

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE AGRONOMIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA

EFEITO DA ADIÇÃO DOS ANTIOXIDANTES CISTEÍNA E GLUTAMINA AO
DILUIDOR DE CONGELAMENTO DE SÊMEN DE JUNDIÁ (*Rhamdia quelen*)

BRUNA BITENCOURT DA COSTA
Engenheira Agrônoma/UFRGS

Dissertação apresentada como um dos requisitos à obtenção do Grau de
Mestre em Zootecnia
Área de Concentração: Produção Animal

Porto Alegre (RS). Brasil
Março de 2018

CIP - Catalogação na Publicação

Bitencourt da Costa, Bruna
EFEITO DA ADIÇÃO DOS ANTIOXIDANTES CISTEÍNA E
GLUTAMINA AO DILUIDOR DE CONGELAMENTO DE SÊMEN DE
JUNDIÁ (Rhamdia quelen) / Bruna Bitencourt da Costa.
-- 2018.
68 f.
Orientador: Danilo Pedro Streit Júnior.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do
Rio Grande do Sul, Faculdade de Agronomia, Programa
de Pós-Graduação em Zootecnia, Porto Alegre, BR-RS,
2018.

1. criopreservação. 2. sêmen. 3. antioxidante. 4.
estresse oxidativo. 5. peixe. I. Streit Júnior,
Danilo Pedro, orient. II. Título.

Bruna Bitencourt da Costa
Agrônoma

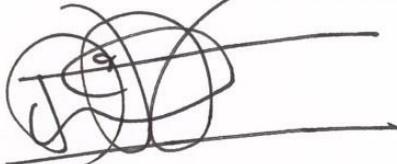
DISSERTAÇÃO

Submetida como parte dos requisitos
para obtenção do Grau de

MESTRE EM ZOOTECNIA

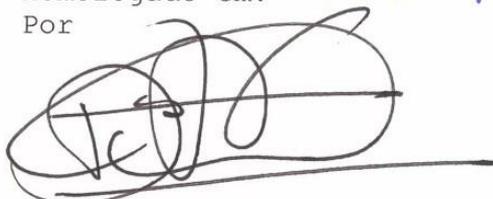
Programa de Pós-Graduação em Zootecnia
Faculdade de Agronomia
Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Porto Alegre (RS), Brasil

Aprovada em: 22.03.2018
Pela Banca Examinadora



DANILO PEDRO STREIT JUNIOR
PPG Zootecnia/UFRGS
Orientador

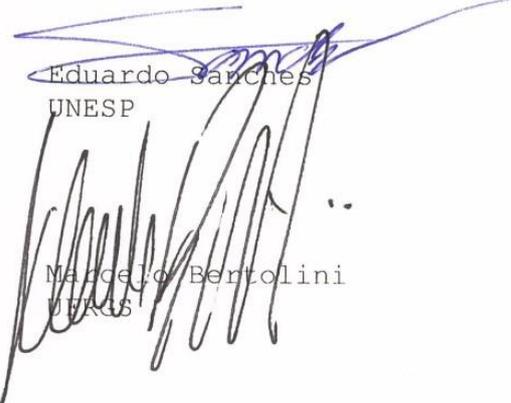
Homologado em: *02/05/2018*
Por



DANILO PEDRO STREIT JR.
Coordenador do Programa de
Pós-Graduação em Zootecnia

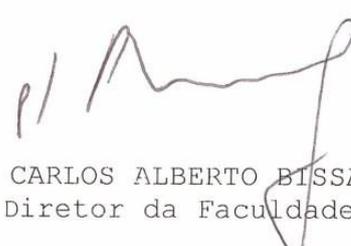


Diogo Lösch de Oliveira
UFRGS



~~Eduardo Sanches~~
UNESP

Marcelo Bertolini
UFRGS



CARLOS ALBERTO BISSANI
Diretor da Faculdade de Agronomia

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos que tornaram esse trabalho possível. Em primeiro lugar, a minha instituição de ensino, UFRGS (Universidade Federal do Rio Grande do Sul) e ao Programa de Pós-Graduação em Zootecnia. Aos meus colegas que integram o grupo de pesquisa Aquam (Produção e Conservação das Espécies Aquáticas) que conviveram comigo por esse período. Aos professores pela orientação durante toda minha trajetória acadêmica, em especial aos convidados a participar da banca. Ao meu orientador pela paciência, incentivo, amizade e pelos conhecimentos passados e por ter me acompanhado durante últimos anos da minha formação acadêmica e profissional, me oferecendo inúmeras oportunidades de aprendizado. Ao CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) pelo apoio financeiro durante o período do mestrado. Por último e não menos importante, à minha família e amigos, especialmente aos meus pais e meu irmão, Telmo, Solange e Matheus, e meu companheiro, Rodrigo, meus maiores apoiadores e motivadores.

Muito obrigada.

EFEITO DA ADIÇÃO DOS ANTIOXIDANTES CISTEÍNA E GLUTAMINA AO DILUIDOR DE CONGELAMENTO DE SÊMEN DE JUNDIÁ (*Rhamdia quelen*)¹

Autor: Bruna Bitencourt da Costa

Orientador: Danilo Pedro Streit Jr.

RESUMO - O processo de criopreservação promove danos celulares que podem comprometer a qualidade espermática em termos de motilidade e dos índices de fertilidade, principalmente, devido ao estresse oxidativo. Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar o efeito de diferentes concentrações de cisteína e glutamina na motilidade, morfologia, integridade da membrana, danos no DNA e índices de estresse oxidativo no sêmen de jundiá (*Rhamdia quelen*) pós-descongelamento. O sêmen de 5 machos (369,6 ± 71,75 g), com motilidade espermática superior a 80%, foi criopreservado em solução crioprotetora (frutose 50 g / L, leite em pó 50 g / L e metanol 100 mL / L) contendo diferentes concentrações de cisteína (0, 2,5, 5, 10 e 20 mM) e/ou glutamina (2,5 e 5,0 mM). O pool de sêmen foi diluído na proporção de 1:3, armazenado em palhetas de 0,25 mL, congelado em vapor de nitrogênio e mergulhado em nitrogênio líquido. Após o descongelamento (25°C por 10s) foram avaliados: motilidade (motilidade total, 0-100%), morfologia (Rosa de Bengala), fertilização, integridade da membrana (Eosina-Nigrosina), dano ao DNA (teste cometa), peroxidação lipídica (TBARS), atividade das enzimas SOD, CAT, GST e GPx, e a concentração de grupos carbonilas e sulfidrilas. Em relação aos parâmetros de motilidade, fertilização e morfologia espermática, nenhum tratamento apresentou diferença significativa em relação ao controle. Na avaliação da integridade de membrana não foi observada diferença entre os tratamentos (P=0,7323). No ensaio do cometa e peroxidação lipídica os tratamentos que apresentaram os piores resultados foram os com maiores concentrações de cisteína e glutamina combinadas (P<0,0001) em relação ao controle. Observou-se uma maior atividade da SOD nos tratamentos 20C, 2,5G e 5G menor atividade no controle (P<0,0001). A atividade da CAT, GST e GPx foi maior no tratamento com as maiores concentrações dos antioxidantes (20C+5G; P<0,0001) e menor no controle. A concentração de grupos carbonilas foi maior no tratamento 20C+5G e menor controle (P<0,0001). Já a concentração de grupos sulfidrilas foi maior no controle e no tratamento 5C+5G (P<0,0001). Os achados deste estudo mostram que cisteína e glutamina, nas concentrações testadas, não apresentaram resultados satisfatórios e sim efeitos prejudiciais à qualidade espermática nos parâmetros de motilidade, morfologia, fertilização, peroxidação lipídica, índice de danos ao DNA e oxidação de proteínas. Portanto, as concentrações testadas não são recomendadas para a suplementação da solução crioprotetora para congelamento de sêmen de *Rhamdia quelen*.

Palavras-chave: criopreservação, sêmen, antioxidante, cisteína, glutamina, estresse oxidativo, *Rhamdia quelen*.

¹ Dissertação de Mestrado em Zootecnia – Produção Animal, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil. (51 p.) Março, 2018.

EFFECT OF THE ADDITION OF ANTIOXIDANTS CISTEIN AND GLUTAMINE TO THE CRYOPROTECTANT SOLUTION OF JUNDIÁ SEMEN (*Rhamdia quelen*)¹

Author: Bruna Bitencourt da Costa

Advisor: Danilo Pedro Streit Jr.

ABSTRACT - The cryopreservation process promotes cellular damage that could compromise sperm quality in terms of motility and fertility rates, mainly due to oxidative stress. Thus, aim of this study was to assess the effects of different concentrations of cysteine and glutamine on post-thaw sperm motility, morphology, membrane integrity, fertility, DNA damage and indices of oxidative stress in the South American silver catfish (*Rhamdia quelen*). Sperm collected from five males ($369.6 \pm 71.75\text{g}$), with sperm motility higher than 80%, was cryopreserved in cryoprotectant solution (fructose 50 g/L, powdered milk 50 g/L and methanol 100mL/L) containing different cysteine concentrations (0, 2.5, 5, 10 and 20 mM) and/or glutamine (2.5 and 5.0 mM). The semen *pool* was diluted 1:3, filled in 0.25 mL straws, frozen in nitrogen vapor, and plunged into liquid nitrogen. After thawing (25°C for 10 s) were measured: motility (total motile, 0-100%), morphology (Bengal Rose Staining), fertilization, membrane integrity (Eosin-Nigrosine), DNA damage (cometa assay), lipid peroxidation (TBARS), the activity of SOD, CAT, GST and GPx enzymes, and the concentration of Carbonyl and Sulfhydryl groups. In relation to parameters of motility, fertilization and sperm morphology, no treatment presented a significant difference in relation to the control. In the evaluation of membrane integrity, no difference was observed between treatments ($P = 0.7323$). In the comet and lipid peroxidation assay the treatments with the worst results were those with the highest concentrations of cysteine and glutamine combined ($P < 0.0001$) in relation to the control. A higher activity of SOD was observed in treatments 20C, 2.5G and 5G lower activity in the control ($P < 0.0001$). The activity of CAT, GST and GPx was higher in the treatment with the highest concentrations of antioxidants (20C + 5G; $P < 0.0001$) and lower in the control. The concentration of carbonyl groups was higher in the 20C + 5G treatment and lower control ($P < 0.0001$). The concentration of sulfhydryl groups was higher in control and 5C + 5G treatment ($P < 0.0001$). The findings of this study show that cysteine and glutamine, at the concentrations tested, did not present satisfactory results, but rather, damaging effects on sperm quality in the parameters of motility, morphology, fertilization, lipid peroxidation, DNA damage and protein oxidation. Therefore, the concentrations tested are not recommended for the supplementation of the cryoprotectant solution for freezing semen of *Rhamdia quelen*.

Keywords: cryopreservation, sperm, antioxidant, cysteine, glutamine, oxidative stress, *Rhamdia quelen*.

¹ Master of Science dissertation in Animal Science, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil. (93 p.) March, 2018.

SUMÁRIO

CAPÍTULO I	12
1. INTRODUÇÃO	13
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	14
2.1 Espécie modelo do estudo.....	14
2.2 Criopreservação e estresse oxidativo	15
2.2.1. Criopreservação e crioinjúrias	15
2.2.2. Espécies reativas de oxigênio (EROS) e estresse oxidativo	16
2.2.3. Danos espermáticos causados pelo estresse oxidativo	18
2.3. Antioxidantes	19
2.3.1. Antioxidantes enzimáticos	19
2.3.2. Antioxidantes não enzimáticos	19
2.3.3. Adição de antioxidantes ao sêmen	20
2.3.4. Antioxidantes em sêmen de peixes	21
2.4 Cisteína.....	22
2.4.1. Propriedades físico-químicas	22
2.4.2. Mecanismo de ação antioxidante	22
2.4.3. Cisteína e a célula espermática.....	23
2.5 Glutamina	23
2.5.1. Propriedades físico-químicas	23
2.5.2. Mecanismo de ação antioxidante	24
2.5.3. Glutamina e a célula espermática.....	24
3 HIPÓTESES E OBJETIVOS	26
CAPÍTULO II	27
1. Introdução.....	29
2. Material e métodos.....	30
2.1. <i>Delineamento experimental e manutenção dos machos</i>	30
2.2. <i>Coleta do sêmen e avaliação do sêmen in natura</i>	30
2.3. <i>Criopreservação</i>	30
2.4. <i>Avaliação da motilidade, morfologia e integridade de membrana espermática após descongelamento</i>	31

2.5. Taxa de fertilização espermática após o descongelamento	31
2.6. Preparação das amostras para o teste cometa e análises bioquímicas	32
2.7. Avaliação do dano ao DNA do espermatozoide pelo teste cometa	32
2.8. Marcadores de danos oxidativos	32
2.9. Enzimas antioxidantes (SOD, CAT, GPx e GST).....	33
2.10. Análise estatística.....	33
3. Resultados	34
3.1. Motilidade, taxa de fertilização, integridade de membrana e morfologia espermática	34
3.2. Dano ao DNA do espermatozoide pelo teste cometa	35
3.3. Marcadores de danos oxidativos	36
3.4. Enzimas antioxidantes (SOD, CAT, GPx e GST).....	37
4. Discussão.....	38
5. Conclusão	41
Referências.....	41
CAPÍTULO III	46
4. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	47
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	48
ANEXOS	58
VITA	68

LISTA DE TABELAS

Capítulo II

Tabela 1. Tratamentos e concentração de cisteína e glutamina utilizadas na criopreservação de sêmen de *Rhamdia quelen*. 31

Tabela 2. Correlação entre percentual de células normais (%CN), motilidade espermática (MOT), taxa de fertilização (TF), integridade de membrana (IM), índice de dano ao DNA (IDD), superóxido diemutase (SOD), catalase (CAT), glutathione s-transferase (GST), glutathione peroxidase (GPx), peroxidação lipídica (TBARS), carbonilas (CARB) e sulfidrilas (SULF) do sêmen de *Rhamdia quelen* criopreservado em meio contendo diferentes concentrações de cisteína e glutamina, pós descongelamento, pela correlação de Pearson. 34

LISTA DE FIGURAS

Capítulo II

Figura 1. A. Motilidade espermática*; B. Taxa de fertilização**; C. Percentual de células normais* e D. Integridade de membrana* do sêmen de *Rhamdia quelen* criopreservado em meio contendo diferentes concentrações de cisteína e glutamina, pós descongelamento. *Valores de média e erro padrão seguidos de letras diferentes na mesma coluna diferem entre si pela análise não paramétrica de Kruskal-Wallis, seguido do teste de Dunn. **Valores de média e erro padrão seguidos de letras diferentes na mesma coluna diferem entre si pela análise de variância, seguido do teste de Tukey..... 35

Figura 2. A. Índice de danos ao DNA (cometa)*; B. Peroxidação lipídica (TBARS)*; Concentração de grupos: C. Carbonilas* e D. Sulfidrilas** em sêmen *Rhamdia quelen* criopreservado em meio contendo diferentes concentrações de cisteína e glutamina, pós descongelamento. $P < 0,0001$. *Médias e erro padrão seguidos de letras diferentes na mesma coluna diferem entre si pela análise de Kruskal-Wallis, seguido de teste de Dunn. **Médias e erro padrão seguidos de letras diferentes na mesma coluna diferem entre si pela análise de variância (ANOVA), seguido de teste de Tukey..... 36

Figura 3. Atividade das enzimas: A. Superóxido Dismutase (SOD)**, B. Catalase**, C. Glutathione S-transferase (GST)** e D. Glutathione Peroxidase (GPx)* em sêmen *Rhamdia quelen* criopreservado em meio contendo diferentes concentrações de cisteína e glutamina, pós descongelamento. $P < 0,0001$. *Médias e erro padrão seguidos de letras diferentes na mesma coluna diferem entre si pela análise de Kruskal-Wallis, seguido de teste de Dunn. **Médias e erro padrão seguidos de letras diferentes na mesma coluna diferem entre si pela análise de variância (ANOVA), seguido de teste de Tukey. 37

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

ACP – Agentes Crioprotetores
CAT – Catalase
DNA – Deoxyribonucleic Acid
DNPH – 2,4-dinitrofenil-hidrazina
EHC – Extrato de Hipófise de Carpa
EROS – Espécies Reativas ao Oxigênio
EDTA – Ethylenediamine Tetraacetic Acid
GPx – Glutathione Peroxidase
GR – Glutathione Redutase
GSH – Glutathione
GSSG – Glutathione Oxidada
GST – Glutathione S-transferase
H₂O₂ – Peróxido de Hidrogênio
HSPs – Heat Shock Protein
L – Litro
LOG – Logarítimo
MDA – Malondialdeído
Me₂SO – Dimetilsulfóxido
mg – miligrama
mL – mililitro
mM – miliMolar
NADP – Dinucleotídeo de Adenina e Nicotinamida Fosfato
NADPH – Dinucleotídeo de Adenina e Nicotinamida Fosfato (forma reduzida)
nm – nanometro
μL – microlitro
O₂^{•-} – Radical Superóxido
OH – Radical Hidroxil
pH – potencial hidrogeniônico
ppm – partes por milhão
SOD – Superóxido Dismutase
TAC – Capacidade Antioxidante Total
TBARS – Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico
TCA – Ácido Tricloroacético
UTA – Unidade Térmica Acumulada
UV – Radiação Ultravioleta

CAPÍTULO I

1. INTRODUÇÃO

A biotecnologia tem sido amplamente utilizada e desenvolvida na reprodução animal, sendo as técnicas de armazenamento de sêmen com grande destaque, pois além de preservar recursos genéticos das espécies, possibilitam a prática de reprodução seletiva e hibridização (Mazur et al., 2008; Yildiz et al., 2013). Embora se tenha bons resultados na criopreservação de sêmen de peixes, a obtenção de resultados satisfatórios e homogêneos na pós-descongelamento não é uma realidade, pois há uma falta de padronização das técnicas, devido as diferentes condições entre as espécies, levando a necessidade de aperfeiçoamento dos protocolos utilizados (Blaxter, 1953; Thomassen & Farstad, 2009). Além disso, o método ainda causa grandes perdas na viabilidade espermática pós-descongelamento, fazendo-se necessário estudos mais aprofundados dos procedimentos utilizados.

A criopreservação em nitrogênio líquido permite o armazenamento de sêmen por um longo período. Porém, o sucesso depende da redução das crioinjúrias causadas às células espermáticas durante o processo de criopreservação. Os danos causados aos espermatozoides durante este processo promovem a redução da motilidade e da integridade dos mesmos, além da redução nos índices de fertilidade pela perda da capacidade fertilizante do espermatozoide, devido à produção excessiva das espécies reativas de oxigênio (EROS) (Tirelli et al., 2005).

As EROS causam o declínio da motilidade em consequência do estresse oxidativo e danos a membrana celular, devido à alta susceptibilidade do espermatozoide a peroxidação lipídica em razão da alta concentração de ácidos graxos poli-insaturados (Aitken & Baker, 2004). O estresse oxidativo é causado por um desbalanço entre as defesas antioxidantes e a produção de EROS (Sikka, 2004). Com isso, antioxidantes têm sido adicionados aos diluentes de congelamento com o intuito de minimizar os efeitos danosos às membranas dos espermatozoides e visando melhorar a viabilidade espermática pós-descongelamento. Acredita-se que diminuindo a concentração de EROS ou aumentando o sistema antioxidante, pode-se diminuir o estresse oxidativo e os danos causados por ele.

Partindo-se do pressuposto de que o uso de antioxidantes associados à solução crioprotetora de sêmen melhoram a qualidade e viabilidade do sêmen pós-congelamento, o presente estudo teve como objetivos, avaliar o efeito da cisteína, da glutamina e da combinação entre cisteína e glutamina na solução crioprotetora para congelamento de sêmen de *Rhamdia quelen* sobre os parâmetros de estresse oxidativo, motilidade, integridade de membrana, morfologia espermática e taxa de fertilização.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Espécie modelo do estudo

O jundiá (*Rhamdia quelen*, Quoy & Gaimard, 1824) é uma espécie de peixe nativo pertencente à família Heptapteridae, ordem Siluriformes, série Teleostei e classe Osteichthyes, com ampla distribuição geográfica, ocorrendo desde o sudoeste do México ao centro da Argentina (Hernández et al., 2015). Não possui escamas, sendo uma espécie de couro, com coloração variando de marrom-avermelhado claro a cinza, com a parte ventral do corpo mais clara. É uma espécie onívora com tendência a piscívora, podendo atingir 50 cm de comprimento e 3 Kg de peso. Possui hábito noturno e habita locais calmos e profundos dos rios, tendo preferência por ambientes de águas mais tranquilas, com fundo de areia e lama, próximo às margens e da vegetação (Baldisserotto, 2004).

