



Resveratrol na conservação de sêmen caprino resfriado centrifugado e não centrifugado

Resveratrol in the preservation of centrifuged and non-centrifuged cooled goats semen

VIEIRA, Renan Luiz Albuquerque. Doutorando em Ciência Animal Nos Trópicos

Universidade Federal da Bahia (UFBA), Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia, Av. Adhemar de Barros, 500, Ondina, Salvador, BA, Brasil. CEP: 40170-110/Telefone: (75) 98246-0439/ E-mail: renan.albuquerque@hotmail.com

BARBOSA, Larissa Pires. Doutora em Zootecnia

Universidade Federal do Recôncavo da Bahia (UFRB), Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas, Centro, Rua Rui Barbosa, 710, Cruz das Almas, BA, Brasil. CEP: 44380-000/ Telefone: (71) 99192-1177/ E-mail: lpires73@yahoo.com.br

MOREIRA, Rennan Herculano Rufino. Doutor em Nutrição e Produção de Não-Ruminantes

Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA), Departamento de Ciências Animais, R. Francisco Mota, 572, Mossoró, RN, Brasil. CEP: 59625-900/ Telefone: (35) 99191-9727/. E-mail: rennanherculano@hotmail.com

BARROS, Celso Henrique Souza Costa. Doutor em Ciência Animal

Centro Universitário INTA, Departamento de Medicina Veterinária, Sobral. R. Coronel Antônio Rodrigues Magalhães, 700, Dom Expedito, Sobral, CE, Brasil. CEP: 62050-100/ Telefone: (87) 98837-0736/ E-mail: celso_barrosmv@hotmail.com

SOUZA, Rosileia Silva. Doutora em Ciência Animal Nos Trópicos

Universidade Federal do Recôncavo da Bahia (UFRB), Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas, Centro, Rua Rui Barbosa, 710, Cruz das Almas, BA, Brasil. CEP: 44380-000/ Telefone: (75) 98854-0471/ E-mail: rosileiasouza@hotmail.com

SANTANA, Ana Lúcia Almeida. Doutora em Zootecnia

Universidade Federal do Recôncavo da Bahia (UFRB), Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas, Centro, Rua Rui Barbosa, 710, Cruz das Almas, BA, Brasil. CEP: 44380-000/ Telefone: (75) 99920-8097/ E-mail: ninhaemarc@hotmail.com

BENTO, Heitor José. Doutorando em Ciências Veterinárias

Universidade Federal de Mato Grosso, Departamento de Medicina Veterinária, Avenida Fernando Corrêa da Costa s/n, Coxipó, Cuiabá, MT, Brasil. CEP: 78060-900/ Telefone: (65) 98136-9656 / E-mail: heitorjbento@gmail.com

RESUMO

Objetivou-se avaliar a inclusão de resveratrol no diluente de sêmen caprino total e centrifugado submetido ao resfriamento. Quatro machos, adultos da raça Anglo Nubiana, foram submetidos à coleta de sêmen. Após a coleta, os ejaculados foram submetidos à análise, formação de um *pool* e fracionado em oito tratamentos, variando o tipo de processamento de sêmen (centrifugado e total) e quatro níveis de adição de resveratrol (0, 6, 12 e 18mg/15mL) ao diluente. Seguiram para o resfriamento e uma alíquota de cada amostra foi submetida ao teste de termorresistência lento (TTR). Não houve diferença para os valores de motilidade espermática progressiva e vigor espermático do sêmen de caprino centrifugado, no entanto para sêmen não centrifugado houve diferença para os valores de motilidade espermática progressiva e vigor espermático do sêmen resfriado a 4 °C utilizando 12 mg de resveratrol como antioxidante. Recomenda-se o uso de 12mg/15mL de resveratrol no diluente do sêmen não centrifugado de caprino, resfriado à 4 °C por até 72h. A centrifugação do sêmen caprino diminui a viabilidade espermática com base TTR.

Palavras-chave: antioxidante, diluidor seminal, espécies reativas ao oxigênio.

ABSTRACT

The objective of this study was to evaluate the inclusion of resveratrol in the total goat semen diluent and centrifuged semen submitted to cooling. Four males, adults of the Anglo Nubian breed, submitted to semen collection. After the collection, the ejaculates were submitted to analysis, formation of a *pool* and fractionated in eight treatments, varying the type of semen processing (centrifuged and total) and four levels of addition of resveratrol (0, 6, 12 and 18mg / 15mL) to the diluent. They proceeded to the cooling and an aliquot of each sample was submitted to the slow heat resistance test (TTR). There was no difference in the values of sperm motility and sperm vigor of centrifuged goat semen. However, for non-centrifuged semen, there were differences in sperm motility and sperm vigor at 4 ° C using 12 mg resveratrol as antioxidant. It is recommended to use 12mg / 15mL of resveratrol in the non-centrifuged goat semen diluent, cooled to 4 ° C for up to 72h. Centrifugation of goat semen decreases sperm viability based on TTR.

keywords: Antioxidant, seminal extender, reactive oxygen species.



