 e os R0, R1, R2, R3. Os resultados são apresentados como média. a,b. Letras minúsculas diferentes indicam diferenças entre linhas. A, B. Letras maiúsculas diferentes indicam diferenças entre colunas ($P < 0,05$).

O BCF é o batimento flagelar, e, por isso, tem relação direta com a velocidade espermática (VERSTEGEN et al., 2002). Para este parâmetro, também houve interação ($P < 0,05$) entre touro e tratamento e os dados são apresentados na Figura 10. Os touros 2175, 3110, 3138, 3118, 3141, 3101 não apresentaram diferenças ($P > 0,05$) entre os grupos. No controle, o touro 2175 obteve melhor ($P < 0,05$) resultado do que todos os outros, exceto 3110 e 3141. Já no tratamento R1, o 2175 foi superior ($P < 0,05$) apenas ao animal 3202. Além disso, no grupo R2 o touro 3138 também diferiu ($P < 0,05$) do 3202, sendo as médias de BCF dos outros animais semelhantes ($P > 0,05$) entre si. Não houve contraste ($P > 0,05$) entre médias dos touros no grupo R1. Entretanto, no tratamento R3, o touro 3204 mostrou menor ($P < 0,05$) BCF do que o 2175 e 3110 e o touro 3101 também foi diferente ($P < 0,05$) do 2175.

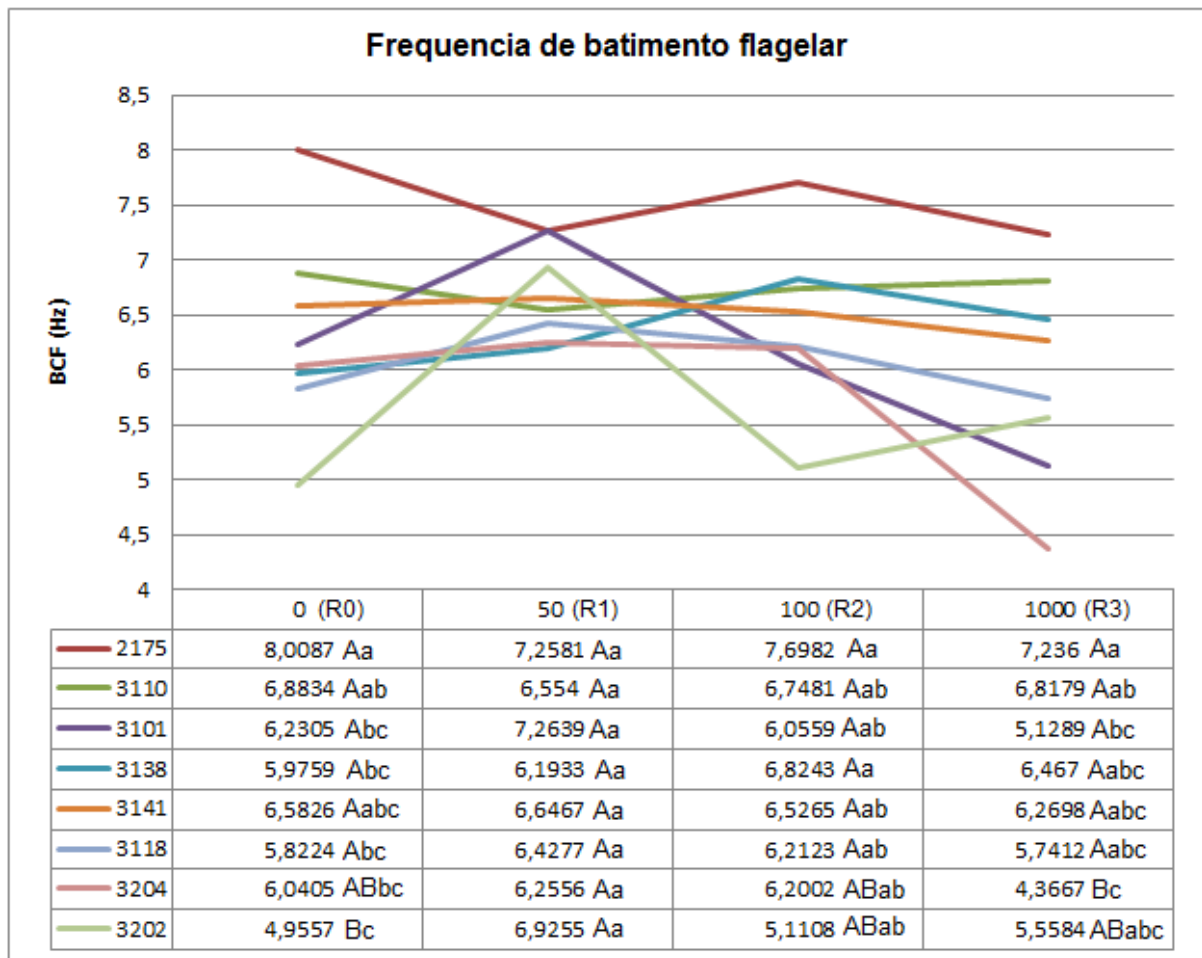


Figura 10. Médias de frequência de batimento flagelar (BCF) (Hz) avaliada por sistema computadorizado (CASA) para os touros 2175, 3110, 3138, 3141, 3101, 3118, 3204, 3202 e os grupos R0, R1, R2, R3. Os resultados são apresentados como média. a,b. Letras minúsculas diferentes indicam diferenças entre linhas. A, B. Letras maiúsculas diferentes indicam diferenças entre colunas ($P < 0,05$).

Em uma análise conjunta dos dados verificamos que o tratamento R1 foi o nosso tratamento mais promissor. O R1 apresentou resultados melhores que o controle (R0) para os parâmetros de motilidade progressiva e velocidade média. Além disso, os resultados de VCL, BCF, LIN e STR, dentro tratamento R1, diferente do controle e outros tratamentos, não foram diferentes entre os oito touros, indicando uma melhora nos resultados destes parâmetros. O R1 também possui a vantagem de ser a concentração mais baixa, podendo trazer menor toxicidade e sendo economicamente mais viável. Devido a estes vários fatores, o tratamento R1 (50 μ M) foi escolhido para as análises seguintes sendo comparado com o controle.

6.4. Avaliação do efeito do resveratrol (50µm) sobre integridade de membrana plasmática, acrossomal e função mitocondrial

Para dados de função mitocondrial e integridade de membrana e acrossoma não houve interação de touro e tratamento. De acordo com a Tabela 9, verifica-se que não houve diferença entre controle e tratamento R1 para potencial de membrana mitocondrial. Já para integridade de membrana plasmática e acrossoma, podemos observar uma diferença entre o grupo tratado com resveratrol e seu respectivo controle, na qual R1 apresenta um maior ($P < 0,05$) número de células com membrana plasmática e acrossoma intacto em relação ao grupo controle (Tabela 10). Quanto à membrana intacta ou lesada e acrossoma lesado, não houve diferença entre os grupos.

Tabela 9. Médias da porcentagem de espermatozoides bovinos que apresentavam baixo potencial de membrana mitocondrial (BPM) e alto potencial de membrana mitocondrial (APM) após o descongelamento para os grupos R0 (sêmen diluído em meio TRIS-gema-glicerol sem resveratrol) e R1 (sêmen diluído em meio TRIS-gema-glicerol acrescido de 50µM de resveratrol).

Tratamento	N	APM (%)	BPM (%)
R0	19	37,35±2,21	62,65±2,21
R1	24	33,12±2,09	66,88±2,09

Não houve diferença significativa ($P > 0,05$; ANOVA). Os resultados são apresentados como média±erro-padrão da média. N=número de leituras

Tabela 10. Médias da porcentagem de espermatozoides bovinos que apresentavam membrana plasmática e acrossoma intacto (MIAI), membrana plasmática intacta com acrossoma lesado (MIAL), membrana plasmática lesada e acrossoma intacto (MLAI), Membrana plasmática e acrossoma lesados (MLAL) após o descongelamento.

