

MARCO AURÉLIO SCHIAVO NOVAES

**DIETA E ORDEM DE EJACULAÇÃO NA QUALIDADE SEMINAL DO
MACHO CAPRINO E POTENCIAL USO DO HOMEOPÁTICO *ARNICA
MONTANA* NA MATURAÇÃO *IN VITRO* DE OÓCITOS BOVINOS**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2019

**Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa**

T

N935d
2019
Novaes, Marco Aurélio Schiavo, 1990-
Dieta e ordem de ejaculação na qualidade seminal do macho caprino e potencial uso do homeopático *Arnica montana* na maturação *in vitro* de oócitos bovinos / Marco Aurélio Schiavo Novaes. – Viçosa, MG, 2019.
xvii, 110 f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Inclui apêndice.

Orientador: Ciro Alexandre Alves Torres.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.

Inclui bibliografia.

1. Sêmen - Qualidade. 2. Sêmen - Criopreservação.
3. Caprinos - Inseminação artificial. 4. Homeopatia.
I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Zootecnia.
Programa de Pós-Graduação em Zootecnia. II. Título.

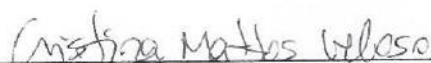
CDD 22. ed. 636.390824

MARCO AURÉLIO SCHIAVO NOVAES

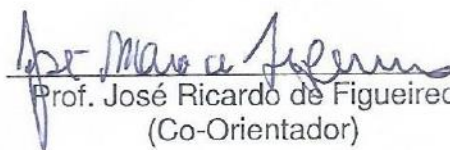
**DIETA E ORDEM DE EJACULAÇÃO NA QUALIDADE SEMINAL DO
MACHO CAPRINO E POTENCIAL USO DO HOMEOPÁTICO *ARNICA
MONTANA* NA MATURAÇÃO *IN VITRO* DE OÓCITOS BOVINOS**

Tese apresentada à
Universidade Federal de Viçosa,
como parte das exigências do
Programa de Pós-Graduação em
Zootecnia, para obtenção do título de
Doctor Scientiae.

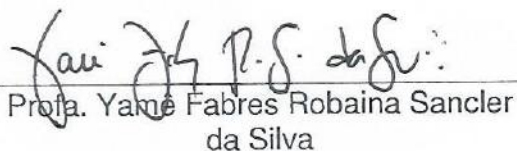
APROVADA: 23 de janeiro de 2019.



Prof. Cristina Mattos Veloso
(Co-Orientador)



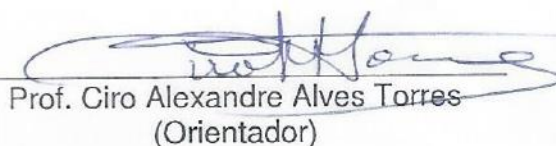
Prof. José Ricardo de Figueiredo
(Co-Orientador)



Prof. Yamé Fabres Robaina Sancler
da Silva



Prof. José Domingos Guimarães



Prof. Ciro Alexandre Alves Torres
(Orientador)

A Deus, pela benção da vida e por ter me permitido vivenciar tantas experiências incríveis e trilhar esse caminho até aqui. Por ser um Pai generoso e próspero, me ensinando mais e mais a cada dia.

Aos meus pais, por todosuporte e apoio, por todo amor e aprendizado.

Jamais duvidem: vocês são a razão de tudo isso!

À Espiritualidade, por não me desassistir nunca. Pelas inúmeras demonstrações de cuidado, por todos os incentivos e horas de trabalho.

Aos meus colegas de trabalho, por me ensinar tanto e preencher as lacunas da minha ignorância. Eterna gratidão.

Aos muitos amigos de caminhada, pelos anos de parceria e companheirismo.

Sem vocês nada disso seria possível.

À música, por ter sido uma fiel companheira de jornada nos momentos alegres e tristes. Esse presente abençoado que a vida me deu e que me abriu tantas portas.

Ao meu irmão Léo (*in memoriam*), por ser meu anjo em tantos momentos de luta e aflição, e também companheiro em tantos sorrisos e vitórias. Nosso amor jamais deixará de ser. Saudades.

Dedico.

“São as nossas escolhas, mais do que as nossas capacidades, que mostram quem realmente somos.” (Alvo Dumbledore)

“Hoje, é possível que a tempestade te amarfanhe o coração e te atormente o ideal, aguilhoando-te com a aflição ou ameaçando-te com a morte... Não te esqueças, porém, de que amanhã será outro dia.” (Meimei)

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Viçosa, por minha formação acadêmica, e em especial ao Departamento de Zootecnia, pela oportunidade de realização deste curso.

Ao professor Ciro Alexandre Alves Torres, pela orientação desse doutorado e pelo aprendizado.

À professora Cristina Mattos Veloso, pela coorientação e colaboração na realização dos experimentos de Viçosa e redação do primeiro artigo. Ainda, pela torcida e apoio.

À Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Zootecnia, Professor Edenio Detmann, pelos ensinamentos, confiança e por acompanhar meu desenvolvimento acadêmico.

À Fernanda Vieira, secretária do Curso de Pós-Graduação em Zootecnia, por tantas vezes me auxiliar com boa vontade e profissionalismo com planos de estudo, prazos e questões administrativas.

Ao Departamento de Zootecnia, setores e laboratórios, estruturas que me permitiram adquirir e praticar conhecimentos e técnicas, desenvolver pesquisa e me profissionalizar. Ainda, aos professores, funcionários e colegas, pelo aprendizado, conviência e desenvolvimento acadêmico.

Ao prof. Marcelo Teixeira Rodrigues, chefe do Setor de Caprinocultura, por autorizar a condução de três experimentos, dos quais dois compõem essa tese.

Ao Setor de Caprinocultura da UFV, suas instalações e funcionários, por tornar possível a condução da etapa experimental da maior parte da pesquisa desenvolvida neste doutorado.

À professora Luciana Navajas Rennó, pelas instruções e pela condução das análises de sangue e urina no Laboratório de Fisiologia e Reprodução Animal do DZO/UFV. Ainda, ao funcionário Mário pela colaboração.

À professora Mariana Machado Neves, do DBG/UFV, pelo conhecimento transmitido, apoio e instruções na condução da análise histológica e de marcadores de estresse oxidativo no tecido. Ainda, pelo auxílio e recomendações na redação do Artigo I.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa de estudo no programa de pós-graduação e da bolsa de doutorado-sanduíche no país (SWP) em Fortaleza-CE.

Ao Laboratório de Manipulação de Oócitos e Folículos Ovarianos Pré-antrais (LAMOFOPA), onde realizei o doutorado-sanduíche, todos os alunos e funcionários. Em especial, ao prof. José Ricardo de Figueiredo, coordenador geral do LAMOFOPA, pela oportunidade e pela orientação local. Também, à equipe que me auxiliou: Laritza, Naíza, Anna Clara e Victor.

À Universidade Estadual do Ceará (UECE, Fortaleza-CE), pelo apoio e suporte ao doutorado-sanduíche.

A Juliano Franco de Souza, proprietário da empresa Brio Embryo, em Araguaína-TO, por permitir a realização dos experimentos realizados em doutorado-sanduíche nas dependências do laboratório. Ainda, à Myrian, técnica da Brio Embryo, que auxiliou com dedicação e boa vontade na condução da etapa experimental deste projeto.

Aos professores Yamê Fabres Robaina Sancler da Silva (DZO/UFV), José Domingos Guimarães (DVT/UFV) e Giancarlo Magalhães dos Santos (UNIVIÇOSA), pelas sugestões, ensinamentos, prestatividade e por terem aceitado compor as bancas examinadoras da qualificação ou da defesa de tese.

Aos meus amigos e parceiros da mais prestativa e dedicada equipe de trabalho que participei em Viçosa: Domingos Lollobrigida, Victor Hugo Rabelo, João Vitor Lovatti, Palloma Porto, Giulia Berzoini e Joana Diniz, por toda colaboração e empenho na condução dos experimentos e nas diversas análises laboratoriais. Gratidão! Espero ter contribuído com a formação de vocês na mesma medida com que vocês colaboraram comigo.

Ainda, aos demais que colaboraram com a etapa de campo dos experimentos de Viçosa: Igor Strelow, Carlos Thiago, Elaine, Raquel, Fernando (colombiano), Mariana e Júlio. Vocês foram mãos fundamentais para a boa condução dos projetos. Agradeço-os profundamente!

Aos meus amigos-irmãos da República Two and a Half Men: Raíssa, Pedro, Carol, Leonel, Alexia, Allie e Dora. Mais do que amigos, vocês são

uma segunda família pra mim, me apoiando e motivando ao longo de todo o doutorado. Gratidão!

Ao Coral da UFV, amigos e ao maestro Ciro Tabet pelos anos de vivência do canto coral, apresentações semestrais, shows e cantatas de Natal. A música foi, todo o tempo, um alento aos desafios do caminho.

Aos meus amigos de Viçosa: Bia Ribeiro, Igor Tupy, R. Will, Gabi, Gercino, Léo Volpato, Carol Brás, Adriana, Cássia, e todos os outros que amo e levo comigo no coração. O apoio de vocês fez toda diferença!

Ao movimento espírita de Viçosa e demais cidades, pelos anos de trabalho e luta, pela vivência digna e intensa da nossa crença. Em especial, aos amigos que fiz na jornada, que tanto me ensinaram e auxiliaram. Que Deus retribua cada gesto de carinho e auxílio de vocês comigo.

Ao Grupo de Arte Espírita Transformai, pela maravilhosa e encantadora expressão de arte com a nobre finalidade de sensibilizar e evangelizar.

À Casa do Caminho, em especial às crianças do projeto Sementes do Amanhã, pela imersão no universo infantil e por todo aprendizado decorrente dessa vivência tão transformadora.

Aos amigos de Fortaleza: Fred, Rafa, Isabela, Davi, Heline, Yago, Gustavo, Andreza, Norma, Ana Flávia, Gildas, Gabriel, Antônio Layton, Arthur, Juliana Marinho, Lia, Manu e todos os demais que me acolheram e auxiliaram na minha estadia em Fortaleza. Obrigado por todo apoio!

A Viçosa, por ter sido um lar para mim.

Enfim, a todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram com a minha formação e auxiliaram para que este doutorado fosse possível.

Muito obrigado!

BIOGRAFIA

MARCO AURÉLIO SCHIAVO NOVAES, filho de Manoel Domingues Novaes Neto e Maris Stella Schiavo Novaes, nasceu em 14 de novembro de 1990, em Marabá, Pará.

Em maio de 2013, concluiu o curso de graduação em Zootecnia na Universidade Federal de Viçosa.

Em fevereiro de 2015, obteve o título de Mestre em Zootecnia, na área de concentração em Fisiologia da Produção Animal, no curso de Pós-graduação *Stricto Sensu*, do Departamento de Zootecnia da Universidade Federal de Viçosa, sob orientação da Dra. Cristina Mattos Veloso.

De junho de 2017 a dezembro de 2018, realizou Estágio de Doutorado-Sanduíche, no Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias da Universidade Estadual do Ceará, sob orientação do Dr. José Ricardo de Figueiredo, concentrando seus estudos na área de Maturação Oocitária e Produção *In vitro* de Embriões.

Em janeiro de 2019, obteve o título de Doutor em Zootecnia, na área de concentração em Fisiologia e Reprodução Animal, no curso de Pós-Graduação *Stricto Sensu*, do Departamento de Zootecnia da Universidade Federal de Viçosa.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Spermatozoa populations analyzed by flow cytometry for plasma membrane integrity, acrosomal membrane integrity, hydrogen peroxide presence and lipid peroxidation	60
Figura 2 - Luminal diameter (a), epithelium height (b) and seminiferous tubule diameter (c) by diet supply.....	61
Figura 3 - Reaction time of young Alpine bucks by diet supply	62
Figura 4 - Intracellular hydrogen peroxide presence, acrosomal membrane integrity and membrane lipid peroxidation of the semen of young Alpine bucks fed two different diet supply by flow cytometry.....	63
Figura 1 - Spermatozoa populations analyzed by flow cytometry for plasma membrane integrity, acrosomal membrane integrity, hydrogen peroxide presence, and lipid peroxidation	86
Figura 1 - Representação esquemática dos experimentos Ae B	91

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Composition of experimental diet by natural matter.....	52
Tabela 2 - Mean and standard error of the mean of intake and digestibility of young Alpine bucks fed with a standard diet.....	53
Tabela 3 - Mean and standard error of the mean of the body condition score and blood parameters of young Alpine bucks by diet supply.....	54
Tabela 4 - Mean and standard error of the mean of the testicular measures and sexual behaviour of young Alpine bucks by diet supply.....	55
Tabela 5 - Mean and standard error of the mean of reactive oxygen species, carbonylated protein and malondialdehyde, and total testis and histomorphometry of seminiferous tubules in testis of young goats of the Alpine buck by diet supply.....	56
Tabela 6 - Mean and standard error of the mean of the seminal parameters of young Alpine bucks by diet supply	57
Tabela 7 - Mean and standard error of the mean of the sperm motility and vigor by thermoresistance test of young Alpine bucks by diet supply	58
Tabela 8 - Mean and standard error of the mean of the sperm count in hyposmotic medium and major, minor and total sperm defects of young Alpine bucks by diet supply.....	59
Tabela 1 - Composition of experimental diet by natural matter	80
Tabela 2 - Mean \pm SEM of the macro and microscopic evaluations of first and second ejaculates of young Alpine bucks	81
Tabela 3 - Mean \pm SEM of the thermoresistance test in the first and second ejaculates of young Alpine bucks	82
Tabela 4 - Mean \pm SEM of the spermatozoa count in hyposmotic medium in the first and second ejaculates of young Alpine bucks	83
Tabela 5 - Mean \pm SEM of the major, minor and total spermatozoa defects in the first and second ejaculates of young Alpine bucks	84
Tabela 6 - Mean \pm SEM of the fluorescent probes in the first and second	

ejaculates of young Alpine bucks by flow cytometry	85
Tabela 1 - Efeito da adição de álcool e <i>Arnica montana</i> homeopática no meio de maturação <i>in vitro</i> na configuração da cromatina de oócitos bovinos e espécies reativas de oxigênio do meio de maturação.....	106
Tabela 2 - Efeito da adição de álcool e <i>Arnica montana</i> homeopática no meio de maturação <i>in vitro</i> na taxa de clivagem, de formação de embriões no 7° dia de cultivo e total de blastômeros.....	106
Tabela 3 - Efeito da adição de álcool e <i>Arnica montana</i> homeopática no meio de maturação <i>in vitro</i> sob estresse térmico na configuração da cromatina de oócitos bovinos e espécies reativas de oxigênio do meio de maturação.....	107
Tabela 4 - Efeito da adição de álcool e <i>Arnica montana</i> homeopática no meio de maturação <i>in vitro</i> sob estresse térmico na taxa de clivagem, de formação de embriões no 7° dia de cultivo e total de blastômeros.....	107
Tabela 5 - Efeito da adição de álcool e <i>Arnica montana</i> homeopática no meio de maturação <i>in vitro</i> sob estresse térmico na classificação embrionária no 7° dia de cultivo.....	108

SUMÁRIO

RESUMO.....	xiv
ABSTRACT.....	xvi
INTRODUÇÃO GERAL.....	1
REFERÊNCIAS.....	4
REVISÃO DE LITERATURA.....	8
O MACHO REPRODUTOR.....	8
<i>Anatomia do sistema reprodutor do macho.....</i>	8
<i>Aspectos da fisiologia do macho.....</i>	8
<i>Nutrição.....</i>	9
<i>Condição corporal.....</i>	10
<i>Comportamental sexual.....</i>	11
<i>Repouso sexual.....</i>	11
<i>Biometria testicular.....</i>	12
AVALIAÇÃO DO SÊMEN.....	13
<i>A célula espermática.....</i>	13
<i>Avaliação macroscópica do sêmen.....</i>	13
<i>Avaliação microscópica do sêmen.....</i>	14
<i>Termoresistência.....</i>	15
<i>Teste hisposmótico.....</i>	15
<i>Morfologia espermática.....</i>	16
<i>Citometria de fluxo.....</i>	17
<i>Criopreservação espermática.....</i>	18
PRODUÇÃO <i>IN VITRO</i> DE EMBRIÕES.....	20
<i>Produção de embriões e maturação <u>in vitro</u>.....</i>	20
<i>Estresse térmico na maturação <u>in vitro</u>.....</i>	21
HOMEOPATIA E REPRODUÇÃO ANIMAL.....	22
REFERÊNCIAS	24
Capítulo I (Artigo Científico 1) – Can maintenance intake reduce	

production costs without compromising the reproductive performance of bucks?.....	34
ABSTRACT.....	34
INTRODUCTION.....	35
MATERIALS AND METHODS.....	36
RESULTS.....	42
DISCUSSION.....	44
CONCLUSION.....	47
ACKNOWLEDGEMENTS.....	47
REFERENCES.....	47
SUPPLEMENTS.....	52
Capítulo II (Artigo Científico 2) – Quality of first and second cryopreserved ejaculates collected from young Alpine bucks.....	64
ABSTRACT.....	64
INTRODUCTION.....	65
MATERIALS AND METHODS.....	65
RESULTS.....	70
DISCUSSION.....	71
CONCLUSION.....	74
REFERENCES.....	74
ACKNOWLEDGEMENTS.....	79
SUPPLEMENTS.....	80
Capítulo III – Adição de <i>Arnica montana</i> homeopática (6 CH) ao meio de maturação <i>in vitro</i> de oócitos bovinos submetidos ou não ao estresse térmico.....	87
RESUMO.....	87
ABSTRACT.....	88
INTRODUÇÃO.....	88
MATERIAL E MÉTODOS.....	90
RESULTADOS.....	95
DISCUSSÃO.....	96
CONCLUSÃO.....	98
REFERÊNCIAS.....	99

TABELAS.....	106
APÊNDICE.....	109

RESUMO

NOVAES, Marco Aurélio Schiavo, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, janeiro de 2019. **Dieta e ordem de ejaculação na qualidade seminal do macho caprino e potencial uso do homeopático *Arnica montana* na maturação *in vitro* de oócitos bovinos.** Orientador: Ciro Alexandre Alves Torres. Coorientadores: Cristina Mattos Veloso e José Domingos Guimarães.

Foram realizados três experimentos, independentes entre si, com vistas a estudar temas associados à eficiência reprodutiva de caprinos e bovinos. Foram objetivos, respectivamente: 1) estudar o efeito da oferta de uma dieta em nível de manutenção, em comparação com a ingestão *ad libitum*, sobre o comportamento sexual e a qualidade seminal do sêmen criopreservado de machos caprinos; 2) comparar a qualidade seminal do primeiro e do segundo ejaculados de machos caprinos do sêmen fresco e criopreservado; e, 3) a adição do homeopático *Arnica montana* 6 CH ao meio de maturação de oócitos bovinos submetidos ou não ao estresse térmico. No primeiro experimento, foi fornecida uma mesma dieta padrão em manutenção (n = 5) e *ad libitum* (n = 5) a dez bodes jovens da raça Alpina. Foram avaliados parâmetros nutricionais, fisiológicos, biométricos, histológicos e espermáticos pós-descongelação. Nesse estudo, o fornecimento da dieta em manutenção resultou em menor (p < 0,05) escore corporal, volume espermático e circunferência testicular e aumento (p < 0,05) do número de defeitos espermáticos menores e totais. Entretanto, não houve diferença entre os tratamentos (p > 0,05) quanto à síntese de testosterona, comportamento sexual, marcadores de estresse oxidativo no testículo, turbilhonamento, motilidade, vigor, concentração espermática, integridade funcional da membrana plasmática, termorresistência, integridade das membranas plasmática e acrossomal, presença de espécies reativas de oxigênio (ERO) e peroxidação lipídica da membrana plasmática. Portanto, o fornecimento da dieta em manutenção não compromete a capacidade reprodutiva de caprinos jovens, podendo, ainda, reduzir custos de produção. No segundo experimento, foram comparadas as qualidades seminais do primeiro e segundo ejaculados frescos e congelados de machos caprinos jovens por citometria de fluxo. O primeiro ejaculado apresentou maior

porcentagem ($p < 0,05$) de defeitos menores e totais no sêmen fresco e pós-descongelamento. Entretanto, os tratamentos não diferiram ($p > 0,05$) quanto à cor, aspecto, volume, turbilhonamento, motilidade, vigor, concentração espermática, termoresistência, reatividade no meio hiposmótico, integridade das membranas plasmática e acrossomal, presença de ERO e peroxidação lipídica da membrana plasmática. Entretanto, apesar de demonstrarem qualidade seminal similar, os ejaculados apresentaram diferenças quanto aos fatores que comprometem a viabilidade espermática pós-congelamento. No terceiro experimento, foi avaliado o efeito da adição do homeopático *Arnica montana* ao meio de maturação *in vitro* (MIV) de oócitos bovinos submetidos ou não ao estresse por calor (EC). O experimento foi dividido em duas etapas: com ou sem EC. O controle (sem estresse) consistiu em maturação a 38,5 °C por 24 h, enquanto no EC a maturação foi procedida a 41 °C por 12 h seguidas de 12 h a 38,5 °C. Exceto pelo tratamento controle, em ambas as condições foram adicionados aos meios de MIV álcool (veículo homeopático, 30 % v/v) ou *Arnica montana* homeopática 6 CH. Foram avaliados presença de ROS nos meios de MIV, configuração da cromatina dos oócitos, taxas de clivagem e formação de embriões no sétimo dia de cultivo (D7), classificação embrionária e total de células nos blastocistos. Na maturação na ausência do EC, a *Arnica montana* 6 CH reduziu ($p < 0,05$) as taxas de clivagem e blastocistos em D7 em relação aos demais tratamentos. Contudo, na presença do EC, o tratamento *Arnica montana* 6 CH apresentou a maior ($p < 0,05$) contagem de blastômeros dentre todos os tratamentos. O EC resultou em menores taxas de embriões em D7 e blastocistos expandidos que os demais tratamentos ($p < 0,05$). Portanto, a homeopatia apresentou resposta diferente quando aplicado ou não o estresse térmico, sendo prejudicial à maturação oocitária e ao desenvolvimento embrionário na ausência do estresse, mas benéfica na presença do EC, demonstrando, assim, potencial termoprotetor na MIV de oócitos bovinos.

ABSTRACT

NOVAES, Marco Aurélio Schiavo, D.Sc., Universidade Federal Viçosa, January, 2019. **Effect of nutritional level and ejaculation order on the reproductive efficiency of male goats and the potential use of *Arnica montana* homeopathy on the *in vitro* maturation of bovine oocyte.** Advisor: Ciro Alexandre Alves Torres. Co-Advisors: Cristina Mattos Veloso and José Domingos Guimarães.

Three independent experiments were carried out to study the reproductive efficiency of goats and cattle. The objectives were, respectively: 1) to study the effect of maintenance diet versus an *ad libitum* intake diet, on the sexual behavior and seminal quality of bucks; 2) to compare the seminal quality of the first and second ejaculates of bucks; and, 3) the addition of homeopathic *Arnica montana* 6 CH to the maturation medium of bovine oocytes submitted or not to heat stress. In the first experiment, the same standard diet was given in maintenance and *ad libitum* diet to ten young bucks. Nutritional, physiological, biometric, histological and sperm parameters after thawing were evaluated. In this study, the maintenance diet supply resulted in a lower ($p < 0.05$) body score, seminal volume and testicular circumference, and an increase ($p < 0.05$) in the number of minor and total sperm defects. However, there was no difference between the treatments ($p > 0.05$) for testosterone synthesis, sexual behavior, oxidative stress markers in the testis, gross motility, sperm motility, sperm vigor, sperm concentration, reactivity to hyposmotic medium, thermoresistance, plasma and acrosomal membrane integrity, reactive oxygen species (ROS) presence and lipid peroxidation of the plasma membrane. Therefore, the maintenance diet supply does not compromise the reproductive capacity of bucks, and can also reduce production costs. The writing and formatting of this article were done according to the standards of the Animal Reproduction Science Journal, for which it will be submitted. In the second experiment, the seminal qualities of the fresh and frozen ejaculates of young bucks were compared by flow cytometry. The first ejaculate presented a higher percentage ($p < 0.05$) of minor and total defects in fresh and post-thawed semen. However, treatments did not differ ($p > 0.05$) regarding color, appearance, seminal volume, gross motility, sperm motility, sperm vigor, sperm concentration,

thermoreistance, reactivity to hyposmotic medium, plasma and acrosomal membranes integrity, reactive oxygen species (ROS) presence and lipid peroxidation of the plasma membrane. However, despite showing similar seminal quality, the ejaculates presented differences by the factors that compromise the post-freezing sperm viability. The writing and formatting of this article were done according to the standards of the Animal Reproduction Journal, for which it will be submitted. The third experiment was evaluated the effect of homeopathic *Arnica montana* addition to maturation medium *in vitro* (IVM) of bovine oocytes submitted to heat stress (HS) or not. The experiment was divided into two stages: with or without HS. The control (without HS) consisted of maturation at 38.5 °C for 24 h, while the HS maturation was proceeded at 41 °C for 12 h followed by 12 h at 38.5 °C. Except for the control treatment, in both conditions the IVM medium were supplemented with alcohol (homeopathic vehicle, 30 % v/v) or homeopathic *Arnica montana* 6 CH. The presence of ROS in the IMV medium, oocyte chromatin configuration, the rates of cleavage and embryo formation on the seventh day of culture (D7), embryonic classification and total cells in blastocysts were evaluated. During maturation in the absence of HS, the *Arnica montana* 6 CH reduced ($p < 0.05$) the rates of cleavage and blastocysts in D7 in relation to the other treatment. However, in the presence of HS, *Arnica montana* 6 CH presented the highest ($p < 0.05$) blastomere count among all treatments. The HS resulted in lower embryo rates in D7 and expanded blastocysts than the other treatment ($p < 0.05$). Therefore, homeopathy presented a different response whensubmitted or not to HS, being detrimental to oocyte maturation and embryonic development in the absence of stress, but beneficial in the presence of HS, demonstrating thermoprotective potential in IVM of bovine oocytes.

INTRODUÇÃO GERAL

Eficiência reprodutiva é um somatório de fatores de ordem genética, como a síntese e a ativação de genes, a produção de proteínas com ação hormonal, ativação ou inibição de receptores e funções das organelas (Roche and Diskin, 1995), e ambiental, como nutrição e condição corporal (Gallego-Calvo *et al.*, 2015), temperatura ambiental (Hansen, 2009), manejo (Pala *et al.*, 2015), dentre outros.

Dos fatores que afetam a eficiência reprodutiva, a nutrição destaca-se por seu alto custo, podendo chegar a 70 % do custo de produção, o que pode acarretar em prejuízos quando mal manejada (Gionbelli *et al.*, 2014). Além disso, pode prejudicar a reprodução pela ação direta sobre a condição corporal (Gallego-Calvo *et al.*, 2015), síntese hormonal (Martin and Walkden-Brown, 1995), biometria testicular (Martin *et al.*, 2004), eficiência da espermatogênese e libido (Boshoff, 2014).

A eficiência reprodutiva pode ser mensurada por eventos como a idade ao primeiro parto e o intervalo de partos (Diskin and Kenny, 2014). A redução desses intervalos de tempo pode variar de acordo com a condição tecnológica adotada, investimento inicial, taxa de retorno de capital, dentre outros fatores. Uma das estratégias para aumentar essa eficiência é a adoção de biotécnicas da reprodução animal.

Tecnologias simples e de baixo custo têm sido adotadas em campo para aumento da eficiência reprodutiva, como a inseminação artificial (IA), reduzindo intervalos de partos e maximizando a difusão de material genético de qualidade superior nas proles (Freitas, 2015). Nesta técnica, espermatozoides são coletados, manipulados, armazenados e introduzidos artificialmente nos órgãos reprodutivos femininos no momento apropriado para a concepção (Patel *et al.*, 2017). Para isso, é fundamental que o sêmen utilizado seja de boa qualidade, cujo processamento e armazenamento devem preservar ao máximo características como viabilidade e motilidade.

Uma das técnicas mais utilizadas para conservação dos espermatozoides é a criopreservação. Entretanto, este processo causa diminuição da viabilidade espermática, devido à ação de diversos eventos estressantes, como redução de temperatura, desidratação celular,

congelamento, descongelamento e reidratação (Lemma, 2011). Em virtude dessa realidade, se faz necessário compreender os aspectos que comprometem a qualidade seminal antes e após a criopreservação.