Introdução

A inseminação artificial com sêmen resfriado apresenta vantagens na utilização em programas reprodutivos, uma vez que o processo de refrigeração favorece que os espermatozoides permaneçam viáveis por mais tempo em comparação ao sêmen fresco através da redução metabólica (Falchi et al., 2018). Embora o frio seja o promotor mais eficiente do estado de anabiose (Holt, 2000), sua utilização na preservação de sêmen representa um evento estressante para a viabilidade espermática.

O metabolismo normal dos espermatozoides promove a liberação de metabólitos chamados espécies reativas de oxigênio (ROS), as ROS em quantidades fisiológicas têm papel fundamental e atuam como moléculas sinalizadoras das fases da aquisição do potencial espermático fertilizante, como a capacitação, hiperativação, reação acrossomal e fusão com o oócito (Desai et al., 2009). Porém, o excesso de produção dos radicais livres devido ao processo de criopreservação pode afetar o sistema intracelular de defesa antioxidante do espermatozoide, essa produção em excesso de ROS causa um processo conhecido como estresse oxidativo (Maxwell e Watson, 1996).

Deste modo, a redução na qualidade do ejaculado submetido a algum tipo de processamento pode estar relacionado a maior produção de ROS (Ortega et al., 2003). O espermatozoide apresentará prejuízos ao metabolismo celular e diminuição de parâmetros como a motilidade e vigor (Aitken et al., 2007). O ideal seria um equilíbrio entre a quantidade de ROS produzida e a quantidade removida pelo sistema antioxidante (Sikka, 1996). Para evitar o estresse oxidativo causado pelo processo de resfriamento, alguns estudos foram realizados em diferentes substâncias de teste de espécies animais, algumas com potencial antioxidante (Mata-Campuzano et al., 2014; Affonso et al., 2017), com o intuito de manter a qualidade dos espermatozoides em um diluente por mais tempo.

As substâncias protetoras do sêmen que atuam contra o efeito deletério das ROS são denominadas antioxidantes, que atuam tanto removendo as ROS quanto impedindo a formação das lesões celulares ou ainda, reparando as injurias causadas (Halliwell & Gutteridge, 1999, Foote et al., 2002). Com o propósito de aumentar os índices de fertilidade com a utilização do sêmen preservado, estudos vêm sendo desenvolvidos para manter a integridade do espermatozoide durante as etapas de refrigeração. Dentre os quais, foram demonstrados a importância dos antioxidantes na proteção celular durante os procedimentos de manipulação espermática e redução da temperatura, com o intuito de reduzir as crioïnjúrias (Guerra et al., 2004). Ortega (2003) demonstrou o efeito prejudicial dos ROS sobre a célula espermática humana, a qual foi exposta a altas concentrações de oxigênio, resultando em toxicidade, com perda de sua motilidade devido à ocorrência da peroxidação lipídica. Os efeitos desta reação incluem perda de motilidade, de forma irreversível, inibição de respiração espermática, lesões no DNA espermático e perda de enzimas intracelulares, interferindo na capacidade fertilizante do espermatozoide (Gillan et al., 2004). Vários antioxidantes vêm sendo testados na composição de diluidores seminais, incluindo os antioxidantes naturais, dentre eles o resveratrol (3, 5, 4'-trihidroxiistilbeno) é um polifenol (Stojanović et al., 2001) não flavonoide (Degáspari & Waszczynskyj, 2004), encontrado em 38 formas cis e trans (Frémont, 2000).



O trans-resveratrol (trans-3-5-4'-trihidroxiistilbeno) é abundantemente encontrado na videira e, está entre os compostos fenólicos que inibem a formação de ROS, retardando o envelhecimento celular e orgânico (David et al., 2007). Na presença de trans-resveratrol, a peroxidação lipídica é inibida com mais eficiência quando comparado às vitaminas C e E, sem prejuízos a este processo com o incremento da dose empregada, demonstrando que o resveratrol possui melhores efeitos antioxidantes que tais vitaminas (Stojanović et al., 2001).

Além disso o plasma seminal é o meio natural onde o espermatozoide é encontrado após ejaculação, que suporta o seu transporte e metabolismo, fornecendo proteção e controle vários processos importantes como motilidade, capacitação e reconhecimento e união entre gametas (Maxwell et al., 2007). Durante a criopreservação do sêmen de carneiro, o plasma seminal parece aumentar a resistência dos espermatozoides ao choque frio (Barrios et al., 2005), reduzindo o processo de criocapacitação que limita seriamente a vida dos espermatozoides e conseqüentemente a sua capacidade de fertilização. Diante disso, efeitos negativos foram relatados pela presença de plasma seminal no processo de criopreservação (Maxwell et al., 2007) e no sêmen caprino (Aboagla & Terada, 2003). Portanto, a necessidade eliminar o plasma seminal ou não no sêmen de caprino a criopreservação ainda é uma questão de estudo. Dessa forma, objetivou-se avaliar a inclusão de resveratrol no diluente de sêmen caprino não centrifugado e centrifugado submetido ao resfriamento.