TTO	N	MLAL (%)	MIAL (%)	MLAI (%)	MIAI (%)
R0	19	31,20±2,90	10,43±2,44	12,4656±1,78	45,90±2,54 ^b
R1	24	25,33±2,74	10,43±2,30	9,5275±1,67	54,71±2,39 ^a

a, b : letras diferentes indicam diferenças entre linhas ($P < 0,05$). Os resultados são apresentados como média±erro-padrão da média. N=número de leituras/TTO=tratamento

Analisando separadamente a integridade de membrana, observamos que houve diferença entre os grupos, sendo que o tratamento com resveratrol mostrou uma menor ($P < 0,05$) porcentagem de células lesadas ($34,8 \pm 3,6\%$) quando comparado com o controle ($43,6 \pm 3,8\%$; Figura 11A). Não houve diferença entre R0 ($41,6 \pm 2,2\%$) e R1 ($35,7 \pm 2,0\%$) para porcentagem de células com acrossoma lesado (Figura 11B), apesar da tendência ($P = 0,0626$) de menor proporção para R1. Assim, observa-se que o antioxidante foi eficiente promovendo uma proteção das células espermáticas durante a criopreservação e não alterou o número de espermatozoides com acrossoma reagido.

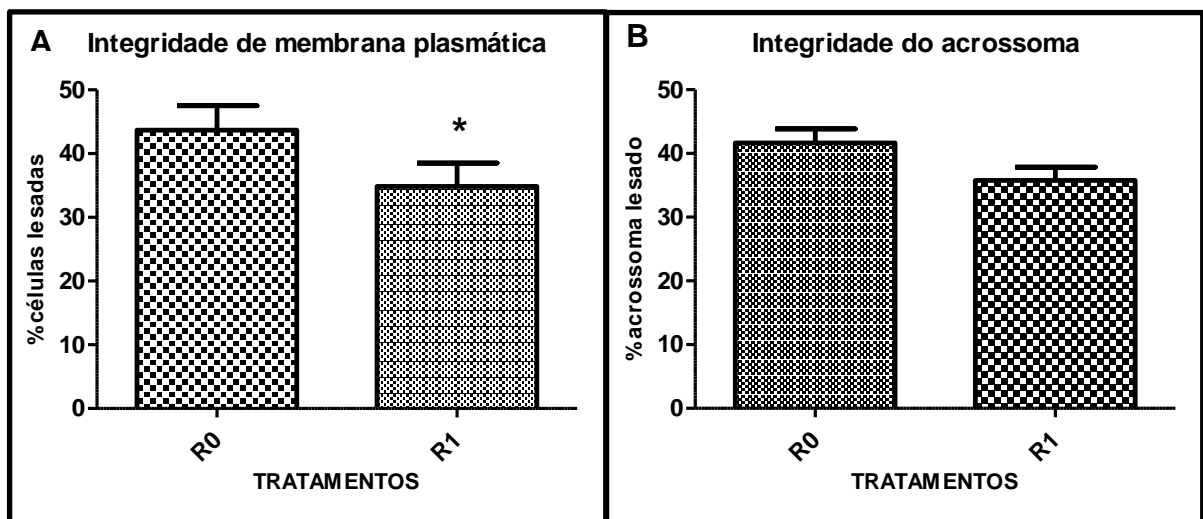


Figura 11. A) Quantidade de espermatozoides com membrana plasmática lesada para os grupos R0 e R1. Os resultados são apresentados como média±erro-padrão da média. Asterisco (*) indica diferença entre colunas ($P < 0,05$). **B)** Quantidade de espermatozoides com acrossoma lesado para os grupos R0 e R1. Os resultados são apresentados como média±erro-padrão da média ($P < 0,05$). Não houve diferença significativa ($P > 0,05$).

6.5. Avaliação do efeito do resveratrol sobre a fertilidade do sêmen através da produção *in vitro* de embriões

Para avaliar o efeito da concentração de $50\mu\text{M}$ de resveratrol sobre a fertilidade do sêmen na PIVE, foram escolhidos quatro touros diferentes baseados na motilidade pós-descongelamento encontrada na tabela 1. Os touros 2175 e 3110 foram selecionados por apresentarem as maiores motilidades, o touro 3138 por apresentar motilidade intermediária e o touro 3202 por exibir a menor motilidade

pós-descongelamento. Foi avaliada a taxa de clivagem dos embriões no dia 3 (D3) (72 horas pós-fertilização) e número de blastocistos nos dias 7 (D7) e 8 (D8). Os touros selecionados foram 2175, 3110, 3138 e 3202.

De acordo com a Tabela 12, não houve diferença ($P>0,05$) nas taxas de clivagem e de blastocisto no D7 entre os touros. Entretanto, para a taxa de blastocisto de D8, o touro 3202 apresentou melhor ($P<0,05$) resultado do que o touro 3110 e não foi diferente ($P>0,05$) dos demais. Os touros 2175, 3110, 3138 também foram semelhantes ($P>0,05$) entre si (Tabela 13).

Tabela 11. Médias das taxas de embriões clivados (D3) e taxas de blastocistos (D7 e D8) na fertilização *in vitro* para os touros 2175, 3110, 3138 e 3202.

TOURO	N OÓCITOS	CLIVAGEM (%)	BLASTOCISTO	BLASTOCISTO
			D7 (%)	D8 (%)
2175	343	72,50±2,57	31,45±3,67	32,50±4,31 ^{ab}
3110	351	63,91±11,74	23,01±2,73	22,27±2,94 ^b
3138	309	63,84±6,53	23,87±3,59	25,35±4,42 ^{ab}
3202	314	79,11±3,00	34,15±2,14	37,51±1,54 ^a
MÉDIA±EPM	329,25±10,42	69,91±0,02	28,19±0,02	29,44±0,02

Letras diferentes (a,b,c,d) indicam diferenças entre os touros. Os resultados são apresentados como média±erro-padrão da média ($P<0,05$). Oito repetições por touro.

Os resultados de comparação entre os tratamentos R0 e R1 está apresentado na Tabela 14. Não foi observada diferença entre o controle e tratamento com concentração de 50µM de resveratrol para taxas de clivagem (D3) e de blastocisto (D7) e (D8).

Tabela 12. Médias das taxas de embriões clivados (D3) e taxas de blastocistos (D7 e D8) na fertilização *in vitro* para os grupos R0 e R1.

TTO	N OÓCITOS	CLIVAGEM D3	BLASTOCISTO	BLASTOCISTO
		(%)	D7 (%)	D8 (%)
R0	668	67,86±3,40	27,57±2,51	27,91±2,85
R1	649	71,82±3,40	28,66±2,51	30,90±2,85

Os resultados são apresentados como média±erro-padrão da média. Não houve diferença significativa ($P>0,05$). Dezesesseis repetições por tratamento.

7. DISCUSSÃO

O estresse oxidativo ocorrido durante a criopreservação resulta da diminuição da motilidade e vigor, fragmentação do DNA e lesões de membrana plasmática e acrossomal, causando alterações irreversíveis na funcionalidade da célula espermática e levando à queda da fertilidade da amostra seminal (BUCAK et al., 2014; HAMMERSTED, 1993). Por isso, no presente estudo, concentrações diferentes de resveratrol foram testadas no diluente de congelamento com objetivo de minimizar os danos causados pelo estresse oxidativo. Vários testes laboratoriais foram realizados para avaliação do sêmen pós-descongelamento no intuito de determinar se o antioxidante tem algum efeito sobre a qualidade de parâmetros espermáticos e/ou fertilidade da amostra seminal.