Um relevante aspecto a ser considerado é o repouso sexual. Depois de produzidos, os espermatozoides ficam armazenados na cauda do epidídimo, onde realizam a etapa de maturação espermática, passando por intensas modificações bioquímicas e morfofisiológicas, que conferem capacidade fecundante a estes gametas. Os espermatozoides permanecem armazenados até a ejaculação, ou até serem fagocitados ou eliminados na urina (Jones, 2004; Mann and Mann, 2012). Entretanto, o armazenamento do sêmen por períodos prolongados, mesmo no epidídimo, pode causar danos aos espermatozoides (Jones, 1999; Reinhardt, 2007).

Uma possível solução é descartar o primeiro ejaculado para melhorar a qualidade seminal e reduzir contaminantes no sêmen (Aquino *et al.*, 2014; Eljarah *et al.*, 2017), principalmente quando se destina à congelamento (Gibbons *et al.*, 2009). Porém, a literatura é inconclusiva quanto à qualidade seminal após esse descarte, uma vez que alguns trabalhos demonstram decréscimo da qualidade espermática após o primeiro (Martins *et al.*, 2006) ou quarto ou quinto ejaculados (Shamsuddin *et al.*, 2000).

Outra biotécnica utilizada para melhoria da eficiência reprodutiva é a produção *in vitro* de embriões (PIV), permitindo a produção de um grande número de embriões a partir de doadores com potencial genético superior, reduzindo o intervalo de gerações e o tempo para teste de progênie (Nandi *et al.*, 2006). Além disso, esta técnica pode ser utilizada para elucidar eventos fisiológicos relacionados à maturação e fertilização de oócitos e desenvolvimento de embriões (El-Aziz *et al.*, 2016).

Muitos estudos têm sido realizados na tentativa de determinar as condições mais adequadas para a maturação oocitária, fertilização e desenvolvimento *in vitro*, a fim de maximizar a taxa de produção e a qualidade de embriões (Souza-Fabjan *et al.*, 2014). Entre os diferentes fatores que afetam os resultados da PIV estão a qualidade dos espermatozoides (Hansen, 2006) e do oócito (Souza-Fabjan *et al.*, 2014).

Dentre os fatores associados ao comprometimento da qualidade do oócito, o estresse térmico é um dos mais frequentemente descritos na

literatura (Roth and Hansen, 2005; Nabenishi *et al.*, 2011; Rispoli *et al.*, 2013). Estudos *in vitro* (Nabenishi *et al.*, 2011; Paes *et al.*, 2016) demonstraram efeitos deletérios do estresse térmico sobre a maturação oocitária (Nabenishi *et al.*, 2011; Maya-Soriano *et al.*, 2012), tais como aumento de espécies reativas de oxigênio (ERO), na taxa de apoptose (Roth *et al.*, 2001; Soto and Smith, 2009; Nabenishi *et al.*, 2011) e redução da viabilidade oocitária (Hansen, 2009; Xiang *et al.*, 2009).

Metodologias de baixo custo que mitiguem os efeitos deletérios do estresse térmico na maturação oocitária são escassas. Uma possível alternativa, com baixo custo e ausência de resíduos químicos, é a adoção de compostos naturais como drogas homeopáticas. Nesse campo, a *Arnica montana* destaca-se por seu potencial para atenuar situações de estresses físicos ou térmicos (Macedo, 2004; Das *et al.*, 2010; Kawakami, 2011; Camargo, 2013). Entretanto, não existem pesquisas avaliando o efeito termoprotetor desse medicamento na maturação de oócitos submetidos à condição de estresse térmico.

Diante do exposto, três experimentos, independentes entre si, foram propostos no intuito de contribuir para o entendimento da eficiência reprodutiva de machos e fêmeas, pela aplicação de biotécnicas da reprodução animal, sendo seus respectivos objetivos:

1. Estudar o efeito da oferta de uma dieta em nível de manutenção, em comparação à ingestão *ad libitum*, sobre o comportamento sexual e a qualidade seminal de machos caprinos;
2. Comparar a qualidade seminal do primeiro e do segundo ejaculados de machos caprinos; e,
3. Avaliar a adição do homeopático *Arnica montana* ao meio de maturação de oócitos bovinos submetidos ou não ao estresse térmico.

REFERÊNCIAS

- AQUINO, F. P. *et al.* Viability of extended goat semen stored at refrigerated condition. **Journal of Agricultural Science and Technology**. **A**, v. 4, n. 2A, 2014.
- CAMARGO, R. A.; DA COSTA, E. D.; CATISTI, R. Effect of the oral administration homeopathic *Arnica montana* on mitochondrial oxidative stress. **Homeopathy**, v. 102, n. 1, p. 49-53, 2013.
- DAS, S.*et al.* Potential of the homeopathic remedy, *Arnica montana* 30C, to reduce DNA damage in *Escherichia coli* exposed to ultraviolet irradiation through up-regulation of nucleotide excision repair genes. **Zhong Xi Yi Jie He Xue Bao**, v. 10, n. 3, p. 337-46, 2012.
- DISKIN, M. G.; KENNY, D. A. Optimising reproductive performance of beef cows and replacement heifers. **Animal**, v. 8, n. s1, p. 27-39, 2014.
- ELJARAH, A., ALHAIDER, A.K., JAWASREH, K., BANI ISMAIL, Z., ALHALAH, A., EL-BAHR, S.M., 2017. Investigation of scrotal circumference, testicular dimensions and semen characteristics of the vulnerable Arabian oryx (*Oryx leucoryx*): an approach supports the future use of artificial insemination. **Italian Journal of Animal Science**. 16:484-489.
- EL-AZIZ, AYMAN H. Abd *et al.* Factors influencing *in vitro* production of bovine embryos: a review. **Asian Journal of Animal and Veterinary Advances**, v. 11, p. 737-756, 2016.
- FERREIRA, A. C. D. *et al.* Protein and energy requirements of castrated male Saanen goats. **Small Ruminant Research**, v. 123, n. 1, p. 88-94, 2015.
- FREITAS, B. W. Efeito de diferentes crioprotetores e aditivos no diluente sobre a qualidade seminal de garanhões da raça Mangalarga Marchador. **Tese de Doutoradoem Zootecnia**– Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2015.

- GALLEGO-CALVO, L. *et al.* Reproductive performance response to the male effect in goats is improved when doe live weight/body condition score is increasing. **Animal Reproduction Science**, v. 156, p. 51-57, 2015.
- GIBBONS, A., CUETO, M., WOLFF, M., 2009. **Artificial insemination in goats**. Bariloche Experimental Station, National Institute of Agricultural Technology.
- HANSEN, P. J. Realizing the promise of IVF in cattle – an overview. **Theriogenology**, v. 65, n. 1, p. 119-125, 2006.
- HANSEN, P. J. Effects of heat stress on mammalian reproduction. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, 2009.
- INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICAS. **Censo Agropecuário** 2017. Disponível em: <<https://censos.ibge.gov.br/agro/2017/>>. Acesso em: 05 dez. 2018.
- JONES, R. 1999. To store or mature sperm? The primary role of the epididymis. **International Journal of Andrology**. 22: 57–67.
- JONES, R. Sperm survival versus degradation in the mammalian epididymis: a hypothesis. **Biology of Reproduction** 71.5 (2004): 1405-1411.
- KAWAKAMI, A. P. *et al.* Inflammatory process modulation by homeopathic *Arnica montana* 6CH: the role of individual variation. **Evidence-based complementary and alternative medicine**, v. 2011, 2011.
- LEMMA, Alemayehu. Effect of cryopreservation on sperm quality and fertility. In: **Artificial insemination in farm animals**. InTech, 2011.
- MACEDO, S. B. *et al.* Anti-inflammatory activity of *Arnica montana* 6CH: preclinical study in animals. **Homeopathy**, v. 93, n. 2, p. 84-87, 2004.
- MARTIN, G. B.; WALKDEN-BROWN, S. W. Nutritional influences on reproduction in mature male sheep and goats. **Journal of Reproduction and Fertility**. Supplement, v. 49, p. 437-449, 1995.
- MARTINS, L. F. *et al.* Avaliação espermática e da concentração de proteínas solúveis no plasma seminal de bodes da raça Alpina em regime de monta controlada. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 35, n. 4, p. 1653-1659, 2006.

- MANN, T.; MANN, C. L. Male reproductive function and semen: themes and trends in physiology, biochemistry and investigative andrology. **Springer Science & Business Media**, 2012.
- MAYA-SORIANO MJ, TABERNER E, LÓPEZ-BÉJAR M. Retinol improves *in vitro* oocyte nuclear maturation under heat stress in heifers. **Zygote** 2012; 21:377–84.
- NABENISHI H, OHTA H, NISHIMOTO T, MORITA T, ASHIZAWA K, TSUZUKI Y. The effects of cysteine addition during *in vitro* maturation on the developmental competence, ROS, GSH and apoptosis level of bovine oocytes exposed to heat stress. **Zygote** 2011; 20:249–59.
- NANDI, S.; KUMAR, V. G.; CHAUHAN, M. S. *In vitro* production of bovine embryos: we need to stop or proceed - a review. **AGRICULTURAL REVIEWS-AGRICULTURAL RESEARCH COMMUNICATIONS CENTRE INDIA**, v. 27, n. 2, p. 122, 2006.
- PAES, V. M. *et al.* Effect of heat stress on the survival and development of *in vitro* cultured bovine preantral follicles and on *in vitro* maturation of cumulus–oocyte complex. **Theriogenology**, v. 86, n. 4, p. 994-1003, 2016.
- PATEL, G. K. *et al.* (2017). Artificial insemination: A tool to improve livestock productivity. **Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry**. p. 309-313.
- REINHARDT, K. 2007. Evolutionary consequences of sperm aging. **Q. Rev. Biol.** 82: 375–393.
- RISPOLI, L. A. *et al.* (2013). Heat stress effects on the cumulus cells surrounding the bovine oocyte during maturation: altered matrix metalloproteinase 9 and progesterone production. **Reproduction**, v.146, p.193-207.
- ROCHE, J. F.; DISKIN, M. G. Hormonal regulation of reproduction and interactions with nutrition in female ruminants. In: **Ruminant Physiology: Digestion, Metabolism, Growth and Reproduction: Proceeding of the Eighth International Symposium on Ruminant Physiology**. Ferdinand Enke, Stuttgart, 1995. p. 409-428.
- ROTH, Z., ARAV, A., BOR, A., ZERON, Y., BRAW-TAL, R., & WOLFENSON, D. (2001). Improvement of quality of oocytes collected in

- the autumn by enhanced removal of impaired follicles from previously heat-stressed cows. **Reproduction**, 122(5), 737-744.
- ROTH Z, HANSEN PJ. Disruption of nuclear maturation and rearrangement of cytoskeletal elements in bovine oocytes exposed to heat shock during maturation. **Reproduction**, v.129, p.235-144, 2005.
- SHAMSUDDIN, M.; AMIRI, Y.; BHUIYAN, M. M. U. Characteristics of buck semen with regard to ejaculate numbers, collection intervals, diluents and preservation periods. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 35, n. 2, p. 53-57, 2000.
- SOTO, P.; SMITH, L. C. BH4 peptide derived from Bcl-xL and Bax-inhibitor peptide suppresses apoptotic mitochondrial changes in heat stressed bovine oocytes. **Molecular reproduction and development**, v. 76, n. 7, p. 637-646, 2009.
- SOUZA-FABJAN, J. M. G. *et al.* *In vitro* production of small ruminant embryos: late improvements and further research. **Theriogenology**, v. 81, n. 9, p. 1149-1162, 2014.
- THORNTON, P. K. Livestock production: recent trends, future prospects. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences**, v. 365, n. 1554, p. 2853-2867, 2010.
- WANG, Li-ya *et al.* Mitochondrial functions on oocytes and preimplantation embryos. **Journal of Zhejiang University Science B**, v. 10, n. 7, p. 483-492, 2009.

REVISÃO DE LITERATURA

O MACHO REPRODUTOR

Anatomia do sistema reprodutor do macho

Os órgãos reprodutores do macho são constituídos externamente por órgão copulatório (pênis), escroto, testículos e epidídimo. Internamente, é composto pelo ducto deferente e glândulas acessórias (Stanbenfeldt and Edqvist, 1996).

De maneira geral, as funções essenciais dos órgãos reprodutores masculinos dependem dos testículos, responsáveis pela produção espermática, nos túbulos seminíferos, e de hormônios sexuais pelas células intersticiais e de Sertoli. Na cabeça e corpo do epidídimo ocorrem o transporte e a maturação dos espermatozoides. Este evento confere capacidade fertilizante a esses gametas, por meio de mudanças no padrão de motilidade, alterações das características de membrana e do metabolismo espermático (Hafez and Hafez, 2008).

Após maturados, os espermatozoides são armazenados na cauda do epidídimo até a ejaculação ou até serem naturalmente eliminados na urina (Jones, 2004; Mann and Mann, 2012).

Aspectos da fisiologia do macho

As funções testiculares são controladas pela secreção pulsátil de GnRH pelo hipotálamo, que estimula a liberação de hormônio folículo-estimulante (FSH) e hormônio luteinizante (LH) pela adenohipófise. A produção de hormônios esteroides no testículo é regulada pela ligação do LH com receptores específicos na membrana das células de Leydig.

O FSH, por sua vez, atua estimulando a produção de ativinas e inibinas pelas células de Sertoli. A secreção desses hormônios, juntamente

com os andrógenos, auxiliam na regulação hipotalâmica de GnRH, que leva à liberação de LH e FSH (Hafez and Hafez, 2008).

A espermatogênese é dependente das células de Sertoli, que são responsáveis por funções nutritivas e regulatórias (Johnson, 1991; Stanbenfeldt and Edqvist, 1996). Mediante a estimulação pelo FSH, essas células traduzem sinais hormonais para as células germinativas, que não possuem receptores para FSH e testosterona (Kretser *et al.*, 1998).

O FSH estimula a secreção da proteína ligadora de andrógenos (ABP) pelas células de Sertoli, proteína com grande afinidade pela testosterona e di-hidrotestosterona (Dadoune and Demoulin, 1993), que é secretada no lúmen dos túbulos seminíferos, formando um complexo com andrógenos, aumentando a concentração intratesticular desses hormônios (Stanbenfeldt and Edqvist, 1996), estimulando a maturação das células germinativas, que resulta nos espermatozoides (Hafez and Hafez, 2008).

Nas células de Sertoli ocorre, também, a aromatização da testosterona em estrógenos, que migram para compartimentos dos túbulos seminíferos, de onde podem ser secretados na corrente sanguínea (Stanbenfeldt and Edqvist, 1996).

As células de Sertoli atuam, ainda, na conversão de testosterona em di-hidrotestosterona, androgênio com atividade biológica mais potente que a testosterona e que atua no desenvolvimento e manutenção da libido (Kaltenbach and Dunn, 1982), maturação dos órgãos sexuais masculinos e na expressão de características sexuais secundárias de macho (Stanbenfeldt and Edqvist, 1996), assim como estimula as glândulas sexuais acessórias a produzirem secreções que compõem o fluido seminal. Ainda, determina alta taxa de crescimento em machos, em conjunto com carcaça mais magra e maior massa muscular, o que resulta em maior exigência de energia (Paulino *et al.*, 2009), o que pode levar a variações no consumo.

Nutrição

A nutrição pode influenciar diretamente a fertilidade, interferindo na secreção de hormônios e no suprimento dos nutrientes necessários para o

desenvolvimento oocitário e espermático, ovulação, fertilização, estabelecimento da prenhez e sobrevivência do embrião (Pires *et al.*, 2011).

A superalimentação pode resultar em machos obesos e letárgicos, com baixa libido (Smith, 1986). Porém, deficiências nutricionais também podem comprometer a reprodução, atrasando o início da puberdade e prejudicando a função espermatogênica dos testículos e as características seminais (Boshoff, 2014).

Machos adultos alimentados insuficientemente são, ainda, capazes de manter a mesma produção espermática e a testosterona necessárias para suportar a espermatogênese (Boshoff, 2014).

No entanto, reprodutores jovens, que ainda estão em crescimento, podem apresentar retardo no crescimento e no desenvolvimento sexual, devido à inibição da atividade endócrina dentro dos testículos que, por sua vez, retardará o crescimento e a função secretora dos órgãos reprodutivos masculinos (Hafez and Hafez, 2008). Ainda, pode ocorrer redução da libido e da produção de testosterona, mesmo antes de ser verificada redução da qualidade do sêmen (Boshoff, 2014). Neste caso, nem sempre os danos causados às células germinativas dos testículos podem ser revertidos em machos adultos (Hafez and Hafez, 2008).

Carneiros recebendo dietas que atenderam a 80 %, 100 % ou 120 % da demanda energética foram comparados quanto à qualidade seminal e fertilidade. Os animais que receberam 100 % e 120 % apresentaram melhores características seminais, como maior integridade e funcionalidade da membrana espermática, maior potencial de membrana mitocondrial espermática, maior número de espermatozoides ligantes a oócitos e concentração plasmática de IGF-1 (Selvaraju *et al.*, 2012).

Condição corporal

Reservas corporais influenciam fortemente a eficiência de produção. Uma alternativa para verificação desse *status* é o escore de condição corporal, que varia de 1 a 5, onde 1 é considerado muito magro e 5, obeso. Para o melhor desempenho reprodutivo, devem ser utilizados animais que

estejam em uma condição corporal moderada a boa (escores 3-3,5) (Mellado, 2016).

Carneiros magros submetidos a rápida mudança energética (duas vezes a energia de manutenção) durante sete dias, apresentaram pulsos aumentados de LH em relação a animais com escore de condição corporal normal (Zhang *et al.*, 2005).

Comportamento sexual

O termo libido é usado para descrever o desejo sexual em machos inteiros e pode ser avaliado observando o tempo decorrido (tempo de reação) entre a exposição de um macho a uma fêmea em estro até a ejaculação (Chenoweth, 1981).

A libido é frequentemente correlacionada com a concentração circulante de testosterona (Kaltenbach and Dunn, 1982) e a um bom desempenho reprodutivo (Parkinson, 1998).

A condição nutricional pode afetar a concentração sérica de testosterona e o diâmetro testicular, comprometendo quantitativamente e qualitativamente a produção e a fertilidade seminal (Ghorbankhani *et al.*, 2015). Conseqüentemente, a concentração de testosterona pode afetar a espermatogênese, assim como as características sexuais secundárias e a expressão do comportamento sexual (Roselli *et al.*, 2002; Perkins and Roselli, 2007).

Entretanto, poucos estudos foram conduzidos relacionando a concentração de testosterona circulante com o desempenho sexual em machos jovens (Preston *et al.*, 2012).

O desempenho sexual pode variar com a experiência, idade e tempo da primeira exposição à fêmea em estro (Perkins and Roselli, 2007). Em geral, machos mais velhos apresentam maior eficiência de ejaculação (Kridli and Said, 1999) e menor tempo de reação (Darwish and Mahboub, 2011) que machos mais jovens.

Repouso sexual

Repouso sexual pode ser caracterizado como o período de inatividade sexual, podendo ser ocasionado naturalmente ou por condições clínicas (Mann and Mann, 2012). Entretanto, a literatura é escassa em informações que precisem o período mínimo necessário para caracterizar a inatividade sexual como repouso sexual.

Um dos fatores que levam ao repouso sexual, em condições naturais, é a sensibilidade à duração do fotoperíodo, caracterizando, assim, estações de reprodução natural e de repouso sexual. Manipulações fotoperiódicas em espécies sazonais permitem a coleta de sêmen durante todo o ano (Leboeuf *et al.*, 2000).

Bodes sujeitos a ritmos de alternância de curta duração entre dias longos e curtos produzem melhores doses de sêmen, evitando o aparecimento de uma estação de repouso (Delgadillo *et al.*, 1995; Chemineau and Leboeuf, 1999). Delgadillo *et al.*, (1991) observaram maior concentração de espermatozoides durante a estação de repouso sexual que durante a estação de reprodução natural, provavelmente devido ao menor uso do reprodutor.

Biometria testicular

A capacidade reprodutiva do macho pode ser avaliada pela libido e pela análise seminal, também por exame clínico e pelos órgãos reprodutores (Monteiro *et al.*, 2014).

O processo de seleção de machos reprodutores envolve a avaliação de diversas variáveis correlacionadas positivamente com a fertilidade (Regeet *et al.*, 2000), pela avaliação das medidas biométricas testiculares, como: circunferência escrotal, largura, comprimento e volume testicular (Notteret *et al.*, 1981; Unanian *et al.*, 2000).

Essas medidas podem ser afetadas por diversos fatores, como: idade (Forni and Albuquerque, 2004), peso corporal (Braun *et al.*, 1980; Freitas *et al.*, 1991), desenvolvimento corporal (Santana *et al.*, 2001) e nutrição (Martin *et al.*, 2004).

A circunferência escrotal é uma mensuração facilmente obtida e uma característica que possui herdabilidade moderada a alta (Dias *et al.*, 2003),

sendo correlacionada com ganho de peso (Valentim *et al.*, 2002), produção espermática (Palasz *et al.*, 1994; Santos *et al.*, 1998; Kastelic *et al.*, 2001; Pant *et al.*, 2003) e qualidade seminal (Silva *et al.*, 2002).

AVALIAÇÃO DO SÊMEN

A célula espermática

Espermatozoides são células alongadas, revestidas por uma membrana plasmática e são morfológicamente divididos em cabeça, peça intermediária e cauda (Garcia and Fernandez, 2001; Singh, 2006).

A integridade destas estruturas, incluindo a membrana plasmática, é fundamental para que haja adequada fecundação e desenvolvimento embrionário (Moraes *et al.*, 1998; Silva and Gadella, 2006). É primordial, também, o conteúdo de DNA retido no núcleo com as informações genéticas, que constituirão o genoma do novo indivíduo, após a fecundação (Garcia and Fernandez, 2001).

Além do núcleo, a cabeça é constituída, ainda, na sua região apical, pelo acrossoma, organela originada a partir do complexo de Golgi com enzimas hidrolíticas em seu interior (Pesch and Bergmann, 2006). Tais enzimas são liberadas durante a reação acrossomal, fazendo com que haja a fusão entre as membranas acrossomal e plasmática. Esta reação é essencial para que haja a fertilização do oócito (Pesch and Bergmann, 2006; Silva and Guerra, 2012).

A integridade dessas estruturas espermáticas e suas características biofísicas e bioquímicas podem ser comprometidas pelo processo de criopreservação (Hafez and Hafez, 2008).

Avaliação macroscópica do sêmen

Algumas características seminais são avaliadas macroscopicamente, como volume, aspecto e coloração. Isso permite inferir sobre o caráter normal ou anormal do sêmen para reprodutores daquela espécie e raça,

conforme critérios definidos no Manual Para Exame Andrológico e Avaliação de Sêmen Animal (CBRA, 2013).

Em geral, maior volume seminal está relacionado à fertilidade, maior número de doses por ejaculado (Foxcroft *et al.*, 2008), e com a estimação da concentração espermática (Sieme, 2009).

O volume do ejaculado pode orientar a melhor metodologia para manipulação do sêmen. Ejaculados com volume muito reduzido podem ser aproveitados com estratégias adequadas de diluição (Watson, 2000). Em geral, coletas de sêmen pelo método da vagina artificial apresentam valores mais próximos ao fisiológico (CBRA, 2013).

O aspecto e a coloração estão relacionados à composição química do sêmen e à concentração espermática (Estrada and Samper, 2007; Catunda *et al.*, 2011). Sêmens caprinos mais brancos foram associados a maior concentração espermática (Catunda *et al.*, 2011), enquanto sêmens mais amarelos são relacionados à maior concentração de riboflavinas, frutose e ácido cítrico (Mendonza *et al.*, 1989). Esses fatores são afetados, ainda, pelo período do ano (Aguilar *et al.*, 2013).

Avaliação microscópica do sêmen

Algumas características seminais são avaliadas microscopicamente, como turbilhonamento, motilidade, vigor e concentração espermática. Quando avaliadas visualmente apresentam caráter mais subjetivo, dependendo da experiência do avaliador (Varner *et al.*, 1991). Podem, ainda, serem avaliadas objetivamente por avaliação computadorizada (Salviano and Souza, 2008).

O turbilhonamento ou movimento de massa é um fenômeno inerente ao sêmen fresco de ruminantes. Possui aparência de ondas, é observado em uma gota do ejaculado e classificado subjetivamente em uma escala de zero a cinco. Pode ser afetado por fatores extrínsecos, como método de coleta, condições de preservação e temperatura da amostra, ou intrínsecos, como motilidade, vigor e concentração espermática. O sêmen pode ser considerado apto quando o turbilhonamento for igual ou superior a três (CBRA, 2013).

A motilidade espermática é a proporção percentual de espermatozoides móveis em uma amostra de sêmen (CBRA, 2013), sendo um elemento importante na avaliação da função espermática (Pickett, 1993), devido ao seu papel indispensável na fertilização (Varner *et al.*, 1988). Segundo o CBRA (2013), é necessário o mínimo de 70 % de motilidade progressiva para o sêmen caprino ser considerado apto.

O vigor representa a intensidade do movimento, que resulta na velocidade espermática, sendo classificado de zero (ausência de movimento) a cinco (máximo movimento vigoroso e veloz). Em geral, é necessário mínimo de três na escala de vigor para o sêmen ser considerado apto (CBRA, 2013).

A concentração espermática é obtida verificando o número de espermatozoides por milímetro cúbico (mm^3) ou centímetro cúbico ($1,0 \text{ cm}^3 = 1,0 \text{ mL}$), geralmente pelo uso de uma câmara de Neubauer, que multiplicado pelo volume, expressa o total de espermatozoides no ejaculado (CBRA, 2013).

Hafez and Hafez (2008) apresentaram concentração espermática variando de 2×10^9 a 6×10^9 spz/mL para o sêmen fresco caprino. São fatores extrínsecos, que afetam a concentração, o método de coleta, frequência de atividades do reprodutor e condicionamento. E intrínsecos, a idade, tamanho e estado de higidez testicular (CBRA, 2013).

Termoresistência

O Teste de Termoresistência (TTR) é capaz de avaliar a longevidade dos espermatozoides *in vitro*, supondo-se que estes estariam nos órgãos sexuais da fêmea (Santos *et al.*, 2006; Castilho *et al.*, 2009).

Uma das formas de se realizar esse teste é pelo acondicionamento das amostras seminais, cobertas por óleo mineral, em microtubos de polietileno e incubação em banho-maria sob temperatura pré-estabelecida e por um período de tempo determinado, avaliando-se, posteriormente, a motilidade progressiva e o vigor espermático a cada 30 min, até totalizar 3 h (Santos *et al.*, 2006; Barros *et al.*, 2013).

Teste hiposmótico (THO)

O teste hiposmótico avalia a integridade funcional da membrana espermática, que permite o transporte seletivo de moléculas (Oliveira *et al.*, 2013). Quando a célula espermática está exposta a um meio hipotônico ocorre entrada de água pela membrana plasmática, de maneira a restabelecer o equilíbrio osmótico entre o meio intra e extracelular (Jeyendran *et al.*, 1984).

Em virtude do efeito osmótico, ocorre aumento de volume do espermatozoide, sendo particularmente visível na cauda, pois a membrana plasmática que a envolve parece ser mais frouxamente aderida que a membrana que envolve a cabeça. Por isso, a região enrola-se com facilidade (Amorim, 2008).

Jeyendran *et al.* (1984) verificaram correlação positiva entre o enrolamento das caudas e a penetração do espermatozoide em oócitos, indicando boa funcionalidade da membrana da cabeça.

Correa and Zavos (1994) relataram correlação positiva entre a porcentagem de espermatozoides que enrolam a cauda no teste hiposmótico e motilidade espermática em sêmen de bovinos.

Entretanto, apesar das citadas correlações, membranas fisicamente intactas podem ser bioquimicamente afuncionais. O THO apresenta-se como um bom teste complementar, contudo, não deve ser utilizado como único teste para avaliação da qualidade espermática (Penitente-Filho *et al.*, 2017).

Morfologia espermática

Alterações morfológicas podem ocorrer nas estruturas do espermatozoide, como acrossoma, cabeça, colo, peça intermediária, cauda (Mies Filho, 1987), caracterizando defeitos maiores, durante o processo espermatogênico, ou menores, depois de formado (Blom, 1950).

Quanto maior a porcentagem decélulas espermáticas morfolologicamente anormais, menor a fertilidade do sêmen (Pantke *et al.*, 1995). Em particular, células com defeitos de cabeça e acrossoma estão associadas com infertilidade (CBRA, 2013).