Material e métodos

O estudo foi aprovado pelo comitê de ética e uso dos animais (N° do protocolo CEUA: 23007.005461/201418) da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia e realizado no Setor de Caprinocultura da mesma instituição, na cidade de Cruz das Almas/BA, durante o inverno. Trata-se de uma área de clima tropical quente e úmido, com temperatura média anual de 24,2°C, e precipitação pluviométrica média anual de 1.206 mm. Com latitude de 12° 39' 11" Sul, Longitude: 39° 7' 19" Oeste (Rodrigues, 2003).

Foram utilizados quatro machos adultos da raça Anglo Nubiana, com idade entre dois a três anos, submetidos previamente a exame andrológico de acordo com o Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (Cbra, 2013), mantidos em regime semi-intensivo de criação, com acesso à pastagem de capim *Brachiaria decumbens* e fornecimento de concentrado comercial. Sal mineral e água foram oferecidos *ad libitum*.

Os animais foram submetidos à coleta de sêmen semanalmente, utilizando-se o método de vagina artificial e uma fêmea estrogenizada como manequim, até totalizar cinco coletas viáveis por animal. Após a coleta, os ejaculados foram acondicionados em banho-maria à 37°C e avaliados quanto aos aspectos físicos (volume do ejaculado; aspecto, turbilhonamento espermático, motilidade espermática progressiva, vigor espermático, concentração espermática por mL e total) e morfológicos em microscopia óptica, segundo os padrões preconizados pelo Cbra (2013). Os ejaculados que atingiram os valores mínimos preconizados pelo Cbra (2013) foram submetidos à formação de um *pool*. Os fatores analisados separadamente, sendo estes: processamento de sêmen



(centrifugado e não centrifugado) e adição de resveratrol ao diluente ($t_1= 0$, $t_2= 6$, $t_3=12$ e t_4 , ambos contendo 18mg/15mL, respectivamente).

Para a centrifugação do sêmen, este foi diluído em solução ringer lactato na proporção de 1:9 e centrifugado durante 10 minutos a 300G, após o processo de centrifugação foi retirado o sobrenadante e o sêmen foi ressuscitado com diluente Tris-gema numa proporção de 1:1. A diluição final foi ajustada para obtenção de 150 milhões de espermatozoides por mL. Seguindo-se a diluição final da amostra, esta foi destinada ao resfriamento, por um período de 72h, à temperatura de 4°C em freezer vertical. Foi avaliada a motilidade espermática progressiva e vigor espermático em cada nível de resveratrol durante o processo de resfriamento, nos tempos 0, 2, 12, 24, 48 e 72 horas.

Realizou-se o teste de termorresistência lento (TTR), para isto, alíquotas de 150µL foram retiradas das amostras antes e durante o resfriamento e acomodadas em microtubos de polipropileno de 1,5 mL e incubadas em banho-maria a 37°C por 3 horas. As amostras foram avaliadas para motilidade e vigor espermáticos nos tempos (0, 30, 60, 120 e 180 minutos).

Para as análises estatísticas utilizou-se o pacote estatístico do SAS (9.3). Inicialmente os dados obtidos foram avaliados quanto a sua homocedasticidade utilizando o Teste de Box-Cox. Todos os dados foram submetidos à análise de normalidade através do teste de Shapiro-Wilk ao nível de 5% de probabilidade. Aqueles que não apresentaram distribuição normal foram normalizados através do PROC RANK do pacote estatístico do SAS (9.3). Atendida esta pressuposição, os dados foram submetidos a uma análise de variância ao nível de 5% de probabilidade, em seguida foram realizadas análises de regressão considerando o nível de resveratrol como variável independente, por meio de modelos lineares e quadráticos. Os modelos com ajustes de coeficiente de determinação menores do que 70% foram desconsiderados, e médios comparados pelo teste Tukey da análise de variância ao nível de 5% de probabilidade, através do modelo:

$$Y_{ij} = \mu + G_i + B_j + \varepsilon_{ij}$$

onde:

Y_{ij} = observações dos efeitos dos níveis de resveratrol i , centrifugação j ;

μ = média geral;

G_i = efeito fixo dos níveis de resveratrol;

B_j = efeito fixo da centrifugação;

ε_{ijk} = erro aleatório associado a cada observação, considerado independente, identicamente distribuída, normais com média 0 e variância σ .

Resultados e discussão

Os dados descritos em relação ao *pool* de sêmen utilizado nas cinco coletas quanto aos aspectos físicos e morfológicos estão sumariados na Tabela 1. Os ejaculados apresentaram-se dentro dos padrões normais para a espécie caprina, considerando-se satisfatórios para serem submetidos ao processo de resfriamento. Os valores mínimos de motilidade espermática progressiva, vigor



espermático, turbilhonamento espermático foram considerados em 70%, 3, 3, respectivamente, seguido os critérios adotados pelo Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (Cbra, 2013).