O movimento espermático representa uma das principais características associadas ao potencial de fertilização do sêmen, reportando-se uma clara associação entre a ausência de movimento e os quadros de infertilidade (OLDS-CLARKE, 1996). A habilidade do espermatozoide para migrar através do trato reprodutivo da fêmea e penetrar no oócito depende das propriedades cinemáticas dessas células (COX et al., 2006). Usualmente, a motilidade e vigor espermático são estimados de forma subjetiva, por meio da avaliação visual das células sob microscopia óptica convencional, representando a principal análise laboratorial utilizada pelas centrais de coleta e congelamento de sêmen (ARRUDA et al., 2004; CRESPILO et al., 2006).

No presente trabalho, a análise visual de motilidade revelou que o grupo R1 obteve média superior ao grupo R3 ($P < 0,05$), e os mesmos não foram diferentes ($P > 0,05$) de R0 e R2. Através destes resultados, observamos que nenhum dos tratamentos foi eficiente ao evitar a perda de motilidade ocorrida durante a criopreservação. No entanto, o tratamento R1 além de apresentar maior resultado que o R3, mostrou uma tendência ($P = 0,0630$) de maior motilidade que o grupo controle (R0). Como a análise visual é subjetiva e possui baixa sensibilidade, a detecção de diferenças no padrão de movimento espermático é limitada, por isso foi utilizado o sistema computadorizado (CASA) para confirmação destes resultados.

O sistema CASA é um método objetivo que gera informações importantes a respeito das propriedades cinéticas de um ejaculado baseando-se na avaliação

individual das células (FERREIRA et al., 1997; JANUSKAUSKA E ZILINSKAS, 2002). Na análise por CASA para parâmetro de motilidade total, não foi observada diferença entre os quatro grupos. Contudo, para a motilidade progressiva o tratamento R1 obteve média superior ao R0 e R3 e semelhante ao R2. O tratamento R2, por sua vez, não foi diferente do R0 e R3.

A motilidade progressiva é a porcentagem de espermatozoides que estão se movendo ativamente para frente, ou seja, aqueles que possuem a capacidade de migrar através do trato reprodutivo feminino e alcançar o oócito. Assim, existe alta correlação da motilidade progressiva e fertilidade do sêmen *in vivo* (VERBERCKMOES et al., 2002). Os resultados obtidos neste trabalho mostraram que o tratamento R1 foi capaz de proteger as células espermáticas diminuindo a inevitável perda na motilidade progressiva que ocorre durante o processo de criopreservação, podendo contribuir para uma maior fertilidade do sêmen congelado.

Poucos estudos foram realizados com resveratrol como antioxidante no diluente para criopreservação de sêmen. Os trabalhos que existem até o presente momento foram desenvolvidos em espécies de mamíferos diferentes e utilizando diversas concentrações do antioxidante (BUCAK et al., 2014; GARCEZ et al., 2010; SILVA et al., 2012). Garcez et al. (2010) obtiveram resultados diferentes do encontrado no nosso trabalho, já que os autores observaram um efeito negativo do resveratrol sobre a motilidade espermática. No estudo, através de análise microscópica, foi observada uma menor motilidade espermática pós-descongelamento em espermatozoides humanos criopreservados com 100, 1000 e 10.000 μM de resveratrol em relação ao controle (sem antioxidante) e a queda de motilidade não foi dose-dependente (GARCEZ et al., 2010). Entretanto, no nosso trabalho, os tratamentos 100 e 1000 μM do antioxidante não apresentaram médias de motilidade por análise por microscopia diferentes do controle.

Silva et al. (2012) e Bucak et al. (2014) mostraram dados semelhantes ao encontrado no presente estudo. Silva et al. (2012) não observaram no congelamento de sêmen caprino, nenhuma diferença dos tratamentos de 5, 10, 15, 20 e 25 $\mu\text{g/mL}$ (25, 50, 100, 125, 150 μM , respectivamente) de resveratrol em relação ao controle para dados de motilidade total avaliado por microscopia. Já Bucak et al. (2014) trabalhando com bovinos, apesar de não terem observado diferença entre tratamento e controle para motilidade progressiva através de análise para o CASA,

verificaram uma maior motilidade total em relação ao controle na concentração de 1000 μM . Entretanto, no nosso trabalho, o tratamento 1000 μM do antioxidante não obtiveram médias de motilidade total e progressiva diferentes do controle.

Bucak et al. (2014) é o único trabalho com resveratrol realizado em bovinos. Estes autores, entretanto, em contraste com o nosso trabalho Bucak et al. (2014) utilizam apenas 3 touros da raça Holandesa de apenas uma dose de resveratrol no experimento, limitando o trabalho e podendo gerar uma resposta dose-dependente. Utilizamos no nosso trabalho oito animais e 3 doses de resveratrol levando a um estudo mais minucioso do efeito do antioxidante na criopreservação. Além disso, no nosso trabalho realizamos a fecundação *in vitro* realizando uma avaliação funcional da célula espermática criopreservada com resveratrol.

Além da motilidade, CASA analisa outros parâmetros cinéticos do sêmen (FERREIRA et al., 1997, JANUSKAUSKA e ZILINSKAS, 2002). As variáveis geradas pela técnica e citadas como de maior importância na análise de fertilidade do sêmen são: velocidade média de percurso (VAP), velocidade linear (VSL), velocidade curvilínea (VCL), amplitude de deslocamento lateral da cabeça (ALH), índice de linearidade (LIN), índice de retilinearidade (STR) e frequência de batimento flagelar (BCF), são comumente analisados (ZHANG et al., 1999; RODRIGUEZ-MARTINEZ, 2005, FARREL et al., 1998).

Os valores de VAP, VSL e VCL já foram correlacionados com a fertilidade do sêmen *in vivo* e *in vitro* (CHAN, 1990; MARSHBURN et al, 1992; HOLT et al., 1997). Para a velocidade curvilínea do espermatozoide (VCL), não houve diferença entre os grupos R0, R1 e R2, sendo estes superiores ao tratamento de maior concentração, o R3. Entretanto, na velocidade média (VAP), a concentração de 50 μM (R1) obteve melhor resultado que o controle (R0) e os dois outros tratamentos (R2 e R3). Para dados de VSL não há diferença entre os grupos, analisando os dados separadamente para cada animal, exceto para 3204, que houve diferença entre R1 e R3. No entanto, quando observamos os resultados, percebermos que há diferenças de valores de VSL entre os touros dentro dos grupos R0, R2 e R3, mas no R1 os animais apresentam resultados semelhantes entre si. Isso mostra que para o tratamento R1 há uma elevação do valor de VSL igualando as médias entre os animais. Assim, na concentração de 50 μM , as discrepâncias existentes entre os touros reduzem.

Para se obter mais informações sobre o padrão do movimento espermático, foi feita a relação entre as velocidades. Dados de linearidade ($LIN=VSL/VCL$) e retilinearidade ($STR=VSL/VAP$) foram calculados. Para os resultados de LIN e STR, acontece um fenômeno parecido com aquele observado para VSL, no qual não há diferença entre os grupos para cada animal, mas há diferenças entre os touros nos grupos R0, R2 e R3. Entretanto, em R1 tais diferenças são reduzidas. Os resultados de CASA mostram que o resveratrol na concentração de 50 μM levou a um ganho específico do movimento progressivo dos espermatozoides, já que não apresentou um aumento de motilidade total e velocidade real, mas teve maior motilidade progressiva e dados de VAP e VSL. Na análise por microscopia visual para os dados de vigor, não foi observada diferenças entre os grupos, apesar de haver uma tendência ($P=0,068$) de maior motilidade para R1 do que para o controle R0, mostrando que a análise visual é menos sensível do que a apresentada em CASA

Os resultados apresentados pelos parâmetros de CASA e motilidade demonstram diferenças entre os animais quanto à qualidade do sêmen pós-descongelamento. Resumidamente, os touros 3110 e 2175 apresentaram os melhores resultados, enquanto os touros 3101, 3138 e 3141 obtiveram resultados intermediários e os animais 3118, 3202, 3204 mostraram os mais baixos. Sabe-se que estas variações podem ocorrer por causa das diferenças de sensibilidade ao congelamento (congelabilidade) que existem entre animais (HAFEZ, 2004). O processo de criopreservação gera uma perda de 50 a 60% na motilidade, sendo por isso a observação dos padrões de movimento espermático um importante marcador da eficiência da criopreservação (FISER, 1982; CRISTANELLI, 1985; ARRUDA, 2000; NAGY, 2004). Assim, neste estudo calculamos a taxa de queda de motilidade para verificar a eficiência do processo de congelamento.