Em seu habitat natural, o período reprodutivo desta espécie vai de agosto a março e apresenta desova assincrônica. Tornam-se aptos a reprodução por volta de um ano de idade, os machos com 13,4 cm e as fêmeas com 16,5 cm, apresentando dois picos reprodutivos por ano, um na primavera e outro no verão com desovas múltiplas (Baldisserotto, 2004).

É uma espécie de importância econômica na Região Sul do Brasil, pois é bem-adaptada a diferentes ambientes e possui boa aceitação no mercado consumidor, sendo amplamente utilizada nos viveiros de piscicultura da região por apresentar crescimento contínuo durante o inverno e um bom desempenho reprodutivo (Marchioro & Baldisserotto, 1999; Barcellos et al., 2004). No entanto, para um melhor aproveitamento desta espécie na piscicultura, são necessários mais estudos sobre a reprodução, principalmente o que diz respeito à inseminação artificial e a máxima utilização dos gametas disponíveis e a qualidade destes (Bombardelli et al., 2006).

Embora existam inúmeros trabalhos que tratam sobre resfriamento e congelamento de sêmen de peixes, ainda há poucos que tratam dessas técnicas em *Rhamdia quelen*. A literatura existente aborda aspectos reprodutivos, mas muitas vezes sem avaliar o armazenamento do sêmen em baixas temperaturas, como é o caso do estudo realizado por Bombardelli et al. (2006), que determinou 89.497 espermatozoides.ovócito⁻¹ como a melhor relação espermatozoide: oócito de jundiá. Ferreira et al. (2001), avaliaram as características qualitativas e quantitativas do sêmen do jundiá; e Borges et al. (2005), determinaram a composição bioquímica do plasma seminal e as variações anuais nas características do sêmen de jundiá.

No estudo de Carneiro et al. (2006), os autores avaliaram a viabilidade do sêmen de jundiá armazenado sob refrigeração durante 12 dias. Neste período foi observada a redução significativa na motilidade e na porcentagem de espermatozoides vivos (iniciando em 74,5% e finalizando em 15,5%), porém, observaram taxa de fertilização superior a 50% após 12 dias de armazenamento do sêmen.

Sanches et al. (2011) avaliaram os parâmetros espermáticos de *R. quelen* do sêmen armazenado por curtos períodos (0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 16, 20,

24, 32, 40 e 48 horas após a coleta) sob diferentes temperaturas de armazenamento e ativação (15, 25 e 35°C). Foi observada interação para os parâmetros de velocidade média de trajeto, velocidade em linha reta, frequência de batimento cruzado e taxa de motilidade entre o tempo e a temperatura de armazenamento, e entre o tempo e a temperatura de ativação. E os autores concluíram que temperatura de armazenamento e ativação que proporcionou o melhor movimento espermático foi a 15°C.

Adames et al. (2015) utilizaram soluções contendo frutose para promover a ativação espermática em sêmen de jundiá após o descongelamento e avaliaram seus efeitos como modulador da motilidade espermática e na redução do número de espermatozoides móveis para fertilizar oócitos em procedimentos de reprodução artificial. Os autores sugeriram a possibilidade de reduzir os espermatozoides na fertilização em 17,77% quando se utiliza uma solução contendo 2,28% de frutose.

2.2 Criopreservação e estresse oxidativo

2.2.1. Criopreservação e crioinjúrias

A criopreservação de sêmen de peixe é uma técnica valiosa que desempenha um papel importante na aquicultura, principalmente no que diz respeito ao transporte de material genético entre instalações, reduzindo o risco de propagação de infecções, facilitando estudos de hibridação, conservação da biodiversidade, proteção de espécies ameaçadas de extinção (Alderson & Macneil, 1984; Aires et al., 2003). Possibilita o melhoramento genético de espécies de peixe, sendo indicada para minimizar a assincronia na maturação dos gametas, no uso seletivo de reprodutores ou mesmo no transporte de gametas (Godinho, 2000). No entanto, ainda é uma tecnologia pouco utilizada quando comparada a outras espécies de animais domésticos.

As técnicas de criopreservação envolvem a adição de crioprotetores, congelamento e descongelamento de amostras de sêmen, sendo que todos estes processos podem resultar em algum dano aos espermatozoides, diminuindo o sucesso da fertilização (Kopeika et al., 2003). Portanto, antes de se criopreservar os espermatozoides, é necessária uma avaliação completa das soluções crioprotetoras a serem utilizadas para cada espécie de peixe (Yavas & Bozkurt, 2011).

Segundo Fogli da Silveira et al. (1988), a reprodução artificial com utilização de sêmen congelado possibilita que se mantenha um estoque limitado de machos na piscicultura, propiciando a exploração mais racional de reprodutores e a redução nos custos de produção. No entanto, há a necessidade de estudos relacionados à qualidade do sêmen após o congelamento e de soluções de congelamento adequadas.

O processo de criopreservação tem como princípio a utilização de temperaturas ultrabaixas visando à preservação de forma eficiente da estrutura e função de células e tecidos vivos (Baust, 2008). Para isso, é necessária a exposição destas células e/ou tecidos a substâncias crioprotetoras antes da redução da temperatura. Estas substâncias ou agentes crioprotetores substituem a água presente no meio intracelular através de um gradiente

osmótico, conferindo desidratação e redução do metabolismo, e consequentemente, maior proteção à célula e/ou tecido (Pegg, 2007).

Os crioprotetores intracelulares são substâncias de baixo peso molecular, permeáveis que atuam no citoplasma e organelas, auxiliando na desidratação das células e reduzindo a temperatura de congelação do seu interior. As substâncias crioprotetoras intracelulares mais utilizadas são o dimetilsulfóxido (Me_2SO), o metanol e o glicerol (Viveiros & Godinho, 2009). Já os crioprotetores extracelulares são açúcares ou polímeros de alto peso molecular, não permeáveis e hidrofílicos, que recobrem a superfície celular e estabilizam a membrana para evitar os danos causados pela congelação e diminuem a formação de cristais de gelo. Os mais utilizados são a gema de ovo fresco, leite em pó, frutose e glicose (Carolsfeld et al., 2003). Para bagres sul-americanos, surubim e pintado (*Pseudoplatystoma* spp.) o diluente mais recomendado na literatura consiste na mistura de metanol, glicose e leite em pó. Todas essas soluções devem ser misturadas numa proporção de 3 a 4 partes para cada uma de sêmen (Carolsfeld et al., 2003).

A criopreservação pode ser realizada por dois métodos: a congelação lenta e a vitrificação. A congelação lenta é descrita como método largamente utilizado para a criopreservação de células germinativas (Pegg, 2002). Este método utiliza baixas concentrações de agentes crioprotetores (ACP) e resfriamento de forma gradual (Ambrosini et al., 2006). Já a vitrificação, consiste em resfriamento ultrarrápido (em torno de $20.000^\circ\text{C}/\text{min}$), com a utilização de altas concentrações de agentes crioprotetores (Wowk, 2010).

Durante o processo de criopreservação podem ocorrer danos de diversas naturezas, que implicam no comprometimento da viabilidade das células reprodutivas. Os principais danos podem ser ocasionados por formação de gelo intracelular, efeito da solução, toxicidade dos agentes crioprotetores e estresse oxidativo. Os danos causados pelo estresse oxidativo ocorrem, principalmente, através da peroxidação lipídica que ocorre na membrana celular. A criopreservação também pode afetar a estrutura e o metabolismo celular (Tirelli et al., 2005) devido à produção excessiva de EROS, comprometendo a sobrevivência celular após o descongelamento. Com o objetivo de minimizar os possíveis danos provocados pela produção de EROS durante a criopreservação, pesquisadores têm estudado os efeitos da adição de agentes antioxidantes ao meio de congelamento (Souza et al., 1999; Lahnsteiner et al., 2010; Lahnsteiner & Mansour, 2010; Ögretmen et al., 2015).

2.2.2. Espécies reativas de oxigênio (EROS) e estresse oxidativo

Os radicais livres são substâncias que apresentam número ímpar de elétrons, com um elétron desemparelhados na última camada eletrônica, sendo assim altamente instáveis e reativos. São intermediários químicos do metabolismo do oxigênio, sendo que os principais são: o radical superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$), o radical hidroxil (OH^\bullet) e o não radical peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (Maia & Bicudo, 2009). Podem ser formados pela ação direta de alguma fonte de energia externa (luz, calor e radiação), ou interna, pelo próprio metabolismo (subprodutos da respiração celular), por reações catalisadas por metais (ferro e cobre) ou por enzimas. Essa energia ao atingir o átomo produz a perda de um

elétron tornando essa molécula instável. O acúmulo de EROS na célula promove o estresse oxidativo (Sikka, 1996; Nordberg & Arner, 2001).

O ânion superóxido ($O_2^{\circ-}$) é um radical livre pouco reativo e sem habilidade de penetrar nas membranas lipídicas, agindo apenas onde é produzido. É formado a partir do oxigênio molecular, pela adição de um elétron, sendo gerado de forma espontânea, especialmente na membrana mitocondrial, através da cadeia respiratória e também por flavoenzimas, lipoxigenases e cicloxigenases. O peróxido de hidrogênio (H_2O_2) não é um radical livre, mas um metabólito do oxigênio extremamente deletério porque participa como intermediário na reação que produz o radical OH° . O H_2O_2 é gerado a partir da dismutação enzimática do ânion $O_2^{\circ-}$ pela ação da superóxido dismutase (SOD). Após, o peróxido de hidrogênio pode ser convertido ao radical OH° , através de uma reação catalisada por metais (principalmente Fe^{++} ou Cu^+), denominada reação de Fenton (Ferreira & Matsubara, 1997; Nordberg & Arnér, 2001). O radical hidroxil (OH°) é o radical mais reativo em sistemas biológicos, reagindo rapidamente com biomoléculas.

O estresse oxidativo pode ser causado por diversos fatores relacionados com a redução da disponibilidade de antioxidantes, entre eles, a nutrição inadequada, a permanência dos animais em condições de estresse, a coleta de sêmen, e a geração de quantidades excessivas de EROS pelos próprios espermatozoides (Peña et al., 2009). O estímulo à formação de EROS induzido pela congelação pode estar relacionado com alterações na respiração celular e/ou estado de repouso das células, assim como por células espermáticas defeituosas que morreram durante o processo de criopreservação (Bailey et al., 2000). Esta condição pode estar associada ao aumento da ocorrência de danos celulares, com conseqüente redução da fertilidade dos machos (Wang et al., 2003).

Os radicais livres podem reagir com várias biomoléculas, subtraindo elétrons para sua estabilização. Os substratos mais frequentes para os radicais livres são os ácidos graxos, proteínas entre outros. Os lipídios da membrana espermática são ricos em ácidos graxos poliinsaturados, os quais, em concentração elevada, determinam fluidez da membrana possibilitando que o espermatozoide participe dos eventos de fusão de membranas durante a fertilização, o que torna a membrana plasmática dos espermatozoides o principal alvo das EROS (Aurich, 2005; Baumber et al., 2002). Assim, espermatozoides com peroxidação lipídica apresentam redução da fluidez da membrana e da sua capacidade de fertilização (Aitken & Baker, 2004). Bilodeau et al. (2000) sugeriram que o balanço entre a produção de EROS e a desintoxicação dos mesmos, pode ser um importante fator de sobrevivência e funcionalidade dos espermatozoides antes, durante e após sua criopreservação, exercendo influência direta sobre a fertilidade. Estes autores observaram que as principais enzimas antioxidantes envolvidas na desintoxicação das EROS no sêmen bovino são glutatona peroxidase e a superóxido dismutase.

O impacto do estresse oxidativo durante o processo de criopreservação seria minimizado através da suplementação dos meios diluidores com agentes antioxidantes, garantindo maior qualidade ao sêmen (Michael et al., 2009). Nesse sentido, diversos antioxidantes como Vitamina C e

E, aminoácidos como cisteína, hipotaurina, e enzimas como superóxido dismutase e glutathione peroxidase têm sido utilizados como estratégia para melhorar a viabilidade dos diluidores de congelamento (De Graaf et al., 2007).

2.2.3. Danos espermáticos causados pelo estresse oxidativo

Sabe-se que a produção de EROS pelas células espermáticas é um fator importante para os seus processos fisiológicos (Baker & Aitken, 2004), pois, em concentrações reduzidas, elas participam de diversas vias de sinalização celular e intervêm em funções como capacitação, hiperativação, reação acrossomal e fusão do espermatozoide com o oócito (Aitken & Baker, 2004; Aitken & Bennetts, 2006). Embora a geração controlada de EROS tenha funções fisiológicas, altas concentrações destas são prejudiciais às funções celulares, podendo danificar todos os tipos de biomoléculas, incluindo DNA, proteínas e lipídios.

Durante a criopreservação de células espermáticas pode ocorrer estresse oxidativo promovido pelas EROS, que é caracterizado por um distúrbio entre os sistemas pró-oxidantes e antioxidantes da célula, prejudicando o sistema de defesa antioxidante da mesma, o que acarreta mudanças físicas e químicas na membrana plasmática e acrossomal (Baumber et al., 2000; Agarwal et al., 2005). Em situações que existe uma maior ocorrência de eventos oxidativos, o sistema tende para o lado pró-oxidante, o que pode afetar os níveis de antioxidantes intracelulares e, dependendo da severidade deste processo, pode ser letal à célula (De Lamirande & Gagnon, 1995). Acredita-se que essa letalidade seja devido aos danos oxidativos, que as EROS podem reduzir motilidade, viabilidade, integridade acrossomal e no potencial de fertilização (Roca et al., 2004; Ball, 2008).

Segundo Cummins et al. (1994), as lesões oxidativas ao DNA mitocondrial e à estrutura da membrana representam os fatores de maior importância para explicar a redução da fertilidade e motilidade do sêmen criopreservado, pois as mitocôndrias são as responsáveis pela produção de ATP necessário para a motilidade espermática. Estudos mostram que a geração de altas concentrações de EROS no sêmen está associada ao declínio no metabolismo energético do espermatozoide, na motilidade e na viabilidade espermática e à fragmentação do DNA em equinos, bovinos, ovinos, caprinos, humanos e peixes (Armstrong et al., 1999; Duru et al., 2000; Krzyzosiak et al., 2001; Baumber et al., 2002; Bilodeau et al., 2002; Hagedorn et al., 2012).

Outros estudos verificaram, em mamíferos, um maior percentual de células espermáticas com acrossoma reagido (Peris et al., 2004; Joshi et al., 2005), redução significativa na motilidade e no percentual de espermatozoides rápidos (Baumber et al., 2000; Bilodeau et al., 2001; Krzyzosiak et al., 2001; Joshi et al., 2005), além de interferência com o movimento flagelar (Aitkens & Bennetts, 2006) associados ao estresse oxidativo, culminando com a sobrevivência após criopreservação de, aproximadamente, 50-60% da população de células espermáticas (Watson, 2000).

2.3. Antioxidantes

Os antioxidantes são substâncias que retardam a velocidade da oxidação, inibindo a produção ou os efeitos deletérios dos radicais livres, protegendo as células de danos oxidativos (Ball et al., 2001). Tais substâncias podem agir diretamente, neutralizando a ação dos radicais livres, ou indiretamente, participando dos sistemas enzimáticos com tal capacidade. O sistema de defesa antioxidante da célula pode atuar de forma preventiva, impedindo a formação e/ou a ação de radicais livre, ou reparando a lesão ocorrida (Ferreira & Matsubara, 1997).

Nas células, os antioxidantes podem atuar por meio de dois sistemas: o sistema enzimático e o sistema não enzimático, que podem ou não atuarem em conjunto. Os antioxidantes enzimáticos são macromoléculas também conhecidos como antioxidantes naturais e é o primeiro sistema a agir. Esse sistema é composto pelas enzimas superóxido dismutase (SOD); peroxirredoxinas, catalase (CAT) e pelo sistema glutaciona peroxidase (GPx)/glutaciona redutase (GR)/glutaciona s-transferase (GST). O sistema não enzimático são micromoléculas que podem ter origem endógena ou dietética e inclui vários compostos hidrofílicos e lipofílicos, como vitaminas, minerais (cofatores enzimáticos) e compostos fenólicos; entre estes últimos estão a vitamina C (ácido ascórbico), vitamina E (α -tocoferol), vitamina A (β -caroteno), piruvato, cisteína, glutaciona, selênio, zinco, cobre, magnésio, ubiquinonas (coenzima Q), ácido úrico e ácido lipóico (Nordberg & Arnér, 2001; Lubberda, 2005). Os antioxidantes enzimáticos são o principal mecanismo de defesa intracelular dos espermatozoides contra as EROS, enquanto os componentes do plasma seminal, tanto enzimáticos quanto não enzimáticos, são responsáveis pela proteção extracelular dos espermatozoides (Van Overveld et al., 2000).

2.3.1. Antioxidantes enzimáticos

A SOD catalisa a conversão do radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$) em peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o H_2O_2 , por sua vez, sofre ação da glutaciona peroxidase e da catalase. A catalase, atua de forma complementar à superóxido dismutase, convertendo o peróxido de hidrogênio em oxigênio e água, impedindo a formação de OH (Sikka, 1996). A GPx reduz o peróxido de hidrogênio a duas moléculas de água e uma da glutaciona oxidada, tendo como substrato a glutaciona reduzida. A ação desta enzima depende da manutenção da relação entre glutaciona reduzida (GSH) e oxidada (GSSG), o qual é garantido pela ação da enzima glutaciona redutase, que na presença de NADPH, transforma a glutaciona oxidada em glutaciona reduzida (Sikka, 2004).

2.3.2. Antioxidantes não enzimáticos

A cisteína é um aminoácido sulfurado não essencial com propriedades antioxidantes por ser um importante precursor na produção de glutaciona, penetra facilmente a membrana celular e atua na eliminação das EROS através da manutenção dos níveis de glutaciona intracelular aumentando os níveis de glutaciona reduzida (Bilodeau et al., 2001). A glutaciona é um tiol tripeptídeo (ácido glutâmico-cisteína-glicina) não proteico, capaz de agir

diretamente em muitas EROS, sendo o grupo tiol da cisteína o sítio ativo responsável pelas suas propriedades bioquímicas (Luberda, 2005; Câmara & Guerra, 2011). A taurina é um aminoácido sulfurado essencial que atua como um estabilizador de membrana através de interações diretas com fosfolipídios. Já a hipotaurina é um captador de oxidantes, tais como o radical hidroxil, o peróxido de hidrogênio e radicais superóxido e sua oxidação resulta na formação de taurina, estando indiretamente, relacionada à regulação osmótica e à proteção da membrana espermática (Martínez-Páramo et al., 2013).

A metionina, em sua forma reduzida, se liga às EROS, protegendo os espermatozoides do estresse oxidativo (Lahnsteiner & Mansour, 2010). O ácido úrico tem seu papel antioxidante por ser um forte agente redutor, sendo considerados um antioxidante extremamente importante no sêmen de peixes teleosteos, assim como o ácido ascórbico. Este último, por sua vez, neutraliza as EROS por meio de reações de redução, contribuindo com a inibição da peroxidação lipídica (Barreiros et al., 2006). As concentrações de ácido ascórbico no sêmen são reguladas pelos níveis alimentares (Ciereszko & Dabrowski, 1995). O α -tocoferol é um antioxidante lipossolúvel capaz de prevenir a peroxidação lipídica, protegendo os espermatozoides contra danos oxidativos ao DNA e à membrana, podendo também atuar na restauração dos níveis de glutathione e, assim, inibir a peroxidação lipídica (Sikka, 1996; Sikka, 2004; Silva & Guerra, 2012).

2.3.3. Adição de antioxidantes ao sêmen

A adição de antioxidantes ao sêmen, aumenta a tolerância espermática ao dano oxidativo após a descongelação, neutralizando os radicais livres que causam a peroxidação lipídica da membrana plasmática dos espermatozoides (Baumber et al., 2000). Com o objetivo de reduzir os danos oxidativos causados pela elevada concentração de EROS exógenas, estudos têm sido realizados adicionando substâncias antioxidantes aos diluentes de sêmen de equinos (Ball et al., 2001; Baumber et al., 2005), suínos (Gadea et al., 2004; Gadea et al., 2005), bovinos (Bilodeau et al., 2001), ovinos (Bucak et al., 2008, 2009a e 2009b; Câmara & Guerra, 2011), aves (Bréque et al., 2003), humanos (Agarwal & Saleh, 2002) e peixes (Lahnsteiner, 2009; Lahnsteiner & Mansour, 2010; Lahnsteiner et al., 2011; Kledmanee et al., 2013; Martínez-Páramo et al., 2013; Kutluyer et al., 2014; Ögretmen et al., 2015).

