VICTOR HENRIQUE BITTAR RIGO

**Influência do resveratrol na qualidade e na fertilidade do
espermatozoide suíno refrigerado entre 15-17°C por 72 horas para
inseminação artificial intrauterina**

Pirassununga

2016

VICTOR HENRIQUE BITTAR RIGO

Influência do resveratrol na qualidade e na fertilidade do espermatozoide suíno refrigerado entre 15-17°C por 72 horas para inseminação artificial intrauterina

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências

Departamento:
Reprodução Animal

Área de concentração:
Reprodução Animal

Orientador:
Prof. Dr. André Furugen Cesar de Andrade

Pirassununga

2016

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T.3418
FMVZ

Rigo, Victor Henrique Bittar
Influência do resveratrol na qualidade e na fertilidade do espermatozoide suíno refrigerado entre 15-17°C por 72 horas para inseminação artificial intrauterina / Victor Henrique Bittar Rigo. -- 2016. 125 f. : il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Reprodução Animal, Pirassununga, 2016.

Programa de Pós-Graduação: Reprodução Animal.

Área de concentração: Reprodução Animal.

Orientador: Prof. Dr. André Furugen Cesar de Andrade.

1. Refrigeração. 2. Espermatozoides. 3. Suíno. 4. Antioxidante. 5. Resveratrol. I. Título.

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "INFLUÊNCIA DO RESVERATROL NA QUALIDADE E NA FERTILIDADE DO SÊMEN SUÍNO PROCESSADO E ARMAZENADO (15-17°C) PARA A INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL INTRA-UTERINA", protocolada sob o CEUA nº 2000230714, sob a responsabilidade de **André Furugen César de Andrade e equipe; Victor Henrique Bittar Rigo; Bruno Bracco Donatelli Muro; Diego Feitosa Leal; Gisele Mouro Ravagnani; Mariana Andrade Torres** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (CEUA/FMVZ) na reunião de 13/10/2015.

We certify that the proposal "INFLUENCE OF RESVERATROL ON THE QUALITY AND FERTILITY OF BOAR SEMEN PROCESSED AND STORED (15-17° C) TO INTRAUTERINE ARTIFICIAL INSEMINATION", utilizing 36 Swines (6 males and 30 females), protocol number CEUA 2000230714, under the responsibility of **André Furugen César de Andrade and team; Victor Henrique Bittar Rigo; Bruno Bracco Donatelli Muro; Diego Feitosa Leal; Gisele Mouro Ravagnani; Mariana Andrade Torres** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the School of Veterinary Medicine and Animal Science (University of São Paulo) (CEUA/FMVZ) in the meeting of 10/13/2015.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa**

Vigência da Proposta: de **11/2014** a **02/2016**

Área: **Reprodução Animal**

Origem: **Animais provenientes de estabelecimentos comerciais**

Espécie: **Suínos**

sexo: **Machos**

idade: **a**

N: **6**

Linhagem: **híbridos comerciais**

Peso: **a**

Origem: **Animais provenientes de estabelecimentos comerciais**

Espécie: **Suínos**

sexo: **Fêmeas**

idade: **a**

N: **28**

Linhagem: **híbrido comercial**

Peso: **a**

Resumo: O presente projeto pretende verificar se adição do antioxidante resveratrol gera modificações positivas em parâmetros celulares relacionados à qualidade do sêmen suíno refrigerado à 15-17°C (experimento 1), além disso, será verificado se o resveratrol melhora os índices de fertilidade na inseminação artificial intra-uterina (IAIU) (experimento 2). Experimento 1: serão realizadas seis coletas de sêmen de seis cachos (n=36). Realizadas as análises iniciais do sêmen (in natura), este será diluído (meio BTS) e adicionado o resveratrol. Será realizado os seguintes tratamentos: Controle (CON) BTS sem resveratrol T1 (BTS + RVT 0,1 mM), T2 (BTS + RVT 1,0 mM) e T3 (BTS + RVT 10 mM). Os tratamentos serão acondicionados sob refrigeração e avaliados as características da motilidade, integridade das membranas plasmática e acrossomal, fluidez de membrana plasmática (capacitação) e peroxidação das membranas e do citoplasma espermático, nos intervalos de 0, 24, 48 e 72 horas. As análises do sêmen consistirão na avaliação computadorizada das características da motilidade (CASA) e para os demais parâmetros será utilizado a análise por citometria de fluxo. Experimento 2: o teste de fertilidade será realizado em 30 marrãs comparando os tratamentos Controle (CON) (n=15) e Resveratrol (RESV) (n=15) utilizando a concentração de resveratrol que apresentar melhores resultados nas avaliações do experimento 1. Estas fêmeas serão submetidas a um protocolo hormonal para a realização das IAIUs em tempo fixo. Após 5 dias de inseminadas, as fêmeas serão encaminhadas ao abatedouro, onde serão eutanasiadas e retido o útero e ovário para coleta e contagem dos embriões. Os dados serão submetidos à análise de variância (PROC GLM), empregando-se o programa SAS (1998). As variáveis contínuas serão comparadas pelo teste de Tukey, já a taxa de fertilidade e a taxa de parto serão analisadas pelo teste não-paramétrico de frequência Qui-Quadrado, ambos analisados ao nível de 5% de significância.

São Paulo, 18 de novembro de 2016

Profa. Dra. Denise Tabacchi Fantoni

Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo

Roseli da Costa Gomes

Secretaria Executiva da Comissão de Ética no Uso de Animais

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de
São Paulo

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: RIGO, Victor Henrique Bittar

Título: **Influência do resveratrol na qualidade e na fertilidade do espermatozoide suíno refrigerado entre 15-17°C por 72 horas para inseminação artificial intrauterina**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais Evandro José Rigo e Rita Solange de Cássia Bittar Rigo e irmã Victória Bittar Rigo pela força, incentivo e por ouvirem meus desabafos nestes dois anos de pós-graduação e com paciência mostrarem a mim as melhores atitudes e escolhas para seguir adiante equilibrado e focado no que me propus a fazer. AMO VOCÊS. Esta conquista é nossa família.

Aos meus avós Luiz Emílio Rigo e Carmen Eleuza por acolherem um filho-neto nestes dois anos, que para mim foram um dos melhores da minha vida. Muito obrigado vó e vô. Amo vocês.

À minha bisavó Aparecida e tia avó Rita por me acolherem em sua casa em épocas de disciplinas e experimentos.

À minha namorada Isabella pela paciência e compreensão da minha busca por mais uma conquista.

Ao meu orientador Professor Dr. André Furugen Cesar de Andrade, esse cara é sensacional!!! Professor com espírito não apenas de docente, mas com espírito humano que sempre procurou encontrar um ponto de equilíbrio entre razão e emoção nas diversas situações cotidianas dos seus orientados do grupo de pesquisa. Cara emotivo que emocionava a todos em suas histórias desafiadoras de conquistas e isto me fazia admirá-lo ainda mais pela transparência de sua alma. Obrigado pelos ensinamentos acadêmicos e de vida. Você é um exemplo para mim!! Posso não ter sido o orientado mais dedicado, mas saiba que tentei dar o melhor de mim.

À professora Dra. Simone, esposa do professor André. Mulher profissional, carismática e sempre disponível a ajudar e que de fato me ajudou muito com a estatística do meu experimento. Muito obrigado!

Ao professor Dr. Aníbal de Sant'Anna Moretti, ícone e referência na suinocultura brasileira com quem tive a honra e oportunidade de vivenciar seus ensinamentos ainda como docente do departamento de produção e nutrição animal da FMVZ-USP e quem me apresentou uma das frases que mais fazem sentido para minha vida profissional e quiça pessoal “VISÃO GLOBAL E INTERATIVA”.

Aos colegas de grupo do Núcleo de Pesquisa em Suínos Mariana, Diego, Gisele, Gustavão, Melissa, Ana Paula, Marina, pelas ajudas em assuntos acadêmicos e na execução do meu experimento.

Aos funcionários da granja de suínos da FMVZ-USP Fabinho, Chiquinho e Ricardão pelas ajudas em assuntos relacionados ao experimento.

Aos professores Drs. Flávio Meirelles e Felipe Perecin por possibilitarem a utilização de suas instalações e equipamentos e **suas respectivas pós doutorandas Fabiana Bressan e Maitê Dell Collado Barondo**, pelo dispêndio de tempo para me auxiliarem na parte de citometria de fluxo e identificação dos embriões do meu experimento.

À professora Dra. Eneiva Carla, a quem sempre se prontificava a ajudar em dúvidas quando o prof. André não podia me atender ou para ter outras vertentes de opinião. Professora você é muito legal! Gosto muito da senhora. Não poderia deixar de mencionar toda sua equipe também. Todos 100%!! Galera finíssima.

Ao professor Dr. Marcílio Nichi e toda sua equipe pela ajuda na realização de análises relacionadas ao meu experimento. Ô grupo unido esse! Em um dia que passei com eles em São Paulo, me ajudaram muitíssimo. Grupo acolhedor, simpático e eficiente.

A todos os demais professores do departamento de Reprodução Animal da FMVZ-USP com quem pude interagir e que contribuíram com seus ensinamentos de forma direta ou indiretamente durante minha pós-graduação.

A todos os professores do departamento de Nutrição e Produção Animal da FMVZ-USP com quem pude interagir e que contribuíram com seus ensinamentos de forma direta ou indiretamente durante minha pós-graduação.

À Harumi e Cleyton pelas ajudas e esclarecimentos em assuntos acadêmicos.

Às bibliotecárias da FMVZ-USP Elza e Evadne, pela grande ajuda nas correções desta dissertação.

À todos os demais funcionários com quem me relacionei, com mais ou menos frequência nos diversos setores durante estes dois anos de pós graduação.

Aos cachacos Golias, Betão, Nestor, Josué, João e Moisés pela ajuda em doarem seus gametas para que fosse possível a realização do meu experimento. Seres que foram muito importantes na minha vida e que sempre lembrarei como parte primordial deste trabalho.

Às 28 leitoas que doaram suas vidas para que este trabalho tivesse o desfecho completo.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela bolsa concedida. Sem esta instituição muito provavelmente tudo isto não seria possível.

RESUMO

RIGO, V. H. B. **Influência do resveratrol na qualidade e na fertilidade do espermatozoide suíno refrigerado entre 15-17°C por 72 horas para inseminação artificial intrauterina.** [Influence of resveratrol on quality and fertility of cooled boar spermatozoa at 15-17°C for 72 hours to intrauterine insemination]. 2016. 125 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2016.

A preservação do sêmen suíno refrigerado para fins de inseminação artificial é a forma mais utilizada no mundo. Para tal, os espermatozoides são diluídos em meios que forneçam substratos para nutrir e proteger estas células. Porém, a faixa de temperatura de armazenamento do sêmen suíno refrigerado não é capaz de cessar completamente os mecanismos metabólicos dos espermatozoides, que em ambiente aeróbico da dose inseminante, produzem e liberam continuamente produtos do metabolismo do oxigênio. A ação das espécies reativas de oxigênio sobre o espermatozoide é uma das razões do declínio na população de células espermáticas estrutural e funcionalmente aptas à fertilizarem os gametas femininos. Portanto, a adição de um composto antioxidante ao meio diluidor poderia melhorar ou manter constante o número de espermatozoides viáveis ao longo do período de conservação da dose inseminante. Neste contexto, este trabalho objetivou verificar se a adição do antioxidante resveratrol geraria modificações positivas em parâmetros celulares relacionados à qualidade do sêmen suíno refrigerado à 15-17°C avaliados por sistema computadorizado da motilidade espermática e citometria de fluxo (experimento *in vitro*), e se este antioxidante melhoraria os índices de fertilidade na inseminação artificial intrauterina (IAIU) através da recuperação, contagem e identificação dos embriões (experimento *in vivo*). As concentrações testadas no experimento *in vitro* não superaram os resultados do tratamento controle ($p < 0,05$), sendo a concentração de 1,0 mM prejudicial ao espermatozoide suíno ($p < 0,05$). A utilização da concentração de 0,01 mM de resveratrol para inseminação das fêmeas suínas no experimento *in vivo* não apresentou efeito positivo nos índices de taxa de prenhez e fertilidade ajustada total ($p > 0,05$), além de ter resultado em uma baixa taxa de embriões viáveis ($p < 0,05$), quando comparados ao tratamento controle. Deste modo, pode concluir que não é indicado a adição do antioxidante resveratrol ao meio diluidor para inseminação artificial, uma vez que compromete a qualidade das células espermáticas do reprodutor suíno e impacta negativamente na fertilidade das fêmeas.

Palavras-chave: Refrigeração. Espermatozoides. Suíno. Antioxidante. Resveratrol.

ABSTRACT

RIGO, V. H. B. **Influence of resveratrol on quality and fertility of cooled boar spermatozoa at 15-17°C for 72 hours to intrauterine insemination.** [Influência do resveratrol na qualidade e na fertilidade do espermatozoide suíno refrigerado entre 15-17°C por 72 horas para inseminação artificial intrauterina]. 2016. 125 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2016.

The preservation of chilled boar semen for artificial insemination is the most performed worldwide. For this, the sperm are extended in medium that provides substrates to nourish and protect these cells. However, the storage temperature range of chilled semen is not able to completely stop the metabolic mechanisms of sperm, which keeps producing and releasing oxygen reactive products in aerobic environment of insemination doses. The action of reactive oxygen species on the sperm is one of the reasons for decreasing sperm population with structural and functional capacity to fertilize the female gamete. Therefore, the addition of antioxidant compound to the extender medium could improve or maintain the number of viable spermatozoa throughout the conservation time of insemination doses. In this context, this work aimed to determine whether addition of antioxidant resveratrol would generate positive changes in cell parameters related to the quality of boar semen cooled to 15-17 °C assessed by computered analysis of sperm motility and flow citometry (*in vitro* experiment) and whether this antioxidant would improve fertility rates using intrauterine insemination (IUI) by the recovery, counting and embryos identification (*in vivo* experiment). The concentrations tested in vitro experiment have not exceed control treatment results ($p < 0.05$), with the concentration of 1.0 mM being detrimental to the boar spermatozoa ($p < 0.05$). The concentration of 0.01 mM of resveratrol used for gilts insemination in experiment *in vivo* has not shown positive effect on pregnancy rate and the total adjusted fertility ($p > 0.05$) and have resulted in a low rate viable embryos ($p < 0.05$) compared to control. Thus, we concluded that the addition of resveratrol antioxidant in boar extender medium is not suitable for artificial insemination, once it compromises the quality of boar sperm cells and impairs on female fertility.

Keywords: Liquid-storage. Spermatozoa. Boar. Antioxidant. Resveratrol.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Laboratório de Andrologia e Tecnologia de Embriões Suínos (LATES, FMVZ-USP)	41
Figura 2 - Citômetro de Fluxo BD Accuri C6 (LMMD, FZEA-USP)	42
Figura 3 - Esquema experimental das análises realizadas	43
Figura 4 - Cachaços alojados no Núcleo de Pesquisa em Suínos (FMVZ-USP)	45
Figura 5 - (A) Higienização do divertículo prepucial e (B) coleta de sêmen através do método da mão enluvada	46
Figura 6 - Contagem espermática por meio da utilização da câmara de Neubauer em aumento de 400x	47
Figura 7 - Análise morfológica dos espermatozoides em microscópio de contraste de interferência diferencial (D.I.C.)	48
Figura 8 - Sistema de análise computadorizada do sêmen (SCA, Microptic® S. L., Barcelona, Espanha) instalado em um computador com câmera acoplada a um microscópio de epifluorescência (Nikon®, Modelo Eclipse Ni-U 80i) para captura de imagens	51
Figura 9 - Imagem gerada pelo programa de análise computadorizada do sêmen Sperm Class Analyzer (SCA, Microptic® S. L., Barcelona, Espanha)	51
Figura 10 - Marrãs destinadas ao experimento <i>in vivo</i> alojadas em gaiolas individuais na granja experimental do NPS, FMVZ-USP	63
Figura 11 - Ilustração do programa de sincronização para a realização da inseminação artificial em tempo fixo	66
Figura 12 - Procedimento de inseminação artificial intrauterina nas marrãs do experimento <i>in vivo</i> , sem a presença do rufião	67

Figura 13 - Procedimento de lavagem da tuba uterina e útero para recuperação de embriões.....	69
Figura 14 - Embriões recuperados (viáveis e degenerados) identificados por esteriomicroscopia e microscopia de contraste de fase, após a realização do lavado da tuba uterina e porção do corno uterino	70

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Médias $\pm$ erro padrão das características de cinética espermática e da integridade das membranas plasmática e acrossomal.....	64
Tabela 2 - Média $\pm$ erro padrão das características de cinética espermática avaliadas pelo programa Sperm Class Analyzer (S.C.A.) da motilidade total (MT), motilidade progressiva (MP) e espermatozoides rápidos (RAP) do espermatozoide suíno refrigerado por 72 horas	74
Tabela 3 - Média $\pm$ erro padrão das características de cinética espermática avaliadas pelo programa Sperm Class Analyzer (S.C.A.) velocidade de trajeto (VAP), velocidade progressiva (VSL), velocidade curvilínea (VCL), amplitude lateral da cabeça (ALH) do espermatozoide suíno refrigerado por 72 horas.....	75
Tabela 4 - Média $\pm$ erro padrão das categorias de células AIMI (Acrossoma Íntegro e Membrana Plasmática Íntegra), ARMI (Acrossoma Reagido e Membrana Plasmática Íntegra), AIML (Acrossoma Íntegro e Membrana Plasmática lesada) e ARML (Acrossoma Reagido e Membrana Plasmática lesada), de espermatozoides suínos refrigerados por 72 horas avaliadas por citometria e fluxo	78
Tabela 5 - Média $\pm$ erro padrão das categorias de células MI (Membrana Plasmática Íntegra) e AI (Acrossoma Íntegro), expressas em porcentagem (%), de espermatozoides suínos refrigerados por 72 horas avaliadas por citometria e fluxo	79
Tabela 6 - Média $\pm$ erro padrão das categorias de células AIMI (Acrossoma Íntegro e Membrana Plasmática Íntegra), ARMI (Acrossoma Reagido e Membrana Plasmática Íntegra), AIML (Acrossoma Íntegro e Membrana Plasmática lesada) e ARML (Acrossoma Reagido e Membrana Plasmática lesada), AI (Acrossoma Íntegro) e MI (Membrana Plasmática Íntegra) das amostras submetidas à estresse oxidativo no momento 72 horas de análise por citometria e fluxo	80
Tabela 7 - Média $\pm$ erro padrão das categorias de células AHP (vivos com alto potencial de membrana mitocondrial), ALP (vivos com baixo potencial de membrana mitocondrial), MPL (células com membrana plasmática lesada), expressas	

em porcentagem (%), de espermatozoides suínos refrigerados por 72 horas avaliadas por citometria e fluxo.....	81
Tabela 8 - Média $\pm$ erro padrão das categorias de células AHP (vivos com alto potencial de membrana mitocondrial), ALP (vivos com baixo potencial de membrana mitocondrial), MPL (células com membrana plasmática lesada) das amostras submetidas à estresse oxidativo no momento 72 horas de análise por citometria e fluxo	81
Tabela 9 - Média $\pm$ erro padrão da desordem lipídica da membrana plasmática, expressa em intensidade de fluorescência média (a.u.) de espermatozoides suínos refrigerados por 72 horas e avaliados por citometria de fluxo	83
Tabela 10 - Média $\pm$ erro padrão da desordem lipídica da membrana plasmática, expressa em intensidade de fluorescência média (a.u.) de espermatozoides suínos induzidos ao estresse oxidativo no momento 72 horas de análise, avaliados por citometria de fluxo	83
Tabela 11 - Médias $\pm$ erro padrão da peroxidação lipídica, medida em intensidade de fluorescência (a.u.), de espermatozoides suínos refrigerados por 72 horas e avaliados por citometria de fluxo	85
Tabela 12 - Médias $\pm$ erro padrão da peroxidação lipídica, medida em intensidade de fluorescência (a.u.), de espermatozoides suínos sob estresse oxidativo no tempo 72 horas, avaliados por citometria de fluxo	85
Tabela 13 - Médias $\pm$ erro padrão do estresse oxidativo no citoplasma de espermatozoides suínos refrigerados por 72 horas, analisada por citometria de fluxo e medida em intensidade de emissão do espectro de fluorescência (a.u.).....	87
Tabela 14 - Médias $\pm$ erro padrão do estresse oxidativo no citoplasma de espermatozoides suínos refrigerados por 72 horas, analisada por citometria de fluxo e medida em intensidade de emissão do espectro de fluorescência (a.u.).....	87
Tabela 15 - Médias $\pm$ erro padrão das anormalidades morfológicas dos espermatozoides suínos avaliados por microscopia de contraste de interferência diferencial (D.I.C.).....	89
Tabela 16 - Médias $\pm$ erro padrão do efeito de tratamento sobre as características de fertilidade	91

LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 1 - 1.a) Histograma de pré-seleção espermática através do tamanho e complexidade interna das células; 1.b) Histograma de seleção da população Syto 59 positiva a partir da população pré-selecionada no gráfico 1.a; 1.c) Histograma representando a população com membrana plasmática lesionada (PI+); 1.d) histograma representando a população com acrossoma reagido (PSA+); 1.e) Dotplot PSA x PI possibilitou a divisão dos espermatozoides positivos para Syto 59 em quatro populações distintas: AIML – acrossoma íntegro e membrana plasmática lesionada; ARML – acrossoma reagido e membrana plasmática lesionada; AIMI – acrossoma e membrana plasmática íntegra; ARMI – acrossoma reagido e membrana plasmática íntegra54
- Gráfico 2 - 2.a) Histograma de pré-seleção espermática através do tamanho e complexidade interna das células; 2.b) Histograma de seleção da população Syto 59+ a partir da população pré-selecionada no gráfico 2.a; 2.c) Histograma representando a porcentagem da população Syto 59+ com membrana plasmática lesionada (PI+); 2.d) Histograma representando a porcentagem da população Syto 59+ com alto potencial de membrana mitocondrial (JC-1 +); 2.e) Dotplot JC-1 x IP possibilitou a divisão dos espermatozoides positivos para Syto 59 em três populações distintas: vivos com alto potencial (Alive HP), vivos com baixo potencial (Alive LP) e mortos (Dead)57
- Gráfico 3 - 3.a) O gráfico de pontos gerado pela análise por citometria de fluxo em amostra corada com a associação das sondas fluorescentes Yo-Pro, Merocianina 540 e Syto 59. Neste gráfico podem-se observar duas categorias distintas, sendo que no quadrante LIVE contém os espermatozoides suínos com a membrana plasmática íntegra e selecionados para a avaliação da intensidade de fluorescência da merocianina 540; 3.b) O histograma representa o pico de intensidade de fluorescência da merocianina 540 da população selecionada no quadrante LIVE. O valor obtido é indicado no quadro da mediana de intensidade de fluorescência do canal FL2-A onde é detectado a emissão de fluorescência da sondas Merocianina 54058

Gráfico 4 - 4.a) Histograma de pré-seleção espermática através do tamanho e complexidade interna das células; 4.b) Histograma de seleção da população Syto 59+ a partir da população pré-selecionada no gráfico 4.a; 4.c) Histograma representando a porcentagem da população Syto 59+ com membrana plasmática lesionada- DEAD (PI+) e íntegra- ALIVE (PI-); 4.d) O histograma apresenta o pico de intensidade de fluorescência da população selecionada no gate ALIVE do gráfico 4.c que está passando por processo de peroxidação da membrana plasmática. O valor obtido é indicado no quadro da mediana de intensidade de fluorescência do canal FL1-A.....59

Gráfico 5 - 5.a) Histograma de pré-seleção espermática através do tamanho e complexidade interna das células; 5.b) Histograma de seleção da população Syto 59+ a partir da população pré-selecionada no gráfico 5.a; 5.c) Histograma representando a porcentagem da população Syto 59+ com membrana plasmática lesionada (Yo-Pro+) e íntegra (Yo-Pro-); 5.d) O histograma apresenta o pico de intensidade de fluorescência da população de espermatozoide suíno selecionada no gate Yo-Pro- do gráfico 5.c que está sofrendo estresse oxidativo no citosol. O valor obtido é indicado no quadro da mediana de intensidade de fluorescência do canal FL2-A.....61

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

μL	microlitro
μg	micrograma
nM	nanomolar
μM	micromolar
mM	milimolar
nm	nanômetro
a.u.	unidades arbitrárias
AI	acrossoma íntegro
AIMI	espermatozoides com membranas acrossomal e plasmática íntegras
AIML	espermatozoides com membrana acrossomal íntegra e membrana plasmática lesionada
ARMI	espermatozoides com membrana acrossomal reagida e membrana plasmática íntegra
ARML	espermatozoides com membrana acrossomal reagida e membrana plasmática íntegra
ATP	adenosina trifosfato
AGPs	ácidos graxos poliinsaturados
ALH	amplitude de deslocamento lateral da cabeça
AHP	espermatozoides com membrana plasmática íntegra com alto potencial de membrana mitocondrial
ALP	espermatozoides com membrana plasmática íntegra com baixo potencial de membrana mitocondrial
BCF	frequência de batimento flagelar
BTS	beltsville Thawing Solution
C11-BODIPY ^{581/591}	4,4-difluoro-5-(4-phenyl-1,3-butadienyl)-4-bora-3 ^a ,4 ^a -diazas-indacene-3-undecanoic acid
CAT	catalase
Ca ²⁺	íon cálcio
CON	controle
CTA-PS	capacidade antioxidante presente no plasma seminal
CTE	cadeia de transporte de elétrons
Cu ⁺	íon cobre
DHE	dihidroetídio
DMPBS	tampão fosfato salino modificado por Dulbecco
DMSO	dimetilsufóxido
DNA	ácido desoxirribonucleico
DI	dose inseminante
DIC	contraste de interferência diferencial
eCG	gonadotrofina coriônica equina
EM	energia metabolizável

EROs	espécies reativas de oxigênio
Fe ⁺⁺	íon ferro
FeSO ₄	sulfato de ferro
FIV	fecundação <i>in vitro</i>
FITC-PSA	fluoresceína conjugada à uma aglutinina de <i>Pisum sativum</i>
FL1	canal 1 de captação da emissão da fluorescência das sondas
FL2	canal 2 de captação da emissão da fluorescência das sondas
FL3	canal 3 de captação da emissão da fluorescência das sondas
FL4	canal 4 de captação da emissão da fluorescência das sondas
GPx	glutathione peroxidase
GRD	glutathione reductase
h	horas
HP	alto potencial de membrana mitocondrial
HIPER	células hiperativadas
H ₂ O ₂	peróxido de hidrogênio
IA	inseminação artificial
IAIU	inseminação artificial intrauterina
IATF	inseminação artificial em tempo fixo
ICSI	injeção intracitoplasmática de espermatozoides
IP	iodeto de propídio
JC-1	5,5',6,6'-tetra-chloro-1,1',3,3'-iodeto de carbocianato de tetraetilbenzimidazol
Kg	quilograma
LH	hormônio luteinizante
LIN	linearidade
LP	baixo potencial de membrana mitocondrial
LPO	lipoperoxidação
MDA	malondialdeído
MI	somatório das células com membrana plasmática íntegra
mL	mililitro
mg	miligrama
m ²	metro quadrado
Mcal	megacalorias
MT	motilidade total
MP	motilidade progressiva
MPL	membrana plasmática lesionada
NADH	dinucleotídeo de nicotinamida e adenina
NADPH	fosfato de dinucleotídeo de nicotinamida e adenina
O ₂ ⁻	ânion superóxido
OH ⁻	radical hidroxila
P	fósforo
PB	proteína bruta

PUFAs	ácidos graxos poliinsaturados
RAP	espermatozoides rápidos
REDOX	reduções oxidativas
RVT	resveratrol
SCA	sperm class analyzer – software de análise da motilidade espermática
SFB	soro fetal bovino
SFe	sulfato ferroso
SOD	superóxido dismutase
STR	retilinearidade
TBARS	ácido tiobarbitúrico
TALP	solução de Tyrode acrescida de albumina, lactato e piruvato
TEV	taxa de embriões viáveis
TF	taxa de fertilidade
TP	taxa de prenhez
UI	unidades internacionais
VAP	velocidade de trajeto
VCL	velocidade curvilinear
VSL	velocidade progressiva

LISTA DE SÍMBOLOS

%	porcentagem
<	menor
>	maior
°C	graus Célsius
±	mais ou menos
®	marca registrada
/	por
-	menos/ negativo
+	mais/ positivo
10 ⁶	milhões
10 ⁹	bilhões
:	para (1:100)
x	vezes

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	23
2	REVISÃO DE LITERATURA	25
2.1	METABOLISMO DO OXIGÊNIO E PRODUÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS	25
2.2	ESTRESSE OXIDATIVO	27
2.3	PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA	28
2.4	CONSERVAÇÃO DO SÊMEN SUÍNO REFRIGERADO	30
2.5	DILUENTES DE REFRIGERAÇÃO	32
2.6	ANTIOXIDANTES ADICIONADOS AOS DILUIDORES DE REFRIGERAÇÃO DE SÊMEN	33
2.7	AÇÃO DOS ANTIOXIDANTES	34
2.8	CARACTERÍSTICAS E MECANISMO DE AÇÃO DO RESVERATROL	35
2.9	RESVERATROL NA REPRODUÇÃO	37
3	HIPÓTESES	39
4	OBJETIVOS	40
5	MATERIAL E MÉTODOS	41
5.1	LOCAL	41
5.2	DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	42
5.3	EXPERIMENTO <i>IN VITRO</i> – EFEITO DAS DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE RESVERATROL NAS CARACTERÍSTICAS DA MOTILIDADE, INTEGRIDADE DAS MEMBRANAS PLASMÁTICA E ACROSSOMAL, POTENCIAL MITOCONDRIAL, FLUIDEZ DE MEMBRANA PLASMÁTICA, PEROXIDAÇÃO DE MEMBRANA PLASMÁTICA E ESTRESSE OXIDATIVO INTRACIPLASMÁTICO DE ESPERMATOZOIDES ARMAZENADOS À 15-17°C POR 72 HORAS	44
5.3.1	Animais	44
5.3.2	Coleta do sêmen e avaliações espermáticas iniciais	45
5.3.3	Concentração espermática	46
5.3.4	Avaliação das características morfológicas	47
5.3.5	Distribuição nos tratamentos	48
5.3.6	Indução ao estresse oxidativo	49
5.3.7	Avaliação computadorizada das características da motilidade e detecção da população hiperativa	50
5.3.8	Análises por citometria de fluxo	52
5.3.8.1	Avaliação da integridade das membranas plasmática e acrossomal por citometria de fluxo	52
5.3.8.2	Avaliação do potencial de membrana mitocondrial do espermatozoide por citometria de fluxo	55
5.3.8.3	Avaliação da estabilidade (Fluidez) da membrana plasmática por citometria de fluxo	57

5.3.8.4	Avaliação da peroxidação das membranas espermáticas por citometria de fluxo	58
5.3.8.5	Avaliação do estresse oxidativo no citoplasma espermático por citometria de fluxo	60
5.4	EXPERIMENTO <i>IN VIVO</i> - EFEITO DO RESVERATROL NA FERTILIDADE DOS ESPERMATOZOIDES SUÍNOS ARMAZENADOS À 15-17°C.....	62
5.4.1	Local	62
5.4.2	Animais	62
5.4.2.1	Fêmeas.....	62
5.4.2.2	Machos	63
5.4.3	Coleta de sêmen e análises iniciais.....	64
5.4.4	Distribuição dos tratamentos experimentais	64
5.4.5	Inseminação Artificial em Tempo Fixo (IATF)	65
5.4.6	Abate, coleta e avaliação dos embriões suínos	67
6	ANÁLISE ESTATÍSTICA	71
7	RESULTADOS	72
7.1	EFEITO DO RESVERATROL SOBRE AS CARACTERÍSTICAS ESTRUTURAIS E FUNCIONAIS DO ESPERMATOZOIDE SUÍNO REFRIGERADO	72
7.1.1	Efeito do resveratrol sobre a cinética do espermatozoide suíno	72
7.1.2	Efeito do resveratrol sobre a integridade das membranas plasmática e acossomal	77
7.1.3	Efeito do resveratrol sobre o potencial de membrana mitocondrial.....	80
7.1.4	Efeito do resveratrol na desordem fosfolípídica (fluidéz) da membrana plasmática	82
7.1.5	Efeito do resveratrol na peroxidação da membrana plasmática	84
7.1.6	Efeito do resveratrol sobre o estresse oxidativo no citoplasma espermático	86
7.2	EFEITO DO RESVERATROL SOBRE AS ANOMALIAS MORFOLÓGICAS DOS ESPERMATOZOIDES SUÍNOS.....	88
7.3	EFEITO DO RESVERATROL SOBRE A FERTILIDADE E PRENHES DE FÊMEAS SUÍNAS	91
8	DISCUSSÃO	92
9	CONCLUSÕES	97
10	CONSIDERAÇÕES FINAIS	98
	REFERÊNCIAS	99
	ANEXOS	115

1 INTRODUÇÃO

Na suinocultura, com a crescente difusão de biotecnologias que permitem a redução da utilização de espermatozoides por dose inseminante (DI), torna-se imprescindível a otimização da qualidade destas células para manutenção de suas funções, garantindo a fecundação dos gametas femininos e mantendo os índices zootécnicos desejáveis. Segundo Belstra (2002), grande parte das pesquisas em relação à técnica de Inseminação Artificial (IA) tem como principal objetivo a redução do número de espermatozoides por DI/serviço, sem que haja comprometimento da taxa de parição e do tamanho de leitegada. Várias inovações na tecnologia de inseminação, tais como a IA pós-cervical (IA intrauterina e intrauterina profunda) são favoráveis ao uso do menor número de espermatozoides por inseminação (FOXCROFT et al., 2008).