Como resultado, não verificamos diferença significativa ($P>0,05$) para taxa de queda de motilidade entre os touros, mostrando que o processo de congelamento foi eficiente de forma equivalente para todos os animais e dentro do esperado com média de taxa de queda de motilidade de 46,98%. Desta forma, as discrepâncias encontradas entre os animais não estavam relacionadas com diferenças de sensibilidade ao congelamento.

Segundo Salvador et al. (2008) a qualidade da amostra inicial do sêmen antes da congelamento é importante para melhores resultados pós-descongelamento.

Então, verificando os dados de motilidade de sêmen fresco e pós-descongelamento, observamos que os touros que obtiveram melhor taxa de motilidade pós-descongelamento foram os mesmos que possuíam maiores médias de motilidade no sêmen fresco e os que obtiveram as piores médias foram aqueles que possuíam a pior motilidade inicial. Assim, não observamos diferença de sensibilidade ao congelamento entre os touros, mas sim entre a qualidade da amostra inicial.

Além disso, verificamos também que os touros que apresentam melhores resultados pós-descongelamento sofrem pouco ou nenhum efeito do tratamento pelo resveratrol. Isso pode ter ocorrido, já que as fontes de ERO's no sêmen são o metabolismo oxidativo de espermatozoides vivos, células do sistema imune e principalmente células mortas que tiveram seu conteúdo exposto (AITKEN et al., 1995). Desta forma, quanto maior a quantidade de células mortas (ou menor motilidade) na sua amostra inicial maior a produção de espécies reativas de oxigênio e maior a necessidade de um antioxidante na proteção das células espermáticas.

A alta atividade mitocondrial pode estar relacionada com o movimento progressivo retilíneo do espermatozoide (DONNELLY et al., 2000). Entretanto, apesar do tratamento R1 apresentar maior motilidade progressiva e também um melhor BCF, não houve diferença significativa para o potencial mitocondrial entre R1 e o controle. Essa diferença pode não ter sido visualizada, uma vez que o método de análise por microscopia de epifluorescência é limitado pelo número menor de células avaliadas, sendo difícil de detectar diferenças muito sutis. Assim, o ideal seria realizar uma técnica de maior sensibilidade como a citometria de fluxo, no qual um número muito maior de células fosse contado para confirmar estes resultados.

Nos dados de integridade de membrana plasmática e acrossoma, observamos maior número de espermatozoides com membrana plasmática e acrossoma intacto no grupo tratado com resveratrol em relação ao controle. Além disso, quando analisamos os dados separadamente, observamos que houve diferença entre os grupos para integridade de membrana, sendo que o grupo tratado mostrou uma menor porcentagem de células lesadas quando comparado com o controle. Além disso, apesar de não haver diferença entre os grupos R0 e R1 para porcentagem de células com acrossoma lesado, há uma tendência de menor número de acrossoma lesado no R1 ($p=0,0626$). Assim, observa-se que o antioxidante foi eficiente promovendo uma proteção das células espermáticas durante a criopreservação.

A membrana plasmática do espermatozoide, por ser composta por ácidos graxos poliinsaturados, são altamente vulneráveis à atuação de agentes oxidantes, torna-se extremamente sensível à peroxidação lipídica. (BILODEU et al., 2002). Devido ao caráter lipofílico do resveratrol, este possui ação eficiente contra a peroxidação lipídica (GREENBERG et al., 2008; WEST e MARNETT, 2006). Neste trabalho, verificamos que o resveratrol na concentração de 50 μ M foi eficiente na proteção de membranas. Essa ação de proteção de membranas também pode estar relacionada com uma maior motilidade pos-descongelamento do R1, já que o efeito da oxidação sobre a membrana e DNA mitocondrial e sobre a arquitetura da membrana plasmática pode ser considerado um fator importante na redução da motilidade espermática do sêmen criopreservado (CUMMINS et al., 1994).

Graham (2001) obteve correlações próximas a 80% quando comparou diversas análises espermáticas (motilidade total, integridade de membrana plasmática e de membrana acrossomal) com os índices de fertilidade gerados por essas amostras. Entretanto, apesar de várias técnicas laboratoriais serem utilizadas no intuito de prever a capacidade fertilizante de uma amostra seminal (SOUSA et al., 2013), apenas testes de inseminação artificial (IA) ou fertilização *in vitro* (FIV) podem de fato confirmar a capacidade fecundante do espermatozoide (CRESPILHO et al., 2009). Por isso, avaliamos o efeito do resveratrol na fertilidade do sêmen através da produção *in vitro* de embriões. Os resultados não mostraram diferença entre o controle e tratamento com concentração de 50 μ M de resveratrol para taxas de clivagem (D3) e de blastocisto (D7) e (D8).

Através dos dados obtidos por fertilização *in vitro*, observamos que não houve influência do tratamento com resveratrol sobre a fertilidade do sêmen. Apesar dos efeitos positivos no resveratrol nos parâmetros espermáticos, não foi observado um efeito positivo sobre a produção *in vitro*. Isso pode ocorrer porque, quando são utilizadas técnicas de reprodução *in vitro*, a população espermática a ser utilizada é potencializada por métodos de seleção (PARRISH, KROGENAES e SUSKO-PARRISH, 1995). Esses métodos possibilitam a remoção do diluente de congelamento, agentes infecciosos espermatozoides mortos, imóveis ou com alterações na membrana plasmática, selecionando uma população de espermatozoides com maior motilidade (GRAHAM, 1996). Através da seleção espermática, as discrepâncias entre controle e tratamento podem ser eliminadas.

Por outro lado, a avaliação da fecundação *in vitro* mostra que o tratamento dos espermatozoides com 50 μM não prejudicou a capacidade fecundante do sêmen. Sabe-se que o resveratrol possui efeitos tóxicos que podem prejudicar a viabilidade celular (SHAMIM et al., 2012) e, por isso, é importante mostrar que as concentrações que melhoram os parâmetros espermáticos não interferem na fecundação.

O resveratrol é uma molécula que possui grande diversidade de efeitos biológicos, sendo que sua ação efetiva depende de fatores como dose, tempo de exposição, tipo celular e estado metabólico da célula afetada (PACHOLEC et al., 2010). Autores observaram que o antioxidante tem capacidade de induzir apoptose em alguns sistemas enquanto inibe sinais de morte celular em outros. Isso pode explicar, por exemplo, o fato de que a menor concentração utilizada no trabalho foi a que apresentou melhor resultados, enquanto a maior dose apresentou menores resultados, indicando uma possível toxicidade. Desta forma, as doses e tempo de exposição do antioxidante devem ser bem estudados e estarem de acordo com o objetivo do trabalho, para que se tenha um efeito positivo sem haver toxicidade (HARIKUMAR e AGGARWALL, 2008).

No presente trabalho, o resveratrol se mostrou eficiente numa baixa concentração. Melhores resultados com baixas concentrações colaboram não só na economia de princípio ativo, mas também para um menor risco de toxicidade e necessidade de solventes. O resveratrol possui baixa solubilidade e estabilidade em água, o que dificulta sua aplicação em sistemas biológicos, limitando a concentração a ser utilizada. O antioxidante é altamente solúvel em compostos orgânicos, que são substâncias normalmente tóxicas as células e devem ser utilizadas em baixas porcentagens. Assim, possuindo ação em uma baixa concentração menos solvente será necessário para sua aplicação.