Tabela 1 - Aspectos físicos e morfológicos do sêmen fresco do *pool* de quatro machos caprinos coletados em cinco períodos, expressos em médias \pm desvio padrão.

Parâmetros	Sêmen fresco
Volume seminal (mL)	1,6 \pm 0,0
Turbilhonamento Espermático (0-5)	4,0 \pm 0,4
Motilidade Espermática Progressiva (0-100%)	80,0 \pm 4,4
Vigor Espermático (0-5)	4,0 \pm 0,0
Concentração Espermática ($\times 10^9$ espermatozoide/mL)	1,4 \pm 2,8
Defeitos maiores (%)	1,0 \pm 0,8
Defeitos menores (%)	2,0 \pm 0,9
Defeitos Totais (%)	3,0 \pm 0,2

Após a centrifugação, evidenciaram-se diferença na motilidade dos espermatozoides caprinos, ao comparar o grupo com e sem plasma seminal (Tabela 2).

Tabela 2 - Parâmetros espermáticos do sêmen caprino em função da centrifugação ou não.

	Centrifugado	Não Centrifugado	CV (%)	P
N° amostral	20	20		
¹ Motilidade	70,00 ^b	78,50 ^a	12,90	0,003
¹ Vigor	3,55	3,70	13,53	0,340

^{a,b} Médias com letras diferentes diferem entre si a 5% de probabilidade pelo teste F.

¹ Dados normais.

Verificou-se que a centrifugação, independente do nível de antioxidante utilizado, contribuiu para a redução da motilidade total ($P < 0,05$) no início do resfriamento (T0h). Esses resultados corroboram com os achados por Corteel (1981) e Gil et al., (2002), ao relatarem que o processo de centrifugação pode causar estresse físico aos espermatozoides, reduzindo assim, a cinética espermática. O efeito da centrifugação na redução dos parâmetros de movimento espermático (motilidade e vigor) do sêmen caprino também foram relatados por Viana et al. (2006) ao utilizarem o mesmo diluidor base e temperatura de refrigeração do presente estudo.

Houve diferença ($P < 0,05$) para os valores médios de motilidade espermática progressiva e vigor espermático do sêmen de caprino centrifugado e resfriado a 4°C, utilizando 0, 6, 12 e 18mg de resveratrol como antioxidante (Tabela 3).

**Tabela 3** - Aspectos físicos do sêmen centrifugado de caprinos acrescido de diluente tris-gema acrescido de níveis de resveratrol¹

Horas	Níveis de resveratrol (mg)				Média	CV (%)	P valor		
	(T1) 0	(T2) 6	(T3) 12	(T4) 18			ANOVA	Linear	Quadrático
	¹ 0	75,00	72,50	75,00					
¹ 2	75,00	70,00	75,00	61,25	68,50	15,90	0,072	0,710	0,389
¹ 12	70,00	62,50	67,50	60,00	64,00	13,79	0,325	0,686	0,954
¹ 24	62,50	60,00	60,00	51,25	57,00	16,20	0,295	0,828	0,784
¹ 48	52,50	50,00	55,00	45,00	49,50	22,20	0,742	0,777	0,718
¹ 72	45,00	47,50	52,50	40,00	45,00	19,74	0,109	0,087	0,050
Média	63,33 ^a	60,41 ^{ab}	64,17 ^a	53,54 ^b	59,00	23,19	0,004	0,412	0,117
Vigor Espermático									
¹ 0	4,00 ^a	3,50 ^{ab}	3,75 ^{ab}	3,25 ^b	3,55	14,38	0,074	0,616	0,931
¹ 2	4,00	3,50	3,50	3,38	3,55	14,38	0,258	0,228	0,436
¹ 12	3,25 ^{ab}	3,50 ^a	3,50 ^a	2,38 ^b	3,00	24,18	0,005	0,072	0,012
¹ 24	3,25 ^a	3,00 ^{ab}	3,25 ^a	2,50 ^b	2,90	19,05	0,040	0,612	0,250
¹ 48	2,75	2,75	2,75	2,25	2,55	20,02	0,206	0,533	0,262
¹ 72	2,25	2,00	2,25	2,00	2,10	21,30	0,715	0,923	0,943
Média	3,25 ^a	3,04 ^{ab}	3,17 ^a	2,63 ^b	2,94	25,43	0,001	0,697	0,188

^{a, b} Médias com letras diferentes diferem entre si a 5% de probabilidade pelo teste Tukey.

¹ Dados não normalizados.



Após o início do resfriamento, durante as 72 horas de conservação, não se encontraram diferenças entre as amostras, com e sem plasma seminal, o que está de acordo com os resultados observados por Roca et al., (1997), em avaliação das médias de motilidade e de acrossomas normais no sêmen resfriado a 5°C em diluidor à base de tris-gema, centrifugado e não centrifugado. Tais resultados são discordantes dos obtidos por Menon et al., (1985), que observaram efeito benéfico da retirada do plasma sobre a motilidade dos espermatozoides.