A ação antioxidante dos aminoácidos vem sendo testada em inúmeros estudos, pois são moléculas carregadas, sendo possível que eles interajam eletrostaticamente com os grupos fosfato dos fosfolipídios da membrana plasmática do espermatozoide, formando assim, uma camada sobre superfície da célula, protegendo-a contra possíveis choques térmicos (El-Sheshtawy et al., 2008). Isto pode contribuir para a manutenção da integridade da membrana acrossomal dos espermatozoides, durante o processo de criopreservação.

Combinações entre alguns aminoácidos também têm sido testadas para criopreservação de sêmen, como a glutamina, histidina, metionina, cisteína, alanina, prolina, betaína, taurina e glicina, verificando-se a eficácia de alguns destes aminoácidos na crioproteção celular (Peña et al., 1998; Lindeberg et al.,

1999; El-Sheshtawy et al., 2008; De Mercado et al., 2009; Çoyan et al., 2010). Kundu et al. (2001) obtiveram êxito no congelamento de espermatozoides caprinos utilizando apenas aminoácidos como crioprotetores, e relataram que os melhores resultados foram obtidos com a associação de 40 mM de alanina, 60 mM de glutamina, 20 mM de prolina ou 40 mM de glicina com glicerol e dimetilsulfóxido.

2.3.4. Antioxidantes em sêmen de peixes

O sêmen de peixes conta com a presença de diferentes tipos de antioxidantes importantes na manutenção da sua viabilidade. Estudos verificaram a presença de diversos antioxidantes no sêmen, entre eles, ácido ascórbico, ácido úrico, tocoferol, metionina e metionina redutase, glutatona reduzida, catalase, peroxidase e superóxido dismutase (Ciereszko & Dabrowski, 1995; Ciereszko et al., 1999; Mansour et al., 2006; Stejskal et al., 2008; Lahnsteiner, 2009; Lahnsteiner & Mansour, 2010; Lahnsteiner et al., 2010). Lahnsteiner & Mansour (2010) e Lahnsteiner et al. (2010) demonstraram que o ácido úrico é o principal antioxidante não-enzimático encontrado no sêmen de peixe. Já Słowińska et al. (2013), sugerem que a proteção antioxidante varia entre as espécies de peixes, pois demonstraram uma grande variabilidade na capacidade antioxidante total (TAC) no plasma seminal de 13 espécies.

Lahnsteiner & Mansour (2010) testaram o uso de antioxidantes em sêmen de peixes teleósteos (*Lota*, *Perca fluviatilis*, *Alburnus*, *Salmo trutta*). Os resultados obtidos neste estudo demonstraram que o ácido úrico, na concentração de 0,5 mmol/L, foi o antioxidante que apresentou os melhores resultados, melhorando a motilidade espermática e a integridade da membrana e diminui a peroxidação lipídica dos espermatozoides para todas as espécies investigadas. A metionina em sua forma oxidada (sulfóxido de metionina) também foi efetiva como antioxidante na concentração de 1,5-3 mmol/L. E a catalase melhorou a motilidade espermática e a integridade da membrana em todas as espécies do estudo, com exceção de *A. alburnos*.

Kutluyer et al. (2014) testaram a adição de catalase (250 U / l), superóxido dismutase (250 U / l), peroxidase (250 U / l), glutatona oxidada (1,5 mmol / l), glutatona reduzida (1,5 mmol / l), l-metionina (1,5 mmol / l), ácido úrico (0,25 mmol / l), ácido l-ascórbico (0,5 mmol / l), a-tocoferol (2,0 mmol / l), β -caroteno (0,5 mmol / l) e carnitina (0,5 mmol / l) na solução de congelamento de sêmen de *O. mykiss*. Os autores concluíram que a taxa de motilidade e a duração da motilidade pós-descongelamento aumentaram com a utilização de ácido úrico, l-metionina, SOD, α -tocoferol e l-glutatona reduzida, e que o ácido ascórbico melhorou o movimento espermático, aumentando a linearidade e retilinearidade das células espermáticas.

Lahnsteiner et al. (2011), testaram a adição de glutatona reduzida e a adição conjunta de glutatona reduzida e oxidada, metionina, e catalase na solução de diluição de *S. fontinalis* e *O. mykiss*. Em *O. mykiss* 1,5 mmol/L de metionina reduzida e a mistura de 1.5 mmol/L de glutatona oxidada e reduzida aumentou a velocidade espermática após a descongelação. Em *S. fontinalis*, a glutatona reduzida, na concentração de 1,5 mmol/L, elevou a taxa de fertilização e a adição de glutatona reduzida e oxidada, ambas na concentração de 1,5

mmol/L, proporcionou o aumento da velocidade espermática no sêmen criopreservado. Já a metionina também na concentração de 1,5 mmol/L, promoveu um aumento da velocidade espermática, taxa de fertilização e duração da motilidade espermática. E a catalase na concentração de 100 U/L, promoveu o aumento da taxa de fertilização.

Kledmanee et al. (2013) testaram a adição de L-cisteína a solução de diluição em sêmen de carpa comum (*Cyprinus carpio*) refrigerado, apresentando resultados positivos verificando que a motilidade espermática, a duração da motilidade espermática e a viabilidade espermática nos tratamentos com L-cisteína foram significativamente superior ao tratamento controle. Já Ögretmen et al., (2015), testaram o efeito da cisteína em sêmen de carpa comum congelado e verificaram que um aumento na concentração de cisteína causou um aumento significativo na taxa de motilidade e duração da motilidade do sêmen, concluindo que a suplementação com cisteína aumentou a fertilização e a taxa de eclosão e diminuiu os danos no DNA.

Taurina e hipotaurina foram testadas por Martínez-Páramo et al. (2013), ambas na concentração de 1 mM em *Dicentrarchus labrax*. A taurina promoveu melhora dos parâmetros de motilidade espermática, aumentando a velocidade e linearidade espermáticas, e a redução da fragmentação de DNA. Já a hipotaurina aumentou da motilidade total e reduziu na fragmentação de DNA.

2.4 Cisteína

2.4.1. Propriedades físico-químicas

A cisteína é um antioxidante não enzimático, produzido de forma endógena, que previne a peroxidação lipídica. É um aminoácido de baixo peso molecular contendo um grupamento tiol, precursora da biossíntese da GSH e aumenta os níveis de GR (Bilodeau et al., 2001).

A glutathiona é um tiol tri-peptídeo (ácido glutâmico-cisteína-glicina) não proteico, capaz de agir diretamente em muitas EROS, sendo o grupo tiol da cisteína o sítio ativo responsável pelas suas propriedades bioquímicas (Luberda, 2005; Oliveira, 2011; Câmara & Guerra, 2011). Segundo Christophersen (1968), o metabolismo da glutathiona ocorre da seguinte forma duas moléculas de GSH, sob ação da GPx, reduzem o peróxido de hidrogênio em duas moléculas de água e uma de GSSG (glutathiona oxidada). A GSSG junto com uma molécula de hidrogênio e na presença de dinucleotídeo de adenina e nicotinamida fosfato reduzida (NADPH), sob ação da glutathiona redutase (GR), é convertida a duas moléculas de GSH e uma de NADP (dinucleotídeo de adenina e nicotinamida fosfato).

2.4.2. Mecanismo de ação antioxidante

A cisteína capta radicais livres através de interações químicas diretas com eles, atuando na eliminação das EROS através da manutenção dos níveis de glutathiona intracelular, por isso possui boa capacidade antioxidante (Tuncer et al., 2010). Por ser precursor da biossíntese de glutathiona intracelular ocasiona o aumento da glutathiona reduzida, e como esse composto é um cofator da

glutathione peroxidase, essa também é aumentada indiretamente (Bilodeau et al., 2001).

A glutathione peroxidase, catalisa a redução do peróxido de hidrogênio e hidroperóxidos, protegendo a célula contra o estresse oxidativo. (Oliveira, 2011). Assim, a cisteína tem efeito crioprotetor sobre a integridade funcional do acrossoma e das mitocôndrias, melhorando a motilidade espermática pós-descongelamento (Uysal & Bucak, 2007). A glutathione, glutathione reductase e glutathione peroxidase são conhecidos como antioxidantes naturais, pertencem ao sistema de defesa antioxidante enzimático e são responsáveis em neutralizar as EROS excessivas e prevenir os danos na estrutura celular espermática (Andrade et al., 2010).

2.4.3. Cisteína e a célula espermática

Em peixes, Stejskal et al. (2008) determinaram os teores e o efeito de cisteína em sêmen de *Acipenser baerii*, *Acipenser ruthenus*, *Perca fluviatilis*, e *Sander lucioperca*. Kledmanee et al. (2013) testaram a adição de L-cisteína a solução de diluição em sêmen de carpa comum (*Cyprinus carpio*) refrigerado. Os autores registraram resultados positivos observando que a motilidade espermática, a duração da motilidade espermática e a viabilidade espermática nos tratamentos com L-cisteína (1 mM) foram significativamente superior ao tratamento controle.

Sarosiek et al. (2014) avaliou a influência de antioxidantes no armazenamento de sêmen de *Perca fluviatilis*. Neste estudo, melhores efeitos foram observados após a adição de glutathione (5 mM) ao sêmen; e a adição de cisteína (5 mM) resultou no alongamento da vida útil das células. Já Ögretmen et al. (2015), testaram o efeito da cisteína em sêmen de *C. Carpio* congelado e verificaram que um aumento na concentração de cisteína (20 mM) causou um aumento significativo na motilidade e duração da motilidade do sêmen, concluindo que a suplementação com cisteína aumentou a fertilização e a taxa de eclosão e diminuiu os danos no DNA.

Em mamíferos, o efeito da cisteína foi testado em ovinos por Bucak et al. (2008) e Uysal & Bucak (2007). Estes autores verificaram que a adição de cisteína promoveu uma melhora na motilidade pós-descongelamento, e que a cisteína na concentração de 10 mM teve um efeito significativo na manutenção das características espermáticas pós-descongelamento. Oliveira (2011) avaliou o efeito *in vitro* da adição de cisteína em refrigeração de sêmen equino e concluiu que a cisteína pode melhorar a motilidade e a integridade da membrana. Sariözkan et al. (2009) verificaram que a adição de cisteína (2 mM) em sêmen bovino levou a maior motilidade e mostrou maior efeito protetor de dano acrossomal e anormalidades totais.

2.5 Glutamina

2.5.1. Propriedades físico-químicas

A glutamina ($C_5H_{10}N_2O_3$) é um L- α -aminoácido, classificada de acordo com seu grupamento R como não carregada, mas é polar, o que significa uma característica mais hidrofílica, sendo facilmente hidrolisada por ácidos ou bases.

É um aminoácido não essencial, uma vez que pode ser sintetizada pelo organismo a partir de outros aminoácidos. O metabolismo da glutamina acontece por uma única reação catalisada por duas enzimas: a glutamina sintetase e a glutaminase (Aquino et al., 2013). A glutamina é mais extensamente investigada na sua relação com o estresse oxidativo no exercício físico. Está envolvida em diferentes funções, tais como a proliferação e desenvolvimento de células, o balanço acidobásico, o transporte da amônia entre os tecidos, a doação de esqueletos de carbono para a gliconeogênese, a participação no sistema antioxidante e outras.

A partir de estudos, tem sido demonstrado que a glutamina pode também influenciar diversas vias de sinalização celular, em especial a expressão de proteínas de choque térmico (HSPs - Heat Shock Protein). As HSPs contribuem para a manutenção da homeostasia da célula na presença de agentes estressores, tais como as EROS. Menor disponibilidade desse aminoácido pode diminuir a resistência da célula a lesões, levando a processos de apoptose celular (Cruzat et al., 2009).

2.5.2. Mecanismo de ação antioxidante

A função antioxidante da glutamina é exercida pela glutathiona, pois esta molécula, assim como a cisteína é um precursor da glutathiona. Quando catalisada pela enzima glutaminase, a glutamina sofre hidrólise, dissociando-se em íon amônio e glutamato. O glutamato, por sua vez, é essencial para a síntese da glutathiona (Cruzat et al., 2009).

A glutamina pode também modular a ativação das HSPs, que estão relacionadas com a resposta antiapoptótica celular. A ativação dessas proteínas corresponde a uma das principais vias de sinalização que contribuem para o aumento da capacidade da célula de sobreviver a alterações na sua homeostasia em decorrência da exposição a agentes estressores, como radiação ultravioleta (UV), calor, agentes infecciosos e espécies reativas de oxigênio (Gabai & SHERMAN, 2002). O principal fator indutor da expressão das HSPs é o acúmulo de proteínas desnaturadas no meio intracelular, que ocorre quando a célula é exposta a algum tipo de estresse. Estas proteínas atuam no reparo de estruturas na molécula proteica, na identificação e remodelamento de proteínas danificadas durante períodos de estresse e na síntese de novas proteínas, sendo consideradas essenciais no processo de recuperação celular (Burg et al., 2007).

2.5.3. Glutamina e a célula espermática

No que diz respeito a peixes, o conhecimento sobre o uso da glutamina como antioxidante na criopreservação de sêmen é limitada. Aramli et al. (2016) avaliaram o efeito da glutamina na motilidade do sêmen pós-descongelamento e o sucesso de fertilização em *Acipenser persicus*. Os resultados revelaram que um aumento na concentração de glutamina provocou um aumento significativo na porcentagem de motilidade, velocidade curvilínea (VCL) e também sucesso de fertilização, sendo 10mM a melhor concentração para motilidade espermática e taxa de fertilização.

Alguns estudos avaliam seu efeito na criopreservação de sêmen de mamíferos. Bucak et al. (2009a), verificaram que a adição de glutamina (5 mM)

ao diluente utilizado para congelação do sêmen ovino aumentou o percentual de espermatozoides móveis e com membranas íntegras, concluindo que a glutamina produziu um efeito antioxidante, podendo ter um efeito crioprotetor sobre a integridade do acrossoma e da mitocôndria dos espermatozoides. Em equinos, Trimeche et al. (1999), avaliaram a suplementação com três aminoácidos (glutamina, prolina e histidina) e verificaram que a glutamina (40 mM) melhorou significativamente a motilidade espermática. Bucak et al. (2009b), determinaram o efeito da glutamina em sêmen caprino e verificaram que a suplementação com glutamina apresentou valores mais elevados de motilidade espermática e melhor integridade da membrana.

Khelifaoui et al. (2005) verificaram que a adição de 50 mM de glutamina mais 2,5% de glicerol aumenta a motilidade espermática equina, em comparação com outros meios crioprotetores contendo apenas glicerol. De Mercado et al. (2009) testaram o efeito da glutamina no sêmen suíno congelado e verificam que a adição de 80 mM de glutamina e 2% de glicerol aumentou a motilidade dos espermatozoides dos suínos pós-descongelação. Os autores concluíram que a glutamina tem efeito crioprotetor no espermatozoide suíno quando utilizado como um substituto parcial de glicerol na solução de diluição.

3 HIPÓTESES E OBJETIVOS

Hipótese:

A adição dos aminoácidos com ação antioxidante (cisteína e glutamina) à solução crioprotetora diminui os danos causados pelo estresse oxidativo durante a criopreservação de sêmen de *Rhamdia quelen*.

Objetivo geral:

Avaliar o efeito da adição de diferentes concentrações dos aminoácidos com ação antioxidante cisteína e glutamina à solução crioprotetora de sêmen de jundiá (*Rhamdia quelen*) sobre a viabilidade espermática.

Objetivos específicos:

1. Avaliar o efeito da adição de cisteína nas concentrações 2,5, 5, 10, e 20 mM na solução crioprotetora para congelamento de sêmen de jundiá sobre os parâmetros de estresse oxidativo, motilidade, integridade de membrana, morfologia espermática e taxa de fertilização.
2. Avaliar o efeito da adição de glutamina nas concentrações 2,5 e 5 mM na solução crioprotetora para congelamento de sêmen de jundiá sobre os parâmetros de estresse oxidativo, motilidade, integridade de membrana, morfologia espermática e taxa de fertilização.
3. Avaliar o efeito da adição de cisteína (2,5, 5, 10, e 20 mM) e glutamina (2,5 e 5 mM), combinadas, na solução crioprotetora para congelamento de sêmen de jundiá sobre os parâmetros de estresse oxidativo, motilidade, integridade de membrana, morfologia espermática e taxa de fertilização.

CAPÍTULO II¹
**Efeito da suplementação com cisteína e glutamina na qualidade
espermática do sêmen criopreservado de catfish (*Rhamdia quelen*)**

¹Artigo elaborado conforme as normas do periódico *Theriogenology*.

Cysteine and glutamine supplementation on the quality of cryopreserved sperm of South American silver catfish

Bruna Bitencourt da Costa¹, Lis Santos Marques¹, Rômulo Batista Rodrigues¹, Danilo Pedro Streit Jr¹

¹Aquam Research Group, Department of Animal Science, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

Abstract

The cryopreservation process promotes cellular damage that could compromise sperm quality in terms of motility and fertility rates, mainly due to oxidative stress. Thus, aim of this study was to assess the effects of different concentrations of cysteine and glutamine on post-thaw sperm motility, morphology, membrane integrity, fertility, DNA damage and indices of oxidative stress in the South American silver catfish (*Rhamdia quelen*). Sperm collected from five males ($369.6 \pm 71.75\text{g}$), with sperm motility higher than 80%, was cryopreserved in cryoprotectant solution (fructose 50 g/L, powdered milk 50 g/L and methanol 100mL/L) containing different cysteine concentrations (0, 2.5, 5, 10 and 20 mM) and/or glutamine (2.5 and 5.0 mM). The semen *pool* was diluted 1:3, filled in 0.25 mL straws, frozen in nitrogen vapor, and plunged into liquid nitrogen. After thawing (25°C for 10 s) were measured: motility (total motile, 0-100%), morphology (Bengal Rose Staining), fertilization, membrane integrity (Eosin-Nigrosine), DNA damage (cometa assay), lipid peroxidation (TBARS), the activity of SOD, CAT, GST and GPx enzymes, and the concentration of Carbonyl and Sulfhydryl groups. In relation to parameters of motility, fertilization and sperm morphology, none treatment presented a significant difference in relation to the control. In the evaluation of membrane integrity, no difference was observed between treatments ($P = 0.7323$). In the comet and lipid peroxidation assay the treatments with the worst results were those with the highest concentrations of cysteine and glutamine combined ($P < 0.0001$) in relation to the control. A higher activity of SOD was observed in treatments 20C, 2.5G and 5G lower activity in the control ($P < 0.0001$). The activity of CAT, GST and GPx was higher in the treatment with the highest concentrations of antioxidants (20C + 5G; $P < 0.0001$) and lower in the control. The concentration of carbonyl groups was higher in the 20C + 5G treatment and lower control ($P < 0.0001$). The concentration of sulfhydryl groups was higher in control and 5C + 5G treatment ($P < 0.0001$). The findings of this study show that cysteine and glutamine, at the concentrations tested, did not present satisfactory results, but rather, damaging effects on sperm quality in the parameters of motility, morphology, fertilization, lipid peroxidation, DNA damage and protein oxidation. Therefore, the concentrations tested are not recommended for the supplementation of the cryoprotectant solution for freezing semen of *Rhamdia quelen*.

Keywords: cryopreservation, sperm, antioxidant, oxidative stress, *Rhamdia quelen*.

1. Introdução

O jundiá (*Rhamdia quelen*) é um bagre sul-americano nativo pertencente à família Heptapteridae, ordem Siluriformes, com ampla distribuição geográfica, ocorrendo desde o sudoeste do México ao centro da Argentina [1]. É uma espécie bem-adaptada a diferentes ambientes, sendo amplamente utilizada nos viveiros de piscicultura da região sul do Brasil por apresentar crescimento contínuo durante o inverno e um bom desempenho reprodutivo [2,3].

A criopreservação de sêmen de peixe é uma ferramenta valiosa à aquicultura, a qual possibilita algumas vantagens, tais como o transporte de material genético [4], a sincronização da disponibilidade de gametas [5,6], a proteção de espécies ameaçadas de extinção [4,6] e a economia de sêmen [6]. Entretanto, esta técnica pode causar danos celulares ocasionados pela formação de gelo intracelular, pelo efeito da solução, pela toxicidade dos agentes crioprotetores, bem como pelo estresse oxidativo, que podem comprometer a qualidade espermática [7,6].