O aperfeiçoamento das técnicas de inseminação pós-cervical e sua validação são de extrema importância devido os benefícios econômicos que a redução do número de espermatozoides em até 50% e a redução do volume de diluente podem trazer (DALLANORA et al., 2004). No entanto, a redução desses números pode requerer um novo método de conservação, e conseqüentemente serão necessários estudos acerca dos melhores e mais adequados diluentes para esta técnica (RATH, 2002).

O uso de antioxidantes exógenos no sêmen tem determinado resultados favoráveis, como a redução da concentração de malondialdeído (MDA) nas amostras seminais em decorrência da redução da peroxidação lipídica e, em virtude disto, menos danos espermáticos e melhor conservação destes gametas durante o processo de criopreservação (SARLÓS et al., 2002). À exemplo de antioxidantes não enzimáticos exógenos adicionados ao diluentes, encontram-se os compostos fenólicos.

Os compostos fenólicos são divididos em dois grupos: o dos flavonóides e o dos não flavonóides. Os denominados flavonóides apresentam a estrutura química C6-C3-C6, enquanto que os não flavonóides são classificados como sendo derivados das estruturas químicas C6-C1 (ácido hidroxibenzóico, gálico e elágico), C6-C3 (ácidos cafêico e p-cumaríco hidroxí cinamatos) e C6-C2-C6 (trans-resveratrol, cis- resveratrol e trans-resveratrol-glucosídeo) (DEGÁSPARI; WASZCZYNSKY, 2004).

Os compostos fenólicos possuem uma estrutura ideal para retirada de radicais, o que decorre da presença de vários grupos hidroxila, tornando os antioxidantes mais potentes do que as vitaminas C e E (BARREIROS et al., 2006). Deste modo, em virtude de suas propriedades de oxidorredução, os polifenóis podem desempenhar importante papel na absorção e na

neutralização das EROs, exercendo efeito quelante sobre o oxigênio triplete e singleto ou decompondo os peróxidos (DEGÁSPARI; WASZCZYNSKYJ, 2004), que por sua vez, podem prevenir a ocorrência de danos espermáticos (SIKKA, 2004; BUCAK et al., 2015).

O resveratrol (3, 5, 4'- trihidroxiistilbeno) é um polifênol (STOJANOVIĆ et al., 2001) não flavonóide (DEGÁSPARI; WASZCZYNSKYJ, 2004), encontrado sobre as formas *cis* e *trans*. O *cis*-resveratrol é muito instável à ação da luz, enquanto que o *trans*-resveratrol consiste na forma mais estável, permanecendo por longo período quando protegido da luz e em uma faixa de pH entre 1 e 7 (TRELA; WATERHOUSE, 1996).

O *trans*-resveratrol é abundantemente encontrado na videira e, embora não se conheça com clareza seu papel protetor, está entre os compostos fenólicos que inibem a formação das EROs, retardando o envelhecimento celular e orgânico. Na presença do *trans*-resveratrol, a peroxidação lipídica é inibida de forma mais eficaz do que com as vitaminas C e E, demonstrando que o resveratrol possui melhores efeitos antioxidantes do que tais vitaminas (STOJANOVIĆ et al., 2001). O resveratrol tem atividade antioxidante através da inibição da atividade dioxigenase da lipoxigenase (ARICHI et al., 1982; PINTO et al., 1999).

Diante do exposto, a adição de antioxidantes como o resveratrol, ao meio diluidor durante o processamento do sêmen refrigerado, é uma ferramenta que pode auxiliar na proteção do espermatozoide contra a ação de produtos tóxicos resultantes do metabolismo celular. Deste modo, análises laboratoriais objetivas em organelas celulares alvo do estresse oxidativo são necessárias para constatar a influência do resveratrol.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 METABOLISMO DO OXIGÊNIO E PRODUÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS

As principais fontes de EROs no ejaculado são os espermatozoides imaturos (GIL-GUZMAN et al., 2001), morfológica ou funcionalmente anormais e os leucócitos, que podem estar presentes no ejaculado (AITKEN et al., 1995; SIKKA, 1996; AITKEN, 1997; SANOCKA; KURPISZ, 2004; ZINI; LIBMAN, 2006; MARCHESI; FENG, 2007). Os espermatozoides imóveis e morfológicamente anormais geram maiores quantidades de EROs que os normais (MAIA; BICUDO, 2009). A geração de radicais livres ocorre, normalmente, na membrana plasmática pelo sistema NADPH-oxidase, nas mitocôndrias pelo NADH-oxiredutase dependente (AGARWAL; SALEH, 2002; GUERRA; EVAN; MAXWELL, 2004) e citoplasma (BARBOSA et al., 2010), e pode ser favorecida pela presença de íons ferro e cobre (KOURY; DONANGELO, 2003), sendo a mitocôndria a principal fonte geradora de radicais livres por meio da cadeia de transporte de elétrons (GREEN; BRAND; MURPHY, 2004), responsável pela produção de mais de 90% de EROs na célula (SKULACHEV, 2012).

Grande parte da energia produzida no organismo é gerada por meio de fosforilação oxidativa, o que implica cinco complexos enzimáticos (BLIER et al., 2001). Os complexos de I a IV (cadeia de transporte de elétrons) estão envolvidos no transporte de elétrons através de uma série de proteínas via reações REDOX (reduções oxidativas), tendo como destino final uma molécula de oxigênio. Em circunstâncias normais, o oxigênio é, então, convertido em água no complexo IV, e a energia é estocada e usada para a produção de ATP no complexo V. Porém, durante esse processo, uma pequena porcentagem do oxigênio consumido pela mitocôndria no complexo IV, é convertida em uma das várias EROs, em vez de água. Portanto, paradoxalmente, um processo fundamental para o desenvolvimento da vida dos eucariotos (fosforilação oxidativa) é também um dos principais responsáveis pela produção de EROs.

São considerados como EROs todos os radicais e não radicais derivados do oxigênio. Devido à sua instabilidade e alta reatividade eletrônica, podem reagir com um grande número de compostos adjacentes, atuando como receptores ou doadores de elétrons (AGARWAL; GUPTA; SHARMA, 2005; ANDRADE et al., 2010).

Em organismos sob condições aeróbicas normais, mais de 90% do oxigênio consumido sofre uma redução tetravalente, com aceitação de quatro elétrons transformando-se diretamente em água pela ação da enzima citocromo oxidase via cadeia de transporte de elétrons (CTE) sem liberação de EROs (OTT et al., 2007; SKULACHEV, 2012). Deste modo, menos de 10% do

oxigênio consumido é reduzido e convertido em ânion superóxido (O_2^-) seguido por outra redução e aceitação de dois prótons produzindo o peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Esta molécula origina o radical hidroxila ($OH^\cdot$) via reação de Fenton catalisada por íons Fe^{2+} e Cu^{2+} . Por fim, o radical hidroxila interage com mais um elétron e um próton resultando na formação de uma molécula de água (LUSHCHAK, 2014).

O ânion superóxido é gerado principalmente na membrana mitocondrial de forma espontânea, através da cadeia respiratória. Parece ser o produto primário do sistema de formação de EROs. É um radical livre pouco reativo, formado após a primeira redução do oxigênio molecular, pela adição de um elétron. Esta ERO não possui capacidade de penetração através da membrana lipídica, agindo somente no compartimento onde é produzida. O ânion superóxido participa da formação do peróxido de hidrogênio através da ação da enzima antioxidante superóxido dismutase (NORDBERG; ARNÉR, 2001; NICHI, 2003; MAIA; BICUDO, 2009; ANDRADE et al., 2010).

O peróxido de hidrogênio é uma ERO com alto potencial reativo. Não é considerado um radical livre, pois não possui um elétron desemparelhado em sua última camada eletrônica. Participa da reação de geração do radical hidroxila ($OH^\cdot$) e, diferente dos outros radicais livres, possui vida longa e é capaz de atravessar membranas biológicas, sendo altamente tóxico para as células (NORDBERG; ARNÉR, 2001; NICHI, 2003; MAIA; BICUDO, 2009; ANDRADE et al., 2010; BARBOSA et al., 2010).

O radical hidroxila é o mais reativo e nocivo dentre as EROs para o sistema biológico, sendo capaz de reagir rapidamente com as biomoléculas, desencadeando a peroxidação dos lipídeos através da retirada de um átomo de hidrogênio dos ácidos graxos poli-insaturados (polyunsaturated fatty acids - PUFAs) da membrana celular (NORDBERG; ARNÉR, 2001; NICHI, 2003; MAIA; BICUDO, 2009; ANDRADE et al., 2010; BARBOSA et al., 2010).

2.2 ESTRESSE OXIDATIVO

O metabolismo aeróbico está associado com a geração de moléculas pró-oxidantes denominadas de radicais livres ou espécies reativas de oxigênio (EROs), comumente encontradas no plasma seminal. As EROs podem desempenhar funções fisiológicas ou deletérias ao sêmen de acordo com as suas concentrações. Portanto, o funcionamento ideal do sistema aeróbico depende de um equilíbrio gerado entre as quantidades de EROs produzidas e removidas pelo sistema antioxidante celular (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2001; MAIA; BICUDO, 2009).

Sob condições fisiológicas, as EROs são produzidas em baixos níveis pelo espermatozoide, o que enfatiza sua importância em eventos como a capacitação e hiperativação espermáticas, reação acrossomal e interação espermio-oocitária (DE LAMIRANDE et al., 1997; BURNAUGH et al., 2007).

Quando em excesso, as EROs são prejudiciais e acarretam o estresse oxidativo (NORDBERG; ARNÉR, 2001) induzindo o processo de lipoperoxidação (LPO), danos ao DNA e apoptose de espermatozoides (KOTHARI et al., 2010). Este excesso pode ser responsável por reações específicas e inespecíficas em componentes celulares adjacentes, tais como, lipídeos insaturados, proteínas e DNA, prejudicando o funcionamento celular normal (GHARAGOZLOO; AITKEN, 2011). Tais elementos celulares representam os substratos moleculares mais frequentes de ataque das EROs (ORTEGA et al., 2003).

O balanço entre antioxidantes e oxidantes também pode ser interrompido, em favor dos oxidantes (TURRENS, 2003), como consequência de baixas concentrações de antioxidantes no plasma seminal e/ou meio diluidor (SIKKA, 2004) e do processamento do sêmen (centrifugação, criopreservação, descongelação), com destaque para as temperaturas de refrigeração que conduzem a uma maior produção de EROs (SALEH; AGARWAL, 2002).

O estresse oxidativo do espermatozoide pode ser avaliado por métodos que mensuram a produção de EROs. Múltiplos ensaios e sondas fluorescentes têm sido desenvolvidos para detecção da produção de ânion superóxido que parece ser a ERO mais gerada pelo espermatozoide (DE LAMIRANDE; GAGNON, 1995), tanto pela NADPH oxidase como por um escape de elétron da cadeia de transporte de elétrons da mitocôndria (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2001).

A sonda fluorescente Dihidroetídio (DHE) tem sido usada com sucesso para mensurar a produção intracelular de O_2^- de várias células e tecidos como da musculatura lisa (RICE et al., 2003) e células endoteliais (ZHANG; ZOU; LI, 2001). Esta sonda é altamente permeável

para as células e é oxidada pelo O_2^- em etídio, um fluoróforo com afinidade ao DNA (BENOV; SZTEJNBERG; FRIDOVICH, 1998). No entanto, o DHE parece fornecer apenas uma mensuração qualitativa da geração de O_2^- por causa da habilidade desta sonda em catalizar a dismutação do O_2^- (BENOV; SZTEJNBERG; FRIDOVICH, 1998).

Guthrie, Welch e Long (2008) utilizaram a sonda DHE para mensurar a formação de EROs e investigar a viabilidade do espermatozoide suíno em relação a produção de EROs, motilidade, potencial de membrana mitocondrial e produção de ATP. Estes autores verificaram que a formação de EROs não estava associada a qualquer mudança na viabilidade espermática, mas que a redução na motilidade poderia ser devido à interrupção na formação de ATP por ação das EROs.

2.3 PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA

Nos últimos anos, muitas pesquisas têm sido realizadas relatando os efeitos do estresse oxidativo sobre a célula espermática, especialmente no sêmen de humanos (AITKEN; KRAUSZ, 2001). No sêmen de reprodutores suínos tem-se observado, especialmente, grande atuação dos peróxidos sobre as células espermáticas, devido à elevada existência de ácidos graxos poliinsaturados em fosfolipídios em sua membrana (CEROLINE et al., 2000) e da baixa capacidade antioxidante de seu plasma seminal (BREZEZINSKA-SLEVBODSINSKA et al., 1995).

A peroxidação lipídica ou lipoperoxidação (LPO) é resultante da ação dos radicais livres sobre lipídeos poliinsaturados das membranas celulares. Os AGPs (ácidos graxos poliinsaturados) são excelentes alvos para ataques das EROs por possuírem uma ou mais duplas ligações em sua longa cadeia de carbonos (AITKEN, 1995; LIMA; ABDALLA, 2001; NORDBERG; ARNÉR, 2001). Esse tipo de reação pode ser catalisada por metais de transição, especialmente ferro e cobre (AITKEN et al., 2007), e comumente está dividida nas etapas de iniciação, propagação e terminação.

O ponto chave na iniciação da peroxidação lipídica é a remoção de uma molécula de hidrogênio da ligação com o carbono do ácido graxo poliinsaturado. O radical hidroxila (OH^-) é a ERO mais eficiente nesta retirada do hidrogênio e iniciação da reação em cadeia da peroxidação lipídica (BENEDET; SHIBAMOTO, 2008). O processo é propagado por radicais peroxila e resulta na formação de hidroperóxidos lipídicos e aldeídos citotóxicos, tais como o malondialdeído (MDA), 4-hidroxynonenal e isoprostanos (AITKEN, 1995; LIMA; ABDALLA, 2001; NORDBERG; ARNÉR, 2001).

A LPO altera a estrutura e permeabilidade da membrana, assim como sua fluidez, podendo prejudicar sua capacidade de fusão, habilidade importante e necessária durante a reação acrossomal, consequentemente influenciando a fertilidade (FERREIRA; MATSUBARA, 1997; MAIA; BICUDO, 2009; BALL, 2011).

A LPO pode ser avaliada e utilizada como indicador do estresse oxidativo celular. Em sistemas biológicos a avaliação da LPO é feita através dos produtos gerados durante o processo. O método mais utilizado para mensuração da LPO é através da detecção de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), neste caso, o malondialdeído (MDA) (LIMA; ABDALLA, 2001; MAIA; BICUDO, 2009).

O método para a mensuração da lipoperoxidação através do ácido tiobarbitúrico (TBARS) é um método espectrofotométrico, o qual mede a concentração dos produtos oriundos da peroxidação dos lipídios. Durante a fase de iniciação da lipoperoxidação, ocorre acúmulo de hidroperóxidos de lipídios na membrana espermática, que se decompõe formando vários aldeídos, entre eles o malondialdeído. No método do ácido tiobarbitúrico, o produto final medido é o MDA ou substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico -TBARS (JENTZSCH et al., 1996; SHARMA; AGARWAL, 1996; LAPENNA et al., 2001; SANOCKA; KURPISZ, 2004). Neste processo duas moléculas de ácido tiobarbitúrico reagem com uma molécula de MDA sob alta temperatura e baixo pH resultando em um cromógeno rosa que pode ser quantificado (JANERO, 1990; NICHI et al., 2007).

Porém este método apresenta limitações como a impossibilidade da localização intracelular da peroxidação lipídica em espermatozoides que é de grande interesse para a compreensão do mecanismo básico da peroxidação relacionado à sub ou infertilidade, dificuldade em demonstrar se as EROs observadas em amostras de células espermáticas são produzidas por uma pequena população que está sofrendo danos oxidativos ou se todas as células contribuem igualmente para a formação de EROs e pela possibilidade dos intermediários formados durante a peroxidação lipídica reagirem com outras moléculas biologicamente relevantes além do TBARS (BROUWERS; GADELLA, 2003).

Como alternativa para a avaliação da LPO algumas sondas fluorescentes lipofílicas vêm sendo utilizadas em espermatozoides de mamíferos. O BODIPY^{581/591}C11 é um análogo de ácidos graxos que se incorpora facilmente à membrana celular do espermatozoide e mimetiza a reação de peroxidação sofrida pelo ácido graxo poli-insaturado. Apresenta propriedade fluorescente nas faixas vermelha e verde do espectro de visibilidade e frente à oxidação induzida por radicais livres, sua fluorescência muda do vermelho para o verde. A avaliação pode ser feita através de microscopia de epifluorescência (PAP et al., 1999), microscopia confocal de varredura a laser (NEILD et al., 2005), fluorimetria (DRUMMEN et al., 2002) e

citometria de fluxo (SILVA et al., 2007). Esta sonda tem sido usada com sucesso em experimentos para avaliação da LPO em espermatozoides de garanhões (; BALL; VO, 2002; NEILD et al., 2005; ORTEGA-FERRUSOLA et al., 2009), touros (BROUWERS; SILVA; GADELLA, 2005; SILVA et al., 2007), carneiros (CHRISTOVA; JAMES; JONES, 2004; LYMBEROPOULOS; TSAKMAKIDIS; KHALIFA, 2008), cachacos (BROUWERS; SILVA; GADELLA, 2005; GUTHRIE; WELCH, 2007) e homens (AITKEN et al., 2007; KOPPERS et al., 2008).

Domínguez-Rebolledo et al. (2010) realizaram um experimento comparando o método do TBARS e as sondas fluorescentes BODIPY^{581/591}C11 (B581) e BODIPY^{665/676}C11 (B665) para medir danos peroxidativos induzidos no sêmen do epidídimo descongelado de veados ibéricos. As sondas fluorescentes foram avaliadas por fluorimetria e citometria de fluxo. Os níveis de LPO encontrados foram semelhantes entre as sondas nas metodologias adotadas, diferindo do método do TBARS. Os resultados deste experimento demonstraram uma maior precisão das sondas fluorescentes na mensuração da LPO.

2.4 CONSERVAÇÃO DO SÊMEN SUÍNO REFRIGERADO

Há duas formas de conservação seminal já utilizadas: a refrigeração e a congelação. A redução da temperatura tem sido um método utilizado para prolongar a viabilidade dos espermatozoides ejaculados, devido a seu efeito de desaceleração dos processos metabólicos celulares (ALMOND et al., 1994). Isso ocorre em virtude da característica da membrana dos espermatozoides, que quanto menor for a temperatura do meio, menor será a mobilidade de seus lipídios na dupla membrana, os quais se solidificam, impedindo seu movimento e também o movimento das proteínas, mantendo desta forma a estrutura da membrana celular (SANCHEZ, 2003).

Apesar dos benefícios dos processos de conservação citados acima, podem acontecer danos irreversíveis a célula espermática em virtude do choque térmico, que levam a uma redução da sua motilidade, resultando em inchaço na membrana acrossomal, aumento da permeabilidade da membrana plasmática (FERNÁNDEZ-SANTOS et al., 2006), ruptura da membrana plasmática, com perda de íons e enzimas interferindo assim na sua sobrevivência e capacidade fecundante (DE LEEUW et al., 1991).

Para o armazenamento do sêmen suíno, dois fatores são muito importantes: a temperatura de armazenamento e a composição do meio diluidor (JOHNSON et al., 2000). O resfriamento na temperatura de 15°C a 18°C é o mais utilizado na rotina das granjas e das

centrais de inseminação e permite a manutenção da viabilidade espermática por até 72 horas (CORRÊA et al., 2001; GERRITS et al., 2005) quando diluído em meio de curta duração.

Essa faixa de temperatura é imprópria à preservação do sêmen por períodos prolongados de tempo, com ênfase para dois aspectos limitantes a saber: a inadequada redução do metabolismo dos espermatozoides que continuam produzindo metabólitos, os quais se acumulam e interferem na motilidade espermática e a facilidade de multiplicação bacteriana, que concomitantemente poderão reduzir a longevidade espermática (BRAGA, 2007).

O sêmen suíno, dentre outras espécies de mamíferos é o mais sensível a flutuações de temperatura (CORRÊA et al., 2001). As diferenças entre as espécies parecem estar relacionadas à composição química e molecular das membranas plasmática e mitocondrial, dos ácidos graxos e fosfolipídios (POULOS; DARIN-BENNETT; WHITE, 1973). A relação colesterol:fosfolipídios da membrana plasmática dos espermatozoides suínos (0,12) é mais baixa em relação aos espermatozoides de bovino (0,38) e carneiro (0,36), podendo ser um dos fatores responsáveis por sua maior sensibilidade a refrigeração (WEBER, 1989; DE LEEUW et al., 1990). Os efeitos estão relacionados à agressão sobre a membrana plasmática e outras organelas celulares, ocasionados pelo choque térmico e estresse oxidativo (GUTHRIE; WELCH, 2005).

Portanto, é importante a adição de um meio diluidor adequado que forneça nutrientes para a produção de energia, proteja contra o choque térmico, controle flutuações de pH, mantenha o balanço osmótico, iniba crescimento de microrganismos (ALTHOUSE, 1997; JOHNSON et al., 2000; LEVIS, 2000; CORRÊA et al., 2001; BORTOLOZZO; BERNARDI; WENTZ, 2005), preserve as características funcionais das células espermáticas (GADEA, 2003) e proporcione um ambiente com concentrações equilibradas de antioxidantes e radicais livres.

Deste modo, a qualidade do meio diluente que permita um maior período de conservação do ejaculado, é importante para o sucesso dos resultados da inseminação artificial (PEREZ-GARCIA, 1958; JOHNSON; AALBERS; GROOTEN, 1988). Assim, se faz necessário o desenvolvimento de técnicas e soluções que permitam a utilização do sêmen refrigerado, sem queda dos resultados de fertilidade em particular na espécie suína (TONIOLLI; MESQUITA; CAVALCANTE, 1998; TONIOLLI et al., 2001).

2.5 DILUENTES DE REFRIGERAÇÃO

A inseminação artificial na espécie suína obteve êxito em virtude da inovação na técnica e melhoria dos materiais utilizados, entre esses, desempenhou papel fundamental o desenvolvimento de diluentes para a conservação do sêmen por refrigeração (SÁNCHEZ, 2003).

O diluente utilizado na inseminação é uma composição bioquímica para dar equilíbrio fisiológico, bioquímico e biofísico aos espermatozoides e ao ambiente que o rodeia, assim ele é composto por uma ampla variedade de substâncias quimicamente diferentes entre si como glicose, antibiótico, sais, dentre outras, que tem como finalidade aumentar o volume do sêmen, proteger o espermatozoide contra choque térmico, fornecer substratos necessários ao metabolismo espermático, manter o pH e inibir o crescimento bacteriano, mantendo assim a viabilidade dos espermatozoides até o momento de serem introduzidos no trato reprodutivo da fêmea (CORRÊA et al., 2001).

Para a escolha do diluente, deve-se considerar as condições específicas em que a inseminação artificial ocorre e o tempo que normalmente decorre entre o processamento das doses e a IA. Ou seja, se o sêmen se destina ao uso imediato ou longos períodos. O manejo da IA adotado e o custo do diluente também influenciam enormemente na sua escolha (BORTOLOZZO et al., 2005).

Na inseminação artificial (IA) de suínos, os diluentes utilizados têm sido tradicionalmente classificados em três grupos (LEVIS, 2000), com base no período de manutenção da viabilidade e da capacidade fecundante do espermatozóide: os de curta (1 a 2 dias); os de média (3 a 5 dias), e os de longa (mais de 6 dias) duração.

O BTS, o Androhep e o MR-A são os diluentes mais utilizados no mundo, sendo seguidos pelo Modena e o Kiev (JOHNSON, 1998). Os principais diluentes de curta duração são o BTS (Beltsville thawing solution) e o Kiev. O BTS é o diluente mais utilizado pela facilidade de fabricação, baixo preço de comercialização (LEVIS, 2000) e por proporcionar um aumento no período de armazenamento do sêmen (SCHEID et al., 1991). No Brasil, o diluente Kiev foi bastante utilizado até 1986, sendo em seguida substituído pelo BTS (SCHEID et al., 1991).

Embora o BTS seja considerado um diluente de curta duração, vários autores observaram que mais de 60% dos espermatozoides apresentavam-se móveis mesmo após 96 horas de armazenamento (BALTES, 1993; SCHEID, 1993; REIS et al., 2000; OHATA, 2001). Por outro lado, Sather, Harbison e Seth (1991) verificaram redução na taxa de concepção para

o sêmen armazenado em BTS por mais de 72 horas em comparação ao armazenamento por até 72 horas.

Segundo Weitze (1991), quando a dose inseminante (DI) é armazenada por períodos superiores a 72 horas, mesmo com o emprego de diluidores de longa duração como o Androhep, MR-A e Reading, a taxa de parto e o tamanho da leitegada podem ser afetados.

Laforest e Allard (1996) compararam diferentes diluentes ao longo de 168 horas (BTS, MR-A, Modena e Androhep) e concluíram que o BTS é tão eficiente quanto os diluentes mais complexos. Nas 96 horas, todos os diluentes avaliados apresentaram taxa de prenhez que variou de 83 a 89%, sem diferença significativa entre eles.

2.6 ANTIOXIDANTES ADICIONADOS AOS DILUIDORES DE REFRIGERAÇÃO DE SÊMEN

Durante a preservação do sêmen ocorre a peroxidação dos lipídios pelas espécies reativas de oxigênio, podendo ser agravada na presença de uma maior proporção de ácidos graxos insaturados e de baixos níveis de antioxidantes presentes no espermatozoide. Assim, a suplementação com vários tipos de antioxidantes tem melhorado a viabilidade e a motilidade espermáticas no sêmen diluído ou criopreservado de várias espécies (FUNAHASHI; SANO, 2005).

Durante o período de maturação, os espermatozoides perdem a maior parte de seu citoplasma e, com isso, são privados de uma fração dos antioxidantes endógenos, o que os torna vulneráveis à ação das EROs (CARVALHO et al., 2002). Deste modo, os espermatozoides maduros passam a depender, basicamente, da proteção dos antioxidantes presentes no plasma seminal (CARVALHO et al., 2002; ALVAREZ; MORAES, 2006), que se torna a mais importante forma de proteção utilizada por estas células no combate às EROs (SIKKA, 2004), uma vez que a síntese de proteínas no espermatozoides é limitada (ZINI; DE LAMIRANDE; GAGNON, 1993) e portanto incapaz de gerar novas enzimas antioxidantes intracelulares.