Diversos fatores podem levar a alteração da morfologia espermática, como a peroxidação lipídica (Hammerstedt, 1993) e alterações na cromatina espermática (Royere *et al.*, 1991), principalmente após a criopreservação (Lemma, 2011).

Citometria de fluxo

A citometria de fluxo permite analisar, simultaneamente e com precisão, milhares de células em pouco tempo, podendo contabilizar 10.000 células por segundo ou 600.000 imagens de 10.000 células em cinco minutos (Basiji *et al.*, 2007).

Pelo uso de sondas fluorescentes, células que incorporam o fluoróforo são excitadas num comprimento de onda específico pertinente ao fluorescente, e então uma emissão de fluorescência é observada (Gillan *et al.*, 2005).

Assim, diversos aspectos específicos da qualidade seminal podem ser avaliados por citometria de fluxo, como a integridade e a peroxidação lipídica das membranas plasmática e acrossomal, e ainda a produção de espécies reativas de oxigênio (ERO), que são potencialmente danosas às membranas e ao metabolismo do espermatozoide (Baumber *et al.*, 2000).

As ERO desempenham papel fisiológico quando produzidas em pequena quantidade, promovendo a cascata de fosforilação da tirosina, essencial para a capacitação espermática. Entretanto, quando a sua produção excede a capacidade antioxidante da célula, ocorre estresse oxidativo, que se caracteriza por peroxidação da membrana espermática e danos importantes ao DNA celular (Guthrie and Welch, 2012), prejudicando a viabilidade e a fertilidade espermática (Aitken *et al.*, 2010).

A viabilidade espermática pode ser determinada na citometria de fluxo mensurando células que apresentem membrana plasmática intacta *versus* células com danos de membrana. Dupla coloração é um método comum de avaliar a integridade do acrossoma de espermatozoides. Na dupla coloração, um corante acrossomal e um corante nuclear são combinados, permitindo contraste na região posterior da cabeça, e também, reduzindo a

quantidade de corante acrossomal levado para cima pelo núcleo (Cross and Meizel, 1989).

A integridade da membrana plasmática do espermatozoide pode ser avaliada por meio da sonda iodeto de propídeo (IP), sonda a qual a membrana é impermeável, que cora o núcleo celular de vermelho quando a mesma encontra-se lesionada (Matyuset *al.*, 1984). Para avaliação da integridade acrossomal, conjuga-se a aglutinina *Pisum sativum* com isotiocionato de fluoresceína (FITc-PSA), sonda incapaz de penetrar a membrana acrossomal intacta, corando em verde somente aqueles espermatozoides reagidos ou com acrossoma lesionado (Cross *et al.*, 1986) ao se ligar em moléculas de α -manose dispostas na matriz acrossomal (Celeghini *et al.*, 2007).

A produção de peróxido de hidrogênio intracelular pode ser avaliada mediante a utilização do fluoróforo diacetato de diclorodihidrofluoresceína (DCFDA), que, ao penetrar na célula, é oxidado pelo peróxido de hidrogênio intracelular, emitindo fluorescência verde, conforme descrito por Macías-García *et al.* (2012).

A avaliação da peroxidação da membrana espermática pode ser realizada mediante utilização do fluoróforo ácido 4,4-difluoro-5-(4-fenil-1,3-butadienil)-4-bora-3a,4a-diaza-sindaceno-3-undecanoico(C11-BODIPY^{581/591}), sonda que se incorpora prontamente em membranas biológicas (Neild *et al.*, 2005) e que se liga às ROS em uma reação irreversível, que é quantificada pela citometria de fluxo como fluorescência verde (Aitken *et al.*, 2007).

Criopreservação espermática

Criopreservação seminal consiste na inibição do metabolismo celular por temperaturas muito baixas, desidratação e congelação do espermatozoide (Barbas and Mascarenhas, 2009).

Os primeiros espermatozoides caprinos foram congelados por Smith and Polge (1950). Desde então, inúmeras pesquisas têm sido realizadas no intuito de melhorar a técnica de congelação do sêmen caprino. Boa taxa de

sobrevivência espermática pós-aquecimento depende de velocidades adequadas de resfriamento e reaquecimento (Watson, 2000; Maia, 2014).

O binômio tempo-temperatura, nessas etapas, pode afetar as membranas plasmáticas e o metabolismo celular estrutural e funcionalmente (Gilmore *et al.*, 1998; Purdy, 2006). Isso pode prejudicar a motilidade espermática e produção de ATP, além de aumentar a susceptibilidade à peroxidação lipídica e reduzir a capacidade fecundante, podendo levar a morte celular (Siqueira, 2004; Celeghini, 2005).

A criopreservação e a descongelação causam danos irreversíveis às células espermáticas (Purdy, 2006), devido à cristalização da água e mudanças osmóticas no meio extracelular, alterando componentes da bicamada lipídica da membrana plasmática, aumentando a sua permeabilidade. Isso pode provocar redução da atividade metabólica, maior número de patologias, danos no acrossoma e em outras estruturas, fragmentação do DNA espermático e alteração da concentração de eletrólitos intracelulares, reduzindo a capacidade fecundante (Barbas and Mascarenhas, 2009; Küçük *et al.*, 2014).

No entanto, a adequada condução dos protocolos de congelamento e o uso de diluidores seminais pode proporcionar um ambiente adequado aos espermatozoides, protegendo-os durante o armazenamento e a criopreservação, conservando a fertilidade destes gametas (Küçük *et al.*, 2014).

PRODUÇÃO IN VITRO DE EMBRIÕES

Produção de embriões e maturação in vitro

A produção *in vitro* de embriões (PIV) permite a produção de um grande número de embriões a partir de doadores com potencial genético superior, reduzindo o intervalo de gerações e o tempo para teste de progênie (Nandi *et al.*, 2006; Fowler *et al.*, 2018).

Diversos fatores influenciam a taxa de produção e a qualidade embrionária, como a qualidade dos espermatozoides (Hansen, 2006) e dos oócitos (Souza-Fabjan *et al.*, 2014) utilizados.

Embriões são rotineiramente produzidos *in vitro*, por meio da aplicação de três técnicas subsequentes: maturação *in vitro* (MIV) de oócitos, seguida de capacitação espermática e fertilização *in vitro* (FIV) e o cultivo *in vitro* (CIV) dos oócitos maturados e fertilizados até o estágio de blastocisto (El-Aziz *et al.*, 2016; Paramio and Izquierdo, 2016).

A maturação oocitária é o evento fisiológico que antecede e é fundamental para o sucesso da fertilização e desenvolvimento embrionário. Em mamíferos, durante a vida fetal, os oócitos iniciam seu desenvolvimento, estacionando no estágio diploteno da prófase I, até serem recrutados ou entrarem em atresia. Com o pico de LH, ocorre a retomada da meiose e a progressão da maturação, que para no estágio de metáfase II, caracterizado pela extrusão do primeiro corpúsculo polar. Após a penetração do espermatozoide ocorre a formação de um embrião diploide e a extrusão do segundo corpúsculo polar (Lonergan and Fair, 2016).

Além da maturação nuclear, o oócito deve realizar, ainda, a maturação citoplasmática, o que envolve a redistribuição de várias organelas celulares, incluindo grânulos corticais, preparando-o para a fertilização (Hyttel *et al.*, 1986; Hyttel *et al.*, 1989).

Estresse térmico na maturação in vitro

Diversos fatores podem comprometer a maturação citoplasmática e nuclear de oócitos, como o estresse térmico (Andreu-Vázquez *et al.*, 2010; Maya-Soriano *et al.*, 2013; Paes *et al.*, 2016).

Para essa condição, são descritos aumento da fragmentação do DNA do oócito (Ispada *et al.*, 2011), um indicativo de apoptose, acompanhada de redução da maturação nuclear, clivagem e taxa de blastocisto após exposição ao estresse térmico (Paula-Lopes *et al.*, 2008), redução da atividade mitocondrial do oócito (Soto e Smith, 2009; Ispada *et al.*, 2011; Gendelman and Roth, 2012), aumento de ERO e indução de apoptose (Soto and Smith, 2009).

Diversas substâncias com potencial antioxidante têm sido adicionadas ao meio de maturação oocitária para reduzir o aumento do estresse oxidativo associado ao estresse térmico, como antocianinas (Sakatani *et al.*, 2007), ácido fólico (Koyama *et al.*, 2012), o polifenol verbascosídeo (Martino *et al.*, 2016) e IGF-I (Ispada *et al.*, 2011; Ascari *et al.*, 2017), reduzindo as ROS e a lipoperoxidação do oócito, e diminuindo a apoptose e aumentando a formação de blastocistos.

A adição de astaxantina, uma substância carotenoide encontrada em algas vermelhas e frutos do mar, adicionada ao meio de cultivo embrionário melhorou significativamente a taxa de formação de blastocistos e diminuiu os valores relativos de ERO dos embriões submetidos ao estresse térmico (Kuroki *et al.*, 2013).

HOMEOPATIA E REPRODUÇÃO ANIMAL

A homeopatia surgiu como ciência no final do século XVIII com os pioneiros trabalhos de Hahnemann, sendo direcionada para tratar condições patológicas (Ramey *et al.*, 1999). As primeiras pesquisas de ciência básica sobre homeopatia foram reportadas no século XIX (Gonçalves *et al.*, 2017).

Nas últimas três décadas, o número de publicações revisadas por pares nesse campo aumentou cerca de 3,5 vezes (Clausen *et al.*, 2014). Do ponto de vista químico, ultradiluições homeopáticas são, até então, indistinguíveis do veículo (água ou etanol, por exemplo). Por isso, há uma grande resistência por parte da comunidade científica em aceitar que essas soluções possam apresentar qualquer efeito clínico além do placebo (Hirst *et al.*, 1993; Singh and Ernst, 2008).

Entretando, diversas pesquisas demonstraram alterações físicas mensuráveis em soluções ultradiluídas, com o uso de técnicas e propriedades como termoluminescência (Rey, 2003), espectroscopias de fluorescência (Sharma and Purkait, 2012) e de luz ultravioleta (Wolf *et al.*, 2011; Marschollek *et al.*, 2013), retardo da luminescência (Lenger *et al.*, 2008) e dispersão dielétrica (Maity *et al.*, 2010; Mahata, 2013).

Foram observadas, ainda, propriedades magnéticas (Botha and Ross, 2008), propriedades elétricas (Assumpção; Smith; Holandino *et al.*, 2008), formação de nanodomínios aquosos (Czerlinski and Ypma, 2010) e diferentes tempos de relaxamento protônico em ressonância magnética nuclear (Demangeat, 2013).

Porém, para além de diferenças químicas ou físicas, ações biológicas das soluções homeopáticas em experimentos *in vitro*, modelos livres do confundimento gerado pelo efeito placebo, também têm sido estudadas e reportadas em periódicos científicos.

Em uma extensa revisão sobre efeitos de ultradiluições homeopáticas em modelos *in vitro*, Waisse (2017) verificou 61 artigos demonstrando diferenças biológicas, dos quais 28 foram incluídos no trabalho. Destes, 19 experimentos foram realizados com soluções acima do número de Avogadro. Por fim, a autora concluiu que o conhecimento gerado no âmbito celular auxilia no entendimento de mecanismos de regulação celular

deflagrados por tratamentos homeopáticos (Waisse, 2017). Entretanto, não foi possível, ainda, determinar com precisão como altas diluições funcionam em nível celular e molecular (Gonçalves *et al.*, 2017).

No campo da reprodução animal, um experimento *in vivo* realizado por Silva *et al.* (2001) com *Pulsatilla nigricans*, um composto homeopático, demonstrou redução do puerpério em 35 % do total de bovinos em estudo. Kumar *et al.* (2004) induziram estro em vacas e búfalas com medicamentos homeopáticos (*Calcarea phosphorica*, *Aletris farinosa*, *Pulsatilla nigricans*, *Aurum muriaticum natronatum*, *Seppia* e *Phosphorus* - 30 CH), verificando estro em 68 % das fêmeas bovinas e 50 % das bubalinas. Rajkumar *et al.* (2006), também estudando um composto homeopático, observaram indução de estro em 100 % das fêmeas e aumento na concentração de estradiol no grupo tratado.

Estudos *in vitro* com o uso de soluções homeopáticas na reprodução animal também foram reportados à comunidade científica. Lima *et al.* (2013) utilizando diluições homeopáticas de FSH (6, 12 e 30 cH) no cultivo de folículos preantrais ovinos, demonstraram aumento de sobrevivência, atividade folicular, crescimento de folículos e oócitos em comparação ao controle, manutenção da viabilidade e integridade ultraestrutural dos folículos após sete dias de cultivo.

Em outro experimento da mesma equipe estudando o desenvolvimento de folículos preantrais ovinos suplementados com FSH (6 cH), Lima *et al.* (2016a) observaram aumento do diâmetro folicular, aumento da taxa de sobrevivência folicular e maior taxa de ativação folicular no primeiro dia de cultivo. Em um terceiro experimento dessa equipe, cultivando folículos preantrais ovinos isolados, com ou sem adição do FSH (6 cH) homeopático ao meio de cultivo, Lima *et al.* (2016b) verificaram que o veículo homeopático (álcool) apresentou maior efeito sobre a proliferação celular que o FSH (6cH), sendo ambos superiores ao controle. A produção de estradiol aumentou em todos os tratamentos e o FSH (6cH) aumentou a expressão de conectina 43.

REFERÊNCIAS

- AGUIAR, G. V. *et al.* Sperm parameters and biochemical components of goat seminal plasma in the rainy and dry seasons in the Brazilian Northeast: the season's influence on the cooling of semen. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 65, n. 1, p. 6-12, 2013.
- AITKEN, R. J. *et al.* Analysis of lipid peroxidation in human spermatozoa using BODIPY C11. **MHR: Basic science of reproductive medicine**, v. 13, n. 4, p. 203-211, 2007.
- AITKEN, R. J. *et al.* Analysis of the relationships between oxidative stress, DNA damage and sperm vitality in a patient population: development of diagnostic criteria. **Human Reproduction**, v. 25, n. 10, p. 2415-2426, 2010.
- AMORIM E.A.M. 2008. Alteração da membrana espermática de suínos, bovinos e equinos na qualidade do sêmen. **Tese (Doutorado em Zootecnia)**, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG. 174p.
- ANDREU-VÁZQUEZ, C., LOPEZ-GATIUS, F., GARCIA-ISPIERTO, I., MAYA-SORIANO, M., HUNTER, R., LÓPEZ-BÉJAR, M., 2010. Does heat stress provoke the loss of a continuous layer of cortical granules beneath the plasma membrane during oocyte maturation? **Zygote** 18, 293.
- ASCARI, I. J. *et al.* Addition of insulin-like growth factor I to the maturation medium of bovine oocytes subjected to heat shock: effects on the production of reactive oxygen species, mitochondrial activity and oocyte competence. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 60, p. 50-60, 2017.
- ASSUMPÇÃO, R. Electrical impedance and HV plasma images of high dilutions of sodium chloride. **Homeopathy**, v. 97, n. 3, p. 129-133, 2008.
- BARBAS, J. P.; MASCARENHAS, R. D. Cryopreservation of domestic animal sperm cells. **Cell and Tissue Banking**, v. 10, n. 1, p. 49-62, 2009.
- BASIJI, D. A. *et al.* Cellular image analysis and imaging by flow cytometry. **Clinics in Laboratory Medicine**, v. 27, n. 3, p. 653-670, 2007.
- 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**, v. 21, n. 6, p. 895-902, 2000.

- BLOM, E. *et al.* A one-minute live-dead sperm stain by means of eosin-nigrosin. **Fertility and Sterility**, v. 1, p. 176-177, 1950.
- BOSHOFF, N. H. The influence of genotype on sperm motility and sperm head morphometry of Merino (*Ovis aries*) sheep. 2014. **Tese de Doutorado**. Stellenbosch: Stellenbosch University. 188p.
- BOTHA I, ROSS AH. A nuclear magnetic resonance spectroscopy comparison of 3C trituration derived and 4C trituration derived remedies. **Homeopathy** 2008; 97(4):196-201.
- CATUNDA, A. G. V. *et al.* Characterization of ejaculates from crossbreed male goats raised in tropical environment. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**, v. 110, p. 59-67, 2011.
- CBRA - Colégio Brasileiro de Reprodução Animal. **Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal**. 3.ed. Belo Horizonte: CBRA, 104p, 2013.
- CELEGHINI, E. C. C.; ARRUDA, R. P.; ANDRADE, A. F. C.; NASCIMENTO, J.; RAPHAEL, C.F. Practical techniques for bovine sperm simultaneous fluorimetric assessment of plasma, acrosomal and mitochondrial membranes. **Reproduction of Domestic Animals**, v. 42, p. 479-488. 2007.
- CELEGHINI, E. C. C. Efeitos da criopreservação do sêmen bovino sobre as membranas plasmática, acrossomal e mitocondrial e estrutura da cromatina dos espermatozoides utilizando sondas fluorescentes. 2005. 186 f. **Tese (Doutorado em Reprodução Animal)** - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, 2005.
- CHENOWETH, P. J. Libido and mating behavior in bulls, boars and rams. A review. **Theriogenology**, v. 16, n. 2, p. 155-177, 1981.
- CLAUSEN, J.; VAN WIJK, R.; ALBRECHT, H. Geographical and temporal distribution of basic research experiments in homeopathy. **Homeopathy**, v. 103, n. 3, p. 193-197, 2014.
- CORREA, J. R.; ZAVOS, P. M. The hypoosmotic swelling test: its employment as an assay to evaluate the functional integrity of the frozen-thawed bovine sperm membrane. **Theriogenology**, v. 42, n. 2, p. 351-360, 1994.
- CROSS, N.L.; MORALES, P.; OVERSTREET, J.W.; HANSON, F.W. Two simple methods for detecting acrosome-reacted human sperm. **Gamete Research**, v. 15, p. 213-226. 1986.

- CROSS, N. L.; MEIZEL, S. Methods for evaluating the acrosomal status of mammalian sperm. **Biology of Reproduction**, v. 41, n. 4, p. 635-641, 1989.
- CZERLINSKI GH, YPMA T. Domains of water molecules provide mechanisms of potentization in homeopathy. **Water**.2010; 2:1–14.
- DADOUNE, J.; DEMOULIN, A. Structure and functions of testis. In: THIBAUT, C.; LEVASSEUR, M. C.; HUNTER, R. H. F. **Reproduction in Mammals and Man**. Paris: Ellipses, 1993. Cap. 13, p. 227-255.
- DARWISH, R. A. AND MAHBOUB, H. D. H. 2011. Breed and experience effect on the sexual behaviors of Damascus and Egyptian-Nubi goat bucks. **Theriogenology** 76:1386-1392.
- DEMANGEAT, J. L. Nanosized solvent superstructures in ultramolecular aqueous dilutions: twenty years' research using proton NMR relaxation. **Homeopathy**.2013; 102:87-105.
- ERNST, E.; SINGH, S. **Trick or treatment: The undeniable facts about alternative medicine**. WW Norton & Company, 2008.
- ESTRADA, A.J., SAMPER, J.C. 2007. **Evaluation of raw semen**. In: Current Therapy in Equine Reproduction (eds. J.C. Samper., J.F. Pycoc., A.O. McKinnon), 253-257. Saunders Elsevier, Missouri, USA.
- FOWLER, K. E., MANDAWALA, A. A., GRIFFIN, D. K., WALLING, G. A., & HARVEY, S. C. (2018). The production of pig preimplantation embryos *in vitro*: Current progress and future prospects. **Reproductive Biology**.doi:10.1016/j.repbio.2018.07.001
- FOXCROFT, G.R., DYCK, M.K., RUIZ-SANCHEZ, A., NOVAK, S., DIXON W.T. 2008. Identifying useable semen. **Theriogenology** 70, 1324–1336.
- GARCIA, S. M. L. de; FERNÁNDEZ, C. G. **Espermatogênese**. In: Embriologia. 2ª ed. Porto Alegre: Artmed. 2001. Pg. 42-61.
- GENDELMAN, M.; ROTH, Z. Incorporation of coenzyme Q10 into bovine oocytes improves mitochondrial features and alleviates the effects of summer thermal stress on developmental competence. **Biology of Reproduction**, v. 87, n. 5, p. 118, 1-12, 2012.
- GHORBANKHANI, F. *et al.* Effect of nutritional state on semen characteristics, testicular size and serum testosterone concentration in Sanjabi ram lambs during the natural breeding season. **Animal Reproduction Science**, v. 153, p. 22-28, 2015.

- GILLAN, I.; EVANS, G.; MAXWELL, W. M. C. Flow cytometric evaluation of sperm parameters in relation to fertility potential. **Theriogenology**, v. 63, p.445–457. 2005.
- GILMORE, J. A. *et al.* Determination of plasma membrane characteristics of boar spermatozoa and their relevance to cryopreservation. **Biology of Reproduction**, v. 58, n. 1, p. 28-36, 1998.
- GONÇALVES, J. P. *et al.* Differential effects of Zincum metallicum on cell models. **Homeopathy**, v. 106, n. 3, p. 171-180, 2017.
- GUTHRIE, H. D.; WELCH, G. R. Effects of reactive oxygen species on sperm function. **Theriogenology**, v. 78, p. 1700-1708. 2012.
- HAFEZ, B., AND HAFEZ, E.S.E., 2008. **Reproduction in farm animals**. 7th ed. Wiley-Blackwell, USA.
- HAMMERSTEDT, R. H. Maintenance of bioenergetic balance in sperm and prevention of lipid peroxidation: a review of the effect on design of storage preservation systems. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 5, n. 6, p. 675-690, 1993.
- HIRST, S. J., HAYES, N. A., BURRIDGE, J., PEARCE, F. L. AND FOREMAN, J. C. (1993). Human basophil degranulation is not triggered by very dilute antiserum against human IgE. **Nature**, 366, 525- 527.
- HYTTEL, P.; GREVE, T.; CALLESEN, H. Ultrastructural aspects of oocyte maturation and fertilization in cattle. **Journal of Reproduction and Fertility**. Supplement, v. 38, p. 35-47, 1989.
- HYTTEL P, XU KP, SMITH S, GREVE T. 1986. Ultrastructure of in-vitro oocyte maturation in cattle. **J. Reprod. Fertil.** 78:615–25.
- HOLANDINO, C. *et al.* Modeling physical-chemical properties of high dilutions: an electrical conductivity study. **International Journal of High Dilution Research-ISSN 1982-6206**, v. 7, n. 25, p. 165-173, 2008.
- ISPADA, J. *et al.* 193 Insulin-like growth factor-1 exerts a thermoprotective role on mitochondrial function of bovine oocytes exposed to heat shock. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 24, n. 1, p. 209-209, 2011.
- JEYENDRAN, R.S. Development of an assay to assess the functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to other semen

- characteristics. **Journal Reproduction Fertility**, v. 70, n. 1, p. 219-228, 1984.
- JOHNSON, L. Spermatogenesis. In: CUPPS, P. T. **Reproduction in domestic animals**. San Diego: Academic Press, Inc., 1991. Cap. 5, p. 174-220.
- JONES, R. Sperm survival versus degradation in the mammalian epididymis: a hypothesis. **Biology of Reproduction** 71.5 (2004): 1405-1411.
- KALTENBACH, C. C.; DUNN, T. G. Endocrinologia da reprodução. In: HAFEZ: E. S. E. **Reprodução animal**. São Paulo: editora Manole, 1982. Cap. 5, p. 95-127.
- KOYAMA, H. *et al.* Effects of folic acid on the development and oxidative stress of mouse embryos exposed to heat stress. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 47, n. 6, p. 921-927, 2012.
- KRETZER, D. M. *et al.* Spermatogenesis. **Human Reproduction**, v. 13, n. suppl_1, p. 1-8, 1998.
- KRIDLI, R. T.; SAID, S. I. Libido testing and the effect of exposing sexually naive Awassi rams to estrous ewes on sexual performance. **Small Ruminant Research**, v. 32, n. 2, p. 149-152, 1999.
- KUMAR, H.; SRIVASTAVA, S.K.; YADAV, M.C.; VARSHNEY, J.P. Management of postpartum anoestrus in dairy animals with a homeopathic combination remedy. **Indian Journal of Animal Sciences**, v. 74, p. 739-740, 2004.
- KUROKI, T. *et al.* Astaxanthin ameliorates heat stress-induced impairment of blastocyst development *In vitro*:—astaxanthin colocalization with and action on mitochondria—. **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**, v. 30, n. 5, p. 623-631, 2013.
- KÜÇÜK, N. *et al.* Comparison of two different cryopreservation protocols for freezing goat semen. **Cryobiology**, v. 68, n. 3, p. 327-331, 2014.
- LENGER, K.; BAJPAI, R. P.; DREXEL, M. Delayed luminescence of high homeopathic potencies on sugar globuli. **Homeopathy**, v. 97, n. 3, p. 134-140, 2008.
- LEMMA, Alemayehu. Effect of cryopreservation on sperm quality and fertility. In: **Artificial insemination in farm animals**. InTech, 2011.
- LIMA, L F *et al.* Dynamized follicle-stimulating hormone affects the development of ovine preantral follicles cultured *in vitro*. **Homeopathy**, v. 102, n. 1, p. 41-48, 2013.

- LIMA, L F; ROCHA, R M P; ALVES, A M C V; CARVALHO, A A; CHAVES, R N; LOPES, C A P; BÁO, S N; CAMPELLO, C C; RODRIGUES, A P R; FIGUEIREDO, J R. Comparison between the additive effects of diluted (rFSH) and diluted/dynamized (FSH 6 cH) recombinant follicle-stimulating hormone on the *in vitro* culture of ovine preantral follicles enclosed in ovarian tissue. **Complementary Therapies in Medicine**, v. 25, p. 39-44, 2016a.
- LIMA, L F.; ROCHA, R M P; DUARTE, A B G.; BRITO, I R; SILVA, G M; RODRIGUES, G Q; NUNES-PINHEIRO, D C S; SALES, A D; MOURA, A A; WHEELER, M B; RODRIGUES, A P R; CAMPELLO, C C; FIGUEIREDO, J R. Unexpected effect of the vehicle (grain ethanol) of homeopathic FSH on the *in vitro* survival and development of isolated ovine preantral follicles. **Microscopy Research and Technique**, v. 80, p. 406-418, 2016b.
- MACÍAS-GARCÍA, B.; GONZALEZ-FERNANDEZ, L.; GALLARDO-BOLANOS, J. M.; PEÑA, F. J.; JOHANNISSON, A.; MORRELL, J. M. Androcoll-E large selects a subset of live stallion spermatozoa capable of producing ROS. **Animal Reproduction Science**, v. 132, p. 74-82. 2012.
- MAHATA, C. R. Dielectric dispersion studies of some potentised homeopathic medicines reveal structured vehicle. **Homeopathy**, v. 102, n. 4, p. 262-267, 2013.
- MAIA, M. S. Tecnologia de sêmen e inseminação artificial em caprinos. **Acta Veterinaria Brasilica**, v.8, n. 2, p. 389-395, 2014.
- MAITY, T.; GHOSH, D.; MAHATA, C. R. Effect of dielectric dispersion on potentised homeopathic medicines. **Homeopathy**, v. 99, n. 2, p. 99-103, 2010.
- MANN, T.; MANN, C. L. Male reproductive function and semen: themes and trends in physiology, biochemistry and investigative andrology. **Springer Science & Business Media**, 2012.
- MARSCHOLLEK, B.*et al.* Effects of exposure to physical factors on homeopathic preparations as determined by ultraviolet light spectroscopy. **The Scientific World Journal**, v. 10, p. 49-61, 2010.
- MARTINO, Nicola Antonio *et al.* Supplementation with nanomolar concentrations of verbascoside during *in vitro* maturation improves embryo development by protecting the oocyte against oxidative stress: a large animal model study. **Reproductive Toxicology**, v. 65, p. 204-211, 2016.