Apesar de indicada no processo de criopreservação do sêmen caprino, alguns autores (Evans et al., 1987; Ritar & Salamon, 1982) não recomendam a retirada do plasma seminal, em virtude desse procedimento prejudicar a viabilidade das células espermáticas e, conseqüentemente, as taxas de fertilidade após as inseminações, provavelmente devido ao efeito da centrifugação sobre a viabilidade das células espermáticas (Barbosa et al., 1999).

Após 72 horas de estocagem, o melhor resultado de motilidade obtido neste estudo foi 60,0%, para sêmen não centrifugado acrescido com 12mg de resveratrol, em meio tris gema. Corroborando com os resultados de Azevêdo & Toniolli (2000) e Figueirêdo et al., (2002), também com meio tris-gema. Resultados similares de motilidade espermática foram encontrados por Azevêdo & Toniolli (2000), com utilização do diluidor leite desnatado, adicionado de ácido 3-indol-acético (IAA), após 24 horas de resfriamento a 4°C, de 61,5%.

Houve diferença ($P<0,05$) para os valores de motilidade espermática progressiva e vigor espermático do sêmen de caprino não centrifugado e resfriado a 4°C utilizando níveis de resveratrol (Tabela 4). Com melhores valores utilizando 12mg de resveratrol para motilidade progressiva e vigor espermático ao final do período de resfriamento seminal.

Durante o processo de resfriamento ocorrem alterações químicas e físicas na membrana celular, que conseqüentemente levam à ruptura e remoção de importantes proteínas de membrana, alterações na estrutura da bicamada lipídica, redução da fluidez, aumento da permeabilidade, danos no acrossoma, desidratação, liberação de enzimas e fosfolipídios, redução da atividade metabólica e diminuição do consumo de ATP, que podem comprometer de forma parcial ou total a fertilidade (Farstad, 1996; Holt, 2000) e, ainda, reduzir a longevidade espermática e acelerar a capacitação (Watson, 1995).

Para os valores médios de motilidade espermática progressiva, referentes ao teste de termorresistência lento do sêmen caprino centrifugado e não centrifugado, mantido a 37°C por 3 horas (Tabela 5), houve diferença entre os grupos ($P<0,05$). Contudo, quando se avaliou entre os tratamentos, não houve diferença ($P>0,05$).

Os valores para sêmen não centrifugado foram superiores ao do sêmen centrifugado, por meio de Análise de Regressão a 5% de probabilidade ($P<0,05\%$). Os valores para motilidade espermática progressiva e vigor espermático do sêmen centrifugado, avaliados no processo de TTR corroboram com os resultados anteriores para resfriamento do mesmo, comprovando que a centrifugação ocasiona estresse físico a célula.

**Tabela 4** - Aspectos físicos do sêmen não centrifugado de caprinos acrescido de diluente tris-gema acrescido de níveis de resveratrol¹

Motilidade Progressiva									
Horas	Níveis de resveratrol (mg)				Média	CV (%)	P valor		
	(T1) 0	(T2) 6	(T3) 12	(T3) 18			ANOVA	Linear	Quadrático
² 0	77,50	77,50	80,00	78,75	78,50	4,67	0,760	0,582	0,696
² 2	77,50 ^{ab}	70,00 ^b	80,00 ^a	77,50 ^a	76,50	6,40	0,009	0,531	0,369
² 12	72,50	72,50	75,00	66,25	70,50	11,71	0,367	0,420	0,259
² 24	67,50	62,50	65,00	58,75	62,50	12,58	0,325	0,779	0,892
² 48	60,00	57,50	60,00	56,25	58,00	12,00	0,820	0,972	0,850
² 72	55,00 ^{ab}	50,00 ^{ab}	60,00 ^a	48,75 ^b	52,50	13,64	0,036	0,451	0,304
Média	68,3 3	65,00	70,00	64,38	66,42	17,44	0,188	0,720	0,540
Vigor Espermático									
¹ 0	3,75	3,25	4,00	3,75	3,70	12,71	0,136	0,819	0,678
¹ 2	3,75 ^{ab}	3,00 ^b	4,00 ^a	3,75 ^a	3,65	13,41	0,009	0,531	0,369
¹ 12	3,75 ^{ab}	3,00 ^b	4,00 ^a	3,25 ^b	3,45	14,79	0,009	0,902	0,670
¹ 24	3,50 ^{ab}	3,00 ^b	3,75 ^a	3,00 ^b	3,25	13,67	0,006	0,675	0,447
¹ 48	3,00	3,00	3,00	2,88	2,95	7,58	0,716	0,744	0,554
¹ 72	2,75	2,50	3,00	2,50	2,65	18,47	0,364	0,644	0,542
Média	3,42 ^{ab}	2,96 ^c	3,63 ^a	3,19 ^{bc}	3,28	17,69	0,000	0,961	0,865

^{a,b} Médias com letras diferentes diferem entre si a 5% de probabilidade pelo teste Tukey.