Barranco et al. (2015) demonstraram através de um método de determinação da capacidade total de antioxidantes presentes no plasma seminal (CTA-PS) desenvolvido por Erel (2004), que amostras de sêmen com baixa CTA-PS apresentam maior declínio na motilidade e viabilidade em comparação à amostras com alta CTA-PS. Este autores concluíram portanto que o CTA-PS poderia proteger o espermatozoide de cachaços durante o armazenamento da dose inseminante sob refrigeração, especialmente se a amostra de sêmen fosse armazenada em

condições subótimas ou obtida de cachaços cujo espermatozoide fosse mais sensível ao processo de refrigeração.

Os antioxidantes presentes no plasma seminal ajudam a proteger o espermatozoide dos danos oxidativos, mas a lavagem, adotada no processamento do sêmen de algumas espécies, remove parte desta capacidade protetora. Além disso, pode haver contaminação dos meios de lavagem e diluentes com íons de metais de transição, como o Fe^{++} ou Cu^+ , que podem desencadear as reações químicas que geram EROs (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2001). Mesmo quando não há lavagem, a concentração dos antioxidantes presentes no sêmen é reduzida com a diluição deste, diminuindo consideravelmente o efeito benéfico do antioxidante natural. Assim, a adição de antioxidantes, ainda que em pequenas concentrações, pode melhorar a função espermática no sêmen manipulado.

A prática do uso de substâncias antioxidantes adicionadas a diluentes de sêmen, tem sido utilizada em várias espécies de forma a diminuir os efeitos deletérios causados pelos metabólitos reativos do oxigênio às células espermáticas. Apesar disto é de conhecimento que estes radicais livres também podem estar presentes em meios com ausência de células, por isto um maior estudo sobre a minimização dos efeitos tóxicos desses compostos sobre o espermatozoide pode ajudar a formulação de melhores diluentes (MAIA et al., 2007).

O *trans*-Resveratrol é um composto polifenólico não-flavonóide que apresenta atividade antioxidante mais intensa comparada às vitaminas E e C (STOJANOVIC; SPRINZ; BREDE, 2001), bem como menor toxicidade (KYSLOVA et al., 2003; JUAN et al., 2005), tendo portanto papel de destaque em estudos que visam opções de suplementação antioxidante no controle da formação de EROs pelas células.

2.7 AÇÃO DOS ANTIOXIDANTES

A homeostase intracelular é mantida através de uma complexa interação entre EROs e antioxidantes (AGARWAL; GUPTA; SIKKA, 2006). Esta homeostase intracelular é modulada por um sistema de defesa antioxidante enzimático e não enzimático (AGARWAL; GUPTA; SIKKA, 2006; SAALU, 2010) capaz de prevenir, interceptar ou reparar a ação dos oxidantes, convertendo-os em água, protegendo as células e o organismo dos efeitos nocivos ocasionados pela superprodução de EROs (SIES, 1997; NORDBERG; ARNÉR, 2001; LUZ et al., 2011).

Segundo Agarwal, Makker e Sharma (2008) os antioxidantes, protegem os espermatozoides contra as EROs oriundas de espermatozoides anormais, eliminam EROs

formadas por leucócitos, previnem a fragmentação do DNA, reduzem as crioinjúrias e bloqueiam a maturação espermática prematura.

Apesar de os antioxidantes reduzirem as taxas de peroxidação dos fosfolípidios endógenos dos espermatozoides (JONES; MANN, 1976), a terapia com antioxidantes pode apresentar efeitos indesejáveis se a dose de segurança for ultrapassada (CARVALHO et al., 2002). Concomitantemente, estes agentes devem ser utilizados com moderação, até mesmo pelo fato de inibirem a formação das EROs e suas funções fisiológicas desempenhadas nos espermatozoides (CARVALHO et al., 2002), a exemplo da hiperativação, capacitação e reação acrossômica (DE LAMIRANDE et al., 1997; SANOCKA; KURPISZ, 2004).

Os antioxidantes enzimáticos são também denominados de agentes naturais. É o primeiro sistema de defesa a agir no organismo, neutralizando o excesso de EROs e prevenindo danos à estrutura celular. Fazem parte deste grupo, a superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathione peroxidase (GPx) e redutase (GRD) (ANDRADE et al., 2010; LUZ et al., 2011).

Os antioxidantes não enzimáticos são micromoléculas, oriundas ou não do próprio organismo (BARREIROS et al., 2006). A proteção antioxidante por mecanismo não enzimático é feita por moléculas que protegem alvos biológicos da oxidação, por apresentarem uma das três propriedades: supressão da formação de radical livre (quelção de metais ou inibição de enzimas geradoras de radicais livres), eliminação de radicais livres ou desativação, formando um produto estável e participação em processos de reparo (BOURNE; RICE-EVANS, 1999).

Encontram-se neste grupo a vitamina C, vitamina A, alfa-tocoferol (alfa-TOH), ácido alfa-lipóico, ácido úrico, zinco, taurina e hipotaurina, presentes no plasma seminal. Os antioxidantes de maior relevância na reprodução são a vitamina C, o alfa-TOH e a glutathione (AGARWAL; MAKKER; SHARMA, 2008; ANDRADE et al., 2010; CAROCHO; FERREIRA, 2013).

2.8 CARACTERÍSTICAS E MECANISMO DE AÇÃO DO RESVERATROL

O Resveratrol (RVT) (trans-3,5,4'-trihydroxystilbene) é um composto polifenólico presente em uvas, amendoim, frutas vermelhas e vinho (KOVACIC; SOMANATHAN, 2010). Este polifenol é um estilbeno formado através de uma reação de condensação entre 3 moléculas de malonil- CoA e uma molécula de 4 – cumaroil- CoA. É uma fitoalexina cuja função biológica é proteger a planta em resposta a ambientes estressantes, como infecções microbianas, radiação ultravioleta e flutuações de temperatura. Pode ser encontrado nas configurações *cis* ou *trans*

(HAO; HE, 2004), sendo a forma *trans* mais estável e biodisponível. O precursor do resveratrol é a fenilalanina e a enzima estilbeno sintase catalisa a conversão desta em resveratrol (JEANDET et al., 2002). O *trans*-Resveratrol, é o isômero mais comum, com efeito protetor contra a peroxidação lipídica na membrana celular e danos ao DNA causados pelas EROs (FRÈMONT, 2000).

Os compostos fenólicos são divididos em dois grupos: o dos flavonóides e o dos não flavonóides. Os denominados flavonóides apresentam a estrutura química C6-C3-C6, enquanto que os não flavonóides são classificados como sendo derivados das estruturas químicas C6-C1 (ácido hidroxibenzóico, gálico e elágico), C6-C3 (ácidos cafêico e p-cumaríco hidroxí cinamatos) e C6-C2-C6 (*trans*-resveratrol, *cis*- resveratrol e *trans*-resveratrol-glucosídeo) (DEGÁSPARI; WASZCZYNSKYJ, 2004).

Polifenóis são facilmente incorporados à bicamada lipídica da membrana, inibindo a formação de radicais oriundos da peroxidação lipídica e mantendo a integridade da membrana e equilíbrio iônico da célula (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2001), deste modo, o resveratrol tem a habilidade de inibir a formação de EROs pelas enzimas NADPH-oxidase (LI, 2011) e NADH-depedente oxiredutase (DELMAS; JANNIN; LATRUFFE, 2005) localizadas na membrana plasmática e mitocôndria do espermatozoide (TURRENS, 2003; GUERRA; EVAN; MAXWELL, 2004).

Compostos polifenólicos agem como *scavengers* de radicais livres [Resveratrol-ânion superóxido, radical hidroxila (LEONARD et al., 2003)] e podem quelar metais como ferro e cobre e assim inibir a formação de radicais livres por meio da reação de Haber-Weiss/Fenton agindo tanto na fase de iniciação como propagação do processo oxidativo (SOARES, 2002; DEGÁSPARI; WASZCZYNSKYJ, 2004). A ação do composto fenólico depende de sua estrutura, dosagem e método de administração (LIMA et al., 2001), bem como a meia-vida do radical a ser interceptado, uma vez que são altamente variáveis (SIES, 1993).

A literatura contém numerosos relatos sobre as propriedades do RVT, incluindo anti-inflamatória, cardioprotetora, anticancerígena, antimicrobiana, antienvelhecimento e efeito antioxidante (COTTART et al., 2010), sendo que uma das atividades biológicas mais importantes é a de antioxidante devido à eliminação de radicais livres (XIA et al., 2010).

2.9 RESVERATROL NA REPRODUÇÃO

Resultados divergentes com suplementação de antioxidantes são comuns e são atribuídos à vários fatores que interferem na ação dos antioxidantes, incluindo a espécie animal, o meio diluidor (RUIZ et al., 2007), o tipo e concentração do antioxidante (SIKKA, 2004) e a eficiência do sistema antioxidante de cada indivíduo dentro da espécie.

Um amplo número de estudos demonstram que o resveratrol pode ser benéfico em vários aspectos da função celular e saúde animal, porém este composto apresenta uma dicotomia onde baixas doses melhoram a função celular enquanto altas doses aumenta a morte celular com concomitante redução da função da membrana mitocondrial (ZINI et al., 1999; SAREEN et al., 2006; ZUNINO; STORMS, 2006; PERVAIZ; HOLME, 2009; FULDA; GALLUZZI; KROEMER, 2010; LOW et al., 2010). Em relação ao sistema reprodutor do macho, pesquisas que focaram na ação do resveratrol apresentam resultados divergentes (JUAN et al., 2005; BRANCO et al., 2010; GARCEZ et al., 2010; COLLODEL et al., 2011; SILVA et al., 2012; OURIQUE et al., 2013).

Alguns estudos em modelos animais demonstram que RVT tem um efeito positivo no eixo hipotálamo-hipofisário, nos níveis de testosterona sanguíneos e produção e motilidade de espermatozoides (JUAN et al., 2005; SHIN et al., 2008). Além disso, o RVT pode diminuir a apoptose de células germinativas (REVEL et al., 2001; UGURALP; MIZRAK; BAY KARABULUT, 2005).

A adição do RVT (0,01 mM, 0,1 mM e 1 mM) ao meio diluidor antes do processo de criopreservação de espermatozoides humanos foi capaz de evitar danos oxidativos a estas células (GARCEZ et al., 2010) e em concentração de 10 mM também foi capaz de reduzir danos ao DNA durante o processo de criopreservação (BRANCO et al., 2010).

Em bovino, Bucak et al. (2015), ao utilizarem resveratrol na concentração de 1,0 mM observaram aumento da motilidade espermática, maior atividade mitocondrial divergindo dos trabalhos de Garcez et al. (2010) e Silva et al. (2012), e observaram ainda uma redução dos danos ao DNA concordando com Branco et al. (2010) e Garcez et al. (2010). Entretanto, não houve diferenças significativas entre o grupo com resveratrol e o grupo controle para as demais características avaliadas.

Em carneiros, o uso de RVT em diferentes concentrações 0, 5, 10, 15 e 20 µg/ml, não alteraram os parâmetros avaliados exceto o potencial de membrana mitocondrial o qual diminuiu em todas as concentrações testadas (SILVA et al., 2012). Mojica-Villegas et al. (2014) ao utilizarem 15 µg/ml de RVT em camundongos, também observaram decréscimo no potencial

de membrana mitocondrial em tratamento utilizando somente este composto, porém sem afetar os demais parâmetro analisados.

Sarlós et al. (2002) contrariando os resultados de Silva et al. (2012) e Mojica-Villegas et al. (2014), verificaram que o resveratrol, é um potente antioxidante, inibindo a peroxidação lipídica com maior eficácia em baixas concentrações ($15 \mu\text{g}/10^9$ espermatozoides/mL), nas temperaturas de 37 e 5 °C.

O Resveratrol também tem sido estudado como antioxidante adicionado à dieta de ratos (JUAN et al., 2005), onde os resultados foram benéficos. O reduzido diâmetro dos túbulos seminíferos aliado ao aumento da densidade dos túbulos testiculares, produziu um aumento do tecido espermátogênico o que implicou no aumento da concentração de espermatozoides observado em ratos suplementados com 20 mg/kg de resveratrol em suas dietas.

Em sua investigação, Ourique et al. (2013) mostrou que a administração intraperitoneal de resveratrol em ratos com hipertireodismo, previne a queda na motilidade espermática, leva a uma diminuição da peroxidação lipídica e previne o estresse oxidativo.

Apesar dos diversos trabalhos relacionando a ação do Resveratrol à qualidade e função espermática, somente Martin-Hidalgo et al. (2013) realizaram experimento com amostras de sêmen suíno suplementadas com diferentes concentrações de Resveratrol (10, 33, 66 e $100\mu\text{M}$) para avaliarem parâmetros convencionais ligados à qualidade seminal como viabilidade espermática, fluidez de membrana plasmática, integridade de membrana acrossomal e potencial de membrana mitocondrial. Os resultados obtidos não permitiram concluir se a adição do RVT melhora ou se há efeito adverso na preservação do sêmen armazenado a 17°C, entretanto estes autores constataram que o resultado mais evidente foi a redução do potencial de membrana mitocondrial observado em espermatozoides tratados com qualquer concentração de RVT (10- $100\mu\text{M}$).

Os resultados obtidos por estes autores deixam abertas possibilidades de mais estudos acerca deste composto, sobre a função e qualidade das ultraestruturas da célula espermática, bem como avaliações que envolvam concentrações variadas além das existentes na literatura.

3 HIPÓTESES

A adição do Resveratrol é capaz de reverter os efeitos provenientes da ação das Espécies Reativas de Oxigênio (EROs) produzidas e liberadas continuamente no ambiente da dose inseminante armazenada entre 15 e 17°C por 72 horas, no que diz respeito à:

- Alterações nos padrões de motilidade dos espermatozoides suíno;
- Alterações de membrana plasmática e acrossomal dos espermatozoides suíno;
- Alterações no potencial de membrana mitocondrial dos espermatozoides suíno;
- Alterações na estabilidade (fluidez) da membrana plasmática ligadas ao processo de capacitação dos espermatozoides suíno;
- Alterações na peroxidação lipídica da membrana plasmática dos espermatozoides suíno;
- Estresse oxidativo no citoplasma dos espermatozoides suínos;
- Melhora no índice de fertilidade das fêmeas suínas inseminadas com estas doses inseminantes.

4 OBJETIVOS

- Avaliar os efeitos do antioxidante resveratrol sobre os espermatozoides suíno armazenado sob refrigeração entre 15-17°C por 72 horas com relação a cinética espermática, integridade das membranas plasmática e acrossomal, potencial de membrana mitocondrial, peroxidação lipídica da membrana plasmática, estresse oxidativo intracitoplasmático;
- Avaliar qual concentração do antioxidante resveratrol é mais eficaz para melhorar as variáveis citadas acima;
- Verificar se a adição de resveratrol aumenta a fertilidade do sêmen suíno processado e armazenado (15-17°C) para inseminação artificial intra-uterina.

5 MATERIAL E MÉTODOS

Nesta sessão encontram-se descritas as metodologias empregadas no presente experimento.

5.1 LOCAL

O experimento foi realizado no Laboratório de Andrologia e Tecnologia de Embriões Suínos (LATES) (Figura 1) e no Laboratório de Pesquisa em Suínos (LPS) que integram o Núcleo de Pesquisa em Suínos (NPS) da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ) da Universidade de São Paulo e no Laboratório de Morfofisiologia Molecular e Desenvolvimento (LMMD) (Figura 2) pertencente à Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos (FZEA) da Universidade de São Paulo, ambos localizados no *campus* administrativo da USP Pirassununga.

Figura 1 - Laboratório de Andrologia e Tecnologia de Embriões Suínos (LATES, FMVZ-USP)

Fonte: (N.P.S., 2016)

Figura 2 - Citômetro de Fluxo BD Accuri C6 (LMMD, FZEA-USP)

Fonte: (N.P.S., 2016)

5.2 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Esta pesquisa foi realizada em duas partes, sendo a primeira uma avaliação *in vitro*, a qual foi verificado a melhor concentração de resveratrol a ser adicionada ao sêmen refrigerado de cachacos. A segunda foi um teste *in vivo* avaliando a fertilidade do sêmen contendo a dose de resveratrol com os melhores resultados *in vitro*.

O experimento *in vitro* (Figura 3) foi delineado em blocos generalizados, sendo cada cachaco considerado um bloco, para eliminar qualquer efeito do animal nas respostas estudadas. A unidade experimental foi considerada $\frac{1}{4}$ do ejaculado. Ao delineamento em blocos foi adicionado o complemento de delineamento medidas repetidas no tempo, referente aos diferentes momentos de análise das amostras (0 = 90 min. pós preparo da amostra, 24, 48 e 72 horas após a distribuição nos tratamentos).

Figura 3 - Esquema experimental das análises realizadas

Fonte: (RIGO, V. H. B., 2016)

Para o experimento *in vivo* foi utilizado o delineamento inteiramente casualizado sendo cada fêmea uma unidade experimental. Os procedimentos empregados foram a IAIU com dose de sêmen com $1,0 \times 10^9$ espermatozoides diluída em 50 ml de diluidor BTS adicionada da melhor concentração de resveratrol encontrada no experimento *in vitro*. Neste experimento foi avaliada a taxa de fertilidade ajustada calculada pela relação entre embriões totais sobre o número de embriões recuperados de cada fêmea.

5.3 EXPERIMENTO *IN VITRO* – EFEITO DAS DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE RESVERATROL NAS CARACTERÍSTICAS DA MOTILIDADE, INTEGRIDADE DAS MEMBRANAS PLASMÁTICA E ACROSSOMAL, POTENCIAL MITOCONDRIAL, FLUIDEZ DE MEMBRANA PLASMÁTICA, PEROXIDAÇÃO DE MEMBRANA PLASMÁTICA E ESTRESSE OXIDATIVO INTRACIPLASMÁTICO DE ESPERMATOZOIDES ARMAZENADOS À 15-17°C POR 72 HORAS

5.3.1 Animais

Foram utilizados seis cachacos híbridos comerciais (Figura 4). Os animais foram submetidos a manejo nutricional e sanitário idênticos e ficaram alojados nas dependências do LPS-FMVZ/USP. Os animais foram alojados em baias individuais com metragem de 9,76 m²/animal, providas de comedouro e bebedouros tipo chupeta. Durante o período experimental os animais receberam uma dieta basal seguindo recomendações do NRC (1998). O consumo estabelecido foi de acordo com o peso do animal podendo variar de 2,4 a 3,1 kg/animal/dia (3,15 Mcal/EM/Kg; 16% PB; 0,85% lisina; 0,75% Ca; 0,65% P). O arração foi dividido em duas vezes ao dia, 7:00 e 13:00 horas.

Figura 4 - Cachaços alojados no Núcleo de Pesquisa em Suínos (FMVZ-USP)

Fonte: (N.P.S., 2016)

5.3.2 Coleta do sêmen e avaliações espermáticas iniciais

Foram obtidos 6 ejaculados totais de cada cachorro ($n=36$) através do método da mão enluvada. Para tanto, foi realizada prévia higienização do prepúcio do macho (Figura 5). Em seguida o sêmen *in natura* foi avaliado quanto às características da motilidade usando o sistema computadorizado de análise do sêmen (Sperm Class Analyzer- Microptic®, Microptic S.L., Barcelona, Espanha), através da captura de imagens simultâneas por uma câmera acoplada a um microscópio equipado com contraste de fase (Nikon®, Modelo Eclipse Ni-U 80i) e a morfologia espermática por contraste de interferência diferencial (DIC). Somente ejaculados com motilidade total acima de 80 %, alterações morfológicas abaixo de 20 % e com concentrações superiores a 150×10^6 espermatozoides por mililitro foram submetidos à diluição com os tratamentos propostos.

Figura 5 - (A) Higienização do divertículo prepucial e (B) coleta de sêmen através do método da mão enluvada

Fonte: (RIGO, V. H. B., 2016)

5.3.3 Concentração espermática

A concentração espermática foi realizada por meio da diluição do sêmen em formol salino 4% (Anexo A) na proporção de 1: 100, ou seja, 10 μ L de sêmen em 990 μ L de formol salino tamponado (Anexo A). A contagem espermática foi realizada em câmara de Neubauer (Laboroptic, Lancing, United Kingdom), sob microscopia óptica comum (Nikon® – Eclipse E200), em aumento de 400x (Figura 6).

Figura 6 - Contagem espermática por meio da utilização da câmara de Neubauer em aumento de 400x

Fonte: (N.P.S., 2016)

5.3.4 Avaliação das características morfológicas

As avaliações das características morfológicas dos espermatozoides foram realizadas pela técnica da câmara úmida. Para tanto, o sêmen foi diluído e fixado em formol salino tamponado, previamente aquecido à 37°C. Foi preparada uma gota de sêmen diluído entre lâmina e lamínula e a avaliação foi realizada pela contagem de 200 células em aumento de 1000x com óleo de imersão em microscopia de contraste de interferência diferencial (D.I.C.) (Nikon®, Modelo Eclipse Ni-U 80i) (Figura 7).

Os defeitos foram divididos em defeitos de acrossoma, cabeça, colo, peça intermediária, cauda, gota protoplasmática proximal e formas teratológicas (CBRA, 1998).

Figura 7 - Análise morfológica dos espermatozoides em microscópio de contraste de interferência diferencial (D.I.C.)

Fonte: (N.P.S., 2016)

5.3.5 Distribuição nos tratamentos

Após a coleta e avaliação do sêmen *in natura*, este foi submetido à diluição em meio BTS (Beltsville Thawing Solution, IMV Technologies, L'Aigle, França) calculando-se uma concentração de 50×10^6 espermatozoides por mililitro (mL) atingindo um volume final da DI de 20 ml segundo Melizara et al. (2005). As doses foram produzidas em "split sample", ou seja, para os diferentes tratamentos foi utilizado o mesmo ejaculado obtido de cada macho.

O sêmen diluído foi dividido nos seguintes tratamentos: 0 (BTS + 7,5µL de D.M.S.O.), 0,01 (BTS + 7,5µL de RVT à 0,01 mM) [concentração equivalente de 10µM utilizada por Martin-Hidalgo et al. (2013) em suínos], 0,1 (BTS + 7,5µL de RVT à 0,1 mM) [concentração equivalente à 100µM utilizada por Martin-Hidalgo et al. (2013) em suínos; Garcez et al. (2010) – em humanos e Collodel et al. (2011)- em roedores e humanos] e 1,0 (BTS + 7,5µL de RVT à 1,0 mM) [Bucak et al. (2015)- em bovinos; Garcez et al. (2010) – em humanos], utilizando o antioxidante Resveratrol (R5010- Sigma-Aldrich Co., Saint Louis, Missouri, EUA) (Anexo B).

Em seguida, as amostras permaneceram por 90 minutos em temperatura ambiente e protegidas da luz antes de serem transferidas para o refrigerador. As amostras com os diferentes tratamentos foram acondicionadas à temperatura de 15 a 17°C e foram avaliadas nos intervalos 0 (90 min pós-diluição), 24, 48 e 72 horas para os seguintes parâmetros: cinética espermática,

integridade das membranas plasmática e acrossomal, potencial de membrana mitocondrial, fluidez de membrana plasmática (capacitação), peroxidação das membranas e estresse oxidativo do citoplasma espermático.

5.3.6 Indução ao estresse oxidativo

No momento 72 horas das análises por citometria de fluxo, foram realizadas induções ao estresse oxidativo de amostras dos tratamentos para serem analisadas em paralelo com as mesmas amostras não submetidas a este procedimento, com a finalidade de verificar se haveria algum tratamento que conseguisse neutralizar a produção excessiva de EROs induzida e mantivesse os valores dos parâmetros espermáticos analisados próximos às amostras não induzidas, mesmo após o desafio.

Deste modo, previamente à adição das sondas e suas incubações para a realização das suas respectivas análises, foi realizado um protocolo de indução ao estresse oxidativo utilizando peróxido de hidrogênio (H_2O_2) 500 mM e sulfato de ferro (FeSO_4) 64 mM (Anexo C). Então, para a indução ao estresse oxidativo para realização das análises de integridade de membranas plasmática e acrossomal, potencial de membrana mitocondrial e estabilidade (fluidez) da membrana plasmática, foi utilizada uma amostra de 445 μl de sêmen diluída a uma concentração de 5×10^6 espermatozoides por mililitro e adicionado 50 μl de H_2O_2 e 5 μl de SFe. Após a adição dos indutores, a amostra foi incubada por 30 minutos à 37°C com a tampa do microtubo aberta. Passado o tempo de incubação da indução, a amostra foi dividida em três tubos com 150 μl cada. A partir disto, os procedimentos para cada análise foram os mesmo daqueles descritos nos itens 5.3.8.1, 5.3.8.2 e 5.3.8.3.

Para a preparação das amostras de sêmen induzidas para realização das análises de peroxidação da membrana plasmática e estresse oxidativo do citoplasma, foram utilizadas amostras de 150 μl de sêmen diluída a uma concentração de 5×10^6 espermatozoides por mililitro e adicionado 15 μl de H_2O_2 e 1,5 μl de SFe. Estas amostras foram incubadas por 30 minutos à 37°C com a tampa do microtubo aberta. A partir disto, os procedimentos para cada análise foram os mesmo daqueles descritos nos itens 5.3.8.4 e 5.3.8.5.

5.3.7 Avaliação computadorizada das características da motilidade e detecção da população hiperativada

Com a finalidade de examinar o padrão de motilidade dos espermatozoides, as amostras foram analisadas pelo sistema de análise computadorizada do sêmen (CASA) através do software Sperm Class Analyzer (SCA- Microptic®, Microptic S.L., Barcelona, Espanha) (Anexo G) montado em um microscópio de epifluorescência (Nikon®, Modelo Eclipse Ni-U 80i) (Figuras 8 e 9) no Laboratório de Andrologia e Tecnologia de Embriões Suínos (LATES-FMVZ/USP). Para que fosse possível a realização das análises neste equipamento, as amostras com os tratamentos a uma concentração de 50×10^6 espermatozoides por mililitro foram diluídas em meio TALP *sperm* (Anexo D) a fim de se obter amostras com concentração espermática de 30×10^6 por mililitro. As características analisadas foram: motilidade total (%), motilidade progressiva (%), velocidade de trajeto (VAP, $\mu\text{m/s}$), velocidade progressiva (VSL, $\mu\text{m/s}$), velocidade curvilínea (VCL, $\mu\text{m/s}$), amplitude do deslocamento lateral da cabeça (ALH, μm), frequência de batimento (BCF, Hz), retilinearidade (STR, %), linearidade (LIN, %), hiperativos (HIPER, %) e espermatozoides rápidos (RAP, %).

Figura 8 - Sistema de análise computadorizada do sêmen (SCA, Microptic® S. L., Barcelona, Espanha) instalado em um computador com câmera acoplada a um microscópio de epifluorescência (Nikon®, Modelo Eclipse Ni-U 80i) para captura de imagens

Fonte: (N.P.S., 2016)

Figura 9 - Imagem gerada pelo programa de análise computadorizada do sêmen Sperm Class Analyzer (SCA, Microptic® S. L., Barcelona, Espanha)

Fonte: (N.P.S., 2016)

Os espermatozoides marcados em vermelho foram classificados como rápidos, os em verde apresentam velocidade média, em azul são os espermatozoides considerados lentos e aqueles marcados em amarelo são os espermatozoides estáticos.

5.3.8 Análises por citometria de fluxo

As amostras para coloração e análise em citometria de fluxo foram diluídas em meio modificado de Tyrode's (TALPm) (Anexo E). O pH do meio foi corrigido até 7,4 com o uso de NaOH 1 N. Após a adição das sondas fluorescentes (Anexo F) indicadas para as análises (itens 3.8.1, 3.8.2, 3.8.3, 3.8.4 e 3.8.5), as amostras de sêmen incubadas em TALPm foram analisadas no citometro de fluxo BDAccuri C6 (Beckton-Dickeson, San Jose, USA), (Figura 1) controlado pelo *software* BDAccuri C6 (Beckton-Dickeson, San Jose, USA). As amostras passaram no instrumento com uma taxa de aquisição de aproximadamente 600-1000 eventos/s, sendo adquiridas 10.000 células por análise. As células marcadas com as respectivas sondas fluorescentes utilizadas para cada análise foram interceptadas simultaneamente por um laser de argônio na faixa de 488 nm e por um laser vermelho na faixa de 640 nm. A emissão da fluorescência das sondas excitadas pelo laser de argônio foram captadas pelos canais FL1 (Band Pass-533/30 nm), FL2 (Band Pass- 585/40 nm) e FL3 (Long Pass > 670 nm), já as sondas excitadas pelo laser vermelho, tiveram sua emissão de fluorescência captada pelo canal FL4 (Band Pass- 675/25 nm).

5.3.8.1 Avaliação da integridade das membranas plasmática e acrossomal por citometria de fluxo

As alíquotas foram retiradas das amostras e adicionadas ao TALP *sperm* (BAVISTER; LIEBFRIED; LIEBERMAN, 1983) modificado (TALPm) em tubos de microcentrifugação (1,5 mL) pré-aquecidos a 37°C, a fim de se obter amostras com concentração de 5×10^6 espermatozoides por mL em um volume final de 147 µL. A seguir, foi adicionada 1,0 µL da sonda Syto 59 (5 mM, S10341, Molecular Probes Inc., Eugene, Oregon, EUA) com posterior incubação por 10 minutos a 37°C. O uso desta sonda teve como objetivo, corar o DNA das células espermáticas para que não houvesse a contagem de forma equivocada de partículas com o mesmo tamanho e granulosidade do espermatozoide. Passado o período de incubação, foram

adicionados a amostra 1,0 μL de Iodeto de Propídio (IP-0,5 mg/mL, L0770, Sigma-Aldrich Co., Saint Louis, Missouri, EUA), conjuntamente com a adição de 1,0 μL de aglutinina de *Pisum sativum* conjugada ao isotiocionato de fluoresceína (FITC-PSA-100 $\mu\text{g/mL}$, L-0770, Sigma-Aldrich Co., Saint Louis, Missouri, EUA). Estas duas sondas tiveram os seguintes objetivos: corar as células com membrana plasmática lesada (IP positivo) (CELEGHINI et al., 2007; DE ANDRADE et al., 2007) e com a membrana acrossomal reagida (FITC-PSA positivo) (DE ANDRADE et al., 2006, 2011). Após 10 minutos de incubação à 37°C, os espermatozoides foram diluídos com a adição de 150 μL de TALPm nos mesmos microtubos onde as sondas foram incubadas. Com isso, as amostras apresentaram uma concentração de $2,5 \times 10^6$ espermatozoides por mL no momento que foram analisadas pela técnica de citometria de fluxo. Todas as amostras tiveram 10.000 células analisadas. Os gráficos 1.a, 1.b, 1.c, 1.d e 1.e abaixo foram gerados a partir do software BD Accuri C6.