- MATYUS, L.; SZABO, J. R. G.; RESLI, I.; GASPAR JR, R.; DAMJANOVICH, S. Flowcytometric analysis of viability of bull sperm cells. **Acta Biochemical et Biophysica Acta**; v. 19, p. 209-214. 1984.
- MAYA-SORIANO, M. J. *et al.* Bovine oocytes show a higher tolerance to heat shock in the warm compared with the cold season of the year. **Theriogenology**, v. 79, n. 2, p. 299-305, 2013.
- MELLADO, M. **Goat Husbandry: Reproductive Management**. 2015.
- MENDOZA G, WHITE IG, CHOW P (1989). Studies of chemical components of Angora goat seminal plasma. **Theriogenology**, 32, 455-466.
- MIES FILHO, A. **Inseminação Artificial**. Editora Sulina. 6ª ed., v. 2, 750 p., Porto Alegre, 1987.
- MONTEIRO, A. W. U. *et al.* Biometria Testículo-Epididimária e a Reserva Espermática Epididimária de Ovinos Sem Padrão Racial Definido. **Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal**, v. 8, n. 1, p. 81-98, 2014.
- MORAES CN, NEVES JP, GONÇALVES PBD, OLIVEIRA JFC, SCHWEITZER CM. Criopreservação do sêmen ovino em *pellets* com etileno glicol. **Ciência Rural**, v.28, p.287-292, 1998.
- NEILD, D. M. *et al.* Lipid peroxide formation in relation to membrane stability of fresh and frozen thawed stallion spermatozoa. **Molecular Reproduction and Development**, v. 72, n. 2, p. 230-238, 2005.
- OLIVEIRA, I. R. S. *et al.* Correlações entre o teste hiposmótico e a avaliação clássica do sêmen de caprinos. **Ciência Animal Brasileira**, v. 14, n. 2, p. 216- 221, 2013.
- PAES, V. M. *et al.* Effect of heat stress on the survival and development of *in vitro* cultured bovine preantral follicles and on *in vitro* maturation of cumulus–oocyte complex. **Theriogenology**, v. 86, n. 4, p. 994-1003, 2016.
- PANTKE, P. *et al.* Development of a zona pellucida sperm binding assay for the assessment of stallion fertility. **Biology of Reproduction**, v. 52, n. monograph_series1, p. 681-687, 1995.
- PARAMIO, M.; IZQUIERDO, D. Recent advances in *in vitro* embryo production in small ruminants. **Theriogenology**, v. 86, n. 1, p. 152-159, 2016.
- PARKINSON, T. J. Seasonal variations in semen quality of bulls: correlations with environmental temperature. **The Veterinary Record**, v. 120, n. 20, p. 479-482, 1987.

- PAULA-LOPES, F., MILAZZOTTO, M., ASSUMPCAO, M., VISINTIN, J. 2008. Heat shock induced damage in bovine oocytes. **Reproduction, Fertility and Development**, 43, 208.
- PAULINO, P. V. R. *et al.* Body tissue and chemical component deposition in Nellore bulls, steers and heifers. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 38, n. 12, p. 2516-2524, 2009.
- PENITENTE-FILHO, J. M. *et al.* Correlation between sperm motility and hypoosmotic swelling test on cryopreserved goat semen. **MAGISTRA**, v. 27, n. 3/4, p. 468-473, 2017.
- PERKINS, A.; ROSELLI, C. E. The ram as a model for behavioral neuroendocrinology. **Hormones and Behavior**, v. 52, n. 1, p. 70-77, 2007.
- PESCH S, BERGMANN M. Structure of mammalian spermatozoa in respect to viability and cryopreservation. **Micron**, v.37, p.597-612, 2006.
- PICKETT, B. W. Factors affecting sperm production and output. **Equine Reproduction**, v. 78, p. 689-704, 1993.
- PRESTON, B. T. *et al.* Testis size, testosterone production and reproductive behaviour in a natural mammalian mating system. **Journal of Animal Ecology**, v. 81, n. 1, p. 296-305, 2012.
- PIRES, A.V.; RIBEIRO, C.V.D.M.; MENDES, C.Q. Aspectos nutricionais relacionados à reprodução. In: BERCHIELLI, T.T., PIRES, A.V., OLIVEIRA, S.G. **Nutrição de Ruminantes**. Jaboticabal: FUNEP, 2011. p. 537-563.
- PURDY, P. H. A review on goat sperm cryopreservation. **Small Ruminant Research**, v. 63, n. 3, p. 215-225, 2006.
- RAJKUMAR, R; SRIVASTAVA, S. K.; YADAV, M. C.; VARSHNEY, V. P.; VARSHNEY, J. P.; KUMAR, H. Effect of a Homeopathic complex on oestrus induction and hormonal profile in anoestrus cows. **Homeopathy**, v. 95, p. 131-135, 2006.
- RAMEY, D. W. *et al.* Homeopathy and science: a closer look. **Technology**, v. 6, n. 1-2, p. 95-105, 1999.
- REY, L. Thermoluminescence of ultra-high dilutions of lithium chloride and sodium chloride. **Physica A: Statistical mechanics and its applications**, v. 323, p. 67-74, 2003.

- ROYERE, D. *et al.* Chromatin alterations induced by freeze-thawing influence the fertilizing ability of human sperm. **International Journal of Andrology**, v. 14, n. 5, p. 328-332, 1991.
- ROSELLI, C. E. *et al.* Relationship of serum testosterone concentrations to mate preferences in rams. **Biology of Reproduction**, v. 67, n. 1, p. 263-268, 2002.
- SAKATANI, M.*et al.* Effects of purple sweet potato anthocyanins on development and intracellular redox status of bovine preimplantation embryos exposed to heat shock. **Journal of Reproduction and Development**, v. 53, n. 3, p. 605-614, 2007.
- SALVIANO, M. B.; SOUZA, J. A. T. Avaliação andrológica e tecnologia do sêmen caprino. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 32, n. 3, p. 159-67, 2008.
- SELVARAJU, S. *et al.* Effect of dietary energy on seminal plasma insulin-like growth factor-I (IGF-I), serum IGF-I and testosterone levels, semen quality and fertility in adult rams. **Theriogenology**, v. 78, n. 3, p. 646-655, 2012.
- SIEME, H. Semen evaluation. **Equine breeding management and artificial insemination**, p. 57-74, 2009.
- SILVA, C. T. L.; MCMANNUS, C.; RUNPE, R. Efeito da Pulsatilla nigricans aplicada em um ponto de acupuntura na redução do puerpério bovino. **Homeopatia Brasileira**. v. 7, n. 1, p. 13 - 21, 2001.
- SILVA PFN, GADELLA BM. Detection of damage in mammalian sperm cells. **Theriogenology**, v.65, p.958-978, 2006.
- SILVA, E. C. B.; GUERRA, M. M. P. Aspectos fundamentais da morfofisiologia e criopreservação espermática em pequenos ruminantes. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 36, n. 3, p. 181-187, 2012.
- SINGH BK. **Compêndio de andrologia e inseminação artificial em animais de fazenda**. São Paulo: Andrei Editora, 2006. 331p.
- SIQUEIRA, J. B. Relação da fertilidade de sêmen bovino congelado com testes de avaliação espermática “*in vitro*”. 2004. 77p. **Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária)** - Departamento de Veterinária, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2004.
- SMITH AH, POLGE C. Survival of spermatozoa at low temperatures. **Nature**, v.166, p.668-671, 1950.

- SMITH, M.C. (1986). Collection and evaluation of caprine semen. In: Morrow (editor), **Current Therapy in Theriogenology**, W.B. Saunders Company, Philadelphia, pp. 577-632.
- SMITH, C. W. The electrical properties of high dilutions. **Homeopathy**, v. 97, n. 03, p. 111-112, 2008.
- SOTO, P.; SMITH, L. C. BH4 peptide derived from Bcl-xL and Bax-inhibitor peptide suppresses apoptotic mitochondrial changes in heat stressed bovine oocytes. **Molecular Reproduction and Development**, v. 76, n. 7, p. 637-646, 2009.
- STANBENFELDT, G. H.; EDQVIST, L. Processos reprodutivos do macho. In: SWENSON, M. J.; REECE, W. O. **Dukes – fisiologia dos animais domésticos**. Rio de Janeiro: editora Guanabara Koogan S.A., 1996. Cap. 35, p. 603-614.
- VARNER, D. D. *et al.* Bacteriology of preserved stallion semen and antibiotics in semen extenders. **Theriogenology**, v. 50, n. 4, p. 559-573, 1998.
- VARNER, D. D.; VAUGHAN, S. D.; JOHNSON, L. Use of a computerized system for evaluation of equine spermatozoal motility. **American Journal of Veterinary Research**, v. 52, n. 2, p. 224-230, 1991.
- WAISSSE, S. Effects of homeopathic high dilutions on *in vitro* models: literature review. **Revista de Homeopatia**, v. 80, n. 3/4, p. 90-103, 2017.
- WATSON, P. F. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. **Animal Reproduction Science**, v. 60, p. 481-492, 2000.
- WOLF, U. *et al.* Homeopathic preparations of quartz, sulfur and copper sulfate assessed by UV-spectroscopy. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2011, 2011.
- ZHANG, S. *et al.* Body reserves affect the reproductive endocrine responses to an acute change in nutrition in mature male sheep. **Animal Reproduction Science**, v. 88, n. 3-4, p. 257-269, 2005.

CAPÍTULO I

A redação e formatação deste artigo foram procedidas segundo as normas do periódico *Animal Reproduction Science*, para o qual será submetido.

Can maintenance intake reduce production costs without compromising the reproductive performance in bucks?

M. A. S. Novaes^a; D. L. de Souza Netto^a; P. P. Almeida^b; V. H. R. Carvalho^a;
J. V. R. Lovatti^a; M. Machado-Neves^c; C. M. Veloso^a; C. A. A. Torres^a

^a *Department of Animal Science, Universidade Federal de Viçosa, Animal Reproduction Laboratory, 36570-900, Viçosa, MG, Brazil*

^b *Department of General Biology, Universidade Federal de Viçosa, Immunochemistry and Glycobiology Laboratory, 36570-900, Viçosa, MG, Brazil*

^c *Department of General Biology, Universidade Federal de Viçosa, Structural Biology Laboratory, 36570-900, Viçosa, MG, Brazil*

Abstract

Excessive intake of nutrients can damage the reproductive efficiency of male goats and increase production costs. Therefore, we aimed to compare the reproductive qualities of young Alpine bucks based on whether they were fed via maintenance intake or *ad libitum* intake. Ten young, uniform bucks between four to five months of age were used, with five animals being fed maintenance and five in *ad libitum* level, in a completely randomized design. Samples of blood and semen, as well as metabolic and hormonal evaluations, were collected per animal every two weeks until nine collections were completed. Fresh semen was evaluated, processed, frozen, and later analyzed in a flow cytometry in order to compare the sample's reactive oxygen, plasma membranes, acrosomal integrity, and lipid peroxidation of the cell membrane. Body condition score, sexual behavior, the

measurements and histomorphometry of the testis, as well as oxidative enzymes and carbonylated proteins were evaluated. It was verified that the animals in *ad libitum* presented higher body condition score ($3.32 \pm 0.08 \times 2.88 \pm 0.05$), sperm volume ($0.68 \pm 0.04 \times 0.52 \pm 0.03$ mL), and testis circumference ($25.2 \pm 0.21 \times 24.5 \pm 0.24$ cm) and volume ($121 \pm 5.83 \times 107 \pm 4.38$ cm³, left testicle; $116 \pm 5.26 \times 100 \pm 3.75$ cm³, right testicle). The ejaculates of the maintenance fed bucks presented an increase number of minor ($3.88 \pm 0.33 \times 3.44 \pm 0.29$) and total ($7.75 \pm 0.55 \times 7.20 \pm 0.42$) defects. No difference was verified in testosterone synthesis and expression of sexual behavior. Based on the results of this experiment, the provision of a maintenance diet can be used to reduce animal production costs and does not impair the sexual behavior or seminal quality of young Alpine bucks.

Keywords: animal reproduction, feeding level, flow cytometry, seminal quality; *ad libitum*.

1. Introduction

The production cost of the meat of small ruminants seems to remain a factor of great financial impact, representing 60 to 70 % of the total costs [1]. To optimize production systems, diets must be adjusted to meet the nutritional, compositional, and quantitative needs of the animals, while avoiding excessive spending and compromising animal performance [2].

In goat farms, poorly managed breeding animals ingest nutrients in quantities and proportions that are inadequate for their needs, often in excess [3,4]. *Ad libitum* feeding can implicate in overfeeding, which increases production costs and can result in reproductive problems [5,6], such as difficulty in effecting courtship and mating, alteration of gametes production [7], reduction of sperm production [8] and reduction of sexual activity [9].

The study aimed to observe the effect of the maintenance versus *ad libitum* intake of young Alpine bucks in the areas of sexual behavior, oxidative stress status, histomorphometry of the testis, as well as seminal, sperm, and metabolic parameters.

2. Materials and methods

2.1 Ethics committee

All procedures of animal handling were approved by the local Ethics Committee for Animal Use (case no. 027/2017) and were performed according to the Ethics principles of animal experimentation as established by the Brazilian Animal Experimentation College and the current law.

2.2 Local of experiment and animals

The animals were housed in Viçosa, Minas Gerais, Brazil, in the Caprine Sector of the Universidade Federal de Viçosa. Ten healthy Alpine bucks were used, with an initial mean body condition score of 2.5 to 3.0, with initial age between five and six months, with five animals per treatment. The bucks were kept in individual stalls, having free access to mineral salt and water. Before starting the experimental period, the animals were adapted for 30 days and weighed at the end of the adaptation phase, for four to five months. The control of endo and ectoparasites was carried out according to the sanitary program of the sector.

2.3 Treatments and food

The animals were randomly assigned to one of the treatments, in a completely randomized design. The total diet was formulated according to the Agricultural and Food Research Council (AFRC) [10], and composed of Tifton hay and concentrate based on corn and soybean meal (Table 1).

The same diet was provided for the animals of both treatments, varying only the amount supplied to the animals of each treatment. The dry matter intake (DMI) was initially estimated from body weight (BW), by the equation suggested by AFRC (1998): $DMI = 0.522 + 0.0135 * BW$. The treatments: i) maintenance intake (meeting the nutritional requirements for the category, according to AFRC, 1998); ii) *ad libitum* intake.

To obtain the maintenance consumption of the animals from the maintenance treatment, daily weighings were carried out until weight stabilization. From that moment, weekly weighings were carried out to adjust the consumption of these animals and to monitor bucks development. The hay and concentrate intake were recorded daily.

2.4 Processing of the Samples and Laboratory Analysis

On a daily basis, samples of hay and concentrate were collected, conditioned in plastic bags and, then, frozen. Concentrate ingredient samples were collected, which were also placed in plastic bags and frozen for further analysis. The same was made for the hay. The daily orts samples were clustered proportionally, every seven days, which consisted of one composed sample for each experimental diet. Then, the samples were partially dehydrated in a forced ventilated oven at 55 °C for 72 h; they were grounded in a knife mill using a one mm sieve, and were preserved in a jar with a lid and saved for future analysis. The chemical composition was analyzed according to Detmann (2010)[11].

2.5 Apparent Intake and Digestibility of Dry Matter and Dietary Nutrients

Two digestibility trials were done on the 31st and the 61st experimental days and lasted for ten days each: five days were designated for the animals' acclimation to titanium dioxide and the other five days for fecal and urine collection on the 6th, 8th and 10th days for digestibility trial aiming to obtain total samples from each animal. The indicator was provided from the first to the 10th days in the digestibility trial. The titanium dioxide was included in the concentrate in the ratio of 10 g of titanium dioxide to 990 g of concentrate aiming to obtain the ratio of hay and concentrate in the fecal excretion.

2.6 Blood collection and analysis

Blood samples were collected per animal every two weeks until nine collections were completed, by jugular vein puncture, using collection tubes

without anticoagulant, with clot activator. For further glucose analysis, another blood sample was collected in a collection tube with potassium fluoride. Immediately, the blood samples were centrifuged at 4000 g for 15 minutes, and serum samples were then taken and packed in microtubes (Eppendorf®) and frozen at -15 °C for determination of plasma glucose, total cholesterol, triglycerides, high density lipoprotein (HDL), total protein, albumin and urea nitrogen in an automatic biochemical analyzer (BS200E, Mindray, China) using Bioclin® kits. It was also analyzed the concentration of testosterone by immunoassay technique (Access® 2, Beckman Coulter) using Beckman Coulter kits®.

2.7 Semen collection, sexual behavior, and analysis of fresh semen

Samples of semen were collected in the morning using an estrus female restrained in a trunk for the goat species. At the same time, sexual behavior was observed and recorded, according to [12]. Progressive sperm motility and vigor were evaluated as recommended by CBRA (2013) [13].

The fresh semen samples were submitted to the hyposmotic test to determine the functional integrity of the sperm plasma membrane. Spermatozoa that responded to the test (reactive) with coiling or tail folding were considered normal after the addition of the hyposmotic solution, subtracting from this value the percentage of spermatozoa that presented a folded tail in the morphological evaluation. The methodology used was described by Bittencourt *et al.* (2005) [14].

For the sperm concentration, a 10 µL aliquot of the semen was taken, which was diluted in 1.99 mL of saline formaldehyde solution, resulting in a dilution factor of 1:200 (semen:solution). The number of spermatozoa was quantified using a Neubauer chamber and the total concentration of ejaculation was calculated. The value was found in cm³ (sperm/cm³), being converted to mL in a ratio of 1:1 (sperm/mL).

The longevity of fresh semen was evaluated by the thermoresistance test (TRT) consisting of placing 0.5 mL of diluted semen in a preheated microtube at 37 °C, evaluating the motility and vigor of the sperm every 30 min in a bath of 37 °C, totaling three h.

2.8 Semen cooling

The ejaculates were diluted in commercial medium (Botubov[®]), which was previously evaluated for their osmolarity. The osmotic pressure of the media used in the experiment was always as close as possible to the osmotic pressure of the seminal plasma (282 mOsm). After obtaining the final dilution, the ejaculates were packed in 0.25 mL plastic tube (IMV[®]) at room temperature and frozen in liquid nitrogen at -196 °C, at a concentration of 25×10^9 of sperm per straw. Ten straws were stored per animal at each harvest.

The plastic straws were placed in a glass test tube (15 mL), which was hermetically sealed. Subsequently, this tube was placed inside a plastic tube (240 mL) containing 120 mL of absolute alcohol, both kept at room temperature (24 °C), and placed in a refrigerator at 5 °C for 3 h, following the cooling curve (45 min) and equilibrium time of 2 h and 15 min.

2.9 Semen freezing

Freezing was carried out in liquid nitrogen vapor phase (-179 °C), placing the straws that were in equilibrium at 5 °C, on a platform screened at a height of five centimeters from liquid nitrogen for 15 min. After this period, the straws were immersed in tonitrogen. Afterward, the straws were conditioned in an appropriate canister and stored in criogenic container for further analysis.

2.10 Thawing and semen analysis

The straws were thawed in a 37 °C water bath for 30 sec, packed in 1.5 mL plastic tubes (Eppendorf[®]) and homogenized for immediate analysis of progressive motility and sperm vigor by a phase contrast microscopy, increasing by 200 X [15]. A semen sample from each harvest, after thawing, was submitted to the TRT to evaluate its motility after thermal stress. Progressive motility and sperm vigor were evaluated every 30 min until completetotal of 3 h incubation in a water bath at 37 °C (VLOGER *et al.*,

1991).The hyposmotic swelling test and sperm morphology were performed as described for the evaluation of fresh semen.

2.11 Flow cytometry

These analyses were performed in a FACSVerse™ Flow Cytometer (BD Biosciences) equipped with a 488 nm and 640 nm excitation lasers. The flow cytometer was calibrated using a fresh semen aliquot without any probe. The detected non-spermatoc particles (debris) were eliminated, sorting the population of interest. Particles with similar dispersion characteristics to spermatozoa but without sufficient DNA content were also excluded. All samples had 10,000 cells analyzed, at a rate of approximately 200 cells/sec.

All the probes were conjugated with propidium iodide (PI), to evaluate the production of intracellular hydrogen peroxide (Figure 1 – A and B) by DCFDA probe [16]. The plasma and acrosomal membrane integrity (Figure 1 – C and D) was evaluated by FITC probe, conjugated with PSA. In the end, the sperm membrane peroxidation (Figure 1 – E and F) was evaluated by C11-BODIPY^{581/591} probe [17].

2.12 Testicular biometry

The scrotal perimeter was measured by means of a tape measure in the middle region of the testicles, and, the testicular length and width were measured by a pachymeter. To measure the length, the testicles were considered and the tail of the epididymis discarded in the dorsoventral direction. The width was measured in the middle portion of the testis in the lateromedial direction.

2.13 Oxidative stress markers in the testis

For analysis of antioxidant enzymes, 100 mg of frozen testis were homogenized in phosphate buffered saline (PBS) and centrifuged at 3,500 x g (5 °C) for 10 min. The supernatant was used to analyze the activities of superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione S-transferase

(GST). SOD activity was estimated by the pyrogallol method based on the ability of this enzyme to catalyze the reaction of superoxide (O_2^-) and hydrogen peroxide (H_2O_2) [18]. CAT activity was assessed by measuring the rate of decomposition of H_2O_2 [19]. In addition, GST activity was estimated by spectrophotometry as described by [20], and calculated from the oxidation rate of NADPH. Lipid peroxidation was evaluated in the testis tissue by the levels of malondialdehyde (MDA). For this, the 100 mg aliquots were homogenized in PBS and incubated with thiobarbituric acid to evaluate the levels of thiobarbituric acid reactive substances [21]. Protein oxidation was also analyzed by quantification of carbonyl proteins in testicular pellets using the 2,4-dinitrophenylhydrazine (DNPH) method [22]. The concentration of total protein was obtained by using Bradford method [23].

2.14 Histological processing and tubular morphometry

The testis was completely immersed in Bouin solution for 24 h. Testicular fragments were selected from the testis periphery and were dehydrated in crescent ethanol series (70, 80, 90, and 100 %) and embedded in histological paraffin. Thickness of 7 μm was obtained using a rotary microtome (RM 2255, Leica), stained with hematoxylin and eosin, and qualitatively analyzed using Olympus CX40 optical microscope. Ten digital images of testicular parenchyma were obtained per animal using a photomicroscope (Olympus BX-50). They were used to measure seminiferous tubule and luminal diameters, as well as epithelium height, using the ImageJ software (Figure 2 – A and B).

2.15 Statistical analysis

The linear statistical model used was: $Y_{ij} = \mu + T_i + e_{ij}$, where:

Y_{ij} = experimental response measured under treatment i , in the j replications of treatment i , where $j > 1$.

μ = general mean;

T_i = treatment effects (feeding level);

e_{ij} = random error.

The data results were analyzed by SPSS analysis software (Statistical Package for the Social Sciences), using 0.05 as critical level of probability for a type error I.

3. Results

3.1 Diet intake

The dry matter intake ($P = 0.006$) and Tifton hay intake ($P = 0.001$) were higher in the *ad libitum* fed bucks, however, the concentrate intake was similar for both treatment animals. When the diet nutrients were compared, the crude protein ($P = 0.003$) and neutral detergent fiber intake ($P = 0.01$) were higher too in the *ad libitum* fed bucks. Similarly, the digestibility of the crude protein ($P = 0.015$) and neutral detergent fiber ($P = 0.049$) was higher for the same treatment animals (Table 2).

3.2 Body condition score and blood parameters

Body condition score ($P = 0.0001$) and serum levels of glucose ($P = 0.0001$) and triglycerides ($P = 0.022$) were higher in *ad libitum* fed bucks, while urea ($P = 0.002$) and albumin ($P = 0.019$) were lower in these same animals (Table 3). The other metabolic and hormonal parameters did not differ among the animals of both treatments.

3.3 Testis biometry and sexual behavior

Scrotal circumference ($P = 0.040$) and volume of the left ($P = 0.038$) and right ($P = 0.002$) testicles were higher in *ad libitum* fed bucks. Among the parameters for evaluating sexual behavior (Table 4), only the reaction time (Figure 3) differed between treatments ($P = 0.0182$), which were higher in *ad libitum* bucks.

3.4 Oxidative stress markers in testis and histomorphometry of the seminiferous tubules

Tissue fragments of the bucks left testicle for carbonylated protein, MDA, and for SOD, CAT and GST proteins were evaluated. Only the concentration of MDA differed ($P = 0.035$) among the animals of the two dietary treatments (Table 5), demonstrating that the diet does not interfere in the metabolism of the other antioxidant enzymes and carbonylated and total proteins in young Alpine bucks.

The tubular ($P = 0.0001$) and luminal diameter ($P = 0.002$) and epithelium height ($P = 0.0001$) were higher in *ad libitum* fed bucks than in the animals receiving maintenance diet (Table 5).

3.6 Seminal parameters and thermoresistance test

Sperm volume was higher in the *ad libitum* fed bucks ($P = 0.0001$). The color and appearance of the semen differed among the animals from both treatments, however, there was no difference regarding gross motility, sperm motility and vigor, and sperm concentration (Table 6). Sperm motility and vigor at 0 and 30 min times were higher than at other times (Table 7), indicating a gradual reduction of sperm motility and vigor for both animals from treatments over time. These parameters were higher in *ad libitum* fed bucks.

3.7 Sperm count in hyposmotic medium and spermatozoa defects

Fresh and frozen buck semen were more reactive in hyposmotic medium test (Table 8) in the maintenance than *ad libitum* fed animals. When compared by sperm morphology (Table 8), the fresh semen of maintenance bucks had 11 % and 7 % of minor and total defects than *ad libitum* bucks, respectively. In thawed semen, only the percentage of minor defects differed between treatments animals, being 7 % higher in maintenance bucks.

3.8 Flow Cytometry

Three fluorescent probes conjugated with PI were: DCFDA, FITC, and BODIPY (Figure 4). The PI label cells that are not viable. BODIPY is incorporated into biological membranes and responds to the attack of free radicals with an irreversible reaction that is quantified by flow cytometry (NEILD *et al.*, 2005). The FITC-PSA indicates the integrity of the acrosomal membrane [24]. The FITC-PSA combined with PI indicates viable cells, cells with both plasma and acrosomal membrane intact. In this experiment data, there was no difference between treatments with the analyzed probes, indicating that none of the nutrients in the treatments interferes with membrane lipids. DCFDA measure intracellular hydrogen peroxide. Upon penetration into the cell, it is oxidized by intracellular hydrogen peroxide emitting fluorescence that is detected by flow cytometer. No difference between groups in the spermatozoid population in DCFDA analysis, indicating that the treatments did not influence in hydrogen peroxide formation.

4. Discussion

The analysis of sexual behavior, oxidative stress status, histomorphometry of the testis, seminal, sperm, and metabolic analysis of young Alpine bucks submitted to maintenance and *ad libitum* feed intake treatments were evaluated. Shortly, the *ad libitum* fed bucks showed higher dry matter intake, body condition score, scrotal circumference and testis volume than the maintenance treated animals. However, sexual behavior, oxidative stress markers in testis, histomorphometry of the seminiferous tubules, seminal parameters, thermoresistance test, and sperm damages assessed by flow cytometry were similar between both treatments.

Goats constantly self-regulate crude protein and neutral detergent fiber levels, with minimal daily variations [25], tending to select dense diets. These diets can mitigate the fibrous carbohydrates intake, once high fibrous diets may affect energy intake since forage intake is lower [26]. The highest intake of dry matter and Tifton in the *ad libitum* fed bucks indicate a compensation of this animals consumption, possible by self-regulation to

meet the nutritional demand, mainly energy consumption. This was evidenced by the higher CPI and NDFI by these same goats, but not by EEI, which is the energetically more concentrated fraction of the diet.

The body score is the most practical way to evaluate the deposition of reserves by animals, especially fat [27]. Despite the significant difference in body score between treated animals, diet *ad libitum* did not cause overweight or characterized overfeeding in this experiment. Mellado (2014) suggests that for the best reproductive performance, the body score should be between moderate and good (scores 3-3.5) [28]. The mean of the *ad libitum* fed bucks was in this range and was higher than that of the maintenance animals, which was close to three. This difference did not compromise sexual activity in any aspect.

Nutrition can affect reproductive function in domestic ruminants [29]. Live weight and testicular size have been pointed out as general indicators of the production of viable spermatozoa in males. Our analysis showed that the circumference and volume of the left and right testicles were higher in the *ad libitum* fed bucks, which can be caused by the effect of higher nutrient intake on the gonads size. Additionally, these animals presented higher measures in the seminiferous tubules and sperm volume compared to maintenance animals. The scrotal circumference was similar to those described by Agga *et al.* (2011) and Lacuesta *et al.* (2015) for young Saanen male goats [30,31]. The testicular size is a practical variable to evaluate the reproductive growth status, spermatogenesis and seminal characteristics [32], characterizing changes in seminiferous tubule measurements and spermatogenesis efficiency, parameters directly influenced by nutrition [33]. When unbalanced or insufficient, nutrition can affect the quality and the seminal quantity [34]. Moreover, the testosterone concentration found in our study did not differ among treatment animals, which is similar to that found by Lacuesta *et al.* (2015), in young Saanen goats, and superior to that described by Farshad *et al.* (2012) [31,35]. However, serum testosterone concentration was positively correlated with increased sexual behavior and scrotal circumference [36], and may also affect spermatogenesis [37,38].