O estresse oxidativo ocorre devido ao desequilíbrio entre as espécies reativas de oxigênio (EROS) e o sistema antioxidante dos espermatozoides, levando a distúrbios metabólicos e funcionais, promovendo a peroxidação dos fosfolípidios da membrana e oxidação das proteínas, além de dano ao DNA que compromete a motilidade, viabilidade, integridade acrossomal e o potencial de fertilização [8,9]. O sêmen possui diferentes antioxidantes em sua composição, que mantém a viabilidade das células *in vivo* [10,11]. Diversos estudos verificaram a presença de antioxidantes no sêmen de peixes, como o ácido ascórbico, ácido úrico, tocoferol, metionina e metionina redutase, glutathione reduzida, catalase, peroxidase e superóxido dismutase [12,13,14,15,16,10,11]. No entanto, durante a criopreservação é necessária a diluição do sêmen na solução crioprotetora, o que reduz a concentração desses destes antioxidantes, diminuindo sua proteção antioxidante [17,5].

A composição lipídica da membrana plasmática, rica em ácidos graxos poli-insaturados, torna o espermatozoide alvo das EROS e extremamente suscetível ao dano oxidativo [18,5]. Com isso, autores têm avaliado o uso de antioxidantes adicionados à solução crioprotetora, a fim de minimizar os efeitos prejudiciais às membranas e ao DNA dos espermatozoides e visando melhorar a viabilidade espermática pós-descongelamento [16,11,19,20,5,21,22,4,6,23].

A cisteína e a glutamina são aminoácidos precursores da glutathione, que age diretamente nas EROS [24,25]. A glutamina também pode modular a ativação das proteínas de estresse ou choque térmico (HSPs), que estão relacionadas com a resposta antiapoptótica celular [26,24]. Estudos sobre o uso destes aminoácidos no sêmen de peixes ainda são poucos e contraditórios.

Assim, o presente estudo teve como objetivos, avaliar o efeito da cisteína, da glutamina e da combinação entre cisteína e glutamina na solução crioprotetora para congelamento de sêmen de jundiá sobre os parâmetros de estresse oxidativo, motilidade, integridade de membrana, morfologia espermática e taxa de fertilização.

2. Material e métodos

2.1. Delineamento experimental e manutenção dos machos

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente ao acaso, em que foram testadas 15 soluções crioprotetoras (tratamentos, Tabela 1), sendo quatro repetições por tratamento (palhetas). Foram utilizados cinco machos ($369,6 \pm 71,75$ g) de *Rhamdia quelen* estocados em tanques concreto de 7 m³ ou 7.000 L, sob condições de temperatura e fotoperíodo natural. Os machos foram pesados, medidos e identificados com chips próximo à nadadeira dorsal, para controle dos animais.

2.2. Coleta do sêmen e avaliação do sêmen in natura

Foi coletado o sêmen de cinco machos com motilidade espermática superior a 80% e misturados, dando origem a um *pool* de sêmen. A indução hormonal foi realizada com a administração de uma dose única de 3 mg/kg de extrato de hipófise de carpa (EHC) e após um período de 240 horas-grau ou unidade térmica acumulada (UTA) (10 horas, água a 24°C) foi realizada a coleta do sêmen [28]. Os animais foram contidos com o uso de toalhas úmidas e a região da papila urogenital foi higienizada e seca com papel toalha, e em seguida, aplicada uma massagem anteroposterior na região abdominal. A primeira gota de sêmen foi descartada a fim de evitar contaminação com água, urina ou fezes.

Imediatamente após a coleta foi avaliada a motilidade espermática através da indução com solução de NaCl 58 mM na diluição de 1 µL do sêmen e 800 µL de solução de ativação [27] e subjetivamente determinada (0-100%). Para as avaliações da concentração e a morfologia do *pool*, as amostras foram fixadas em solução formol tamponado 10% na diluição 1:1000. A concentração espermática foi estimada por meio de uma câmara Neubauer, em microscópio óptico, com a objetiva de 40X. Quatro esfregaços foram montados e corados com Rosa Bengala (4%), a uma diluição de 1:10 (rosa de bengala: sêmen fixado em formol tamponado 10%) em um microtubo 1,5 mL, para avaliação das alterações morfológicas dos espermatozoides. As lâminas foram analisadas em microscópio de luz (100X), avaliando-se um total de 200 espermatozoides e classificados em normais e defeituosos.

2.3. Criopreservação

Para a criopreservação as amostras do *pool* foram diluídas na proporção de 1:3 (2,5 mL de sêmen: 7,5 mL de solução) em uma solução crioprotetora contendo leite em pó desnatado (50 g/L), frutose (50 g/L) e metanol (100 mL/L) [27]. Posteriormente foi adicionado os antioxidantes de acordo com os respectivos tratamentos (Tabela 1). Após a diluição o sêmen foi congelado em palhetas de 0,25 mL. As palhetas foram armazenadas e resfriadas em vapor de nitrogênio líquido (*dry shipper*) e após 18 horas transferidas para o botijão e mergulhadas em nitrogênio líquido, e armazenadas por um período mínimo de sete dias.

Tabela 1. Tratamentos e concentração de cisteína e glutamina utilizadas na criopreservação de sêmen de *Rhamdia quelen*.

Tratamentos	Cisteína (mM)	Glutamina (mM)
Controle	0	0
2,5C	2,5	0
5C	5,0	0
10C	10,0	0
20C	20,0	0
2,5G	0	2,5
5G	0	5,0
2,5C+2,5G	2,5	2,5
5C+2,5G	5,0	2,5
10C+2,5G	10,0	2,5
20C+2,5G	20,0	2,5
2,5C+5G	2,5	5,0
5C+5G	5,0	5,0
10C+5G	10,0	5,0
20C+5G	20,0	5,0

C = Cisteína; G = Glutamina.

2.4. Avaliação da motilidade, morfologia e integridade de membrana espermática após descongelamento

As palhetas foram descongeladas em imersão em água à 25°C por 10 segundos [28]. Foram realizadas as avaliações dos parâmetros de motilidade, morfologia e integridade de membrana.

A percentagem de células com membrana intacta foi avaliada utilizando os corantes Eosina-Nigrosina. O sêmen foi diluído (1:100) em solução de Ginsburg Fish Ringer (NaCl 123,2 mM, KCl 3,75 mM, CaCl₂ 3,0 mM, NaHCO₃ 2,65 mM; pH 7,6; 244 mOsm) [29] e 20 µL desta diluição foram misturados a 20 µL do corante e feito o esfregaço e avaliação de 100 espermatozoides por lâmina. Foram considerados íntegros os espermatozoides que apresentaram a cabeça não corada e não íntegros os espermatozoides que apresentaram a cabeça corada.

2.5. Taxa de fertilização espermática após o descongelamento

Três fêmeas (312 ± 80,20 g) foram submetidas a um protocolo de manipulação hormonal aplicando duas doses intramusculares de EHC. A primeira dose foi de 0,5 mg de EHC × kg / fêmea, e a segunda dose, administrada 12 h depois, foi de 5,0 mg de EHC × kg / fêmea. Após 240 UTA (10 h, água a 24°C) da segunda aplicação as fêmeas foram contidas individualmente, secas e submetidas à coleta de oócitos por massagem abdominal na direção cefalocaudal [28].

Uma alíquota de 100 µL de cada palheta de sêmen criopreservado foi misturada a 1,2 mL de oócitos (1238 oócitos), a mistura foi ativada (5 mL de NaCl

58 mM) e agitada cuidadosamente por 60s [28]. Foi utilizada uma relação média de $3,014 \times 10^6$ espermatozoides por oócitos.

Após a ativação, os oócitos foram lavados em solução de hipoclorito 5% (5,9 mL/L) por 5 minutos e posteriormente, lavados com água do sistema por 5 minutos [30]. Em seguida, foram transferidos para aquários retangulares de 1,5 L, com oxigenação constante, para incubação a 24°C. Foram fertilizadas três repetições por tratamento. Para a estimativa da taxa de fertilização, foram avaliados 100 ovos por repetição em lupa estereoscópica, 12 horas após a fertilização.

2.6. Preparação das amostras para o teste cometa e análises bioquímicas

As amostras foram centrifugadas, os sobrenadantes coletados e todos os resultados redox normalizados para o teor de proteína [31]. Os resultados bioquímicos foram normalizados ao teor de proteína usando a albumina bovina como padrão. A proteína foi determinada pelo método de Lowry et al. [32] utilizando a albumina de soro bovino como padrão.

2.7. Avaliação do dano ao DNA do espermatozoide pelo teste cometa

O teste cometa foi realizado em condições alcalinas, de acordo com o procedimento de Singh et al. [33], Collins [34] e adaptações de Da Silva et al. [35]. Para examinar o dano do DNA basal, as alíquotas (20 µL) das células foram tomadas imediatamente após a centrifugação, misturadas com 90 µL de agarose com baixo ponto de fusão (0,7% em tampão de fosfato) e adicionadas a lâminas de microscópio pré-revestidas com 1,5% de agarose. As lâminas foram então incubadas numa solução de lise gelada (NaCl 2,5 M, EDTA 100 mM, Tris 10 mM, NaOH 20 mM, pH 10,2, Triton X-100 a 1% e DMSO a 10%). Após 24 h a 4°C, as lâminas foram removidas da solução de lise e colocadas em uma unidade de eletroforese preenchida com tampão de eletroforese fresco alcalino (10M NaOH, 1 mM de EDTA e pH > 13) a 4°C. A amostra realizou 20 minutos de desnaturação, seguida de eletroforese de 15 minutos. As lâminas foram secas durante a noite à temperatura ambiente, depois fixadas e coradas com 20 µL de 4,6-diamidino-2-fenilindole. Cada slide foi analisado em microscopia de fluorescência (EVOS® FL Auto Imaging System AMAFD1000 - Thermo Fisher Scientific, MA, EUA) e o grau de dano foi marcado visualmente. Para um total de 100 cometas em cada slide, uma pontuação de 0 a 4 foi atribuída, dependendo da fração de DNA tirada na cauda. A pontuação geral para cada slide foi, portanto, entre 0 (não danificado) e 400 (completamente danificado).

2.8. Marcadores de danos oxidativos

As espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) foram quantificadas como um índice de peroxidação lipídica, como descrito anteriormente por Morrone et al. [36]. As amostras foram misturadas com 0,6 mL de ácido tricloroacético a 10% (TCA) e 0,5 mL de ácido tiobarbitúrico 0,67% e depois aquecidas em banho-maria em ebulição durante 30 min. Os TBARS foram determinados a 532 nm utilizando um espectrofotômetro. Os resultados são expressos como ηMol de TBARS / mg de proteína.

As modificações oxidativas em proteínas foram acessadas pela quantificação dos grupos carbonila de acordo com Levine et al. [37]. Este método baseia-se na reação da 2,4-dinitrofenil-hidrazina (DNPH) com os grupos de proteína carbonila, com uma absorvência de 370 nm. Os resultados são expressos em μmol de carbonila / mg de proteína.

Para avaliar o teor de sulfidril (-SH) não proteico (que inclui glutatona e outros peptídeos pequenos), fez-se reagir uma alíquota de proteína de 1 mg com ácido tricloroacético (10% v / v) para desproteíntização e centrifugou-se (10 000 g / 10 min); os sobrenadantes foram coletados para medir o nível de SH na fração livre de proteína. Os resultados são expressos em μmol de grupos SH / mg de proteína.

2.9. Enzimas antioxidantes (SOD, CAT, GPx e GST)

A atividade da enzima superóxido dismutase (SOD) foi medida monitorando a inibição da auto oxidação de adrenalina dependente de superóxido em adrenocromo a 480 nm durante 10 minutos (32°C) num espectrofotômetro [38]. Os resultados são expressos como unidades de SOD / mg de proteína.

A atividade da enzima catalase (CAT) foi avaliada pela avaliação da taxa de diminuição da absorvência de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) a 240 nm Morrone et al. [39]. Os resultados são expressos em unidades de CAT / mg de proteína.

A atividade da enzima glutatona peroxidase (GPx) foi determinada medindo a taxa de oxidação de NADPH em um espectrofotômetro a 340 nm como descrito anteriormente por Wendel [40]. A atividade GPx foi expressa em Unidades (μmol NADPH oxidado / min) / mg de proteína.

A atividade da enzima glutatona s-transferase (GST) foi determinada utilizando o procedimento descrito por Habig et al. [41] usando CDNB como substrato em espectrofotômetro a 340 nm. A atividade GST foi expressa em Unidades (nmol CDNB / min) / mg de proteína.

2.10. Análise estatística

As análises foram realizadas com o auxílio do software Statistical Analysis System (SAS). Todos os parâmetros foram analisados utilizando a correlação de Pearson ao nível de significância de 0,1, 1 ou 5%. Os dados obtidos foram submetidos a teste de normalidade de Kolmogorov Smirnov e de homogeneidade de Levene. Quando os dados se apresentaram não paramétricos foi efetuado a transformação dos dados (LOG) para que se tente alcançar a normalidade. A análise de variância (ANOVA) foi realizada e quando houve diferença significativa ($P < 0,05$) foi aplicado o teste de comparação de médias de Tukey, a 5% de significância. Para os dados que não apresentaram normalidade, mesmo após transformação, foi aplicada uma análise não paramétrica de Kruskal-Wallis, seguido do teste de Dunn.

3. Resultados

A Tabela 2 mostra a correlação entre parâmetros qualitativos do sêmen, índice de dano ao DNA e análises bioquímicas. Foi constatada correlação negativa entre a motilidade espermática e a atividade das enzimas CAT e GST; entre a fertilidade e o índice de dano ao DNA, TBARS, carbonilas, atividade das enzimas CAT, GST E GPx; e entre a atividade da SOD e a concentração de grupamentos sulfidrilas. Observou-se também correlação positiva entre o índice de danos ao DNA e TBARS, carbonilas, atividade das enzimas CAT, GST E GPx; entre a atividade da SOD e o TBARS; entre a atividade da CAT e o TBARS, carbonilas, atividade das enzimas GST e GPx; entre a atividade da GST e o TBARS, carbonilas e atividade da GPx; entre a atividade da GPx e o TBARS e carbonilas; e entre o TBARS e carbonilas.

Tabela 2. Correlação entre percentual de células normais (%CN), motilidade espermática (MOT), taxa de fertilização (TF), integridade de membrana (IM), índice de dano ao DNA (IDD), superóxido diemutase (SOD), catalase (CAT), glutathione s-transferase (GST), glutathione peroxidase (GPx), peroxidação lipídica (TBARS), carbonilas (CARB) e sulfidrilas (SULF) do sêmen de *Rhamdia quelen* criopreservado em meio contendo diferentes concentrações de cisteína e glutamina, pós descongelamento, pela correlação de Pearson.

	%CN	MOT	TF	IM	IDD	SOD	CAT	GST	GPx	TBARS	CARB
MOT	0,17 ^{NS}	-									
TF	0,13 ^{NS}	0,25 ^{NS}	-								
IM	-0,05 ^{NS}	0,28 ^{NS}	0,11 ^{NS}	-							
IDD	-0,06 ^{NS}	-0,24 ^{NS}	-0,45 ^{**}	0,01 ^{NS}	-						
SOD	0,15 ^{NS}	0,01 ^{NS}	0,12 ^{NS}	0,13 ^{NS}	0,14 ^{NS}	-					
CAT	-0,02 ^{NS}	-0,33 [*]	-0,39 ^{**}	0,02 ^{NS}	0,90 ^{***}	0,25 ^{NS}	-				
GST	-0,10 ^{NS}	-0,31 [*]	-0,39 ^{**}	-0,01 ^{NS}	0,89 ^{***}	0,13 ^{NS}	0,96 ^{***}	-			
GPx	-0,08 ^{NS}	-0,27 ^{NS}	-0,40 ^{**}	0,03 ^{NS}	0,89 ^{***}	0,11 ^{NS}	0,97 ^{***}	0,96 ^{***}	-		
TBARS	-0,09 ^{NS}	-0,03 ^{NS}	-0,35 [*]	0,25 ^{NS}	0,71 ^{***}	0,36 ^{**}	0,70 ^{***}	0,65 ^{***}	0,68 ^{***}	-	
CARB	-0,16 ^{NS}	-0,24 ^{NS}	-0,36 [*]	0,08 ^{NS}	0,92 ^{***}	0,28 ^{NS}	0,94 ^{***}	0,92 ^{***}	0,91 ^{***}	0,70 ^{***}	-
SULF	-0,26 ^{NS}	-0,06 ^{NS}	0,06 ^{NS}	0,02 ^{NS}	0,06 ^{NS}	-0,43 ^{**}	0,06 ^{NS}	0,14 ^{NS}	0,10 ^{NS}	-0,02 ^{NS}	0,12 ^{NS}

^{NS}Não significativo; ^{*}P<0,05; ^{**}P<0,01; ^{***}P<0,001.

3.1. Motilidade, taxa de fertilização, integridade de membrana e morfologia espermática

O sêmen de *R. quelen* apresentou $14,9 \pm 1,6 \times 10^{10}$ espermatozoides.mL⁻¹ e o volume de sêmen coletado por macho foi de $5,46 \pm 0,63$ mL. A análise de integridade de membrana não apresentou diferença significativa entre os tratamentos (Figura 1D; P=0,7323).

Em relação aos parâmetros de motilidade, taxa de fertilização e morfologia espermática, nenhum tratamento apresentou diferença significativa em relação ao controle. Entretanto, o tratamento 2,5G apresentou o maior percentual de células móveis ($42,50 \pm 2,50\%$; P=0,0003) em relação aos tratamentos 20C, 20C+2,5G e 20C+5G que apresentaram o menor percentual de células móveis ($8,75 \pm 1,25$; $5,00 \pm 0,05$ e $7,50 \pm 1,44$ %, respectivamente) (Figura 1A). Nos resultados de fertilização observou-se um maior percentual de oócitos fertilizados no tratamento 10C ($34,67 \pm 3,84\%$; P=0,0286) em relação aos

tratamentos 10C+5G ($15,33\pm 2,33\%$) e 20C+5G ($14,33\pm 1,76\%$; Figura 1B). A taxa de fertilização do sêmen fresco foi de $20,00\pm 4,36\%$.

Na avaliação morfológica destaca-se apenas que houve diferença entre os tratamentos 5G ($34,75\pm 0,87\%$; $P=0,0056$) e 5C+5G ($14,2\pm 0,80\%$, Figura 1C). O percentual de células normais do sêmen fresco foi de $67,36\pm 1,12\%$.

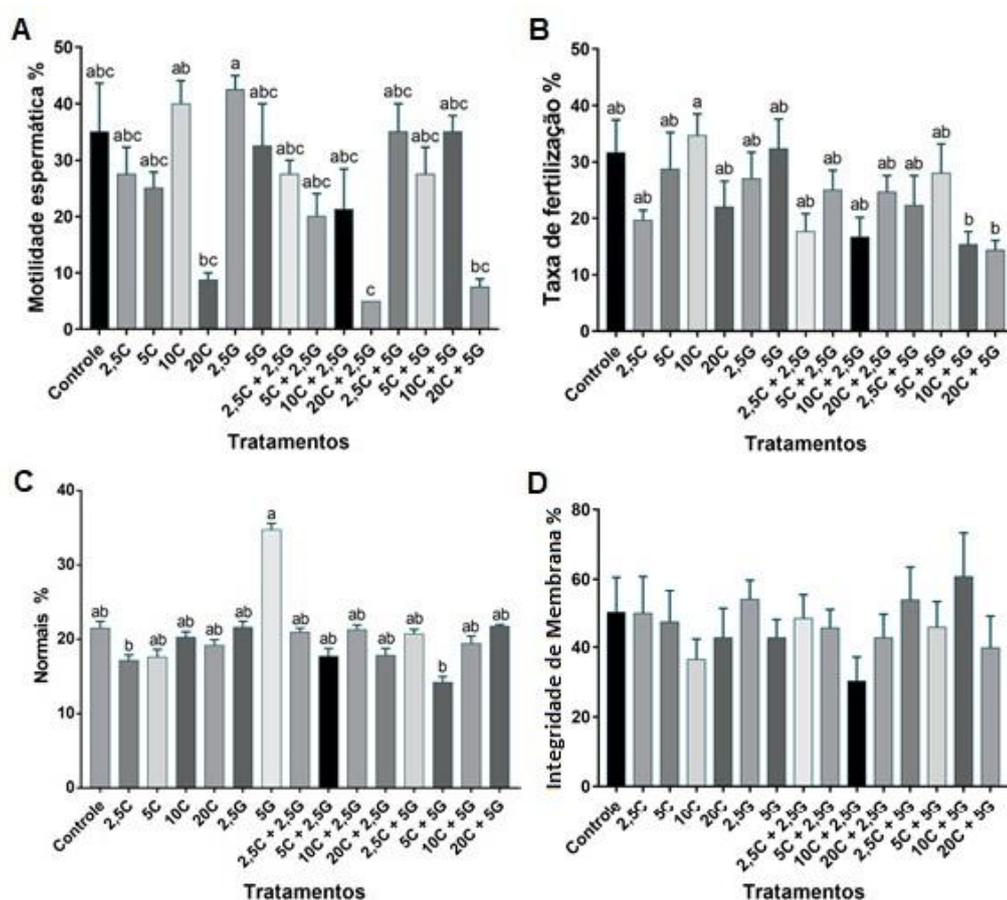


Figura 1. A. Motilidade espermática*; B. Taxa de fertilização**; C. Percentual de células normais* e D. Integridade de membrana* do sêmen de *Rhamdia quelen* criopreservado em meio contendo diferentes concentrações de cisteína e glutamina, pós descongelamento. *Valores de média e erro padrão seguidos de letras diferentes na mesma coluna diferem entre si pela análise não paramétrica de Kruskal-Wallis, seguido do teste de Dunn. **Valores de média e erro padrão seguidos de letras diferentes na mesma coluna diferem entre si pela análise de variância, seguido do teste de Tukey.