O resveratrol a partir dos resultados apresentados mostrou significativo benefício às células espermáticas. No presente trabalho, o antioxidante foi capaz de proteger os espermatozoides contra perda de motilidade, aumentando sua viabilidade e também diminuindo danos as membranas espermáticas. Entretanto, é importante destacarmos que, apesar do estresse oxidativo causar danos expressivos no espermatozoide, ainda há outros fatores como as mudanças de temperatura durante o processo biotecnológico, o estresse osmótico e tóxico

representado pela exposição aos crioprotetores e a formação e dissolução de cristais de gelo extracelulares que interferem no sucesso da técnica (RASUL et al., 2001, WATSON, 2000). Assim, apesar dos efeitos positivos do resveratrol, muitos estudos ainda deverão ser realizados para melhorar a criopreservação do sêmen bovino.

8. CONCLUSÃO

Como resultado, o antioxidante na concentração de 50 μM no diluente de congelamento melhorou alguns parâmetros espermáticos após o descongelamento, diminuindo a perda de motilidade e garantindo um maior número de células com membrana plasmática íntegra. Além disso, o tratamento R1 obteve uma quantidade maior de células espermáticas com movimento progressivo retilíneo, o que está diretamente relacionado com a eficiência de migração do espermatozoide. Os efeitos benéficos são mais evidentes em sêmen que apresenta menor qualidade antes do congelamento. Como a habilidade do espermatozoide para migrar através do trato reprodutivo da fêmea depende das suas propriedades cinemáticas, acreditamos que o sêmen congelado com resveratrol pode obter resultados em melhores taxas de inseminação artificial. Além disso, seu efeito protetor em relação à membrana plasmática pode ser de grande eficiência quando aplicado em sêmen sexado, que normalmente sofre maior estresse no seu processamento. Para isso, estudos futuros ainda são necessários.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AITKEN, R.J. 1997. Molecular mechanisms regulating human sperm function, **Molecular Human Reproduction**, **3**(3):169-173,

AITKEN, R.J.; BUCKINGHAM, D.W.; BRINDLE, J. 1995. Analysis of sperm movement in relation to the oxidative stress created by leukocytes in washed sperm preparations and seminal plasma, **Human Reproduction**, **10** (8): 2061-2071.

AITKEN, R.J.; HARKISS, D.; BUCKINGHAM, D. 1993. Relationship between iron-catalysed lipid peroxidation potential and human sperm function. **Journal Reproduction Fertil**, **98**: 257-65.

ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. 2010. **Biologia Molecular da Célula**. 5ª Edição. Editora Artmed.

AMANN, R. P.; PICKET, B. W. 1987. Principles of cryopreservation and a review of cryopreservation of stallion spermatozoa. **Equine Veterinary Science**, **7**: 145-173.

AMBROSINI, G.; ANDRISANI, A.; PORCU, E.; REBELLATO, E.; REVELLI, A.; CASERTA, D.; COSMI, E.; MARCI, R.; MOSCARINI, M. 2006. Oocytes cryopreservation: State of art. **Reproductive Toxicology**, **22** (2): 250-262.

ARMSTRONG, J.S; RAJASEKARAN, M.; CHAMULITRAT, W.; GATTI, P.; HELLSTROM, W.J.; SIKKA, S.C. 1999. Characterization of reactive oxygen species induced effects on human spermatozoa movement and energy metabolism. **Free Radical Biology Medicine**, **26**: 869-880.

ARRUDA, R.P. Avaliação dos efeitos de diluidores e crioprotetores para o espermatozoide equino pelo uso de microscopia de epifluorescência, citometria de fluxo, análises computadorizadas da motilidade (CASA) e morfometria (ASMA). **Tese de Livre Docência**, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, São Paulo, 2000, 121 p.

ARRUDA, R.P.; CELEGHINI, E.C.C. Validação de uma técnica para avaliação simultânea das membranas plasmática, acrossomal e mitocondrial de espermatozoides bovinos. 2003. **Acta Scientiae Veterinariae**, **31**: 230-231.

ARRUDA, R.P.; CELEGHINI, E.C.C.; ANDRADE, A.F.C.; GARCIA, A.R.; NASCIMENTO, J.; RAPHAEL, C.F.; SOUZA, L.W.O. Importância da qualidade do

sêmen em programas de IATF e TETF. In: **Simpósio Internacional de Reprodução Animal Aplicada 1**. Londrina, PR. 2004. São Paulo: Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia Universidade de São Paulo, 2004. p. 166-179.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL. **INDEX ASBIA – Mercado de sêmen 2014**. Uberaba, 2014. Disponível em: <http://www.asbia.org.br/novo/relatorios/>. Acesso em: 30/03/2016.

BAUMBER, J.; SABEUR, K.; BALL, B.A. 2002. Generation of reactive oxygen species by equine neutrophils and their effect on motility of equine spermatozoa. **Theriogenology**, **57**: 1025-1033.

BEORLEGUI, N.; CETICA, P.; TRINCHERO, G.; CÓRDOBA, M.; BECONI, M. 1997. Comparative study of functional and biochemical parameters in frozen bovine sperm. **Andrologia**, **29**: 37-42.

BILODEAU, J.F.; BLANCHETTE, S.; CORMIER, N. S. 2002. Reactive oxygen species-mediated loss of bovine sperm motility in egg yolk Tris extender: protection by pyruvate, metal chelators and bovine liver or oviductal fluid catalase. **Theriogenology**, **57 (3)**:1105-1122.

BLOCH, D. P. A. 1969. Catalog of sperm histones, **Genetics**, **61**: 93-111.

BORGES, J.C.; SILVA, M.R.; GUIMARÃES, J.D.; ESPER, C.R.; FRANCESCHINI, P.H. 2011. Membrana plasmática de espermatozoides bovinos: efeito de metabólitos do oxigênio, antioxidantes e criopreservação. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**. **35(3)**: 303-314.

BRANCO, C.S.; GARCEZ, M.E.; PASQUALOTTO, F.F; ERDTMAN, B.; SALVADOR, M. 2010. Resveratrol and ascorbic acid prevent DNA damage induced by cryopreservation in human semen. **Cryobiology**, **60**: 235–237.

BUCAK, M.N.; ATAMAN, M.B.; BASPINAR, N.; UYSAL, O.; TASPINAR, M.; BILGILI, A.; ÖZTÜRK, C.; GÜNGÖR, S.; INAÇ, M.E.; AKAL, E. 2014. Lycopene and resveratrol improve post-thaw bull sperm parameters: sperm motility, mitochondrial activity and DNA integrity. **Andrologia**, 1–8.

BURNS, J.; YOKOTA, T.; ASHIHARA, H.; LEAN, M.E.; CROZIER, A. 2002. Plant foods and herbal sources of resveratrol, **Journal Agricultural and Food Chemistry**, **50 (11)**: 3337-40.

CAO, Z.; LI, Y. 2004. Potent induction of cellular antioxidants and phase 2 enzymes by resveratrol in cardiomyocytes: protection against oxidative and electrophilic injury. **European Journal of Pharmacology**, **5**: 39-48.

CARVALHO, O.F.; FERREIRA, J.D.J.; SILVEIRA, N.A.; FRENEAU, G.E. 2002. Efeito oxidativo do óxido nítrico e infertilidade no macho. **Jornal Brasileiro Patologia e Medicina Laboratorial**, **38**: 33-38.

CASTELO, T.S.; FROTA, T.R.; SILVA, A.R. 2008. Considerações sobre a criopreservação do sêmen de caprinos. **Acta Veterinaria Brasilica**, **2**: 67-75.