In the stress oxidative analysis, was observed an alteration only in MDA concentration, that was higher in maintenance fed bucks. However, the

membrane peroxidation evaluation by BODIPY though flow cytometry analysis showed no statistical difference in any of the nutrient available in the treatments. This indicates that none of them did changes in membrane lipids peroxidation. It is possible that MDA results indicate an already expected biochemical stress by cryopreservation [39], perhaps influenced by the controlled availability of nutrients in the maintenance treatment. Despite this, the other analyzes did not differ statistically. The production of antioxidant enzymes in the testicular cells prevents oxidative damage that could harm spermatozoid and reduce male fertility [40]. This reinforces the maintenance treatment as a viable alternative for goat reproductivity.

The conservation of sperm structures integrity was well observed in this study. The hyposmotic test is characterized by the influx of fluids into the spermatozoid in the hyposmotic condition until equilibrium is established [41]. Although fresh and frozen buck semen were more reactive in the maintenance group, flow cytometry showed no differences in the integrity of sperm and acrosomal membranes between treatment spermatozoa, measured by BODIPY and FITC-PSA, respectively. These analyses are important because they showed that maintenance treatment as a possible condition in breeding farms. The seminal longevity was also investigated. The functional status of the spermatozoa, following motility and vigor parameters, was evaluated through TRT [42]. In thawed semen, with 30 % of motility and 2 of vigor are the minimum values recommended [13]. These requirements were met only in the first 30 min in this data, possibly due to variations in semen quality of young goats [43].

In general, the analyzed spermatozoa presented low viability when compared with data from the literature on adult goats [12], however, oscillations in semen quality of young goats were already reported [43]. The ROS increase is known to be a cause of sperm cells damage [44], which reduce sperm viability. The analyzed semen showed high ROS production and a low percentage of peroxidation and rupture of sperm membranes. Increased ROS levels are commonly described in cryopreserved semen [45]. Therefore, this increase was not affected by the diet supply in this experiment.

In conclusion, our study identified that the maintenance intake is a viable alternative to replace the *ad libitum*-level intake without compromising seminal and reproductive quality, which can reduce the production costs of young Alpine bucks.

Acknowledgments

This work was supported by CNPq (Entity of the Brazilian Government returned to the Scientific and Technological Development). And to Alexandria Jeanne Wilson for kindly reviewing English

References

- [1] Gionbelli TRS, Veloso CM, Gionbelli MP, Novais MAS, Silva AL, Espechit CJB, *et al.* Utilization of castor bean meal treated with calcium hydroxide, fed wet or dry, by lambs. *Livest Sci* 2014. doi:10.1016/j.livsci.2014.08.012.
- [2] Pala A, Savaş T, Uğur F, Daş G. Growth Curves of Turkish Saanen Goats' Kids Grouped for Weight and Body Mass Index. *Arch Anim Breed* 2017. doi:10.5194/aab-48-185-2005.
- [3] Ribeiro SD de A. *Caprinocultura : criação racional de caprinos*. Nobel; 1997.
- [4] Combrink GC, Schoeman SJ. The influence of exercising rams on the lambing performance of a Merino ewe flock. n.d.
- [5] Dado RG, Abner ML, Arthur RD, Martz FA, Hatfield EE. Effect of Excess Feeding on Intake and Production by Dairy Cows Offered Mixed Diets. *Prof Anim Sci* 1998;14:152–8. doi:10.15232/S1080-7446(15)31816-7.
- [6] Olivares CCS, da Fonseca JF, de Almeida Camargo LS, de Souza-Fabjan JMG, Rodrigues ALR, Brandão FZ. Comparison of different methods of goat sperm selection and capacitation for optimization of assisted reproductive technologies. *Small Rumin Res* 2015;127:44–9.

doi:10.1016/j.smallrumres.2015.04.009.

- [7] Martin GB, Blache D, Miller DW, Vercoe PE. Interactions between nutrition and reproduction in the management of the mature male ruminant. *Animal* 2010. doi:10.1017/s1751731109991674.
- [8] Mwansa PB, Makarechian M. The effect of postweaning level of dietary energy on sex drive and semen quality of young beef bulls. *Theriogenology* 1991. doi:10.1016/0093-691X(91)90363-I.
- [9] Okolski A. Effect of different amounts of protein in the diet on sexual behaviour and properties of semen in rams. *Acta Agrar Silvestria Ser Zootech* 1975;15:101–21.
- [10] Council A and FR. *The nutrition of goats*. Wallingford: CAB International; 1998.
- [11] Detmann E. Fibra na nutrição de novilhasleiteiras. In: Pereira E, Pimentel P, Queiroz A, editors. *Novilhas leiteiras*, Fortaleza: Graphiti; 2010, p. 253–302.
- [12] Dias JCO, Veloso CM, Santos MC da R, Oliveira CTSAM de, Silveira CO, Iglesias E, *et al.* Seasonal variation in the reproductive activity of male goats raised under tropical climate conditions. *Rev Bras Zootec* 2017;46:192–201. doi:10.1590/s1806-92902017000300003.
- [13] Colégio Brasileiro de Reprodução Animal. *Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal*. 3rd ed. CRBA; 2013.
- [14] Bittencourt RF, Filho A de LR, Santos ADF, Chalhoub M, Alves SGG, Vasconcelos MF, *et al.* Utilização do Teste Hiposmótico para Avaliar a Eficácia de Diferentes Protocolos de Criopreservação do Sême Caprino. *Cienc Anim Bras* 2005;6:213–8.
- [15] Colégio Brasileiro de Reprodução Animal. *Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal*. 3rd ed. Belo Horizonte: Colégio Brasileiro de Reprodução Animal; 2013.
- [16] Macías-García B, González-Fernández L, Gallardo-Bolaños JM, Peña FJ, Johannisson A, Morrell JM. Androcoll-E large selects a subset of live stallion spermatozoa capable of producing ROS. *Anim Reprod Sci* 2012;132:74–82. doi:10.1016/j.anireprosci.2012.03.017.
- [17] Oliveira LZ, de Arruda RP, de Andrade AFC, Celeghini ECC, dos Santos RM, Beletti ME, *et al.* Assessment of field fertility and several *in*

- in vitro* sperm characteristics following the use of different Angus sires in a timed-AI program with suckled Nelore cows. *Livest Sci* 2012. doi:10.1016/j.livsci.2012.02.018.
- [18] Sarban S, Kocyigit A, Yazar M, Isikan UE. Plasma total antioxidant capacity, lipid peroxidation, and erythrocyte antioxidant enzyme activities in patients with rheumatoid arthritis and osteoarthritis. *Clin Biochem* 2005;38:981–6. doi:10.1016/j.clinbiochem.2005.08.003.
- [19] Aebi H. [13] Catalase *in vitro*. *Methods Enzymol* 1984. doi:10.1016/S0076-6879(84)05016-3.
- [20] Habig WH, Pabst MJ, Jakoby WB. Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J Biol Chem* 1974;249:7130–9.
- [21] Buege JA, Aust SD. Microsomal Lipid Peroxidation. *Methods Enzymol* 1978. doi:10.1016/S0076-6879(78)52032-6.
- [22] Levine RL, Garland D, Oliver CN, Amici A, Climent I, Lenz AG, *et al.* Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Methods Enzymol* 1990;186:464–78.
- [23] Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976;72:248–54.
- [24] Cross N, Morales P, Overstreet J, Hanson F. Two simple methods for detecting acrosome-reacted human sperm. *Mol Reprod Dev* 1986;15:213–26.
- [25] Pulina G, Avondo M, Molle G, Francesconi AHD, Atzori AS, Cannas A. Models for estimating feed intake in small ruminants. *Rev Bras Zootec* 2013;42:675–90. doi:10.1590/S1516-35982013000900010.
- [26] Huston JE, Engdahl BS, Bales KW. Intake and digestibility in sheep and goats fed three forages with different levels of supplemental protein. *Small Rumin Res* 1988;1:81–92. doi:10.1016/0921-4488(88)90047-8.
- [27] Caldeira RM, Belo AT, Santos CC, Vazques MI, Portugal A V. The effect of body condition score on blood metabolites and hormonal profiles in ewes. *Small Rumin Res* 2007. doi:10.1016/j.smallrumres.2005.08.027.

- [28] Mellado M, Vera A, Loera H. Reproductive performance of crossbred goats in good or poor body condition exposed to bucks before breeding. *Small Rumin Res* 1994. doi:10.1016/0921-4488(94)90008-6.
- [29] Gallego-Calvo L, Gatica MC, Guzmán JL, Zarazaga LA. Reproductive performance response to the male effect in goats is improved when doe live weight/body condition score is increasing. *Anim Reprod Sci* 2015. doi:10.1016/j.anireprosci.2015.03.001.
- [30] Agga GE, Udala U, Regassa F, Wudie A. Body measurements of bucks of three goat breeds in Ethiopia and their correlation to breed, age and testicular measurements. *Small Rumin Res* 2011. doi:10.1016/j.smallrumres.2010.09.011.
- [31] Lacuesta L, Orihuela A, Ungerfeld R. Reproductive development of male goat kids reared with or without permanent contact with adult females until 10 months of age. *Theriogenology* 2015. doi:10.1016/j.theriogenology.2014.09.001.
- [32] Daudu CS. Spermatozoa output, testicular sperm reserve and epididymal storage capacity of the Red Sokoto goats indigenous to northern Nigeria. *Theriogenology* 1984. doi:10.1016/0093-691X(84)90417-5.
- [33] Eloy AMX, Pereira EP. Estresse na reprodução de caprinos machos. *Rev Bras Reprod Anim* 2013;37:156–63.
- [34] NUNES JF. Fisiologia sexual do macho caprino. *Embrapa Caprinos e Ovinos-Artigo em An. Congr., Olinda - PE: Sociedade Pernambucana de Medicina Veterinária; 1982, p. 204–24.*
- [35] Farshad A, Yousefi A, Moghaddam A, Khalili B. Seasonal changes in serum testosterone, LDH concentration and semen characteristics in Markhoz goats. *Asian-Australasian J Anim Sci* 2012. doi:10.5713/ajas.2011.11179.
- [36] Hammoudi S, Aït-Amrane A, Belhamiti T, Khiati B, Niar A, Guetarni D. *African journal of biotechnology. vol. 9. Academic Journals; 2002.*
- [37] Roselli CE, Stormshak F, Stellflug JN, Resko JA. Relationship of Serum Testosterone Concentrations to Mate Preferences in Rams1. *Biol Reprod* 2005. doi:10.1095/biolreprod67.1.263.
- [38] Perkins A, Roselli CE. The ram as a model for behavioral

neuroendocrinology. Horm Behav 2007.
doi:10.1016/j.yhbeh.2007.03.016.

- [39] Chen YK, Liu QH, Li J, Xiao ZZ, Xu SH, Shi XH, *et al.* Effect of long-term cryopreservation on physiological characteristics, antioxidant activities and lipid peroxidation of red seabream (*Pagrus major*) sperm. *Cryobiology* 2010. doi:10.1016/j.cryobiol.2010.07.003.
- [40] Bansal AK, Bilaspuri GS. Impacts of oxidative stress and antioxidants on semen functions. *Vet Med Int* 2011. doi:10.4061/2011/686137.
- [41] Inamassu A, Vechi E, Lopes M. Viabilização do teste hipo-osmótico em cães e sua relação com outras variáveis espermáticas. *Rev Bras Reprodução Anim* 1999;23:302–4.
- [42] Barnabé R, Barnabé V, Viana W. Correlações entre motilidade progressiva e retenção do acrossoma em sêmen de bovinos, pós-descongelamento e após provas de termoresistência. *Fac Med Veterinária e Zootec* 1981;18:61–8.
- [43] Trejo G, Marquez M, Salazar C, Felipe S, Garcia L, Reyes R. Testis growth, seminal quality, sperm reserves and testosterone production in Alpine kids treated hormonally around puberty. *Int Congr Anim Reprod Artif Insemin* 1988;3:3pp.
- [44] Azevedo HC, Machado R, Simplício AA, Soares A. Características do sêmen caprino congelado: influência do tipo de palheta e concentração espermática. *Rev Científica Rural* 2000;5:148–57.
- [45] Góes PAA, Nichi M, Silva ROC, Perez EGA, Dalmazzo A, Gurgel JRC, *et al.* 75 Influence Of Cryopreservation On The Susceptibility Of Goat Sperm Against Different Reactive Oxygen Species. *Reprod Fertil Dev* 2011;23:143. doi:10.1071/RDv23n1Ab75.

SUPPLEMENTS

Tables

Table 1 – Composition of experimental diet on natural matter basis

Component	(%)	(% total diet)
Forage		60.00
Tifton hay	100.00	60.00
Concentrate		40.00
Cornmeal	75.54	30.22
Soybean meal	23.96	9.58
Calcareous	0.50	0.20
Chemical characteristics	Nutritional composition (% DM)	
CP		14.37
NDF _{ap}		44.31
EE		0.74
MM		4.71

CP = crude protein; NDF_{ap} = neutral detergent fiber (ashes and protein free); EE = ether extract; MM = mineral matter.

Table 2 - Mean and standard error of the mean of intake and digestibility of young Alpine bucks fed a standard diet

Variable	Maintenance	<i>Ad libitum</i>	P-value
Intake (g/day)			
Dry matter	557.2 + 26.8	825.6 + 67.4	0.006*
Tifton hay	441.8 ± 11.9	802.1 ± 74.0	0.001*
Concentrate	142.0 ± 3.16	149.7 ± 10.4	NS
Crude protein	76.5 ± 2.83	107.7 ± 6.90	0.003*
Ether extract	4.08 ± 0.19	5.40 ± 0.65	NS
Neutral detergent fiber	278.8 ± 20.4	442.6 ± 44.3	0.010*
Digestibility (%)			
Dry matter	93.2	95.3	NS
Crude protein	78.5	86.6	0.015*
Ether extract	58.7	63.8	NS
Neutral detergent fiber	79.7	86.1	0.049*

*Significant by ANOVA test (P < 0.05). NS = not significant.

Table 3 - Mean and standard error of the mean of the body condition score and blood parameters of young Alpine bucks by diet supply

Variable	Unit	Maintenance	<i>Ad libitum</i>	P-value
Body score	-	2.88 + 0.05	3.32 + 0.08	0.0001*
Glucose	(mg/dL)	57.5 ± 1.40	64.7 ± 1.42	0.0001*
Urea	(mg/dL)	37.4 ± 1.11	33.0 ± 1.09	0.002*
Cholesterol	(mg/dL)	71.8 ± 2.59	68.3 ± 1.84	NS
Triglycerides	(mg/dL)	20.1 ± 1.18	23.7 ± 1.61	0.022*
HDL	(mg/dL)	41.8 ± 1.18	39.7 ± 1.51	NS
Total protein	(g/dL)	5.93 ± 0.08	6.00 ± 0.06	NS
Albumin	(g/dL)	3.39 ± 0.03	3.31 ± 0.02	0.019*
Testosterone	(ng/mL)	7.76 ± 0.66	6.70 ± 0.73	NS

*Significant by Student's t-test (P < 0.05). HDL = high density lipoprotein. NS = not significant.

Table 4 - Mean and standard error of the mean of the testicular measures and sexual behaviour of young Alpine bucks by diet supply

Testicular measures	Maintenance	<i>Ad libitum</i>	P-value
Scrotal circumference (cm)	24.5 ± 0.24	25.2 ± 0.21	0.040*
Volume of left testicle (cm ³)	107 ± 4.38	121 ± 5.83	0.038*
Volume of right testicle (cm ³)	100 ± 3.75	116 ± 5.26	0.002*
Sexual behaviour	(%)	(%)	P-value
Licking and smelling the urogenital region of the female	91.4 (32/35)	82.9 (29/35)	NS
Flehmen response	11.4 (4/35)	2.9 (1/35)	NS
Hitting or scraping the hull on the floor	17.1 (6/35)	28.6 (10/35)	NS
Nudging the female	20.0 (7/35)	34.3 (12/35)	NS
Vocalization	0.0 (0/35)	5.7 (2/35)	NS
Externalization and tongue retraction	42.9 (15/35)	62.9 (22/35)	NS
Erection and penis exposure	91.4 (32/35)	94.3 (33/35)	NS
Mounting reflex	88.6 (31/35)	88.6 (31/35)	NS
Sexual interest after mating (service)	14.3 (5/35)	14.3 (5/35)	NS
Number of false mounts	1.00 ± 0.24	1.49 ± 0.35	NS

*Significant by Student's t-test (P < 0.05). NS = not significant.

Table 5 - Mean and standard error of the mean of reactive oxygen species, carbonylated protein and malondialdehyde, and total testis and histomorphometry of seminiferous tubules in testis of young goats of the Alpine buck by diet supply

Parameters of oxidative status	<i>Maintenance</i>	<i>Ad libitum</i>	P-value
Superoxide dismutase	1.42 ± 0.11	1.01 ± 0.19	NS
Catalase	4,44 ± 0.41	4.34 ± 0.57	NS
Glutathione S-transferase	23.9 ± 4.05	17.9 ± 2.05	NS
Carbonylated protein	2.86 ± 0.33	4.32 ± 1.96	NS
Malondialdehyde	4.35 ± 0.69	2.04 ± 0.41	0.035*
Histomorphometry			
Tubular diameter (µm)	135.4 ± 1.30 ^b	142.4 ± 1.47 ^a	0.0001**
Lumen diameter (µm)	60.9 ± 1.00 ^b	68.2 ± 2.12 ^a	0.002**
Epithelium height (µm)	39.32 ± 0.50 ^b	44.3 ± 0.66 ^a	0.0001**

^{a,b}Different superscript letters in the same row indicate difference between these measurements. *Significant by Student's t-test (p < 0.05). **Significant by ANOVA (p < 0.05). NS = not significant.

Table 6 - Mean and standard error of the mean of the seminal parameters of young Alpine bucks by diet supply

Variable	Diet supply		P-value
	Maintenance	<i>Ad libitum</i>	
Sperm volume (mL)	0.52 ± 0.03	0.68 ± 0.04	0.0001*
Color	A (8.60 %). B (49.5 %) e C (41.9 %)	A (31.5 %). B (51.1 %) e C (17.4 %)	0.0001**
Appearance	A (10.8 %). B (63.4 %) e C (25.8 %)	A (29.3 %). B (59.8 %) e C (10.9 %)	0.0001**
Gross motility (1-5)	2.69 ± 0.12	2.33 ± 0.15	NS
Sperm motility (0-100)	74.8 ± 1.95	68.9 ± 2.92	NS
Sperm vigor (1-5)	3.37 ± 0.09	3.18 ± 0.12	NS
Sperm concentration (10 ⁹ sperm/mL)	2.39 ± 0.17	2.17 ± 0.17	NS

*Significant by Student's t-test (p < 0.05); ** Chi-square (p < 0.05). Color (A: yellowish; B: yellow-whitish; and C: white). Appearance (A: watery; B: milky; and C: creamy).

Table 7 - Mean and standard error of the mean of the sperm motility and vigor by thermoresistance test of young Alpine bucks by diet supply

Evaluation time	Sperm motility		Sperm vigor	
	Maintenance	<i>Ad libitum</i>	Maintenance	<i>Ad libitum</i>
0	36.6 ± 2.38 ^A	33.3 ± 2.64 ^A	2,67 ± 0,13 ^{aA}	2,57 ± 0,13 ^{bA}
30	28.1 ± 2.68 ^{aAB}	25.5 ± 2.56 ^{bAB}	2.29 ± 0.16 ^{bAB}	2.30 ± 0.15 ^{aAB}
60	21.8 ± 2.55 ^{BC}	19.2 ± 2.34 ^{BC}	1.94 ± 0.17 ^{BC}	2.13 ± 0.15 ^{AB}
90	16.3 ± 2.37 ^{aCDE}	15.2 ± 2.30 ^{bCDE}	1.61 ± 0.18 ^{bCDE}	1.63 ± 0.19 ^{aBCD}
120	12.6 ± 2.14 ^{aCDE}	10.0 ± 1.63 ^{bDE}	1.23 ± 0.17 ^{bDE}	1.33 ± 0.18 ^{aCD}
150	9.35 ± 1.75 ^D	8.00 ± 1.43 ^D	1.03 ± 0.16 ^{bD}	1.17 ± 0.17 ^{aCD}
180	5.97 ± 1.24 ^{aE}	5.83 ± 1.22 ^{bE}	0.65 ± 0.11 ^E	0.87 ± 0.16 ^D

*Significant by Tukey test ($p < 0.05$). Lowercase letters differ on the same line, while uppercase letters differ in the same column.

Table 8 - Mean and standard error of the mean of the sperm count in hyposmotic medium and major, minor and total sperm defects of young Alpine bucks by diet supply

Semen	Sperm count		Sperm defects		
		Reactive	Major	Minor	Total
Fresh					
	Maintenance	23,6 ^A	3.86 ± 0.34 ^A	3.88 ± 0.33 ^A	7.75 ± 0.55 ^A
	<i>Ad libitum</i>	22,3 ^B	3.74 ± 0.64 ^A	3.44 ± 0.29 ^B	7.20 ± 0.42 ^B
Thawed					
	Maintenance	25,4 ^A	4.96 ± 0.35 ^A	5.70 ± 0.22 ^A	10.7 ± 0.41 ^A
	<i>Ad libitum</i>	19,9 ^B	5.25 ± 0.40 ^A	5.30 ± 0.32 ^B	10.6 ± 0.40 ^A

* Significant by Student's t-test ($P < 0.05$). Uppercase letters differ in the same column.

Figures

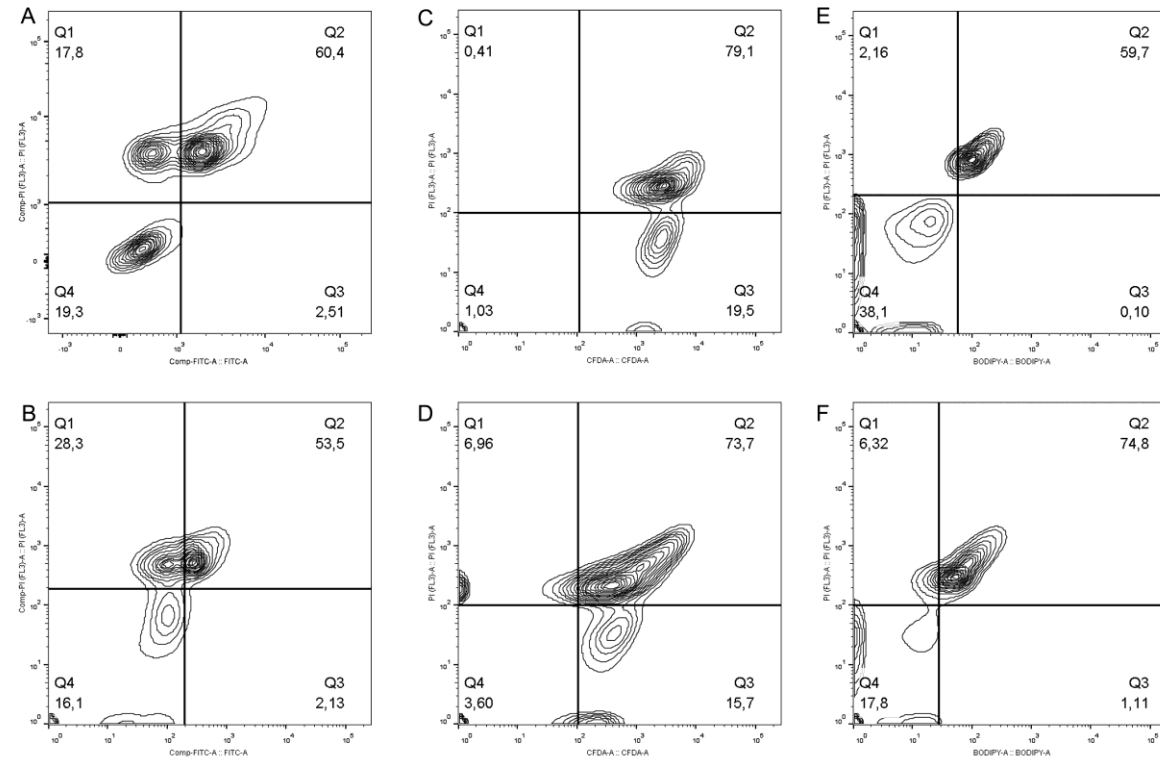


Figure 1. Spermatozoa populations analyzed by flow cytometry for plasma membrane integrity using propidium iodide (PI) probe conjugated with fluorescein isothiocyanate (FITC) probe for acrosomal membrane integrity (A and B), with dichlorofluorescein (DCF) probe for hydrogen peroxide presence (C and D), and with boron-dipyrromethene (BODIPY) probe for lipid peroxidation (E and F). A, C and E = maintenance diet. B, D and F = *ad libitum* diet.

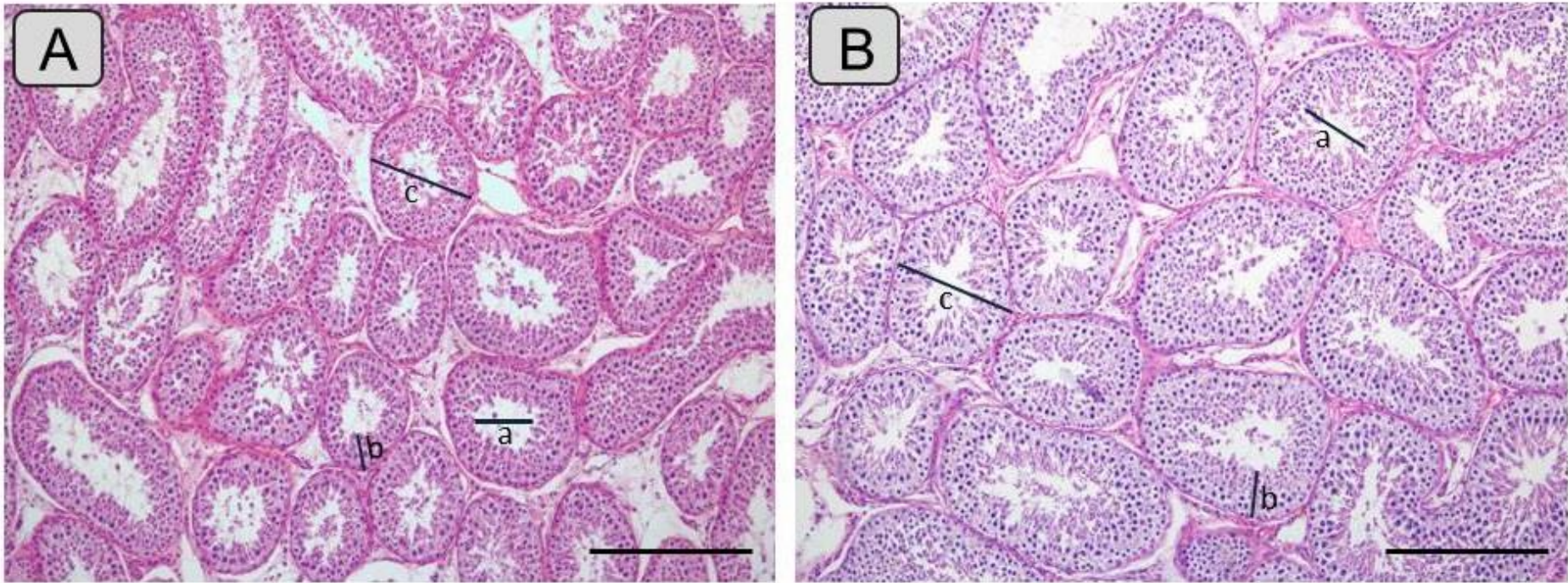


Figure 2. Luminal diameter (a), epithelium height (b) and seminiferous tubule diameter (c) by diet supply. A = maintenance diet. B = *ad libitum* diet.