¹ Dados normalizados; ² Dados não normalizados.



Tabela 5 - Motilidade espermática progressiva do sêmen caprino centrifugado e não centrifugado, avaliado até três horas no teste de termorresistência lento (horas).

	Centrifugado					CV (%)	Não Centrifugado					Médi	CV (%)
	0 (T1)	6 (T2)	12 (T3)	18 (T4)	Média (G)		0 (T1)	6 (T2)	12 (T3)	18 (T4)	a (G)		
0h	58,33	58,00	55,67	58,33	57,58	28,16	68,83	67,33	67,67	67,00	67,71	32,07	
2h	55,67	51,67	51,33	50,00	52,17		68,00	63,67	64,67	66,00	65,58		
12h	52,00	51,00	49,00	50,00	50,50		60,00	60,67	60,67	61,00	60,58		
24h	49,66 ^a	44,67 ^b	44,67 ^{ab}	45,48 ^{ab}	46,08		54,67	56,33	56,67	54,33	55,50		
48h	42,33	39,67	42,33	41,67	41,50		43,67	45,33	46,00	45,00	45,00		
72h	32,33	29,67	33,00	34,67	32,42		39,00	41,67	43,00	42,00	41,42		

Médias com letras diferentes diferem entre si a 5% de probabilidade pelo teste F.

¹ Dados normalizados.

**Tabela 6** - Vigor espermático do sêmen caprino centrifugado e não centrifugado, avaliados até três horas no teste de termorresistência lento (horas).

	Centrifugado					CV (%)	Não Centrifugado					CV (%)
	0 (T1)	6 (T2)	12 (T3)	18 (T4)	Média (G)		0 (T1)	6 (T2)	12 (T3)	18 (T4)	Média (G)	
¹ 0h	2,73	2,53	2,47	2,53	2,57	30,49	3,13	3,07	3,30	3,07	3,14	27,12
¹ 2h	2,60	2,33	2,43	2,43	2,45		3,00 ^{ab}	2,77 ^b	3,13 ^a	3,07 ^{ab}	2,99	
¹ 12h	2,53	2,50	2,30	2,37	2,43		2,83	2,73	3,03	2,80	2,85	
¹ 24h	2,41 ^a	2,37 ^{ab}	2,20 ^{ab}	2,10 ^b	2,27		2,93 ^a	2,83 ^{ab}	2,77 ^{ab}	2,60 ^b	2,78	
¹ 48h	2,00	1,87	2,03	1,90	1,95		2,23	2,33	2,33	2,17	2,27	
¹ 72h	1,33	1,57	1,57	1,57	1,51		2,00	2,27	2,30	2,20	2,19	

Médias com letras diferentes diferem entre si a 5% de probabilidade pelo teste F.

¹ Dados normais.



Segundo Kumar (2000), a motilidade progressiva é fundamental para a fertilidade, pois facilita a passagem pelo trato genital feminino tornando possível a penetração nas células do *cumulus* e na zona pelúcida do ovócito. De acordo com o Cbra (2013), após o TTR, a motilidade e o vigor inferior a 30% e 2, respectivamente, não são considerados viáveis.

Na Tabela 6 observa-se que houve diferença ($P<0,05$) para os valores médios de vigor espermático entre os grupos centrifugado e não centrifugado, porém não houve efeito ($P>0,05$) da inclusão dos níveis de resveratrol.

Pode-se observar que os valores médios para sêmen não centrifugado foram superiores ao do sêmen centrifugado, por meio de Análise de Regressão a 5% de probabilidade, corroborando com achados para sêmen criopreservado no presente estudo, ao comparar o grupo centrifugado com o não centrifugado. Estes resultados estão de acordo com os descritos por Chauhan & Anand (1990), avaliando o mesmo diluente e crioprotetor aqui utilizado, puderam observar superioridade do sêmen caprino não centrifugado, proporcionando altas taxas de fertilidade.

Lima (2008) afirma que a importância do TTR está na avaliação da viabilidade espermática após a exposição a uma temperatura similar à do trato reprodutivo da fêmea, permitindo mimetizar a permanência do sêmen nos órgãos genitais femininos. De acordo com Borges (2003), o teste de termorresistência possui intuito de prever a fertilidade seminal. Outros trabalhos verificaram a associação da resistência dos espermatozoides imposta ao período de incubação estabelecido em testes de termorresistência com importantes aplicações fisiológicas e práticas, sendo que as correlações com fertilidade *in vivo* e a campo mostraram-se presentes (Vishwanath & Shannon, 1997).

Conclusões

Verificou-se que a centrifugação, independente do nível de antioxidante utilizado, contribui para a redução da motilidade espermática progressiva, no início do resfriamento (T0h). A centrifugação reduziu ainda a viabilidade espermática com base no teste de termorresistência lento. O acréscimo de 12mg de resveratrol no diluidor proporcionou melhores valores para motilidade progressiva e vigor espermático quando comparado aos demais níveis do antioxidante no sêmen caprino resfriado a 4° C por até 72 h.