CELEGHINI, E.C.C. Efeitos da criopreservação do semen bovino sobre as membranas plasmática, acrossomal e mitocondrial e estrutura da cromatina utilizando sondas fluorescentes. **Tese Doutorado**, Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2005.

CHAN, S.Y.; TSOI, W.L.; LEUNG, J. N.G.V., WANG, C. 1990. The accuracy of sperm concentration determination by the automated Cell Soft semen analyzer before and after discontinuous Percoll gradient centrifugation. **Andrologia**, **22**: 55-61.

CHENOWETH P.J. LORTON S.P. 2014. **Animal Andrology: Theories and Applications**. 1 ed. CAB International. USA. 584p.

COLÉGIO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL. **O Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal**. Belo Horizonte, 3.ed, 2013.

COSSON, J. A 1996. .Moving image of flagella: news and views on the mechanisms involved in axonemal beating. **Cell Biology International**, **20(2)**: 83-94.

COX, J.F.; ALFARO, V.; MONTENEGRO, V.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. 2006. Computer-assisted analysis of sperm motion in goats and its relationship with sperm migration in cervical mucus. **Theriogenology**, **66**: 860-867.

CRESPILHO, A.M.; LANDIM-ALVARENGA, F.C.; PAPA, F.O. 2006. Infertilidade associada a defeito microtubular dos espermatozoides de jumento (*Equus asinus*) avaliados por microscopia eletrônica de transmissão. **Ciência Rural**, **36**: 1507-1510.

CRESPILHO, A.M.; PAPA, F.O.; MARTINS JUNIOR, A.; DELL'AQUA, J.A. 2009. Evaluation of frozen bovine semen: How do semen collection and processing centers evaluate the quality of commercialized samples? **Veterinária e Zootecnia**, **16**: 335-342.

CRISTIANELLI, M.J.; AMANN, R.P.; SQUIRES, E.L.; PICKETT, B.W. 1985. Effects of egg yolk and glycerol levels in lactose-EDTA-egg yolk extender and of freezing rate on the motility of frozen-thawed stallion spermatozoa. **Theriogenology**, **24(6)**: 681-686.

CUMMINS, J.M.; JEQUIER, A.M.; KAN, R. 1994. Molecular biology of human male infertility: links with aging, mitochondrial genetics, and oxidative stress. **Molecular Reproduction and Development**, **37**: 345-362.

DELMAS, D.; JANNIN, B.; LATRUFFE, N. 2005. Resveratrol: Preventing properties against vascular alterations and ageing. **Molecular Nutrition and Food Research**, **49(5)**: 377-395.

DONNELLY, E.T.; O'CONNELL, M.; MCCLURE, N.; LEWIS, S.E. 2000. Differences in nuclear DNA fragmentation and mitochondrial integrity of semen and prepared human spermatozoa. **Human Reproduction**, **15**: 1552-1561.

EDDY, E.M.; O'BRIEN, D.A. The spermatozoon. In: KNOBIL, E.; NEIL, J.D. The physiology of reproduction. cap. 2, p. 29-77. New York: Raven Press. 1994.

FARREL, P.B.; PRESICCE, G.A.; BROCKETT, C.C.; FOOTE, R.H. 1998. Quantification of bull sperm characteristics measured by Computer-Assisted Sperm Analysis (CASA) and the relationship to fertility. **Theriogenology**, **49**: 871-879.

FERREIRA, A.L.A.; MATSUBARA, L.S. 1997. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Revista Associação Médica Brasileira**, **43**: 1-16.

FISER, P.S.; AINSWORTH, L.; FAIRFULL, R.W. 1982. Cryosurvival of ram spermatozoa in hypertonic and isotonic diluents. **Canadian Journal of Animal Science**, **62**: 425-428.

FLESCH, F.M.; GADELLA, B.M. 2000. Dynamics of the mammalian sperm membrane in the process of fertilization. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1469**: 197-235.

FOOTE, R. H., BROCKETT, C.C., KAPROTH, M.T. 2002. Motility and fertility of bull sperm in whole milk extender containing antioxidants. *Animal Reproduction Science*, **71**: 13-23.

FRANCO, J. S. V., CHAVEIRO, A.; SILVA, F.M. 2014. Effect of Freezing Rates and Supplementation of α -Tocopherol in the Freezing Extender in Equine Sperm Cryosurvival. *Journal of Equine Veterinary Science*. **34(8)**: 992–997.

FRENKEL, E.N.; WATERHOUSE, A.L.; TEISSEDE, P.L. 1995. Principal phenolic phytochemicals in selected California wines and their antioxidant activity in inhibiting oxidation of human low density lipoproteins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **43**: 890-4.

GARCEZ, M. E.; BRANCO, C. S.; LARA, L.V.; PASQUALOTTO, F.F.; SALVADOR, M. 2010. Effects of resveratrol supplementation on cryopreservation medium of human semen. *Fertility and Sterility*, **94(6)**: 2018-2021.

GRAHAM, J.K. Assessment of sperm quality. In: Annual Convention of the AAEP, 47, 2001, San Diego, CA. *Proceedings*. San Diego, CA: AAEP, 2001. p.302-305.

GRAHAM, J.K. 1996.. Cryopreservation of stallion spermatozoa. *Veterinary Clinics of North America: Equine Practice*, **12**:131-147.

GREENBERG, M.E.; SUN, M.; ZHANG, R.; FEBBRAIO, M.; SILVERSTEIN R, HAZEN, S.L. 2013. Oxidized phosphatidylserine-CD36 interactions play an essential role in macrophage-dependent phagocytosis of apoptotic cells. *Journal of Experimental Medicine*, **27**: 2613-25.

HAFEZ, E.S.E.; HAFEZ, B. *Reprodução Animal*. 7. ed. Barueri, SP: Manole, 2004. 513 p.

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

HAMMERSTEDT, R. H.; GRAHAM, J. K.; NOLAN, J. P. 1990. Cryopreservation of mammalian sperm: What we ask them to survive. **Journal of Andrology**, **11**: 73-88.

HARIKUMAR, K.B.; AGGARWALL, B.B. 2008. Resveratrol: A multitargeted agent for age-associated chronic diseases. **Cell Cycle**, **7(8)**:1020-1035.

HOLT, C.; HOLT, W.V.; MOORE, H.D.; REED, H.C.; CURNOCK, R.M. 1997. Objectively measured boar sperm motility parameters correlate with the outcomes of on-farm inseminations: results of two fertility trials. **Journal of Andrology**, **18(3)**: 312-23.

HOLT, W.V. 2000. Fundamental aspects of sperm cryobiology: The importance of species and individual differences. **Theriogenology**, **43**:47-58.

JANUSKAUSKAS, A.; ZILINSKAS H. 2002. Bull semen evaluation post-thaw and relation semen characteristics to bulls fertility. **Veterinaria e Zootecnia**, **39**: 1-8.

JUNG, H.J.; SEU, Y.B.; LEE, D.G. 2007. Candidicidal action of resveratrol isolated from grapes on human pathogenic yeast *C. albicans*. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, **17**:1324-1329.

KATHIRAVAN, P.; KALATHARAN, J.; EDWIN, M.J.; VEERAPANDIAN, C.. 2008. Computer automated motion analysis of crossbred bull spermatozoa and its relationship with *in vitro* fertility in zona-free hamster oocytes. **Animal Reproduction Science**, **104**:.9-17.

KENNEDY, J. H.; KORN, N.; THURSTON, R.J. 2003. Prostaglandin levels in seminal plasma and sperm extracts of the domestic turkey, and the effects of cyclooxygenase inhibitors on sperm mobility. **Reproductive Biology and Endocrinology**, **74(1)**:1-7.

KNOBIL, E., NEILL, J. D. **The Physiology of Reproduction**. 2^a Edv, p.29-79. Raven Press. New York, 1993.