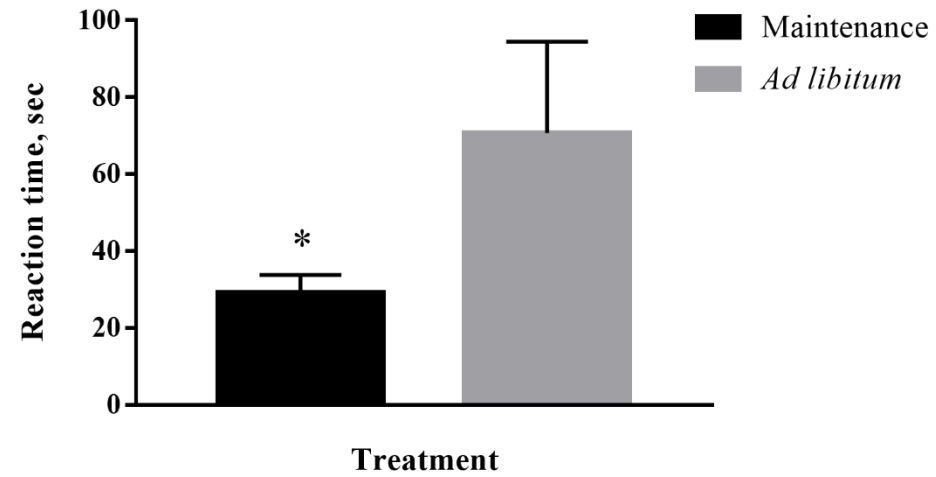


Figure 3. Reaction time (sec) of Young Alpine bucks by diet supply.

*Significant by Mann-Whitney test (P = 0.0182).

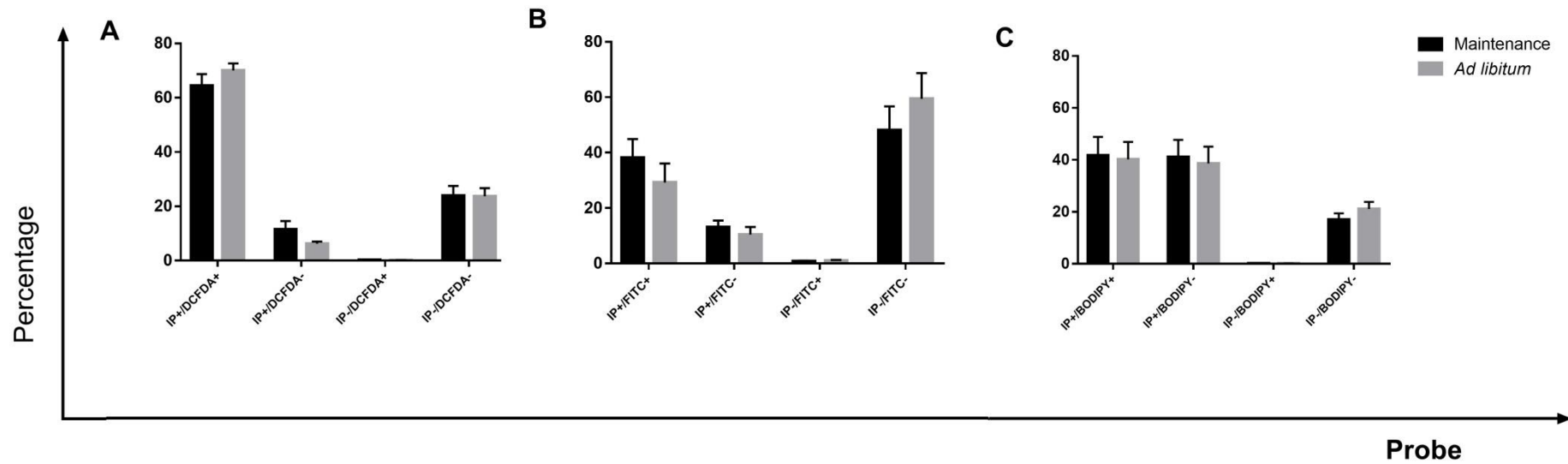


Figure 4. Intracellular hydrogen peroxide presence, acrosomal membrane integrity and membrane lipid peroxidation of the semen of young Alpine bucks fed two different diet supply by flow cytometry. DCFDA = dichlorofluorescein (A); FITC = fluorescein isothiocyanate (B); BODIPY = boron-dipyrromethene (C). Significant by ANOVA ($P < 0.05$).

CAPÍTULO II

A redação e formatação deste artigo foram procedidas segundo as normas do periódico *Animal Reproduction*, para o qual será submetido.

Quality of first and second cryopreserved ejaculates collected from young Alpine bucks

Marco Aurélio Schiavo Novaes^{1,3}; Domingos Lollobrigida de Souza Netto¹; Palloma Porto Almeida²; Victor Hugo Rabelo Carvalho¹; João Vitor Ribeiro Lovatti¹; Ciro Alexandre Alves Torres¹

³Corresponding author:

54 Vereador José Valentino da Cruz St, 702 apartment, Viçosa, MG, Brazil; +5531994778651; marcoaurelioschiavo@gmail.com

ABSTRACT

Discarding the first ejaculate as an alternative for improving seminal quality is recommended, especially when semen should be used for cryopreservation. This recommendation has not been used for young bucks. Therefore, the aim of this study was to compare the quality of the first and second ejaculates by flow cytometry. Ten young and uniform bucks were used, between five and six months of age, in a completely randomized design. Semen samples were collected from the bucks every three or four days until a total of five samples were collected from each animal per treatment. The collected semen was processed fresh and frozen, which were later analyzed by flow cytometry to evaluate the production of reactive oxygen species, plasma and acrosomal membrane integrity and lipid peroxidation of the plasma membrane. None of these analyses differed among treatments. The ejaculates also did not differ for the macro and microscopic seminal parameters, the resistance test or the reactivity in the hyposmotic medium. However, the first ejaculate had a higher percentage of minor and total defects. The first and second

ejaculates showed similar seminal qualities but appeared to be affected by different factors reducing the viability.

Keywords: cryopreservation; ejaculate order; flow cytometry; lipid peroxidation; ROS

1. Introduction

The discard of the first ejaculate has been used as an alternative to improve seminal quality of several species and reduce seminal contaminants, aiming an adequate cryopreservation (Gibbons *et al.*, 2009, Aquino *et al.*, 2014; Eljarah *et al.*, 2017). Non-ejaculated sperm are stored in the tail of the epididymides and *ampulla* of *ductus deferens*, and are gradually eliminated by urine or undergo cellular degeneration (Hafez, 1995), therefore, reducing the seminal viability of the first ejaculates after a period of sexual rest.

Despite discarding the first ejaculate be a common practice, previous researches point a decrease in sperm quality after the first, fourth and fifth ejaculates (Shamsuddin *et al.*, 2000; Martins *et al.*, 2006), therefore, the evaluation of seminal quality between the first and second ejaculates seems to lack studies that are more conclusive.

The flow cytometry (FC) allows the analysis of seminal quality through multiple surface and intracellular parameters. The FC uses fluorescent probes to evaluate the integrity and peroxidation of plasma and acrosomal membranes, mitochondrial potential and the production of reactive oxygen species (ROS) (Baumber *et al.*, 2000; Hossain *et al.*, 2011), with high reproducibility and capable of analyzing a large number of samples (Basiji *et al.*, 2007). This allows the correlation between cell parameters and potential fertilizer capacity more accurately (Hossain *et al.*, 2011).

For these reason, we aimed to compare the seminal quality of the first and second ejaculates of the young Alpine bucks submitted to maintenance diet treatment using flow cytometry analysis.

2. Materials and methods

2.1 Local and animals

The experiment was conducted in the Goat Production Sector of the Universidade Federal de Viçosa from June to October 2017. Ten clinically healthy Alpine bucks were used, with a mean body condition score of 2.5 to 3.0, with initial age between five and six months. The bucks were kept in individual stalls, having free access to mineral salt and water, being adapted for 30 days. The control of endo and ectoparasites was carried out according to the sanitary program of the sector. All procedures of animal handling were approved by the local Ethics Committee for Animal Use (case no. 030/2017).

2.2 Diet

The diet was formulated according to the AFRC (1998), and was composed of Tifton hay and concentrate based on corn and soybean meal, in order to simulate a standard diet (Table 1).

2.3 Semen and treatments

Before the experimental period, the animals were submitted to andrological examinations according to the Andrological Examination and Evaluation of Animal Semen Manual of the Brazilian College of Animal Reproduction (CBRA, 2013). The animals were assigned to one of the treatments, in a completely randomized design (CRD). The treatments were (i) first ejaculate and (ii) second ejaculate. The semen collection was carried out every three or four days, in a total of five ejaculates per animal.

2.4 Semen collection and analysis of fresh semen

Samples of semen were collected in the morning using an estrus females restrained in a trunk for the goat species, according to the method described by Dias *et al.* (2017). The first and second ejaculates were collected sequentially. Progressive sperm motility and vigor were evaluated as recommended by CBRA (2013).

The fresh semen samples were submitted to the hyposmotic test to determine the functional integrity of the sperm plasma membrane. Spermatozoa that responded to the test (reactive) with coiling or tail folding were considered normal after the addition of the hyposmotic solution, subtracting from this value the percentage of spermatozoa that presented a folded tail in the morphological evaluation. The methodology used was described by BITTENCOURT *et al.* (2005).

For the sperm concentration, a 10 µL aliquot of the semen was taken, which was diluted in 1.99 mL of saline formaldehyde solution, resulting in a dilution factor of 1:200 (semen:solution). The number of spermatozoa was quantified using a Neubauer chamber and the total concentration of ejaculation was calculated. The value was found in cm³ (sperm/cm³), being converted to mL in a ratio of 1:1 (sperm/mL).

The longevity of fresh semen was evaluated by the thermoresistance test (TRT) consisting of placing 0.5 mL of diluted semen in a preheated microtube at 37 °C, evaluating the motility and vigor of the sperm every 30 min in a bath of 37 °C, totaling three h.

2.5 Semen cooling

The ejaculates were diluted in commercial medium (Botubov[®]), which was previously evaluated for its osmolarity. The osmotic pressure of the media used in the experiment was always as close as possible to the osmotic pressure of the seminal plasma (282 mOsm). After obtaining the final dilution, the ejaculates were packed in 0.25 mL plastic tube (IMV[®]) at room temperature and frozen in liquid nitrogen at -196 °C, at a concentration of 25x10⁶ of sperm per vial. Ten reeds were stored per animal at each harvest.

The plastic straws were placed in a glass test tube (15 mL), which was hermetically sealed. Subsequently, this tube was placed inside a plastic tube (240 mL) containing 120 mL of absolute alcohol, both kept at room temperature (24 °C), and placed in a refrigerator at 5 °C for three h, following the cooling curve (45 min) and equilibrium time of two h and 15 min.

2.6 Semen freezing

Freezing was carried out in liquid nitrogen vapor phase (-179 °C), placing the straws that were in equilibrium at 5 °C, on a platform screened at a height of five centimeters from liquid nitrogen for 15 min. After this period, the straws were immersed in to nitrogen. Afterward, the straws were conditioned in an appropriate canister and stored in criogenic container for further analysis.

2.7 Thawing and semen analysis

The straws were thawed in a 37 °C water bath for 30 sec, packed in 1.5 mL plastic tubes (Eppendorf®) and homogenized for immediate analysis of progressive motility and sperm vigor by a phase contrast microscopy, increasing by 200 X (CBRA, 2013). A semen sample from each harvest, after thawing, was submitted to the TRT to evaluate its motility after thermal stress. Progressive motility and sperm vigor were evaluated every 30 min until complete total of 3 h incubation in a water bath at 37 °C (VLOGGER *et al.*, 1991). The hyposmotic swelling test and sperm morphology were performed as described for the evaluation of fresh semen.

2.8 Flow cytometry

These analyses were performed in a FACSVerse™ Flow Cytometer (BD Biosciences) equipped with a 488 nm and 640 nm excitation lasers. The flow cytometer was calibrated using a fresh semen aliquot without any probe. The detected non-spermatoc particles (debris) were eliminated, sorting the population of interest. Particles with similar dispersion characteristics to spermatozoa but without sufficient DNA content were also excluded. All samples had 10,000 cells analyzed, at a rate of approximately 200 cells/sec.

2.8.1 Evaluation of plasmatic and acrosomal membrane integrity (PI/FITC-PSA)

To evaluate the integrity of the plasmatic and acrosomal membrane, the protocol was followed with modifications (Oliveira *et al.*, 2012). An aliquot of 150 µL of semen diluted in PBS (5×10^6 sperm/mL) was incubated with 10 µL of FITC-PSA (100 µg/mL), to analyze acrosomal integrity, and 3 µL of PI (0.5 mg/mL), to analyze

spermatic plasma integrity, in plastic microtubes (2 mL) placed in a 37 °C water bath for 10 min. Then, 150 µL of PBS was added and read out on the flow cytometer.

2.8.2 Evaluation of the production of intracellular hydrogen peroxide (DCFDA/PI)

In order to evaluate the production of intracellular hydrogen peroxide, a protocol was proposed by Macías-García *et al.* (2012). Briefly, an aliquot of 500 µL of the sample diluted in PBS medium (5×10^6 sperm/mL) was added to a microtube (2.0 mL) in a heated water bath (37 °C) and stained with 0.5 µL DCFDA (1 mg/mL) for 30 min. After this period, 150 µL of the incubated sample was stained with 3 µL of PI, remaining incubated for another five min, 150 µL of PBS was then added and read by the flow cytometer.

2.8.3 Evaluation of sperm membrane peroxidation (BODIPY)

For the analysis of membrane peroxidation, the protocol proposed by (Oliveira *et al.*, 2012) was followed. A 500 µL aliquot of the semen diluted in PBS medium (5×10^6 sperm/mL) was added to a microtube (2.0 mL) in a heated water bath (37 °C) and stained with 0.5 µL of the C11-BODIPY^{581/591} (1 mg/mL, Annex A) for 30 min at 37 °C, to analyze the attack of free radicals in biological membranes. After this period, a 150 µL aliquot of the sample was stained with 3 µL of PI (0.5 mg/mL) as a marker of the damaged plasma membrane cells, remaining incubated for 5 min. Subsequently, 150 µL of PBS medium was added to the sample for reading at the flow cytometer.

2.9 Statistical analysis

The linear statistical model used was: $Y_{ij} = \mu + T_i + e_{ij}$, where:

Y_{ij} = experimental response measured under treatment i , in the j replications of treatment i , where $j > 1$.

μ = general mean;

T_i = treatment effects (first or second ejaculate);

e_{ij} = random error.

The data results were analyzed through SPSS software (Statistical Package for the Social Sciences), adopting 0.05 as critical level of probability for a type I error.

3. Results

3.1 Semen analysis

3.1.1 Semen analysis and thermoresistance test

The sperm concentration was higher for the first ejaculate. The other macro and microscopic parameters were not different (Table 2) among the ejaculates. Motility and vigor were evaluated by a thermoresistance test through 30 min for a total of 3 hours. There was a gradual reduction on these parameters in time. All times were different from each other but were equal among ejaculates (Table 3).

3.1.1 Plasmatic membrane integrity and sperm morphology

The evaluation of fresh and frozen semen in hyposmotic medium (Table 4) identified differences between the percentage of reactive and non-reactive spermatozooids, both in the first and second ejaculates. Although, there was no difference between treatments. When compared by morphology (Table 5), the second ejaculate did not differ from fresh semen for any of the variables evaluated. However, the first ejaculate had a higher percentage of minor and total defects than the second one.

3.2 Flow Cytometry

3.2.1 Plasmatic and acrosomal membrane integrity

Propidium iodide (PI) (Mátyus *et al.*, 1984), and fluorescein isothiocyanate-labeled *Pisum sativum* agglutinin (FITC-PSA) (Cross *et al.*, 1986) were used for analyze the integrity of the spermatid plasma and acrosomal membranes (Fig. 1A – B).

There was only difference between the ejaculates in the population where the spermatozoa were alive and with membrane damage, which was higher in the second ejaculate. When compared to the populations, the spermatozoa in this analysis presented the most part dead and with damage to the plasma and acrosomal membranes (Table 6).

3.2.2 Intracellular hydrogen peroxide production

The production of intracellular hydrogen peroxide was evaluated using the fluorophore dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCFDA), which, upon penetration into the cell, is oxidized by intracellular hydrogen peroxide emitting green fluorescence (Fig. 1C – D).

There was only a difference in the population of spermatozoa that was dead and without hydrogen peroxide, being higher in the first one than in the second ejaculate. In this analysis, most spermatozoa were dead and had hydrogen peroxide, which did not differ between treatments (Table 6).

3.2.3 Sperm membrane peroxidation

The evaluation of sperm membrane peroxidation was performed using the C11-BODIPY^{581/591} (4,4-difluoro-5-(4-phenyl-1,3-butadienyl)-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacene-3-undecanoic acid), a probe that is readily incorporated into biological membranes (Neild *et al.*, 2005) and responds to the attack of free radicals with an irreversible reaction that is quantified by flow cytometry as green fluorescence (Aitken *et al.*, 2007) (Fig. 1E – F).

All populations differed between the first and second ejaculates. The second ejaculate presented a higher number of live spermatozoa, but also a higher peroxidation. When the populations of each ejaculate were evaluated within each probe, all of them differed for all probes and ejaculates (Table 6).

4. Discussion

Variations in seminal quality reflected directly in reproductive capability. Ejaculate volume, sperm motility, morphology, and concentration are used to achieve this qualification. The analysis of sperm thermoresistance and morphology, plasmatic and acrossomal membrane integrity, intracellular hydrogen peroxide production and sperm membrane peroxidation was evaluated to the first and second cryopreserved ejaculates of young Alpine bucks. Shortly, the sperm concentration, and minor and total spermatozoa defects was higher to the first ejaculate. The percentage of live spermatozoa was superior in the second ejaculate, however the lipid peroxidation was also higher in these treatment. All the other parameters evaluated by flow cytometry were similar for both treatments.

Studies indicate variations in sperm motility and concentration after periods of sexual rest. In the same way, it was verified that during the collection periods, the percentage of viable cells decreased (Valença *et al.*, 2007). Mayorga-Torres *et al.* (2016) verified a reduction in sperm volume, motility, and concentration from one collection to another, in a short period of time, as in the present study, demonstrating the existence of two seminal profiles. The first collection was more concentrated and bulky in relation to the second one (Azevedo *et al.*, 2000). Sperm volume, motility, and concentration in both ejaculates were above the minimum recommended by the CBRA and the last two parameters were in agreement with the literature about young Alpine bucks (CBRA, 2013; Turri *et al.*, 2016).

In the present data, recommendations were met only within the first 30 min of TRT. The presence of spermatozoa in the semen of young goats is very variable (Trejo *et al.*, 1988), as well as their quality. In this case, this is corroborated by the low reactivity of these cells to the hyposmotic test, both in fresh and frozen semen, thus evidencing low cell membrane integrity, as defined by Santos *et al.* (2001). The data was lower than the values obtained by Santos *et al.* (2006), but similar to those obtained by (Oliveira *et al.* (2013), working with adult goats.

The production of ROS by spermatozoa is a normal physiological process necessary for the occurrence of sperm capacitation and the acrosomal reaction (Olivares *et al.*, 2015). However, excessive ROS can generate oxidative stress and consequent DNA damage, as well as the lipid peroxidation of the sperm membrane, leading to a reduction in sperm motility (Silva, 2011). The integrity of the plasma and acrosomal membranes is also of paramount importance for the evaluation of the animal's reproductive capability (Borg *et al.*, 1997).

To perform the freezing, the semen is pre-cooled, reducing the temperature from approximately 37 °C to 5 °C, which often causes alteration of normal patterns of sperm motility and vigor, as well as damage to plasma and acrosomal membranes (Squires *et al.*, 1999). The evaluation of the longevity of the semen is made through the TRT (Santos *et al.*, 2006), in which the functionality of the plasma membrane is verified. The CBRA recommends that the thawed semen has to be used only when it has sperm motility above 30 % and vigor above 2 (CBRA, 2013).

Sperm viability was lower in the first ejaculate, which presented higher sensitivity for membrane integrity. The morphology analysis demonstrated a higher percentage of minor and total spermatozoa defects in the first ejaculate compared to fresh semen and second ejaculate. This indicates that the development of these spermatozoa may have been compromised in the spermatogenesis (Garcia, 2004) or have had increased susceptibility of these to cryopreservation (Nöthling and Irons, 2008), especially with respect to the integrity of plasma and acrosomal membranes (Ozkavukcu *et al.*, 2008).

The second ejaculate although it presented greater number of viable cells, also had the higher membrane peroxidation. Some studies indicate that the increased frequency of ejaculation can reduce spermatozoal exposure to harmful ROS (Mashburn *et al.*, 2010). However, this also can generate a deficient antioxidant defense system in semen due to the short period of storage in epididymis for adequate recovery of this system. Additionally, the cryopreservation reduces the sperm quality (Watson, 2000). Freezing of semen results in the production of ROS and the formation of ice crystals, which can generate lipid peroxidation and loss of sperm function (Azevedo *et al.*, 2000; Valença *et al.*, 2007).

Our data indicate decreased cellular or dead cell damage in the second ejaculate compared to the first, however, increased membrane peroxidation. Lipid peroxidation can be used as an indicator of the ROS action (Del Rio *et al.*, 2005), associated with oxidative stress and its pathologies (Bagis *et al.*, 2005). However, in response to lipid peroxidation of the membrane, cells can also promote defense systems of antioxidants that stimulate cellular survival or activation of signaling pathways. An increase in the regulation of antioxidant proteins occurs in response to oxidative stress (Ayala *et al.*, 2014), which can be directly related with the results of DCFDA analysis, despite the BODYPI analysis.

5. Conclusion

The first and second ejaculates have similar seminal qualities. However, the first ejaculate seems to have more sensitivity to cryopreservation, presenting more minor and total defects. In other words, the second ejaculate was more viable and had less membrane damages, nonetheless the presented higher lipid peroxidation. The ejaculates seem to be affected by different factors of viability.

References

Aitken, R.J., Wingate, J.K., De Iuliis, G.N., McLaughlin, E.A., 2007. Analysis of lipid peroxidation in human spermatozoa using BODIPY C11. *Mol. Hum. Reprod*, 13: 203–211.

Aquino, F.P., Vergara, K.G., Ocampo, L.C., 2014. Viability of Extended Goat Semen Stored at Refrigerated Condition. *J of AgrSci Tech*, 4:169–176.

Ayala, A., Muñoz, M.F., Argüelles, S., 2014. Lipid peroxidation: Production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal. *Oxid. Med. Cell. Longev.*

Azevedo, H.C., Machado, R., Simplício, A.A., Soares, A., 2000. Características do sêmen caprino congelado: influência do tipo de palheta e concentração espermática. *Rev. Científica Rural*, 5:148–157.

Bagis, S., Tamer, L., Sahin, G., Bilgin, R., Guler, H., Ercan, B., Erdogan, C., 2005. Free radicals and antioxidants in primary fibromyalgia: An oxidative stress disorder? *Rheumatol. Int*, 25:188–190.

Basiji, D.A., Ortyn, W.E., Liang, L., Venkatachalam, V., Morrissey, P., 2007. Cellular Image Analysis and Imaging by Flow Cytometry. *Clin. Lab. Med*, 27:653–670.

Baumber, J., Ball, B.A., Gravance, C.G., Medina, V., Davies-Morel, M.C.G., 2000. The Effect of Reactive Oxygen Species on Equine Sperm. *J. Androl*, 21:895–902.

Bittencourt, R.F., Filho, A. de L.R., Santos, A.D.F., Chalhoub, M., Alves, S.G.G., Vasconcelos, M.F., Leandro, E.E.S., Guimarães, J.D., 2005. Utilização do Teste Hiposmótico para Avaliar a Eficácia de Diferentes Protocolos de Criopreservação do Sêmen Caprino. *Cienc. Anim. Bras*, 6:213–218.

Borg, K., Colenbrander, B., Fazeli, A., Parlevliet, J., Malmgren, L., 1997. Influence of thawing method on motility, plasma membrane integrity and morphology of frozen-thawed stallion spermatozoa. *Theriogenology*, 48:531–6.

Colégio Brasileiro de Reprodução Animal, 2013. Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal, 3rd ed. *Colégio Brasileiro de Reprodução Animal*, Belo Horizonte.

Council, A. and F.R., 1998. The nutrition of goats. CAB International, Wallingford.

Cross, N., Morales, P., Overstreet, J., Hanson, F., 1986. Two simple methods for detecting acrosome-reacted human sperm. *Mol. Reprod. Dev*, 15:213–26.

Del Rio, D., Stewart, A.J., Pellegrini, N., 2005. A review of recent studies on malondialdehyde as toxic molecule and biological marker of oxidative stress. *Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis*, 4:316-328.

Dias, J.C.O., Veloso, C.M., Santos, M.C. da R., Oliveira, C.T.S.A.M. de, Silveira, C.O., Iglesias, E., Maitan, P.P., Sanglard, L.M.P., 2017. Seasonal variation in the reproductive activity of male goats raised under tropical climate conditions. *Rev. Bras. Zootec*. 46:192–201.

Eljarah, A., Alhaider, A.K., Jawasreh, K., Bani Ismail, Z., Alhalah, A., El-Bahr, S.M., 2017. Investigation of scrotal circumference, testicular dimensions and semen characteristics of the vulnerable Arabian oryx (*Oryx leucoryx*): an approach supports the future use of artificial insemination. *Ital. J. Anim. Sci.* 16:484-489.

Garcia, A.R., 2004. Efeitos do estresse térmico testicular e do uso da somatotropina recombinante bovina nas características seminais, integridade de membranas, função mitocondrial e estrutura da cromatina de espermatozóides de touros Simental (*Bostaurus taurus*). Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da Universidade de São Paulo, Pirassununga.

Gibbons, A., Cueto, M., Wolff, M., 2009. Artificial Insemination in Goats. Bariloche Experimental Station, National Institute of Agricultural Technology.

Hafez, E., 1995. Reprodução Animal, 6th ed. Manole, São Paulo.

Hossain, M.S., Johannisson, A., Wallgren, M., Nagy, S., Siqueira, A.P., Rodriguez-Martinez, H., 2011. Flow cytometry for the assessment of animal sperm integrity and functionality: State of the art. *Asian J. Androl*, 13:406–419.

Macías-García, B., González-Fernández, L., Gallardo-Bolaños, J.M., Peña, F.J., Johannisson, A., Morrell, J.M., 2012. Androcoll-E large selects a subset of live stallion spermatozoa capable of producing ROS. *Anim. Reprod. Sci.*, 132:74–82.

Marshburn, P. B., Alanis, M., Matthews, M. L., Usadi, R., Papadakis, M. H., Kullstam, S., & Hurst, B. S. 2010. A short period of ejaculatory abstinence before intrauterine insemination is associated with higher pregnancy rates. *Fertility and sterility*, 93: 286-288.

Martins, L.F., Pereira, M.C.B., Guimarães, J.D., Da Costa, E.P., Silveira, T.D.S., Torres, C.A.A., Rodrigues, M.T., Braz, V.B., 2006. Avaliação espermática e da concentração de proteínas solúveis no plasma seminal de bodes da raça Alpina em regime de monta controlada. *Rev. Bras. Zootec*, 35:1653–1659.

Mátyus, L., Szabó, G., Resli, I., Gáspár, R., Damjanovich, S., 1984. Flow cytometric analysis of viability of bull sperm cells. *ActaBiochimBiophysAcadSci Hung*, 19:209–214.

Mayorga-Torres, J.M., Agarwal, A., Roychoudhury, S., Cadavid, A., Cardona-Maya, W.D., 2016. Can a Short Term of Repeated Ejaculations Affect Seminal Parameters? *J. Reprod. Infertil*, 17:177–83.

Neild, D.M., Brouwers, J.F.H.M., Colenbrander, B., Agüero, A., Gadella, B.M., 2005. Lipid peroxide formation in relation to membrane stability of fresh and frozen thawed stallion spermatozoa. *Mol. Reprod. Dev*, 72:230–238.

Nöthling, J.O., Irons, P.C., 2008. A simple multidimensional system for the recording and interpretation of sperm morphology in bulls. *Theriogenology*, 69:603–611.

Olivares, C.C.S., da Fonseca, J.F., de Almeida Camargo, L.S., de Souza-Fabjan, J.M.G., Rodrigues, A.L.R., Brandão, F.Z., 2015. Comparison of different methods of goat sperm selection and capacitation for optimization of assisted reproductive technologies. *Small Rumin. Res*, 127:44–49.

Oliveira, I.R.S., Alves, H.M., Castelo, T.S., Bezerra, F.S.B., Bezerra, A.C.S.D., Silva, A.R., 2013. Correlações entre o teste hiposmótico e a avaliação clássica do sêmen de caprinos. *Ciência Anim. Bras*, 14:216–221.