3.2. Dano ao DNA do espermatozoide pelo teste cometa

Na análise de dano ao DNA (Figura 2A) os tratamentos 10C+5G ($151,5\pm 10,97$) e 20C+5G ($160,5\pm 10,97$) apresentaram os maiores índices de dano em relação ao controle ($21,5\pm 0,87$) e aos tratamentos 5C ($31\pm 0,71$), 10C ($29,75\pm 3,57$) e 20C ($33\pm 2,48$), que apresentaram um baixo índice de dano.

3.3. Marcadores de danos oxidativos

Na avaliação da peroxidação lipídica (TBARS) o tratamento controle apresentou a menor concentração de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico ($0,036 \pm 0,00$; Figura 2B). Embora o controle tenha apresentado o menor valor, apresentou diferença estatística apenas em relação aos tratamentos 2,5G ($0,062 \pm 0,01$), 2,5C+5G ($0,062 \pm 0,00$), 10C+5G ($0,068 \pm 0,00$) e 20C+5G ($0,078 \pm 0,00$).

A concentração de grupos carbonilas foi maior nos tratamentos 5C+5G ($3,71 \pm 0,12$), 10C+5G ($3,72 \pm 0,08$) e 20C+5G ($3,92 \pm 0,01$) em relação ao controle ($1,13 \pm 0,07$) e ao tratamento 2,5C ($1,49 \pm 0,07$; Figura 2C). A concentração de grupos sulfidrilas foi maior no controle ($2,79 \pm 0,26$) e no tratamento 5C+5G ($2,86 \pm 0,21$) em relação aos tratamentos 2,5C ($1,74 \pm 0,07$), 10C ($1,72 \pm 0,11$), 20C ($1,58 \pm 0,13$), 2,5G ($1,65 \pm 0,07$), 5G ($1,64 \pm 0,08$), 2,5C+2,5G ($1,59 \pm 0,25$), 10C+5G ($1,73 \pm 0,31$) e 20C+5G ($1,82 \pm 0,24$; Figura 2D).

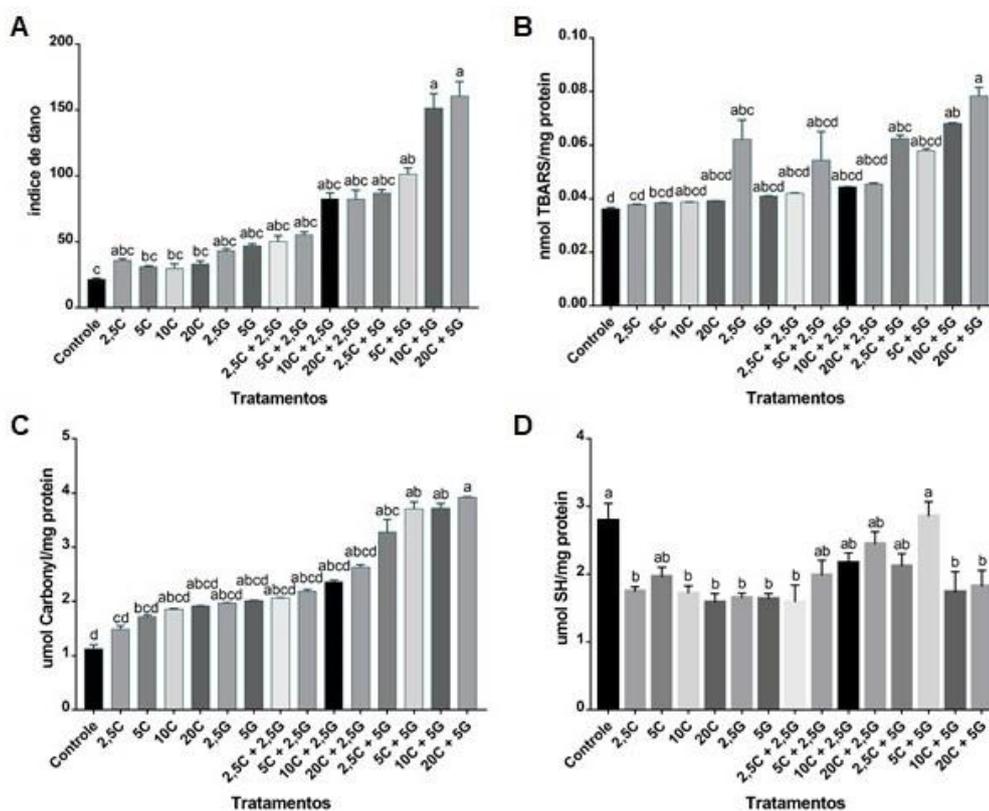


Figura 2. A. Índice de danos ao DNA (cometa)*; B. Peroxidação lipídica (TBARS)*; Concentração de grupos: C. Carbonilas* e D. Sulfidrilas** em sêmen *Rhamdia quelen* criopreservado em meio contendo diferentes concentrações de cisteína e glutamina, pós descongelamento. $P < 0,0001$. *Médias e erro padrão seguidos de letras diferentes na mesma coluna diferem entre si pela análise de Kruskal-Wallis, seguido de teste de Dunn. **Médias e erro padrão seguidos de letras diferentes na mesma coluna diferem entre si pela análise de variância (ANOVA), seguido de teste de Tukey.

3.4. Enzimas antioxidantes (SOD, CAT, GPx e GST)

A atividade da SOD foi maior nos tratamentos 20C (23,72±2,53), 2,5G (26,29±3,22) e 5G (23,91±3,36) em relação ao controle (8,78±0,95; Figura 3A). A atividade da Catalase foi maior no tratamento 20C+5G (262,2±3,50) e menor no controle (53,53±2,80; Figura 3B).

A atividade da Glutathiona S-transferase (GST) foi maior nos tratamentos contendo 5 mM de glutamina combinados com cisteína: 2,5C+5G (3,58±0,06), 5C+5G (3,86±0,16), 10C+5G (3,62±0,16) e 20C+5G (3,86±0,16; Figura 3C). A menor atividade da GST foi encontrada no controle (1,62±0,12).

Os tratamentos que apresentaram maior atividade da GPx (Figura 3D) foram 2,5C+5G (81,35±2,43), 10C+5G (79,23±1,18) e 20C+5G (85,38±0,26); diferindo apenas em relação ao controle (14,86±1,55) e ao tratamento 2,5C (19,77±0,49).

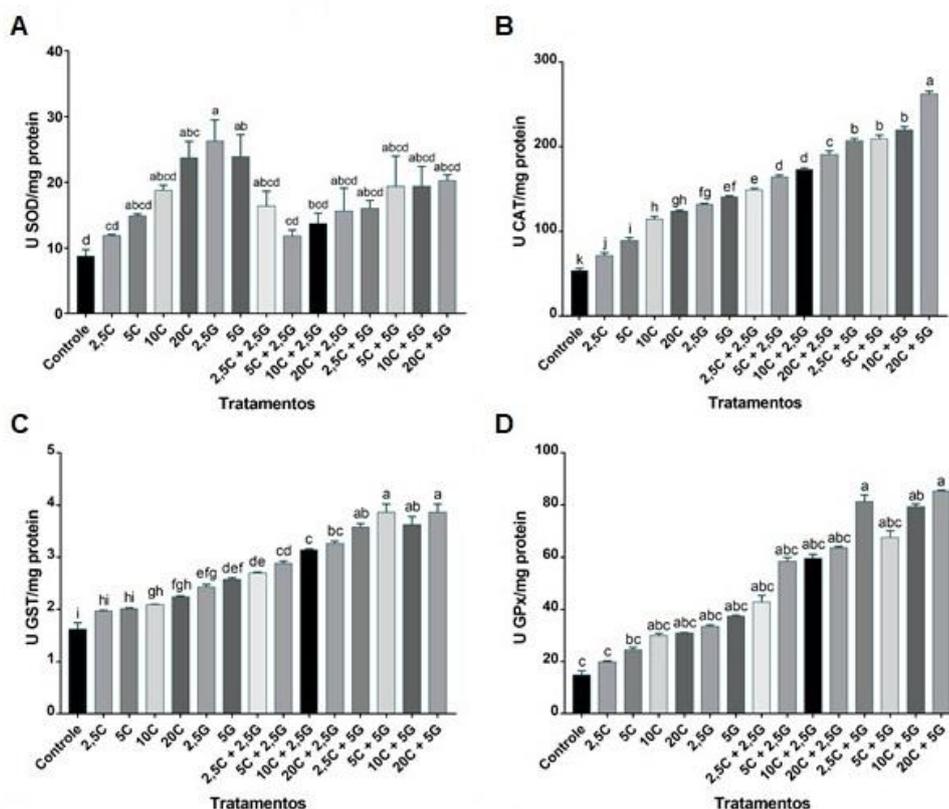


Figura 3. Atividade das enzimas: A. Superóxido Dismutase (SOD)**, B. Catalase**, C. Glutathiona S-transferase (GST)** e D. Glutathiona Peroxidase (GPx)* em sêmen *Rhamdia quelen* criopreservado em meio contendo diferentes concentrações de cisteína e glutamina, pós descongelamento. $P < 0,0001$. *Médias e erro padrão seguidos de letras diferentes na mesma coluna diferem entre si pela análise de Kruskal-Wallis, seguido de teste de Dunn. **Médias e erro padrão seguidos de letras diferentes na mesma coluna diferem entre si pela análise de variância (ANOVA), seguido de teste de Tukey.

4. Discussão

Em algumas espécies de peixes, a utilização de antioxidantes na suplementação das soluções crioprotetoras durante o congelamento de sêmen tem apresentado resultados promissores na qualidade do sêmen pós-aquecimento [11,19,20,21,22,4,6,23]. Por outro lado, a presença, concentração e modo, de atuação dessas substâncias no sêmen ocorrem de maneira espécie-específica [17].

Os resultados das correlações sugerem que a medida que aumenta a atividade das enzimas antioxidantes (exceto a SOD), durante o processo de criopreservação, ocorre o aumento da peroxidação lipídica e do índice de dano ao DNA, que provoca redução da taxa de fertilização. Além disso, um aumento na atividade da CAT e GST provoca a redução da motilidade espermática; e um aumento na concentração de grupamentos carbonilas provoca uma redução na fertilização. Correlações positivas são observadas entre a atividade das enzimas antioxidantes (exceto a SOD) com TBARS, índice de dano ao DNA e a concentração de grupamentos carbonilas, ou seja, a medida que aumentam os danos ao DNA, lipídios e proteínas aumenta a atividade das enzimas. Observa-se também, que um aumento na atividade da SOD gera um aumento da peroxidação lipídica e redução dos grupamentos sulfidrilas, ou seja, uma redução na defesa celular contra estresse oxidativo.

A adição de cisteína e glutamina na solução crioprotetora de sêmen de *Rhamdia quelen*, não produziu efeito positivo nos parâmetros qualitativos do sêmen após a criopreservação. Mesmo não havendo diferença entre os tratamentos e o controle na motilidade espermática, é possível observar que há uma queda nos percentuais de motilidade nos tratamentos com a maior concentração de cisteína (20 mM), tanto isolada quanto em combinação com a glutamina. Em uma análise pontual destes tratamentos, é possível inferir que a alta concentração de cisteína apresentou efeitos de toxicidade, e assim, concentrações menores que 2,5 mM de cisteína devem ser investigadas em trabalhos futuros. Em conformidade com os resultados obtidos no presente estudo, Kledmanee et al. [20] recomendam a suplementação de L-cisteína a uma concentração de 1 mM, em sêmen de *C. carpio*, uma vez que a concentração 2 mM de L-cisteína apresentou efeitos tóxicos.

Nos tratamentos com altas concentrações de antioxidantes também foi constatado aumento da peroxidação lipídica e de danos ao DNA o que pode estar diretamente relacionado, com a baixa de motilidade (20C+5G) e taxa de fertilização (10C+5G e 20C+5G) observadas. Ainda, a maior concentração de glutamina (5 mM) reduziu a peroxidação lipídica e teve um melhor percentual de células espermáticas normais em comparação à menor concentração (2,5 mM). Portanto, novos testes utilizando a suplementação de glutamina em concentrações superiores a 5 mM, poderiam vir a verificar efeitos semelhantes aos encontrados na literatura, para a espécie utilizada no presente estudo.

Os índices bioquímicos avaliados no sêmen de *R. quelen*, a partir da adição de cisteína e glutamina não produziu efeitos positivos em relação ao controle. Ao contrário, apresentou perda de qualidade em alguns tratamentos testados, especialmente naqueles em que as concentrações dos antioxidantes

foram mais altas. Esta observação foi perceptível na análise do índice de dano ao DNA e dos níveis de peroxidação lipídica (TBARS). Em carpa comum (*Cyprinus carpio*), foi constatado que um aumento na concentração de cisteína (20 mM) causou uma melhora significativa na motilidade espermática e uma redução aos danos de DNA dos espermatozoides, porém não apresentou diferença significativa na taxa de fertilização [4]. No entanto, em sêmen de esturjão (*Acipenser dabryanus* e *Acipenser baerii*) a cisteína em uma concentração inferior a 1,6 mg / mL não mostrou efeitos nos parâmetros de qualidade de sêmen avaliados, já em uma concentração superior a 1,6 mg / mL (~ 9,8 mM), foi associada a menor mobilidade dos espermatozoides, integridade de membrana e do acrosoma e taxa de fertilização, não mostrando efeito protetor ao sêmen de esturjão durante a criopreservação [23]. Em *Acipenser persicus*, o aumento na concentração de glutamina (10 mM) resultou em melhora na motilidade, na concentração espermática e na taxa de fertilização [6]. Estas contradições nos resultados podem ocorrer devido às diferenças na composição da solução crioprotetora, espécies animais e/ou pelas diferentes concentrações dos antioxidantes utilizadas nos estudos [17].

O desequilíbrio entre as EROS e o sistema antioxidante dos espermatozoides leva a distúrbios metabólicos e funcionais, promovendo a peroxidação dos fosfolípidos da membrana e oxidação das proteínas, além de causar danos a proteínas transmembrana e ao DNA que comprometem a motilidade, viabilidade, integridade acrossomal e o potencial de fertilização [8,9]. Diversos tipos de oxidação de proteínas podem ser induzidos pelas EROS, entre elas, a perda de grupamentos sulfidrílica e formação de grupamentos carbonílica. Os grupamentos sulfidrílica estão ligados às proteínas e moléculas que contém sulfidrílica (SH), como a glutatona e a cisteína, que representam um potencial antioxidante ativo na defesa celular contra estresse oxidativo [42]. A formação dos grupamentos carbonílica é utilizada como um marcador de oxidação de proteínas, já que é uma alteração oxidativa irreversível, levando à perda total ou parcial da função da proteína [43,37,44]. Além disso, o dano a proteínas pode contribuir para danos secundários a outras biomoléculas, como por exemplo, a inativação de enzimas de reparo do DNA [44]. Assim, o aumento das carbonílicas e/ou a diminuição das sulfidrílicas indicam dano oxidativo às proteínas, bem como redução das defesas antioxidantes.

Neste estudo verificamos um alto conteúdo de grupamentos carbonílica e baixo conteúdo de grupamentos sulfidrílica nos tratamentos 10C+5G e 20C+5G quando comparados com o controle, além de alto nível de peroxidação lipídica. Esses dados indicam que estes tratamentos apresentam tanto danos oxidativos a proteínas quanto a lipídios, provavelmente devido a um aumento das EROS no sêmen de *R. quelen* criopreservado.

A atividade da SOD se mostrou maior nos tratamentos em que foi utilizado apenas glutamina (2,5G e 5G) em relação ao controle, o que pode ter influenciado os bons índices de motilidade e da taxa de fertilização destes tratamentos, especialmente, se observado o elevado percentual de células normais no tratamento 5G. Já a atividade da Catalase aumentou significativamente conforme o aumento da concentração de antioxidantes (cisteína e/ou glutamina) adicionados à solução crioprotetora, atingindo a maior

atividade no tratamento em que há a concentração mais elevada dos dois antioxidantes (20C+5G). Não houve diferença quando a cisteína foi utilizada isoladamente nos tratamentos 2,5C, 5C, 10C e 20C quanto a atividade da enzima Glutathione S-transferase (GST). Por outro lado, quando associada a concentrações de glutamina a partir de 5 mM à cisteína a atividade da GST aumentou. Em relação à Glutathione Peroxidase (GPx) observa-se diferença apenas no controle e na menor concentração de cisteína isolada (2,5 mM) em relação aos tratamentos 2,5C+5G, 10C+5G e 20C+5G.

As respostas relacionadas com as atividades dos diferentes índices bioquímicos do sêmen criopreservado de *R. quelen*, quando observadas isoladamente podem resultar em uma análise superficial do estudo. Quando avaliamos a atividade das enzimas, vemos que a CAT aumentou em todos os tratamentos em relação ao controle. Nos tratamentos em que foi combinado cisteína com a glutamina, principalmente na combinação da cisteína com 5 mM de glutamina, houve um aumento na atividade da GST e GPx, provavelmente, pelo fato destes aminoácidos serem precursores da glutathione. Mas apesar do aumento da atividade da GST e GPx, houve um alto índice de dano ao DNA e alta peroxidação lipídica. Nestes tratamentos, onde foram utilizadas maiores concentrações de cisteína e glutamina, há também, uma baixa atividade da SOD e alta atividade da CAT. A SOD catalisa a conversão do radical superóxido ($O_2^{\circ-}$) em peróxido de hidrogênio (H_2O_2), que sofre ação da GPx e da CAT. Logo, há um indicativo de que a peroxidação lipídica e os danos ao DNA sejam causados pelo radical superóxido ($O_2^{\circ-}$), pois com baixa atividade da SOD, ocorre um acúmulo de $O_2^{\circ-}$, não havendo substrato para a ação da CAT e GPx. Assim, é necessária atividade, em conjunto, de todas as enzimas do sistema antioxidante para que a proteção às células contra o estresse oxidativo seja eficiente.

Em sêmen de *Pangasianodon hypophthalmus*, Rani & Munuswamy [45] afirmam que o principal motivo do dano ao DNA é a toxicidade do crioprotetor, e ainda, que a formação de cristais de gelo nos procedimentos de congelamento e descongelamento são os principais fatores que induzem lesões mecânicas às células congeladas. McCarthy et al. [46] estabeleceram que o estresse osmótico induzido pela criopreservação pode levar ao dano celular oxidativo. Assim, é possível que apesar da atividade das enzimas CAT, GPx e GST ter aumentado quando adicionado maiores concentrações de antioxidantes, outros mecanismos de crioinjúria, podem ter causado o aumento de danos ao DNA espermático e peroxidação lipídica, já que a maior atividade destas enzimas não resultou na diminuição destes danos.

Mesmo que o parâmetro de integridade de membrana não tenha apresentando diferença estatística, observa-se uma média de 45,95% de células íntegras, ou seja, a maioria das células com membranas rompidas. As lesões produzidas na membrana plasmática pela peroxidação lipídica podem ter resultado no extravasamento de mitocôndrias destas células para o meio extracelular. Que por sua vez estariam produzindo EROS, e estas estariam sofrendo ação das enzimas antioxidantes, consumindo cisteína e glutamina neste processo. Está hipótese explicaria o aumento da atividade destas enzimas sem a redução da peroxidação lipídica mesmo com o aumento nas concentrações dos antioxidantes. Assim, estes aminoácidos com ação antioxidante (cisteína e

glutamina) não estariam disponíveis para a proteção contra o estresse oxidativo nas células íntegras, gerando os baixos índices de fertilidade obtidos neste estudo.