KROON, P.A.; IYER, A.; CHUNDURI, P.; CHAN, V.; BROWN, L. 2010. The cardiovascular nutraceutical pharmacology of resveratrol: Pharmacokinetics, molecular mechanisms and therapeutic potential. **Current Medicinal Chemistry**, **17**: 2442–2455.

- KRZYZOSIAK, J.; EVENSON, D.; PITT, C.; JOST, L.; MOLAN, P.; VISHWANATH, R. 2000. Changes in susceptibility of bovine sperm to in situ DNA denaturation, during prolonged incubation at ambient temperature under conditions of exposure to reactive oxygen species and nuclease inhibitor. **Reproduction, Fertility and Development** , **12**: 251-261.
- LI, T.; WANG, W.; CHEN, H.; LI, T.; YE, L. 2010. Evaluation of anti-leukemia effect of resveratrol by modulating SIRT3 signaling. **International Immunopharmacology**., **10**: 18–25.
- LOVELOCK J.E.; BISHOP, M.W. 1959. Prevention of freezing damage to living cells by dimethyl sulphoxide. **Nature**, **183(4672)**: 1394-1395.
- MAIA, M.S. Viabilidade espermática e geração de metabólitos Reativos do Oxigênio (ROS) no semen ovino criopreservado em diluidor aditivado de Lauril Sulfato de Sódio (OEP), Trolox-C e Catalase, 2006. **Tese (doutorado)** – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Botucatu, 2006.
- MAIA, M.S.; BICUDO, S.D. 2009. Radicais livres, antioxidantes e função espermática em mamíferos: uma revisão. **Revista Brasileira Reprodução Animal**, Belo Horizonte, **33(4)**:183-193.
- MANACH, C.; SCALBERT, A.; MORAND, C.; RÉMÉSY, C.; JIMÉNEZ, L. 2004. Polyphenols: food sources and bioavailability **The American Journal of Clinical Nutrition**, **79**: 727– 747..
- MARSHBURN P.B.; MCINTIRE, D.; CARR, B.R.; BYRD, W. 1992. Spermatozoal characteristics from fresh and frozen donor semen and their correlation with fertility outcome after intrauterine insemination. **Fertility and Sterility**, **58(1)**, p.179-86.
- MARTÍN, A.R.; VILLEGAS, I.; SÁNCHEZ-HIDALGO, M.; LASTRA, C.A. 2006. The effects of resveratrol, a phytoalexin derived from red wines, on chronic inflammation induced in an experimentally induced colitis model. **Journal Pharmacology**, **147**: 873–885.
- MATOS, D.L.; ARAÚJO, A.A.; ROBERTO, I.G.; TONIOLLI, R. 2008. Análise computadorizada de espermatozoides: revisão de literatura, **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, **32(4)**: 225-232.
- MAXWELL, W.M.C.; STOJANOV, T. 1996. Liquid storage of ram semen in the absence or presence of some antioxidants. **Reproduction, Fertility and Development**, **8**:1013-1020

MCCALLEY, A.E.; KAJA, S.; PAYNE, A.J.; KOULEN, P. 2014. Resveratrol and Calcium Signaling: Molecular Mechanisms and Clinical Relevance. **Molecules**, **19**: 7327-7340.

MEAMAR, M.; ZRIBI, N.; CAMBI, M.; TAMBURRINO, L.; MARCHIANI, S.; FILIMBERTI, E.; GRAZIA, M.; BIGGERI, F.A.; MENEZO, Y.; FORTI, G.; BALDI, E.; MURATORI, M. Sperm DNA fragmentation induced by cryopreservation: new insights and effect of a natural extract from *Opuntia ficus indica*. **Fertility and Sterility**, **98(2)**: 326–333.

MISRO, M.M.; CHOUDHURY, L.; UPRETI, K.; GAUTAM, D.; CHAKI, S.P.; MAHAJAN, A.S.; BABBAR, R. 2004. Use of hydrogen peroxide to assess the sperm susceptibility to oxidative stress in subjects presenting a normal semen profile. **International Journal of Andrology**, **27**:82-87.

MIZUTANI, K.; IKEDA, K.; KAWAI, Y.; YAMORI, Y. 2001. Protective effect of resveratrol on oxidative damage in male and female stroke-prone spontaneously hypertensive rats. **Clinical and Experimental Pharmacology Physiology**. **28(2)**: 55-9.

MORTIMER, S.T. 1997. A critical review of the physiological importance and analysis of sperm movement in mammals. **Human Reproduction**, **3(5)**: 403-439.

MORTIMER, S.T. CASA-Practical aspects. **Journal of Andrology**, p.515-524, 2000.

NAGY, S.N.; HALLAP, T.; JOHANNISSON, A.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. 2004. Changes in plasma membrane and acrosome integrity of frozen-thawed bovine spermatozoa during a 4 h incubation as measured by multicolor flow cytometry, **Animal Reproduction Science**, **80**: 225-35.

NELSON, DAVID L, COX, MICHAEL MCUCHILLO, CLAUDI. Lehninger principios de bioquímica. Barcelona: Omega, 2009.

NEVES, A.R.; LUCIO, M.; LIMA, J.L.; REIS, S. 2012. Resveratrol in medicinal chemistry: A critical review of its pharmacokinetics, drug-delivery, and membrane interactions. **Current Medical Chemistry**, **19**: 1663–1681.

NEVES, M.A.; DINIS, T.C.; COLOMBO, G.; AS, E.M.M.L. 2007. Combining computational and biochemical studies for a rationale on the anti-aromatase activity of natural polyphenols. **Chemistry Medical Chemical**, **2**: 1750-1762.

NOBLANC, A.; DAMON-SOUBEYRAND, C.; KARRICH, B.; HENRY-BERGER, J.; CADET, R.; SAEZ, F.; GUITON, R.; JANNY, L.; PONS-REJRAJI, H.; ALVAREZ, J.G.; DREVET, J.R.; KOCER, A. 2013. DNA oxidative damage in mammalian spermatozoa: where and why is the male nucleus affected? **Free Radical Biology and Medicine**, **65(7)**: 19-23.

NORDBERG, J.; ÁRNER, E.S.J. 2001. Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. **Free Radical Biology and Medicine**, **31**:1287-1312.

OCHSENDORF, F. R. Infections in the male genital tract and reactive oxygen species. **Human Reproduction**, v. 5, p. 399-420, 1999.

OLAS, B.; WACHOWICZ, B. 2005. Resveratrol, a phenolic antioxidant with effects on blood platelet functions. **Platelets**, **16**: 251-260

OLDS-CLARKE, P. 1996. How does poor motility alter sperm fertilizing ability? **Journal of Andrology**, **17**: 183-186.

ÕURA, C.; TOSHIMORI, K. 1990. Ultrastructural studies on the fertilization of mammalian gametes. **International Review of Cytology**. **122**:105-151.

PACHOLEC, M.; BLEASDALE, J.E.; CHRUNYK, B.; CUNNINGHAM, D.; FLYNN, D.; GAROFALO R.S.; GRIFFITH, D.; GRIFFOR, M.; LOULAKIS, P.; PABST, B.; QIU, X.; STOCKMAN, B.; THANABAL, V.; VARGHESE, A.; WARD, J.; WITHKA, J.; AHN, K. 2010. SRT1720, SRT2183, SRT1460, and Resveratrol Are Not Direct Activators of SIRT1. **Journal Biological Chemistry**, **285**:8340-8351.

PARRISH, J.J.; KROGENAES, A.; SUSKO-PARRISH, J.L. 1995. Effect of bovine sperm separation by either Swim-up or Percoll method on success of *in vitro* fertilization and early embryonic development. **Theriogenology**, **44**: 859- 869.

POLGE, C.; SMITH, A.U.; PARKER, A.S. 1949. After vitrification and dehydration at low temperatures. **Nature**, **167**: 626.