Oliveira, L.Z., de Arruda, R.P., de Andrade, A.F.C., Celeghini, E.C.C., dos Santos, R.M., Beletti, M.E., Peres, R.F.G., Oliveira, C.S., Hossepian de Lima, V.F.M., 2012. Assessment of field fertility and several *in vitro* sperm characteristics following the use of different Angus sires in a timed-AI program with suckled Nelore cows. *Livest. Sci*, 146:38–46.

Ozkavukcu, S., Erdemli, E., Isik, A., Oztuna, D., Karahuseyinoglu, S., 2008. Effects of cryopreservation on sperm parameters and ultrastructural morphology of human spermatozoa. *J. Assist. Reprod. Genet.*, 25:403–411.

Santos, A.D.F., Torres, C.A.A., Da Fonseca, J.F., Borges, Á.M., Guimarães, J.D., Da Costa, E.P., Rovay, H., 2006. Uso de testis complementares para avaliação do congelamento do sêmen de bodes submetidos ao manejo de fotoperíodo artificial. *Rev. Bras. Zootec*, 35:1934–1942.

Santos, A.D.F., Torres, C.A.A., Fonseca, J.F., Borges, A.M., Rovay, H., Goretti, R.G., Guimarães, J.D., Costa, E.P., Barbosa, L.P., Maffili, V. V., Fraga, D.B.M., 2001. Uso do Teste Hiposmótico (HOST) para avaliar a congelabilidade do sêmen de caprinos das raças Alpina e Saanen, jovens e adultos, submetidos ao manejo com luz artificial. *Rev. Bras. ReproduçãoAnim*, 25:438–439.

Shamsuddin, M., Amiri, Y., Bhuiyan, M.M.U., 2000. Characteristics of buck semen with regard to ejaculate numbers, collection intervals, diluents and preservation periods. *Reprod. Domest. Anim*, 35:53–57.

Silva, R.O.C., 2011. Efeito da adição de antioxidantes enzimáticos na criopreservação do sêmen caprino. São Paulo.

Squires, E.L., Pickett, B.W., Graham, J.K., Vanderwall, D.K., McCue, P.M., Brummer, J.E., 1999. Cooled and frozen stallion semen. *Animal Reproduction and Biotechnology Laboratory, Fort Collins.*

Trejo, G., Marquez, M., Salazar, C., Felipe, S., Garcia, L., Reyes, R., 1988. Testis growth, seminal quality, sperm reserves and testosterone production in Alpine kids treated hormonally around puberty. *Int. Congr. Anim. Reprod. Artif. Insemin*, 11:386.

Turri, F., Madeddu, M., Gliozzi, T.M., Gandini, G., Pizzi, F., 2016. Relationship between body weight, sexual secondary traits and epididymal semen quality in the Alpine goat. *Small Rumin. Res*, 135:81–84.

Valença, R.M.B., Guerra, M.M.P., Guerra, P., 2007. Espécies Reativas ao Oxigênio (ROS) e a utilização de antioxidantes na criopreservação do sêmen suíno. *Ver Bras Reprod Anim*, 31:47–53.

Vogler, C.J., Saacke, R.G., Bame, J.H., Dejarnette, J.M., McGilliard, M.L., 1991. Effects of scrotal insulation on viability characteristics of cryopreserved bovine semen. *J. Dairy Sci*, 74:3827–3835.

Watson, P.F., 2000. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Anim Reprod Sci*, 60:481–492.

Acknowledgements

Our acknowledgment to CNPq for providing the corresponding author's Ph.D. scholarship and to Alexandria Jeanne Wilson for reviewing English.

SUPPLEMENTS

Tables

Table 1. Composition of experimental diet on natural matter basis

Component	(%)	(% total diet)
Forage		60.00
Tiftonhay	100.00	60.00
Concentrate		40.00
Cornmeal	75.54	30.22
Soybean meal	23.96	9.58
Calcareous	0.50	0.20
Chemical characteristics	Nutritional composition (% DM)	
CP		14.37
NDF _{ap}		44.31
EE		0.74
MM		4.71

CP = crude protein; NDF_{ap} = neutral detergent fiber (ashes and protein free); EE = ether extract; MM = mineral matter.

Table 2. Mean \pm SEM of the macro and microscopic evaluations of first and second cryopreserved ejaculates of young Alpine bucks

Variable	Ejaculate		p-value
	First	Second	
<i>Macroscopic parameters</i>			
Ejaculate volume (mL)	0.77 \pm 0.05	0.68 \pm 0.04	0.007*
Color	A (24.0 %), B (52.0 %), and C (24.0 %)	A (28.8 %), B (57.7 %), and C (13.5 %)	0.0001**
Appearance	A (28.0 %), B (66.0 %), and C (6.00 %)	A (30.8 %), B (61.5 %), and C (7.69 %)	0.0001**
<i>Microscopic parameters</i>			
Gross motility (1-5)	2.82 \pm 0.15	2.67 \pm 0.16	NS
Sperm motility (0-100)	78.6 \pm 1.37	74.7 \pm 2.56	NS
Sperm vigor (1-5)	3.22 \pm 0.09	3.11 \pm 0.11	NS
Sperm concentration (10 ⁹ sperm/mL)	2.25 \pm 0.16	1.83 \pm 0.12	0.007*

*Significant by Student's t-test (p < 0.05); ** Chi square (p < 0.05). Color (A: yellowish; B: yellow-whitish; and C: white). Appearance (A: watery; B: milky; and C: creamy).

Table 3. Mean \pm SEM of the thermoresistance test in the first and second cryopreserved ejaculates of young Alpine bucks

Time	Sperm motility		Sperm vigor	
	First	Second	First	Second
0	38.7 \pm 1.78 ^A	35.8 \pm 1.83 ^A	2.88 \pm 0.07 ^A	2.79 \pm 0.08 ^A
30	33.2 \pm 1.81 ^B	33.3 \pm 1.87 ^B	2.72 \pm 0.09 ^B	2.66 \pm 0.10 ^B
60	28.3 \pm 2.08 ^C	29.4 \pm 2.15 ^C	2.52 \pm 0.13 ^C	2.38 \pm 0.13 ^C
90	24.0 \pm 2.18 ^D	22.3 \pm 2.25 ^D	2.22 \pm 0.15 ^D	1.96 \pm 0.15 ^D
120	21.3 \pm 2.18 ^E	19.9 \pm 2.25 ^E	1.86 \pm 0.16 ^E	1.49 \pm 0.16 ^E
150	17.3 \pm 2.00 ^F	14.90 \pm 2.06 ^F	1.57 \pm 0.14 ^F	1.06 \pm 0.15 ^F
180	13.0 \pm 1.73 ^G	10.3 \pm 1.78 ^G	1.13 \pm 0.13 ^G	0.76 \pm 0.13 ^G

*Significant by Student's t-test ($p < 0.05$). Uppercase letters differ in the same column.

Table 4. Mean \pm SEM of the spermatozoa count in hyposmotic medium in the first and second cryopreserved ejaculates of young Alpine bucks

Semen	Ejaculate	
	First (%)	Second (%)
Fresh		
	Reactive	22 ^A
		23 ^A
Thawed		
	Reactive	27 ^A
		26 ^A

*Significant by F test ($p < 0.05$). Uppercase letters differ on the same line.

Table 5. Mean \pm SEM of the major, minor and total spermatozoa defects in the first and second cryopreserved ejaculates of young Alpine bucks

Semen	Spermatozoa defects		
	Major	Minor	Total
Fresh	4.78 \pm 0.34 ^A	4.86 \pm 0.30 ^A	9.65 \pm 0.57 ^A
First	5.65 \pm 0.52 ^A	6.45 \pm 0.28 ^B	12.1 \pm 0.64 ^B
Second	4.40 \pm 0.30 ^A	5.55 \pm 0.16 ^A	9.95 \pm 0.44 ^A

*Significant by Tukey test ($p < 0.05$). Uppercase letters differ in the same column.

Table 6. Mean \pm SEM of the fluorescent probes in the first and second cryopreserved ejaculates of young Alpine bucks by flow cytometry

Variable	DCFDA		FITC		BODIPY	
	First	Second	First	Second	First	Second
PI+/probe+	73.5 \pm 2.18 ^{aB}	73.0 \pm 2.01 ^{aB}	57.1 \pm 2.34 ^{aB}	55.0 \pm 2.89 ^{aB}	36.1 \pm 3.67 ^{aB}	24.0 \pm 3.92 ^{bB}
PI+/probe-	2.78 \pm 0.56 ^{aC}	1.92 \pm 0.42 ^{bC}	18.1 \pm 1.22 ^{aC}	17.2 \pm 1.42 ^{aC}	0.91 \pm 0.26 ^{aC}	0.03 \pm 0.02 ^{bC}
PI-/probe+	19.4 \pm 2.00 ^{aA}	20.5 \pm 1.77 ^{aA}	3.00 \pm 1.54 ^{aA}	6.13 \pm 2.73 ^{bA}	37.6 \pm 3.77 ^{aA}	54.7 \pm 3.19 ^{bA}
PI-/probe-	4.28 \pm 0.79 ^{aD}	4.58 \pm 0.79 ^{aD}	21.9 \pm 1.44 ^{aD}	21.7 \pm 1.96 ^{aD}	25.4 \pm 2.64 ^{aD}	21.3 \pm 1.75 ^{bD}

*Significant by Tukey test ($p < 0.05$). Lowercase letters differ on the same line, while uppercase letters differ in the same column. DCFDA = dichlorofluorescein (hydrogen peroxide presence); FITC = fluorescein isothiocyanate (acrosomal membrane integrity); BODIPY = boron-dipyrromethene (membrane lipid peroxidation).

Figures

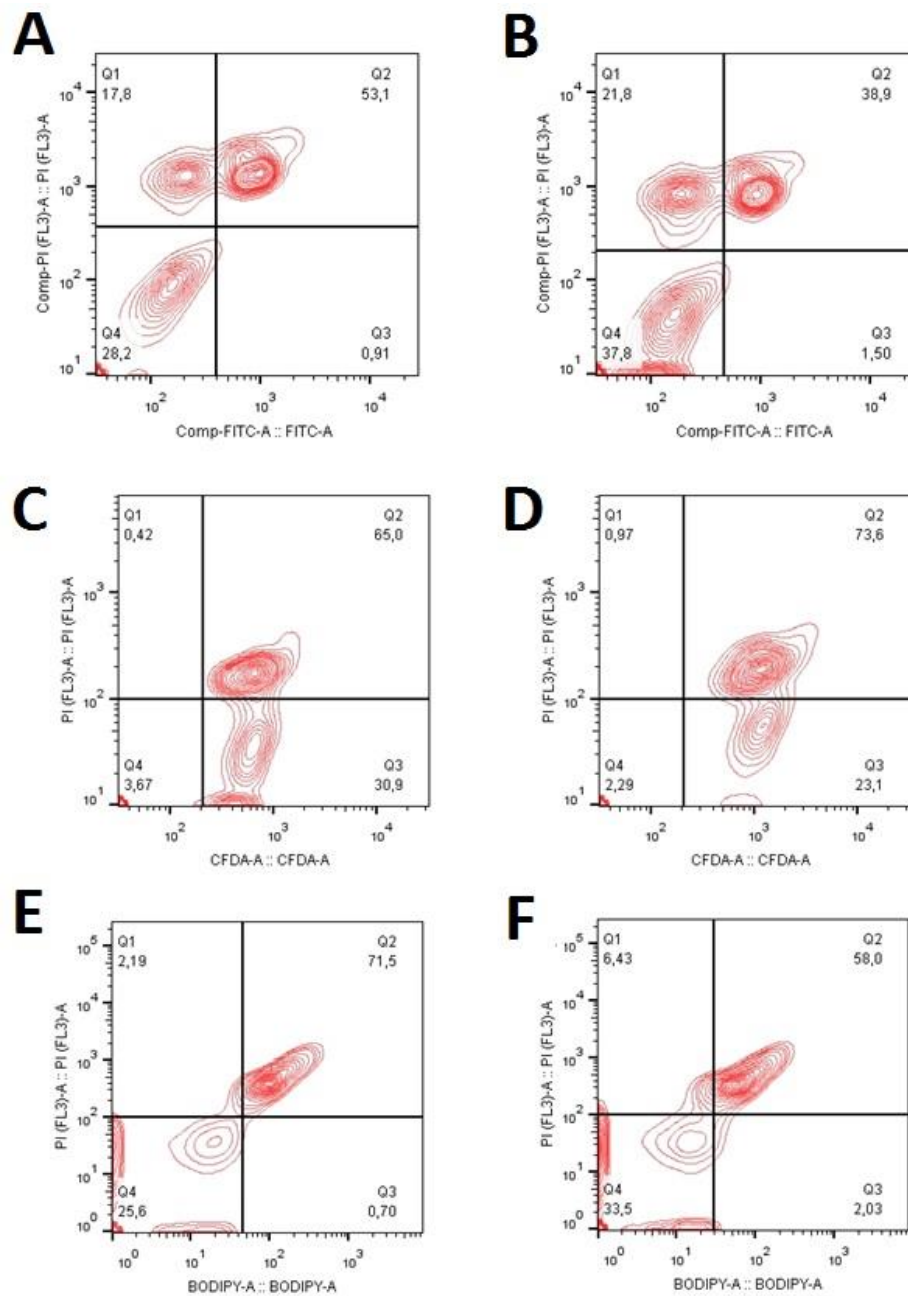


Figure 1. Spermatozoa populations analyzed by flow cytometry for plasma membrane integrity using propidium iodide (PI) probe conjugated with fluorescein isothiocyanate (FITC) probe for acrosomal membrane integrity (A and B), with dichlorofluorescein (DCF) probe for hydrogen peroxide presence (C and D), and with boron-dipyrromethene (BODIPY) probe for lipid peroxidation (E and F). A, C and E = first ejaculate. B, D and F = second ejaculate.

CAPÍTULO III

Adição de *Arnica montana* homeopática (6CH) ao meio de maturação *in vitro* de oócitos bovinos submetidos ou não ao estresse por calor

RESUMO

O estresse por calor acarreta redução do desempenho reprodutivo, da maturação oocitária *in vitro* e aumento das espécies reativas de oxigênio. Metodologias de baixo custo que atenuem esses efeitos são necessárias. Na homeopatia, a *Arnica montana* é utilizada para tratamento de danos físicos, entretanto, suas diluições homeopáticas ainda não foram testadas como termoprotetores de oócitos em estresse por calor. Por isso, objetiva-se estudar seu efeito na maturação *in vitro* de oócitos bovinos e no cultivo *in vitro* de embriões. Dois experimentos foram realizados, o primeiro com os seguintes tratamentos: controle, álcool (AL; veículo homeopático) e *Arnica montana* homeopática 6 CH (AM). No segundo experimento, os tratamentos foram: controle sem (SEC) e com estresse (C-EC), mais estresse com adição de álcool (AL-EC) ou *Arnica montana* 6 CH (AM-EC). O estresse por calor aplicando consistiu em maturação por 12 h a 41 °C, seguidas de mais 12 h a 38,5 °C. No primeiro experimento, o tratamento AM apresentou as menores taxas de clivagem, percentual de embriões no sétimo dia (D7) e número de blastômeros quando comparado aos demais tratamentos. No segundo experimento, o tratamento C-EC foi inferior aos demais quanto ao percentual de embriões no D7, total de blastômeros e blastocistos expandidos. O tratamento AM-EC apresentou a maior contagem de blastômeros dentre os tratamentos avaliados. A *Arnica montana* 6 CH apresentou comportamento diferente na presença e na ausência do estresse por calor, apresentando potencial como termoprotetor em meio de maturação *in vitro* de oócitos bovinos.

Palavras-chave: estresse térmico, efeito não linear, homeopatia, livre de placebo, qualidade embrionária

ABSTRACT

Heat stress (HS) results in reduced reproductive performance, decreasing in vitro oocyte maturation, and increased reactive oxygen species. Low-cost methodologies that relieve these effects are necessary. In homeopathy, the *Arnica montana* is used to treat physical damage, however, its homeopathic dilutions have not yet been tested as thermoprotectants of oocytes under HS. Therefore, the objective was to study the effect of *Arnica montana* on the in vitro maturation (IVM) of bovine oocytes and on in vitro culture (IVC) of embryos. Two experiments were carried out. The first one with the following treatments: control, alcohol (AL, homeopathic vehicle) and *Arnica montana* homeopathic 6 CH (AM). In the second experiment, the treatments were: control without (WHS) and stress (C-HS), plus stress with alcohol addition (AL-HS) or *Arnica montana* 6 CH (AM-HS). The HS applied consisted of oocyte maturation for 12 h at 41 °C, followed by a further 12 h at 38.5 °C. In the first experiment, AM-treatment had the lowest cleavage rates, percentage of embryos on the seventh day (D7) and number of blastomeres when compared to the other treatments. In the second experiment, the C-HS treatment was inferior to the others in the percentage of embryos in D7, total of blastomeres and expanded blastocysts. The AM-HS treatment presented the highest blastomer count among the evaluated treatments. Then, the *Arnica montana* 6 CH showed different behavior in the presence and absence of HS, presenting potential as a thermoprotector in maturation medium in vitro of bovine oocytes.

Key-words: embryo quality, heat stress, homeopathy, non-linear effect, placebo-free

INTRODUÇÃO

Em bovinos, a temperatura corporal ideal varia de 38 °C e 39 °C, no entanto, condições ambientais estressantes podem desencadear condições hipertérmicas acima de 41°C, evento denominado estresse térmico ou

estresse por calor (EC). O EC está diretamente ligado ao comprometimento da homeostase animal e sua atividade reprodutiva (Oliveira *et al.*, 2012).

Estudos *in vitro* em fêmeas (Nabenishi *et al.*, 2012, Paes *et al.*, 2016) têm demonstrado os efeitos deletérios do EC sobre a maturação oocitária (Nabenishi *et al.*, 2011; Maya-Soriano *et al.*, 2012), tais como aumento das espécies reativas de oxigênio (ERO) e da taxa de apoptose (Roth *et al.*, 2001; Soto and Smith, 2009; Nabenishi *et al.*, 2012), aumento da produção de progesterona nas primeiras 12 h de maturação (Rispoli *et al.*, 2013) e redução da viabilidade oocitária (Hansen, 2009; Xiang *et al.*, 2009).

Visando contornar estes efeitos deletérios do EC, substâncias têm sido adicionadas ao meio de maturação oocitária, como IGF-I (Ascari *et al.*, 2017) e polifenol verbascosídeo (Martino *et al.*, 2016), diminuindo a apoptose de blastocistos. Entretanto, essas metodologias são caras, carecendo alternativas de baixo custo.

Nesse sentido, têm sido estudados compostos naturais, como astaxantina (Kuroki *et al.*, 2013), resveratrol (Wang *et al.*, 2014) e curcaciclinas A e B (Barakat *et al.*, 2016), melhorando as taxas de metáfase II dos oócitos e reduzindo a geração de ERO, porém, são compostos de difícil obtenção. Uma possível alternativa, com baixo custo e ausência de resíduos químicos, é a adoção de outros compostos naturais, como drogas homeopáticas.

Homeopatia consiste no tratamento de pacientes utilizando o princípio da "semelhança", com baixas doses ou altas diluições (dinamizações) de diferentes compostos (Bellavite *et al.*, 2015). Sabe-se, também, que a utilização de substâncias homeopáticas em indivíduos saudáveis pode desencadear efeitos colaterais similares aos sintomas da doença a ser tratada.

Drogas homeopáticas têm sido utilizadas com sucesso em diversas aplicações, como na reprodução animal, promovendo efeitos na sincronização de estro, redução do puerpério e, mais recentemente, sobre a fisiologia ovariana, por meio de estudos *in vitro*. Damasceno (2018) estudou o efeito do homeopático *Folliculinum* na maturação oocitária. Lima *et al.* (2016a; 2016b) verificaram efeitos benéficos do homeopático FSH 6 CH sobre o diâmetro, sobrevivência e ativação folicular, proliferação celular

eprodução de estradiol. Apesar dos recentes avanços, poucos compostos homeopáticos têm seu efeito conhecido sobre a reprodução.

Dentre estes compostos, é destacado o extrato da planta *Arnica montana*, apresentando ações anti-inflamatórias (Macedo, 2004; Kawakami, 2011), de proteção contra a permeabilidade da membrana mitocondrial (Camargo, 2013) e regulatória da expressão de genes reparadores de DNA (Usui *et al.*, 2016). Desta forma, a *Arnica montana* apresenta potencial na prevenção de injúrias do tecido ovariano, tais como o EC.

Entretanto, não existem pesquisas avaliando o efeito termoprotetor da adição de medicamentos homeopáticos ao meio de maturação oocitária. Portanto, com o presente trabalho, visa-se estudar o efeito da adição da *Arnica montana* ultradiluída e dinamizada (6 CH), com e sem EC, no meio de maturação *in vitro* (MIV) de oócitos bovinos.

MATERIAL E MÉTODOS

Desenho experimental

Dois experimentos foram realizados (Figura 1 A e B). O primeiro experimento (Figura 1A) teve como objetivo avaliar o efeito da adição de *Arnica montana* 6 CH ao meio de maturação de oócitos bovinos. Para isso, os complexos cumulus-oócito (CCO; n = 969) foram distribuídos igualmente aleatoriamente nos seguintes grupos: 1) maturados em meio de MIV sozinhos (Controle - C); 2) suplementado com AL (AL, 30 % de álcool v/v) ou; 3) *Arnica montana* homeopática 6 CH (AM). Depois disso, os CCO foram submetidos à fertilização (FIV) e cultivo *in vitro* (CIV) até o estágio de blastocisto.

O segundo experimento (Figura 1B) teve como objetivo estudar os efeitos da suplementação de *Arnica montana* 6 CH ao meio de MIV de CCO submetidos ou não a EC, que consistiu em expor os CCO a 41 °C por 12 h, seguidos de maturação a 38,5 °C até o fim do cultivo (24 h). Neste experimento, uma parcela dos CCO recuperados (n = 1096) foi distribuída igualmente e aleatoriamente nos seguintes grupos: 1) maturados na ausência de EC, que foi o controle negativo (sem EC - SEC); 2) submetido ao EC e

cultivado no meio controle (C-EC, apenas no meio de MIV); 3) submetido ao EC e suplementado com AL (AL-EC, 30 % de álcool v/v); ou 4) submetido ao EC e suplementado com *Arnica montana* homeopática 6 CH (AM-EC). Após cada MIV, o meio de cultivo foi armazenado para avaliar os valores relativos de espécies reativas de oxigênio (ERO) e uma parte dos oócitos foi avaliada quanto à configuração da cromatina. Os demais CCO foram submetidos à FIV e subsequente CIV. Cada experimento foi replicado cinco vezes.

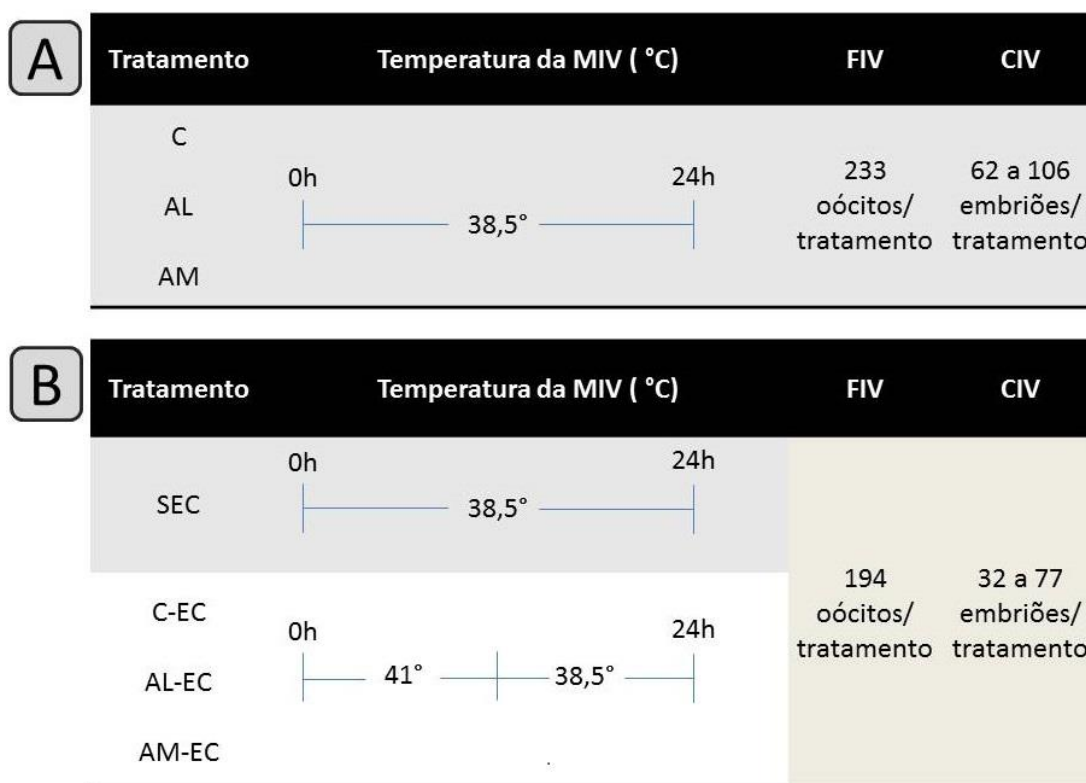


Figura 1 - Representação esquemática dos experimentos I (A) e II (B). C = controle; AL = álcool; AM = *Arnica montana* 6 CH. SEC = controle negativo (sem estresse térmico); C-EC = controle positivo (com estresse térmico); AL-EC = álcool (com estresse térmico); AM-EC = *Arnica montana* 6 CH (com estresse térmico). MIV = maturação *in vitro*; FIV = fertilização *in vitro*; CIV = cultivo *in vitro*.

Meios de cultivo e manipulação

Exceto quando mencionado, os meios de cultivo e suplementos utilizados nos experimentos foram comprados da Vitrogen (Cravinhos-SP,

BR), com exceção da solução homeopática e do seu veículo (água-álcool), que foram comprados de outra fonte.

Preparação da Arnica montana 6 CH

A preparação da *Arnica montana* ultradiluída e dinamizada foi realizada na Farmácia Homeopática Naturalis (Fortaleza-CE, BR). Resumidamente, o extrato alcoólico (tintura-mãe) foi preparado a partir da planta inteira, usando planta fresca colhida em flor (ESCOP, 2003). Primeiro, diluiu-se 1 mL de tintura-mãe em 99 mL de água-álcool (etanol da fermentação de grãos) a 30 % (v/v), sequencialmente foram procedidas 100 succussões (agitações) para produzir a primeira dinamização. Então, 1 mL da solução resultante (1 CH) foi adicionado novamente a 99 mL de água-etanol, com o mesmo procedimento de succussão para compor a segunda dinamização (2 CH). Sequencialmente, foram realizadas sucessivas diluições e succussões até a 6ª centesimal Hahnemanniana (AM 6 CH).

Colheita de oócitos

Ovários bovinos (n = 266) foram colhidos de um abatedouro local imediatamente após o abate, sendo transportados para o laboratório em solução salina 0,9 % (NaCl) a 33-35 °C por 2 h e lavados duas vezes em solução salina no laboratório (Shabankareh *et al.*, 2014). Os CCO foram puncionados de folículos (4-8 mm) usando agulhas de 18 G conectadas a seringas descartáveis de 10 mL. Os CCO foram selecionados em meio TCM 199 (Gibco) suplementado com 10 % de soro fetal bovino (SFB), sob um estereomicroscópio (SMZ 645 Nikon, Tóquio, Japão; aumento de 100x). Apenas CCO com citoplasma homogêneo e claro, circundados por duas ou mais camadas compactas de células do cumulus e zona pelúcida intacta, foram selecionados para MIV.

Maturação in vitro (MIV)

Os CCO seleccionados foram lavados duas vezes em DPBS e três vezes em meio IVM sem hormônio, previamente equilibrado durante pelo menos três horas a 38,5 °C sob 5 % de CO₂. O meio utilizado para MIV foi o TCM-199 suplementado com 10 % de soro fetal de bezerro (FCS), 5µg/mL de FSH, 50 µg/mL de LH (eCG) e 1 µg/mL de estradiol (TCM-199 +). Para MIV, os COC foram cultivados em TCM-199 + (controle) ou TCM-199 + suplementado com álcool (veículo; 10 %) ou *Arnica montana* 6 CH (10 %). Cada repetição foi cultivada em uma placa de 60 mm com um total de 30 CCO por gota de 100 µL em cada meio de maturação, depois incubada por 24 horas sob 5 % de CO₂ em ar.