Gráfico 1 - **1.a)** Histograma de pré-seleção espermática através do tamanho e complexidade interna das células; **1.b)** Histograma de seleção da população Syto 59 positiva a partir da população pré-selecionada no gráfico 1.a; **1.c)** Histograma representando a população com membrana plasmática lesionada (PI+); **1.d)** histograma representando a população com acrossoma reagido (PSA+); **1.e)** Dotplot PSA x PI possibilitou a divisão dos espermatozoides positivos para Syto 59 em quatro populações distintas: AIML – acrossoma íntegro e membrana plasmática lesionada; ARML – acrossoma reagido e membrana plasmática lesionada; AIMI – acrossoma e membrana plasmática íntegra; ARMI – acrossoma reagido e membrana plasmática íntegra

5.3.8.2 Avaliação do potencial de membrana mitocondrial do espermatozoide por citometria de fluxo

As alíquotas retiradas das amostras foram adicionadas ao TALP *sperm* modificado (TALPm) em tubos de microcentrifugação (1,5 mL) pré-aquecidos a 37°C, a fim de se obter amostras com concentração de 5×10^6 espermatozoides por mililitro em um volume final de 147 µL de amostra. A seguir, foi adicionada 1,0 µL da sonda Syto 59 (5 mM, S10341, Molecular Probes Inc., Eugene, Oregon, EUA), 1,0 µL de Iodeto de Propídio (IP-0,5 mg/mL, L0770, Sigma-Aldrich Co., Saint Louis, Missouri, EUA) e 1,0 µL de JC-1 (153 µM, T3168, Molecular Probes Inc., Eugene, Oregon, EUA) com posterior incubação por 10 minutos a 37°C. Passado o período de incubação os espermatozoides foram diluídos com a adição de 150 µL de TALPm no mesmo microtubo onde foram adicionadas as sondas fluorescentes. Com isso, as amostras apresentaram uma concentração de $2,5 \times 10^6$ espermatozoides por mL no momento de serem analisadas pela técnica de citometria de fluxo. Todas as amostras tiveram 10.000 células analisadas. A marcação com a sonda JC-1 permitiu a classificação das células com membrana plasmática íntegra em duas categorias: com alto potencial de membrana mitocondrial (Alive HP) e baixo potencial de membrana mitocondrial (Alive LP) (DE ANDRADE, 2011). Os Gráficos 2.a, 2.b, 2.c, 2.d e 2.e abaixo foram gerados a partir do software BD Accuri C6.

Gráfico 2 - 2.a) Histograma de pré-seleção espermática através do tamanho e complexidade interna das células; 2.b) Histograma de seleção da população Syto 59+ a partir da população pré-selecionada no gráfico 2.a; 2.c) Histograma representando a porcentagem da população Syto 59+ com membrana plasmática lesionada (PI+); 2.d) Histograma representando a porcentagem da população Syto 59+ com alto potencial de membrana mitocondrial (JC-1 +); 2.e) Dotplot JC-1 x IP possibilitou a divisão dos espermatozoides positivos para Syto 59 em três populações distintas: vivos com alto potencial (Alive HP), vivos com baixo potencial (Alive LP) e mortos (Dead)

5.3.8.3 Avaliação da estabilidade (Fluidez) da membrana plasmática por citometria de fluxo

Para a análise da estabilidade da membrana plasmática pela técnica de citometria de fluxo (FLESCH et al., 1999), as amostras foram incubadas em solução de TALPm na concentração de 5×10^6 espermatozoides/mL em um volume final de 145 μL . Então, 1,0 μL da sonda fluorescente Yo-Pro-1 foi adicionada a amostra (7,5 μM -Molecular Probes Inc., Eugene, Oregon, EUA) obtendo-se uma concentração final de 25 nM. O Yo-Pro-1 é impermeável a membrana plasmática íntegra, se ligando ao DNA das células com a membrana plasmática lesada. A amostra foi incubada por 20 minutos com a sonda Yo-Pro e restando 5 minutos para o final da incubação foi adicionado 1,0 μL de Syto 59 e 3,0 μL da sonda fluorescente merocianina 540 (810 μM -Molecular Probes Inc., Eugene, Oregon, EUA) a fim de se obter uma concentração de 101,25 μM em uma solução final de 150 μL . As amostras com todas as sondas foram diluídas em 150 μL de TALPm nos mesmos microtubos onde foram adicionadas, resultando em uma concentração de $2,5 \times 10^6$ espermatozoides por mL no momento de serem analisadas pela técnica de citometria de fluxo, no qual foi avaliado as porcentagens de espermatozoides viáveis (Yo-Pro-1 negativo) com aumento na desordem da bicamada lipídica (Merocianina 540 positivo) (DE ANDRADE et al., 2012). Os gráficos 3.a e 3.b abaixo foram gerados a partir do software BD Accuri C6.

Gráfico 3 - 3.a) O gráfico de pontos gerado pela análise por citometria de fluxo em amostra corada com a associação das sondas fluorescentes Yo-Pro, Merocianina 540 e Syto 59. Neste gráfico podem-se observar duas categorias distintas, sendo que o quadrante LIVE contém os espermatozoides suínos com a membrana plasmática íntegra e selecionados para a avaliação da intensidade de fluorescência da merocianina 540; 3.b) O histograma representa o pico de intensidade de fluorescência da merocianina 540 da população selecionada no quadrante LIVE. O valor obtido é indicado no quadro da mediana de intensidade de fluorescência do canal FL2-A onde é detectado a emissão de fluorescência da sonda Merocianina 540

Merocianina: A01 1 48 C C3	Median FL2-A
Gated on (syto 59 + in sperm + debris#) except (DEAD in (syto 59 ...	
MR + (7.763,0 / 11.926.492,0)	9.252,5

5.3.8.4 Avaliação da peroxidação das membranas espermáticas por citometria de fluxo

Foram retiradas alíquotas de sêmen durante as etapas de análise a fim de obter amostras diluídas em TALPm com 5×10^6 espermatozoides/mL em um volume final de 147 μ L. Estas foram então coradas com 1 μ L da sonda C11-BODIPY^{581/591} (1 mg/mL, D-3861, Molecular Probes Inc., Eugene, Oregon, EUA) e incubadas por 30 minutos à 37°C. Restando 5 minutos para o fim da incubação da sonda C11-BODIPY^{581/591}, foram adicionados 1,0 μ L de Syto 59 e 1,0 μ L de Iodeto de Propídio. Passado os 5 minutos restantes de incubação, os espermatozoides foram diluídos com a adição de 150 μ L de TALPm nos mesmos microtubos onde as sondas foram incubadas. Com isso, as amostras apresentaram uma concentração de $2,5 \times 10^6$ espermatozoides por mL no momento de serem analisadas por citometria de fluxo (DE ANDRADE et al., 2012). Foram analisadas 10.000 células por amostra. As células viáveis (IP negativo) e coradas com a sonda C11-BODIPY^{581/591} foram analisadas quanto à mediana de intensidade de emissão de fluorescência captada no pelo canal FL1 com band pass de 533 ± 30 nm. Esta faixa corresponde às células que estão sofrendo ação da peroxidação.

Gráfico 4 - **4.a)** Histograma de pré-seleção espermática através do tamanho e complexidade interna das células; **4.b)** Histograma de seleção da população Syto 59+ a partir da população pré-selecionada no gráfico 4.a; **4.c)** Histograma representando a porcentagem da população Syto 59+ com membrana plasmática lesionada- DEAD (PI+) e íntegra- ALIVE (PI-); **4.d)** O histograma apresenta o pico de intensidade de fluorescência da população selecionada no gate ALIVE do gráfico 4.c que está passando por processo de peroxidação da membrana plasmática. O valor obtido é indicado no quadro da mediana de intensidade de fluorescência do canal FL1-A

BP +: A01 1 48 C C3 Gated on ((SYTO in Sperm + debris) and (ALIVE in (SYTO...))	Median FL1-A
Body + (2.561,0 / 552.897,0)	3.195,0

5.3.8.5 Avaliação do estresse oxidativo no citoplasma espermático por citometria de fluxo

As alíquotas retiradas das amostras foram adicionadas ao TALP *sperm* modificado (TALPm) em tubos de microcentrifugação (1,5 mL) pré-aquecidos a 37°C, a fim de se obter amostras com concentração de 5×10^6 espermatozoides por mililitro em um volume final de 147 µl de amostra. Estas foram então coradas com 1 µl da sonda Dihidroetídio (DHE) (1 mL, D-23107, 5mM, Molecular Probes Inc., Eugene, Oregon, EUA) e incubadas por 30 minutos à 37°C. A sonda fluorescente Dihidroetídio (DHE) tem sido usada com sucesso para mensurar a produção intracelular de O_2^- (RICE et al., 2003). Esta sonda é altamente permeável para as células e é oxidada pelo O_2^- em etídio, um fluoróforo com afinidade ao DNA (BENOV; SZTEJNBERG; FRIDOVICH, 1998), emitindo fluorescência vermelha. Passado 10 minutos da incubação da sonda DHE, 1 µl da sonda Yo-Pro foi adicionado à amostra e restando 5 minutos para o fim da incubação da sonda DHE, 1 µl da sonda Syto 59 foi adicionado. Os espermatozoides foram diluídos com a adição de 150 µL de TALPm nos mesmos microtubos onde as sondas foram incubadas. Com isso, as amostras apresentaram uma concentração de $2,5 \times 10^6$ espermatozoides por mL no momento de serem analisadas por citometria de fluxo (DE ANDRADE et al., 2012). As células viáveis (Yo-Pro negativo) e coradas com a sonda DHE foram analisadas quanto à mediana de intensidade de emissão de fluorescência captada no pelo canal FL2 com band pass de 585 ± 40 nm.

Gráfico 5 - **5.a)** Histograma de pré-seleção espermática através do tamanho e complexidade interna das células; **5.b)** Histograma de seleção da população Syto 59+ a partir da população pré-selecionada no gráfico 5.a; 5.c) Histograma representando a porcentagem da população Syto 59+ com membrana plasmática lesionada (Yo-Pro+) e íntegra (Yo-Pro-); **5.d)** O histograma apresenta o pico de intensidade de fluorescência da população de espermatozoide suíno selecionada no gate Yo-Pro- do gráfico 5.c que está sofrendo estresse oxidativo no citosol. O valor obtido é indicado no quadro da mediana de intensidade de fluorescência do canal FL2-A.

DHE +: H09 6 72 C C1	Median FL2-A
Gated on (Syto 59 in Sperm + debris#) except (Yo-Pro + i...	
DHE + (2.561,0 / 279.402,0)	2.954,0

5.4 EXPERIMENTO *IN VIVO* - EFEITO DO RESVERATROL NA FERTILIDADE DOS ESPERMATOZOIDES SUÍNOS ARMAZENADOS À 15-17°C

5.4.1 Local

O experimento foi realizado no Laboratório de Andrologia e Tecnologia de Embriões Suínos (LATES) e no Laboratório de Pesquisa em Suínos (LPS) ambos pertencentes ao Núcleo de Pesquisa em Suínos da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, localizados no campus administrativo de Pirassununga.

5.4.2 Animais

5.4.2.1 Fêmeas

Para a realização do estudo foram utilizadas vinte e oito marrãs púberes de linhagem híbrida comercial (Figura 10) as quais foram submetidas a manejo nutricional e sanitário idênticos. As fêmeas foram alojadas na unidade de gestação, em gaiola de gestação composta de comedouro automático, bebedouro tipo chupeta e piso parcialmente ripado, com metragem de 1,32 m²/animal. As fêmeas foram alimentadas duas vezes ao dia (7:00 e 13:00h) a fim de suprir os requerimentos descritos por Rostagno (2011).

Figura 10 - Marrãs destinadas ao experimento *in vivo* alojadas em gaiolas individuais na granja experimental do NPS, FMVZ-USP

Fonte: (N.P.S., 2016)

5.4.2.2 Machos

Para a realização do experimento *in vivo* foi utilizado um pool de sêmen de dois machos que apresentaram os melhores resultados (machos Betão e 06) no experimento *in vitro* quanto às características de motilidade total e progressiva, além da integridade das membranas plasmática e acrossomal (Tabela 1).

Tabela 1 - Médias $\pm$ erro padrão das características de cinética espermática e da integridade das membranas plasmática e acrossomal

Reprodutores	Características espermáticas (%)		
	Motilidade total	Motilidade progressiva	AIMI
Betão	83,40 $\pm$ 2,33 ^{a,b}	62,70 $\pm$ 5,00 ^{a,b}	86,95 $\pm$ 2,91
03	72,55 $\pm$ 8,95 ^c	55,80 $\pm$ 12,50 ^{a,b}	80,51 $\pm$ 2,22
04	76,82 $\pm$ 2,72 ^{b,c}	60,12 $\pm$ 3,25 ^{a,b}	84,32 $\pm$ 1,71
06	82,67 $\pm$ 2,69 ^{a,c}	70,02 $\pm$ 2,60 ^a	84,80 $\pm$ 4,06
02	85,47 $\pm$ 2,40 ^a	70,17 $\pm$ 2,97 ^a	88,74 $\pm$ 1,36
01	77,70 $\pm$ 1,74 ^{a,c}	57,02 $\pm$ 2,18 ^b	88,43 $\pm$ 3,10

Fonte: (RIGO, V. H. B., 2016)

^{a,b}Letras diferentes na mesma coluna representam diferença estatística ($p < 0,05$).

5.4.3 Coleta de sêmen e análises iniciais

Idem ao item 5.3.2

5.4.4 Distribuição dos tratamentos experimentais

O sêmen dos dois reprodutores foram coletados simultaneamente e misturados formando um *pool*. A concentração foi obtida pela contagem em câmara de Neubauer. Em seguida, o *pool* de sêmen foi dividido em dois tratamentos, a saber; 0 (Controle)- diluição em meio BTS (Beltsville Thawing Solution, IMV Technologies, L'Aigle, França) com 250 μ l de solução D.M.S.O. calculando-se uma concentração de 20×10^6 espermatozoides por mililitro (mL) atingindo um volume final da DI de 50 ml e 0,01 mM (Resveratrol)- diluição em meio BTS com a adição de 250 μ l de resveratrol (0,01 mM) (R5010, 100 mg - Sigma-Aldrich Co., Saint Louis, Missouri, EUA) (Anexo B) calculando-se uma concentração de 20×10^6 espermatozoides por mililitro (mL) atingindo um volume final da DI de 50 ml. Para o delineamento deste experimento, optamos pela concentração de 0,01 mM de resveratrol, pois a utilização de qualquer outra concentração dentre aquelas estipuladas no experimento *in vitro* inviabilizaria financeiramente a execução do experimento *in vivo*, uma vez que demandaria um alto volume de resveratrol, onerando os gastos do processo.

As doses produzidas permaneceram por 90 minutos em temperatura ambiente e protegidas da luz antes de serem transferidas para o refrigerador. As doses foram acondicionadas à temperatura de 15 a 17°C por 72 horas para então serem utilizadas para as inseminações.

Para cada grupo inseminado, foi preparado uma dose inseminante extra do tratamento CON (0) e RVT (0,01 mM de resveratrol), a fim de se avaliar a motilidade e integridade de membrana plasmática dos espermatozoides antes da realização das inseminações.

5.4.5 Inseminação artificial em tempo fixo (IATF)

O estro que foi utilizado para a inseminação (segundo ou terceiro) respeitou a condição do escore corporal, a espessura do toucinho (por ultrassonografia) e o peso adequados para a realização do procedimento de I.A em nulíparas à nível comercial. Para tal, estas características foram avaliadas em intervalos quinzenais. Diante do quadro de dispersão de manifestação de estros esperado e observado neste período pós-púbere e visando concentrar as IA, foi implantado um protocolo de IATF (Figura 11) à base de progestágeno altrenogest (Regumate[®], MSD saúde animal), gonadotrofina coriônica equina (eCG-Novormon[®]) e hormônio Luteinizante (LH - Lutropin[®]). O protocolo hormonal utilizado foi baseado no protocolo descrito por Degenstein et al. (2008) seguido por algumas alterações. As fêmeas foram sincronizadas utilizando 5ml do progestágeno altrenogest (4mg/ml de Regumate[®]) por 18 dias consecutivos (Figura 2). Após 24 horas do término do oferecimento do Altrenogest, foi aplicado uma dose intramuscular de 600 UI de eCG (Novormon[®]). Passados 72 horas dessa aplicação foi realizado a aplicação intramuscular de LH (2,5 mg-Lutropin[®]; CANDINI et al., 2004; GAMA et al., 2005) como indutor de ovulação. Transcorrido 36 horas da aplicação do LH (CANDINI et al., 2001), estas fêmeas foram inseminadas uma única vez.

Figura 11 - Ilustração do programa de sincronização para a realização da inseminação artificial em tempo fixo

Fonte: (TORRES, M. A., 2015)

As inseminações artificiais foram realizadas, pela técnica de inseminação intrauterina (BORTOLOZZO; BERNARDI; WENTZ, 2005) sem a presença do rufião (Figura 12). Foi utilizado o sêmen oriundo dos dois tratamentos (0 e 0,01), sendo inseminadas 14 fêmeas por tratamento. A recuperação dos embriões foi realizada 5 dias após a inseminação artificial.

Figura 12 - Procedimento de inseminação artificial intrauterina nas marrãs do experimento *in vivo*, sem a presença do rufião

Fonte: (RIGO, V. H. B., 2016)

5.4.6 Abate, coleta e avaliação dos embriões suínos

O abate das fêmeas suínas, para coleta do trato reprodutivo, atendeu a normas legais e de bioética. Anteriormente à eletronarcose, foi introduzida na cérvix das fêmeas uma pipeta de inseminação artificial, visando evitar o refluxo de urina para o interior do útero. O processo de retirada do aparelho reprodutivo se deu logo após a sangria, através de uma incisão sobre a linha alba na região inguinal e retirada o trato reprodutivo como um todo, em seguida foi realizada a sutura da musculatura, tecidos adjacentes e pele, permitindo que a carcaça seguisse a linha de abate normal.

O conjunto composto por cérvix, útero, tubas uterinas e ovários foi então acondicionado em sacos plásticos identificados, sendo imediatamente acondicionados em isopor e transportados em temperatura ambiente para o LPS. O aparelho reprodutivo foi, primeiramente, posicionado, respeitando sua posição anatômica, permitindo assim, a identificação dos antímeros direito e esquerdo. Os ovários foram então retirados do conjunto e identificados, e a partir desses, foi averiguada a taxa de ovulação (número de corpos lúteos). Procedeu-se então, a dissecação da tuba uterina a partir do óstio abdominal da tuba uterina em direção à junção útero-tubária e cerca de 10 centímetros de útero após o óstio uterino da tuba uterina, onde foram colocadas duas pinças hemostáticas tipo Kelly para seccionar e retirar estes dois segmentos do restante do órgão e proceder a lavagem.

Para a lavagem da tuba uterina e parte do útero (10 cm) (Figura 13), cada antítmero foi lavado separadamente utilizando cerca de 20 mL de Tampão Fosfato Salino Modificado por Dulbecco (DMPBS) (Biodux®) com 1% de Soro Fetal Bovino (SFB) (Vitrocell®) previamente aquecido, os quais foram introduzidos através do óstio abdominal do tuba uterina com auxílio de um tomat acoplado a uma seringa de 20mL. Foi realizada massagem em toda a extensão da tuba uterina a fim de desprender os embriões que, por ventura, estivessem aderidos à parede, direcionando todo o fluído de lavagem para as primeiras porções do útero. Então outra pinça hemostática foi posicionada na junção útero-tubárica para possibilitar a separação da tuba uterina e útero. A porção do útero com o conteúdo de lavagem foi submetido à movimentos em forma de “s”, a extremidade com pinça única foi aberta e o conteúdo drenado para tubos cônicos de 50 ml previamente aquecidos com auxílio de massagem em toda extensão da porção lavada. A tuba uterina foi lavada novamente direto no tubo cônico para garantir que todos os embriões fossem recuperados. O mesmo procedimento foi realizado para ambos antítmeros.

Figura 13 - Procedimento de lavagem da tuba uterina e útero para recuperação de embriões

Fonte: (N.P.S, 2016)

Legenda: A) Posicionamento uterino de acordo com a anatomia suína; B) Contagem de corpos lúteos. C) Preparação das tubas uterinas e cornos para a lavagem; D) Lavagem da tuba uterina com DPBD acrescido de 1% de soro fetal bovino; E) Acondicionamento do lavado em placa de petri para análise sob esteriomicroscopia.

Os tubos devidamente identificados foram acondicionados em caixa de isopor e transportados ao LMMD para avaliação sob esteriomicroscopia em aumento de 20 x, e realizada a contagem e classificação do estágio de desenvolvimento embrionário em placas de petri. Os embriões recuperados foram classificados em viáveis e degenerados, sendo considerados viáveis aqueles embriões encontrados em estágio de desenvolvimento de mórula à blastocisto expandido, pois esta variação de embriões encontrados durante a recuperação correspondeu ao

momento do desenvolvimento embrionário fisiológico e cronológico na fêmea (Figura 14). As variáveis analisadas foram: taxa de prenhez (TP), sendo consideradas prenhes as fêmeas que apresentavam alguma estrutura fecundada, e taxa de fertilidade ajustada (TF), calculada a partir da porcentagem total de embriões sobre as estruturas recuperadas e taxa de embriões viáveis (TEV) calculada a partir da porcentagem de embriões viáveis (estágio embrionário correspondente ao dia da recuperação) sobre o total de embriões recuperados.

Figura 14 - Embriões recuperados (viáveis e degenerados) identificados por esteriomicroscopia e microscopia de contraste de fase, após a realização do lavado da tuba uterina e porção do corno uterino

Fonte: (N.P.S., 2016)

Legenda: A) Oócito não fecundado; B) Embrião degenerado com 2 células; C) Embrião degenerado de 6 à 8 células; D) Embrião degenerado de 8 à 12 células; E) Mórula; F) Mórula compacta; G) Blastocisto inicial; H) Blastocisto; I) Blastocisto expandido.

6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os efeitos obtidos dos procedimentos experimentais foram analisados com prévia verificação da normalidade dos resíduos e homogeneidade das variâncias. As variáveis dependentes que não atenderam às premissas estatísticas foram submetidas à transformação logarítmica e em arco-seno. O experimento *in vitro* foi delineado em blocos generalizados, sendo cada cachaco considerado um bloco e ¼ do ejaculado a unidade experimental. Os dados foram submetidos à análise de variância (PROC MIXED), empregando-se o programa SAS (1998). Para os efeitos de tempo e tratamento, as médias foram comparadas pelo teste de Tukey-Kramer. O nível de significância considerado foi de 5%.

No experimento *in vivo* a taxa de prenhez foi submetida à análise de variância (PROC GLIMMIX) e as demais taxas analisadas foram submetidas à análise de variância (PROC MIXED), empregando-se o programa SAS (1998). Para o efeito de tratamento, as médias foram comparadas pelo teste de Tukey-Kramer. O nível de significância considerado foi de 5%.

7 RESULTADOS

Nesta seção encontram-se descritos os resultados do presente estudo.

7.1 EFEITO DO RESVERATROL SOBRE AS CARACTERÍSTICAS ESTRUTURAIS E FUNCIONAIS DO ESPERMATOZOIDE SUÍNO REFRIGERADO

Neste tópico serão apresentados os resultados do efeito do resveratrol sobre a cinética espermática, integridade de membranas plasmática e acrossomal, potencial de membrana mitocondrial, manutenção da estabilidade (fluidez) da membrana plasmática, peroxidação da membrana plasmática, estresse oxidativo no citosol espermático e sobre as características morfológicas do espermatozoide suíno refrigerado.

7.1.1 Efeito do resveratrol sobre a cinética do espermatozoide suíno

Os resultados das características de movimentação espermática estão apresentados na tabela 2. De uma forma geral, somente a característica de MT apresentou interação entre os tratamentos e os tempos ($p < 0,05$), sendo que não houve diferença ($p > 0,05$) entre os tratamentos 0, 0,01 e 0,1mM ao longo das 72 horas de armazenamento das amostras. Porém, o tratamento 1,0 mM exerceu efeito deletério sobre o movimento espermático, uma vez que os espermatozoides deste tratamento apresentaram menores valores de MT ($p < 0,05$) diferindo dos demais tratamentos ao longo das 72 horas de armazenamento das amostras. O resultado das características de MP e RAP para o tratamento 1,0 mM também foi inferior ($p < 0,05$) aos demais que não diferiram entre si ($p > 0,05$). Estas duas variáveis também sofreram declínio com o avançar do tempo ($p < 0,05$), sendo que para MP a queda ocorreu após 24h e para RAP foi após 48 horas de armazenamento das amostras.

Dentre as velocidades espermáticas aferidas e expostas na tabela 3 apenas a característica VSL não apresentou interação ($p < 0,05$) entre tempo e tratamento. O tratamento 1,0 mM diminuiu a VAP ($p < 0,05$) e VCL ($p < 0,05$) a partir de 24 horas de armazenamento enquanto que os outros tratamentos não diferiram entre si ($p > 0,05$). O VSL também foi afetado negativamente pelo tratamento 1,0 mM ($p < 0,05$), além de ter sido influenciado pelo tempo após 24 horas ($p < 0,05$).

Para as demais características (Tabelas 3 e 3-continuação) ALH, BCF, STR, LIN e HIPER, houve interação entre o tempo e tratamento ($p < 0,05$). Com exceção do efeito dos tratamentos no tempo 0h para as características ALH e BCF, o tratamento 1,0 mM diferiu ($p < 0,05$) dos demais tratamentos em todos os tempos analisados.

Os valores das características que apresentaram interação entre o tratamento 1,0 mM e os tempos, com exceção ao ALH, diminuíram ($p < 0,05$) do tempo 0 horas para os demais tempos que foram iguais ($p > 0,05$) entre eles.

Tabela 2 - Média $\pm$ erro padrão das características de cinética espermática avaliadas pelo programa Sperm Class Analyzer (S.C.A.) da motilidade total (MT), motilidade progressiva (MP) e espermatozoides rápidos (RAP) do espermatozoide suíno refrigerado por 72 horas

Características Espermáticas	Tratamentos (mM)	Tempos (h)				Médias ¹	Probabilidades		
		0	24	48	72		Trat.	Tempo	T*T
MT (%)	0	77,91 $\pm$ 3,38 ^a	77,72 $\pm$ 2,84 ^a	81,97 $\pm$ 1,23 ^a	75,23 $\pm$ 3,80 ^a	78,17 $\pm$ 1,51	<,0001	<,0001	<,0001
	0,01	77,58 $\pm$ 3,63 ^a	79,38 $\pm$ 2,59 ^a	80,54 $\pm$ 1,11 ^a	74,82 $\pm$ 3,64 ^a	77,5 $\pm$ 1,57			
	0,1	77,76 $\pm$ 3,58 ^a	77,59 $\pm$ 2,06 ^a	78,41 $\pm$ 1,36 ^a	69,60 $\pm$ 3,97 ^a	75,90 $\pm$ 1,50			
	1,0	15,81 $\pm$ 2,44 ^{b,A}	2,08 $\pm$ 0,37 ^{b,B}	1,40 $\pm$ 0,27 ^{b,B}	1,45 $\pm$ 0,33 ^{b,B}	5,19 $\pm$ 0,82			
	Médias ²	62,96 $\pm$ 2,81	58,76 $\pm$ 3,13	59,64 $\pm$ 3,15	56,02 $\pm$ 3,22				
MP (%)	0	62,63 $\pm$ 3,40	59,32 $\pm$ 3,15	64,94 $\pm$ 1,39	64,30 $\pm$ 1,52	62,74 $\pm$ 1,31 ^a	<,0001	<,0001	0,1599
	0,01	63,92 $\pm$ 3,51	63,57 $\pm$ 2,53	64,20 $\pm$ 1,27	64,74 $\pm$ 1,44	63,61 $\pm$ 1,30 ^a			
	0,1	62,48 $\pm$ 3,55	58,99 $\pm$ 2,64	60,55 $\pm$ 1,42	61,18 $\pm$ 1,46	60,81 $\pm$ 1,28 ^a			
	1,0	7,43 $\pm$ 1,61	0,38 $\pm$ 0,07	0,59 $\pm$ 0,24	0,35 $\pm$ 0,08	2,12 $\pm$ 0,46 ^b			
	Médias ²	49,72 $\pm$ 2,56 ^A	45,36 $\pm$ 2,57 ^B	46,10 $\pm$ 2,54 ^B	45,68 $\pm$ 2,64 ^B				
RAP (%)	0	48,88 $\pm$ 3,79	47,13 $\pm$ 3,33	46,60 $\pm$ 3,17	44,64 $\pm$ 3,38	46,81 $\pm$ 1,70 ^a	<,0001	<,0001	0,1751
	0,01	50,70 $\pm$ 3,60	50,55 $\pm$ 2,70	44,66 $\pm$ 3,14	45,06 $\pm$ 3,20	47,39 $\pm$ 1,62 ^a			
	0,1	50,64 $\pm$ 3,85	43,75 $\pm$ 2,83	38,29 $\pm$ 2,61	36,33 $\pm$ 3,16	42,25 $\pm$ 19,24 ^a			
	1,0	3,89 $\pm$ 1,10	0,21 $\pm$ 0,05	0,20 $\pm$ 0,12	0,09 $\pm$ 0,05	1,06 $\pm$ 0,29 ^b			
	Médias ²	39,03 $\pm$ 2,36 ^A	35,30 $\pm$ 2,16 ^{A,B}	32,44 $\pm$ 2,05 ^B	31,53 $\pm$ 2,10 ^B				

Fonte: (RIGO, V. H. B., 2016)

Trat.- tratamento, T*T- interação entre tempo e tratamento, Médias¹- médias dos tratamentos, Médias²- médias dos tempos.