A glutamina pode modular a ativação de proteínas de choque térmico (HSPs). Estas proteínas correspondem a uma das principais vias de sinalização celular, contribuindo para o aumento da capacidade da célula de sobreviver a alterações na sua homeostasia na presença de agentes estressores, como as EROS [26]. Nos tratamentos onde apenas glutamina é adicionada (2,5 e 5 mM) à solução crioprotetora, observou-se altos índices de motilidade, taxa de fertilização e percentual de células normais (5 mM). Indicando que mesmo o aumento da GST e GPx não terem reduzido o dano ao DNA e a peroxidação lipídica, a adição de glutamina à solução crioprotetora pode promover um efeito benéfico causado pela ativação das HSPs (proteínas de choque térmico). Este efeito poderia ser melhor avaliado testando-se a adição de maiores concentrações de glutamina à solução crioprotetora.

Muito embora de um modo geral, a adição dos antioxidantes testados neste estudo, em diferentes concentrações, isoladas ou combinadas, não tenham melhorado a qualidade do sêmen criopreservado de *R. quelen*, alguns tratamentos devem ser utilizados como balizadores para novos estudos, como os tratamentos 2,5C e 5G. Índices qualitativos e bioquímicos associados são indicadores positivos para futuros estudos com estas concentrações destes antioxidantes.

5. Conclusão

Em conclusão, a adição dos antioxidantes cisteína (2,5; 5; 10; 20 mM) e glutamina (2,5; 5 mM), associados ou isolados, não apresentaram resultados satisfatórios, e sim, promoveram efeitos prejudiciais à qualidade espermática nos parâmetros de motilidade, morfologia, fertilização, peroxidação lipídica, índice de danos ao DNA e oxidação de proteínas. Portanto, as concentrações de cisteína e/ou glutamina testadas não são recomendadas para a suplementação da solução crioprotetora (leite em pó desnatado 50g/L, metanol 100mL/L e frutose 50g/L) para sêmen de *Rhamdia quelen* criopreservado.

Referências

- [1] **Hernández CL, Ortega-Lara A, Sánchez-Garcés GC, Alford MH.** 2015. Genetic and morphometric evidence for the recognition of several recently synonymized species of trans-Andean *Rhamdia* (Pisces: Siluriformes: Heptapteridae). *Copeia*, 103(3), 563-579.
- [2] **Marchioro MI, Baldisserotto B.** 1999. Sobrevivência de alevinos de jundiá (*Rhamdia quelen* Quoy & Gaimard, 1824) à variação de salinidade da água. *Ciência Rural*, 29(2), 315-318.
- [3] **Sanches EA, Neumann G, Toledo CPR, Bombardelli RA, Piana PA, Romagosa E.** 2013. Temperature and storage period over spermatoc parameters

of jundiá, *Rhamdia quelen* (Quoy & Gaimard, 1824). *Aquaculture Research*, 44(4), 534-541.

[4] **Öğretmen F, İnanan BE, Kutluyer F, Kayim M.** 2015. Effect of semen extender supplementation with cysteine on postthaw sperm quality, DNA damage, and fertilizing ability in the common carp (*Cyprinus carpio*). *Theriogenology*, 83(9), 1548-1552.

[5] **Martínez-Páramo S, Diogo P, Dinis MT, Herráez MP, Sarasquete C, Cabrita E.** 2012. Incorporation of ascorbic acid and α -tocopherol to the extender media to enhance antioxidant system of cryopreserved sea bass sperm. *Theriogenology*, 77(6), 1129-1136.

[6] **Aramli MS, Golshahi K, Nazari RM, Golpour A, Aramli S.** 2016. Influence of Glutamine Supplementation on Motility and Fertilization Success of Frozen–Thawed Persian Sturgeon (*Acipenser persicus*) Sperm. *Reproduction in domestic animals*, 51(4), 474-477.

[7] **Watson PF.** 1995. Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function. *Reproduction, Fertility and Development*, v. 7, n. 4, p. 871-891.

[8] **Watson PF.** 2000. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Animal reproduction science*, v. 60, p. 481-492.

[9] **Ball BA.** 2008. Oxidative stress, osmotic stress and apoptosis: impacts on sperm function and preservation in the horse. *Animal Reproduction Science*, v. 107, n. 3, p. 257-267.

[10] **Lahnsteiner F, Mansour N, Plaetzer C.** 2010. Antioxidant systems of brown trout (*Salmo trutta f. fario*) semen. *Animal Reproduction Science*, v.119, p.314-321.

[11] **Lahnsteiner F, Mansour N.** 2010. A comparative study on antioxidant systems in semen of species of the Percidae, Salmonidae, Cyprinidae, and Lotidae for improving semen storage techniques. *Aquaculture*, v.307, p.130-140.

[12] **Ciereszko A, Dabrowski K.** 1995. Sperm quality and ascorbic acid concentration in rainbow trout semen are affected by dietary vitamin C: an across-season study. *Biology of Reproduction*, v.52, p.982-988.

[13] **Ciereszko A, Dabrowski K, Kucharczyk D, Dobosz S, Goryczko K, Glogowski J.** 1999. The presence of uric acid, an antioxidative substance, in fish seminal plasma. *Fish Physiology and Biochemistry*, 21(4), 313-315.

[14] **Mansour N, McNiven MA, Richardson GF.** 2006. The effect of dietary supplementation with blueberry, α -tocopherol or astaxanthin on oxidative stability of Arctic char (*Salvelinus alpinus*) semen. *Theriogenology*, 66(2), 373-382.

[15] **Stejskal K, Svobodova Z, Fabrik I, Adam V, Beklova M, Rodina M, Kizek R.** 2008. Content of cysteine, reduced and oxidized glutathione in spermatozoa of representatives of Acipenseriformes (*Acipenser baerii* and *A. ruthenus*) as well as teleosts (*Perca fluviatilis* and *Sander lucioperca*). *Journal of Applied Ichthyology*, 24(4), 519-521.

- [16] **Lahnsteiner F.** 2009. The role of free amino acids in semen of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* and carp *Cyprinus carpio*. *Journal of Fish Biology*, v.75, p.816-833.
- [17] **Cabrera E, Ma S, Diogo P, Martínez-Páramo S, Sarasquete C, Dinis MT.** 2011. The influence of certain aminoacids and vitamins on post-thaw fish sperm motility, viability and DNA fragmentation. *Animal reproduction science*, 125(1-4), 189-195.
- [18] **Aurich C.** 2005. Factors affecting the plasma membrane function of cooled-stored stallion spermatozoa. *Animal Reproduction Science*, v. 89, n. 1, p. 65-75.
- [19] **Lahnsteiner F, Mansour N, Kunz FA.** 2011. The effect of antioxidants on the quality of cryopreserved semen in two salmonid fish, the brook trout (*Salvelinus fontinalis*) and the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Theriogenology*, v.76, p.882-890.
- [20] **Kledmanee K, Taweedet S, Thaijongruk P, Chanapiwat P, Kaeoket K.** 2013. Effect of L-cysteine on Chilled carp (*Cyprinus carpio*) semen qualities. *The Thai Journal of Veterinary Medicine*, v. 43, n. 1, p. 91.
- [21] **Martínez-Páramo S, Diogo P, Dinis MT, Soares F, Sarasquete C, Cabrera E.** 2013. Effect of two sulfur-containing amino acids, taurine and hypotaurine in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) sperm cryopreservation. *Cryobiology*, 66(3), 333-338.
- [22] **Kutluyer F, Kayim M, Öğretmen F, Büyükleblebici S, Tuncer PB.** 2014. Cryopreservation of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* spermatozoa: effects of extender supplemented with different antioxidants on sperm motility, velocity and fertility. *Cryobiology*, 69(3), 462-466.
- [23] **Li P, Xi MD, Du H, Qiao XM, Liu ZG, Wei QW.** 2017. Antioxidant supplementation, effect on post-thaw spermatozoan function in three sturgeon species. *Reproduction in Domestic Animals*.
- [24] **Cruzat VF, Petry ÉR, Tirapegui, J.** 2009. Glutamina: aspectos bioquímicos, metabólicos, moleculares e suplementação. *Revista Brasileira de medicina do Esporte*, 15(5), 392-397.
- [25] **Tuncer PB, Bucak MN, Büyükleblebici S, Sariözkan S, Yeni D, Eken A, ..., Gündoğan M.** 2010. The effect of cysteine and glutathione on sperm and oxidative stress parameters of post-thawed bull semen. *Cryobiology*, 61(3), 303-307.
- [26] **Gabai VL, Sherman MY.** 2002. Invited review: Interplay between molecular chaperones and signaling pathways in survival of heat shock. *Journal of Applied Physiology*, v. 92, n. 4, p. 1743-1748.
- [27] **Streit Jr DP, da Costa BB, Marques LS, Lassen PG, Fossati AA, Pegorini C, Batista R.** 2018. Cysteine supplementation on the quality of cryopreserved sperm of South American catfish. In Abstracts of the 55th Annual Meeting of the Society for Cryobiology, 2018, Madrid, Spain, Madrid: CRYO, 2018.

- [28] **Adames MS, Toledo CPR, Neumann G, Buzzi AH, Buratto CN, Piana PA, Bombardelli RA.** 2015. Optimization of the sperm: oocyte ratio and sperm economy in the artificial reproduction of *Rhamdia quelen* using fructose as a sperm motility modulator. *Animal reproduction science*, 161, 119-128.
- [29] **Viveiros ATM, So N, Komen J.** 2000. Sperm Criopreservation of African Catfish (*Clarias gariepinus*) Cryoprotectants, Freezing Rates and Sperm: Egg Dilution Ratio. *Theriogenology*, New York, v. 54, n. 9, p. 1305-1308.
- [30] **Westerfield M.** 2000. The zebrafish book, 4th Edition; A guide for the laboratory use of zebrafish (*Danio rerio*), Eugene, University of Oregon Press. Paperback.
- [31] **Schnorr CE, Morrone MDS, Simões-Pires A, Bittencourt LDS, Zeidán-Chuliá F, Moreira JCF.** 2014. Supplementation of adult rats with moderate amounts of β -carotene modulates the redox status in plasma without exerting pro-oxidant effects in the brain: a safer alternative to food fortification with vitamin A?. *Nutrients*, 6(12), 5572-5582.
- [32] **Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ.** 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of biological chemistry*, 193(1), 265-275.
- [33] **Singh NP, McCoy MT, Tice RR, Schneider EL.** 1988. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Experimental cell research*, 175(1), 184-191.
- [34] **Collins, A. R.** 2002. The comet assay. Principles, applications, and limitations. *Methods in molecular biology (Clifton, NJ)*, v. 203, p. 163.
- [35] **Da Silva ALG, Da Rosa HT, Karnopp TE, Charlier CF, Ellwanger JH, Moura DJ, ..., Henriques JAP.** 2013. Evaluation of DNA damage in COPD patients and its correlation with polymorphisms in repair genes. *BMC medical genetics*, 14(1), 93.
- [36] **Morrone MDS, Schnorr CE, Behr GA, Gasparotto J, Bortolin RC, da Boit Martinello K., ..., Moreira JCF.** 2016. Curcumin supplementation decreases intestinal adiposity accumulation, serum cholesterol alterations, and oxidative stress in ovariectomized rats. *Oxidative medicine and cellular longevity*.
- [37] **Levine RL, Williams JA, Stadtman EP, Shacter E.** 1994. Carbonyl assays for determination of oxidatively modified proteins. In *Methods in enzymology* (Vol. 233, pp. 346-357). Academic Press.
- [38] **Misra HP, Fridovich I.** 1972. The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. *Journal of Biological chemistry*, v. 247, n. 10, p. 3170-31752.
- [39] **Morrone MDS, Schnorr CE, Behr GA, Gasparotto J, Bortolin RC, da Boit Martinello K., ..., Moreira JCF.** 2016. Oral administration of curcumin relieves behavioral alterations and oxidative stress in the frontal cortex, hippocampus, and striatum of ovariectomized Wistar rats. *The Journal of nutritional biochemistry*, v. 32, p. 181-188.

- [40] **Wendel A.** 1981. Glutathione peroxidase. In: *Methods in enzymology*. Academic Press. p. 325-333.
- [41] **Habig WH, Pabst MJ, Jakoby WB.** 1974. Glutathione S-transferases the first enzymatic step in mercapturic acid formation. *Journal of biological Chemistry*, v. 249, n. 22, p. 7130-7139.
- [42] **Starke-Reed PE, Oliver CN.** 1989. Protein oxidation and proteolysis during aging and oxidative stress. *Arch Biochem Biophys* 275:559-567.
- [43] **Levine RL, Garland D, Oliver CN, Amici A, Climent L, Lenz AG, Ahn BW, Shalithiel S, Stadman ER.** 1990. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Methods Enzymol* 186:464-478.
- [44] **Halliwell BH, Gutteridge JMC.** 2007. *Free Radicals in Biology and Medicine*. 4th ed. Oxford University Press, Oxford.
- [45] **Rani KU, Munuswamy N.** 2014. Effect of DNA damage caused by cryopreservation of spermatozoa using a modified single cell gell electrophoresis in the freshwater catfish. *Journal of Coastal Life Medicine*, v. 2, p. 515-519.
- [46] **McCarthy MJ, Baumber J, Kass PH, Meyers SA.** 2010. Osmotic stress induces oxidative cell damage to rhesus macaque spermatozoa. *Biology of reproduction*, 82(3), 644-651.

CAPÍTULO III

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Recomenda-se a realização de estudos complementares para avaliar o real benefício da cisteína e da glutamina em relação à solução crioprotetora utilizada para a criopreservação de sêmen de *Rhamdia quelen*. Além disso, outras concentrações e antioxidantes devem ser avaliados, bem como seus possíveis efeitos de toxicidade.

Esforços futuros são necessários para se entender melhor as mudanças bioquímicas que são importantes na criopreservação de sêmen e para encontrar os antioxidantes apropriados e suas concentrações efetivas a fim de melhorar os parâmetros de qualidade de sêmen de peixes após o congelamento e descongelamento. Outros antioxidantes devem ser testados em sêmen de *R. quelen* para que se possa determinar qual promove o melhor efeito de proteção aos espermatozoides desta espécie.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAMES, M. S. et al. Optimization of the sperm: oocyte ratio and sperm economy in the artificial reproduction of *Rhamdia quelen* using fructose as a sperm motility modulator. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 161, p. 119-128, 2015.
- AGARWAL, A.; SALEH, R. A. Role of oxidants in male infertility: rationale, significance, and treatment. **Urologic Clinics of North America**, Philadelphia, v. 29, n. 4, p. 817-827, 2002.
- AGARWAL, A.; PRABAKARAN, S. A.; SAID, T. M. Prevention of oxidative stress injury to sperm. **Journal of Andrology**, Lawrence, v. 26, n. 6, p. 654-660, 2005.
- AIRES, V. A. et al. *In vitro* and *in vivo* comparison of egg yolk-based and soybean lecithin-based extenders for cryopreservation of bovine semen. **Theriogenology**, New York, v. 60, n. 2, p. 269-279, 2003.
- AITKEN, R. J.; BAKER, M. A. Oxidative stress and male reproductive biology. **Reproduction, Fertility and development**, East Melbourne, v. 16, n. 5, p. 581-588, 2004.
- AITKEN, R. J.; BENNETTS, L. Reactive oxygen species: friend or foe. In: DE JONGE, C. J.; BARRATT, C. L. R. **The Sperm Cell**. Cambridge: Cambridge University Press, 2006, p. 170-193.
- ALDERSON, R.; MACNEIL, A. J. Preliminary investigations of cryopreservation of milt of Atlantic salmon (*Salmo salar*) and its application to commercial farming. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 43, n. 1-3, p. 351-354, 1984.
- AMBROSINI, G. et al. Oocytes cryopreservation: state of art. **Reproductive toxicology**, Elmsford, v. 22, n. 2, p. 250-262, 2006.
- ANDRADE, E. R. et al. Consequências da produção das espécies reativas de oxigênio na reprodução e principais mecanismos antioxidantes. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 34, n. 2, p. 79-85, 2010.
- AQUINO, R. S. et al. A importância nutricional da glutamina na fisiologia de matrizes suínas lactantes. **PUBVET**, Londrina, v. 7, n. 17, Ed. 240, Art. 1582, Setembro, 2013.
- ARAMLI, M. S. et al. Influence of Glutamine Supplementation on Motility and Fertilization Success of Frozen–Thawed Persian Sturgeon (*Acipenser persicus*) Sperm. **Reproduction in domestic animals**, Berlin, v. 51, n. 4, p. 474-477, 2016.

ARMSTRONG, J. S. et al. Characterization of reactive oxygen species induced effects on human spermatozoa movement and energy metabolism. **Free Radical Biology and Medicine**, Tarrytown, v. 26, n. 7-8, p. 869-880, 1999.

AURICH, C. Factors affecting the plasma membrane function of cooled-stored stallion spermatozoa. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 89, n. 1-4, p. 65-75, 2005.

BAILEY, J. L.; BILODEAU, J. F.; CORMIER, N. Semen cryopreservation in domestic animals: a damaging and capacitating phenomenon. **Journal of andrology**, Lawrence, v. 21, n. 1, p. 1-7, 2000.

BAKER, M. A.; AITKEN, R. J. The importance of redox regulated pathways in sperm cell biology. **Molecular and cellular endocrinology**, Limerick, v. 216, n. 1-2, p. 47-54, 2004.

BALDISSEROTTO, B. Biologia do jundiá. In: BALDISSEROTTO, B.; NETO, J. R. **Criação de jundiá**. Santa Maria: Editora UFSM, 2004. p. 67-72.

BALL, B. A. et al. Effect of antioxidants on preservation of motility, viability and acrosomal integrity of equine spermatozoa during storage at 5 C. **Theriogenology**, New York, v. 56, n. 4, p. 577-589, 2001.

BALL, B. A. Oxidative stress, osmotic stress and apoptosis: impacts on sperm function and preservation in the horse. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 107, n. 3-4, p. 257-267, 2008.

BARCELLOS, L. J. G. et al. Nursery rearing of jundiá, *Rhamdia quelen* (Quoy & Gaimard) in cages: cage type, stocking density and stress response to confinement. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 232, n. 1, p. 383-394, 2004.

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**, São Paulo, v. 29, n. 1, p. 113-123, 2006.

BAUMBER, J. et al. The effect of reactive oxygen species on equine sperm motility, viability, acrosomal integrity, mitochondrial membrane potential and membrane lipid peroxidation. **Journal of andrology**, Lawrence, v. 21, n. 6, p. 895-902, 2000.

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

BAUMBER, J.; BALL, B. A.; LINFOR, J. J. Assessment of the cryopreservation of equine spermatozoa in the presence of enzyme scavengers and antioxidants.

American journal of veterinary research, Schaumburg, v. 66, n. 5, p. 772-779, 2005.

BAUST, J. G. The management of mammalian cells at low temperature. **Cell Preservation Technology**, New Rochelle, v.6, p.111-112, 2008.

BILODEAU, J-F. et al. Levels of antioxidant defenses are decreased in bovine spermatozoa after a cycle of freezing and thawing. **Molecular reproduction and development**, Hoboken, v. 55, n. 3, p. 282-288, 2000.

BILODEAU, J-F. et al. Thiols prevent $H_2O_2^-$ mediated loss of sperm motility in cryopreserved bull semen. **Theriogenology**, New York, v. 56, n. 2, p. 275-286, 2001.

BILODEAU, J-F. et al. Reactive oxygen species-mediated loss of bovine sperm motility in egg yolk Tris extender: protection by pyruvate, metal chelators and bovine liver or oviductal fluid catalase. **Theriogenology**, New York, v. 57, n. 3, p. 1105-1122, 2002.

BLAXTER, J. H. S. Sperm storage and cross-fertilization of spring and autumn spawning herring. **Nature, London**, v. 172, p. 1189-1190, 1953.

BOMBARDELLI, R. A. et al. Dose inseminante para fertilização artificial de ovócitos de jundiá cinza, *Rhamdia quelen* (Quoy & Gaimardm, 1824). **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 35, n. 4, p. 1251-1257, 2006.

BORGES, A. et al. Biochemical composition of seminal plasma and annual variations in semen characteristics of jundia *Rhamdia quelen* (Quoy and Gaimard, Pimelodidae). **Fish Physiology and Biochemistry**, Dordrecht, v. 31, n. 1, p. 45-53, 2005.