Referências

- ABOAGLA E.M.E. & TERADA T. Trehalose-enhanced fluidity of the goat sperm membrane and its protection during freezing. *Biology Reproduction*, 69: 1245-1250, 2013.
- AFFONSO, F. J.; CARVALHO, H. F.; LANÇONI, R.; LEMES, K. M.; LEITE, T. G.; OLIVEIRA, L. Z.; CELEGHINI, E. C. C. & ARRUDA, R. P. 2017. Addition of antioxidants myoinositol, ferulic acid, and melatonin and their effects on sperm motility, membrane integrity, and reactive oxygen species production in cooled equine semen. *Journal of Equine Veterinary Science*, 59:57-63, 2017.



VEIRA, R. L. A.; BARBOSA, L. P.; MOREIRA, R. H. R.; BARROS, C. H. S. C.; SOUZA, R. S.; SANTANA, A. L. A.; BENTO, H. J. Resveratrol na conservação de sêmen caprino resfriado centrifugado e não centrifugado

AITKEN, G. R.; HENDERSON, J. R.; CHANG, S. C.; MCNEIL, C. J. & BIRCH-MACHIN, M. A. Direct monitoring of UV-induced free radical generation in HaCaT keratinocytes. *Clinical and Experimental Dermatology*, 32(6): 722-727, 2007.

AZEVEDO, D.M.M.R. & TONIOLLI, R. Avaliação in vitro do sêmen de caprinos do tipo racial Marota diluído em água de coco estabilizada com antibióticos e leite desnatado adicionado de ácido 3 - indolacético (IAA). *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, 24(4):187-193, 2000.

BARBOSA, L.P.; GUIMARÃES, J.S.; ESPECHIT, C.J.B.; [TORRES, C. A. A.](#) & [SANTOS, A. B. F.](#) Avaliação de diferentes diluentes e métodos de congelamento de sêmen em programas de inseminação artificial em cabras Alpinas. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, 23:283-285, 1999.

BARRIOS, B.; FERNANDEZ-JUAN, M.; MUINO-BLANCO, T. & CEBRIAN-PEREZ, J.A. Immunocytochemical localization and biochemical characterization of two seminal plasma proteins which protect ram spermatozoa against cold-shock. *International Journal of Andrology*, Schaumburg, 27: 588-595, 2005.

BORGES, J.C. Utilização de antioxidantes associados ou não a emulsificantes na criopreservação de sêmen bovino. 2003. 56p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária), Universidade Federal de Viçosa - UFV - Viçosa, 2003.

CHAUHAN, M.S. & ANAND, S.R. Effect of egg yolk lipids on the freezing of goat semen. *Theriogenology*, 34:1003-1013, 1990.

COLÉGIO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL - CBRA. Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal. 3. ed. Belo Horizonte: CBRA, 2013. 104p.

CORTEEL, J.M. Production, storage and artificial insemination of goat semen. In: Management of reproduction in sheep and goats symposium 1981. Anais. Madison, 1981. p.188-274.

DAVID, J.M.P.; DAVID, J.P.; SANTOS, V.L.C.S.; SANTOS, M.L.S. & MOTA, M.D. Resveratrol: Ações e benefícios à saúde humana. *Diálogos e Ciência*, 5(10):1-11, 2007.

DEGÁSPARI, C.H. & WASZCZYNSKYJ, N. Propriedades antioxidantes de compostos fenólicos. *Acadêmica*, 5(1):33-40, 2004.

DESAI, N.; SHARMA, R.; MAKKER, K. & SABANEKH, E. Phygiologic and pathologic levels of reactive oxygen species in neat semen of infertile men. *Fertility and Sterility*, 92: 1626-1631, 2009.

EVANS, G.; MAXWELL, W.M.C.; SALAMON, S. Artificial Insemination of Sheep and Goats. London: Butterworth. 1987. 194p.

FALCHI, L.; GALLERI, G.; ZEDDA, M. T.; PAU, S.; BOGLIOLO, L.; ARIU, F. & LEDDA, S.. Liquid storage of ram semen for 96 h: Effects on kinematic parameters, membranes and DNA integrity, and ROS production. *Livestock Science*, 207:1-6, 2018.

FARSTAD, W. Sêmen cryopreservation in dogs and foxes. *Animal Reproduction Science*, 42:251-260, 1996.

FIGUEIREDO, E.L.; NUNES, J.F.; CAMPOS, A.W.U. & SILVA FILHO, A.H.S. Viabilidade in vitro do sêmen caprino Saanen diluído em água de coco a 4°C. *Ciência Veterinária Tropical*, 5:31-38, 2002.

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

FRÉMONT, L. Minireview: Biological effects of resveratrol. *Life Sciences*, 66 (8): 663-673, 2000.

GIL, J.; RODRIGUEZ-IRAZOQUI, M.; SODERQUIST, L. & RODRIGUEZ MARTINEZ, H. Influence of centrifugation or low extension rates prefreezing on the fertility of sêmen after cervical insemination. *Theriogenology*, 57:1781-1792, 2002.