^{a,b}Letras minúsculas diferentes na mesma coluna, diferem estatisticamente $p < 0,05$ (teste de Tukey-Kramer).

^{A,B}Letras maiúsculas diferentes na mesma linha, diferem estatisticamente $p < 0,05$ (teste de Tukey-Kramer).

Tabela 3 - Média $\pm$ erro padrão das características de cinética espermática avaliadas pelo programa Sperm Class Analyzer (S.C.A.) velocidade de trajeto (VAP), velocidade progressiva (VSL), velocidade curvilínea (VCL), amplitude lateral da cabeça (ALH) do espermatozoide suíno refrigerado por 72 horas

(continua)

Características Espermáticas	Tratamentos (mM)	Tempos (h)				Médias ¹	Probabilidades		
		0	24	48	72		Trat.	Tempo	T*T
VAP ($\mu\text{m/s}$)	0	44,80 $\pm$ 1,94 ^a	44,56 $\pm$ 1,85 ^a	44,43 $\pm$ 1,65 ^a	43,55 $\pm$ 2,00 ^a	44,33 $\pm$ 0,93	<,0001	<,0001	0,0283
	0,01	45,37 $\pm$ 1,84 ^a	45,57 $\pm$ 1,28 ^a	43,50 $\pm$ 1,80 ^a	43,78 $\pm$ 1,85 ^a	44,30 $\pm$ 0,88			
	0,1	45,10 $\pm$ 2,2,34 ^a	43,23 $\pm$ 1,50 ^a	39,97 $\pm$ 1,68 ^a	39,66 $\pm$ 1,95 ^a	41,94 $\pm$ 0,96			
	1,0	17,18 $\pm$ 1,16 ^{b,A}	8,30 $\pm$ 0,61 ^{b,B}	8,03 $\pm$ 0,61 ^{b,B}	6,97 $\pm$ 0,68 ^{b,B}	9,99 $\pm$ 0,53			
	Médias ²	38,52 $\pm$ 1,38	35,16 $\pm$ 1,52	35,98 $\pm$ 1,48	33,68 $\pm$ 1,55				
VSL ($\mu\text{m/s}$)	0	35,83 $\pm$ 1,46	33,00 $\pm$ 1,25	33,98 $\pm$ 0,89	32,78 $\pm$ 1,44	33,91 $\pm$ 0,64 ^a	<,0001	<,0001	0,5826
	0,01	36,81 $\pm$ 1,50	34,55 $\pm$ 0,86	34,03 $\pm$ 1,10	33,63 $\pm$ 1,47	34,56 $\pm$ 0,66 ^a			
	0,1	36,04 $\pm$ 1,86	32,24 $\pm$ 0,99	30,93 $\pm$ 1,12	30,90 $\pm$ 1,56	32,54 $\pm$ 0,73 ^a			
	1,0	12,16 $\pm$ 1,04	4,60 $\pm$ 0,47	4,03 $\pm$ 0,55	3,56 $\pm$ 0,53	6,10 $\pm$ 0,46 ^b			
	Médias ²	30,43 $\pm$ 1,15 ^A	26,05 $\pm$ 1,17 ^B	25,74 $\pm$ 1,18 ^B	25,67 $\pm$ 1,26 ^B				
VCL ($\mu\text{m/s}$)	0	56,07 $\pm$ 2,33 ^a	57,65 $\pm$ 2,13 ^a	57,83 $\pm$ 1,98 ^a	56,01 $\pm$ 2,33 ^a	56,89 $\pm$ 1,09	<,0001	<,0001	0,0011
	0,01	56,29 $\pm$ 2,07 ^a	58,46 $\pm$ 1,53 ^a	56,29 $\pm$ 1,95 ^a	55,86 $\pm$ 2,05 ^a	56,48 $\pm$ 0,97			
	0,1	56,75 $\pm$ 2,69 ^a	55,86 $\pm$ 1,99 ^a	52,84 $\pm$ 1,90 ^a	51,24 $\pm$ 2,01 ^a	54,16 $\pm$ 1,08			
	1,0	32,14 $\pm$ 1,38 ^{b,A}	19,75 $\pm$ 1,12 ^{b,B}	17,02 $\pm$ 1,44 ^{b,B}	15,40 $\pm$ 1,39 ^{b,B}	20,92 $\pm$ 0,86			
	Médias ²	50,53 $\pm$ 1,40	47,85 $\pm$ 1,63	46,00 $\pm$ 1,69	44,63 $\pm$ 1,74				
ALH (μm)	0	2,03 $\pm$ 0,07 ^{a,b,B}	2,19 $\pm$ 0,05 ^{a,A,B}	2,19 $\pm$ 0,05 ^{a,A}	2,12 $\pm$ 0,05 ^{a,A,B}	2,13 $\pm$ 0,03	<,0001	<,0001	<,0001
	0,01	2,00 $\pm$ 0,06 ^{a,b,B}	2,19 $\pm$ 0,04 ^{a,A}	2,13 $\pm$ 0,05 ^{a,A,B}	2,07 $\pm$ 0,05 ^{a,A,B}	2,10 $\pm$ 0,02			
	0,1	2,07 $\pm$ 0,07 ^{a,A}	2,15 $\pm$ 0,05 ^{a,A}	2,07 $\pm$ 0,06 ^{a,B}	2,03 $\pm$ 0,05 ^{a,A}	2,08 $\pm$ 0,03			
	1,0	1,84 $\pm$ 0,10 ^b	0,77 $\pm$ 0,10 ^b	0,39 $\pm$ 0,07 ^b	0,38 $\pm$ 0,06 ^b	0,86 $\pm$ 0,07			
	Médias ²	1,99 $\pm$ 0,04	1,82 $\pm$ 0,06	1,76 $\pm$ 0,07	1,70 $\pm$ 0,07				

Fonte: (RIGO, V. H. B., 2016)

Trat.- tratamento, T*T- interação entre tempo e tratamento, Médias¹- médias dos tratamentos, Médias²- médias dos tempos.

^{a,b}Letras minúsculas diferentes na mesma coluna, diferem estatisticamente $p < 0,05$ (teste de Tukey-Kramer).

^{A,B}Letras maiúsculas diferentes na mesma linha, diferem estatisticamente $p < 0,05$ (teste de Tukey-Kramer).

(conclusão)									
Características espermáticas	Tratamentos (mM)	Tempos (h)				Médias ¹	Probabilidades		
		0	24	48	72		Trat.	Tempo	T*T
BCF (Hz)	0	5,83 ± 0,06	5,54 ± 0,14 ^a	5,68 ± 0,07 ^a	5,69 ± 0,06 ^a	5,69 ± 0,05	<,0001	<,0001	<,0001
	0,01	5,89 ± 0,07	5,74 ± 0,05 ^a	5,74 ± 0,09 ^a	5,73 ± 0,08 ^a	5,75 ± 0,04			
	0,1	5,74 ± 0,11	5,66 ± 0,07 ^a	5,68 ± 0,09 ^a	5,70 ± 0,08 ^a	5,70 ± 0,04			
	1,0	5,26 ± 0,34 ^A	1,08 ± 0,22 ^{b,B}	0,51 ± 0,10 ^{b,B}	0,33 ± 0,08 ^{b,B}	1,76 ± 0,21			
	Médias ²	5,70 ± 0,08	4,60 ± 0,18	4,47 ± 0,20	4,45 ± 0,21				
STR (%)	0	80,34 ± 1,31 ^{a,A}	74,38 ± 1,24 ^{a,B}	74,57 ± 1,22 ^{a,B}	75,95 ± 1,42 ^{a,B}	76,31 ± 0,67	<,0001	<,0001	<,0001
	0,01	81,09 ± 1,34 ^{a,A}	76,22 ± 0,95 ^{a,B}	76,11 ± 1,21 ^{a,B}	76,94 ± 1,40 ^{a,B}	77,40 ± 0,66			
	0,1	79,77 ± 1,41 ^{a,A}	73,95 ± 1,34 ^{a,B}	75,84 ± 1,24 ^{a,B}	77,56 ± 1,08 ^{a,A,B}	76,78 ± 0,66			
	1,0	67,94 ± 2,12 ^{b,A}	51,54 ± 3,17 ^{b,B}	49,04 ± 2,71 ^{b,B}	55,79 ± 1,93 ^{b,B}	56,24 ± 1,46			
	Médias ²	77,47 ± 0,90	69,62 ± 1,22	69,43 ± 1,26	73,01 ± 1,01				
LIN (%)	0	64,79 ± 1,82 ^{a,A}	56,84 ± 1,62 ^{a,B}	58,31 ± 1,22 ^{a,B}	58,88 ± 1,76 ^{a,B}	59,72 ± 0,84	<,0001	<,0001	0,0041
	0,01	65,31 ± 1,87 ^{a,A}	59,46 ± 1,10 ^{a,B}	59,84 ± 1,23 ^{a,B}	60,16 ± 1,85 ^{a,B}	60,90 ± 0,84			
	0,1	63,38 ± 1,94 ^{a,A}	56,13 ± 1,66 ^{a,B}	58,95 ± 1,35 ^{a,B}	60,16 ± 1,80 ^{a,A,B}	59,66 ± 0,88			
	1,0	35,97 ± 2,07 ^{b,A}	23,41 ± 2,85 ^{b,B}	19,51 ± 1,55 ^{b,B}	23,81 ± 2,24 ^{b,B}	25,66 ± 1,23			
	Médias ²	57,78 ± 1,41	49,25 ± 1,56	49,53 ± 1,61	51,28 ± 1,62				
HIPER (%)	0	6,10 ± 1,42 ^{a,B}	7,55 ± 1,01 ^{a,A,B}	8,80 ± 1,53 ^{a,A}	6,23 ± 1,01 ^{a,A,B}	7,17 ± 0,63	<,0001	<,0001	0,0003
	0,01	5,22 ± 1,08 ^{a,B}	6,74 ± 0,82 ^{a,A}	5,93 ± 0,68 ^{a,A,B}	5,16 ± 0,73 ^{a,A,B}	5,71 ± 0,42			
	0,1	6,88 ± 1,37 ^{a,A,B}	6,78 ± 0,85 ^{a,A}	5,51 ± 0,70 ^{a,A,B}	3,75 ± 0,56 ^{a,B}	5,72 ± 0,47			
	1,0	0,69 ± 0,28 ^{b,A}	0,04 ± 0,01 ^{b,B}	0,07 ± 0,03 ^{b,B}	0,02 ± 0,01 ^{b,B}	0,20 ± 0,07			
	Médias ²	4,78 ± 0,60	5,26 ± 0,46	5,07 ± 0,52	3,79 ± 0,39				

Fonte: (RIGO, V. H. B, 2016)

Trat.- tratamento, T*T- interação entre tempo e tratamento, Médias¹- médias dos tratamentos, Médias²- médias dos tempos.

^{a,b}Letras minúsculas diferentes na mesma coluna, diferem estatisticamente p<0,05 (teste de Tukey-Kramer).

^{A,B}Letras maiúsculas diferentes na mesma linha, diferem estatisticamente p<0,05 (teste de Tukey-Kramer).

7.1.2 Efeito do resveratrol sobre a integridade das membranas plasmática e acrossomal

Os resultados de avaliação simultânea das membranas plasmática e acrossomal estão demonstrados nas tabelas 4 e 5. Os resultados das amostras submetidas previamente à estresse oxidativo no momento 72 horas para avaliação simultânea das membranas plasmática e acrossomal estão expostos na tabela 6.

Para todas as características analisadas e apresentadas nas tabelas 4 e 5, houve interação entre o tempo e tratamento ($p < 0,05$). A conservação dos espermatozoides sob refrigeração com 1,0 mM de resveratrol resultou na redução ($p < 0,05$) da população de células com membrana plasmática íntegra e acrossoma íntegro (AIMI) após 24 horas, bem como, levou ao aumento ($p < 0,05$) da categoria de células indesejáveis, ou seja, aquelas com membrana plasmática lesada e acrossoma reagido (ARML). De forma semelhante, a população de células MI e AI foi menor ($p < 0,05$) para os espermatozoides submetidos ao tratamento 1,0 mM, enquanto que não houve diferença ($p < 0,05$) entre os demais tratamentos. A categoria de células ARMI aumentou ($p < 0,05$) ao longo das 72 horas em todos os tratamentos, porém no tratamento 0 a diferença ($p < 0,05$) ocorreu a partir de 48 horas enquanto que no tratamento 1,0 mM, ocorreu no tempo 24 horas. A população de células AIML de amostras tratadas com 1,0 mM de resveratrol foi superior ($p < 0,05$) aos demais tratamentos a partir de 24 horas até 72 horas, entretanto a categoria de células AIML na amostra tratada com 1,0 mM aumentou ($p < 0,05$) de 0 horas até 72 horas de armazenamento.

Os resultados da tabela 6 mostraram que o tratamento 1,0 mM diminuiu ($p < 0,05$) a população desejável de células AIMI, além de reduzir ($p < 0,05$) os espermatozoides com AI e MI. As categorias ARMI e ARML por outro lado, aumentaram ($p < 0,05$) quando as amostras foram tratadas com 1,0 mM de resveratrol.

Tabela 4 - Média $\pm$ erro padrão das categorias de células AIMI (Acrossoma Íntegro e Membrana Plasmática Íntegra), ARMI (Acrossoma Reagido e Membrana Plasmática Íntegra), AIML (Acrossoma Íntegro e Membrana Plasmática lesada) e ARML (Acrossoma Reagido e Membrana Plasmática lesada), de espermatozoides suínos refrigerados por 72 horas avaliadas por citometria e fluxo

Classificação das células	Tratamentos (mM)	Tempos (h)				Médias ¹	Probabilidades		
		0	24	48	72		Trat.	Tempo	T*T
AIMI (%)	0	85,98 $\pm$ 1,78 ^{a,b}	86,70 $\pm$ 1,58 ^a	87,26 $\pm$ 1,61 ^a	85,17 $\pm$ 1,71 ^a	86,28 $\pm$ 0,83	0,0004	0,0024	<,0001
	0,01	88,27 $\pm$ 1,64 ^{a,b}	88,54 $\pm$ 1,43 ^a	88,24 $\pm$ 1,37 ^a	85,87 $\pm$ 1,73 ^a	87,73 $\pm$ 0,77			
	0,1	88,36 $\pm$ 1,66 ^a	88,66 $\pm$ 1,45 ^a	87,80 $\pm$ 1,64 ^a	86,75 $\pm$ 1,53 ^a	87,89 $\pm$ 0,78			
	1,0	80,86 $\pm$ 1,88 ^{b,A}	70,14 $\pm$ 2,59 ^{b,B}	56,09 $\pm$ 2,64 ^{b,C}	59,73 $\pm$ 3,57 ^{b,C}	67,04 $\pm$ 1,60			
	Médias ²	85,94 $\pm$ 0,90	83,61 $\pm$ 1,11	80,80 $\pm$ 1,45	79,83 $\pm$ 1,46				
ARMI (%)	0	1,50 $\pm$ 0,26 ^B	2,00 $\pm$ 0,21 ^{a,A,B}	1,83 $\pm$ 0,21 ^{a,c,B}	3,09 $\pm$ 0,41 ^{1A}	2,17 $\pm$ 0,15	<,0001	<,0001	<,0001
	0,01	1,33 $\pm$ 0,22 ^{A,B}	1,53 $\pm$ 0,22 ^{a,b,A,B}	1,15 $\pm$ 0,13 ^{b,c,B}	2,17 $\pm$ 0,38 ^A	1,56 $\pm$ 0,13			
	0,1	1,43 $\pm$ 0,23 ^{A,B}	1,18 $\pm$ 0,17 ^{b,A,B}	1,01 $\pm$ 0,10 ^{b,B}	1,88 $\pm$ 0,26 ^A	1,38 $\pm$ 0,10			
	1,0	1,14 $\pm$ 0,19 ^C	1,50 $\pm$ 0,17 ^{a,b,B}	2,44 $\pm$ 0,32 ^{a,A}	2,82 $\pm$ 0,34 ^A	2,02 $\pm$ 0,15			
	Médias ²	1,34 $\pm$ 0,11	1,55 $\pm$ 0,10	1,62 $\pm$ 0,12	2,49 $\pm$ 0,18				
AIML (%)	0	2,89 $\pm$ 0,23	3,63 $\pm$ 0,41 ^b	3,00 $\pm$ 0,30 ^b	3,46 $\pm$ 0,42 ^b	3,25 $\pm$ 0,18	<,0001	<,0001	<,0001
	0,01	3,08 $\pm$ 0,29	3,36 $\pm$ 0,29 ^b	3,39 $\pm$ 0,31 ^b	3,45 $\pm$ 0,34 ^b	3,32 $\pm$ 0,15			
	0,1	3,05 $\pm$ 0,28	3,67 $\pm$ 0,36 ^b	3,48 $\pm$ 0,31 ^b	3,64 $\pm$ 0,27 ^b	3,46 $\pm$ 0,15			
	1,0	3,97 $\pm$ 0,32 ^C	7,19 $\pm$ 0,83 ^{a,B}	10,38 $\pm$ 1,40 ^{a,A,B,C}	10,59 $\pm$ 1,53 ^{a,A}	7,91 $\pm$ 0,60			
	Médias ²	3,26 $\pm$ 0,15	4,44 $\pm$ 0,29	4,78 $\pm$ 0,41	5,28 $\pm$ 0,48				
ARML (%)	0	7,52 $\pm$ 1,52 ^{a,b,B}	9,36 $\pm$ 2,26 ^{b,A,B}	8,11 $\pm$ 1,51 ^{b,A,B}	9,86 $\pm$ 2,03 ^{b,A}	8,71 $\pm$ 0,92	<,0001	<,0001	<,0001
	0,01	6,89 $\pm$ 1,38 ^{a,b}	8,47 $\pm$ 2,16 ^b	8,18 $\pm$ 1,71 ^b	7,94 $\pm$ 1,50 ^b	7,87 $\pm$ 0,85			
	0,1	6,72 $\pm$ 1,35 ^{b,B}	7,64 $\pm$ 1,73 ^{b,A,B}	7,57 $\pm$ 1,43 ^{b,A,B}	9,10 $\pm$ 1,84 ^{b,A}	7,76 $\pm$ 0,79			
	1,0	16,08 $\pm$ 2,05 ^{a,C}	22,81 $\pm$ 2,98 ^{a,B}	31,58 $\pm$ 3,09 ^{a,A}	30,42 $\pm$ 2,92 ^{a,A}	25,20 $\pm$ 1,49			
	Médias ²	9,30 $\pm$ 0,86	11,99 $\pm$ 1,26	13,86 $\pm$ 1,33	14,26 $\pm$ 1,32				

Fonte: (RIGO, V. H. B., 2016)

Trat.- tratamento, T*T- interação entre tempo e tratamento, Médias¹- médias dos tratamentos, Médias²- médias dos tempos.

^{a,b,c}Letras minúsculas diferentes na mesma coluna, diferem estatisticamente $p < 0,05$ (teste de Tukey-Kramer).

^{A,B,C}Letras maiúsculas diferentes na mesma linha, diferem estatisticamente $p < 0,05$ (teste de Tukey-Kramer).

Tabela 5 - Média $\pm$ erro padrão das categorias de células MI (Membrana Plasmática Íntegra) e AI (Acrossoma Íntegro), expressas em porcentagem (%), de espermatozoides suínos refrigerados por 72 horas avaliadas por citometria e fluxo

Classificação o das células	Tratamentos (mM)	Tempos (h)				Médias ¹	Probabilidades		
		0	24	48	72		Trat.	Tempo	T*T
AI (%)	0	89,04 $\pm$ 1,70 ^{a,b}	91,50 $\pm$ 0,87 ^a	90,25 $\pm$ 1,52 ^a	88,49 $\pm$ 1,64 ^a	89,81 $\pm$ 0,74	<,0001	<,0001	<,0001
	0,01	91,46 $\pm$ 1,46 ^a	92,75 $\pm$ 0,97 ^a	91,50 $\pm$ 1,26 ^a	89,86 $\pm$ 1,59 ^a	91,40 $\pm$ 0,67			
	0,1	92,04 $\pm$ 1,44 ^a	93,16 $\pm$ 0,88 ^a	91,56 $\pm$ 1,47 ^a	90,31 $\pm$ 1,42 ^a	91,75 $\pm$ 0,66			
	1,0	84,81 $\pm$ 1,75 ^{b,A}	80,14 $\pm$ 1,83 ^{b,B}	68,22 $\pm$ 2,38 ^{b,C}	69,22 $\pm$ 2,93 ^{b,C}	75,82 $\pm$ 1,29			
	Médias ²	89,39 $\pm$ 0,82	89,60 $\pm$ 0,74	86,25 $\pm$ 1,15	84,78 $\pm$ 1,22				
MI (%)	0	91,89 $\pm$ 0,70 ^a	88,85 $\pm$ 1,56 ^a	89,03 $\pm$ 1,64 ^a	88,26 $\pm$ 1,55 ^a	89,47 $\pm$ 0,72	0,1967	<,0001	<,0001
	0,01	92,22 $\pm$ 0,85 ^a	90,09 $\pm$ 1,34 ^a	89,77 $\pm$ 1,31 ^a	88,57 $\pm$ 1,63 ^a	90,14 $\pm$ 0,66			
	0,1	92,26 $\pm$ 0,79 ^a	90,07 $\pm$ 1,39 ^a	88,98 $\pm$ 1,61 ^a	87,26 $\pm$ 1,97 ^a	89,58 $\pm$ 0,77			
	1,0	84,54 $\pm$ 1,43 ^{b,A}	71,81 $\pm$ 2,58 ^{b,B}	59,71 $\pm$ 2,69 ^{b,C}	62,52 $\pm$ 3,40 ^{b,C}	69,60 $\pm$ 1,59			
	Médias ²	90,46 $\pm$ 0,55	85,30 $\pm$ 1,10	83,26 $\pm$ 1,37	82,08 $\pm$ 1,44				

Fonte: (RIGO, V. H. B., 2016)

Trat.- tratamento, T*T- interação entre tempo e tratamento, Médias¹- médias dos tratamentos, Médias²- médias dos tempos.

^{a,b}Letras minúsculas diferentes na mesma coluna, diferem estatisticamente $p < 0,05$ (teste de Tukey-Kramer).

^{A,B,C}Letras maiúsculas diferentes na mesma linha, diferem estatisticamente $p < 0,05$ (teste de Tukey-Kramer).

Tabela 6 - Média $\pm$ erro padrão das categorias de células AIMI (Acrossoma Íntegro e Membrana Plasmática Íntegra), ARMI (Acrossoma Reagido e Membrana Plasmática Íntegra), AIML (Acrossoma Íntegro e Membrana Plasmática lesada) e ARML (Acrossoma Reagido e Membrana Plasmática lesada), AI (Acrossoma Íntegro) e MI (Membrana Plasmática Íntegra) das amostras submetidas à estresse oxidativo no momento 72 horas de análise por citometria e fluxo

Classificação das células	Tratamentos (mM)				Probabilidade
	0	0,01	0,1	1,0	Tratamento
AIMI (%)	78,25 $\pm$ 1,28 ^a	77,72 $\pm$ 1,44 ^a	77,02 $\pm$ 1,44 ^a	31,49 $\pm$ 1,88 ^b	<,0001
ARMI (%)	3,83 $\pm$ 0,46 ^b	5,55 $\pm$ 0,86 ^b	5,95 $\pm$ 0,81 ^b	17,05 $\pm$ 1,77 ^a	<,0001
AIML (%)	6,92 $\pm$ 0,51 ^b	6,41 $\pm$ 0,48 ^b	7,57 $\pm$ 0,62 ^b	15,58 $\pm$ 1,53 ^a	<,0001
ARML (%)	11,46 $\pm$ 0,95 ^b	10,44 $\pm$ 0,74 ^b	11,23 $\pm$ 0,85 ^b	36,17 $\pm$ 2,72 ^a	<,0001
AI (%)	85,07 $\pm$ 1,02 ^a	84,86 $\pm$ 1,12 ^a	85,17 $\pm$ 1,06 ^a	44,45 $\pm$ 1,89 ^b	<,0001
MI (%)	82,07 $\pm$ 1,11 ^a	83,17 $\pm$ 1,05 ^a	82,11 $\pm$ 1,11 ^a	50,59 $\pm$ 2,95 ^b	<,0001

Fonte: (RIGO, V. H. B., 2016)

^{a,b}Letras minúsculas diferentes na mesma linha, diferem estatisticamente $p < 0,05$ (teste de Tukey-Kramer).

7.1.3 Efeito do resveratrol sobre o potencial de membrana mitocondrial

Os resultados da tabela 7 mostram que para todas as categorias de células avaliadas houve interação entre tempo e tratamento ($p < 0,05$). Com exceção aos tempos 0h e 24h da categoria ALP, nos demais tempos os valores do tratamento 1,0 mM diferiram ($p < 0,05$) do restante dos tratamentos, que não divergiram ($p < 0,05$) entre eles. O efeito das horas de armazenamento e do tratamento 1,0 mM causaram queda ($p < 0,05$) na população células AHP a partir de 24 horas enquanto que para as populações ALP e MPL houve um aumento ($p < 0,05$) a partir de 24 horas de refrigeração.

Os resultados das análises das amostras submetidas à estresse oxidativo no tempo 72 horas (Tabela 8), demonstraram que, ao contrário da tabela 7 no mesmo tempo de análise, o tratamento 0,1 mM diminuiu ($p < 0,05$) a categoria de células AHP e aumentou ($p < 0,05$) a categoria ALP. Entretanto, na categoria dos mortos da mesma forma que na tabela 7, o valor do tratamento 1,0 mM foi estatisticamente maior ($p < 0,05$) que os demais tratamentos que não diferiram entre si ($p < 0,05$).

Tabela 7 - Média $\pm$ erro padrão das categorias de células AHP (vivos com alto potencial de membrana mitocondrial), ALP (vivos com baixo potencial de membrana mitocondrial), MPL (células com membrana plasmática lesada), expressas em porcentagem (%), de espermatozoides suínos refrigerados por 72 horas avaliadas por citometria e fluxo

Classificação das células	Tratamentos (mM)	Tempos (h)				Médias ¹	Probabilidades		
		0	24	48	72		Trat.	Tempo	T*T
AHP (%)	0	89,54 $\pm$ 0,93 ^{a,A}	83,92 $\pm$ 2,51 ^{a,A,B}	83,41 $\pm$ 2,14 ^{a,B}	83,08 $\pm$ 2,26 ^{a,B}	84,92 $\pm$ 1,05	<,0001	<,0001	<,0001
	0,01	89,02 $\pm$ 1,06 ^{a,A}	84,92 $\pm$ 2,29 ^{a,A,B}	83,65 $\pm$ 2,28 ^{a,A,B}	82,83 $\pm$ 2,24 ^{a,B}	85,05 $\pm$ 1,04			
	0,1	89,26 $\pm$ 1,03 ^{a,A}	83,74 $\pm$ 2,51 ^{a,A,B}	83,52 $\pm$ 1,95 ^{a,B}	81,80 $\pm$ 2,03 ^{a,B}	84,51 $\pm$ 1,01			
	1,0	77,25 $\pm$ 2,04 ^{b,A}	56,33 $\pm$ 3,28 ^{b,B}	44,26 $\pm$ 3,41 ^{b,C}	51,64 $\pm$ 3,63 ^{b,B,C}	57,49 $\pm$ 1,90			
	Médias ²	86,34 $\pm$ 0,80	77,32 $\pm$ 1,67	74,36 $\pm$ 1,88	75,88 $\pm$ 1,67				
ALP (%)	0	2,49 $\pm$ 0,47	3,11 $\pm$ 0,43 ^b	3,34 $\pm$ 0,36 ^b	3,26 $\pm$ 0,30 ^b	3,06 $\pm$ 0,20	<,0001	<,0001	<,0001
	0,01	2,28 $\pm$ 0,30	3,46 $\pm$ 0,49 ^b	2,98 $\pm$ 0,43 ^b	3,05 $\pm$ 0,30 ^b	2,94 $\pm$ 0,19			
	0,1	2,26 $\pm$ 0,34 ^B	3,40 $\pm$ 0,46 ^{a,b,A,B}	2,94 $\pm$ 0,49 ^{b,A,B}	3,72 $\pm$ 0,36 ^{b,A}	3,08 $\pm$ 0,21			
	1,0	2,36 $\pm$ 0,34 ^C	5,40 $\pm$ 0,74 ^{a,B}	8,07 $\pm$ 0,77 ^{a,A}	8,12 $\pm$ 1,12 ^{a,A,B}	6,00 $\pm$ 0,44			
	Médias ²	2,35 $\pm$ 0,18	3,83 $\pm$ 0,28	4,33 $\pm$ 0,32	4,51 $\pm$ 0,35				
MPL (%)	0	8,77 $\pm$ 1,48 ^{b,B}	12,40 $\pm$ 2,43 ^{b,A,B}	12,89 $\pm$ 2,07 ^{b,A}	13,21 $\pm$ 2,20 ^{b,A}	11,84 $\pm$ 1,04	<,0001	<,0001	<,0001
	0,01	10,89 $\pm$ 1,89 ^{b,B}	12,34 $\pm$ 2,45 ^{b,A,B}	13,12 $\pm$ 2,18 ^{b,A,B}	14,05 $\pm$ 2,19 ^{b,A}	12,60 $\pm$ 1,09			
	0,1	10,60 $\pm$ 1,84 ^{b,B}	12,57 $\pm$ 2,41 ^{b,A,B}	13,31 $\pm$ 1,86 ^{b,A}	13,83 $\pm$ 2,08 ^{b,A}	12,57 $\pm$ 1,02			
	1,0	22,14 $\pm$ 2,23 ^{a,C}	36,78 $\pm$ 3,12 ^{a,B}	47,63 $\pm$ 3,36 ^{a,A}	43,30 $\pm$ 3,68 ^{a,A,B}	37,42 $\pm$ 1,76			
	Médias ²	13,13 $\pm$ 1,04	18,52 $\pm$ 1,57	21,74 $\pm$ 1,75	20,94 $\pm$ 1,68				

Fonte: (RIGO, V. H. B., 2016)

Trat.- tratamento, T*T- interação entre tempo e tratamento, Médias¹- médias dos tratamentos, Médias²- médias dos tempos.