BRÉQUE, C.; SURAI, P.; BRILLARD, J-P. Roles of antioxidants on prolonged storage of avian spermatozoa in vivo and in vitro. **Molecular reproduction and development**, Hoboken, v. 66, n. 3, p. 314-323, 2003.

BUCAK, M. N.; ATESSAHIN, A.; YÜCE, A. Effect of anti-oxidants and oxidative stress parameters on ram semen after the freeze-thawing process. **Small ruminant research**, Amsterdam, v. 75, n. 2-3, p. 128-134, 2008.

BUCAK, M. N. et al. Comparison of the effects of glutamine and an amino acid solution on post-thawed ram sperm parameters, lipid peroxidation and antioxidant activities. **Small Ruminant Research**, Amsterdam, v. 81, n. 1, p. 13-17, 2009a.

BUCAK, M. N. et al. Effect of antioxidants on microscopic semen parameters, lipid peroxidation and antioxidant activities in Angora goat semen following

cryopreservation. **Small Ruminant Research**, Amsterdam, v. 81, n. 2, p. 90-95, 2009b.

BURG, M. B.; FERRARIS, J. D.; DMITRIEVA, N. I. Cellular response to hyperosmotic stresses. **Physiological reviews**, Bethesda, v. 87, n. 4, p. 1441-1474, 2007.

CÂMARA, D. R.; GUERRA, M. M. P. Refrigeração e criopreservação do sêmen ovino: danos inerentes à técnica e influência da suplementação do meio com antioxidantes sobre a qualidade espermática. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, São Paulo, v. 35, n. 1, p. 33-40, 2011.

CARNEIRO, P. C. F. et al. Viabilidade do sêmen do jundiá, *Rhamdia quelen*, armazenado sob refrigeração. **Revista Acadêmica: Ciência Animal**, Curitiba, v. 4, n. 3, p. 11-16, 2006.

CAROLSFELD J. et al. Cryopreservation of sperm in Brazilian migratory fish conservation. **Journal of Fish Biology**, London, v. 63, n. 2, p.472-481, 2003.

CHRISTOPHERSEN B. O. The inhibitory effect of reduced glutathione on the lipid peroxidation of microsomal fraction and mitochondria. **Biochemical Journal**, London, v. 106, n. 2, p. 515-522, 1968.

CIERESZKO, A.; DABROWSKI, K. Sperm quality and ascorbic acid concentration in rainbow trout semen are affected by dietary vitamin C: an across-season study. **Biology of Reproduction**, New York, v. 52, n. 5, p. 982-988, 1995.

CIERESZKO A. et al. The presence of uric acid, an antioxidative substance, in fish seminal plasma. **Fish Physiology and Biochemistry**, Dordrecht, v. 21, n. 4, p. 313-315, 1999.

ÇOYAN, K. et al. Influence of methionine and dithioerythritol on sperm motility, lipid peroxidation and antioxidant capacities during liquid storage of ram semen. **Research in veterinary science**, London, v. 89, n. 3, p. 426-431, 2010.

CRUZAT, V. F. et al. Glutamina: aspectos bioquímicos, metabólicos, moleculares e suplementação. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**, Niterói, v. 15, n. 5, p. 392-397, 2009.

CUMMINS, J. M.; JEQUIER, A. M.; KAN, R. Molecular biology of human male infertility: links with aging, mitochondrial genetics, and oxidative stress? **Molecular reproduction and development**, Hoboken, v. 37, n. 3, p. 345-362, 1994.

DE GRAAF, S. P. et al. The influence of antioxidant, cholesterol and seminal plasma on the in vitro quality of sorted and non-sorted ram spermatozoa. **Theriogenology**, New York, v. 67, n. 2, p. 217-227, 2007.

DE LAMIRANDE, E.; GAGNON, C. Capacitation-associated production of superoxide anion by human spermatozoa. **Free Radical Biology and Medicine**, Tarrytown, v. 18, n. 3, p. 487-495, 1995.

DE MERCADO, E. et al. Evaluation of l-glutamine for cryopreservation of boar spermatozoa. **Animal reproduction science**, Amsterdam, v. 115, n. 1-4, p. 149-157, 2009.

DURU, N. K. I.; MORSHEDI, M.; OEHNINGER, S. Effects of hydrogen peroxide on DNA and plasma membrane integrity of human spermatozoa. **Fertility and sterility**, New York, v. 74, n. 6, p. 1200-1207, 2000.

EL-SHESHTAWY, R. I.; EL-SISY, G. A.; EL-NATTAT, W. S. Use of selected amino acids to improve buffalo bull semen cryopreservation. **Global Veterinária, Dubai**, v. 2, n. 4, p. 146-150, 2008.

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

FERREIRA, A. A. et al. Avaliação qualitativa e quantitativa do sêmen de jundiá, *Rhamdia quelen*. **Boletim do Instituto de Pesca**, São Paulo, v. 27, n. 1, p. 57-60, 2001.

FOGLI DA SILVEIRA, W. et al. Fertilidade do sêmen de truta arco-íris, *Salmo irideus gibbons*, em diferentes concentrações de espermatozoides por óvulo. **Boletim do Instituto de Pesca**, São Paulo, v. 15, n. 1, p. 51-54, 1988.

GABAI, V. L.; SHERMAN, M. Y. Invited review: Interplay between molecular chaperones and signaling pathways in survival of heat shock. **Journal of Applied Physiology**, Bethesda, v. 92, n. 4, p. 1743-1748, 2002.

GADEA, J. et al. Addition of reduced glutathione to freezing medium improved the sperm functionality of thawed boar spermatozoa. **Reproduction, fertility and development**, Perth, v. 17, n. 2, p. 192-193, 2004.

GADEA, J., et al. Cooling and freezing of boar spermatozoa: supplementation of the freezing media with reduced glutathione preserves sperm function. **Journal of andrology**, Lawrence, v. 26, n. 3, p. 396-404, 2005.

GODINHO, H. P. Criopreservação de sêmen de peixes. **Informe agropecuário**, Belo Horizonte, v. 21, n. 203, p. 6-20, 2000.

HAGEDORN, M. et al. Oxidative stress in zebrafish (*Danio rerio*) sperm. **PloS One**, San Francisco, v. 7, n. 6, p. e39397, 2012.

HERNÁNDEZ, C. L. et al. Genetic and morphometric evidence for the recognition of several recently synonymized species of trans-Andean *Rhamdia* (Pisces: Siluriformes: Heptapteridae). **Copeia**, Lawrence, v. 103, n. 3, p. 563-579, 2015.

JOSHI, A. et al. Effect of post-thawing incubation on sperm motility and acrosomal integrity of cryopreserved Garole ram semen. **Small ruminant research**, Amsterdam, v. 56, n. 1, p. 231-238, 2005.

KHLIFAOU, M. et al. Effects of glutamine on post-thaw motility of stallions spermatozoa: an approach of the mechanism of action at spermatozoa level. **Theriogenology**, New York, v. 63, n. 1, p. 138-149, 2005

KLEDMANEE, K. et al. Effect of L-cysteine on chilled carp (*Cyprinus carpio*) semen qualities. **The Thai Journal of Veterinary Medicine, Bangkok**, v. 43, n. 1, p. 91, 2013.

KOPEIKA, J. et al. Detrimental effects of cryopreservation of loach (*Misgurnus fossilis*) sperm on subsequent embryo development are reversed by incubating fertilised eggs in caffeine. **Cryobiology**, Amsterdam, v. 46, n. 1, p. 43-52, 2003.

KRZYZOSIAK, J. et al. Changes in susceptibility of bovine sperm to in situ DNA denaturation during prolonged incubation at ambient temperature under conditions of exposure to reactive oxygen species and nuclease inhibitor. **Reproduction, Fertility and Development**, East Melbourne, v. 12, n. 5-6, p. 251-261, 2001.

KUNDU, C. N.; DAS, K.; MAJUMDER, G. C. Effect of amino acids on goat cauda epididymal sperm cryopreservation using a chemically defined model system. **Cryobiology**, Amsterdam, v. 42, n. 1, p. 21-27, 2001.

KUTLUYER F. et al. Cryopreservation of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* spermatozoa: Effects of extender supplemented with different antioxidants on sperm motility, velocity and fertility. **Cryobiology**, Amsterdam, v. 69, n. 3, p. 462-466, 2014.

LAHNSTEINER F. The role of free amino acids in semen of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* and carp *Cyprinus carpio*. **Journal of Fish Biology**, Oxford, v. 75, n. 4, p. 816-833, 2009.

LAHNSTEINER, F.; MANSOUR, N. A comparative study on antioxidant systems in semen of species of the Percidae, Salmonidae, Cyprinidae, and Lotidae for improving semen storage techniques. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 307, n. 1-2, p. 130-140, 2010.

LAHNSTEINER, F.; MANSOUR, N.; PLAETZER C. Antioxidant systems of brown trout (*Salmo trutta f. fario*) semen. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 119, n. 3-4, p. 314-321, 2010.

LAHNSTEINER, F.; MANSOUR, N.; KUNZ F. A. The effect of antioxidants on the quality of cryopreserved semen in two salmonid fish, the brook trout (*Salvelinus fontinalis*) and the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Theriogenology**, New York, v. 76, n. 5, p. 882-890, 2011.

LINDEBERG, H. et al. Freezing of stallion semen with addition of glycine betaine. **Zentralbl Veterinarmed A**, Berlin, v. 46, n. 2, p. 87-90, 1999.

LUBERDA, Z. The role of glutathione in mammalian gametes. **Reproductive Biology**, Olsztyn, v. 5, n. 1, p. 5-17, 2005.

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

MANSOUR, N.; MCNIVEN M. A.; RICHARDSON G. F. The effect of dietary supplementation with blueberry, α -tocopherol or astaxanthin on oxidative stability of Arctic char (*Salvelinus alpinus*) semen. **Theriogenology**, New York, v. 66, n. 2, p. 373-382, 2006.

MARCHIORO, M. I.; BALDISSEROTTO, B. Sobrevivência de alevinos de jundiá (*Rhamdia quelen* Quoy & Gaimard, 1824) à variação de salinidade da água. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 29, n. 2, p. 315-318, 1999.

MARTÍNEZ-PÁRAMO S. et al. Effect of two sulfur-containing amino acids, taurine and hypotaurine in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) sperm cryopreservation. **Cryobiology**, Amsterdam, v. 66, n. 3, p. 333-338, 2013.

MAZUR, P.; LEIBO, S. P.; SEIDEL JR, G. E. Cryopreservation of the germplasm of animals used in biological and medical research: importance, impact, status, and future directions. **Biology of reproduction**, New York, v. 78, n. 1, p. 2-12, 2008.

MICHAEL, A. J. et al. Effect of antioxidant supplementation in semen extenders on semen quality and reactive oxygen species of chilled canine spermatozoa. **Animal reproduction science**, Amsterdam, v. 112, n. 1-2, p. 119-135, 2009.

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

ÖĞRETMEN, F. et al. Effect of semen extender supplementation with cysteine on postthaw sperm quality, DNA damage, and fertilizing ability in the common carp (*Cyprinus carpio*). **Theriogenology**, New York, v. 83, n. 9, p. 1548-1552, 2015.

OLIVEIRA, R. et al. **Antioxidante na viabilidade do sêmen equino congelado e refrigerado**. 2011. 54 f. Tese (Doutorado em Ciências Agrárias) - Programa de Pós-graduação em Ciência Animal, Escola de Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2011.

PEGG, D. E. Cryopreservation of vascular endothelial cells as isolated cells and as monolayers. **Cryobiology**, Amsterdam, v. 44, n. 1, p. 46-53, 2002.

PEGG, D. E. Principles of cryopreservation. **Cryopreservation and freeze-drying protocols**, Totowa, v. 368, p. 39-57, 2007.

PEÑA, A. I. et al. Proline and glycine betaine in a diluent for freezing canine spermatozoa. **Reproduction in Domestic Animals**, Berlin, v. 33, n. 1, p. 5-9, 1998.

PEÑA, F. J. et al. Mitochondria in mammalian sperm physiology and pathology: a review. **Reproduction in domestic animals**, Berlin, v. 44, n. 2, p. 345-349, 2009.

PERIS, S. I. et al. Cryopreservation of ram semen facilitates sperm DNA damage: relationship between sperm andrological parameters and the sperm chromatin structure assay. **Journal of andrology**, Lawrence, v. 25, n. 2, p. 224-233, 2004.

ROCA, J. et al. Survival and fertility of boar spermatozoa after freeze-thawing in extender supplemented with butylated hydroxytoluene. **Journal of andrology**, Lawrence, v. 25, n. 3, p. 397-405, 2004.

SANCHES, E. A. et al. Temperature and storage period over spermiatic parameters of jundiá, *Rhamdia quelen* (Quoy & Gaimard, 1824). **Aquaculture Research**, Oxford, v. 44, n. 4, p. 534-541, 2013.

SARIÖZKAN, S. et al. The influence of cysteine and taurine on microscopic-oxidative stress parameters and fertilizing ability of bull semen following cryopreservation. **Cryobiology**, Amsterdam, v. 58, n. 2, p. 134-138, 2009.

SAROSIEK, B. et al. Motility parameters of perch spermatozoa (*Perca fluviatilis* L.) during short-term storage with antioxidants addition. **Aquaculture international**, London, v. 22, n. 1, p. 159-165, 2014.

SŁOWIŃSKA, M. et al. Total antioxidant capacity of fish seminal plasma. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 400-401, p. 101-104, 2013.

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

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

SILFVERGRIP A. M. C. **A sistematic revision of the neotropical catfish genus Rhamdia (teleostei, pimelodidae)**. Stockholm: Swedish Museum of natural History Sweden, 1996. 156 p. Thesis, Doctorship in Zoology.

SILVA, E. C. B.; GUERRA, M. M. P. Terapias antioxidantes na criopreservação espermática. **Revista portuguesa de ciências veterinárias**, Lisboa, v. 107, p. 143-149, 2012.

SOUZA, M. F.; TOME, A. R.; RAO, V. S. N. Inhibition by the Bioflavonoid Ternatin of Aflatoxin B1-induced Lipid Peroxidation in Rat Liver. **Journal of pharmacy and pharmacology**, West Sussex, v. 51, n. 2, p. 125-129, 1999.

STEJSKAL, K. et al. Content of cysteine, reduced and oxidized glutathione in spermatozoa of representatives of Acipenseriformes (*Acipenser baerii* and *A. ruthenus*) as well as teleosts (*Perca fluviatilis* and *Sander lucioperca*). **Journal of Applied Ichthyology**, Berlin, v. 24, n. 4, p. 519-521, 2008.

THOMASSEN, R.; FARSTAD, W. Artificial insemination in canids: a useful tool in breeding and conservation. **Theriogenology**, New York, v. 71, n. 1, p. 190-199, 2009.

TIRELLI, M. et al. Cryopreservation of pig granulosa cells: effect of FSH addition to freezing medium. **Domestic animal endocrinology**, Stoneham, v. 28, n. 1, p. 17-33, 2005.

TRIMECHE, A. et al. Effects of glutamine, proline, histidine and betaine on post-thaw motility of stallion spermatozoa. **Theriogenology**, New York, v. 52, n. 1, p. 181-191, 1999.

TUNCER, P. B. et al. The effect of cysteine and glutathione on sperm and oxidative stress parameters of post-thawed bull semen. **Cryobiology**, Amsterdam, v. 61, n. 3, p. 303-307, 2010.

UYSAL, O.; BUCAK, M. N. Effects of oxidized glutathione, bovine serum albumin, cysteine and lycopene on the quality of frozen-thawed ram semen. **Acta Veterinaria Brno**, Brno, Tchechoslovaquia, v. 76, n. 3, p. 383-390, 2007.

VAN OVERVELD, F. W. P. C. et al. Tyrosine as important contributor to the antioxidant capacity of seminal plasma. **Chemical-Biological Interactions**, Limerick, v. 127, n. 2, p. 151–161, 2000.

VIVEIROS, A. T. M.; GODINHO, H. P. Sperm quality and cryopreservation of Brazilian freshwater fish species: a review. **Fish Physiology and Biochemistry**, Dordrecht, v. 35, n. 1, p. 137-150, 2009.

YAVAS, I.; BOZKURT, Y. Effect of different thawing rates on motility and fertilizing capacity of cryopreserved grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) sperm. **Biotechnology & Biotechnological Equipment**, Abingdon, v. 25, n. 1, p. 2254-2257, 2011.

YILDIZ, C.; BOZKURT, Y.; YAVAS, I. An evaluation of soybean lecithin as an alternative to avian egg yolk in the cryopreservation of fish sperm. **Cryobiology**, San Diego, v. 67, n. 1, p. 91-94, 2013.

WANG, X. et al. Alterations in mitochondria membrane potential and oxidative stress in infertile men: a prospective observational study. **Fertility and sterility**, New York, v. 80, suppl. 2, p. 844-850, 2003.

WATSON, P. F. Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function. **Reproduction, Fertility and Development**, East Melbourne, v. 7, n. 4, p. 871-891, 1995.

WATSON, P. F. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. **Animal reproduction science**, Amsterdam, v. 60-61, p. 481-492, 2000.

WOWK, B. Thermodynamic aspects of vitrification. **Cryobiology**, Amsterdam, v. 60, n. 1, p. 11-22, 2010.

ANEXOS

ANEXO 1 - Resultados das análises estatísticas para os parâmetros de motilidade, integridade de membrana, taxa de fertilização e percentual de células normais do sêmen de *Rhamdia quelen* criopreservado em meio contendo diferentes concentrações de cisteína e glutamina, pós descongelamento.

Tratamentos	Variáveis			
	Motilidade	Integridade de membrana	Taxa de fertilização (%)	Morfologia (% de células normais)
Controle	35,00±8,66abc	50,00±10,55	31,67±5,78ab	21,48±0,95ab
2,5C	27,50±4,79abc	49,75±11,09	19,67±1,76ab	17,15±0,77b
5C	25,00±2,89abc	47,25±9,07	28,67±6,57ab	17,61±1,04ab
10C	40,00±4,08ab	36,50±5,84	34,67±3,84a	20,27±0,77ab
20C	8,75±1,25bc	42,75±8,41	22,00±4,62ab	19,2±0,75ab
2,5G	42,50±2,50a	53,75±6,02	27,00±4,73ab	21,59±0,84ab
5G	32,50±7,50abc	42,75±5,22	32,33±5,34ab	34,75±0,87a
2,5C+2,5G	27,50±2,50abc	48,25±6,87	17,67±3,18ab	20,98±0,54ab
5C+2,5G	20,00±4,08abc	45,50±5,36	25,00±3,51ab	17,73±1,06ab
10C+2,5G	21,25±7,18abc	30,25±6,94	16,67±3,53ab	21,3±0,65ab
20C+2,5G	5,00±0,05c	42,75±6,75	24,67±2,91ab	17,85±0,94ab
2,5C+5G	35,00±5,00abc	53,50±10,04	22,33±5,24ab	20,75±0,60ab
5C+5G	27,50±4,79abc	45,75±7,34	28,00±5,20ab	14,2±0,80b
10C+5G	35,00±2,89abc	60,75±12,60	15,33±2,33b	19,43±1,03ab
20C+5G	7,50±1,44b	39,75±9,19	14,33±1,76b	21,77±0,23ab
Valor de P	0,0003*	0,7323*	0,0286**	0,0056*

*Valores de média e erro padrão seguidos de letras diferentes na mesma coluna diferem entre si pela análise não paramétrica de Kruskal-Wallis, seguido do teste de Dunn. **Valores de média e erro padrão seguidos de letras diferentes na mesma coluna diferem entre si pela análise de variância, seguido do teste de Tukey.

ANEXO 2 - Resultados das análises estatísticas para os parâmetros de índice de danos ao DNA pelo ensaio do cometa e análises bioquímicas do sêmen de *Rhamdia quelen* criopreservado em meio contendo diferentes concentrações de cisteína e glutamina, pós descongelamento.