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

RASUL, Z.; AHMAD, N.; ANZAR, M. 2001. Changes in motion characteristics, plasma membrane integrity and acrosome morphology during cryopreservation of buffalo spermatozoa, **Journal of Andrology**, **22(2)**: 278-83.

RICHARD, J.L. 1987. Coronary risk factors. The French paradox. **Archives des Maladies du Coeur et des Vaisseaux**, 80:17–21.

RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Methods for semen evaluation and their relationship to fertility. In: Congresso Brasileiro de Reprodução Animal, 16, 2005, Goiânia, GO. Anais: Palestra. Belo Horizonte, MG: CBRA, 2005. 8p.CD-ROM. 2005.

SALVADOR, D.F.; ANDRADE, V.J.; VALE FILHO, V.R.; DIAS, J.C.; NOGUEIRA, L.A.G. 2008. Relationship between andrologic profile and semen freezing in two-year-old Nelore bulls, pre select by breeding soundness evaluation (BSE). **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, **60(3)**.

SARLÓS, P.; MOLNÁR, A.; KÓKAI, M.; GÁBOR, G.; RÁTKY, J. 2002. Comparative evaluation of the effect of antioxidants in the conservation of ram semen. **Acta Veterinaria Hungarica**, **50**: 235– 45.

SAUTTER, C.K.; DENARDIN, S.; ALVES, A.O.; MALLMANN, C.A.; PENNA, N.G.; HECKTHEUER, L.H. 2005. Determinação de resveratrol em sucos de uva no brasil. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, **25(3)**: 437-442.

SHAMIM. U.; HANIF, S.; ALBANYAN, A.; BECK, F.W.; BAO, B.; WANG, Z.; BANERJEE, S.; SARKAR, F.H.; MOHAMMAD, R.M.; HADI, S.M.; AZMI, A.S.J. 2012. Resveratrol-induced apoptosis is enhanced in low pH environments associated with cancer. **Cell Physiology**, **227(4)**:1493-500.

SHAMSI, M.B.; VENKATESH, S.; TANWAR, P.; SHARMA, R.K.; DHAWAN, A.; KUMAR, R.; GUPTA, N.P.; MALHOTRA, N.; SINGH, N.; MITTAL, S.; DADA, R. 2009. DNA integrity and semen quality in men with seminal antioxidant levels. **Mutation Research**, **665**: 29-36.

SILVA, J.F.P.; CAJUEIRO, S.V.; SILVA, P.C.; SOARES, M.M.P.; GUERRA, E.C.B. 2012. Effect of antioxidants resveratrol and quercetin on *in vitro* evaluation of frozen ram sperm. **Theriogenology**, **77**:1722–1726.

SIMÕES, R. Influência da fragmentação de DNA espermático na produção *in vitro* de embriões bovinos. **Tese (Doutorado em Ciências)**, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010. 105p.

SINGER, S.; J, NICOLSON, G. L. 1972. The Fluid Mosaic Model of the Structure of Cell Membranes. **Science**, **175(4023)**: 720-731.

SILVA, S.V.; SOARES, A.T.; BATISTA, A.M.; ALMEIDA, F.C.; NUNES, J. F.; PEIXOTO, C.A.; GUERRA, M.M.P. 2013. Vitamin E (Trolox) addition to Tris-egg yolk extender preserves ram spermatozoon structure and kinematics after cryopreservation. **Animal Reproduction Science**.**137(2)**: 37–44.

SLATER, S.J.; SEIZ, J.L.; COOK, A.C.; STAGLIANO, B.A.; BUZAS, C.J. 2003. Inhibition of protein kinase C by resveratrol. **Biochemistry Biophysical Acta**, **1637**:59-69,

SOUZA, D. B.; BICUDO, S.D.; AZEVEDO, H.C.; MAIA, M.S. 2013. Raqueamento/agrupamento do sêmen congelado de carneiros da raça Santa Inês analisadas pelo sistema CASA e sondas fluorescentes pela análise estatística multivariada. **Veterinária e Zootecnia**, **20(4)**: 649-657.

SOUZA, J.D.S.; FERREIRA, W.M. 2007. O papel da vitamina e na nutrição e reprodução animal - meios de defesa contra os radicais livres. **Revista Eletrônica de Nutrição**, **4**:456-461.

STRADAIOLI, G.; NORO, T.; SYLLA, L.; MONACI, M. 2007. Decrease in glutathione (GSH) content in bovine sperm after cryopreservation: comparison between two extenders. **Theriogenology**, **67**: 1249-1255.

TAPIA, J.A.; MACIAS-GARCIA, B.; MIRO-MORAN, A.; ORTEGA-FERRUSOLA, C.; SALIDO, G.M.; PEÑA, F.J.; APARICIO, I.M.2012. The membrane of the mammalian spermatozoa: much more than an inert envelope. **Reproduction in Domestic Animals**, **3**: 65-75.

TOWHIDI, A ; ZEINOALDINI, S.; ARDEBILI, R.; DAVACH, N.D.; NASIRI, A.H. 2013. Combined n-3 Fatty Acids and $\hat{\pm}$ -Tocopherol Supplementation Improved the Ovine Sperm Cryosurvival. **Iranian Journal of Biotechnology**, **11**: 238-243.

UPRETI, G.C.; JENSEN, K.; MUNDAY, R.; DUGANZICH, D.M.; VISHWANATH, R.; SMITH, J.F. 1998. Studies on aromatic amino acid oxidase activity in ram spermatozoa: role of pyruvate as an antioxidant. **Animal Reproduction Science**, **51**: 275-287,

VALENÇA, R.M.B.; GUERRA, M.M.P. 2007. Espécies Reativas ao Oxigênio (ROS) e a utilização de antioxidantes na criopreservação do sêmen suíno. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, **31**: 47-53.

VERBERCKMOES, S.; VAN SOOM, A.; DE PAUW, I.; DEWULF, J.; DE KRUIF A. 2002. Migration of bovine spermatozoa in a synthetic medium and its relation to in vivo bull fertility. **Theriogenology**, **58(5)**: 1027-37

VERSTEGEN, J.; IGUER-OUADA, M.; ONCLIN, K. 2002. Computer assisted semen analyzers in andrology research and veterinary practice. **Theriogenology**, **57**:149-179.

WATHES, D.C.; ROBERT, D.; ABAYASEKARA, E.; AITKEN, R.J. 2007. Polyunsaturated fatty acids in male and female Reproduction. **Biology of Reproduction**, **77(2)**:190-201.

WATSON, P. F. 2000. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. **Animal Reproduction Science**, **61(2)**:481-492.

WENZEL, E.; SOLDI, T.; ERBERSDOBLER, H.; SOMOZA, V. 2005. Bioactivity and metabolism of *trans*-resveratrol orally administered to Wistar rats. **Molecular Nutrition & Food Research**, **49(5)**:482-494.

WEST, J.D.; MARNETT, L.J. 2006. Endogenous reactive intermediates as modulators of cell signaling and cell death. **Chemical Research in Toxicology**, **19(2)**: 173-94.

WOODS, E.J.; BENSON, J.D.; AGCA, Y.; CRITSER, J.K. 2004. Fundamental cryobiology of reproductive cells and tissues. **Cryobiology**, **48**:146-156

YEN, G. C.; DUH, P.D.; LIN, C. W. 2003. Effects of resveratrol and 4-hexylresorcinol on hydrogen peroxide-induced oxidative DNA damage in human lymphocytes. **Free Radical Research**, **37**: 509-514.

ZHANG B.R.; LARSSON, B.; LUNDEHEIM, N.; HAARD, M.G.H.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. 1999. Prediction of bull fertility by combined *in vitro* assessments of frozen-thawed semen from young dairy bulls entering an IA-programme. **International Journal Of Andrology**, **22**: 253-260.