Fertilização in vitro (FIV)

Os espermatozoides foram obtidos a partir do sêmen descongelado, colhido de um touro fértil. Os espermatozoides descongelados foram lavados em gradiente descontínuo de Percoll a 45/90 % a 700 xg durante 30 min em temperatura ambiente, e o *pellet* foi inicialmente ressuspensão com 5 mL de meio Sperm-TALP. O *pellet* final foi ressuspensão em meio FIV-TALP suplementado com 30 µg/mL de penicilinamina, 15 µM de hipotaurina, 1 µM de epinefrina e 10 µg/mL de heparina. Após 24 h de MIV, metade dos CCO foram processados para FIV e lavados duas vezes em meio FIV-TALP e, então, transferidos em grupos de 30 CCOs em 70 µL de meio FIV-TALP contendo 1x10⁶ spz/mL em placas de 60 mm. Os espermatozoides e CCO foram incubados por 18 h a 38,5 °C em atmosfera úmida a 5 % de CO₂.

Cultivo in vitro (CIV)

Os presumíveis zigotos foram colhidos do meio de FIV-TALP, desnudados mecanicamente por pipetagem repetida e lavados duas vezes em meio CR4 modificado (meio de controle de CIV), adicionado com soro fetal bovino (SFB) e albumina sérica bovina (BSA). Grupos de 30 presumíveis zigotos foram transferidos para gotas de 100 µL do mesmo meio de lavagem, sob óleo mineral, em placas de Petri de 60 mm e cultivados em incubadora de bancada (Eve - WTA[®]) por sete dias a 38,5 °C,

em atmosfera úmida de 5 % de CO₂ no ar. Metade do meio foi substituído a cada dois dias. A clivagem foi avaliada no terceiro dia (Dia 3) após a FIV (Dia 0 = FIV), e os blastocistos foram avaliados no sétimo dia (Dia 7 - D7). Os blastocistos no D7 foram colhidos e fixados em solução de 0,5 % de glutaraldeído para posterior análise em fluorescência.

Avaliação da viabilidade oocitária, configuração da cromatina e contagem de blastômeros

Após a MIV, os CCOs foram desnudados mecanicamente por pipetagem repetida e a configuração da cromatina foi avaliada por microscopia de epifluorescência (Nikon, Eclipse 80i, Tóquio, Japão). Os oócitos foram incubados por 30 min em 500 µL de PBS suplementado com 0,5 % de glutaraldeído e 10 µM de Hoechst 33342 (emissão a 483 nm). De acordo com a configuração da cromatina, os oócitos foram classificados como: vesícula germinativa (VG), quebra da vesícula germinativa (VGBD), metáfase I (MI), metáfase II (MII) ou degenerada (DEG) quando a cromatina apresentou configuração anormal (Brito *et al.*, 2014).

Os embriões armazenados em glutaraldeído foram lavados e incubados durante 30 min em 500 µL de PBS suplementado com 10 mM de Hoechst 33342 (emissão de 483 nm). Os blastocistos foram microfotografados com o auxílio de um microscópio de fluorescência (Eclipse 80i, Nikon, Japão) a 483 nm. A contagem total de blastômeros foi realizada com o software ImageJ (NIH).

Valores relativos de espécies reativas de oxigênio (ERO)

Os valores relativos de ERO foram mensurados no meio de cultivo por um método espectrofluorimétrico usando o ensaio diacetato 2',7'-diidrodiclorofluoresceína (DCHF-DA). Uma alíquota de amostra (50 µL) foi incubada com 10 µL de DCHF-DA (1 mM). A oxidação de DCHF-DA em diclorofluoresceína fluorescente (DCF) foi medida para a detecção de ERO. A emissão da intensidade de fluorescência do DCF (IF) foi registrada em 520

nm (com excitação de 480 nm), duas h após a adição de DCHF-DA ao meio de cultivo (Castro *et al.*, 2014).

Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o SigmaPlotversion 11 (Systat Software Inc., San José, CA, EUA). A comparação das médias entre tratamentos foi analisada por One-way ANOVA e pelo teste de Tukey. As taxas de metáfase II, clivagem e desenvolvimento embrionário foram analisadas pelo teste do Qui-quadrado. Os dados foram apresentados como média (\pm EPM) e porcentagem, e o nível de significância associado ao erro tipo I foi de 5 %.

RESULTADOS

Experimento Um

A Tabela 1 mostra as taxas de oócitos degenerados e em metáfase I ou II, assim como os valores relativos de espécies reativas de oxigênio no meio de maturação. Não foram observadas diferenças entre os tratamentos ($P > 0,05$).

Em relação à taxa de clivagem (Tabela 2), o tratamento AM apresentou o menor percentual de zigotos clivados ($P < 0,05$) quando comparado aos demais tratamentos. No tocante ao desenvolvimento embrionário, o tratamento AL promoveu a maior taxa de blastocistos produzidos após sete dias de cultivo ($P < 0,05$) quando comparado aos demais tratamentos, bem como o tratamento AM promoveu a menor taxa de desenvolvimento embrionário ($P < 0,05$; Tabela 2). Adicionalmente, o número de blastômeros foi inferior no tratamento AM ($P < 0,05$) quando comparado aos demais tratamentos. Não foram observadas diferenças entre os tratamentos controle e AL.

Experimento Dois

A Tabela 3 demonstra a taxa de degeneração, o estágio meiótico e os valores relativos de ERO após MIV de CCO. Não foram observadas diferenças ($P>0,05$) nos parâmetros avaliados, independente do tratamento.

Não foram verificadas diferenças entre os tratamentos na taxa de clivagem ($P>0,05$; Tabela 4). Em relação ao desenvolvimento embrionário (Tabela 4), o tratamento C-EC apresentou o menor percentual de embriões ($P<0,05$), quando comparado aos demais tratamentos. Não foram identificadas diferenças ($P>0,05$) quando comparados os embriões dos demais tratamentos. Em relação ao número de blastômeros (Tabela 4), o grupo AM-EC apresentou o maior número total de células ($P<0,05$) comparado aos demais tratamentos. Os grupos C-EC e AL-EC apresentaram total de blastômeros similar, porém, inferior ao grupo SEC.

O estágio de desenvolvimento dos embriões (Tabela 5) apresentou redução no percentual de embriões expandidos no tratamento C-EC, quando comparado aos tratamentos AL-EC e AM-EC ($P<0,05$). No entanto, não foram observadas diferenças entre as demais categorias embrionárias, independentemente do tratamento ($P>0,05$).

DISCUSSÃO

Foi investigado o efeito da adição de álcool e *Arnica montana* ultradiluída e dinamizada na maturação *in vitro* de óocitos bovinos, desafiados ou não com estresse por calor. Tratamentos homeopáticos podem apresentar efeitos não lineares em diferentes condições, ocasionando resultados diferentes (Bellavite *et al.*, 2015).

Substâncias homeopáticas atuam segundo o princípio da “lei dos semelhantes”, de modo que sintomas produzidos por uma mesma substância em um organismo saudável, atua como agente curador em um organismo doente, apresentando os mesmos sintomas (Hahnemann, 1983).

Essa relação foi observada nestes experimentos. No primeiro, sem a presença do estresse térmico, a *Arnica montana* homeopática ocasionou prejuízo na clivagem e desenvolvimento embrionário, assim como no número total de blastômeros.

Costa Filho (2003) recuperou oócitos bovinos por aspiração, que foram submetidos à FIV e ao cultivo dos embriões com a adição de um composto homeopático e seu veículo. Entretanto, não foram observadas diferenças entre o controle e tratamento com adição do homeopático.

No cultivo de oócitos ovinos, Damasceno (2018) observou comprometimento do estágio de maturação nuclear com a adição do homeopático *Folliculinum* ao meio oocitário, quando comparado ao controle.

Estes resultados evidenciam que o uso de um homeopático, na ausência de um agente estressor, pode não afetar, ou mesmo comprometer, o desenvolvimento oocitário e embrionário. É possível, neste caso, que a *Arnica montana* 6 CH tenha atuado como um agente estressor na maturação oocitária.

Oócitos cultivados em condições de estresse podem incorrer em alterações que são mais expressas nos estágios iniciais do desenvolvimento embrionário. Nestes casos, blastocistos que se desenvolvem a partir de oócitos estressados expressam um padrão de transcriptoma comprometido, sugerindo baixa competência do desenvolvimento embrionário (Roth, 2018), conforme verificado.

Dos fatores estressores que levam ao comprometimento da função ovariana, o estresse térmico é o mais estudado e documentado, por provocar redução da competência do desenvolvimento oocitário e embrionário (Alemu *et al.*, 2018). Também, reduzida produção de estradiol (Roth *et al.*, 2001) e disfunção das células da granulosa (Tatone *et al.*, 2008). Ainda, redução da taxa de formação de embrião no sétimo dia de cultivo (Silva *et al.*, 2013) e do número de células nos blastocistos (Sakatani *et al.*, 2012).

Entretanto, no segundo experimento, quando aplicado o estresse por calor, o tratamento *Arnica montana* igualou-se ao controle não estressado em todos os parâmetros avaliados. Sendo, ainda, superior a todos os tratamentos quanto ao número total de blastômeros.

Uma possível causa é a atuação da lactona helenalina sesquiterpênica, um dos principais componentes da *Arnica montana*, cuja atividade biológica inibe o fator de transcrição nuclear *kappa* β (NF-*kappa* β), um mediador central da resposta imune, por meio da alquilação da subunidade p65, impedindo assim sua ligação ao DNA (Lyss *et al.*, 1997; LY β *et al.*, 1998; Klaas *et al.*, 2002). O NF-*kappa* β desempenha um papel primordial na parada transcrricional materna, necessária para o estágio de metáfase II da maturação nuclear oocitária, e no desenvolvimento embrionário, através da ativação de genes (Paciolla *et al.*, 2011).

A *Arnica montana* também está relacionada com a regulação positiva da chaperona HSP70 (Usui *et al.*, 2016), uma proteína com função de reparo de DNA, da família das proteínas do choque térmico (HSPs). A indução da expressão dessas proteínas por estressores é regulada em nível transcrricional via fator de choque térmico-1 (HSF-1) (Morimoto, 1998). Essa regulação positiva, particularmente da HSP70, confere resistência celular a estressores (Morimoto e Santoro, 1998). A HSP70 ainda exerce, também, uma ação antiinflamatória, através de seu efeito inibitório sobre o NF-*kappa* β (Tang *et al.*, 2007; Wiess *et al.*, 2007).

Ademais, outros resultados positivos foram verificados com a adição de compostos em diluição muito baixa na maturação oocitária. Martino *et al.* (2016) adicionaram uma concentração nanomolar do polifenol antioxidante verbascosídeo no cultivo de oócitos ovinos. Foi verificado que o composto não afetou a maturação meiótica oocitária, porém, melhorou o desenvolvimento embrionário no sétimo dia de cultivo e o número total blastômeros, conforme verificado no segundo experimento. É possível, portanto, que, neste caso, a *Arnica montana* 6 CH tenha atuado como antioxidante, promovendo o desenvolvimento e a qualidade embrionária.

CONCLUSÃO

A *Arnica montana* 6 CH apresentou comportamento diferente na presença e na ausência do estresse térmico, apresentando potencial como

termoprotetor em meio de maturação *in vitro* de oócitos bovinos, promovendo o desenvolvimento e a qualidade embrionária.

REFERÊNCIAS

ALEMU, T. W. *et al.* Oxidative and endoplasmic reticulum stress defense mechanisms of bovine granulosa cells exposed to heat stress. *Theriogenology*, v. 110, p. 130-141, 2018.

ASCARI, I. J. *et al.* Addition of insulin-like growth factor I to the maturation medium of bovine oocytes subjected to heat shock: effects on the production of reactive oxygen species, mitochondrial activity and oocyte competence. *Domestic animal endocrinology*, v. 60, p. 50-60, 2017.

BARAKAT, I. A. H.; KHALIL, W. K. B.; AL-HIMAIDI, A. R. Curcacycline A and B modulate apoptosis induced by heat stress in sheep oocytes during *in vitro* maturation. *Small Ruminant Research*, v. 136, p. 187-196, 2016.

BELLAVITE, P. *et al.* Cell sensitivity, non-linearity and inverse effects. *Homeopathy*, v. 104, n. 02, p. 139-160, 2015.

BRITO, I. R. *et al.* Alginate hydrogel matrix stiffness influences the *in vitro* development of caprine preantral follicles. *Molecular reproduction and development*, v. 81, n. 7, p. 636-645, 2014.

CASTRO, S. V. *et al.* Fresh and vitrified bovine preantral follicles have different nutritional requirements during *in vitro* culture. *Cell and tissue banking*, v. 15, n. 4, p. 591-601, 2014.

- CAMARGO, R. A.; DA COSTA, E. D.; CATISTI, R. Effect of the oral administration homeopathic *Arnica montana* on mitochondrial oxidative stress. *Homeopathy*, v. 102, n. 1, p. 49-53, 2013.
- COSTA FILHO, L. C. C. Uso de homeopatia em programas de transferência de embriões bovinos. *Dissertação (Mestrado)* - Universidade Federal de Mato Grosso do Sul- Campo Grande- MS, 2013.
- DAMASCENO, K. N. M. Efeitos da suplementação com Folliculinum 6cH durante a maturação *in vitro* de oócitos ovinos. 2018. *Dissertação (Mestrado em Ciências Fisiológicas)* - Universidade Estadual do Ceará.
- ESCOP - European Scientific Cooperative on Phytotherapy. *ESCOP. Monographs: the scientific foundation for herbal medicinal products*. Thieme. (2003).
- HAHNEMANN, S. *Organon of Medicine*. 270p. 6 [sup] th ed. New Delhi: B. 1983.
- HANSEN, P. J. Effects of heat stress on mammalian reproduction. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 2009.
- KAWAKAMI, A. P. *et al.* Inflammatory process modulation by homeopathic *Arnica montana* 6CH: the role of individual variation. *Evidence-based complementary and alternative medicine*, v. 2011, 2011.

KLAAS, C. A. *et al.* Studies on the anti-inflammatory activity of phytopharmaceuticals prepared from Arnica flowers. *Planta Medica*, v. 68, n. 05, p. 385-391, 2002.

KUROKI, T. *et al.* Astaxanthin ameliorates heat stress-induced impairment of blastocyst development *In vitro*:—astaxanthin colocalization with and action on mitochondria—. *Journal of assisted reproduction and genetics*, v. 30, n. 5, p. 623-631, 2013.

LIMA, L F; ROCHA, R M P; ALVES, A M C V; CARVALHO, A A; CHAVES, R N; LOPES, C A P; BÁO, S N; CAMPELLO, C C; RODRIGUES, A P R; FIGUEIREDO, J R. Comparison between the additive effects of diluted (rFSH) and diluted/dynamized (FSH 6 cH) recombinant follicle-stimulating hormone on the *in vitro* culture of ovine preantral follicles enclosed in ovarian tissue. *Complementary Therapies in Medicine*, v. 25, p. 39-44, 2016a.

LIMA, L F.; ROCHA, R M P; DUARTE, A B G.; BRITO, I R; SILVA, G M; RODRIGUES, G Q; NUNES-PINHEIRO, D C S; SALES, A D; MOURA, A A; WHEELER, M B; RODRIGUES, A P R; CAMPELLO, C C; FIGUEIREDO, J R. Unexpected effect of the vehicle (grain ethanol) of homeopathic FSH on the *in vitro* survival and development of isolated ovine preantral follicles. *Microscopy research and technique*, v. 80, p. 406-418, 2016b.

LYß, G. *et al.* The anti-inflammatory sesquiterpene lactone helenalin inhibits the transcription factor NF- κ B by directly targeting p65. *Journal of Biological Chemistry*, v. 273, n. 50, p. 33508-33516, 1998.

- LYSS, G. *et al.* Helenalin, an anti-inflammatory sesquiterpene lactone from Arnica, selectively inhibits transcription factor NF- κ B. *Biological Chemistry*, v. 378, n. 9, p. 951-962, 1997.
- MACEDO, S. B. *et al.* Anti-inflammatory activity of *Arnica montana* 6cH: preclinical study in animals. *Homeopathy*, v. 93, n. 2, p. 84-87, 2004.
- MARTINO, N. A. *et al.* Supplementation with nanomolar concentrations of verbascoside during *in vitro* maturation improves embryo development by protecting the oocyte against oxidative stress: a large animal model study. *Reproductive Toxicology*, v. 65, p. 204-211, 2016.
- MAYA-SORIANO, M. J.; TABERNER, E.; LÓPEZ-BÉJAR, M. Retinol improves *in vitro* oocyte nuclear maturation under heat stress in heifers. *Zygote*, v. 21, n. 4, p. 377-384, 2013.
- MORIMOTO, R. I. Regulation of the heat shock transcriptional response: cross talk between a family of heat shock factors, molecular chaperones, and negative regulators. *Genes & development*, v. 12, n. 24, p. 3788-3796, 1998.
- MORIMOTO, R. I.; SANTORO, M. G. Stress-inducible responses and heat shock proteins: new pharmacologic targets for cytoprotection. *Nature biotechnology*, v. 16, n. 9, p. 833, 1998.
- NABENISHI, H. *et al.* The effects of cysteine addition during *in vitro* maturation on the developmental competence, ROS, GSH and apoptosis level of bovine oocytes exposed to heat stress. *Zygote*, v. 20, n. 3, p. 249-259, 2012.

OLIVEIRA, M.S; TIBURCIO, M; FERREIRA, S.G.C. Influência do estresse térmico sobre a reprodução de bovinos de corte. *Anais Eletrônico*. VI Mostra Interna de Trabalhos de Iniciação Científica. ISBN 978-85-8084-413-9 23 a 26 de outubro de 2012.

PACIOLLA, M. *et al.* Nuclear factor-kappa-B-inhibitor alpha (NFKBIA) is a developmental marker of NF- κ B/p65 activation during *in vitro* oocyte maturation and early embryogenesis. *Human Reproduction*, v. 26, n. 5, p. 1191-1201, 2011.

PAES, V. M. *et al.* Effect of heat stress on the survival and development of *in vitro* cultured bovine preantral follicles and on *in vitro* maturation of cumulus–oocyte complex. *x*, v. 86, n. 4, p. 994-1003, 2016.

RISPOLI LA, PAYTON RR, GONDRO C, SAXTON AM, NAGLE KA, JENKINS BW, SCHRICK FN, EDWARDS JL. Heat stress effects on the cumulus cells surrounding the bovine oocyte during maturation: altered matrix metalloproteinase 9 and progesterone production. *Reproduction*, v.146, p.193-207, 2013.

ROTH, Z. *et al.* Improvement of quality of oocytes collected in the autumn by enhanced removal of impaired follicles from previously heat-stressed cows. *REPRODUCTION-CAMBRIDGE-*, v. 122, n. 5, p. 737-744, 2001.

ROTH, Z. Stress-induced alterations in oocyte transcripts are further expressed in the developing blastocyst. *Molecular Reproduction and Development*, v. 85, n. 11, p. 821-835, 2018.

- SAKATANI, M. *et al.* Consequences of physiological heat shock beginning at the zygote stage on embryonic development and expression of stress response genes in cattle. *Journal of Dairy Science*, v. 95, n. 6, p. 3080-3091, 2012.
- SHABANKAREH, H.K.; AZIMI, G.; TORKI, M. Developmental competence of bovine oocytes selected based on follicle size and using the brilliant cresyl blue (BCB) test. *Iranian Journal of Reproductive Medicine*. v.12, p.771-778, 2014
- SILVA, C. F. *et al.* Effects of heat stress on development, quality and survival of *Bos indicus* and *Bos taurus* embryos produced *in vitro*. *Theriogenology*, v. 79, n. 2, p. 351-357, 2013.
- SOTO, P.; SMITH, L. C. BH4 peptide derived from Bcl-xL and Bax-inhibitor peptide suppresses apoptotic mitochondrial changes in heat stressed bovine oocytes. *Molecular reproduction and development*, v. 76, n. 7, p. 637-646, 2009.
- TANG, D. *et al.* The anti-inflammatory effects of heat shock protein 72 involve inhibition of high-mobility-group box 1 release and proinflammatory function in macrophages. *The Journal of Immunology*, v. 179, n. 2, p. 1236-1244, 2007.
- TATONE, C. *et al.* Cellular and molecular aspects of ovarian follicle ageing. *Human Reproduction Update*, v. 14, n. 2, p. 131-142, 2008.

- USUI, K. *et al.* Identification of HSP70-inducing activity in *Arnica montana* extract and purification and characterization of HSP70-inducers. *Journal of Dermatological Science*, v. 84, n. 1, p. e171, 2016.
- XIANG, Z. F.*et al.* Comparison of Gene Expression between Cumulus Oocyte Complexes and Naked Oocytes by Suppression Subtractive Hybridization in Swine. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, v. 23, n. 1, p. 17-24, 2009.
- WANG, F.*et al.* Beneficial effect of resveratrol on bovine oocyte maturation and subsequent embryonic development after *in vitro* fertilization. *Fertility and sterility*, v. 101, n. 2, p. 577-586.e1, 2014.
- WEISS, Y. G. *et al.* Enhanced heat shock protein 70 expression alters proteasomal degradation of I κ B kinase in experimental acute respiratory distress syndrome. *Critical Care Medicine*, v. 35, n. 9, p. 2128-2138, 2007.

Tabelas

Experimento 1

Tabela 1 - Efeito da adição de álcool e *Arnica montana* homeopática no meio de maturação *in vitro* sobre a configuração da cromatina de oócitos bovinos e espécies reativas de oxigênio do meio de maturação

Tratamento	DEG (%)	MI (%)	MII (%)	ERO
C	14,7	11,8	73,5	33,16 ± 0,84
AL	22,0	11,0	67,0	31,08 ± 1,87
AM	22,7	18,2	59,1	30,75 ± 0,80

C = controle; AL = álcool; AM = *Arnica montana* 6 CH. DEG = degenerado; MI = metáfase I; MII = metáfase II. ERO = espécies reativas de oxigênio. (* P>0,05).

Tabela 2 - Efeito da adição de álcool e *Arnica montana* homeopática no meio de maturação *in vitro* sobre a taxa de clivagem e formação de embriões no sétimo dia de cultivo e total de blastômeros

Tratamento	Oócito (número)	Clivagem (% clivagem)	Formação de embriões no D7 (% embriões)	Total de blastômeros
C	233	187 (80,3) A	82 (35,2) B	110,5 ± 4,1 A
AL	233	185 (79,4) A	106 (45,5) A	111,7 ± 3,6 A
AM	233	166 (71,2) B	62 (26,6) C	91,8 ± 3,8 B

C = controle; AL = álcool; AM = *Arnica montana* 6 CH. Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa a 5 %.

Experimento 2

Tabela 3 - Efeito da adição de álcool e *Arnica montana* homeopática no meio de maturação *in vitro* sob estresse térmico sobre a configuração da cromatina de oócitos bovinos e espécies reativas de oxigênio do meio de maturação

Tratamento	DEG (%)	MI (%)	MII (%)	ERO
SEC	21,4	8,6	70,0	30,16 ± 1,51
C-EC	25,6	7,7	66,7	31,79 ± 1,38
AL-EC	23,2	9,8	67,1	29,46 ± 3,48
AM-EC	18,8	15,6	65,5	28,39 ± 3,88

SEC = controle negativo (sem estresse térmico); C-EC = controle positivo (com estresse térmico); AL-EC = álcool (com estresse térmico); AM-EC = *Arnica montana* 6 CH (com estresse térmico). DEG = degenerado; MI = metáfase I; MII = metáfase II. ERO = espécies reativas de oxigênio. (* P>0,05).

Tabela 4 - Efeito da adição de álcool e *Arnica montana* homeopática no meio de maturação *in vitro* sob estresse térmico sobre a taxa de clivagem, de formação de embriões no sétimo dia de cultivo e total de blastômeros

Tratamento	Oócito (número)	Clivagem (% clivagem)	Formação de embrião no D7 (% embriões)	Total de blastômeros
SEC	194	137 (68,3) A	77 (39,3) A	104,4 ± 3,1 B
C-EC	194	130 (67,0) A	32 (16,9) B	92,9 ± 3,9 C
AL-EC	194	127 (66,0) A	64 (32,4) A	93,2 ± 3,3 C
AM-EC	194	140 (70,9) A	77 (36,9) A	116,8 ± 3,9 A

SEC = controle negativo (sem estresse térmico); C-EC = controle positivo (com estresse térmico); AL-EC = álcool (com estresse térmico); AM-EC = *Arnica montana* 6 CH (com estresse térmico). Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa a 5 %.

Tabela 5 - Efeito da adição de álcool e *Arnica montana* homeopática no meio de maturação *in vitro* sob estresse térmico sobre a classificação embrionária no sétimo dia de cultivo

Tratamento	Classificação embrionária			
	Bi	BL	BX	BE
SEC	50,0 A (40/80)	31,2 A (25/80)	15,0 AB (12/80)	3,7 A (3/80)
C-EC	48,7 A (19/39)	35,8 A (14/39)	7,6 B (3/39)	7,6 A (3/39)
AL-EC	42,3 A (22/52)	26,9 A (14/52)	25,0 A (13/52)	5,7 A (3/52)
AM-EC	48,6 A (35/72)	22,2 A (16/72)	25,0 A (18/72)	4,1 A (3/72)

SEC = controle negativo (sem estresse térmico); C-EC = controle positivo (com estresse térmico); AL-EC = álcool (com estresse térmico); AM-EC = *Arnica montana* 6 CH (com estresse térmico). Bi = blastocisto inicial; BL = blastocisto; BX = blastocisto expandido; BE = blastocisto eclodido. Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa a 5 %.

APÊNDICE

1. Marcha das sondas fluorescentes

1.1 – Iodeto de propídio - IP

- Preparo da solução-estoque (25 mg/mL = 40 mM): adicionar 10 mg de IP em 0,4 mL de dimetilsulfóxido (DMSO);
- Preparo da solução de trabalho (0,5 mg/mL = 0,8 mM): diluir 20 µL da solução estoque em 980 µL de PBS.

1.2 – Isotiocionato de fluoresceína (FITC) conjugada com aglutinina *Pisum sativum* (PSA) – FITc-PSA

- Preparo da solução-estoque (0,5 mg/mL): adicionar 2 mg de FITC-PSA em 4 mL de PBS;
- Preparo da solução de trabalho (100 µg/mL): diluir 1 mL de azida sódica a 1 % em 19 mL de PBS.

1.3 – Diacetato de 2',7'-diclorofluoresceína- DCFDA

- Preparo da solução-estoque I (50 mg/mL): adicionar 1 g DCFDA em 20 mL de DMSO;
- Preparo da solução-estoque II (5 mg/mL): diluir 1 mL da solução-estoque I em 9 mL de DMSO;
- Preparo da solução de trabalho (1 mg/mL): diluir 1 mL da solução estoque II em 4 mL de DMSO.

1.4 – Ácido 4,4-difluoro-5-(4-fenil-1,3-butadienil)-4-bora-3a,4a-diazasindaceno-3-undecanoico - C11-BODIPY^{581/591}

- Preparo da solução de trabalho: adicionar 1 mg de C11-BODIPY^{581/591} em 1 mL de etanol.

2. Planilha de avaliação do comportamento sexual (Dias, 2016)

- Tempo de reação (período entre a introdução do bode na sala de coleta com observação da fêmea em estro e a ejaculação na vagina artificial) = _____ seg
- Ato de cheirar e lambe a região anogenital da fêmea = () sim () não
- Reflexo de Flehmen = () sim () não
- Ato de bater e raspar o casco no chão = () sim () não
- Acotovelamento e escoiceamento da fêmea = () sim () não
- Emissão de som característico = () sim () não
- Exteriorização e retração da língua = () sim () não
- Ereção/exposição do pênis = () sim () não
- Reflexo de monta (contração seguidas da região posterior do macho com ou sem exposição do pênis) = () sim () não
- Número de falsas montas = _____
- Interesse sexual após a monta (serviço*) = () sim () não

*Serviço = monta acompanhada por introdução do pênis na vagina artificial e ejaculação, caracterizada por um impulso pélvico com a cabeça jogada para trás, seguido ou não por um curto período durante o qual o bode não mostrou interesse pela fêmea (período de refratariedade).