^{a,b}Letras minúsculas diferentes na mesma coluna, diferem estatisticamente $p < 0,05$ (teste de Tukey-Kramer).

^{A,B,C}Letras maiúsculas diferentes na mesma linha, diferem estatisticamente $p < 0,05$ (teste de Tukey-Kramer).

Tabela 8 - Média $\pm$ erro padrão das categorias de células AHP (vivos com alto potencial de membrana mitocondrial), ALP (vivos com baixo potencial de membrana mitocondrial), MPL (células com membrana plasmática lesada) das amostras submetidas à estresse oxidativo no momento 72 horas de análise por citometria e fluxo

Classificação das células	Tratamentos (mM)				Probabilidade
	0	0,01	0,1	1,0	
AHP (%)	67,41 $\pm$ 3,48 ^a	58,75 $\pm$ 3,49 ^a	31,63 $\pm$ 4,07 ^b	4,12 $\pm$ 1,69 ^c	<,0001
ALP (%)	12,64 $\pm$ 2,01 ^b	19,82 $\pm$ 2,18 ^b	45,16 $\pm$ 3,65 ^a	45,68 $\pm$ 3,42 ^a	<,0001
MPL (%)	18,88 $\pm$ 2,42 ^b	19,59 $\pm$ 2,41 ^b	20,21 $\pm$ 2,46 ^b	47,84 $\pm$ 3,30 ^a	<,0001

Fonte: (RIGO, V. H. B., 2016)

^{a,b,c}Letras minúsculas diferentes na mesma linha, diferem estatisticamente $p < 0,05$ (teste de Tukey-Kramer).

7.1.4 Efeito do resveratrol na desordem fosfolipídica (fluidez) da membrana plasmática

Com relação a esta variável (Tabela 9), não houve interação entre tempo e tratamento ($p < 0,05$). O tratamento 1,0 mM apresentou maior valor de intensidade de fluorescência, sendo estatisticamente igual ($p < 0,05$) ao tratamento 0,1 mM e diferindo dos demais ($p < 0,05$), que não diferiram ($p < 0,05$) entre si. A intensidade de fluorescência do tratamento 0,1 mM teve a mesma relevância estatística ($p < 0,05$) do tratamento 0,01 mM.

O valor da intensidade de fluorescência reduziu ($p < 0,05$) de 0h para 24h, porém aumentou novamente ($p < 0,05$) no tempo 48h e se manteve ($p < 0,05$) até 72 horas como demonstrado na tabela 9.

Os resultados apresentados na tabela 10 indicam que a intensidade de fluorescência não se alterou ($p < 0,05$) entre os tratamentos 0 e 0,01 mM, mas foram estatisticamente menores ($P < 0,05$) do que no tratamento 1,0 mM. O tratamento 0,1 mM não diferiu ($p < 0,05$) dos demais tratamentos.

Tabela 9 - Média ± erro padrão da desordem lipídica da membrana plasmática, expressa em intensidade de fluorescência média (a.u.) de espermatozoides suínos refrigerados por 72 horas e avaliados por citometria de fluxo

	Tratamentos	Tempos (h)					Probabilidades		
		0	24	48	72	Médias ¹	Trat.	Tempo	T*T
	(mM)								
Intensidade de fluorescência MERO 540 (a.u.)	0	3859,48 ± 814,30	2247,21 ± 207,21	2658,62 ± 242,11	2761,47 ± 222,65	2875,21 ± 225,11 ^c	0,0019	<,0001	0,9115
	0,01	3759,09 ± 671,26	2578,79 ± 242,69	2864,09 ± 251,49	2942,76 ± 219,73	3031,41 ± 195,55 ^{b,c}			
	0,1	3781,47 ± 666,29	2941,06 ± 328,25	2897,51 ± 251,30	3313,31 ± 278,97	3225,81 ± 202,43 ^{a,b}			
	1,0	4533,79 ± 964,09	3083,24 ± 356,83	3284,57 ± 273,55	3635,14 ± 301,08	3627,58 ± 271,90 ^a			
	Médias ²	3985,00 ± 391,59 ^A	2712,57 ± 146,20 ^C	2928,66 ± 127,64 ^B	3163,17 ± 130,79 ^B				

Fonte: (RIGO, V. H. B., 2016)
Trat.- tratamento, T*T- interação entre tempo e tratamento, Médias¹- médias dos tratamentos, Médias²- médias dos tempos.
^{a,b,c}Letras minúsculas diferentes na mesma coluna, diferem estatisticamente p<0,05 (teste de Tukey-Kramer).
^{A,B,C}Letras maiúsculas diferentes na mesma linha, diferem estatisticamente p<0,05 (teste de Tukey-Kramer).

Tabela 10 - Média ± erro padrão da desordem lipídica da membrana plasmática, expressa em intensidade de fluorescência média (a.u.) de espermatozoides suínos induzidos ao estresse oxidativo no momento 72 horas de análise, avaliados por citometria de fluxo

Intensidade de fluorescência	Tratamentos (mM)				Probabilidade
	0	0,01	0,1	1,0	Tratamento
MERO 540 (a.u.)	2922,01 ± 259,08 ^b	3566,04 ± 274,48 ^b	3997,93 ± 341,62 ^{a,b}	5366,78 ± 430,45 ^a	0,0007

Fonte: (RIGO, V. H. B., 2016)
^{a,b}Letras minúsculas diferentes na mesma linha, diferem estatisticamente p<0,05 (teste de Tukey-Kramer).

7.1.5 Efeito do resveratrol na peroxidação da membrana plasmática

Na tabela 11 houve interação entre tempo e tratamento sendo que apenas no tempo 72 horas o tratamento 1,0 mM apresentou uma intensidade de fluorescência menor ($p < 0,05$) do que os demais tratamentos, que não diferiram estatisticamente entre si ($p < 0,05$).

A intensidade de fluorescência no tratamento 1,0 mM não apresentou diferença ($p > 0,05$) em 0 e 24 horas, porém aumentou ($p < 0,05$) em 48 horas e caiu ($p < 0,05$) no tempo 72 horas.

Não houve efeito de tratamento ($p < 0,05$) para as amostras submetidos à estresse oxidativo para variável analisada e exposta na tabela 12.

Tabela 11 - Médias ± erro padrão da peroxidação lipídica, medida em intensidade de fluorescência (a.u.), de espermatozoides suínos refrigerados por 72 horas e avaliados por citometria de fluxo

	Tratamentos (mM)	Tempos (h)				Médias ¹	Probabilidades		
		0	24	48	72		Trat.	Tempo	T*T
Intensidade de fluorescência Bodypy (a.u.)	0	3205,35 ± 93,81	3351,11 ± 94,22	3357,76 ± 121,28	3244,30 ± 56,29 ^a	3288,10 ± 46,49	0,0029	<,0001	0,0178
	0,01	3249,28 ± 112,87	3141,77 ± 67,67	3349,78 ± 116,53	3176,39 ± 36,16 ^a	3230,27 ± 44,99			
	0,1	3260,88 ± 120,51	3237,14 ± 96,95	3554,14 ± 158,30	3160,24 ± 44,23 ^a	3306,18 ± 58,12			
	1,0	3104,03 ± 75,76 ^{A,B}	3257,38 ± 127,48 ^{A,B}	3393,38 ± 163,90 ^A	2979,16 ± 39,17 ^{b,B}	3184,59 ± 57,52			
	Médias ²	3206,48 ± 51,11	3248,30 ± 48,98	3415,65 ± 70,32	3144,81 ± 23,84				

Fonte: (RIGO, V. H. B., 2016)
Trat.- tratamento, T*T- interação entre tempo e tratamento, Médias¹- médias dos tratamentos, Médias²- médias dos tempos.
^{a,b}Letras minúsculas diferentes na mesma coluna, diferem estatisticamente p<0,05 (teste de Tukey-Kramer).
^{A,B}Letras maiúsculas diferentes na mesma linha, diferem estatisticamente p<0,05 (teste de Tukey-Kramer).

Tabela 12 - Médias ± erro padrão da peroxidação lipídica, medida em intensidade de fluorescência (a.u.), de espermatozoides suínos sob estresse oxidativo no tempo 72 horas, avaliados por citometria de fluxo

Intensidade fluorescência Bodypy (a.u.)	Tratamentos (mM)				Probabilidade
	0	0,01	0,1	1,0	Tratamento
	8576,64 ± 729,34	8432,58 ± 729,73	9779,08 ± 816,57	8193,64 ± 681,10	0,1970

Fonte: (RIGO, V. H. B., 2016)

7.1.6 Efeito do resveratrol sobre o estresse oxidativo no citoplasma espermático

A interação entre o tempo de refrigeração e as amostras tratadas com 1,0 mM diminuiu ($p < 0,05$) a intensidade de fluorescência do tempo 0 horas para 24 horas, porém não houve diferença ($p > 0,05$) dos tempos 48 e 72 horas com os demais.

Na tabela 14, dos tratamentos que sofreram estresse oxidativo induzido, a média de intensidade de fluorescência do tratamento 1,0 mM foi estatisticamente superior ($p < 0,05$) aos demais tratamentos, que não diferiram entre si ($p < 0,05$).

Tabela 13 - Médias ± erro padrão do estresse oxidativo no citoplasma de espermatozoides suínos refrigerados por 72 horas, analisada por citometria de fluxo e medida em intensidade de emissão do espectro de fluorescência (a.u.)

	Tratamentos (mM)	Tempos (h)				Médias ¹	Probabilidades		
		0	24	48	72		Trat.	Tempo	T*T
Intensidade fluorescência DHE (a.u.)	0	3699,45 ± 272,56	4215,84 ± 239,17	3735,36 ± 343,22	3281,83 ± 107,14	3762,87 ± 135,67	0,0139	<,0001	0,004
	0,01	4359,23 ± 332,60	4088,01 ± 439,60	4436,89 ± 343,60	3259,69 ± 111,84	4074,37 ± 176,63			
	0,1	4277,68 ± 367,94	4364,94 ± 358,05	4212,73 ± 339,45	3220,55 ± 89,91	4049,37 ± 164,06			
	1,0	3775,80 ± 261,22 ^A	3225,89 ± 52,18 ^B	3284,44 ± 108,08 ^{A,B}	3417,62 ± 68,87 ^{A,B}	3426,06 ± 76,19			
	Médias ²	4028,57 ± 156,67	3973,67 ± 157,26	3910,89 ± 153,02	3299,99 ± 46,71				

Fonte: (RIGO, V. H. B., 2016)
Trat.- tratamento, T*T- interação entre tempo e tratamento, Médias¹- médias dos tratamentos, Médias²- médias dos tempos.
^{A,B}Letras maiúsculas diferentes na mesma linha, diferem estatisticamente p<0,05 (teste de Tukey-Kramer).

Tabela 14 - Médias ± erro padrão do estresse oxidativo no citoplasma de espermatozoides suínos refrigerados por 72 horas, analisada por citometria de fluxo e medida em intensidade de emissão do espectro de fluorescência (a.u.)

Intensidade fluorescência DHE (a.u.)	Tratamentos (mM)				Probabilidade
	0	0,01	0,1	1,0	Tratamento
	3153,66 ± 72,20 ^b	3283,08 ± 59,62 ^b	3336,23 ± 67,23 ^b	3867,14 ± 118,48 ^a	<,0001

Fonte: (RIGO, V. H. B., 2016)
^{a,b}Letras minúsculas diferentes na mesma linha, diferem estatisticamente p<0,05 (teste de Tukey-Kramer).

7.2 EFEITO DO RESVERATROL SOBRE AS ANOMALIAS MORFOLÓGICAS DOS ESPERMATOZOIDES SUÍNOS

De todos os defeitos expostos na tabela 15, apenas o defeito de acrossoma resultou em interação entre tempo e tratamento ($p < 0,05$), sendo que no tempo 72 horas de refrigeração os espermatozoides tratados com 1,0 mM apresentaram maior lesão de acrossoma ($p < 0,05$) do que naqueles submetidos aos demais tratamentos, que não diferiram estatisticamente entre eles ($p > 0,05$). Na variável acrossoma, a interação entre os tratamentos e os tempos mostrou que em todos os tratamentos a porcentagem de defeitos foi maior ($p < 0,05$) no tempo 72 horas.

Somente os defeitos de cabeça e colo apresentaram efeito de tratamento ($p < 0,05$).

Os defeitos totais foram influenciados apenas pelo tempo, aumentando ($p < 0,05$) de 0 horas para 72 horas de refrigeração.

Tabela 15 - Médias $\pm$ erro padrão das anormalidades morfológicas dos espermatozoides suínos avaliados por microscopia de contraste de interferência diferencial (D.I.C.)

(continua)

Defeitos Morfológicos	Tratamentos (mM)	Tempos (h)		Médias ¹	Probabilidades		
		0	72		Tratamento	Tempo	T*T
Acrossoma (%)	0	0,65 $\pm$ 0,10 ^B	1,72 $\pm$ 0,26 ^{b,A}	1,18 $\pm$ 0,15	0,0197	<,0001	0,0026
	0,01	0,66 $\pm$ 0,12 ^B	1,85 $\pm$ 0,22 ^{b,A}	1,26 $\pm$ 0,14			
	0,1	0,84 $\pm$ 0,17 ^B	2,24 $\pm$ 0,33 ^{b,A}	1,54 $\pm$ 0,20			
	1,0	0,98 $\pm$ 0,18 ^B	4,47 $\pm$ 0,60 ^{a,A}	2,86 $\pm$ 0,40			
	Médias ²	0,77 $\pm$ 0,07	2,58 $\pm$ 0,21				
Cabeça (%)	0	1,21 $\pm$ 0,15	1,49 $\pm$ 0,21	1,34 $\pm$ 0,13 ^b	0,0081	0,9693	0,6017
	0,01	1,81 $\pm$ 0,29	1,43 $\pm$ 0,16	1,62 $\pm$ 0,17 ^{a,b}			
	0,1	2,47 $\pm$ 0,45	1,74 $\pm$ 0,23	2,11 $\pm$ 0,25 ^a			
	1,0	1,79 $\pm$ 0,22	2,21 $\pm$ 0,27	2,01 $\pm$ 0,18 ^a			
	Médias ²	1,82 $\pm$ 0,16	1,72 $\pm$ 0,11				
Colo (%)	0	0,53 $\pm$ 0,15	0,42 $\pm$ 0,14	0,48 $\pm$ 0,10 ^{a,b}	0,015	0,1545	0,4683
	0,01	0,53 $\pm$ 0,16	0,43 $\pm$ 0,13	0,48 $\pm$ 0,10 ^{a,b}			
	0,1	1,13 $\pm$ 0,28	0,47 $\pm$ 0,14	0,80 $\pm$ 0,16 ^a			
	1,0	0,55 $\pm$ 0,21	0,18 $\pm$ 0,06	0,35 $\pm$ 0,10 ^b			
	Médias ²	0,69 $\pm$ 0,10	0,38 $\pm$ 0,06				
Peça intermediária (%)	0	0,33 $\pm$ 0,07	0,19 $\pm$ 0,07	0,26 $\pm$ 0,05	0,7561	0,2981	0,3952
	0,01	0,28 $\pm$ 0,06	0,36 $\pm$ 0,09	0,32 $\pm$ 0,06			
	0,1	0,27 $\pm$ 0,08	0,25 $\pm$ 0,07	0,26 $\pm$ 0,05			
	1,0	0,25 $\pm$ 0,06	0,19 $\pm$ 0,05	0,22 $\pm$ 0,04			
	Médias ²	0,28 $\pm$ 0,03	0,25 $\pm$ 0,04				
Gota protoplasmática proximal (%)	0	4,20 $\pm$ 0,69	4,98 $\pm$ 0,66	4,60 $\pm$ 0,48	0,1218	0,8347	0,0666
	0,01	4,39 $\pm$ 0,62	4,80 $\pm$ 0,58	4,59 $\pm$ 0,42			
	0,1	5,08 $\pm$ 0,74	5,31 $\pm$ 0,83	5,20 $\pm$ 0,55			
	1,0	4,62 $\pm$ 0,58	3,76 $\pm$ 0,66	4,15 $\pm$ 0,45			
	Médias ²	4,57 $\pm$ 0,33	4,70 $\pm$ 0,34				

(conclusão)

Defeitos Morfológicos	Tratamentos (mM)	Tempos (h)		Médias ¹	Probabilidades		
		0	72		Tratamento	Tempo	T*T
Cauda (%)	0	11,59 ± 2,42	11,15 ± 2,38	11,37 ± 1,68	0,1812	0,7854	0,4239
	0,01	10,38 ± 2,25	13,90 ± 3,06	12,14 ± 1,89			
	0,1	10,97 ± 2,36	11,71 ± 2,78	11,34 ± 1,81			
	1,0	10,34 ± 2,38	9,74 ± 2,05	10,01 ± 1,55			
	Médias ²	10,82 ± 1,16	11,65 ± 1,30				
Formas teratológicas (%)	0	0	0,01 ± 0,15	0,007 ± 0,007	0,1312	0,7913	0,3287
	0,01	0,03 ± 0,02	0,01 ± 0,01	0,02 ± 0,01			
	0,1	0	0,01 ± 0,01	0,007 ± 0,007			
	1,0	0,01 ± 0,02	0,01 ± 0,01	0,02 ± 0,01			
	Médias ²	0,01 ± 0,006	0,01 ± 0,007				
Total (%)	0	18,86 ± 3,10	20,09 ± 2,83	19,48 ± 2,08	0,3783	0,0015	0,4181
	0,01	18,13 ± 2,78	22,85 ± 3,39	20,49 ± 2,19			
	0,1	20,91 ± 2,96	22,01 ± 3,49	21,46 ± 2,27			
	1,0	18,48 ± 2,68	20,83 ± 2,49	19,75 ± 1,81			
	Médias ²	19,11 ± 1,43 ^B	21,47 ± 1,53 ^A				

Fonte: (RIGO, V. H. B., 2016)

Trat.- tratamento, T*T- interação entre tempo e tratamento, Médias¹- médias dos tratamentos, Médias²- médias dos tempos.

^{a,b}Letras minúsculas diferentes na mesma coluna, diferem estatisticamente p<0,05 (teste de Tukey-Kramer).

^{A,B}Letras maiúsculas diferentes na mesma linha, diferem estatisticamente p<0,05 (teste de Tukey-Kramer).

7.3 EFEITO DO RESVERATROL SOBRE A FERTILIDADE E PRENHES DE FÊMEAS SUÍNAS

A fertilidade do sêmen suíno, bem como a taxa de prenhes não foram melhoradas pela adição do antioxidante resveratrol ($p < 0,05$). Além disso, a taxa embriões viáveis recuperados foi pior no grupo tratado com 0,01 mM de resveratrol (Tabela 16).

Tabela 16 - Médias $\pm$ erro padrão do efeito de tratamento sobre as características de fertilidade

Características reprodutivas	Tratamentos (mM)		Probabilidade dos tratamentos
	0	0,01	
Taxa prenhes (%)	46,60 $\pm$ 13,33	26,60 $\pm$ 11,82	0,2700
Taxa fertilidade ajustada total (%)	52,86 $\pm$ 39,65	37,00 $\pm$ 28,29	0,1894
Taxa embriões viáveis (%)	54,55 $\pm$ 44,82 ^a	17,81 $\pm$ 33,53 ^b	0,0206

Fonte: (RIGO, V. H. B., 2016)

^{a,b}Letras minúsculas diferentes na mesma linha, diferem estatisticamente $p < 0,05$ (teste de Tukey -Kramer).

8 DISCUSSÃO

O Resveratrol (3,4, 5-triidroxiestilbeno), é um composto polifenólico natural encontrado primariamente em uvas e vinhos, apresentando um considerável número de efeitos benéficos em uma variedade de órgãos e sistemas devido principalmente à sua atividade antioxidante (FRÉMONT, 2000) desde que atinja as regiões rígidas da membrana plasmática peroxidada e aumente sua fluidez com propósito de interagir mais eficientemente com os radicais na dupla camada lipídica desorganizada (BRITTES et al., 2010). Os efeitos protetores do RVT contra danos oxidativos *in vivo* e *in vitro* são provavelmente devido à regulação do sistema antioxidante celular endógeno, além de agir como antioxidante *scavenger* de EROs (SPANIER et al., 2009). O RVT também inibe a formação de EROs pela supressão de genes pró-oxidantes (BAUR; SINCLAIR, 2006; DOLINSKY et al., 2009; SPANIER et al., 2009) e induz a geração de enzimas antioxidantes incluindo SOD, CAT e GPx (UNGVARI et al., 2007; SPANIER et al., 2009; TANNO et al., 2010).

Belguendouz, Fremont e Linard, (1997) também reportaram que o RVT é um composto quelante de cobre e outros metais de transição que são capazes de gerar radicais livres e causarem peroxidação lipídica. Além disso, o RVT previne danos à fertilidade do macho, desencadeados por diferentes indutores do estresse oxidativo como etanol (KASDALLAH-GRISSA et al., 2006), tert-butil hidroperóxido (COLLODEL et al., 2011), triiodotironina (OURIQUE et al., 2013) e ferro e ácido ascorbico (MOJICA-VILLEGAS et al., 2014).

As amostras com espermatozoides pertencentes ao tratamento 1,0 mM apresentaram menores valores ($p < 0,05$) em todas as características de cinética espermática analisadas. Para aquelas características onde houve interação tempo e tratamento, os valores do tratamento 1,0 mM reduziram a partir de 24 horas de refrigeração. Os demais tratamentos não foram influenciados pela adição do resveratrol e não diferiram do controle ($p > 0,05$). Isto demonstra que o resveratrol nesta concentração prejudica a motilidade do espermatozoide suíno. Os resultados do presente trabalho contrariam os achados de Martin-Hidalgo et al. (2013) quanto as concentrações que causaram redução estatística na porcentagem de espermatozoides móveis e nos parâmetros de velocidade, porém, por outro lado, reforçam que o antioxidante resveratrol causa queda na motilidade espermática com a utilização de concentrações elevadas.

Somente o tratamento na concentração de 1,0 mM de resveratrol refletiu negativamente na variável AIMI, considerada de maior interesse na análise de integridade de membrana plasmática e acrossomal e consequentemente aumentou as categorias indesejadas ARMI, AIML

e ARML. Mesmo após as células espermáticas serem desafiadas ao estresse oxidativo, o resveratrol não apresentou efeito positivo nos tratamentos 0,01 e 0,1 mM, enquanto que para o tratamento 1,0 mM foi observado o mesmo efeito negativo quando comparado com esta mesma concentração não induzido ao estresse oxidativo.

De forma semelhante à característica de integridade de membranas, o potencial de membrana mitocondrial dos espermatozoides foi afetado pelo tratamento 1,0 mM onde a categoria de células com alto potencial de membrana mitocondrial (AHP) diminuiu, enquanto as demais ALP e MPL aumentaram. A indução ao estresse oxidativo não ressaltou a ação do resveratrol sobre a função mitocondrial nos tratamentos 0,01 e 0,1 mM e refletiu negativamente nos resultados do tratamento 1,0 mM de forma semelhante às amostras não induzidas.

Zini et al. (1999); Sareen et al. (2006); Zunino e Storms (2006); Brown (2009); Pervaiz e Holme (2009); Fulda, Galluzzi e Kroemer (2010) e Low et al. (2010) verificaram que este composto apresenta uma dicotomia onde baixas doses podem melhorar a função celular enquanto altas doses podem aumentar a morte celular com concomitante redução da função de membrana mitocondrial. Portanto, é provável que a concentração de 1,0 mM seja tóxica para o espermatozoide suíno refrigerado, já que quando comparado a concentração de 0,1 mM deste trabalho com a concentração de 100 μ M do trabalho de Martin-Hidalgo et al. (2013), não houve diferença de resultados para as características de integridade de membrana plasmática e acrossomal. Porém, Collodel et al. (2011) observaram que a concentração de 100 μ M foi citotóxica para o espermatozoide humano criopreservado, onde nesta concentração a motilidade estava ausente em todas as amostras analisadas. Resultados de aumento da motilidade total, progressiva e ALH e também maior atividade mitocondrial observados por Bucak et al. (2015) utilizando 1,0 mM de resveratrol adicionado ao sêmen bovino congelado, foram diferentes daqueles observados neste trabalho com a mesma concentração.

O presente estudo verificou redução do potencial de membrana mitocondrial em apenas amostras tratadas com 1,0 mM após 24 horas de armazenamento, divergindo dos resultados encontrados por Martin-Hidalgo et al. (2013) onde todos os tratamentos com resveratrol refletiram negativamente sobre a função mitocondrial. A possível explicação para os efeitos danosos da concentração de 1,0 mM ao espermatozoide suíno segue a mesma ideia de ação deste antioxidante utilizado para tratamento contra o câncer em células somáticas, onde o RVT é capaz de regular a permeabilidade da membrana mitocondrial (ZUNINO; STORMS, 2006), aumentar a produção mitocondrial de superóxido (LOW et al., 2010), diminuir o potencial de membrana mitocondrial (SAREEN et al., 2006; VAN GINKEL et al., 2007) e interromper a cadeia respiratória na mitocondria (ZINI et al., 1999; ZHENG; RAMIREZ, 2000). Todos estes

acontecimentos acarretam em uma redução da produção de ATP constatada por Martin-Hidalgo et al. (2013) com consequente queda da motilidade, propiciando um acúmulo intracelular de oxigênio livre e passível de reagir com outras moléculas que favorecem a formação de EROs que promovem uma intensificação da peroxidação da membrana plasmática que apresenta uma relação com a fluidez de membrana (MOWRI et al., 1984; MC LEAN; HAGAMAN, 1992; LUCIO et al., 2007, 2009a,b) levando a um aumento da desordem de fosfolípidios da membrana como demonstrado nas tabelas 9 e 10. Os resultados de desordem fosfolipídica da membrana plasmática deste estudo foram estatisticamente iguais para os grupos 0,1 mM e 1,0 mM e maiores que o controle independente do tempo de refrigeração, enquanto que para Martin-Hidalgo et al. (2013) apenas a maior dose de 100 μ M aumentou estatisticamente a porcentagem de espermatozoides com desordem de fosfolípido de membrana aos 7 dias de armazenamento do sêmen. A intensidade de fluorescência da Merocianina 540 para as amostras induzidas ao estresse oxidativo (Tabela 10) aumentou da mesma forma como observado em amostras não induzidas (9). Os resultados de desordem da membrana plasmática indicam que o resveratrol, nas concentrações definidas, aumentou a instabilidade da membrana plasmática.

Os espermatozoides, espontaneamente, produzem espécies reativas de oxigênio (EROs) os quais em pequenas quantidades são importantes para que ocorra o desencadeamento da cascata de fosforilação oxidativa da tirosina associada com a capacitação espermática (AITKEN et al., 2010). No entanto, quando a produção de EROs se sobrepõem a capacidade antioxidante das células espermáticas são gerados, dentre outras alterações, danos peroxidativos à membrana plasmática e fragmentação do DNA nuclear (GUTHRIE; WELCH, 2012).

Os resultados de peroxidação da membrana plasmática deste trabalho demonstraram que não houve diferença estatística ($p > 0,05$) entre os tratamentos até 48 horas de refrigeração, porém no tempo 72 horas houve uma diminuição ($p < 0,05$) da intensidade de fluorescência da sonda C11 BODYPY para o tratamento 1,0 mM em relação ao demais tratamentos. As amostras induzidas ao estresse oxidativo não apresentaram diferenças entre os tratamentos ($p > 0,05$). Portanto, apesar dos possíveis efeitos negativos para a função espermática, a adição do RVT para o espermatozoide suíno pode ser recomendada da mesma forma que em humanos, no qual este antioxidante foi utilizado previamente à realização de biotécnicas, onde a motilidade espermática não é fator limitante para a realização de procedimentos de fecundação in vitro (FIV) e injeção intracitoplasmática de espermatozoide (ICSI), pois reduziu os danos ao DNA espermáticos durante o processo de criopreservação (BRANCO et al., 2010), preveniu danos aos lipídios da membrana plasmática pela criopreservação (GARCEZ et al., 2010) e foi capaz de proteger o espermatozoide contra o estresse oxidativo (COLLODEL et al., 2011).

Na análise do estresse oxidativo intracitoplasmático, o resveratrol não mostrou redução da intensidade de fluorescência da sonda Dihidroetídio (DHE) com a função de identificar a produção intracelular de O_2^- (RICE et al., 2003), em qualquer tratamento avaliado. Por outro lado, nos tratamentos que passaram por estresse oxidativo, o tratamento 1,0 mM apresentou maior ($p<0,05$) intensidade de fluorescência em relação as demais concentrações.

Apesar da capacidade antioxidante do resveratrol confirmada em vários trabalhos relacionados à qualidade seminal (JUAN et al., 2005; SHIN et al., 2008; BRANCO et al., 2010; GARCEZ et al., 2010; SILVA et al., 2012; MOJICA-VILLEGAS et al., 2014; BUCAK et al., 2015), o presente estudo não observou mudanças positivas em qualquer um dos tratamentos propostos (0,01 mM e 0,1 mM) quando comparados com o grupo controle (0) nas diversas análises *in vitro* realizadas. Deste modo, mesmo que as amostras tratadas com concentrações menores a 1,0 mM tenham apresentado resultados superiores para a maioria das variáveis analisadas, não superaram os resultados do grupo controle e portanto não justificam suas adições no meio diluidor com intuito de melhorar a qualidade do sêmen refrigerado por até 72 horas.

Resultados contraditórios de suplementação com RVT podem ser atribuídos à vários fatores que influenciam sua ação como a espécie animal, meio diluidor usado ou tratamentos os quais as amostras são submetidas (criopreservação, swim-up ou refrigeração), via de administração do antioxidante (oral ou diretamente no sêmen) e concentrações estipuladas. Além disso, a qualidade e concentração dos reagentes utilizados e a variação de equipamentos e técnicas para obtenção de uma mesma resposta, contribuem para essa divergência de resultados.

No experimento *in vivo*, apesar de não ter sido observado diferença estatística entre os tratamentos nas variáveis de taxa de prenhez e taxa de fertilidade ajustada, os valores apresentados para o grupo tratado foram abaixo daqueles do grupo controle. Estes resultados somados à baixa taxa de embriões viáveis ($p<0,05$) no tratamento 0,01 mM em relação ao controle, não encorajam a utilização do antioxidante resveratrol adicionado ao meio diluidor para inseminação artificial intrauterina de fêmeas suínas, pois mesmo com a utilização do tratamento com menor concentração de resveratrol que outrora foi estatisticamente igual ($p<0,05$) ao tratamento controle em todas as variáveis avaliadas no experimento *in vitro*, apresentou efeito negativo ($p<0,05$) no experimento *in vivo*.

A explicação para os resultados negativos do experimento *in vivo* pode ser atribuída a interferência do antioxidante resveratrol na fusão espermio-oocitária, uma vez que este composto após sua incorporação na membrana, interage com os fosfolípídeos se posicionando entre as

regiões polares e a parte hidrofóbica da membrana (BRITTER et al., 2010) induzindo um aumento da espessura da região polar ou hidrofílica muito provavelmente pela formação de pares de fosfatidilcolina e resveratrol levando a mudança local no ângulo de inclinação das cabeças polares da membrana para uma orientação mais vertical. Este efeito é propagado para dentro da região hidrofóbica causando mudanças nas propriedades biofísicas da membrana plasmática (GHELLINCK et al., 2015). Estas modificações na dinâmica da membrana plasmática podem limitar as regiões de interação entre o espermatozoide suíno e a zona pelúcida do oócito e reduzir as chances de fertilização.

9 CONCLUSÕES

1. A adição do antioxidante resveratrol para conservação dos espermatozoides suínos sob refrigeração por 72 horas não melhorou a cinética espermática;
2. A adição do antioxidante resveratrol para conservação dos espermatozoides suínos sob refrigeração por 72 horas não melhorou a integridade das membranas plasmática e acrossomal;
3. A adição do antioxidante resveratrol para conservação dos espermatozoides suínos sob refrigeração por 72 horas não melhorou o potencial de membrana mitocondrial;
4. A adição do antioxidante resveratrol para conservação dos espermatozoides suínos sob refrigeração por 72 horas não melhorou a estabilidade (fluidez) da membrana plasmática;
5. A adição do antioxidante resveratrol para conservação dos espermatozoides suínos sob refrigeração por 72 horas reduziu a peroxidação da membrana plasmática;
6. A adição do antioxidante resveratrol para conservação dos espermatozoides suínos sob refrigeração por 72 horas não reduziu o estresse oxidativo intracitoplasmático;
7. A adição do antioxidante resveratrol para conservação dos espermatozoides suínos sob refrigeração por 72 horas não melhorou os índices de fertilidade das fêmeas suínas inseminadas com doses inseminantes intrauterinas.

10 CONSIDERAÇÕES FINAIS

No experimento *in vitro*, as concentrações do antioxidante resveratrol testadas não exerceram efeito benéfico para os espermatozoides suínos armazenados refrigerados por 72 horas, sendo por outro lado, a concentrações de 1,0 mM prejudicial a estas células. O experimento em *in vivo* demonstrou que mesmo utilizando a menor concentração de resveratrol, os índices de fertilidade foram inferiores ao grupo controle. Portanto, os resultados nos levam a assumir que amostras tratadas com resveratrol pioram a qualidade do sêmen quando armazenadas em diluidor BTS padrão para refrigeração.

REFERÊNCIAS

- AGARWAL, A.; GUPTA, S.; SHARMA, R.K. Role of oxidative stress in female reproduction. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 3, p. 28-49, 2005.
- AGARWAL, A.; GUPTA, S.; SIKKA, S. The role of free radicals and antioxidants in reproduction. **Current Opinion in Obstetrics and Gynecology**, v. 18, p. 325-332, 2006.
- AGARWAL, A.; MAKKER, K.; SHARMA, R. Clinical relevance of oxidative stress in male factor infertility: An update. **American Journal of Reproductive Immunology**, v. 59, p. 2-11, 2008.
- AGARWAL, A.; SALEH, R. A. Role of oxidants in male infertility: rationale, significance, and treatment. **Urologic Clinics of North America**, v. 29, n. 4, p.1-12, 2002.
- AITKEN, R. J. Molecular mechanisms regulating human sperm function. **Molecular Human Reproduction**, Oxford, v. 3, n. 3, p. 169-173, 1997.
- AITKEN, R. J.; BUCKINGHAM, D. W.; BRINDLE, J.; GOMEZ, E.; BAKER, H. W. G; IRVINE, D. S. Analysis of sperm movement in relation to the oxidative stress created by leukocytes in washed sperm preparations and seminal plasma. **Human Reproduction**, v. 10, n. 8, p. 2061-2071, 1995.
- AITKEN, R. J.; KRAUSZ, C. Oxidative stress, DNA damage and the Y chromosome. **Reproduction**, v. 122, p. 497-506, 2001.
- AITKEN, R. J.; WINGATE, J. K.; IULIIS, G. N. D.; MC LAUGHLIN, E. A. Analysis of lipid peroxidation in human spermatozoa using BODIPY C11. **Molecular Human Reproduction**, Oxford, v. 13, n. 4, p. 203-211, 2007.
- AITKEN, R. Y. Free radicals, lipid peroxidation and sperm function. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 7, p. 659-668, 1995.
- ALMOND, G. W.; BRITT, J. H.; CARR, J.; FLOWER, W.; GLOSSOP, C.; MORROW, M.; SEE, T. **The AI book: a field and laboratory technician's guide to artificial insemination in swine**. Raleigh Morgan Morrow, 1994. 180 p.
- ALTHOUSE, G. C. Comparison of currently used semen extenders in the swine industry. **Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian**, v. 19, n. 6, p. 777-782, 1997.
- ALVAREZ, C. A.; MORAES, G. V. Efeitos da Selenometionina e vitamina C sobre o sêmen. **Revista de Saúde e Biologia**, v. 1, n. 1, p. 42-51, 2006.
- ANDRADE, E. R.; MELO-STERZA, F. A.; SENEDA, M. M.; ALFIERI, A. A. Consequências da produção das espécies reativas de oxigênio na reprodução e principais

mecanismos antioxidantes. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 34, n. 2, p. 79-85, 2010.

ARICHI, H.; KIMURA, Y.; OKUDA, H.; BABA, K.; KOZAWA, M.; ARICHI, S. Effects of stilbene components of the roots of *Polygonum cuspidatum* on lipid metabolism. **Chemical Pharmaceutical Bulletin**, v. 30, n. 5, p. 1766-1770, 1982.

BALL, B. A. Oxidative stress in sperm. In: McKINNON, A. O.; SQUIRES, E. L.; VAALA, W. E.; VARNER, D. D. **Equine reproduction**. 2. ed. West Sussex: Wiley-Blackwell, 2011. cap. 98, v. 1, p. 991-995.

BALL, B.; VO, A. Detection of lipid peroxidation in equine spermatozoa based upon the lipophilic fluorescent dye C11-BODIPY581/591. **Journal of Andrology**, v. 23, p. 259-269, 2002.

BALTES, T. J. **Plasma membrane evaluation with fluorescent stains, and computer-measured motility as indicators of in vitro aging of boar spermatozoa**. 1993. 102 p. Tese (Doutorado) - Escola Superior de Hannover, Alemanha, 1993.

BARBOSA, K. B. F.; COSTA, N. M. B.; ALFENAS, R. C. G.; DE PAULA, S. O.; MINIM, V. P. R.; BRESSAN, J. Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. **Revista de Nutrição**, v. 23, n. 4, p. 629-643, 2010.

BARRANCO, I.; TVARIJONAVICIUTE, A.; PEREZ-PATÍÑO, C.; PARRILLA, I.; CERON, J. J.; MARTINEZ, E. A.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H.; ROCA, J. High total antioxidant capacity of the porcine seminal plasma (SP-TAC) relates to sperm survival and fertility. **Nature**, v. 5, p. 18538, 2015.

BARREIROS, A. L. B. S.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Química Nova**, v. 29, n. 1, p. 113-123, 2006.

BAUR, J. A.; SINCLAIR, D. A. Therapeutic potential of resveratrol: the in vivo evidence. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 5, p. 493-506, 2006.

BELGUENDOUZ, L.; FREMONT, L.; LINARD, A. Resveratrol inhibits metal ion-dependent and independent peroxidation of porcine low-density lipoproteins. **Biochemical Pharmacology**, v. 53, p. 1347-55, 1997.

BELSTRA, B. A. Review: Intrauterine (Transcervical) and fixed-time artificial insemination in swine. Raleigh: College of Agriculture & Life Sciences. **Annual Swine Report**, 2002.

BENEDET, J. A.; SHIBAMOTO, T. Role of transition metals, Fe(II), Cr(II), Pb(II) and Cd(II) in lipid peroxidation. **Food Chemistry**, v. 107, p. 165-168, 2008.

BENNEMANN, P. E.; MILBRADT, E.; DIEHL, G. N.; WEBER, D.; SCHIMIDT, A. C. T.; BERNARDI, M. L.; WENTZ, I.; BORTOLOZZO, F. P. Reproductive performance of sows

submitted to intrauterine insemination at different pre-ovulatory intervals. **Animal Reproduction**, v. 1, p. 106–110, 2004.

BENOV, L.; SZTEJNBERG, L.; FRIDOVICH, I. Critical evaluation of the use of hydroethidine as a measure of superoxide anion radical. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 25, p. 826-31, 1998.

BLIER, P. U.; DUFRESNE, F.; BURTON, R. S. Natural selection and the evolution of mtDNA-encoded peptides: evidence for intergenomic co-adaptation. **Trends in Genetics**, v. 17, p. 400-406, 2001.

BORTOLOZZO, F. P.; BERNARDI, M. L.; WENTZ, I. Perspectivas do emprego da inseminação artificial intra-uterina em suínos. In: CONGRESSO DA ABRAVES, 12., 2005, **Anais...** Fortaleza: ABRAVES, 2005. p. 36-47.

BORTOLOZZO, F. P.; WENTZ, I.; BENNEMANN, P. E.; BERNARDI, M. K.; WOLLMANN, E. B.; FERREIRA, F. M.; BORCHARDT NETO, G. **Inseminação artificial na suinocultura tecnificada**. Porto Alegre, Palloti, 2005. 185 p.

BOURNE, L. C.; RICE-EVANS, C. A. Detecting and measuring bioavailability of phenolics and flavonoids in humans: pharmacokinetics of urinary excretion of dietary ferulic acid. **Methods in Enzymology**, v. 299, p. 91-151, 1999.

BRAGA, C. S. R. **Fertilidade de fêmeas suínas inseminadas com sêmen diluído e resfriado a 5°C ou 17°C**. 2007. 172 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2007.

BRANCO, C. S.; GARCEZ, M. E.; PASQUALOTTO, F. F.; ERDTMAN, B.; SALVADOR, M. Resveratrol and ascorbic acid prevent DNA damage induced by cryopreservation in human semen. **Cryobiology**, v. 60, n. 2, p. 235-237, 2010.

BREZEZINSKA-STEVBODZINSKA, F.; SLEBODZINSKI, A. B.; PIETRAS, B.; WIEEZOREK, G. Antioxidant effect of vitamin E and glutathione on lipid peroxidation in boar semen plasma. **Biological Trace Element Research**, v. 47, p. 69-74, 1995.

BRITTES, J.; LÚCIO, M.; NUNES, C.; LIMA, J. L.; REIS, S. Effects of resveratrol on membrane biophysical properties: relevance for its pharmacological effects. **Chemistry and Physics of Lipids**, v. 163, p. 747-754, 2010.

BROUWERS, J. F.; GADELLA, B. M. In situ detection and localization of lipid peroxidation in individual bovine sperm cells. **Free Radical and Biology Medicine**, v. 35, p. 1382-91, 2003.

BROUWERS, J. F.; SILVA, P. F.; GADELLA, B. M. New assays for detection and localization of endogenous lipid peroxidation products in living boar sperm after BTS dilution or after freeze-thawing. **Theriogenology**, v. 63, p. 458-69, 2005.

BROWN, L.; KROON, P. A.; DAS, D. K.; DAS, S.; TOSAKI, A.; CHAN, V.; SINGER, M. V.; FEICK, P. The biological responses to resveratrol and other polyphenols from alcoholic beverages. **Alcoholism: clinical and experimental research**, v. 33, p. 1513–23, 2009.

BUCAK, M. N.; ATAMAN, M. B.; BASPINAR, N.; UYSAL, O.; TASPINAR, M.; BILGILI, A.; ÖZTÜRK, C.; GÜNGÖR, S.; INANÇ, M. E.; AKAL, E. Lycopene and resveratrol improve post-thaw bull sperm parameters: motility, mitochondrial activity and DNA integrity. **Andrologia**, v. 47, p. 545–552, 2015.

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

CANDINI, P. H.; MORETTI, A. S.; SILVERIA, P. R. S.; ZANELLA, E.; VIANA, C. H. C.; SANTOS, I. C. C. **Utilization of a protocol of synchronization of ovulation, induced by porcine LH, to perform insemination programs in fixed time, with one or two inseminations per sow.** In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON PIG REPRODUCTION, 6., 2001, Cambridge. **Proceedings...** Cambridge: Reproduction and Fertility, 2001. p. 99.

CANDINI, P. H.; MORETTI, A. S.; ZANELLA, E. L.; SILVEIRA, P. R. S.; VIANA, C. H. C.; SANTOS, I. Única ou dupla inseminação artificial em tempo fixo em porcas com ovulações induzidas pelo Hormônio Luteinizante. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, 41, 124–130, 2004.

CAROCHO, M.; FERREIRA, I. C. F. R. A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: Natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. **Food and Chemical Toxicology**, v. 51, p. 15–25, 2013.

CARVALHO, O. F.; FERREIRA, J. D. J.; SILVEIRA, N. A.; FRENEAU, G. E. Efeito oxidativo do óxido nítrico e infertilidade no macho. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 38, n. 1, p. 33–38, 2002.

CELEGHINI, E. C. C.; ARRUDA, R. P.; ANDRADE, A. F. C.; NASCIMENTO, J.; RAPHAEL, C. F. Practical techniques for bovine sperm simultaneous fluorimetric assessment of plasma, acrosomal and mitochondrial membranes. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 42, p. 479–488, 2007.

CEROLINE, S.; MALDJIAN, A.; SURAI, P.; BOBLE, R. Viability susceptibility to peroxidation and fatty acid composition of boar semen during liquid storage. **Animal Reproduction Science**, v. 58, p. 99–111, 2000.

CHRISTOVA, Y.; JAMES, P. S.; JONES, R. Lipid diffusion in sperm plasma membranes exposed to peroxidative injury from oxygen free radicals. **Molecular Reproduction and Development**, v. 68, p. 365–72, 2004.

COLÉGIO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL. **Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal**. 2. ed. Belo Horizonte: CBRA, 1998. 49 p.

COLLODEL, G.; FEDERICO, M. G.; GEMINIANI, M.; MARTINI, S.; BONECHI, C.; ROSSI, C.; FIGURA, N.; MORETTI, E. Effect of trans-resveratrol on induced oxidative stress in human sperm and in rat germinal cells. **Reproductive Toxicology**, v. 31, n. 2, p. 239-246, 2011.

CORRÊA, M. N.; MEINCKE, W.; LUCIA JR., T.; DESCHAMPS, J.C. **Inseminação artificial em suínos**. Pelotas: Printar Gráfica e Editora, 2001. 194 p.

COTTART, C.; ANTOINE, V.; MORIZOT, C.; BEAUDEUX, J. Resveratrol bioavailability and toxicity in humans. **Molecular and Nutrition Food Research**, v. 54, n.1, p. 7-16, 2010.

DALLANORA, D.; MEZALIRA, A.; KATZER, L. H.; BERNARDI, M. L.; BORTOLOZZO, F. P.; WENTZ, I. Desempenho reprodutivo de fêmeas suínas inseminadas pela técnica intra-uterina ou tradicional. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 39, n. 8, p. 815-819, 2004.

DE ANDRADE, A. F. C.; ARRUDA, R. P.; CELEGHINI, E. C. C.; NASCIMENTO, J.; MARTINS, S. M. M. K.; RAPHAEL, C. F.; MORETTI, A. S. Fluorescent stain method for the simultaneous determination of mitochondrial potential and integrity of plasma and acrosomal membranes in boar sperm. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 42, p. 190-194, 2007.

DE ANDRADE, A. F. C.; RAPHAEL, C. F.; MARTINS, S. M. M. K.; PERES, K. R.; BIANCONI, L. L.; ARRUDA, R. P. Seminal plasma reduce acrosome reaction in post-thawed equine spermatozoa. **Animal Reproduction**, v. 3, p. 266, 2006.

DE ANDRADE, A. F. C.; ZAFFALON, F. G.; CELEGHINI, E. C. C.; NASCIMENTO, J.; BRESSAN, F. F.; MARTINS, S. M. M. K.; ARRUDA, R. P. Post-thaw seminal plasma addition reduces tyrosine phosphorylation present in the cryopreserved equine sperm surface, but does not reduce lipid peroxidation, **Theriogenology**, v. 77, p. 1866-1872, 2012.

DE ANDRADE, A. F. C.; ZAFFALON, F. G.; CELEGHINI, E. C. C.; NASCIMENTO, J.; TARRAGÓ, O. F. B.; MARTINS, S. M. M. K.; ALONSO, M. A.; ARRUDA, R. P. Addition of seminal plasma to post-thawing equine semen: what is the effect on sperm cell viability? **Reproduction in Domestic Animals**, v. 46, p. 682-686, 2011.

DE LAMIRANDE, E.; GAGNON, C. Capacitation-associated production of superoxide anion by human spermatozoa. **Free Radical and Biology Medicine**, v. 18, p. 487-495, 1995.

DE LAMIRANDE, E.; JIANG, H.; ZINI, A.; KODAMA, H.; GAGNON, C. Reactive oxygen species and sperm physiology. **Review of Reproduction**, v. 2, p. 48-54, 1997.

DE LEEUW, F. E.; CHING CHEN, H.; COLENBRANDER, B. E. M.; VERKLEIJ, A. J. Cold-induced ultrastructural changes in bull and boar sperm plasma membranes. **Cryobiology**, v. 27, p. 171-183, 1990.

DE LEEUW, F. E.; COLENBRANDER, B.; VERKLEIJ, A. J. The role membrane damage plays in cold shock and freezing injury. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 1, p. 95-104, 1991.

DEGÁSPARI, C. H.; WASZCZYNSKYJ, N. Propriedades antioxidantes de compostos fenólicos. **Visão Acadêmica**, v. 5, n. 1, p. 33-40, 2004.

DELMAS, D.; JANNIN, B.; LATRUFFE, N. Resveratrol: natural properties against atherosclerosis, associated proinflammatory effects and aging. **Molecular and Nutrition Food Research**, v. 49, p. 377-395, 2005.

DOLINSKY, V. W.; CHAN, A. Y.; ROBILLARD FRAYNE, I.; LIGHT, P. E.; DES ROSIERS, C.; DYCK, J.R. Resveratrol prevents the prohypertrophic effects of oxidative stress on LKB1. **Circulation**, v. 119, p. 1643-52, 2009.

DOMÍNGUEZ-REBOLLEDO, A. E.; MARTÍNEZ-PASTOR, F.; FERNÁNDEZ-SANTOS, M. R.; OLMO, E.; BISBAL, A.; ROS-SANTAELLA, J. L.; GARDE, J. J. Comparison of the TBARS assay and BODIPY C11 probes for assessing lipid peroxidation in red deer spermatozoa. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 45, p. 360-368, 2010.

DRUMMEN, G. P. C.; VAN LIEBERGEN, L. C. M.; OP DEN KAMP, J. A. F.; POST, J. A. C11-BODIPY (581/591), an oxidation-sensitive fluorescent lipid peroxidation probe: (micro)spectroscopic characterization and validation of methodology. **Free Radical and Biology Medicine**, v. 33, p. 473-490, 2002.

FERNÁNDEZ-SANTOS, M. R.; ESTESO, M. C.; SOLER, A. J.; MONTORO, V.; GARDE, J. J. Effects of egg yolk and cooling rate on the survival of refrigerated of red deer (*Cervus elaphus hispanicus*) epididymal spermatozoa. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 41, p. 114-118, 2006.

FERREIRA, A. L. A.; MATSUBARA, L. S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 43, n. 1, p. 61-68, 1997.

FLESCHE, F. M.; COLENBRANDER, B.; VAN GOLDE, L. M. G.; GADELLA, B. M. Capacitation induces tyrosine phosphorylation of proteins in the boar sperm plasma membrane. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 262, p. 787-792, 1999.

FOXCROFT, G. R.; DYCK, M. K.; RUIZ-SANCHEZ, A.; NOVAK, S.; DIXON, W. T. Identifying useable semen. **Theriogenology**, v. 70, p. 1324-1336, 2008.

FRÉMONT, L. Biological effects of resveratrol. **Life Sciences**, v. 66, p. 663-73, 2000.

FUNAHASHI, H.; SANO, T. Select antioxidants improve the function of extended boar semen stored at 10-8°C. **Theriogenology**, v. 63, p. 1605-1616, 2005.

FULDA, S.; GALLUZZI, L.; KROEMER, G. Targeting mitochondria for cancer therapy. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 9(6), p. 447-464, 2010.

GADEA, J. Semen extenders used in the artificial insemination of swine. A review. **Spanish Journal of Agricultural Research**, v. 1, n. 2, p. 17-27, 2003.

GAMA, R. D.; VIANNA, W. L.; PINESE, M. E.; DE CAMPOS ROSETO, A.; MORETTI, A. S. Different doses of porcine luteinizing hormone in precocious puberty induction in gilts. **Reproduction Domestic Animals**, v. 40, p. 433-435, 2005.

GARCEZ, M. E.; DOS SANTOS, B. C.; LARA, L. V.; PASQUALOTTO, F. F.; SALVADOR, M. Effects of resveratrol supplementation on cryopreservation medium of human semen. **Fertility and Sterility**, v. 94, n. 6, p. 2118-2121, 2010.

GERRITS, R. J.; LUNNEY, J. K.; JOHNSON, L. A.; PURSEL, V. G.; KRAELING, R. R.; ROHRER, G. A.; DOBRINSKY, J. R. Perspectives for artificial insemination and genomics to improve global swine populations. **Theriogenology**, v. 63, p. 283-299, 2005.

GHARAGOZLOO, P.; AITKEN, R. J. The role of sperm oxidative stress in male infertility and the significance of oral antioxidant therapy. **Human Reproduction**, v. 26, n. 7, p. 1628-1640, 2011.

GHELLINCK, A.; SHEN, C.; FRAGNETO, G.; KLOSGEN, B. Probing the position of resveratrol in lipid bilayers: a neutron reflectivity study. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 134, p. 65-72, 2015.

GIL-GUZMAN, E.; OLLERO, M.; LOPEZ, M. C.; SHARMA, R. K.; ALVAREZ, J. G.; THOMAS, A. J.; AGARWAL, A. Differential production of reactive oxygen species by subsets of human spermatozoa at different stages of maturation. **Human Reproduction**, Oxford, v. 16, n. 9, p. 1922-1930, 2001.

GREEN, K.; BRAND, M. D.; MURPHY, M. P. Prevention of mitochondrial oxidative damage as a therapeutic strategy in diabetes. **Diabetes**, v. 53, p. 110-118, 2004. Supplement, 1.

GUERRA, M. M. P.; EVAN, S. G.; MAXWELL, W. M. C. Papel de oxidantes e antioxidantes na andrologia. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 28, n. 4, p. 187-195, 2004.

GUTHRIE, H. D.; WELCH, G. R. Impact of storage prior to cyopreservation on plasma membrane function and fertility of boar sperm. **Theriogenology**, v. 63, p. 316-410, 2005.

GUTHRIE, H. D.; WELCH, G. R. Use of fluorescence-activated flow cytometry to determine membrane lipid peroxidation during hypothermic liquid storage and freeze-thawing of viable boar sperm loaded with 4,4-difluoro-5-(4-phenyl-1,3-butadienyl)-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacene-3-undecanoic acid. **Journal of Animal Science**, v. 85, p. 1402-1411, 2007.

GUTHRIE, H. D.; WELCH, G. R.; LONG, L. A. Mitochondrial function and reactive oxygen species action in relation boar motility. **Theriogenology**, v. 70, p. 1209-1215, 2008

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. **Free radicals in biology and medicine**. 3. ed. Oxford: Oxford University Press, 2001. 936 p.

HAO, H. D.; HE, L. R. Mechanisms of cardiovascular protection by resveratrol. **Journal of Medicinal Food**, v. 7, p. 290-298, 2004.

JANERO, D. R. Malondialdehyde and thiobarbituric acid-reactivity as diagnostic indices of lipid peroxidation and peroxidative tissue injury. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 9, p. 515-540, 1990.

JEANDET, P.; DOUILLET, A. C.; DEBORD, S.; SBAGHI, M.; BESSIS, R.; ADRIAN, M. Phytoalexins from the Vitaceae: Biosynthesis, phytoalexin gene expression in transgenic plants, antifungal activity and metabolism. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, p. 2731-2741, 2002.

JENTZSCH, A. M.; BACHMANN, H.; FÜRST, P.; BIESALSKI, H. K. Improved analysis of malondialdehyde in human body fluids. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 20, p. 251-256, 1996.

JOHNSON, L. A. Current developments in swine semen: preservation, artificial insemination and sperm sexing. In: CONGRESS INTERNATIONAL PIG VETERINARY SOCIETY. 15., 1998, Birmingham, England. **Proceedings...** Nottingham: Nottingham University Press, 1998. p. 225-229.

JOHNSON, L. A.; AALBERS, J. G.; GROOTEN, H. J. G. Artificial insemination of swine: fecundity of boar semen stored in Beltsville TS (BTS), modified modena (MM), or MR-A and inseminated on one, three and four days after collection. **Reproduction of Domestic Animals**, v. 23, n. 2, p. 49-55, 1988.

JOHNSON, L. A.; WEITZE, K. F.; FISER, P.; MAXWELL, W. M. C. Storage of boar semen. **Animal Reproduction Science**, v. 62, n. 1/3, p. 143-172, 2000.

JONES, R.; MANN, T. Lipid peroxidation in spermatozoa; formation, role of plasmalogen, and physiological significance. **Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences**, v. 193, n. 1113, p. 317-333, 1976.

JUAN, M. E.; GONZÁLEZ-PONS, E.; MUNUERA, T.; BALLERTE, J.; RODRÍGUEZ-GIL, J. E.; PLANA, J. M. Trans-resveratrol, a natural antioxidant from grapes, increases sperm output in healthy rats. **The Journal of Nutrition**, v. 135, p. 757-760, 2005.

KASDALLAH-GRISSA, A.; MORNAGUI, B.; AOUANI, E.; HAMMAMI, M.; GHARBI, N.; KAMOUN, A.; EL-FAZAA, S. Protective effect of resveratrol on ethanol-induced lipid peroxidation in rats. **Alcohol and Alcoholism**, v. 41, p. 236-239, 2006.

KNOX, R.; LEVIS, D.; SAFRANSKI, T.; SINGLETON, W. An update on North American boar stud practices. **Theriogenology**, v. 70, p. 1202–1208, 2008.

KOPPERS, A.; DE IULIIS, G. N.; FINNIE, J.; MCLAUGHLIN, E.; AITKEN, R. Significance of mitochondrial reactive oxygen species in the generation of oxidative stress in spermatozoa. **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 93, p. 3199- 207, 2008.

KOTHARI, S.; THOMPSON, A.; AGARWAL, A.; PLESSES, S. S. Free radicals: their beneficial and detrimental effects on sperm functions. **Indian Journal of Experimental Biology**, v. 48, p. 425-435, 2010.

KOURY, J. C.; DONANGELO, C. M. Zinco, estresse oxidativo e atividade física. **Revista de Nutrição**, v. 16, n. 4, p. 433-441, 2003.

KOVACIC, P.; SOMANATHAN, R. Multifaceted approach to resveratrol bioactivity: focus on antioxidant action, cell signaling and safety. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v.3, p.86-100, 2010.

KYSELOVA, V.; PEKNICOVA, J.; BUCKIOVA, D.; BOUBELIK, M. Effects of p-nonylphenol and resveratrol on body and organ weight and in vivo fertility of outbred CD-1 mice. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v.1, p. 30-39, 2003.

LAFOREST, J. P.; ALLARD, D. Comparison of four extenders for long-term storage of fresh boar semen. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 31, p. 275-276, 1996.

LAPENNA, D.; CIOFANI, G.; PIERDOMENICO, S. D.; GIAMBERARDINO, M. A.; CUCCURULLO, F. Reaction conditions affecting the relationship between thiobarbituric acid reactivity and lipid preoxides in human plasma. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 31, p. 331-335, 2001.

LEONARD, S. S.; XIA, C.; JIANG, B. H.; STINEFELT, B.; KLANDORF, H.; HARRIS, G. K.; SHI, X. Resveratrol scavenges reactive oxygen species and effects radical-induced cellular responses. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 309, p. 1017-1026, 2003.

LEVIS, D. Liquid boar semen production: current extender technology and where do we go from here! In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON BOAR SEMEN PRESERVATION. 4., 1999, Beltsville. **Proceedings...** Lawrence: Allen, 2000. p. 121-128.

LI, Y. **Antioxidants in biology and medicine**: essentials, advances and clinical applications. New York: Nova Science Publishers, 2011.

LIMA, E. S.; ABDALLA, D. S. P. Peroxidação lipídica: mecanismos e avaliação em amostras biológicas. **Revista Brasileira de Ciência Farmacêutica**, v. 37, n. 3, p. 293-303, 2001.

LIMA, L. R. P.; OLIVEIRA, T. T.; NAGEM, T. J.; PINTO, A. S.; STRINGHETA, P. C.; TINOCO, A. L. A.; SILVA, J. F. Quercetina e seus efeitos no metabolismo lipídico de coelhos. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 38, p. 196-200, 2001.

LOW, I. C.; CHEN, Z. X.; PERVAIZ, S. Bcl-2 modulates resveratrol-induced ROS production by regulating mitochondrial respiration in tumor cells. **Antioxidant and Redox Signaling**, v. 13, n. 6, p.807-819, 2010.

LUCIO, M.; FERREIRA, H.; LIMA, J. L. F. C.; REIS, S. Use of liposomes to evaluate the role of membrane interactions on antioxidant activity. **Analytica Chimica Acta**, v. 597, n. 1, p. 163-170, 2007.

LUCIO, M.; NUNES, C.; GASPAR, D.; FERREIRA, H.; LIMA, J. L. F. C.; REIS, S. Antioxidant activity of vitamin E and trolox: understanding of the factors that govern lipid peroxidation studies in vitro. **Food Biophysics**, v. 4, n. 4, p. 312-320, 2009b.

LUCIO, M.; NUNES, C.; GASPAR, D.; GOLEBSKA, K.; WISNIEWSKI, M.; LIMA, J. L. F. C.; BREZESINSKA, G.; REIS, S. Effect of anti-inflammatory drugs in phosphatidylcholine membranes: a fluorescence and calorimetric study. **Chemical Physics Letters**, v. 471, n.4/6, p. 300-309, 2009a.

LUSHCHAK, V. I. Free radicals, reactive oxygen species, oxidative stress and its classification. **Chemico-Biological Interactions**, v. 224, p. 164–175, 2014.

LUZ, H. K. M.; WANDERLEY, L. S.; FAUSTINO, L. R.; SILVA, C. M. G.; FIGUEREDO, J. R.; RODRIGUES, A. P. R. Papel de agentes antioxidantes na criopreservação de células germinativas e embriões. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 39, n. 2, p. 956-969, 2011.

LYMBEROPOULOS, A.; TSAKMAKIDIS, I.; KHALIFA, T. Effect of ram age on structural and functional competence of frozen-thawed spermatozoa in dairy sheep. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 45, p. 572-578, 2008.

MAIA, M. S.; BICUDO, S. D. Radicais livres, antioxidantes e função espermática em mamíferos: uma revisão. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 33, n. 4, p. 183-193, 2009.

MAIA, M. S.; BICUDO, S. D.; AZEVEDO, H. C.; SICHERLE, C. C.; de SOUSA, D. B.; RODELLO, L. Geração de metabólitos reativos do oxigênio (ROS) em diluentes para a criopreservação de sêmen. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL, 17., 2007, Belo Horizonte. **Anais...** Belo Horizonte: CBRA, 2007. v. 17, p. 198.

MARCHESI, D. E.; FENG, H. L. Sperm DNA integrity from sperm to egg. **Journal of Andrology**, v. 28, n. 4, p. 481-489, 2007.

MARTIN-HIDALGO, D.; HURTADO DE LLERA, A.; HENNING H.; WALLNER, U.; WABERSKI, D.; BRAGADO, M. J.; GIL, M. C.; GARCIA-MARIN, L. J. The Effect of

resveratrol on the quality of extended boar semen during storage at 17°C. **Journal of Agricultural Science**, v. 5, n. 8, p. 231-242, 2013.

MC LEAN, L. R.; HAGAMAN, K. A. Effect of lipid physical state on the rate of peroxidation of liposomes. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 12, n. 2, p. 113-119, 1992.

MELIZARA, A.; DALLANORA, D.; BERNARDI, M. L.; WENTZ, I.; BORTOLOZZO, F. P. Influence of sperm cell dose and post-insemination backflow on reproductive performance of intrauterine inseminated sows. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 40, p. 1-5, 2005.

MOJICA-VILLEGAS, M. A.; IZQUIERDO-VEGA, J. A.; CHAMORRO-CEVALLOS, G.; SÁNCHEZ-GUTIÉRREZ, M. Protective effect of resveratrol on biomarkers of oxidative stress induced by iron/ascorbate in mouse spermatozoa. **Nutrients**, v. 6, p. 489-503, 2014.

MOWRI, H.; NOJIMA, S.; INOUE, K. Effect of lipid composition of liposomes on their sensitivity to peroxidation. **Journal of Biochemistry**, v. 95, n. 2, p. 551-558, 1984.

NACIONAL RESEARCH CONCIL. **Nutrient requirements of swine**. 10. ed. Washington DC: NRC, 1998. p. 210.

NEILD, D. M.; BROUWERS, J. F. H. M.; COLENBRANDER, B.; AGUERO, A.; GADELLA, B. M. Lipid peroxide formation in relation to membrane stability of fresh and frozen thawed stallion spermatozoa. **Molecular Reproduction and Development**, v. 72, p. 230-238, 2005.

NICHI, M. **Sistema de proteção enzimática e níveis de peroxidação espontânea dos lipídeos seminais de touros zebuínos e taurinos criados a campo na região de Dourados, MS**. 2003. 103 p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Programa de pós-graduação em medicina veterinária – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003.

NICHI, M.; GOOVAERTS, I. G. F.; CORTADA, C. N. M.; BARNABE, V. H.; DE CLERCQ, J. B. P.; BOLS, P. E. J. Roles of lipid peroxidation and cytoplasmic droplets on in vitro fertilization capacity of sperm collected from bovine epididymides stored at 4 and 34 degrees C. **Theriogenology**, v. 67, p. 334-340, 2007.

NORDBERG, J.; ARNÉR, E. S. J. Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 31, n. 11, p. 1287-1312, 2001.

OHATA, P. M. **A influência do período de equilíbrio, do plasma seminal e da sensibilidade dos machos ao resfriamento na congelabilidade do sêmen suíno**. 2001. 81 f. Dissertação de Mestrado. Faculdade de Veterinária da UFRGS, Porto Alegre, 2001.

ORTEGA, A. M.; IZQUIERDO, A. C.; GÓMEZ, J. J. H.; OLIVAREZ-CORICHI, I. M.; TORRES, V. M. M.; MÉNDEZ, J. J. V. Peroxidación lipídica y antioxidantes en la preservación de sêmen: una revisión. **Interciencia**, v. 28, n. 12, p. 699-704, 2003.

ORTEGA-FERRUSOLA, C.; GONZALE FERNANDEZ, L.; MORRELL, J.; SALAZAR SANDOVAL, C.; MACIAS GARCIA, B.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H.; TAPIA, J.; PENA, F. Lipid peroxidation, assessed with BODIPY-C11, increases after cryopreservation of stallion spermatozoa, is stallion-dependent and relates to apoptotic-related changes. **Reproduction**, v. 138, p. 55-63, 2009.

OTT, V.; GOGVADZE, V.; ORRENIUS, V.; ZHIVOTOVSKY, B. Mitochondria, oxidative stress and cell death. **Apoptosis**, v. 12, p. 913-922, 2007.

OURIQUE, G. M.; FINAMOR, I. A.; SACCOL, E. M.; RIFFEL, A. P.; PES, T. S.; GUTIERREZ, K.; BARRETO, K. P. Resveratrol improves sperm motility, prevents lipid peroxidation and enhances antioxidant defences in the testes of hyperthyroid rats. **Reproductive Toxicology**, v. 37, p. 31-39, 2013.

PAP, E. H.; DRUMMEN, G. P.; WINTER, V. J.; KOOIJ, T. W.; RIJKEN, P.; WIRTZ, K. W.; OP DEN KAMP, J. A.; HAGE, W. J.; POST, J. A. Ratio-fluorescence microscopy of lipid oxidation in living cells using C11-BODIPY (581/591). **FEBS Letters**, v. 453, p. 278-282, 1999.

PEREZ-GARCIA, T. Importância de la tecnologia en La obtención del semen bovino. **Revista Patronal Biology Animal**, v. 4, p. 249-257, 1958.

PERVAIZ, S.; HOLME, A. L. Resveratrol: its biologic targets and functional activity. *Antioxid. Redox Signal.*, v. 11(11), p. 2851-2897, 2009.

PINTO, M. C.; GARCÍA-BARRADO, J. A.; MACÍAS, P. Resveratrol is a Potent Inhibitor of the Dioxygenase Activity of Lipoxygenase. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 47, p. 4842-4846, 1999.

POULOS, A.; DARIN-BENNETT, A.; WHITE, I. G. The fosfolipid-bound fatty acids and aldehyds of mammalian spermatozoa. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry**, v. 46, n.13, p. 541-549, 1973.

RATH, D. Low dose insemination in sow: a review. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 37, p. 201-205, 2002.

REIS, G. R.; OHATA, P. M.; SCHWARZ, P. Identificação de cachacos com diferentes períodos de viabilidade in vitro. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL MINITUB-INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL EM SUÍNOS, 3., 2000, Flores da Cunha, RS. **Anais...**Flores da Cunha-RS, p. 42-49, 2000.

REVEL, A.; RAANANI, H.; YOUNGLAI, E.; XU, J.; HAN, R.; SAVOURET, J. F.; CASPER, R. F. Resveratrol, a natural aryl hydrocarbon receptor antagonist, protects sperm from DNA damage and apoptosis caused by benzo(a)pyrene. **Reproductive Toxicology**, v. 15, p. 479-486, 2001.

RICE, J. B.; STOLL, L. L.; LI, W. G.; DENNING, G. M.; WEYDERT, J.; CHARIPARE, et al. Low-level endotoxin induces potent inflammatory activation of human blood vessels: inhibition by statins. **Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology**, v. 23, p. 1576–82, 2003.

ROSTAGNO, H. S. **Tabelas brasileiras para aves e suínos: composição de alimentos e exigências nutricionais**. 3. ed. Viçosa: UFV, DZO, 2011. 252 p.

RUIZ, L.; SANTIANI, A.; SANDOVAL, R.; HUANCA, W.; DELGADO, A.; CORONADO, L.; ALZAMORA, Effect of two antioxidants (tempo and tempol) on ram semen cryopreservation using Tris extender. **Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú**, v. 18, p. 99-106, 2007.

SAALU, L. C. The incriminating role of reactive oxygen species in idiopathic male infertility: An evidence based evaluation. **Pakistan Journal of Biological Sciences**, v. 13, n. 9, p. 413-422, 2010.

SALEH, R. A.; AGARWAL, A. Oxidative stress and male infertility: From reseach bench to clinical practice. **Journal of Andrology**, Lawrence, v. 23, n. 6, p. 737-752, 2002.

SANCHEZ, R. S. Conceito e fundamentos utilizados na inseminação artificial de suínos. **Suínos & Cia**, n.2, p. 18-22, 2003.

SANOCKA, D.; KURPISZ, M. Reactive oxygen species and sperm cells. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v.2, p. 12-18, 2004.

SAREEN, D.; VAN GINKEL, P. R.; TAKACH, J. C.; MOHIUDDIN, A.; DARJATMOKO, S. R.; ALBERT, D. M.; POLANS, A. S. Mitochondria as the primary target of resveratrol-induced apoptosis in human retinoblastoma cells. **Investigative Ophthalmology and Visual Science**, v. 47, n. 9, p. 3708-3716, 2006.

SARLÓS, P.; MOLNÁR, A.; KÓKAI, M.; GÁBOR, G. Y.; RÁTKY, J. Comparative evaluation of the effect of antioxidants in the conservation of ram semen. **Acta Veterinaria Hungarica**, v. 50, n. 2, p. 235-245, 2002.

SATHER, A. P.; HARBISON, D. S.; SETH, P. C. A note on the influence of storage duration of fresh semen on fertilizing capacity and embryo survival in sows. **Animal Production**, v. 52, p. 554-557, 1991.

SCHEID, I. R et al. Comparação entre diluentes para conservação de sêmen suíno no estado líquido: resultados in vitro. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE VETERINÁRIOS ESPECIALISTAS EM SUÍNOS, 6., 1993, Águas de Lindóia-SP. **Anais...** 1993. p. 122.

SCHEID, I. R. Commercial Swine Artificial Insemination in Brazil: development and current use. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 26, p. 299-301. 1991. Supplement 1. Trabalho apresentado ao 2nd International Conference on Boar Semen Preservation, Beltsville., 1991.

SHARMA, R.; AGARWAL, A. Role of reactive oxygen species in male infertility. **Urology**, v. 48, p. 835-850, 1996.

SHIN, S.; HEE, J. J.; PARK, D.; JANG, M. J.; CHOI, J. H.; CHOI, B. H.; JOO, S. S.; NAHM, S. S.; KIM, J.; KIM, Y. B. Trans-resveratrol relaxes the corpus cavernosum ex vivo and enhances testosterone levels and sperm quality in vivo. **Archives of Pharmacal Research**, v. 31, p. 83-87, 2008.

SIES, H. Oxidative stress: oxidant and antioxidant. **Experimental Physiology**, v. 82, p. 291-295, 1997.

SIES, H. Strategies of antioxidant defense. **European Journal of Biochemistry**, v. 215, n. 2, p. 213-219, 1993.

SIKKA, S. C. Oxidative stress and role of antioxidants in normal and abnormal sperm function. **Frontiers in Bioscience**, New York, v. 1, p. 78-86, 1996.

SIKKA, S. C. Role of oxidative stress and antioxidants in andrology and assisted reproductive technology. **Journal of Andrology**, v. 25, n. 1, p. 5-18, 2004.

SILVA, E. C.; CAJUEIRO, J. F.; SILVA, S. V.; SOARES, P. C.; GUERRA, M. M. Effect of antioxidants resveratrol and quercetin on in vitro evaluation of frozen ram sperm. **Theriogenology**, v. 77, n. 8, p. 1722-1726, 2012.

SILVA, P. F. N.; GADELLA, B. M.; COLENBRANDER, B.; ROELEN, B. A. J. Exposure of bovine sperm to pro-oxidants impairs the developmental competence of the embryo after the first cleavage. **Theriogenology**, v. 67, p. 609-619, 2007.

SKULACHEV, V. P. Mitochondria-targeted antioxidants as promising drugs for treatment of age-related brain diseases. **Journal of Alzheimers Disease**, v. 28, p. 283-289, 2012.

SOARES, S. E. Ácidos fenólicos como antioxidantes. **Revista de Nutrição**, v. 15, p. 71-78, 2002.

SPANIER, G.; XU, H.; XIA, N.; TOBIAS, S.; DENG, S.; WOJNOWSKI, L.; FORSTERMANN, U.; LI, H. Resveratrol reduces endothelial oxidative stress by modulating the gene expression of superoxide dismutase 1 (SOD1), glutathione peroxidase 1 (GPx1) and NADPH oxidase subunit (Nox4). **Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 60, p. 111-116, 2009.

STAHLBERG, R.; HARLIZIUS, B.; WEITZE, K. F.; WABERSKI, D. Identification of embryo paternity using polymorphic DNA markers to assess fertilizing capacity of spermatozoa after heterospermic insemination in boars. **Theriogenology**, v. 53, p. 1365-1373, 1998.

STEVERINK, D. W. B.; SOEDE, N. M.; BOUWMAN, E. G.; KEMP, B. Semen backflow after insemination and its effects on fertilisation in sows. **Animal Reproduction Science**, v. 54, p. 109–119, 1998.

STOJANOVIĆ, S.; SPRINZ, H.; BREDE, O. Efficiency and mechanism of the antioxidant action of trans-resveratrol and its analogues in the radical liposome oxidation. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, New York, v. 391, n. 1, p. 79–89, 2001.

SUMRANSAP, P.; TUMMARUK, P.; KUNAVONGKRIT, A. Sperm distribution in the reproductive tract of sows after intrauterine insemination. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 42, p. 113–117, 2007.

TANNO, M.; KUNO, A.; YANO, T.; MIURA, T.; HISAHARA, S.; ISHIKAWA, S.; SHIMAMOTO, K.; HORIO, Y. Induction of manganese superoxide dismutase by nuclear translocation and activation of SIRT1 promotes cell survival in chronic heart failure. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 285, p. 8375–82, 2010.

TONIOLLI, R.; JATAHY, P. C.; SILVA, M. C.; MOREIRA, F. R. C. Utilização do leite desnatado e do ácido 3-indol acético na conservação do sêmen suínos. **Ciência Animal**, v. 11, n. 1, p. 21–26, 2001.

TONIOLLI, R.; MESQUITA, D. S. M.; CAVALCANTE, S. G. Avaliação in vitro do sêmen de suíno diluído em BTS e na água de coco in natura e estabilizada. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 22, p. 198–201, 1998.

TRELA, B. C.; WATERHOUSE, A. L. Resveratrol: isomeric molar absorptivities and stability. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 44, n. 5, p. 1253–1257, 1996.

TURRENS, J. F. Mitochondrial formation of reactive oxygen species. **Journal of Physiology**, v. 552, p. 335–344, 2003.

UGURALP, S.; MIZRAK, B.; BAY KARABULUT, A. Resveratrol reduces ischemia reperfusion injury after experimental testicular torsion. **European Journal Pediatric Surgery**, v. 15, p. 114–119, 2005.

UNGVARI, Z.; OROSZ, Z.; RIVERA, A.; LABINSKY, N.; XIANGMIN, Z.; OLSON, S.; et al. Resveratrol increases vascular oxidative stress resistance. **American Journal of Physiology Heart and Circulatory Physiology**, v. 292, p. 2417–24, 2007.

VAN GINKEL, P. R.; SAREEN, D.; SUBRAMANIAN, L.; WALKER, Q.; DARJATMOKO, S. R.; LINDSTROM, M. J.; POLANS, A. S. Resveratrol inhibits tumor growth of human neuroblastoma and mediates apoptosis by directly targeting mitochondria. **Clinical Cancer Research**, v. 13, n. 17, p. 5162–5169, 2007.

WEBER, H. **Zur Kalteschoskempfindlichkeit von Eberspermiem: Einfluß von Verdünnermedium, Inkubation und Abkühlrate**. 1989. 103 p. Tese (Doutorado em Reprodução Animal) – Hannover: Tierärztliche Hochschule, 1989.

WEITZE, K. F. long-term storage of extender boar semen. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 26, p. 231-253, 1991. Supplement 1.

WENTZ, I.; BORTOLOZZO, F. P. Inseminação artificial em suínos. In: SOBESTIANSKY, J.; WENTZ, I.; SILVEIRA, P. R. S.; SESTI, L. A. C. **Suinocultura intensiva**: produção, manejo e saúde do rebanho. 2. ed. Concórdia: Embrapa-CNPSA, 1998. p. 209-220.

WOLKEN, A.; RATH, D.; BORTOLOZZO, F. P.; WENTZ, I.; MARQUETTI, A. Sows can successfully be inseminated non-surgically into the distal uterine horn with a highly reduced number of sperm cells. **Theriogenology**, v. 57, p. 392, 2002.

XIA, E.; DEN, G.; GUO, Y.; LI, H. Biological activities of polyphenols from grapes. **International Journal of Molecular Science**, v. 11, p. 622-646, 2010.

ZHANG, D. X.; ZOU, A. P.; LI, P. L. Ceramide reduces endothelium dependent vasodilation by increasing superoxide production in small bovine coronary arteries. **Circulation Research**, v. 88, p. 824-31, 2001.

ZHENG, J.; RAMIREZ, V. D. Inhibition of mitochondrial proton F₀F₁-ATPase/ATP synthase by polyphenolic phytochemicals. **British Journal of Pharmacology**, v. 130(5), p. 1115-1123, 2000.

ZINI, A.; DE LAMIRANDE, E.; GAGNON, C. Reactive oxygen species in semen of infertile patients: levels of superoxide dismutase and catalase-like activities in seminal plasma and spermatozoa. **International Journal of Andrology**, v. 16, p. 183-188, 1993.

ZINI, A.; LIBMAN, J. Sperm DNA damage: clinical significance in the era of assisted reproduction. **Canadian Medical Association Journal**, v. 175, n. 5, p. 494-500, 2006.

ZINI, R.; MORIN, C.; BERTELLI, A.; BERTELLI, A. A.; TILLEMENT, J. P. Effects of resveratrol on the rat brain respiratory chain. **Drugs under Experimental and Clinical Research**, v. 25, n. 2-3, p. 87-97, 1999.

ZUNINO, S. J.; STORMS, D. H. Resveratrol-induced apoptosis is enhanced in acute lymphoblastic leukemia cells by modulation of the mitochondrial permeability transition pore. **Cancer Letters**, v. 240, n. 1, p. 123-134, 2006.

ANEXO A**FORMOL SALINO 4%**

Componentes:	Quantidade (1000 mL)
--------------	----------------------

Formol 37%.....	40 mL
-----------------	-------

DPBS/Solução salina.....	960 mL
--------------------------	--------

ANEXO B

Resveratrol (R5010, 100 mg - Sigma-Aldrich Co., Saint Louis, Missouri, EUA)

Peso molecular: 228,24 g/mol

Diluição em DMSO: 0,5% na solução final de 1.500µL (volume amostras para experimento *in vitro*) = 7,5 µL

Diluição em DMSO: 0,5% na solução final de 50.000µL (volume doses inseminantes para experimento *in vivo*) = 250 µL

Concentrações propostas: 0,01 mM; 0,1 mM e 1,0 mM

Solução trabalho (ST):

ST 2 para o tratamento 0,01 mM

$$0,01 \text{ mM} \cdot 1500\mu\text{L} = 7,5\mu\text{L} \cdot x$$

$$X = 2 \text{ mM}$$

ST 20 para o tratamento 0,1 mM

$$0,1 \text{ mM} \cdot 1500\mu\text{L} = 7,5\mu\text{L} \cdot x$$

$$X = 20 \text{ mM}$$

ST 200 para o tratamento 1,0 mM

$$1,0 \text{ mM} \cdot 1500\mu\text{L} = 7,5\mu\text{L} \cdot x$$

$$X = 200 \text{ mM}$$

ANEXO C

Indutores de estresse oxidativo:

H₂O₂ (Peróxido de hidrogênio)

Peso molecular: 34

densidade: 1,11 (peróxido de hidrogênio 30%)

Solução trabalho de 500 mM em 1 mL

$0,5 = m/34.0,001$

$m = 0,017g$

$d = m/v$

$1,11 = 0,017/v$

$v = 15,3 \mu L$ de H₂O₂ + 984,7 μL de sais de TALP

Adicionar 15 μL de peróxido de hidrogênio em 150 μL de amostra

FeSO₄ (Sulfato de ferro)

Solução trabalho 64 mM

Diluir 0,01779g do sulfato de ferro em 1mL de água destilada

Adicionar 1,5 μL em 150 μL de amostra

ANEXO D

TALP *SPERM* (Bavister et al., 1983)

1. Soluções de sais de TALP (para preparar 500 mL)

Componentes:

- NaCl.....2,100g
- KCl.....0,935g
- NaHCO₃.....1,05g
- NaH₂PO₄.....0,025g
- CaCl₂H₂O.....0,145g
- MgCl₆H₂O.....0,04g
- Hepes.....3,25g

Preparo:

- Diluir CaCl₂H₂O e MgCl₆H₂O em 200 mL de água Milli-Q;
- Os demais sais devem ser diluídos em 200 mL de água Milli-Q;
- Combinar as duas soluções e completar para 500 mL;
- Filtrar;
- Manter refrigerado;

2. Soluções de metabólitos glicosados

A. Solução estoque (para preparar 500 mL)

Componentes:

- Glicose.....2,500g
- Lactato de sódio.....9,25 mL
- Piruvato de sódio.....70 mg
- Pen-Strep.....12,5 mL

Preparo:

- Dissolver todos os componentes;
- Aliquotar (alíquotas de 5 mL);
- Manter congelado (-20°C);

B. Solução trabalho

- Pipetar 45 mL da solução de sais de TALP;
- Ajustar pH para 7,4;
- Adicionar 5 mL da solução estoque de metabólitos glicosados;
- Filtrar em filtro de 0,45 µm;
- Aliquotar (alíquotas de 300 µL);
- Manter em freezer (-20°C);

3. Preparo do dia

Componentes:

- Solução de sais de TALP.....10 mL
- Solução trabalho de metabólitos glicosados.....200 µL
- Albumina Sérica Bovina (BSA).....100 mg

Preparo:

- Dissolver BSA e metabólitos glicosados em TALP e incubar por 10 minutos;
- Ajustar o pH para 7,4;
- Filtrar em filtro de 0,45 µm;

ANEXO E

TALP *SPERM* MODIFICADO

1. Soluções de sais de TALP (para preparar 500 mL)

Componentes:

- NaCl.....2,100g
- KCl.....0,935g
- NaH₂PO₄.....0,025g
- MgCl₆H₂O.....0,04g
- Hepes.....3,25g

Preparo:

- Diluir MgCl₆H₂O em 200 mL de água Milli-Q;
- Os demais sais devem ser diluídos em 200 mL de água Milli-Q;
- Combinar as duas soluções e completar para 500 mL;
- Manter refrigerado;

2. Soluções de metabólitos glicosados

A. Solução estoque (para preparar 500 mL)

Componentes:

- Glicose.....2,500g
- Lactato de sódio.....9,25 mL
- Piruvato de sódio.....70 mg
- Pen-Strep.....12,5 mL

Preparo:

- Dissolver todos os componentes;
- Aliquotar (alíquotas de 5 mL);
- Manter congelado (-20°C);

B. Solução trabalho

- Pipetar 45 mL da solução de sais de TALP;
- Ajustar pH para 7,4;
- Adicionar 5 mL da solução estoque de metabólitos glicosados;
- Filtrar em filtro de 0,45 µm;
- Aliquotar (alíquotas de 300 µL);
- Manter em freezer (-20°C);

3. TALP SPERM MODIFICADO (preparo do dia)

Componentes:

- Solução de sais de TALP.....10 mL
- Solução trabalho de metabólitos glicosados.....200 µL

Preparo:

- Misturar os componentes e incubar por 10 minutos;
- Ajustar o pH para 7,4;

ANEXO F

Preparo das sondas fluorescentes

Syto 59 (5 mM, S11341, Molecular Probes Inc., Eugene, Oregon, EUA)

5 mM em 100 µl de DMSO

Concentração na solução final: 5 nM

SE: 500 µM

ST: 750 nM

SE:

$$5 \text{ mM} \cdot 100 \text{ µl} = X \text{ mM} \cdot 1000 \text{ µl}$$

$$X = 0,5 \text{ mM ou } 500 \text{ µM}$$

ST:

$$500 \text{ µM} \cdot X = 0,75 \text{ µM} \cdot 1000 \text{ µl}$$

$$X = 1,5 \text{ µl da solução estoque}$$

$$998,5 \text{ de DMSO}$$

- Adicionar 1 µl da ST para uma concentração final de 5 nM em 150 µl

FITC-PSA (100 µg/mL, L-0770, Sigma-Aldrich Co., Saint Louis, Missouri, EUA)

2 mg – 200 µg

100µg.....1mL

200µg.....x

x= 20 mg

- Deixar o FITC-PSA em temperatura ambiente;
- Adicionar 1 mL de PBS ao frasco de FITC-PSA;
- Homogeneizar bem (vórtex);
- Cobrir um tubo cônico de 50 mL com papel alumínio;

- Transferir o conteúdo do frasco do FITC-PSA para o tubo;
- Lavar o frasco de FITC-PSA 5 vezes 1 mL cada vez de PBS, e em seguida transferir para o tubo cônico;
- Completar com 14 mL de PBS;

Solução estoque de azida de sódio 1%

- Adicionar 0,2g de azida de sódio (Sigma-Aldrich, S8032) a 20 mL de PBS

Iodeto de Propídio (0,5 mg/mL, L0770, Sigma-Aldrich Co., Saint Louis, Missouri, EUA)

Solução estoque 25 mg/ml

- Adicionar 1 mL de DMSO à 25 mg de IP;
- - Aliquotar em microtubos e armazenar à -20°C ;

Solução trabalho 0,5 mg/mL

- Adicionar 20 μL de IP (solução estoque, 25 mg/mL) a 980 μL de PBS;
- - Aliquotar em microtubos e armazenar a -20°C ;

JC-1 (153 μM , T3168, Molecular Probes Inc., Eugene, Oregon, EUA)

Solução estoque 1,53 μM

- Diluir o conteúdo do frasco de JC-1 em 5 mL de DMSO;
- Homogeneizar bem;
- Deixar descansar por 5 minutos antes de fazer a solução trabalho.

Solução trabalho 153 μM

- Pipetar 100 μL de SE de JC-1;
- Diluir em 900 μL de DMSO;
- Homogeneizar bem;
- Aliquotar em microtubos (0,6 mL) protegidos com papel alumínio;
- Conservar à -20°C ;

Yo-Pro-1 (7,5 μM -Molecular Probes Inc., Eugene, Oregon, EUA)

Para avaliar 400 amostras

1,5 μL da solução de Yo-Pro (1000 μM)

198,5 μL de DMSO

Aliquotar tubos com 20 μL (40 amostras) – solução 7,5 μM

Merocianina 540 (810 μM -Molecular Probes Inc., Eugene, Oregon, EUA)

$$x \cdot 1\mu\text{L} = 150\mu\text{L} \cdot 0,675$$

$$x = 101,25\mu\text{M}$$

$$810\mu\text{M} \cdot x = 101,25\mu\text{M} \cdot 1000\mu\text{L}$$

$$x = 125\mu\text{L} \text{ da ST } 810\mu\text{M}$$

$$875\mu\text{L} \text{ de DMSO}$$

C11-BODIPY^{581/591} (1 mg/mL, D-3861, Molecular Probes Inc., Eugene, Oregon, EUA)

Solução trabalho com 2 mM em 1mL

Aliquotar em microtubos com 10 μL (20 microtubos), vedar com parafilm[®] e armazenar congelado.

Dihidroetídio (DHE) (5 mM, D-23107, 5mM, Molecular Probes Inc., Eugene, Oregon, EUA)

2,4 μM na solução final

$$150\mu\text{L} \cdot 2,4\mu\text{M} = 1\mu\text{L} \cdot x$$

$$X = 360\mu\text{M} \text{ (concentração na solução trabalho)}$$

Solução à 5 mM

$$5\text{ mM} \cdot x = 1000\mu\text{L} \cdot 0,36\text{ mM}$$

$$x = 72\mu\text{L} \text{ de DHE}$$

$$928\mu\text{L} \text{ de DMSO}$$

ANEXO G

SETUP SISTEMA SCA (Sperm Class Analyzer, MICROPTIC, Barcelona, Espanha)

Características	Ajuste
Número imagens adquiridas.....	25
Taxa aquisição de imagens (por segundo).....	24
Tamanho mínimo da célula.....	3 μm^2
Valor de corte do VCL para células rápidas.....	>75 $\mu\text{m/s}$
Valor de corte do VCL para células lentas.....	<45 $\mu\text{m/s}$
Retilinearidade (STR), Limiar.....	>80%
Movimento circular (LIN).....	<50%
Temperatura.....	37°C