GILLAN, L.; MAXWELL, W.M.C. & EVANS, G. Preservation and evaluation of semen for artificial insemination. *Reproduction, Fertility and Development*, 16:447-454, 2004.



VEIRA, R. L. A.; BARBOSA, L. P.; MOREIRA, R. H. R.; BARROS, C. H. S. C.; SOUZA, R. S.; SANTANA, A. L. A.; BENTO, H. J. Resveratrol na conservação de sêmen caprino resfriado centrifugado e não centrifugado

GUERRA, M.M.P.; EVANS, G.; MAXWELL, W.H.C. Papel de oxidantes e antioxidantes na andrologia (Revisão de Literatura). *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, 28:187-195, 2004.

HALLIWELL, B. & GUTTERIGE, J. M. C. *Free Radicals in Biology and Medicine*. 3ed., Oxford University Press: New York, 936p., 1999.

HOLT, W.V. Basic aspects of frozen storage of semen. *Animal Reproduction Science*, 62: 3-22, 2000.

KUMAR, S. Cellular damages during cryopreservation and assessment of in vitro fertilizing capacity of spermatozoa. *Indian Veterinary Medicine Journal*, 24: 1-6, 2000.

LIMA, L.F. Influência de Sistemas de Refrigeração sobre a qualidade do sêmen ovino criopreservado em palhetas. 2008. 53p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Universidade de Brasília. Brasília. 2008.

MATA-CAMPUZANO, M.; ÁLVAREZ-RODRÍGUEZ, M.; TAMAYO-CANUL, J.; LÓPEZ-URUEÑA, E.; DE PAZ, P.; ANEL, L.; MARTÍNEZ-PASTOR, F. & ÁLVAREZ, M. Refrigerated storage of ram sperm in presence of Trolox and GSH antioxidants: Effect of temperature, extender and storage time. *Animal Reproduction Science*, 151:137-147, 2014.

MAXWELL, W.M.C. & WATSON, P.F. Recent progress in the preservation of ram semen. *Animal Reproduction Science*, 42: 55- 65, 1996.

MAXWELL, W.M.C.; DE GRAAF, S.P. EL-HA, J.J. & GHAOUI, R. Seminal plasma effects on sperm handling and fertility. *Society of Reproduction and Fertility*, 67: 13 - 38, 2007.

MENON, A.R.R.; PILLAI, C.K.S.; SUDHA, J.D. & MATHEW, A.G. Cashew nut shell liquid-its polymeric and other industrial products. *Journal Science Indian Research*, 44: 324-338. 1985.

ORTEGA, A.M.; IZQUIERDO, A.C.; GÓMEZ, J.J.H.; CORICHI, I.M.O.; TORRES, V.M.M. & MÉNDEZ, J.J.V. Peroxidación lipídica y antioxidantes em la preservación de semen: una revisión. *Interciencia*, 28: 699-704, 2003.

RITAR, A.J. & SALAMON, S. Effects of seminal plasma and of its removal and of egg yolk in the diluent on the survival of fresh and frozen-thawed spermatozoa of the Angora goat. *Australian Journal Biology Science*, 35: 305-312, 1982.

ROCA, J.; CORRIZOSA, J.A.; CAMPOS, I.; LAFUENTE, A.; VAZQUEZ, J.M. & MARTINEZ, E. Viability and fertility of unwashed Murciano Granadina goat spermatozoa dilute in Tris egg yolk extender and stored at 5°C. *Small Ruminant Research*, 25: 147-153, 1997.

RODRIGUES, M.G.F. Dinâmica das paisagens naturais no município de Cruz das Almas - BA, com ênfase aos solos. 111f. Dissertação (Mestrado) - Escola de Agronomia, Universidade Federal da Bahia, Cruz das Almas, 2003.

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

STOJANOVIC, S.; SPRINZ, H. & BREDE, O. Efficiency and mechanism of the antioxidant action o trans-resveratrol and its analogues in the radical liposome oxidation. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 391 (1): 79-89, 2001.

VIANA, A.K.S.; CHALHOUB, B.; RIBEIRO FILHO, A.L.; ALMEIDA, A.K.; PORTELA, A.P.M.; BITTENCOURT, R.F.; ALVES, S.G.G.; BITTENCOURT, T.C.C. & QUINTELA, A.T. Avaliação in vitro do semen caprino resfriado, com ou sem centrifugação do plasma seminal e diluído em leite desnatado-glicose e tris-gema de ovo. *Ciência Animal Brasileira*, 7: 67-76, 2006.

VISHWANATH, R. & SHANON, P. Do sperm cells age? A review of the physiological changes in sperm during storage at ambient temperature. *Reproduction, Fertility and Development*, 9: 871-891, 1997.

WATSON, P.F. Recents developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post - thawing function. *Reproduction Fertility Development*, 7: 87-91, 1995.