Tratamentos	Variáveis							
	COMETA (% índice de dano)	TBARS (nmol TBARS/mg protein)	SOD (U SOD/mg protein)	CAT (U CAT/mg protein)	GST (U GST/mg protein)	GPx (U GPx/mg protein)	CARBONILAS (umol Carbonyl/mg protein)	SULFIDRILAS (umol SH/mg protein)
Controle	21,5±0,87c	0,036±0,00d	8,78±0,95d	53,53±2,80k	1,62±0,12i	14,86±1,55c	1,13±0,07d	2,79±0,26a
2,5C	36±1,08abc	0,037±0,00cd	11,86±0,21cd	71,08±3,51j	1,97±0,01hi	19,77±0,49c	1,49±0,07cd	1,74±0,07b
5C	31±0,71bc	0,038±0,00bcd	14,86±0,31abcd	89,35±3,28i	2,01±0,02hi	24,41±0,96bc	1,72±0,04bcd	1,96±0,14ab
10C	29,75±3,57bc	0,038±0,00abcd	18,77±0,81abcd	114,4±3,40h	2,09±0,01gh	29,98±0,76abc	1,86±0,01abcd	1,72±0,11b
20C	33±2,48bc	0,039±0,00abcd	23,72±2,53abc	123,5±1,28gh	2,24±0,02fgh	30,88±0,24abc	1,91±0,01abcd	1,58±0,13b
2,5G	43±1,68abc	0,062±0,01abc	26,29±3,22a	131,5±1,56fg	2,43±0,05efg	33,45±0,61abc	1,97±0,01abcd	1,65±0,07b
5G	46,75±1,65abc	0,040±0,00abcd	23,91±3,36ab	140,6±1,54ef	2,58±0,03def	37,40±0,29abc	2,01±0,01abcd	1,64±0,08b
2,5C+2,5G	50,5±4,09abc	0,041±0,00abcd	16,39±2,56abcd	148,8±2,05e	2,69±0,02de	42,75±2,57abc	2,06±0,01abcd	1,59±0,25b
5C+2,5G	55,25±2,21abc	0,054±0,01abcd	11,78±0,96cd	164,1±2,36d	2,88±0,05cd	58,33±1,59abc	2,18±0,04abcd	1,98±0,22ab
10C+2,5G	82,5±4,52abc	0,044±0,00abcd	13,69±1,61bcd	173,3±1,81d	3,14±0,02c	59,58±1,52abc	2,36±0,03abcd	2,16±0,15ab
20C+2,5G	82,25±6,82abc	0,045±0,00abcd	15,61±3,49abcd	190,5±4,65c	3,27±0,04bc	63,62±0,47abc	2,63±0,04abcd	2,44±0,19ab
2,5C+5G	87±2,58abc	0,062±0,00abc	15,99±1,29abcd	207,1±2,62b	3,58±0,06ab	81,35±2,43a	3,28±0,23abc	2,12±0,18ab
5C+5G	101,5±4,52ab	0,057±0,00abcd	19,36±4,63abcd	209,6±4,17b	3,86±0,16a	67,46±2,75abc	3,71±0,12ab	2,86±0,21a
10C+5G	151,5±10,97a	0,068±0,00ab	19,36±3,09abcd	219,8±3,95b	3,62±0,16ab	79,23±1,18ab	3,72±0,08ab	1,73±0,31b
20C+5G	160,5±10,97a	0,078±0,00a	20,22±0,94abcd	262,2±3,50a	3,86±0,16a	85,38±0,26a	3,92±0,01a	1,82±0,24b
Valor de P	<0,0001*	<0,0001*	<0,0001**	<0,0001**	<0,0001**	<0,0001*	<0,0001*	<0,0001**

*Médias e erro padrão seguidos de letras diferentes na mesma coluna diferem entre si pela análise de Kruskal-Wallis, seguido de teste de Dunn. **Médias e erro padrão seguidos de letras diferentes na mesma coluna diferem entre si pela análise de variância (ANOVA), seguido de teste de Tukey.

ANEXO 3 – *Theriogenology* instruções para autores

Introduction

Please consult this Guide for Authors for further details on the requirements for submitting your paper to *Theriogenology*. The guidelines described in this document should be adhered to carefully, to ensure high-quality and rapid publication of your manuscript.

Aims and Scope

Theriogenology is an international, peer-reviewed journal that publishes papers regarding the study of reproduction in domestic and non-domestic mammals, birds, reptiles, and fish. *Theriogenology* publishes only material that has never been previously published and is not currently being considered for publication elsewhere; the exception would be limited disclosure (e.g. publication of an abstract or in the proceedings of a scientific conference, with limited circulation).

Types of Articles

Original Research Papers should report the results of original research. The material should not have been previously published elsewhere, except in a preliminary form.

Review Articles should cover subjects within the scope of the journal that are of active current interest. They are usually invited, but prospective Authors may contact the Editors with proposals.

Letters to the Editor offering comment or useful critique on material published in the journal are welcomed. The decision to publish submitted letters rests purely with the Editors. It is hoped that the publication of such letters will permit an exchange of views which will be of benefit to both the journal and its readers.

Submission

Our online submission system guides you stepwise through the process of entering your article details and uploading your files. The system converts your article files to a single PDF file used in the peer-review process. Editable files (e.g., Word, LaTeX) are required to typeset your article for final publication. All correspondence, including notification of the Editor's decision and requests for revision, is sent by e-mail.

Submit your article

Please submit your article via <http://ees.elsevier.com/therio/>.

Referees

Please submit the names and institutional e-mail addresses of several potential referees. For more details, visit our [Support site](#). Note that the editor retains the sole right to decide whether or not the suggested reviewers are used.

Use of word processing software

It is important that the file be saved in the native format of the word processor used. The text should be in single-column format. Keep the layout of the text as simple as possible. Most formatting codes will be removed and replaced on processing the article. In particular, do not use the word processor's options to justify text or to hyphenate words. However, do use bold face, italics, subscripts, superscripts etc. When preparing tables, if you are using a table grid, use only one grid for each individual table and not a grid for each row. If no grid is used, use

tabs, not spaces, to align columns. The electronic text should be prepared in a way very similar to that of conventional manuscripts (see also the [Guide to Publishing with Elsevier](#)). Note that source files of figures, tables and text graphics will be required whether or not you embed your figures in the text. See also the section on Electronic artwork.

To avoid unnecessary errors you are strongly advised to use the 'spell-check' and 'grammar-check' functions of your word processor.

Pages and lines should be numbered.

Article structure

Subdivision - numbered sections

Divide your article into clearly defined and numbered sections. Subsections should be numbered 1.1 (then 1.1.1, 1.1.2, ...), 1.2, etc. (the abstract is not included in section numbering). Use this numbering also for internal cross-referencing: do not just refer to 'the text'. Any subsection may be given a brief heading. Each heading should appear on its own separate line.

Introduction

State the objectives of the work and provide an adequate background, avoiding a detailed literature survey or a summary of the results.

Material and methods

Provide sufficient details to allow the work to be reproduced by an independent researcher. Methods that are already published should be summarized, and indicated by a reference. If quoting directly from a previously published method, use quotation marks and also cite the source. Any modifications to existing methods should also be described.

Results

Results should be clear and concise.

Discussion

This should explore the significance of the results of the work, not repeat them. A combined Results and Discussion section is often appropriate. Avoid extensive citations and discussion of published literature.

Conclusions

The main conclusions of the study may be presented in a short Conclusions section, which may stand alone or form a subsection of a Discussion or Results and Discussion section.

Essential title page information

- **Title.** Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible.
- **Author names and affiliations.** Please clearly indicate the given name(s) and family name(s) of each author and check that all names are accurately spelled. You can add your name between parentheses in your own script behind the English transliteration. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lower-case superscript letter immediately after the author's name and in front of the appropriate address. Provide the full postal address of each affiliation, including the country name and, if available, the e-mail address of each author.
- **Corresponding author.** Clearly indicate who will handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. This responsibility includes answering any

future queries about Methodology and Materials. **Ensure that the e-mail address is given and that contact details are kept up to date by the corresponding author.**

- **Present/permanent address.** If an author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a 'Present address' (or 'Permanent address') may be indicated as a footnote to that author's name. The address at which the author actually did the work must be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes.

Abstract

A concise and factual abstract is required. The abstract should state briefly the purpose of the research, the principal results and major conclusions. Since an abstract is often presented separately from the article, it must be able to stand alone. For this reason, references should generally be avoided, but if essential, they must be cited in full, without reference to the reference list. Also, non-standard or uncommon abbreviations should be avoided, but if their use is essential, they must be defined at their first mention in the abstract itself. Abstracts must be limited to a single paragraph with no more than 2,500 keystrokes (characters plus spaces).

Keywords

Immediately after the abstract, provide a maximum of 6 keywords, using American spelling and avoiding general and plural terms and multiple concepts (avoid, for example, 'and', 'of'). Be sparing with abbreviations: only abbreviations firmly established in the field may be eligible. These keywords will be used for indexing purposes.

Acknowledgements

Collate acknowledgements in a separate section at the end of the article before the references; therefore, do not include them on the title page, as a footnote to the title, etc.. List individuals who provided help during the research (e.g., providing language help, writing assistance or proof reading the article, etc.), sources of financial support, and donations of products and materials.

Formatting of funding sources

List funding sources in this standard way to facilitate compliance to funder's requirements: Funding: This work was supported by the National Institutes of Health [grant numbers xxxx, yyyy]; the Bill & Melinda Gates Foundation, Seattle, WA [grant number zzzz]; and the United States Institutes of Peace [grant number aaaa].

It is not necessary to include detailed descriptions on the program or type of grants and awards. When funding is from a block grant or other resources available to a university, college, or other research institution, submit the name of the institute or organization that provided the funding. If no funding has been provided for the research, please include the following sentence: This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

Nomenclature and units

Follow internationally accepted rules and conventions: use the international system of units (SI). If other quantities are mentioned, give their equivalent in SI. You are urged to consult [IUB: Biochemical Nomenclature and Related Documents](#) for further information.

Math formulae

Please submit math equations as editable text and not as images. Present simple formulae in line with normal text where possible and use the solidus (/) instead of a horizontal line for small

fractional terms, e.g., X/Y . In principle, variables are to be presented in italics. Powers of e are often more conveniently denoted by \exp . Number consecutively any equations that have to be displayed separately from the text (if referred to explicitly in the text).

Footnotes

Footnotes should be used sparingly. Number them consecutively throughout the article. Many word processors can build footnotes into the text, and this feature may be used. Otherwise, please indicate the position of footnotes in the text and list the footnotes themselves separately at the end of the article. Do not include footnotes in the Reference list.

Artwork

Image manipulation

Whilst it is accepted that authors sometimes need to manipulate images for clarity, manipulation for purposes of deception or fraud will be seen as scientific ethical abuse and will be dealt with accordingly. For graphical images, this journal is applying the following policy: no specific feature within an image may be enhanced, obscured, moved, removed, or introduced. Adjustments of brightness, contrast, or color balance are acceptable if and as long as they do not obscure or eliminate any information present in the original. Nonlinear adjustments (e.g. changes to gamma settings) must be disclosed in the figure legend.

Electronic artwork

General points

- Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork.
- Embed the used fonts if the application provides that option.
- Aim to use the following fonts in your illustrations: Arial, Courier, Times New Roman, Symbol, or use fonts that look similar.
- Number the illustrations according to their sequence in the text.
- Use a logical naming convention for your artwork files.
- Provide captions to illustrations separately.
- Size the illustrations close to the desired dimensions of the published version.
- Submit each illustration as a separate file.

A detailed [guide on electronic artwork](#) is available.

You are urged to visit this site; some excerpts from the detailed information are given here.

Formats

If your electronic artwork is created in a Microsoft Office application (Word, PowerPoint, Excel) then please supply 'as is' in the native document format.

Regardless of the application used other than Microsoft Office, when your electronic artwork is finalized, please 'Save as' or convert the images to one of the following formats (note the resolution requirements for line drawings, halftones, and line/halftone combinations given below):

EPS (or PDF): Vector drawings, embed all used fonts.

TIFF (or JPEG): Color or grayscale photographs (halftones), keep to a minimum of 300 dpi.

TIFF (or JPEG): Bitmapped (pure black & white pixels) line drawings, keep to a minimum of 1000 dpi.

TIFF (or JPEG): Combinations bitmapped line/half-tone (color or grayscale), keep to a minimum of 500 dpi.

Please do not:

- Supply files that are optimized for screen use (e.g., GIF, BMP, PICT, WPG); these typically have a low number of pixels and limited set of colors;

- Supply files that are too low in resolution;
- Submit graphics that are disproportionately large for the content.

Color artwork

Please make sure that artwork files are in an acceptable format (TIFF (or JPEG), EPS (or PDF), or MS Office files) and with the correct resolution. If, together with your accepted article, you submit usable color figures then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in color online (e.g., ScienceDirect and other sites) regardless of whether or not these illustrations are reproduced in color in the printed version. **For color reproduction in print, you will receive information regarding the costs from Elsevier after receipt of your accepted article.** Please indicate your preference for color: in print or online only. [Further information on the preparation of electronic artwork.](#)

Figure captions

Ensure that each illustration has a caption. Supply captions separately, not attached to the figure. A caption should comprise a brief title (**not** on the figure itself) and a description of the illustration. Keep text in the illustrations themselves to a minimum but explain all symbols and abbreviations used.

Text graphics

Text graphics may be embedded in the text at the appropriate position. If you are working with LaTeX and have such features embedded in the text, these can be left. See further under Electronic artwork.

Tables

Please submit tables as editable text and not as images. Tables can be placed either next to the relevant text in the article, or on separate page(s) at the end. Number tables consecutively in accordance with their appearance in the text and place any table notes below the table body. Be sparing in the use of tables and ensure that the data presented in them do not duplicate results described elsewhere in the article. Please avoid using vertical rules and shading in table cells.

References

Citation in text

Please ensure that every reference cited in the text is also present in the reference list (and vice versa). Any references cited in the abstract must be given in full. Unpublished results and personal communications are not recommended in the reference list, but may be mentioned in the text. If these references are included in the reference list they should follow the standard reference style of the journal and should include a substitution of the publication date with either 'Unpublished results' or 'Personal communication'. Citation of a reference as 'in press' implies that the item has been accepted for publication.

Web references

As a minimum, the full URL should be given and the date when the reference was last accessed. Any further information, if known (DOI, author names, dates, reference to a source publication, etc.), should also be given. Web references can be listed separately (e.g., after the reference list) under a different heading if desired, or can be included in the reference list.

Data references

This journal encourages you to cite underlying or relevant datasets in your manuscript by citing

them in your text and including a data reference in your Reference List. Data references should include the following elements: author name(s), dataset title, data repository, version (where available), year, and global persistent identifier. Add [dataset] immediately before the reference so we can properly identify it as a data reference. The [dataset] identifier will not appear in your published article.

References in a special issue

Please ensure that the words 'this issue' are added to any references in the list (and any citations in the text) to other articles in the same Special Issue.

Reference management software

Most Elsevier journals have their reference template available in many of the most popular reference management software products. These include all products that support Citation Style Language styles, such as Mendeley and Zotero, as well as EndNote. Using the word processor plug-ins from these products, authors only need to select the appropriate journal template when preparing their article, after which citations and bibliographies will be automatically formatted in the journal's style. If no template is yet available for this journal, please follow the format of the sample references and citations as shown in this Guide.

Users of Mendeley Desktop can easily install the reference style for this journal by clicking the following link:

<http://open.mendeley.com/use-citation-style/theriogenology>

When preparing your manuscript, you will then be able to select this style using the Mendeley plug-ins for Microsoft Word or LibreOffice.

Reference style

Text: Indicate references by number(s) in square brackets in line with the text. The actual authors can be referred to, but the reference number(s) must always be given.

List: Number the references (numbers in square brackets) in the list in the order in which they appear in the text.

Examples:

Reference to a journal publication:

[1] Van der Geer J, Hanraads JAJ, Lupton RA. The art of writing a scientific article. *J Sci Commun* 2010;163:51–9.

Reference to a book:

[2] Strunk Jr W, White EB. *The elements of style*. 4th ed. New York: Longman; 2000.

Reference to a chapter in an edited book:

[3] Mettam GR, Adams LB. How to prepare an electronic version of your article. In: Jones BS, Smith RZ, editors. *Introduction to the electronic age*, New York: E-Publishing Inc; 2009, p. 281–304.

Reference to a website:

[4] Cancer Research UK. *Cancer statistics reports for the UK*, <http://www.cancerresearchuk.org/aboutcancer/statistics/cancerstatsreport/>; 2003 [accessed 13 March 2003].

Reference to a dataset:

[dataset] [5] Oguro M, Imahiro S, Saito S, Nakashizuka T. Mortality data for Japanese oak wilt disease and surrounding forest compositions, Mendeley Data, v1; 2015.

<https://doi.org/10.17632/xwj98nb39r.1>.

Note shortened form for last page number. e.g., 51–9, and that for more than 6 authors the first 6 should be listed followed by 'et al.' For further details you are referred to 'Uniform Requirements for Manuscripts submitted to Biomedical Journals' (*J Am Med Assoc*

1997;277:927–34) (see also [Samples of Formatted References](#)).

Journal Abbreviation Source

Journal names should be abbreviated according to Index Medicus journal abbreviations: <http://www.nlm.nih.gov/tsd/serials/lji.html>; List of serial title word abbreviations: <http://www.issn.org/2-22661-LTWA-online.php>; CAS (Chemical Abstracts Service): <http://www.cas.org/sent.html>

Supplementary material

Supplementary material such as applications, images and sound clips, can be published with your article to enhance it. Submitted supplementary items are published exactly as they are received (Excel or PowerPoint files will appear as such online). Please submit your material together with the article and supply a concise, descriptive caption for each supplementary file. If you wish to make changes to supplementary material during any stage of the process, please make sure to provide an updated file. Do not annotate any corrections on a previous version. Please switch off the 'Track Changes' option in Microsoft Office files as these will appear in the published version.

Additional Style Notes

Please use the following words, phrases, abbreviations, and stylistic conventions

- Avoid the word "injected," (e.g., "Cows were injected with cloprostenol") but include the generic name, proprietary name, dosage and route of administration (e.g., "Cows were treated with cloprostenol [Estrumate 500 µg im]").
- Either cite a P value (recommended for Abstract and for Results) or use the term 'significant' (recommended for Discussion), but generally avoid doing both.
- Terms with a specific statistical meaning (i.e. significant, tended and correlated), should only be used in a strict statistical context.
- Numbers less than 10 are written as a word, unless followed by an abbreviation for unit of measure, e.g. five embryos, 5 min

Use the following expressions

- transrectal palpation, not rectal palpation
- nucleus transfer, not nuclear transplant
- estrus (noun) synchronization, but, estrous (adjective) behavior
- sperm can be used as both noun and adjective
- 120 to 125, not 120-125
- treatment by period, not treatment X period
- gravity: 100 X g (in lieu of speed for centrifugation)
- magnification: X 100
- identification number of an animal: No. 10, but 30 animals: n = 30
- 3 d, Day 3 (define Day 0)

Abbreviations

Never use an abbreviation to start a sentence. Some abbreviations may be used anywhere else, including the manuscript's title and in figures, table titles and legends, without definition; others may not be used in the title, but may be used in the text without definition. In general, abbreviations must be defined when used for the first time (this may be avoided in the ABSTRACT if necessary to conserve space). To make reading the paper more pleasant, avoid using excessive abbreviations and acronyms; instead use short synonyms, for instance: for "Cesarean section" instead of "CS" use "section" or "hysterotomy."

The following abbreviations may be used in the text without definition (note that abbreviations exclude periods):

Units of Measure

cpm - counts per min
dpm - disintegrations per min
g - gram
ga - gauge of hypodermic needle
h - hour
kg - kilogram
L - liter
mL - milliliter
 μ L - microliter
m - meter
min - minute
mo - month
s - second
v:v - volume ratio
wk - week
wt/vol - weight per volume
y - year

Routes of treatment

id - intradermal
im - intramuscular
iu - intrauterine
iv - intravenous
sc - subcutaneous
po - oral

Statistical expressions

ANOVA - analysis of variance
CV - coefficient of variation
df - degrees of freedom
F - variance ratio
NS - not significant
P - probability
SD - standard deviation
SEM - standard error of the mean
r - correlation coefficient
 r^2 - coefficient of regression

VITA

Bruna Bitencourt da Costa, nascida no dia 06 de novembro de 1988, na cidade de Porto Alegre, filha de Telmo Dornelles da Costa e Solange Bitencourt da Costa. Coursou ensino no Colégio Cruzeiro do Sul e médio no Colégio Marista Assunção, em Porto Alegre, concluindo seus estudos em 2005. Ingressou no curso de Administração, da Universidade Estadual do Rio Grande do Sul em 2006, que cursou até 2008. Em 2007 ingressou no curso de Física (Licenciatura), da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, até 2008. Ingressou no curso de Agronomia, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul em 2010, onde estagiou nas áreas de nutrição animal, fitotecnia, biologia molecular e aquicultura; concluindo o curso em 2015. No ano seguinte ingressou no curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, sob orientação do Prof. Danilo Pedro Streit Jr., obtendo bolsa de estudos do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq.