



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL TROPICAL

**EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO ORAL DO ÓLEO DE ARROZ
NA CONGELABILIDADE DO SÊMEN OVINO**

JULIANA ARANDAS BORBA MONTEIRO

RECIFE – PE

FEVEREIRO DE 2015



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL TROPICAL

**EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO ORAL DO ÓLEO DE ARROZ
NA CONGELABILIDADE DO SÊMEN OVINO**

JULIANA ARANDAS BORBA MONTEIRO

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em
Ciência Animal Tropical, como parte dos requisitos para a
obtenção do título de Mestre em Ciência Animal Tropical.

Orientadora: Prof^ª Dr^ª Maria Madalena Pessoa Guerra

Co-orientadora: Prof^ª Dr^ª Sildivane Valcácia Silva

RECIFE – PE

FEVEREIRO DE 2015

Ficha catalográfica

M775e Monteiro, Juliana Arandas Borba
Efeito da suplementação oral do óleo de arroz na
congelabilidade do sêmen ovino / Juliana Arandas Borba
Monteiro. – Recife, 2015.
70 f. : il.

Orientadora: Maria Madalena Pessoa Guerra.
Dissertação (Mestrado em Ciência Animal Tropical) –
Universidade Federal Rural de Pernambuco, Departamento
de Morfologia e Fisiologia Animal, Recife, 2015.
Inclui referências e anexo(s).

1. Óleo de arroz 2. Suplementação oral 3. Ovino
4. Sêmen 5. Congelabilidade I. Guerra, Maria Madalena
Pessoa, orientadora II. Título

CDD 636.089

Dissertação à disposição na Biblioteca Central da Universidade Federal Rural de Pernambuco. A transcrição ou utilização de trechos deste trabalho é permitida, desde que respeitadas às normas de ética científica.

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL TROPICAL

EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO ORAL DO ÓLEO DE ARROZ
NA CONGELABILIDADE DO SÊMEN OVINO

Dissertação de Mestrado elaborada e defendida por

Juliana Arandas Borba Monteiro (Discente)

Aprovada em 27 de Fevereiro de 2015

BANCA EXAMINADORA

Profª Drª Maria Madalena Pessoa Guerra (Orientador/Presidente. UFRPE)

Profª Drª Sildivane Valcácia Silva (Membro Titular. UFPB)

Drª Karen Mascaro Gonçalves da Silva (Membro Titular)

Profª Drª Ellen Cordeiro Bento da Silva (Membro Suplente. UFRPE)

Dr André Mariano Batista (Membro Suplente. UFRPE)

DEDICATÓRIA

Aos meus pais Rivaldo e Erly. À minha sobrinha Marianita, meu solzinho. Ao meu esposo Hugo de Oliveira e aos meus irmãos Tavinho e Eliakim.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ter me dado saúde, nosso bem maior, e paciência nos momentos difíceis; e ao meu anjo da guarda, por sua influência e condução;

Ao meu pai, Rivaldo Borba Monteiro, que esteve comigo em todos os momentos do manejo com os animais, até aos domingos, sempre me encorajando a ser paciente e persistente; sempre mostrando a importância do querer saber. Pai, sem sua ajuda teria sido impossível, muito obrigada!

À minha mãe, Erly, minha fonte de paz por ter recebido os meus amigos com tanto carinho e zelo;

Ao meu avô, Chico Ramos (*in memoriam*), de longe meu melhor parceiro de dominó; pelas dicas, atenção com meu trabalho e por ter me cedido seu pasto para os animais do projeto, na certeza de que ele recebe meu amor e minha gratidão por tudo todos os dias;

Ao meu esposo, Hugo Oliveira, pela paciência, torcida, força e carinho imenso que me dedica;

À Marianita, pelas alegrias, momentos de muita felicidade em sua companhia, minha parceira de sítio;

Aos meus irmãos, Tavinho e Eliakim, meus companheiros, meus amigos; e à minha família pelo carinho e torcida;

À minha sogra, Lucienne, pela acolhida em sua casa;

À minha prima, Patrícia Monteiro e sua família, por terem me acolhido mais uma vez em sua casa com o carinho de sempre. Em especial à Mariana Monteiro, que “gentilmente me cedeu” seu quarto;

Ao professor Gustavo Ferrer Carneiro, por ter desenvolvido comigo a ideia inicial deste trabalho e também por sua amizade;

À professora Maria Madalena Pessoa Guerra, por ter aceitado me orientar, mesmo sem me conhecer. Por ter sentado comigo, ter me ouvido e acreditado que eu seria capaz;

À professora e amiga Sildivane Valcácia Silva, primeiro pela amizade e pela oportunidade. Pela disposição em ajudar e orientar a qualquer momento, se fazendo sempre presente mesmo estando longe. Muito obrigada!

À professora e amiga Ellen Cordeiro Bento da Silva, pela imensa ajuda em todos os momentos do trabalho e fora dele, pela orientação e pela amizade. Muito obrigada, serei sempre grata!

Aos amigos do laboratório, Pierre, Igor, Hélder, Wilton e Karen, pela força e ajuda dedicada nas visitas à cidade de Jurema para realização das colheitas de sêmen. Muito obrigada, vocês foram muito importantes para a realização deste trabalho;

À amiga Lúcia Arruda, pela ajuda prontamente dedicada todas as vezes que foi solicitada.

Aos demais membros do Androlab, pela companhia, esclarecimento de dúvidas e amizade, André Mariano, Cibele Melo, Thales Maciel, Milena Monteiro e Bruna;

A Daniel, pela ajuda nas análises de dosagem da testosterona;

Ao José de Francisco, que foi uma mão amiga nos trabalhos do sítio.

FONTE FINANCIADORA DO PROJETO

Agradeço a FACEPE pela concessão da bolsa de estudos durante todo o mestrado, sendo de grande importância para a dedicação exclusiva ao mesmo.

SUMÁRIO

	Página
AGRADECIMENTOS	
FONTE FINANCIADORA DO PROJETO	
LISTA DE FIGURAS	
LISTA DE TABELAS	
RESUMO	
ABSTRACT	
1 INTRODUÇÃO.....	12
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	14
2.1. Espermatogênese.....	14
2.2. Efeitos da criopreservação.....	17
2.3. Espécies reativas de oxigênio (ROS).....	18
2.4. Antioxidantes.....	21
2.5. Óleo de Arroz.....	23
3 Objetivos.....	27
3.1. Objetivo Geral.....	27
3.2. Objetivos Específicos.....	27
4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	28
5 Artigo.....	37
6 Anexo.....	56

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. (A) Espermatozóides em foco selecionados através do gradiente RMS; (B) Separação dos eventos unicelulares; (C) Subpopulações com diferentes níveis de intensidade; (D) Subpopulações com diferentes níveis de intensidade; (E) Separação das Subpopulações	54
Figura 2. (A) Células com Membrana Acrossomal Íntegra e Membrana Plasmática Íntegra; (B) Células com Membrana Acrossomal Lesada e Membrana Plasmática Íntegra; (C) Células com Membrana Acrossomal Íntegra e Membrana Plasmática Lesada; (D) Células com Membrana Acrossomal e Membrana Plasmática Lesadas	55

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1. Médias e desvios padrão (média \pm DP) dos parâmetros espermáticos avaliados no sêmen criopreservado de carneiros antes e após tratamento diário com 100 mL de óleo de arroz	52
Tabela 2. Médias e desvios padrão (média \pm DP) dos parâmetros de integridade de membrana acrossomal e plasmática de espermatozoides ovinos criopreservados antes (D0) e após tratamento diário (D21, D42 e D63) com 100 mL de óleo de arroz, bem como dos níveis de testosterona sérica destes animais.....	53

RESUMO

Neste trabalho objetivou-se avaliar os efeitos da alimentação suplementar com óleo de arroz comercial na congelabilidade do sêmen ovino, onde foram utilizados 16 ovinos mestiços, com peso de 35 kg e idade de 15 meses, em média, previamente submetidos à avaliação clínico-andrológica. Os animais foram separados em dois grupos experimentais, de acordo com a qualidade do sêmen, onde o grupo controle foi formado por animais aprovados quanto aos parâmetros seminais e o grupo tratamento por indivíduos com qualidade de sêmen inferior. Os animais do grupo tratamento foram suplementados diariamente, por via oral, com 100 mL por dia de óleo de arroz comercial (Gama Horse), durante 63 dias. Os animais do grupo controle receberam diariamente 100 mL, por via oral, de soro fisiológico durante o mesmo período. Colheitas de sêmen e sangue foram realizadas por vagina artificial e venopunção da jugular, respectivamente, a cada 21 dias, tendo sido a primeira colheita realizada imediatamente antes do início do tratamento (dia zero: D0). O sêmen de cada reprodutor foi avaliado subjetivamente e processado individualmente para a congelação (-196 °C), enquanto que da amostra de sangue foi recuperado o soro, o qual foi armazenado sob congelação (-4 °C). Após descongelação, o sêmen foi avaliado quanto à cinética espermática no sistema computadorizado (CASA), bem como a integridade de membrana acrossomal e plasmática com fluorocromos no citômetro de fluxo. O soro sanguíneo foi utilizado para a dosagem de testosterona por eletroquimioluminescência. No D0, as motilidades total (MT) e progressiva (MP), VCL, VAP e VSL foram maiores ($P < 0,05$) no grupo controle do que no grupo tratamento. Por outro lado, aos 21 dias de tratamento (D21), os valores de VCL, VAP e VSL do grupo tratamento foram superiores ($P < 0,05$) aos do grupo controle. Da mesma forma, aos 63 dias de tratamento a MP, VCL, VAP, VSL e total de espermatozoides com acrossoma íntegro foram maiores ($P < 0,05$) no grupo tratamento do que no grupo controle. Além disso, por meio da comparação de cada grupo ao longo do tempo, pode-se constatar que, enquanto os parâmetros seminais do grupo controle diminuíram ao decorrer do estudo ($P < 0,05$), os do grupo tratamento aumentaram ($P < 0,05$). Não foi observada diferença ($P > 0,05$) entre os grupos experimentais com relação à concentração sérica de testosterona, independente do tempo de avaliação. Assim, conclui-se que a administração oral de óleo de arroz age positivamente sobre os parâmetros cinéticos e de integridade do acrossoma de espermatozoides de carneiros submetidos à criopreservação, e que não influencia os níveis séricos de testosterona.

Palavras chaves: crioinjúria, criopreservação, carneiro, espermatozoide, estresse oxidativo, gama-oryzanol.

ABSTRACT

The aim was to carry out a bibliographic study about the sperm and the influence of reactive oxygen species (ROS) and antioxidant therapies on ram semen cryopreservation, as well as evaluated experimentally the effects of supplementary feeding with commercial rice oil in ram semen freezability. For the latter purpose, were used 16 crossbred sheep, with a mean weight of 35 kg and average age of 15 months, previously evaluated clinical and andrologically. These animals were divided into two groups according to the quality of semen, where the control group included animals with approved seminal parameters, and the treatment group for individuals with lower semen quality. The animals from treatment group were supplemented daily, by oral way, with 100 mL per day commercial rice oil (Horse Range), during 63 days. In turn, animals in the control group received 100 mL of saline solution daily, by oral way, during the same period. Semen and blood samples were obtained by artificial vagina and jugular venipuncture, respectively, at which 21 days, where the first sample was taken immediately before treatment start (day zero D0). Semen from each breeder was subjectively evaluated and individually processed for freezing (-196 °C), while from the blood was recovered the serum, which was stored under freezing (-4 °C). After thawing, the semen was evaluated for sperm kinematics in the computerized system (CASA), as well as for plasma membrane and acrosomal integrity in a flow cytometry. The blood serum was used for testosterone determination by electrochemiluminescence. At D0, total (MT) and progressive (MP) motility, VCL, VAP and VSL were higher ($P < 0.05$) in control than in the treatment group. On the other hand, after 21 days of treatment (D21), VCL, VAP and VSL from treatment group were higher ($P < 0.05$) than the control group. Similarly, after 63 days of treatment the MP, VCL, VAP, VSL and total sperm with intact acrosome were higher ($P < 0.05$) in the treatment than in the control group. Furthermore, according comparison of each group over time, was observed that while the seminal parameters from control group decrease throughout the study ($P < 0.05$), those from treatment group are increase ($P < 0.05$). There was no significant difference ($P > 0.05$) between the experimental groups with respect to serum testosterone concentration, regardless of evaluation time. Thus, it is concluded that oral administration of rice oil acts positively on the kinematics parameters and acrosomal integrity of ram semen subjected to cryopreservation, and that it not influence the plasma levels of testosterone.

Keywords: cryoinjury, cryopreservation, sheep, sperm, oxidative stress, gamma-oryzanol

1 INTRODUÇÃO

As espécies reativas de oxigênio (ROS), ou radicais livres, são íons de oxigênio diatômicos gerados através de sistemas biológicos aeróbicos ou parcialmente aeróbicos (SHARMA; AGARWAL, 1996). Estes são relevantes mediadores de injúrias à célula espermática e estão correlacionados com a diminuição da capacidade de penetração do espermatozoide no ovócito, o que decorre da redução da motilidade e aumento de anormalidades na morfologia dos gametas masculinos (AITKEN, 1995). O papel das ROS tem sido enfatizado tanto na fisiologia quanto na biotecnologia da reprodução. Estudos têm demonstrado que os espermatozoides são capazes de produzir quantidades controladas de ROS endógeno, com o objetivo de induzir a capacitação espermática e a reação acrossomal, tornando-os hábil à fertilização (RIVLIN et al., 2004).

Entretanto, sob condições oxidativas extremas, marcadas pelo desequilíbrio entre antioxidantes e oxidantes em favor dos oxidantes, todos os componentes celulares, incluindo proteínas, ácidos nucleicos, lipídios e açúcares, são possíveis alvos de dano oxidativo (HALLIWELL, 2001). A extensão das lesões depende da natureza e da quantidade de ROS, assim como do momento e da duração de exposição, associada ainda a fatores extracelulares, como temperatura, tensão de oxigênio e ambiente celular (AGARWAL et al., 2003), que pode resultar na morte celular via apoptose ou necrose (SHARMA et al., 1999). Assim, apesar da criopreservação espermática ser uma biotécnica benéfica à expansão das espécies de interesse pecuário, todos os danos anteriormente citados podem ser desencadeados pelo processo de redução de temperatura do sêmen, independente da espécie envolvida.

A ação das ROS pode determinar injúrias à célula espermática, com destaque para a peroxidação dos lipídios da membrana plasmática. Tal alteração, em associação ao ataque das ROS sobre as proteínas de superfície, pode conduzir à descaracterização da fluidez da membrana, e consequentes alterações da morfologia e função celular (BALL; VO, 2002). As ROS, quando em grandes concentrações, podem ocasionar ainda perda da motilidade e inibição do metabolismo (AGARWAL; SAID, 2004). A possível explicação para a alta susceptibilidade do espermatozoide ao estresse oxidativo baseia-se no fato de que, em mamíferos e principalmente em ovinos, as membranas espermáticas são ricas em ácidos graxos poli-insaturados, o que aumenta a fluidez das mesmas e, ao mesmo tempo, as tornam mais vulneráveis aos danos peroxidativos (SIKKA, 2004).

Diferentes terapias antioxidantes têm sido utilizadas para melhorar a qualidade espermática nas diferentes espécies, quando seu sêmen é submetido aos processos de

criopreservação (DEICHSEL et al., 2008). O gama-oryzanol, um composto encontrado apenas no óleo de arroz (XU; GODBER, 1999), têm demonstrado potencial atividade antioxidante (XU et al., 2001). Estudos mostraram que este fitoquímico possui ação equilibrada contra a oxidação de lipídios (DEEPAM et al., 2011) e, portanto, tem a capacidade de prevenir a oxidação proteica e a lipoperoxidação, quando as células são expostas às ROS (SUH et al., 2005). Neste contexto, em virtude de sua atividade antioxidante, o gama-oryzanol evita a formação de peróxidos, estabilizando com isto os componentes lipídicos da membrana plasmática da célula espermática (JULIANO et al., 2005).

Com base no exposto, foi objetivado neste estudo avaliar os efeitos da alimentação suplementar com óleo de arroz comercial na congelabilidade do sêmen ovino.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Espermatogênese

A espermatogênese é o meio pelo qual se dá a formação do gameta masculino (ARRUDA et al., 2010). Uma série de fenômenos é vital para a proliferação, manutenção e amadurecimento das células germinativas; o processo se inicia com as células matrizes, as espermatogônias, que por fim atingem o estado de gametas maduros, os espermatozoides (WISTUBA et al., 2007).

Ao nascimento ocorre o aumento da produção de hormônios gonadotróficos, que, através da mitose, conduzem à proliferação das células matrizes ou espermatogônias tipo A, evento acompanhado da descida testicular e da diferenciação destas células em espermatogônias tipo B, as quais são competentes para iniciarem a meiose (SINHA-HIKIM; SWERDLOFF, 1999). Como uma característica exclusiva do sistema reprodutivo masculino, as células germinativas permanecem relativamente inativas e com sua diferenciação incompleta até a fase pré-púbere (JONGE; BARRATT, 2006). Para assegurar o processo da espermatogênese, as células matrizes são submetidas à renovação contínua por toda vida reprodutiva dos mamíferos. Assim sendo, estas células podem sofrer renovação ou diferenciação (SINHA-HIKIM; SWERDLOFF, 1999).

A espermatogênese nos mamíferos se inicia na puberdade (FLESCHE; GADELLA, 2000). A mesma ocorre nos testículos, mais precisamente nos túbulos seminíferos (ARRUDA et al., 2010), e se dá intermitentemente, sendo os gonócitos as primeiras células germinativas presentes nos túbulos seminíferos que se multiplicam e se diferenciam em espermatogônias (FLESCHE; GADELLA, 2000; RUSSEL; FRANÇA, 1994). Após divisões sucessivas, originam-se as espermatogônias tipo B, que são as últimas células desta linhagem, as quais sofrem divisões mitóticas e formam os espermatócitos primários ou de primeira ordem (RUSSEL; FRANÇA, 1994). Estes, por sua vez, são células diploides com tamanho maior e que sofrem divisões redutoras, originando espermatócitos secundários ou de segunda ordem, que são células haploides. Após divisão destas células, as espermátides são formadas e ao final da fase de diferenciação são formados os espermatozoides (MIES FILHO, 1987).

Os espermatozoides formados durante a espermatogênese são, entretanto, imaturos e ainda desprovidos de atividade móvel. Desta forma, seu trânsito desde a espermição, que acontece no lúmen do túbulo seminífero, até o epidídimo é facilitada por ação dos líquidos secretados pelas células de Sertoli. Uma vez no epidídimo, a célula espermática se torna madura e permanece armazenada na porção caudal deste órgão (cauda do epidídimo). A capacidade de maturação do epidídimo é determinada pela atividade funcional das células que o revestem e é

mantida pelos andrógenos testiculares (HAFEZ, 2004). Centenas de milhares de espermatozoides são produzidos por dia e o controle sobre a qualidade destas células é garantido pela morte celular programada (SINHA-HIKIM; SWERDLOFF, 1999).

A duração da espermatogênese é constante para cada espécie e nos ovinos tem a duração de 49 dias (MIES FILHO, 1987). O período entre um efeito nocivo a este processo, que resulte em diminuição da qualidade espermática, é de, aproximadamente, 60 dias e esse mesmo tempo é o requerido para o restabelecimento da espermatogênese ou para a observação de algum fato que possa influenciar na sua produção, a exemplo da aplicação de algumas substâncias (AMANN, 1993).

Para que todo o processo de espermatogênese ocorra é requerido equilíbrio das funções de todo o organismo. Os fatores ambientais influenciam e podem alterar a secreção de hormônios e, conseqüentemente, a diferenciação celular que ocorre nos testículos, bem como o transporte e a maturação da célula espermática no epidídimo. Situações desfavoráveis, principalmente nutricionais, podem acarretar danos ao sistema reprodutivo, levando a disfunções, as quais podem variar quanto ao grau e intensidade, e caracterizando-se, ainda, como transitórias ou permanentes, determinando um maior ou menor comprometimento da fertilidade do animal (ARRUDA et al., 2010).

Nos carneiros, a função reprodutiva é afetada por uma soma de elementos extrínsecos, como os estímulos sócio-sexuais, o fotoperíodo e a nutrição (BLACHE, et al., 2000). A qualidade do sêmen pode ser prejudicada nos meses de seca, devido às altas temperaturas, o que pode interferir no mecanismo de termorregulação dos testículos, resultando na repercussão negativa sobre a espermatogênese. Na espécie ovina, as características seminais mais atingidas por este fator são morfologia, motilidade, vigor e concentração (CHEMINEAU et al., 1991; MOREIRA et al., 2001). Porém, segundo Maia et al. (2011), na Região Nordeste os carneiros manifestam função espermatogênica regular ao longo do ano.

Neste mesmo sentido, vários estudos comprovam que as características relacionadas com a capacidade fecundante do sêmen, tais como motilidade e morfologia espermática, não são afetadas pela estação do ano, comprovando a adaptação das raças deslanadas às condições climáticas do Nordeste brasileiro. Tal ocorrência pode ser justificada pelo fato de que, nesta região, a espécie ovina não apresenta estacionalidade reprodutiva. Sendo assim, a atividade reprodutiva é influenciada, especialmente, por fatores nutricionais e pelo manejo extensivo da criação (MAIA et al., 2011).

A energia fornecida na dieta é o elemento mais significativo relacionado aos problemas reprodutivos, sendo o excesso mais danoso do que sua falta (MARTIN; WALKDENBROWN,

1995; BEARDEN et al., 2004). Fourie et al. (2004), comparando o manejo nutricional a pasto com o intensivo, observaram que houve efeito relevante destes sobre as medidas testiculares, tais como peso, circunferência e gordura escrotal em carneiros Dorper. Os animais que foram submetidos a manejo intensivo apresentaram maiores medidas testiculares, embora a motilidade, o movimento de massa e a concentração espermática, neste grupo, tenham se mostrado menores. Assim, foi possível constatar que o alto consumo de energia, por meio de concentrados, prejudica a qualidade seminal (MAIA et al., 2011).

Os efeitos do manejo nutricional sobre a função espermatogênica não é acompanhado por mudanças equivalentes na função testicular endócrina, como estimado para a produção de testosterona ou de inibina. Sendo assim, nos ovinos, as mudanças no manejo alimentar podem afetar a secreção de gonadotrofinas por apenas algumas semanas, enquanto que a influência da dieta no crescimento dos testículos pode ser observada por vários meses. Em reprodutores fora da estação de monta, o crescimento testicular atrelado à nutrição não parece estar ligado a uma resposta conjunta das gônadas. Com base nisso, pode-se concluir que o crescimento testicular ocasionado por uma melhora na nutrição é parcialmente independente de uma mudança na secreção de gonadotrofinas (MARTIN; WALKDEN-BROWN, 1995).

Estudos com reprodutores ovinos, buscando respostas para as mudanças na dieta, tanto agudas quanto crônicas, têm demonstrado que os ácidos graxos são capazes de ativar as vias dependentes de GnRH que desencadeiam alterações na função testicular (BLACHE et al., 2002). O esquema nutricional influencia no tamanho dos testículos e na produção espermática (MARTIN; WALKDENBROWN, 1995). Segundo Maurya et al. (2010), ao estudarem o efeito da nutrição sobre a reprodução na espécie ovina, por meio da análise do escore corporal e do comportamento sexual, animais com escore corporal moderado apresentaram melhor performance na maioria das características estudadas, quando comparados aos animais de escore baixo e alto.

Ainda, o manejo nutricional pode alterar a sazonalidade reprodutiva nos animais que a apresentam. Este evento foi caracterizado em éguas bem alimentadas, as quais manifestaram uma estação de monta mais duradoura e até mesmo a extinção das características de sazonalidade em alguns dos indivíduos avaliados. As mesmas observações também foram realizadas nas espécies ovina e caprina (SCARAMUZZI; MARTIN, 2008).

2.2 Efeitos da criopreservação

A criopreservação é uma biotecnologia na qual as células são mantidas em temperaturas próximas (refrigeração) ou abaixo de zero grau (congelação), com o objetivo de preservar sua integridade e sua função por período indeterminado (PEGG, 2002). No caso dos espermatozoides, por meio da preservação de tais características durante a criopreservação, torna-se possível prolongar a capacidade de fecundação do oócito pelo gameta masculino (HOLT, 2000).

Porém, apesar de a criopreservação favorecer a utilização dos espermatozoides por período indeterminado, diminuir os custos relacionados à manutenção de reprodutores e possibilitar o intercâmbio de material genético entre locais distantes (CASTELO et al., 2008), ela pode representar um fator limitante para a reprodução de alguns animais (ORTEGA et al., 2003). Isso ocorre porque durante a conservação do sêmen pelo frio são geradas mudanças nas características da célula espermática (ESTEVES et al., 2000), que podem levar a danos letais ou subletais (STORNELLI et al., 2005). Como consequência disto, o número de células danificadas e apoptóticas aumenta drasticamente no sêmen criopreservado, em relação ao sêmen *in natura*, independente das técnicas de congelação/descongelação empregadas (ORTEGA et al., 2003).

As crioinjúrias se originam da associação entre as mudanças bioquímicas, biofísicas e ambientais, as quais as células são expostas durante o processo de criopreservação (FICKEL et al., 2007). Elas podem ser classificadas, de acordo com sua origem, em primárias, quando oriundas da formação de cristais de gelo durante o choque térmico, e secundárias, quando produzidas pelo efeito solução, que resulta do aumento da concentração de solutos à medida que o gelo é produzido (PESCH; BERGMANN, 2006).

O choque térmico ocorre quando o espermatozoide é submetido a uma curva de refrigeração abrupta, onde a temperatura inicial atinge rapidamente temperaturas próximas a 5 °C. Deste evento resultam os danos celulares e a consequente diminuição irreversível da motilidade espermática. Dentre as mudanças na bioquímica e na atividade celular, originadas da criopreservação, podem ser destacados o aumento da degeneração do DNA, a liberação de material intracelular e a redução da taxa de glicólise, respiração celular e frutólise (WATSON, 2000).

Com base no exposto acima, é recomendado que os espermatozoides sejam submetidos a uma curva de congelação suficientemente lenta, a fim de permitir que grande parte da água localizada no interior da célula migre para o ambiente extracelular, ou seja, que a célula desidrate e assim seja evitada a formação de grandes cristais de gelo e os subseqüentes danos celulares.

Em contrapartida, a taxa de refrigeração deve ser rápida o bastante para que a desidratação celular não seja excessiva, a ponto de comprometer o equilíbrio entre solvente e soluto e desencadear o “efeito-solução” (SNOECK, 2003).

Em termos gerais, algumas das características do sêmen criopreservado são a diminuição do número de células morfológicamente normais (O’ CONNEL et al., 2002) e alterações nos padrões de motilidade (WATSON, 2000). Tais observações clássicas podem ser tidas como o resultado dos danos estruturais e funcionais ocasionados aos gametas, particularmente em nível de membrana plasmática e mitocôndrias (disfunção mitocondrial e diminuição da produção de ATP) (AURICH, 2005). Ainda, estas modificações ocorridas nas membranas são devidas às mudanças nas concentrações de cálcio intracelular que podem justificar o comprometimento da motilidade espermática (SIKKA, 2004). Nas mitocôndrias o comprometimento de suas atividades leva a uma conseqüente diminuição das taxas de ATP na célula (HOLT et al., 1992).

A descongelação é caracterizada por mudanças inversas às ocorridas no processo de congelamento. Nesta fase, ocorre diminuição da concentração de soluto intracelular e o restabelecimento da concentração de água intracelular e do volume celular (HOLT et al., 1992). Entretanto, apesar desta etapa estar associada à restauração dos componentes celulares, ela pode resultar em peroxidação lipídica e danos à membrana, resultante da utilização abrupta de oxigênio pelo espermatozoide (GUERRA et al., 2004).

Em adição, durante a descongelação, caso esta seja excessivamente rápida, pode ocorrer a ruptura da membrana plasmática pelo influxo repentino de água para o interior da célula (HOLT, 2000). Por outro lado, a descongelação excessivamente lenta também ocasiona crioinjúrias, em virtude da recristalização, evento que resulta da junção entre pequenos cristais de gelo para a formação de cristais maiores, os quais rompem a membrana da célula espermática (WATSON, 2000). Deste modo, assim como as taxas de refrigeração, a descongelação deve ser realizada em um ritmo ideal, de modo a não ser excessivamente rápida ou lenta e, assim, permitir que haja o gradual restabelecimento das condições da célula e a não geração de crioinjúrias (WATSON, 1995).

2.3 Espécies reativas de oxigênio (ROS)

O oxigênio é vital para a produção de energia pelas vias aeróbias, porém também dá origem às espécies reativas de oxigênio (ROS), as quais podem comprometer as funções e a sobrevivência das células, o que torna o papel deste elemento paradoxal nos sistemas aeróbios (SALEH; AGARWAL, 2002). Elevadas concentrações de ROS, em detrimento das

concentrações de antioxidantes presentes no organismo, determinam o mecanismo conhecido como estresse oxidativo, que prejudica tanto as células quanto os tecidos e órgãos (SALEH et al., 2003). No entanto, em níveis controlados, as ROS constituem um fator indispensável para processos fisiológicos, a exemplo da reação acrossomal, capacitação e fusão do espermatozoide com o óvulo (AITKEN et al., 2004).

Após o estabelecimento de lesões celulares decorrentes do estresse oxidativo, torna-se difícil impedir que novas lesões ocorram, uma vez que as ROS continuam sendo produzidas em cascata pelo metabolismo celular (DAVIES, 2000). O grau de comprometimento acarretado pelo estresse oxidativo depende tanto da natureza e quantidade das ROS envolvidas, quanto do momento e tempo de exposição a estes agentes. Além disso, fatores extracelulares como composição do ambiente celular, temperatura e tensão de oxigênio também são determinantes (SALEH; AGARWAL, 2002).

As ROS encontradas no sêmen são originadas, particularmente, dos espermatozoides imaturos e dos leucócitos (GARRIDO et al., 2004). Na célula espermática propriamente dita, os principais locais de produção de ROS são as mitocôndrias e a membrana plasmática (AITKEN et al., 1992). Neste contexto, embora a produção de ATP seja fundamental para a motilidade da célula espermática (DONNELLY et al., 2000), as mitocôndrias, que representam uma importante via respiratória celular, consistem em uma das maiores fontes intracelulares de ROS (TURRENS, 2003), principalmente em indivíduos inférteis (SALEH; AGARWAL, 2002).

As principais ROS envolvidas na viabilidade dos espermatozoides e nos índices reprodutivos são o ânion superóxido (O_2^-), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o radical hidroxila (OH) (MANEESH; JAYALELSHMI, 2006). Além dessas, ocorre, ainda, a formação das espécies reativas de nitrogênio (RNS), as quais originam-se a partir do nitrogênio, a exemplo do óxido nítrico (ON^-) e do peroxinitrito ($ONOO^-$) (TURRENS, 2003).

O ânion superóxido (O_2^-) é formado à partir da primeira redução do oxigênio molecular (O_2) (FERREIRA; MATSUBARA, 1997), a qual pode ser enzimática ou não-enzimática (TURRENS, 2003). Em virtude de sua incapacidade de penetrar nas membranas celulares, baixa solubilidade e curta meia vida, o O_2^- é pouco reativo e desempenha, assim, papel de menor destaque na geração dos danos oxidativos (ALVAREZ; MORAES, 2006).

O peróxido de hidrogênio (H_2O_2) tem sua formação a partir da redução divalente do O_2 ou da redução univalente do O_2^- . É considerado como o agente oxidante causador dos maiores danos à célula espermática *in vitro* (ALVAREZ; MORAES, 2006), devido à sua elevada capacidade de penetrar as membranas celulares, o que lhe confere grande habilidade para atingir sistemas enzimáticos intracelulares (BAUMBER et al., 2000).

Por fim, o radical hidroxila (OH^\cdot) é conhecido como a ROS mais prejudicial ao organismo, em virtude de produzir danos às membranas celulares, lipídeos, proteínas, DNA e RNA (BARREIROS et al., 2006). Sua formação ocorre a partir da redução do H_2O_2 , na presença de metais de transição, especialmente ferro e cobre (AGARWAL; SALEH, 2002; TURRENS, 2003), mas pode ser originado também do O_2^\cdot e do ON^\cdot (ALVAREZ; MORAES, 2006). O OH^\cdot é um preconizador da reação de peroxidação lipídica em cascata e da perda de funções da célula espermática (AGARWAL; SALEH, 2002).

Constituintes celulares, tais como proteínas, ácidos nucleicos, açúcares e lipídeos, são potentes alvos da ação das ROS (SALEH; AGARWAL, 2002), sendo os lipídios os principais substratos destes agentes (SANOCKA; KURPISZ, 2004). Com base nisto, as membranas dos espermatozoides de mamíferos são muito susceptíveis ao ataque das ROS e à peroxidação lipídica (AITKEN, 1997; SIKKA, 2004), visto que são ricas em ácidos graxos poli-insaturados, a exemplo dos espermatozoides ovinos (ZALATA et al., 2004). Como consequência disso, elevadas concentrações de oxidantes, em associação à baixa capacidade antioxidante total do sêmen, resultam em manifestações de infertilidade (SHARMA et al., 1999).

A infertilidade resultante da peroxidação lipídica pode ser justificada pelo fato da ação das ROS determinar a redução da fluidez de membrana (MEYERS, 2007), uma vez que tal característica depende dos lipídios de membrana (SANOCKA; KURPISZ, 2004). Isso se deve ao fato da integridade de membrana ser fator determinante para o cumprimento da função da célula espermática durante a reação acrossomal ou, posteriormente, durante a fusão com a membrana plasmática do oócito durante o processo da fertilização, bem como da preservação da motilidade e da resistência aos estresses térmico e osmótico (MEYERS, 2007).

A célula espermática ovina apresenta, após a criopreservação, danos nas suas funções e na distribuição de seus antioxidantes enzimáticos, principalmente do superóxido dismutase (SOD) (MARTI et al., 2008). Desse modo, uma maior vulnerabilidade ao estresse oxidativo é observada nas células criopreservadas, quando comparadas às que se apresentam *in natura* (PERIS et al., 2004; SILVA; GADELLA, 2006), como consequência de uma baixa capacidade antioxidante total do sêmen (SHARMA et al., 1999).

2.4 Antioxidantes

Os antioxidantes são compostos capazes de inibir a formação ou o mecanismo de ação das ROS e estão presentes na célula espermática e no plasma seminal; podem atuar sozinhos ou em conjunto (AURICH, 2008). Segundo a definição de Sies e Stahl (1995), antioxidante é qualquer substância que, presente em baixas concentrações quando comparada a do substrato oxidável, retarda ou inibe a oxidação deste substrato de maneira eficaz.

No decorrer das fases de seu desenvolvimento, a célula espermática perde grande parte de seu citoplasma e, junto com ele, parte das defesas conferidas pelos antioxidantes endógenos, tornando o espermatozoide mais susceptível ao ataque das ROS (CARVALHO et al., 2002). Assim, os espermatozoides dependem, sobretudo, da defesa conferida pelos antioxidantes existentes no plasma seminal (CARVALHO et al., 2002; ALVAREZ; MORAES, 2006), que passa a ser a principal forma de proteção dos mesmos frente às ROS (SIKKA, 2004).

As ROS podem ser neutralizadas pelos antioxidantes presentes no sêmen que podem ser enzimáticos, como a superóxido dismutase (SOD), a catalase (CAT) e o sistema glutatona peroxidase/glutatona redutase (GSH-Px/GSH-Rd) (CARVALHO et al., 2002; ALVAREZ; MORAES, 2006), e os não-enzimáticos. Esses antioxidantes servem como mecanismo de defesa contra a peroxidação lipídica da membrana, diminuindo a quantidade de ROS a níveis fisiológicos e mantendo os padrões de fertilidade (AGARWAL; SALEH, 2002). Estudos demonstraram que a adição desses antioxidantes ao meio diluidor pode melhorar a qualidade do sêmen de bodes (SINHA et al., 1996), de touros (BILODEAU et al., 2001), de cavalos (ALMEIDA; BALL, 2005), de cães (MICHAEL et al., 2007) e de suínos (SATORRE et al., 2007; PENA et al., 2003).

Os antioxidantes enzimáticos são representados por macromoléculas, que podem ser inatas ao organismo ou não. Estas substâncias conferem proteção aos sistemas biológicos, bloqueando ou reparando a ação das ROS ou das espécies reativas ao nitrogênio (RNS) sobre os mesmos (BARREIROS et al., 2006).

A superóxido dismutase (SOD) ocorre de duas formas nos sistemas eucariontes, a SOD-Cobre-Zinco que se localiza principalmente no citosol e a SOD-Manganês que se encontra principalmente nas mitocôndrias (FERREIRA; MATSUBARA, 1997), ambas conferem efetiva defesa contra a lipoperoxidação e contra os danos causados pelos efeitos tóxicos do oxigênio (SIKKA, 1996). Amostras de espermatozoides ovinos criopreservados apresentaram maior integridade do acrossoma quando a SOD foi adicionada ao diluidor (SILVA et al., 2011). A

catalase (CAT) é acionada em resposta ao estresse oxidativo, quando as concentrações de H_2O_2 atingem concentrações que ultrapassam as fisiológicas (NOBLANC et al., 2011).

A glutationa-peroxidase (GSH-Px) e a glutationa-redutase (GSH-Rd) são antioxidantes enzimáticos que inibem a peroxidação lipídica (MANEESH; JAYALEKSHMI, 2006), inibindo a ação das ROS e, conseqüentemente, preservando a motilidade espermática (SIKKA, 2004). São encontradas quatro formas de glutationa peroxidase nos sistemas de defesa dos mamíferos, a saber: GSH-Px1, GSH-Px 2, GSH-Px 3 e GSH-Px 4, sendo conferido a esta última a defesa sobre os espermatozoides (ALVAREZ; MORAES, 2006). Falhas na expressão desses antioxidantes são associadas à infertilidade (NOBLANC et al., 2011). A GSH- Rd não tem ação sobre a remoção das ROS, porém reestrutura a glutationa à sua forma reduzida, a qual integra o substrato da GSH-Px no ciclo metabólico da glutationa (SILVA; GUERRA, 2012), formando o que se conhece por sistema glutationa peroxidase/glutationa redutase. A adição de glutationa redutase ao meio diluidor de sêmen de touros criopreservados garantiu a motilidade espermática através do bloqueio da ação das ROS, impedindo a peroxidação lipídica após descongelação (BILODEAU et al., 2001). O mesmo ocorreu no sêmen de caprinos, onde esse antioxidante aumentou as integridades de membrana plasmática e acrossomal (SINHA et al., 1996), bem como a motilidade do sêmen descongelado de búfalos (ANSARI et al., 2010). Sua ação é modificar as ROS disponíveis em moléculas de menos impacto negativo para a célula, além de diminuir ou impedir a geração de novas ROS, evitando injúrias à membrana plasmática (TRIWULANNINGSIH et al., 2008). A glutationa e as vitaminas C e E, somada aos carotenoides, compõem um dos principais mecanismos de defesa endógena do organismo (RILEY, 1994). Assim, a SOD e a GSH-Px são consideradas os principais antioxidantes enzimáticos que conferem proteção contra os efeitos deletérios da ação das ROS sobre a célula espermática (KASIMANICKAM et al., 2006).

Os antioxidantes não enzimáticos são micromoléculas inatas ao organismo ou não, que conferem proteção ao mesmo da ação das ROS e das RNS (BARREIROS et al., 2006). Selênio, glutationa, clorofilina, curcumina, L-cisteína, proteínas do plasma, β -caroteno, flavonoides, α -tocoferol (vitamina E) e ácido ascórbico (vitamina C) são exemplos desses compostos (BIANCHI; ANTUNES, 1999). A vitamina E bloqueia a reação em cadeia provocada pelas ROS nas membranas celulares (TRABER; PACKER, 1995). A ação conjunta das vitaminas E e C é amplamente vista na literatura, onde se afirma que a interação dessas vitaminas é eficaz na proteção da membrana plasmática, evitando a peroxidação lipídica, bem como conferindo proteção ao DNA (GEY, 1998).

Em circunstâncias normais, o plasma seminal possui os meios necessários para conferir proteção antioxidante e eliminar as ROS, protegendo a célula espermática de possíveis danos (ARGAWAL; PRABAKARAN, 2005). Porém, a criopreservação determina redução significativa das defesas antioxidantes dos espermatozoides (BILODEAU et al., 2001), bem como a diluição (SARLÓS et al., 2002), que acabam favorecendo a produção de ROS (AGARWAL et al., 2003). Como o excesso de produção dessas espécies, a criopreservação tem sido associada com diversos danos à célula espermática (AITKEN et al., 2008; BILODEAU et al., 2000). Assim, esse aumento da produção de ROS deve ser restringido à quantidade mínima necessária para a manutenção das funções espermáticas (AGARWAL et al., 2003).

O emprego de elementos antioxidantes pode ser uma nova arma no combate aos danos causados pelo excesso de ROS nos sistemas biológicos (BIANCHI; ANTUNES, 1999). Portanto, os antioxidantes devem ser incluídos à dieta para que, somados aos efeitos protetores dos antioxidantes endógenos, possam impedir o acúmulo de radicais livres (POMPELLA, 1997). Dietas apropriadas e ricas em vitaminas podem restabelecer as defesas antioxidantes desses sistemas (ANDERSON, 1996).

Porém, ainda que os antioxidantes tenham sido apontados como um recurso promissor em relação à defesa da célula espermática frente à ação das ROS e seus danos subsequentes, as terapias que se utilizam destes agentes ainda obtêm resultados divergentes. Portanto, é de grande importância para desenvolvimento da indústria animal que mais estudos sejam realizados para que a técnica de criopreservação do sêmen seja aprimorada e possa gerar resultados mais eficientes (SILVA; GUERRA, 2012).

2.5 Óleo de Arroz

O farelo de arroz é composto pelo pericarpo e gérmen das sementes do arroz (*Oryza sativa*) e, a partir da moagem deste produto, é obtido o óleo de farelo de arroz, também conhecido por óleo de arroz. O farelo de arroz, por sua vez, constitui cerca de 10% da casca dos grãos de arroz e possui 18 a 22% de óleo. Este óleo é límpido, inodoro, com índice de acidez menor que 0,50, densidade entre 0,920 e 0,930 a 20 °C, índice de refração entre 1.471 e 1.475 a 20 °C, sabor agradável e levemente adocicado. O óleo de arroz é constituído pelos ácidos graxos insaturados, oleico (38,4%), linoleico (34,4%) e α -linolênico (2,2%), assim como pelos ácidos graxos saturados, palmítico (21,5%) e esteárico (2,9%).

Ao contrário da maioria dos óleos vegetais refinados, o óleo de farelo de arroz bruto contém uma rica fração insaponificável, composta por esteróis (43%), álcoois de triterpeno

(28%) de 4-metil-esteróis (10%) e menos componentes polares (19%) (SAYRE et al., 1990). Os tocotrienóis estão disponíveis em quantidade variável no óleo (72 a 612 ppm), sendo representados especialmente pelos β e γ -tocotrienóis, mas também muito rico em tocoferol (cerca de 100 mg) (ROGERS et al., 1993). Porém, o gama-oryzanol se apresenta em quantidades de 13 a 20 vezes maior do que esses compostos (CHEN; BERGMANN, 2005).

Em 1954 foi descoberto no óleo de arroz, por Kaneco e Tsuchiya, o gama-oryzanol (GONZAGA, 2008). Este composto é encontrado em elevadas concentrações de até 1,56% (DECKERE; KORVER, 1996) e extraído unicamente do óleo de farelo de arroz. Ele é formado por um grupo de ésteres de ácido ferúlico, de fitoesteróis e de álcoois de triterpeno (XU; GODBER, 1999) e é considerado o mais importante fitoquímico presente no óleo de arroz, tendo eficiente atuação antioxidante (XU et al., 2001). Por conseguinte, o gama-oryzanol presente no óleo de arroz apresenta ação equilibrada contra a oxidação de lipídios, demonstrando ser mais eficaz do que os tocoferóis na inibição da formação de dienos conjugados (DEEPAM et al., 2011).

O interesse no gama-oryzanol e, conseqüentemente, no óleo de arroz começou a partir do início das comprovações de suas propriedades positivas para a saúde. Dentre tais ações pode-se destacar inibição da agregação de plaquetas, redução do colesterol plasmático, redução na biossíntese do colesterol hepático, redução na absorção de colesterol e aumento da excreção fecal de sais biliares (CICERO, 2001; JULIANO et al., 2005). Além disso, o gama-oryzanol possui propriedades farmacológicas no tratamento de úlceras, na supressão da diabetes, nas alergias e nas inflamações (ISLAM et al., 2011). No caso dos processos inflamatórios, a ação do gama-oryzanol se dá pela inibição do fator nuclear-kB, como resultado de sua atividade antioxidante (SAKAI et al., 2012).

O óleo de arroz é utilizado no Japão há quase duas décadas como antioxidante natural em cosméticos, bebidas e alimentos (SCAVARIELLO, 1998; LAI et al., 2012). Além disso, na medicina tradicional japonesa este óleo é utilizado no tratamento de problemas gastrointestinais e na redução dos sintomas da menopausa, como acelerador de crescimento e estimulante da circulação capilar da pele. O óleo de farelo de arroz apresenta, ainda, efeito antiaterogênico, o que se deve às propriedades anti-hiperlipidêmica e antioxidante do gama-oryzanol (HIRAMSU et al., 1991; KIM et al., 1995; JULIANO et al., 2005) e dos demais constituintes do óleo de arroz, como os tocoferóis, tocotrienóis, entre outros (RUKMINI et al., 1991; ROGERS et al., 1993).

Estudos relataram atividade antioxidante do gama-oryzanol, bem como efeito radioprotetor e coadjuvante na quimioterapia (ISMAIL et al., 2010; VALANTINA et al., 2010). Além disso, este agente se mostra eficiente em reduzir a massa tumoral, quando associado a

biomarcadores pró-angiogênicos, inibindo a neogênese no interior dos tumores devido à redução do número de vasos sanguíneos (KIM et al., 2012). Em adição, tem-se ressaltado os efeitos do gama-oryzanol sobre a via de regulação dos genes antioxidantes, catalase e GSH-Px (Klongpityapong et al., 2013), o que viabilizou o uso deste composto como quimioterapia acessória e capaz de tornar células cancerosas da próstata mais sensíveis aos radicais livres. Com base nisto, são viabilizadas a quimioprevenção do câncer de próstata e a diminuição de agentes citotóxicos.

O gama-oryzanol e o ácido ferúlico, presentes no óleo de farelo de arroz, comprovadamente possuem a mesma eficácia que a curcumina para a prevenção da hepatite alcoólica (CHOTIMARKORN; USHIO, 2008). Além disso, este agente apresenta atividade moduladora do sistema imune, por proporcionar o aumento da proliferação de linfócitos B, assim pode ser usado quando se espera a otimização desse sistema (SIERRA et al., 2005; GHATAK; PANCHAL, 2012). Segundo Klongpityapong et al. (2013), o gama-oryzanol é um agente eliminador de radicais orgânicos e, por isso, é capaz de prevenir a lipoperoxidação das membranas. Foi demonstrado que o óleo de farelo de arroz e seus constituintes não possuem toxicidade, além de não apresentarem efeito carcinogênico (De DECKERE et al., 1996).

Apesar do exposto, somente na última década foram iniciados os estudos sobre o efeito do gama-oryzanol, utilizado na suplementação alimentar, sobre as características seminais. Em estudo com equinos, foram fornecidos 150 mL de óleo de soja para o grupo controle e 150 mL de óleo de arroz contendo 1,1% de gama-oryzanol para o grupo tratamento (Gamahorse, HT Nutri®, Brasil Gamahorse®), por 60 dias, e não foram observadas diferenças entre os grupos sobre os parâmetros espermáticos avaliados, tais como volume, concentração, morfologia e integridade de membrana (RAPHAEL et al., 2006).

Resultados também encontrados por Gonzaga (2012) em estudo semelhante, onde seis equinos foram suplementados com 300mL de óleo de arroz semi-refinado em elevada concentração de gama-oryzanol por 60 dias. Foi constatado que o tratamento não afetou a qualidade espermática.

Da mesma forma, Arlas et al. (2008) também avaliaram os efeitos da suplementação alimentar com óleo de arroz comercial (Gamahorse®) sobre os parâmetros reprodutivos em equinos, onde foram fornecidos 200mL, por via oral, durante 80 dias de tratamento. Tal estudo revelou melhoria na concentração espermática, na motilidade total, na funcionalidade da membrana plasmática e no potencial antioxidante total do grupo suplementado com o óleo de arroz. Portanto, é possível que o efeito positivo da administração do óleo de arroz decorra do potencial antioxidante e conseqüente prevenção da peroxidação lipídica da membrana da célula

espermática. Por outro lado, não houve mudança no volume seminal, porcentual de gametas com membranas íntegras e dosagens de testosterona ou estradiol.

Em estudo recente, Kaeoket et al. (2012) evidenciaram efeito positivo da administração de 0,1mg/mL (0,16 mMol) de gama-oryzanol no diluidor (lactose-gema de ovo) do sêmen de suínos, uma vez que constataram maiores ($P < 0,001$) porcentagens de espermatozoides com motilidade progressiva (34 contra 47,0 e 48,5%), viabilidade (35,5 contra 48,1 e 50,1%) e integridade acrossomal (39,8 contra 50,8 e 54,9%), respectivamente, nos espermatozoides do grupo tratado (0,1 mg/mL) com BiogrowNaturalTM ou KingTM rice bran oil, quando comparados aos dos gametas dos animais dos grupos Controle, respectivamente.

A variação na composição lipídica da membrana plasmática da célula espermática nas diferentes espécies é considerada fator determinante para a viabilidade do sêmen criopreservado (VALENÇA; GUERRA, 2007). As baixas taxas de fertilidade obtidas com sêmen criopreservado na espécie ovina são atribuídas ao alto grau de insaturação de sua membrana plasmática (SANOCKA; KURPISZ, 2004). Assim, o óleo de arroz e seu principal constituinte, o gama-oryzanol, através de sua atividade antioxidante (XU et al., 2001), pode conferir maior proteção à membrana plasmática nesta espécie.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Avaliar os efeitos da alimentação suplementar de ovinos, com óleo de arroz comercial (Gama Horse, HT Nutri ®, Brasil), na congelabilidade do sêmen ovino.

3.2 Objetivos Específicos

- a) Avaliar os efeitos da alimentação suplementar de ovinos, com óleo de arroz comercial (Gama Horse, HT Nutri ®, Brasil), nos parâmetros cinéticos, integridade das membranas plasmática e acrossomal de espermatozoides ovinos submetidos à criopreservação;
- b) Avaliar os efeitos da alimentação suplementar de ovinos, com óleo de arroz comercial (Gama Horse, HT Nutri ®, Brasil), sobre as concentrações séricas de testosterona.

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGARWAL, A.; PRABAKARAN, S. A. Mechanism, measurement, and prevention of oxidative stress in male reproductive physiology. **Indian Journal of Experimental Biology**, v. 43, p. 963-97, 2005.
- AGARWAL, A.; RAMADAN, A.; MOHAMED, A. Role of reactive oxygen species in the pathophysiology of human reproduction. **Fertility and Sterility**, v. 79, n. 4, p. 829-843, 2003.
- AGARWAL, A.; SAID, T. M. Oxidative stress, DNA damage and apoptosis in male infertility: a clinical approach. **BJU International**, v. 95, p. 503-507, 2004.
- AGARWAL, A.; SALEH, R. A. Role of oxidants in male infertility: rationale, significance, and treatment. **Urologic Clinics of North America**, v. 29, n. 4, p. 1-12, 2002.
- AGARWAL, A.; SALEH, R. A.; BEDAIWY, M. A. Role of reactive oxygen species in the pathophysiology of human reproduction. **Fertility and Sterility**, v. 79, p. 829-843, 2003.
- AITKEN, R. J. Free radicals, lipid peroxidation and sperm function. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 7, p. 559-668, 1995.
- AITKEN, R. J. et al. Redox activity associated with the maturation and capacitation of mammalian spermatozoa. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 36, n. 8, p. 994-1010, 2004.
- AITKEN, R. J.; BAKER, M. A. The role of proteomics in understanding sperm cell biology. **International Journal of Andrology**, v. 31, n. 3, p. 295-302, 2008.
- AITKEN, R. J.; BUCKINGHAM, D. W.; WEST, K. M. Reactive oxygen species and human spermatozoa: Analysis of the cellular mechanisms involved in luminol- and lucigenin-dependent chemiluminescence. **Journal of Cellular Physiology**, v. 151, p. 466, 1992.
- ALMEIDA, J.; BALL, B. Effect of alpha-tocopherol and tocopherol succinate on lipid peroxidation in equine spermatozoa. **Animal Reproduction Science**, v. 87, p. 321-337, 2005.
- ALVAREZ, C. A.; MORAES, G. V. D. EFEITOS DA SELENOMETIONINA E VITAMINA C SOBRE O SÊMEN. **Revista de Saúde e Biologia**, v. 1, n. 1, p. 42-51, 2006.
- AMANN, M. P. Equine Reproduction. In: AMANN, M. P. **Physiology and Endocrinology**. [S.l.]: Philadelphia, 1993. Cap. 77, p. 659-683.
- ANDERSON, D. Antioxidant defences against reactive oxygen species causing genetic and other damage. **Mutation Research**, v. 350, n. 1, p. 350, 1996.
- ANDRADE, N. L. Óleo de Arroz rico em gama oryzanol e alterações morfofisiológicas em ratos treinados. **Monografia, Universidade Estadual de Maringá**, Maringá, 2010.

- ANSARI, M. et al. Effect of exogenous glutathione in extender on the freezability of Nili-Ravi buffalo (*Bubalus bubalis*) bull spermatozoa. **Animal Science papers and Reports**, v. 28, p. 235-244, 2010.
- ARLAS, T. R. Efeito da suplementação alimentar de garanhões com óleo de arroz contendo gamma-oryzanol na qualidade espermática. **Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária), Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Medicina Veterinária**, Porto Alegre, Agosto 2008.
- ARRUDA, R. P. D. et al. Nutraceuticals in reproduction of bulls and stallions. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Pirassununga, SP, Brazil, v. 39, p. 393-400, 2010.
- ASADPOUR, R.; JAFARI, R.; NASRABADI, H. Influence of Added Vitamin C and Vitamin E on Frozen-Thawed Bovine Sperm Cryopreserved in Citrate and Tris-Based Extenders. **Veterinary Research Forum**, v. 2, n. 1, p. 37 - 44, 2011.
- AURICH, C. Factors affecting the plasma membrane function of cooled-stores stallion spermatozoa. **Animal Reproduction Science**, v. 89, p. 65-75, 2005.
- AURICH, C. Recent advances in cooled-semen technology. **Animal Reproduction Science**, v. 107, p. 268-275, 2008.
- BALL, B. A.; VO, A. T. Detection of lipid peroxidation in equine spermatozoa based upon lipophilic fluorescent de C11-BODIPY581/591. **Journal of Andrology**, v. 23, p. 259-269, 2002.
- BARREIROS, A. L. B. S.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Química Nova**, v. 29, n. 1, p. 113-126, 2006.
- BAUMBER, J. et al. The Effect of Reactive Oxygen Species on Equine Sperm Motility, Viability, Acrosomal Integrity, Mitochondrial Membrane Potential, and Membrane Lipid Peroxidation. **Journal of Andrology**, v. 21, n. 6, p. 895-902, 2000.
- BEARDEN, J.; FUQUAY, J.; WILLARD, S. Applied animal reproduction. **Upper Saddle River: Pearson-Prentice Hall**, p. 427, 2004.
- BIANCHI, M. D. L. P.; ANTUNES, L. M. G. FREE RADICALS AND THE MAIN DIETARY ANTIOXIDANTS. **Revista de Nutrição**, v. 12, n. 2, p. 123-130, 1999.
- BILODEAU, J. et al. Thiols prevent H₂O₂-mediated loss of sperm motility in cryopreserved bull semen. **Theriogenology**, v. 56, p. 275-286, 2001.
- BLACHE, D. et al. Metabolic factors affecting the reproductive axis in male sheep. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 120, p. 1-11, 2000.
- CARVALHO, O. et al. Efeito oxidativo do óxido nítrico e infertilidade no macho. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 38, n. 1, p. 33-38, 2002.

- CASTELO, T. S.; FROTA, T. R.; SILVA, A. R. Considerações sobre a criopreservação do sêmen de caprinos. **Acta Veterinaria Brasilica**, v. 2, n. 3, p. 67-75, 2008.
- CHEMINEAU, P. et al. Training manual on artificial insemination in sheep and goats. **FAO Animal Production and Health**, v. 83, p. 222, 1991.
- CHEN, M.-H.; BERGMAN, C. J. A rapid procedure for analysing rice bran tocopherol, tocotrienol and gama-oryzanol contents. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 18, p. 139-151, 2005.
- CHOTIMARKORN, C.; USHIO, H. The effect of trans-ferulic acid and gamma-oryzanol on ethanol-induced liver injury in C57BL mouse. **Phytomedicine**, v. 15, n. 11, p. 951-958, 2008.
- CICERO, A. F. G.; GADDI, A. Rice Bran Oil and γ -Oryzanol in the Treatment of Hyperlipoproteinaemias and Other Conditions. **Phytotherapy Research**, v. 15, p. 277-289, 2001.
- DAVID, J. et al. Resveratrol: Ações e benefícios à saúde humana. **Diálogos e Ciência**, v. 10, n. 5, p. 1-11, 2007.
- DECKERE, E. A. M. D.; KORVER, O. Minor Constituents of Rice Bran Oil as Functional Foods. **Nutrition Reviews**, v. 54, n. 11, p. 120-126, 1996.
- DEEPAM, L. S. A.; SUNDARESAN, A.; ARUMUGHAN, C. Stability of Rice Bran Oil in Terms of Oryzanol, Tocopherols, Tocotrienols and Sterols. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 88, p. 1001–1009, 2011.
- DEGÁSPARI, C.; WASZCZYNSKYJ, N. Antioxidants Properties of Phenolic Compounds. **Revista Visão Acadêmica**, v. 5, n. 1, p. 33– 40, 2004.
- DONNELLY, E. T. et al. Differences in nuclear DNA fragmentation and mitochondrial integrity of semen and prepared human spermatozoa. **Human Reproduction**, v. 15, n. 7, p. 1552-1561, 2000.
- ESTEVES, S. et al. Improvement in motion characteristics and acrosome status in cryopreserved human spermatozoa by swim-up processing before freezing. **Human Reproduction**, v. 15, p. 2173-2179, 2000.
- FERREIRA, A. L. A.; MATSUBARA, L. S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 43, n. 1, p. 61-68, 1997.
- FICKEL, J.; WAGENER, A.; LUDWIG, A. Semen cryopreservation and the conservation of endangered species. **European Journal of Wildlife Research**, v. 53, p. 81-89, 2007.
- FLESCHE, F. M.; GADELLA, B. M. Dynamics of the mammalian sperm plasma membrane in the process of fertilization. **Biochimica et Biophysica Acta**, p.197-235, 2000.

- FOURIE, P. J. et al. Scrotal, testicular and semen characteristics of young Dorper rams managed under intensive and extensive conditions. **Small Ruminant Research**, v. 54, p. 53-59, 2004.
- GARRIDO, N. et al. Pro-oxidative and anti-oxidative imbalance in human semen and its relation with male fertility. **Asian Journal of Andrology**, v. 6, p. 59-65, 2004.
- GEY, K. F. Vitamins E plus C and interacting conutrients required for optimal health. **Biofactors**, v. 7, n. 1/2, p. 113-174, 1998.
- GONZAGA, I. V. Supplementation with rice bran oil semirefined with high level of gamma-oryzanol in stallion's, **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science** v. 49, n. 3, p. 215-220, 2012
- GUERRA, M. M. P.; EVANS, G.; MAXWELL, W. M. C. Papel de antioxidantes e antioxidantes na andrologia. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 28, n. 4, p. 187-195, 2004.
- HAFEZ, E. S. E.; HAFEZ, B. **Reprodução Animal**. 7. ed. São Paulo: Manole, 2004.
- HALLIWELL, B. Role of free radicals in the neurodegenerative diseases: therapeutic implications for antioxidant treatment. **Drugs & Agin**, v. 18, n. 9, p. 685-716.
- HIRAMITSU, T.; ARMSTRONG, D. Preventive effect of antioxidants on lipid peroxidation in the retina. **Ophthalmic Research**, v. 23, p. 196–203, 1991.
- HOLT, W. V. Fundamental aspects of sperm cryobiology:the importance of species and individual differences. **Theriogenology**, v. 53, p. 47-58, 2000.
- HOLT, W.; HEAD, M.; NORTH, R. Freeze-induced membrane damage in ram spermatozoa is manifested after thawing: observations with experimental cryomicroscopy. **Biology of Reproduction**, v. 46, p. 1086-1094, 1992.
- ISLAM, M. S. et al. Biological abilities of rice bran-derived antioxidant phytochemicals for medical therapy. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 11, p. 1847-1853, 2011.
- ISMAIL, M. et al. Gamma-oryzanol rich fraction regulates the expression of antioxidant and oxidative stress related genes in stressed rat's liver. **Nutrition & Metabolism**, p. 1743-7075, 2010..
- JONGE, C. J. D.; BARRATT, C. L. R. The Sperm Cell Production, Maturation, Fertilization, Regeneration. **Journal of Andrology**, v. 27, n. 6, p. 707.
- JUAN, M. et al. trans-Resveratrol, a natural antioxidant from grapes, increases sperm output in healthy rats. **The Journal of Nutrition**, v. 135, n. 4, p. 757–760, 2005.
- JULIANO, C. et al. Antioxidant activity of gamma-oryzanol: Mechanism of action. **International Journal of Pharmaceutics**, 146–154, 2005.
- DEICHSEL, K.; PALM, F.; KOBLISCHKE, P. Effect of a dietary antioxidant supplementation on semen quality in pony stallions. **Theriogenology**, v. 69, n. 8, p. 940-945, 2088.

- KAEOKET, K. et al. Effect of Gamma-Oryzanol-Enriched Rice Bran Oil on Quality of Cryopreserved. **Theriogenology**, p. 1149-1153, 2012.
- KASIMANICKAM, R. et al. Association of classical semen parameters, sperm DNA fragmentation index, lipid peroxidation and antioxidant enzymatic activity of semen in ram-lambs. **Theriogenology**, v. 65, n. 7, p. 1407-1421, 2006.
- KIM, J.; PYUN, Y. Extraction of soymilk using ohmic heating. **9th CONGRESS of FOOD SCIENCE & TECHNOLOGY**, 1995, Budapeste.
- KIM, S. H.; VU, P.-L.; LEE, K. T. Dietary rice bran component γ -oryzanol inhibits tumor growth in tumor bearing mice. **Molecular Nutrition & Food Research**, p. 935–944, 2012.
- KLONGPITYAPONG, P.; SUPABPHOL, R.; SUPABPHOL, A. Antioxidant Effects of Gamma-oryzanol on Human Prostate. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, v. 14, p. 5421-5425, 2013.
- LAI, M. et al. Effects of rice bran oil on the blood lipids profiles and insulin resistance in type 2 diabetes patients. **Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition.**, v. 51, p. 15-18, 2012.
- LIMA, L. et al. Quercetina e seus efeitos no metabolismo de coelhos. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 38, n. 4, p. 196 –200, 2001.
- MAIA, M. S.; MEDEIROS, I. M.; LIMA, C. A. C. Características reprodutivas de carneiros no Nordeste do Brasil: parâmetros seminais. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 35, n. 2, p. 175-179, 2011.
- MANEESH, M.; JAYALEKSHMI, H. ROLE OF REACTIVE OXYGEN SPECIES AND ANTIOXIDANTS ON PATHOPHYSIOLOGY. **Indian Journal of Clinical Biochemistry**, v. 21, n. 2, p. 80-89, 2006.
- MARTI, E. et al. Effect of the cryopreservation process on the activity and immunolocalization of antioxidant enzymes in ram spermatozoa. **Journal of Andrology**, v. 29, n. 4, p. 459-467, 2008.
- MARTIN, G.; WALKDEN-BROWN, S. Nutritional influences on reproduction in mature male sheep and goats. **Journal of Reproduction and Fertility. Supplement**, v. 49, p. 437-449, 1995.
- MAURYA, V. P. et al. Effect of induced body condition score differences on sexual behavior, scrotal measurements, semen attributes and endocrine responses in Malpura rams under hot semi-arid environment. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, v. 94, p. 308-317, 2010.
- MEMON, A. et al. Effect of ascorbic acid concentrations, methods of cooling and freezing on Boer goat semen cryopreservation. **Reproduction in Domestic Animals**, p. 1-6, 2012.

- MEYERS, S. A. Advanced Semen Tests for Stallions. **Current Therapy in Equine Reproduction**, n. 5, p. 257-280, 2007.
- MICHAEL, A. et al. Effect of antioxidant supplementation on semen quality and reactive oxygen species of frozen-thawed canine spermatozoa. **Theriogenology**, v. 28, p. 204-212, 2007.
- MIES FILHO, A. **Reprodução dos animais e inseminação artificial**. 5. ed. Porto Alegre: Sulina, v. 1, p. 99-109, 1982.
- MOREIRA, E. P.; MOURA, A. A. A.; A.A.ARAÚJO. Efeito da insulação escrotal sobre a biometria testicular e parâmetros seminais em carneiros da raça Santa Inês criados no estado do Ceará. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 30, p. 1704-1711, 2001.
- NOBLANC, A. et al. Glutathione Peroxidases at work review on epididymal spermatozoa: an example of the dual effect of reactive oxygen species on mammalian male fertilizing ability. **Journal of Andrology**, v. 32, n. 6, p. 641-650, 2011.
- O'CONNEL, M.; MCCLURE, M.; LEWIS, S. The effects of cryopreservation on sperm morphology, motility and mitochondrial function. **Human Reproduction**, v. 17, p. 704-709, 2002.
- ORTEGA, A. M. et al. Peroxidación lipídica y antioxidantes en la preservación de semen. Una revisión. **Interciência**, v. 28, n. 12, p. 699-704, 2003.
- PEGG, D. E. The history and principles of cryopreservation. **Seminars in Reproductive Medicine**, v. 20, n. 1, p. 5-13, Fevereiro 2002.
- PENA, F. J.; JOHANNISSON, A.; WALLGREN, M. Concentration to enhance Antioxidant supplementation in vitro improves boar sperm motility and mitochondrial membrane potential after cryopreservation of different fractions of the ejaculate. **Animal Reproduction Science**, v. 78, p. 85-98, 2003.
- PERIS, S. et al. Cryopreservation of ram semen facilitates sperm DNA damage:relationship between sperm andrological parameters and the sperm chromatin structure assay. **Journal of Andrology**, v. 25, n. 2, p. 224-233, 2004.
- PESCH, S.; BERGMANN, M. Structure of mammalian spermatozoa in respect to viability and cryopreservation. **Micronesia Journal**, v. 37, p. 597-612.
- POMPELLA, A. Biochemistry and histochemistry of oxidant stress and lipid peroxidation. **International Journal of Vitamin and Nutrition Research**, v. 67, n. 5, p. 289-297, 1997.
- RAPHAEL, C. F.; A.A.O.GOBESSO; ANDRADE, A. F. C. Effects of dietary supplementation with gamma-oryzanol on seminal characteristics of stallions. **Animal Reproduction**, v. 3, p. 253, 2006.

- RILEY, P. A. Free radicals in biology: oxidative stress and the effects of ionizing radiation. **International Journal of Radiation Biology**, v. 65, n. 1, p. 27-33, 1994.
- RIVLIN, J.; MENDEL, J.; RUBINSTEIN, S. Role of hydrogen peroxide in sperm capacitation and acrosome reaction. **Biology of Reproduction**, v. 70, p. 518-522, 2004.
- ROGERS, E. J. et al. Identification and quantitation of ζ -oryzanol components and simultaneous assessment of tocopherols in rice bran oil. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 70, p. 301-307, 1993.
- RUKMINI, C.; RAGHURAM, T. Nutritional and biochemical aspects of the hypolipidemic action of rice bran oil: a review. **Journal of American College Nutrition**, v. 10, n. 6, p. 593-601, 1991.
- RUSSEL, L.; FRANÇA, L. D. Building a testis. **Tissue & Cell**, v. 27, n. 2, p. 129-147, abril 1995.
- SAKAI, S.; MURATA, T.; TSUBOSAKA, Y. γ -oryzanol reduces adhesion molecule expression in vascular endothelial cells via suppression of nuclear factor- κ B activation. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, p. 3367-3372, 2012.
- SALEH, R. A. et al. Leukocytospermia is associated with increased reactive oxygen species production. **Fertility and Sterility**, v. 78, n. 2, p. 1215-1224, 2002.
- SALEH, R. A. et al. Negative effects of increased sperm DNA damage in relation to seminal oxidative stress in men with idiopathic and male factor infertility. **Fertility and Sterility**, v. 79, n. 3, p. 1597-1605, 2003.
- SALEH, R. A.; AGARWAL, A. Oxidative Stress and Male Infertility: Review From Research Bench to Clinical Practice. **Journal of Andrology**, v. 23, n. 6, p. 737-752, 2002.
- SANOCCA, D.; KURPISZ, M. Reactive oxygen species and sperm cells. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 2, p. 12-18, 2004.
- SARLÓS, P. et al. Comparative evaluation of the effect of antioxidants in the conservation of ram semen. **Acta Veterinaria Hungarica**, v. 50, n. 2, p. 235-245, 2002.
- SATORRE, M. et al. α -Tocopherol modifies tyrosine phosphorylation and capacitation-like state of cryopreserved porcine sperm. **Theriogenology**, v. 68, p. 958-965, 2007.
- SAYRE, B.; SAUNDERS, R. Rice bran and rice bran oil. **Lipid Technology**, v. 2, p. 72-76, 1990.
- SCARAMUZZI, R. J.; MARTIN, G. B. The importance of interactions among nutrition, seasonality and socio-sexual factors in the development of hormone-free methods for controlling fertility. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 43, p. 129-136, 2008.
- SCARAVIELLO, E.; ARELLANO, D. Gamma-oryzanol: an important component in rice bran oil. **Archivos Latinoamericanos de Nutrición**, v. 48, p. 7-12, 1998.

- SHARMA, R. K. et al. The reactive oxygen species– total antioxidant capacity score is a new measure of oxidative stress to predict male infertility. **Human Reproduction**, v. 14, n. 11, p. 2801-2807, 1999.
- SHARMA, R. K.; AGARWAL, A. A role of reactive oxygen species in male fertility. **Urology**, v. 48, p. 838-850, 1996.
- SIES, H. Strategies of antioxidant defense. **European Journal of Biochemistry**, p. 101-107, 1993.
- SIKKA, S. Oxidative stress and role of antioxidants in normal and abnormal sperm function. **Frontiers in Bioscience**, v. 1, p. 78-86, 1996.
- SIKKA, S. C. Role of oxidative stress and antioxidants in andrology and assisted reproductive technology. **Journal of andrology**, v. 25, n. 1, p. 5-18, 2004.
- SILVA, E. C. B. D.; GUERRA, M. M. P. Antioxidant therapies on sperm cryopreservation. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**, v. 107, p. 143-149, 2012.
- SILVA, E. C. B.; CAJUEIRO, J. F. P.; SILVA, S. V.; SOARES, P. C.; GUERRA, M. M. P. Effect of antioxidants resveratrol and quercetin on in vitro evaluation of frozen ram sperm. **Theriogenology**, v. 77, p. 1722–1726, 2011.
- SILVA, P.; GADELLA, B. Detection of damage in mammalian sperm cells. **Theriogenology**, v. 65, p. 958-978, 2006.
- SINHA, M. et al. The effect of glutathione on the motility, enzyme leakage and fertility of frozen goat semen. **Animal Reproduction Science**, v. 41, p. 237-243, 1996.
- SNOECK, P. P. N. Aspectos da criopreservação do sêmen equino: composição do meio diluidor, curvas de congelamento e fertilidade. **Tese (Doutorado em Ciência Animal)**, Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, , p. 116, 2003.
- STOJANOVIC', S.; SPRINZ, H.; BREDE, O. Efficiency and mechanism of the antioxidant action of trans-resveratrol and its analogues in the radical liposome oxidation. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 391, n. 1, p. 79–89, 2001.
- STORNELLI, M. et al. Efecto de los procesos de criopreservación sobre la fertilidad seminal. **Analecta Veterinaria**, v. 25, n. 2, p. 28-35, 2005.
- SUH, M. H. et al. Antioxidative activity of microencapsulated gamma-oryzanol on high cholesterol-fed rats. **Journal of Agriculture Food Chemistry**, v. 53, n. 25, p. 9747-9750, 2005.
- TRABER, M. G.; PARCKER, L. Vitamin E: beyond antioxidant function. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 62, n. 6, p. 1501-1509, 1995.
- TRIWULANNINGSIH, E. et al. The effect of glutathione addition in sperm diluents on the quality of bovine chilled semen. **Indonesian Journal of Agriculture**, v. 1, n. 1, p. 64-69, 2008.

- TURRENS, J. F. Mitochondrial formation of reactive oxygen species. **The Journal of Physiology**, v. 552, n. 2, p. 335–344, 2003.
- VALANTINA, S.; SAHAYARAJ, P. A.; PREMA, A. A. Antioxidant stability in palm and rice bran oil using simple parameters. **Rasayan Journal of Chemistry**, v. 3, p. 44-50, 2010.
- WATSON, P. Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 7, n. 4, p. 871 - 891 , 1995.
- WATSON, P. F. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. **Animal Reproduction Science**, v. 60-61, p. 481-492, 2000.
- WISTUBA, J.; STUKENBORG, J.-B.; LUETJENS, C. M. Mammalian Spermatogenesis. **Functional Development and Embryology**, v. 1, n. 2, p. 99-117, 2007.
- XU, Z.; GODBER, S. Purification and Identification of Components of ζ -Oryzanol in Rice Bran Oil. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 47, n. 4, p. 2724-2728, 1999.
- XU, Z.; GODBER, S. Antioxidant Activities of Major Components of γ -Oryzanol from Rice Bran Using a Linoleic Acid Model. **Journal of the American Oil Chemist's Society**, v. 78, n. 6, p. 645-647, 2001.
- ZALATA, A. A. et al. Relationship between acrosin activity of human. **Asian Journal of Andrology**, v. 6, p. 313-318, 2004.

5. Artigo

Artigo científico a ser submetido ao periódico **Animal Reproduction Science**. Todas as normas de redação e citação deste capítulo atendem às estabelecidas pelo periódico (em anexo).

1 **Efeito da suplementação oral do óleo de arroz na congelabilidade do sêmen ovino**

2

3 Effects of oral supplementation with rice bran oil on ram semen freezability

4

5 J.A.B. Monteiro^{a,*}, E.C.B. Silva^b, R.A.J.A. Silva^a, I.H.A.V. Nery^a, H.M. Souza^a, W.A. Gomes^a,
6 L.C.P. Arruda^a, K.M.G. Silva^a, S.V. Silva^c, M.M.P. Guerra^{a*}

7

8 ^aDepartamento de Medicina Veterinária, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife,
9 52.171-900, Pernambuco, Brasil10 ^bDepartamento de Morfologia e Fisiologia Animal, Universidade Federal Rural de Pernambuco,
11 Recife, 52.171-900, Pernambuco, Brasil12 ^cDepartamento de Biotecnologia, Centro de Biotecnologia, Universidade Federal da Paraíba,
13 João Pessoa, 58.051-900, Paraíba, Brasil

14

15 *Autor para correspondência. Tel.: +55 81 33206412

16 Fax: +55 81 33206057

17 E-mail: mpguerra@dmv.ufrpe.br

18

19 RESUMO

20 Objetivou-se avaliar os efeitos da suplementação oral com óleo de arroz sobre a
21 congelabilidade do sêmen ovino. Foram utilizados dezesseis ovinos, os quais foram divididos em
22 dois grupos, segundo a qualidade do sêmen. O grupo controle (GC) foi formado por animais
23 aprovados quanto aos parâmetros seminais e o grupo tratamento (GT) por indivíduos com
24 qualidade seminal inferior. Os animais do GT foram suplementados com 100 mL por dia de óleo
25 de arroz, via oral, durante 63 dias, e os animais do GC receberam diariamente 100 mL de soro
26 fisiológico, por via oral, pelo mesmo período. Foram realizadas colheitas de sêmen e sangue a
27 cada 21 dias; a primeira colheita foi realizada imediatamente antes do início do tratamento (dia
28 zero; D0). Após colheita, as amostras de sêmen foram submetidas a avaliação e congelação.
29 Após descongelação, o sêmen foi avaliado quanto a cinética espermática e a integridade das
30 membranas acrossomal e plasmática, enquanto que no soro sanguíneo foi dosada a concentração
31 de testosterona. Nas amostras congeladas no D0, os valores de motilidades total (MT) e
32 progressiva (MP), VCL, VAP e VSL foram maiores ($P<0,05$) no GC do que no GT. Porém, após
33 21 dias (D21), os valores de VCL, VAP e VSL das amostras do GT foram superiores ($P<0,05$) às
34 do GC. Aos 63 dias (D63) a MP, VCL, VAP, VSL e total de espermatozoides com acrossoma

35 íntegro foram maiores ($P<0,05$) no GT do que no GC. As análises das amostras congeladas
36 demonstraram que os parâmetros seminais do GC diminuíram ao longo do estudo ($P<0,05$),
37 enquanto as do GT aumentaram ($P<0,05$). Não houve diferença significativa ($P>0,05$) entre os
38 grupos experimentais com relação à concentração sérica de testosterona, independentemente do
39 tempo de avaliação. Conclui-se que, apesar de não influenciar as concentrações séricas de
40 testosterona, a administração oral de óleo de arroz, durante 63 dias, preserva a cinética e a
41 integridade do acrossoma de espermatozoides congelados de carneiros.

42
43 *Palavras chaves:* crioinjúria; criopreservação; carneiro; espermatozoide; estresse oxidativo;
44 gama-oryzanol.

45 46 ABSTRACT

47 The objective was to evaluate the effects of oral supplementation with rice bran oil on
48 ram semen freezability. Were used sixteen ram breeder, which were divided into two groups
49 according to semen quality. The control group (CG) included animals with approved seminal
50 parameters and the treatment group (TG) by individuals with lower sperm quality. The animals
51 of the GT were supplemented orally with 100 mL per day of rice oil, during 63 days, and those
52 from the CG received daily 100 mL of saline solution for the same period. Semen and blood
53 samples were obtained at which 21 days. The first samples collection was performed
54 immediately before start treatment (day zero; D0). After harvest, semen samples were evaluated
55 and freezing. After thawing, the semen was evaluated for sperm kinematics and plasma membrane
56 and acrosomal integrity, while from the serum was measured testosterone. At D0, total (TM) and
57 progressive (PM) motility, VCL, VAP and VSL were higher ($P<0.05$) in control than in the TG.
58 On the other hand, after 21 days of treatment (D21), VCL, VAP and VSL from TG were higher
59 ($P<0.05$) than the CG. Similarly, after 63 days of treatment the MP, VCL, VAP, VSL and total
60 sperm with intact acrosome were higher ($P<0.05$) in the TG than in the CG. The thawed semen
61 samples showed that CG parameters decrease throughout the study ($P<0.05$), while those of TG
62 increased ($P<0.05$). There was not difference ($P>0.05$) between experimental groups related with
63 seric concentration of testosterone, independent of the evaluation time. Thus, it is concluded that,
64 instead of do not influence the serum levels of testosterone, oral administration of rice oil during
65 63 days preserve the kinematic and acrosomal integrity of ram thawed semen.

66
67 *Keywords:* cryoinjury; cryopreservation; sheep; oxidative stress; gamma-oryzanol.

68

69 1. Introdução

70

71 Nos carneiros, a função reprodutiva é afetada por vários elementos extrínsecos, como os
72 estímulos sócio-sexuais, o fotoperíodo e a nutrição (Blache, et al., 2000). Situações
73 desfavoráveis, principalmente nutricionais, podem acarretar danos ao sistema reprodutivo
74 levando a disfunções, as quais podem variar quanto ao grau e intensidade e caracterizando-se,
75 ainda, como transitórias ou mesmo permanentes, determinando um maior ou menor
76 comprometimento da fertilidade do animal (Arruda et al., 2010).

77 A energia da dieta é o elemento mais significativo relacionado aos problemas
78 reprodutivos, sendo o excesso desta mais deletéria do que sua falta (Martin e Walkdenbrown,
79 1995; Bearden et al., 2004). Estudos na mudança da dieta, tanto aguda quanto crônica, de
80 reprodutores ovinos têm demonstrado que os ácidos graxos são capazes de ativar as vias
81 dependentes de GnRH que desencadeiam alterações na função testicular (Blache et al., 2002).

82 O óleo de arroz é constituído pelos ácidos graxos insaturados, como oleico (38,4%),
83 linoleico (34,4%) e α -linolênico (2,2%), assim como pelos ácidos graxos saturados, palmítico
84 (21,5%) e esteárico (2,9%). Somado a isto, ao contrário da maioria dos óleos vegetais refinados,
85 o óleo de farelo de arroz bruto contém uma rica fração insaponificável, conhecida como gama-
86 oryzanol, composta por esteróis (43%), álcoois de triterpeno (28%) de 4-metil-esteróis (10%) e
87 menos componentes polares (19%) (Sayre et al., 1990), o que confere a este óleo atividade
88 antioxidante (Juliano et al., 2005).

89 Os óleos vegetais são extraídos de uma ampla opção de espécies vegetais oleaginosas.
90 Estes óleos são formados por ácidos graxos insaturados que sofrem alterações devido à ação da
91 microbiota ruminal, fato este que tem limitado as pesquisas sobre a adição destes óleos vegetais
92 às rações destinadas à alimentação de ruminantes. Entretanto, esta ação pode oferecer resultados
93 positivos sobre os aspectos reprodutivos (Paula, 2012). Os óleos vegetais apresentam elevadas
94 quantidades de ácidos graxos insaturados, quando comparado aos saturados, e sua digestão
95 parece ser mais eficaz do que a digestão de lipídeos de origem animal (Costa et al., 2009).

96 Apesar de a criopreservação favorecer a utilização dos espermatozoides por período
97 indeterminado, diminuir os custos relacionados à manutenção de reprodutores e possibilitar o
98 intercâmbio de material genético entre locais distantes (Castelo et al., 2008), ela pode representar
99 um fator limitante para a reprodução de alguns animais (Ortega et al., 2003). Isso ocorre porque
100 durante a conservação do sêmen pelo frio são geradas mudanças nas características da célula
101 espermática (Esteves et al., 2000), que podem levar a danos letais ou subletais (Stornelli et al.,
102 2005).

103 Os antioxidantes são compostos capazes de inibir a formação ou o mecanismo de ação
104 das espécies reativas ao oxigênio (ROS) e estão presentes na célula espermática e no plasma
105 seminal (Aurich, 2008). A célula espermática ovina apresenta, após a criopreservação, danos nas
106 suas funções e na distribuição de seus antioxidantes enzimáticos (Marti et al., 2008). Desse
107 modo, uma maior vulnerabilidade ao estresse oxidativo é observada nas células criopreservadas,
108 quando comparadas às que se apresentam *in natura* (Peris et al., 2004; Silva e Gadella, 2006),
109 como consequência de uma baixa capacidade antioxidante total do sêmen (Sharma et al., 1999).
110 As baixas taxas de fertilidade obtidas com sêmen criopreservado da espécie ovina são atribuídas
111 ao alto grau de insaturação de sua membrana plasmática (Sanocka e Kurpisz, 2004). Assim, o
112 óleo de arroz e seu principal constituinte o gama-oryzanol através de sua atividade antioxidante
113 (Xu et al., 2001), somado aos demais constituintes deste óleo, pode conferir uma maior proteção
114 à membrana plasmática nesta espécie.

115 Diante do exposto, objetivou-se com este trabalho avaliar os efeitos da alimentação
116 suplementar de ovinos, com óleo de arroz comercial, quanto aos parâmetros cinéticos e de
117 integridade das membranas acrossomal e plasmática de espermatozoides desta espécie
118 submetidos à criopreservação, assim como quanto às concentrações séricas de testosterona.

119

120 **2. Material e Métodos**

121

122 Exceto quando especificados, todos os reagentes usados neste experimento foram obtidos
123 da Sigma-Aldrich Company (St Louis, MO, USA).

124

125 2.1. Local de Execução

126

127 Este experimento foi realizado na propriedade São Sebastião da Mata, no Município de
128 Jurema (PE-Brazil), localizada na Região Agreste (08° 43' 05'' de latitude sul e 36° 08' 09" de
129 longitude oeste), com clima médio de 27 °C . As análises de sêmen foram realizadas no
130 Laboratório de Andrologia (ANDROLAB) da Universidade Federal Rural de Pernambuco
131 (UFRPE, Recife-Brasil).

132

133

134

135

136

137 2.2. Animais, Colheita de Sêmen e Sangue

138

139 Foram utilizados 16 ovinos mestiços da raça Santa Inês, com idade média de 15 meses e
140 peso médio de 45kg. Este estudo foi realizado com a aprovação do Comitê de Ética sob o
141 número de licença 115/2014. Os animais ficavam estabulados durante à noite, onde recebiam
142 água e sal mineral *ad libitum*, e pastavam durante o dia em um pasto composto por capim
143 pangola (*Digitaria decumbens*) e pasto nativo. Os animais recebiam diariamente 100mg/animal
144 de ração (MaxOvinos), em um cocho comum, e foram submetidos à prévia avaliação clínico-
145 andrológica e separados de acordo com a qualidade seminal, a saber: os animais com qualidade
146 seminal aprovada segundo os critérios do CBRA (2013) formaram o grupo controle e os animais
147 que apresentaram-se no limite ou abaixo do padrão foram selecionados para o grupo tratamento.
148 Os animais do grupo tratamento foram suplementados, por via oral, com 100 mL por dia com
149 óleo de arroz comercial (Gama Horse, HT Nutri ®, Brasil), composto de 34% ácido linoleico,
150 1% ácido linolênico, 1% gama-oryzanol e 660mg/kg vitamina E. Os animais do Grupo Controle
151 receberam diariamente 100 mL de soro fisiológico, por via oral. O tratamento teve duração de
152 duração de 63 dias.

153 As colheitas foram realizadas por meio de vagina artificial, na presença de uma fêmea em
154 estro como manequim. As amostras de sêmen foram colhidas a cada 21 dias (D0, D21, D42,
155 D63), totalizando quatro colheitas por reprodutor. Ressalta-se que a primeira colheita (D0) foi
156 realizada antes da administração do óleo. No mesmo momento da colheita de sêmen foram
157 realizadas as colheitas de sangue por venopunção da jugular, em tubos siliconizados a vácuo sem
158 anticoagulante, para dosagem sérica de testosterona por eletroquimioluminiscência (Acces 2,
159 Beckman, Califórnia, USA), no Centro Integrado de Pesquisa (CENAPESQ), pertencente à
160 UFRPE.

161

162 2.3. Análise e Criopreservação do Sêmen

163

164 Os ejaculados foram mantidos em temperatura ambiente (27°C) durante a realização das
165 análises macroscópicas e microscópicas. Na avaliação macroscópica observou-se volume (mL),
166 aspecto e coloração das amostras.

167 Na análise microscópica as amostras de sêmen (10µL) foram avaliadas quanto aos
168 parâmetros de turbilhonamento, motilidade progressiva, vigor e concentração espermática foram
169 realizadas segundo Mies Filho (1982), em microscópio de contraste de fase (Olympus optical
170 Co., Ltda, Tóquio, Japão). Para análise de turbilhonamento, as amostras de sêmen foram

171 depositadas em lâmina previamente aquecida (37 °C) e, em seguida, procedeu-se à deposição de
172 lamínula 20x20 sobre a gota para avaliação de motilidade (%) e vigor (0-5). A concentração
173 espermática foi obtida em câmara de Neubauer na diluição de 1:400 em formol citrato.

174 Os ejaculados foram diluídos em Tris-gema-de-ovo (3,605g Tris; 2,024g ácido cítrico;
175 1,488 g frutose; 100 mL água destilada; 20% gema de ovo; pH 6,8), acrescido de 5% glicerol. A
176 seguir, as amostras foram envasadas em palhetas (0,25mL), com concentração final de
177 200×10^6 /mL, e congeladas utilizando o sistema automatizado (TK-3000, TK Tecnologia em
178 congelação LTDA, Uberaba, Brasil), na curva de refrigeração de - 0,25 °C/minuto, iniciada a
179 temperatura ambiente (27 °C). Após alcançar temperatura de 5 °C, as amostras foram submetidas
180 ao tempo de estabilização, com duração de 120 minutos. A curva de congelação foi procedida
181 imediatamente após o período de estabilização, com redução de -15 °C/minuto, até alcançar a
182 temperatura de -120 °C. Em seguida, as palhetas foram imersas e armazenadas em nitrogênio
183 líquido (-196 °C).

184

185 2.4.Descongelação e Análises Espermáticas

186

187 As amostras de sêmen criopreservadas foram descongeladas (37 °C por 30 segundos) e
188 submetidas à análise da cinética espermática e integridade das membranas plasmáticas e
189 acrossomal.

190

191 2.4.1. Cinética espermática

192

193 Alíquotas de sêmen foram diluídas (1:5; v:v) com diluidor Tris-gema, sem adição de
194 glicerol, com a finalidade de reduzir a concentração espermática para 50×10^6
195 espermatozoides/mL e facilitar a captura das imagens, sem sobreposições de espermatozoides
196 (MORTIMER, 2000). Para realização da análise, uma alíquota de sêmen (5 µL) foi depositada
197 sobre uma lâmina previamente aquecida (37 °C), coberta com lamínula e observada em
198 microscópio de contraste de fase (100x; Nikon™ H5505, Eclipse 50i, Tóquio, Japão) e as
199 imagens capturadas pela câmara de vídeo (Basler Vision Technologie™ A312FC, Ahrensburg,
200 Germany). Foram analisados cinco campos não consecutivos e selecionados aleatoriamente por
201 amostra, com registro de, no mínimo, 2000 espermatozoides. Os parâmetros analisados pelo
202 Sperm Class Analyzer - SCA™ software v. 5.1 (Microptics, S.L., Barcelona, Spain) foram:
203 motilidade total (MT), motilidade progressiva (MP), linearidade (LIN), retilinearidade (STR) e
204 índice de oscilação (WOB), expressos em valores percentuais; velocidade curvilínea (VCL),

205 velocidade linear progressiva (VSL) e velocidade média da trajetória (VAP), expressas em
206 micrometros por segundo; amplitude de deslocamento lateral da cabeça (ALH), expresso em
207 micrometros; e frequência de batimento flagelar cruzado (BCF), expresso em hertz.

208

209 2.4.2. Integridade das membranas acrossomal e plasmática

210

211 Para a avaliação da integridade das membranas acrossomal, as amostras de sêmen
212 descongeladas foram centrifugadas uma vez em 1 mL de PBS (Fosfato Salino Tamponado), a
213 3000 rpm por 10 min. Ao término, o sobrenadante foi retirado e o pellet foi ressuspenso em 100
214 μ L de PBS. Após homogeneização, as amostras foram coradas pela adição de 1 μ L de FITC-
215 conjugada ao Peanut aglutinina (FITC-PNA; 200 μ g/mL) e 3 μ L de iodeto de propídio (IP; 0,5
216 mg/mL) em PBS, imediatamente ao que foram fixadas em glutaraldeído 0,5%, e incubadas por
217 10 min a temperatura ambiente (27 °C).

218 As amostras de sêmen coradas foram analisadas utilizando citômetro de fluxo (Amnis
219 ImageStream Mark II, EMD Millipore Corp., Seattle, USA), possuidor de objetiva de 60x, com
220 taxa de imagem de 500 células/seg e utilizando o PBS Dulbecco's (livre de Ca^{+2} e Mg^{+2}) como
221 fluido de manutenção celular. O tamanho das células e a velocidade do fluxo foram de 7.0 μ m e
222 44 mm/seg, respectivamente, tendo sido a aquisição das imagens brutas foram realizadas com o
223 software INSPIRE® (Seattle, USA). As amostras foram analisadas utilizando um laser de 488
224 nm com intensidade definida para 55.0 mW, onde aproximadamente 5000 eventos foram
225 coletados por amostra e as imagens brutas foram avaliadas através do software IDEAS® (versão
226 6.0, (Seattle, USA).

227 Utilizando o gradiente raw max sharpness (RMS) para o canal de campo claro foi
228 possível selecionar os espermatozoides em foco (Figura 1A) e, combinando a relação de aspecto
229 x área, pode-se separar os eventos unicelulares (Figura 1B). A partir desta população de células
230 únicas foram criados gráficos de intensidade x frequência que permitiram a visualização de
231 histogramas da intensidade média do pixel, com base nos quais foram extraídas as regiões de
232 sub-populações para diferentes níveis de intensidade (Figuras 1C e 1D) e feita a confirmação
233 visual. Além disso, foi criado um dot plot de intensidade entre os canais 2 e 5, onde foram
234 separadas as sub-populações existentes (Figura 1E).

235 Foram consideradas células com membrana acrossomal e plasmática íntegras aquelas não
236 marcadas (PNA-/IP-) (Figura 2A), células com membrana acrossomal lesada e plasmática
237 íntegra às marcadas pelo FITC-PNA e não marcadas pelo IP (PNA+/IP-) (Figura 2B), células
238 com membrana acrossomal intacta e plasmática lesada aquelas não marcadas por FITC-PNA e

239 marcadas por IP (PNA-/IP+) (Figura 2C) e por fim as células duplas marcadas representavam
240 aquelas com membrana acrossomal e plasmática lesadas (PNA+/IP+) (Figura 2D).

241

242 2.5. Análises estatísticas

243

244 Os dados foram expressos na forma de média e erro padrão. Os parâmetros de motilidade
245 total, motilidade progressiva, linearidade, retilinearidade, oscilação, integridade das membranas
246 acrossomal e plasmática foram analisadas pelo teste de análise de variância (ANOVA), pós-
247 transformação arco-seno ($\arcsen\sqrt{/100}$), com nível de significância de $P<0,05$. Os valores de
248 VCL, VSL, VAP, ALH e BCF foram analisados também pelo ANOVA sem transformação.

249 Os níveis séricos de testosterona foram analisados pelo Teste T não pareado, com nível
250 de significância de $P<0,05$.

251

252 3. Resultados

253

254 Os resultados dos parâmetros cinéticos estão dispostos na Tabela 1 e os de integridade
255 espermática estão apresentados na Tabela 2. Ao D0, antes da administração do óleo de arroz, o
256 grupo controle apresentou maiores ($P<0,05$) valores de motilidade total, motilidade progressiva,
257 VCL, VAP e VSL do que o grupo tratamento. No D21 os parâmetros de VCL, VAP e VSL
258 foram superiores ($P<0,05$) no grupo tratamento do que no controle. No D42, o percentual total
259 de acrossomas íntegros foi maior ($P<0,05$) no grupo tratamento do que no grupo controle,
260 enquanto no D63 a motilidade progressiva, VCL, VAP, VSL e percentual total de acrossomas
261 íntegros do grupo tratamento foram superiores ($P<0,05$) aos do grupo controle.

262 Pela comparação entre os diferentes tempos de avaliação seminal, para cada grupo
263 experimental (controle ou tratamento), foi observado que no grupo controle as motilidades total e
264 progressiva foram maiores ($P<0,05$) aos D0 e D42 do que aos D21 e D63, enquanto que para o
265 grupo tratamento estes parâmetros foram maiores ($P<0,05$) aos D21, D42 e D63 do que no D0.
266 No grupo tratamento, a VCL no D0 foi inferior ($P<0,05$) aos D21, D42 e D63, enquanto que a
267 VAP foi maior ($P<0,05$) ao D63 do que aos D0, D21 e D42, sendo ainda o D21 e D42 superiores
268 ($P<0,05$) ao D0. Com relação à VSL, no grupo controle esta foi maior ($P<0,05$) aos D0, D42 e
269 D63 do que ao D21, e no grupo tratamento foi maior ($P<0,05$) ao D63 do que nos demais, bem
270 como aos D21 e D42 do que ao D0. Os valores de LIN do grupo tratamento nos dias D42 e D63
271 foram superiores ($P<0,05$) aos dos grupos D0 e D21, tendo sido o D21 maior ($P<0,05$) do que o
272 D0. No grupo tratamento, a STR foi maior ($P<0,05$) aos D21, D42 e D63 do que ao D0, a WOB

273 foi maior ($P < 0,05$) aos D42 e D63 do que aos D0 e D21, assim como a ALH e o BCF foi maior
274 ($P < 0,05$) ao D21 do que ao D0.

275 O percentual de células com acrossoma e membrana plasmática íntegros do grupo
276 controle foi maior ($P < 0,05$) ao D21 do que nos demais tempos. O percentual total de células com
277 acrossomas íntegros do grupo controle foi maior ($P < 0,05$) ao D21 do que nos demais, assim
278 como ao D0 em relação aos D42 e D63, e ao D21 em relação ao D0. Por sua vez, o total de
279 espermatozoides com acrossomas íntegros do grupo tratamento foi maior ($P < 0,05$) aos D0, D21
280 e D42 do que ao D63. No grupo controle, o percentual total de espermatozoides com membrana
281 plasmática íntegra foi maior ($P < 0,05$) aos D0, D21, D42 do que ao D63. Além disso, não houve
282 diferença significativa ($P > 0,05$) entre os grupos experimentais com relação à concentração sérica
283 de testosterona, independentemente do tempo de avaliação.

284

285 **4. Discussão**

286

287 Os resultados da cinética espermática mostraram que os parâmetros de velocidade
288 analisados neste estudo estão de acordo com os resultados encontrados por Arlas (2008). Este
289 autor observou aumento significativo na motilidade espermática de equinos suplementados por
290 80 dias com 150 mL de óleo de arroz, contendo gama-oryzanol, tendo os animais apresentados
291 motilidade espermática média de 59%. Porém, em estudo semelhante, Gonzaga (2012) constatou
292 que a suplementação oral com 300 mL de óleo de arroz semi-refinado, com elevada
293 concentração de gama-oryzanol, durante 60 dias, não afetou a qualidade espermática em
294 equinos; resultado também encontrado por Raphael (2006) para a mesma espécie.

295 É sabido que os valores de VAP, VSL e VCL se mostram muito mais elevados em
296 amostras de sêmen que resultam em mais de 50% de oócitos fecundados, quando comparadas às
297 amostras que perfazem um total de menos de 50% de oócitos fertilizados (Verstegen *et al.*,
298 2002). Neste estudo, os valores observados nesses parâmetros se mostraram superiores para o
299 grupo tratamento aos D21 e D63, o que pode evidenciar maior capacidade de fecundação destes
300 gametas.

301 A linearidade (LIN) do espermatozoide (Froman e Feltmann, 1998) e o BCF, quantidade
302 de vezes que a cabeça do espermatozoide cruza a direção do movimento (Mortimer, 2000), são
303 dois movimentos que indicam a progressão linear da célula (Froman e Feltmann, 1998). Neste
304 estudo, o grupo tratamento apresentou maiores valores de LIN espermática à medida que
305 aumentou o período de administração do óleo de arroz, indicando que as células desse grupo
306 apresentaram movimentos mais rápidos e progressivos do que as do grupo controle; este

307 parâmetro de velocidade é indicativo de melhor penetração da célula espermática no muco
308 cervical e favorece os índices de fertilidade (Mortimer, 2000; Versteegen et al., 2002).

309 Considerando-se que a STR é a relação percentual entre a VSL e a VAP (Mortimer 2000;
310 Versteegen et al, 2002), é provável que as células do grupo tratamento possuam maior
311 capacidade em atingir o oócito, devido à melhor qualidade de seu movimento. Ainda, o grupo
312 tratamento apresentou motilidade total (MT) superior em comparação ao grupo controle,
313 evidenciando que, além de qualidade de movimento, estes gametas possuem também maior
314 número de células viáveis (Silva et al., 2011).

315 Por outro lado, os resultados da WOB, que avalia a relação VCL/VAP (Mortimer, 2000),
316 foram maiores para os espermatozoides do grupo tratamento. Altos valores de WOB são
317 relacionados com a manifestação de movimento curvilíneo dos espermatozoides, em detrimento
318 ao movimento progressivo, o qual é correlacionado com a qualidade e fertilidade do sêmen
319 congelado (Silva et al., 2011). Em contrapartida, é válido salientar que inúmeros parâmetros
320 cinéticos também se mostraram elevados neste estudo, de modo que a observação da WOB em
321 isolado pode não necessariamente caracterizar o comprometimento da qualidade do sêmen
322 criopreservado.

323 Os maiores valores de VCL e ALH indicam maior flexão da peça intermediária e grande
324 amplitude de deslocamento lateral da cabeça (Perumal et al., 2014). No grupo tratamento a maior
325 ALH observada aos 21 dias (D21), em relação ao D0, pode ser um indicativo de hiperativação do
326 gameta masculino, que, por sua vez, pode resultar do alto nível de energia nas células, necessária
327 para que haja a penetração do espermatozoide no oócito, garantindo o processo da fertilização
328 (Barratt et al., 1993). Assim, a mobilidade espermática e os parâmetros de velocidade são
329 prováveis indicadores da função mitocondrial e qualidade de energia (Farrel et al., 1996).

330 A criopreservação acarreta o aumento do número de células danificadas e apoptóticas
331 (Ortega, 2003), com conseqüente comprometimento da função da célula espermática (Purdy,
332 2006). É relatado na literatura que as crioinjúrias atingem principalmente o acrossoma e a
333 membrana plasmática por serem ricos em ácidos graxos poli-insaturados (Ladha, 1998),
334 principais substratos das ROS, cuja produção é intensificada pelo processamento laboratorial do
335 sêmen (Watson, 2000). Apesar disso, no presente estudo, a integridade do acrossoma foi maior
336 no grupo tratamento em relação ao grupo controle aos 42 e 63 dias de administração do óleo de
337 arroz, indicando possível proteção destas estruturas pela suplementação.

338 A resposta positiva ao tratamento suplementar contendo gama-oryzanol, encontrada neste
339 experimento, está de acordo com os relatos de Ismail et al. (2010), que demonstraram que o
340 gama-oryzanol evita a formação de peróxidos e possui atividade antioxidante. Neste contexto, a

341 proteção ao acrossoma dos espermatozoides ovinos, observada após administração oral de óleo
342 de arroz, pode ter sido conferida pela ação antioxidante e capacidade de estabilização de
343 membranas asseguradas pelo gama-oryzanol, componente antioxidante presente no óleo.

344 Em adição, Xu e Godber (2001) demonstraram que o gama-oryzanol, apesar de
345 compartilhar o mesmo mecanismo antioxidante da vitamina E, possui maior atividade
346 antioxidante do que esta. Apesar do anteriormente exposto, Arlas (2008) não observou
347 diferenças entre os grupos tratamento e controle para integridade de membrana plasmática em
348 espermatozoides de equino suplementados com 200 mL de óleo de arroz durante 80 dias, o que
349 também foi encontrado no presente estudo.

350 No presente estudo não foi observado aumento das concentrações séricas de testosterona,
351 resultado que corrobora com os de Gonzaga (2012) ao trabalharem com a suplementação oral de
352 equinos com 300 mL de óleo de arroz, contendo 1,1% de gama-oryzanol, durante 60 dias. Da
353 mesma forma, não foi observado nenhum efeito estimulador hormonal, após administração oral
354 durante nove semanas de 500 mg/dia de gama-oryzanol em humanos, nos quais não houve
355 alteração dos níveis circulantes de hormônios (testosterona, cortisol, estradiol, hormônio do
356 crescimento, insulina e beta-endorfina) e dos minerais, cálcio e magnésio, da albumina e dos
357 lipídios sanguíneos (Fry et al., 1997).

358 Em oposição, Andrade (2010), usando volumes entre 3 e 13 mg de gama-oryzanol para
359 cada 100g de peso vivo na suplementação oral de ratos Wistar durante 42 dias, demonstrou
360 alterações expressivas nas concentrações de testosterona sérica, em uma resposta dose-efeito.
361 Tais divergências nos resultados obtidos após suplementação com óleo de arroz com gama-
362 oryzanol podem ser justificadas pelos diferentes volumes administrados dos mesmos, assim
363 como pelos diferentes períodos de tratamento realizados.

364

365 **Conclusão**

366

367 Conclui-se que, apesar de não influenciar os níveis séricos de testosterona, a
368 administração oral de óleo de arroz, durante 63 dias, preserva a cinética e a integridade do
369 acrossoma de espermatozoides congelados de carneiros.

370

371 **Conflito de interesses**

372

373 Os autores declaram não haver conflito de interesse na publicação destes resultados.

374

375 **Agradecimentos**

376
377 Os autores são gratos à Fundação de Apoio e Tecnologia do Estado de Pernambuco
378 (FACEPE) pela concessão de bolsa de estudo, assim como à Coordenação de Aperfeiçoamento
379 de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e
380 Tecnológico (CNPq), pelo suporte financeiro.

381

382 **Referências**

383 ANDRADE, N. L., 2010. Óleo de Arroz rico em gama oryzanol e alterações morfofisiológicas
384 em ratos treinados. Monografia, Univ. Est. Maringá.

385 ARLAS, T. R., 2008. Efeito da suplementação alimentar de garanhões com óleo de arroz
386 contendo gamma-oryzanol na qualidade espermática. Dissertação, Univ. Fed. Rio Grande do Sul.

387 ARRUDA, R. P. D. et al., 2010. Nutraceuticals in reproduction of bulls and stallions. R. Bras. de
388 Zootec. 39, 393-400.

389 AURICH, C., 2008. Recent advances in cooled-semen technology. Anim. Reprod. Sci. 107, 268-
390 275.

391 BARRATT, C. L. R., 1993. TOMLINSON, M. J.; COOKE, I. D. Prognostic significance of
392 computerized motility analysis for in vivo fertility. Fertil Steril. 60, 520-525.

393 BLACHE, D. et al., 2000. Metabolic factors affecting the reproductive axis in male sheep. J.
394 Reprod. Fertil. 120, 1-11.

395 CASTELO, T. S.; FROTA, T. R.; SILVA, A. R., 2008. Considerações sobre a criopreservação
396 do sêmen de caprinos. Acta Vet. Brasilica. 2, 3, 67-75.

397 COSTA, RG. et al., 2009. Influência do alimento na produção e qualidade do leite de cabra. R.
398 Bras. Zootec. 38, 307-321.

399 ESTEVES, S.C. et al., 2000. Improvement in motion characteristics and acrosome status in
400 cryopreserved human spermatozoa by swim-up processing before freezing. Hum. Reprod. 2173-
401 2179.

- 402 FARREL, P. B. et al., 1996. Media and dilution procedures tested to minimize handling effects
403 on human, rabbit, and bull sperm for computer assisted sperm analysis (CASA). *J. Androl.* 17,
404 293-300.
- 405 FROMAN, D. P.; FELTMANN, A. J., 1998. Sperm mobility: a quantitative trait of the domestic
406 fowl (*Gallus domesticus*). *Biol. Reprod.* 58, 379-384.
- 407 FRY, A. C. et al., 1997. The effects of gamma-oryzanol supplementation during resistance
408 exercise training. *Int J Sport Nutr.* 7, 318-329.
- 409 GONZAGA, I. V., 2012. Supplementation with rice bran oil semirefined with high level of
410 gamma-oryzanol in stallion's. *Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.* 49, 3, 215-220,
- 411 ISMAIL, M. et al., 2010. Gamma-oryzanol rich fraction regulates the expression of antioxidant
412 and oxidative stress related genes in stressed rat's liver. *Nutr Metab (Lond)*, 1743-7075.
- 413 JULIANO, C. et al., 2005. Antioxidant activity of gamma-oryzanol: Mechanism of action and its
414 effect on oxidative stability of pharmaceutical oils. *Int. J. Pharm.* 299, 146-154.
- 415 LADHA, S., 1998. Lipid heterogeneity and membrane fluidity in a highly polarized cell, the
416 mammalian spermatozoon. *J. Membr. Biol.* v. 165, n. 1, p. 1-10.
- 417 MARTI, E. et al., 2008. Effect of the cryopreservation process on the activity and
418 immunolocalization of antioxidant enzymes in ram spermatozoa. *J Androl.* 29, 4, 459-467.
- 419 MARTIN, G.; WALKDEN-BROWN, S., 1995. Nutritional influences on reproduction in mature
420 male sheep and goats. *J. Reprod.Fertil. Supp.* 49, 437-449.
- 421 MORTIMER, S. T., 2000. CASA—Practical Aspects. *J. Androl.* 21, 515–524.
- 422 ORTEGA, A. M. et al., 2003. Peroxidación lipídica y antioxidantes en la preservación de semen.
423 Una revisión. *Interciencia.* 18, 699-704.
- 424 PAULA, E. F. E. D. et al., 2013. Óleos vegetais na nutrição de ruminantes. *Rev. Eletrôn.*
425 *Nutritime.* 9, 6, 2075-2103.
- 426 PERIS, S. et al., 2004. Cryopreservation of ram semen facilitates sperm DNA
427 damage:relationship between sperm andrological parameters and the sperm chromatin structure
428 assay. *J. Androl.* 25, 2, 224-233.

- 429 PERUMAL, P. et al., 2014. Computer-Assisted Sperm Analysis of Freezable and non Freezable
430 Minthun (*Bos frontalis*) Semen. *Journal of Animals*, 1-6.
- 431 PURDY, P. H., 2006. A review on goat sperm cryopreservation. *Small Ruminat Res.* 63, 215-
432 225.
- 433 RAPHAEL, C. F.; A.A.O.GOBESSO; ANDRADE, A. F. C., 2006. Effects of dietary
434 supplementation with gamma-oryzanol on seminal characteristics of stallions. *Anim. Reprod.*
435 *Sci.* 3, 253.
- 436 SANOCKA, D.; KURPISZ, M., 2004. Reactive oxygen species and sperm cells. *RB&E.* 2, 12-
437 18.
- 438 SAYRE, B.; SAUNDERS, R., 1990. Rice bran and rice bran oil. *Lipid Technol.* 15, 6-72, 1990.
- 439 SHARMA, R. K. et al., 1999. The reactive oxygen species– total antioxidant capacity score is a
440 new measure of oxidative stress to predict male infertility. *Hum. Reprod.* 14, 2801-2807.
- 441 SILVA, S. et al., 2011. In vitro and in vivo evaluation of ram sperm frozen in Tris-egg-yolk and
442 supplemented with superoxidise dismutase and reduced glutathione. *Reprod Domest Anim.* 46,
443 874-881.
- 444 SILVA, P.; GADELLA, B., 2006. Detection of damage in mammalian sperm cells.
445 *Theriogenology.* 65, 958-978, 2006.
- 446 STORNELLI, M. et al., 2005. Efecto de los procesos de criopreservación sobre la fertilidad
447 seminal. *Analecta Vet.* 25, 2, 28-35.
- 448 VERSTEGEN, J.; IGUER-OUADA, M.; ONCLIN, K., 2002. Computer assisted semen
449 analyzers in andrology research and veterinary practice. *Theriogenology.* 57, 149-179.
- 450 WATSON, P. F., 2000. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Anim.*
451 *Reprod. Sci.* 60-61, 481-492.
- 452 Xu, Z., Hua, N., Godber, J.S., 2001. Antioxidant activity of tocopherols, tocotrienols, and
453 gamma-oryzanol components from rice bran against cholesterol oxidation accelerated by 2,2-
454 azobis(2- methylpropionamide) dihydrochloride. *J. Agric. Food Chem.* 49, 2077–2081
- 455 XU, Z.; GODBER, S., 2001. Antioxidant Activities of Major Components of γ -Oryzanol from
456 Rice Bran Using a Linoleic Acid Model. *JAOCS.* 78.

Tabela 1

Médias e desvios padrão (média \pm DP) dos parâmetros de cinética espermática do sêmen criopreservado de carneiros antes (D0) e após tratamento diário (D21, D42 e D63) com 100mL de óleo de arroz

Parâmetros avaliados	D 0		D 21		D 42		D 63	
	Controle	Tratamento	Controle	Tratamento	Controle	Tratamento	Controle	Tratamento
MT	48,83 \pm 16,22 ^{aA}	9,96 \pm 6,16 ^{bB}	25,73 \pm 9,81 ^B	32,92 \pm 13,94 ^A	46,55 \pm 12,86 ^A	33,01 \pm 13,33 ^A	29,59 \pm 9,75 ^B	32,02 \pm 10,12 ^A
MP	24,00 \pm 9,56 ^{aA}	2,86 \pm 2,92 ^{bB}	9,26 \pm 3,71 ^B	15,16 \pm 8,46 ^A	26,33 \pm 9,73 ^A	19,04 \pm 10,01 ^A	12,39 \pm 3,74 ^{bB}	21,82 \pm 9,93 ^{aA}
VCL	60,87 \pm 6,86 ^a	46,63 \pm 8,39 ^{bB}	55,51 \pm 5,20 ^b	65,61 \pm 7,75 ^{aA}	60,32 \pm 3,76	61,98 \pm 5,96 ^A	60,34 \pm 5,81 ^b	72,22 \pm 12,56 ^{aA}
VAP	49,62 \pm 7,43 ^a	32,15 \pm 9,75 ^{bC}	39,78 \pm 4,19 ^b	48,89 \pm 6,24 ^{aB}	49,35 \pm 6,03	51,95 \pm 7,05 ^B	26,63 \pm 150,36 ^b	63,01 \pm 14,34 ^{aA}
VSL	42,68 \pm 7,40 ^{aA}	25,19 \pm 11,55 ^{bC}	33,21 \pm 3,75 ^{bB}	41,07 \pm 5,64 ^{aB}	43,67 \pm 6,88 ^A	46,60 \pm 7,10 ^B	41,10 \pm 8,08 ^{bA}	57,61 \pm 14,55 ^{aA}
LIN	69,70 \pm 4,50	51,68 \pm 16,31 ^C	63,74 \pm 4,64	62,56 \pm 3,71 ^B	72,08 \pm 7,98	74,99 \pm 7,43 ^A	68,01 \pm 10,37	78,81 \pm 7,39 ^A
STR	85,76 \pm 2,57	74,78 \pm 13,94 ^B	84,05 \pm 2,43	83,96 \pm 2,51 ^A	88,26 \pm 3,89	89,48 \pm 2,46 ^A	87,65 \pm 4,33	90,95 \pm 3,05 ^A
WOB	81,22 \pm 3,22	67,76 \pm 10,10 ^B	75,77 \pm 3,64	74,48 \pm 2,91 ^B	81,47 \pm 5,95	83,65 \pm 6,28 ^A	77,28 \pm 8,65	86,52 \pm 5,65 ^A
ALH	1,94 \pm 0,12	1,59 \pm 0,73 ^B	2,06 \pm 0,23	2,19 \pm 0,19 ^A	1,88 \pm 0,18	1,86 \pm 0,22 ^{AB}	2,12 \pm 0,44	1,78 \pm 0,18 ^{AB}
BCF	9,82 \pm 1,29	7,57 \pm 3,82 ^B	10,75 \pm 1,03	11,55 \pm 1,40 ^A	10,36 \pm 1,22	9,75 \pm 1,78 ^{AB}	11,53 \pm 2,09	10,14 \pm 1,14 ^{AB}

Letras minúsculas diferentes na mesma linha indicam diferença significativa ($P < 0,05$) entre os grupos experimentais (controle x tratamento) para cada tempo de avaliação. Letras maiúsculas diferentes na mesma linha indicam diferença significativa entre os tempos de avaliação para cada grupo experimental separadamente. D0: dia de início do tratamento; D21: 21 dias de tratamento; D42: 42 dias de tratamento; D63: 63 dias de tratamento. MT: motilidade total; MP: motilidade progressiva; VCL: velocidade curvilínea; VAP: velocidade média da trajetória; VSL: velocidade linear progressiva; LIN: linearidade; STR: retilinearidade; WOB: oscilação; ALH: amplitude de deslocamento lateral de cabeça; BCF: frequência de batimento flagelar cruzado.

Tabela 2

Médias e desvios padrão (média \pm DP) dos parâmetros de integridade de membrana acrossomal e plasmática de espermatozoides ovinos criopreservados antes (D 0) e após tratamento diário (D 21, D 42 e D 63) com 100mL de óleo de arroz, bem como dos níveis de testosterona sérica destes animais

Parâmetros avaliados	D 0		D 21		D 42		D 63	
	Controle	Tratamento	Controle	Tratamento	Controle	Tratamento	Controle	Tratamento
PNA-/IP-	18,58 \pm 7,16 ^A	13,57 \pm 7,95	19,04 \pm 5,63 ^A	15,49 \pm 9,12	15,86 \pm 8,44 ^A	8,00 \pm 4,83	6,90 \pm 4,02 ^B	6,95 \pm 2,26
Total PNA-	72,80 \pm 4,24 ^B	72,64 \pm 9,58 ^A	83,80 \pm 4,42 ^A	66,54 \pm 28,27 ^A	54,83 \pm 14,00 ^{bC}	73,59 \pm 9,30 ^{aA}	6,90 \pm 4,02 ^{bD}	36,31 \pm 15,84 ^{aB}
Total IP-	18,59 \pm 7,16 ^A	13,57 \pm 7,95	19,05 \pm 5,61 ^A	15,51 \pm 9,14	15,87 \pm 8,44 ^A	8,00 \pm 4,83	6,90 \pm 4,02 ^B	7,02 \pm 2,32
Test (ng/mL)	6,83 \pm 5,17	5,31 \pm 3,93	4,48 \pm 3,55	8,45 \pm 4,45	5,65 \pm 5,07	8,40 \pm 5,83	4,00 \pm 3,48	2,34 \pm 2,62

Letras minúsculas diferentes na mesma linha indicam diferença significativa ($P < 0,05$) entre os grupos experimentais (controle x tratamento) para cada tempo de avaliação. Letras maiúsculas diferentes na mesma linha indicam diferença significativa entre os tempos de avaliação para cada grupo experimental separadamente. D0: dia de início do tratamento; D21: 21 dias de tratamento; D42: 42 dias de tratamento; D63: 63 dias de tratamento. PNA-/IP-: acrossoma e membrana plasmática íntegros; Total PNA-: acrossoma íntegro; Total IP-: membrana plasmática íntegra; Test: testosterona plasmática.

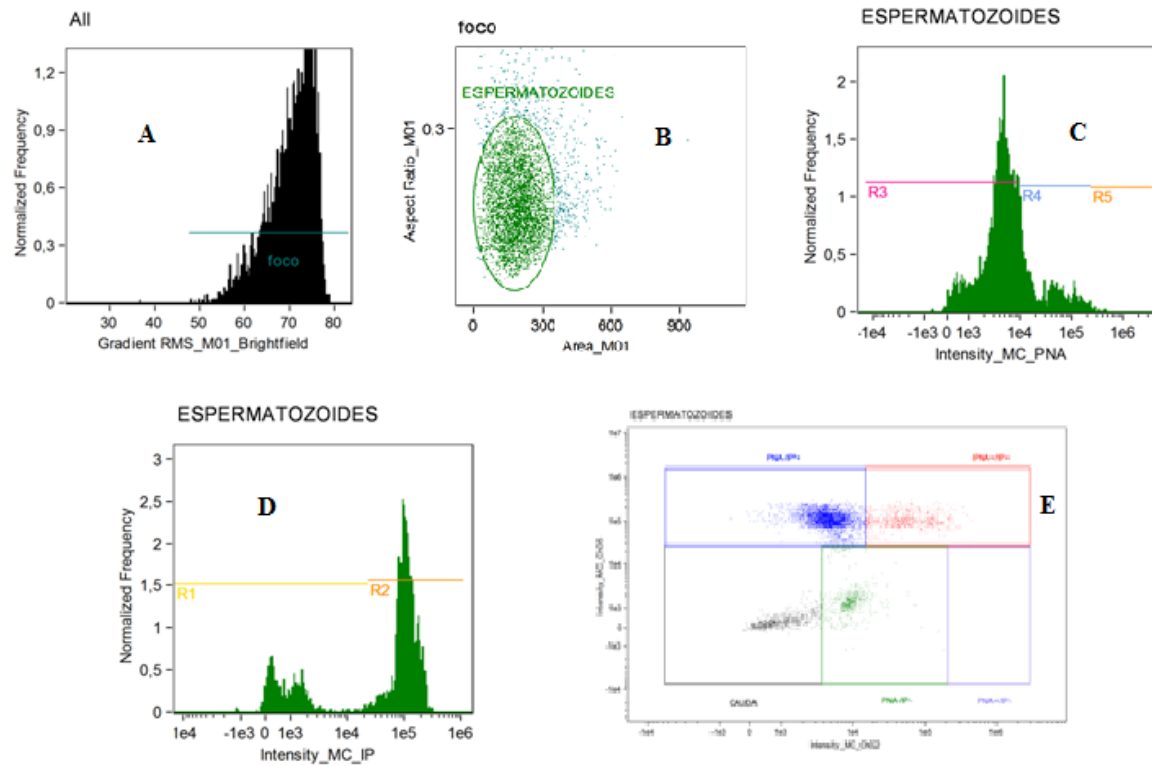


Figura 1 Avaliação de integridade das membranas acrossomal e plasmática de espermatozoides congelados de ovinos, por citometria de fluxo. (A) Espermatozóides em foco selecionados através do gradiente RMS; (B) Separação dos eventos unicelulares; (C) Subpopulações com diferentes níveis de intensidade; (D) Subpopulações com diferentes níveis de intensidade; (E) Separação das Subpopulações.

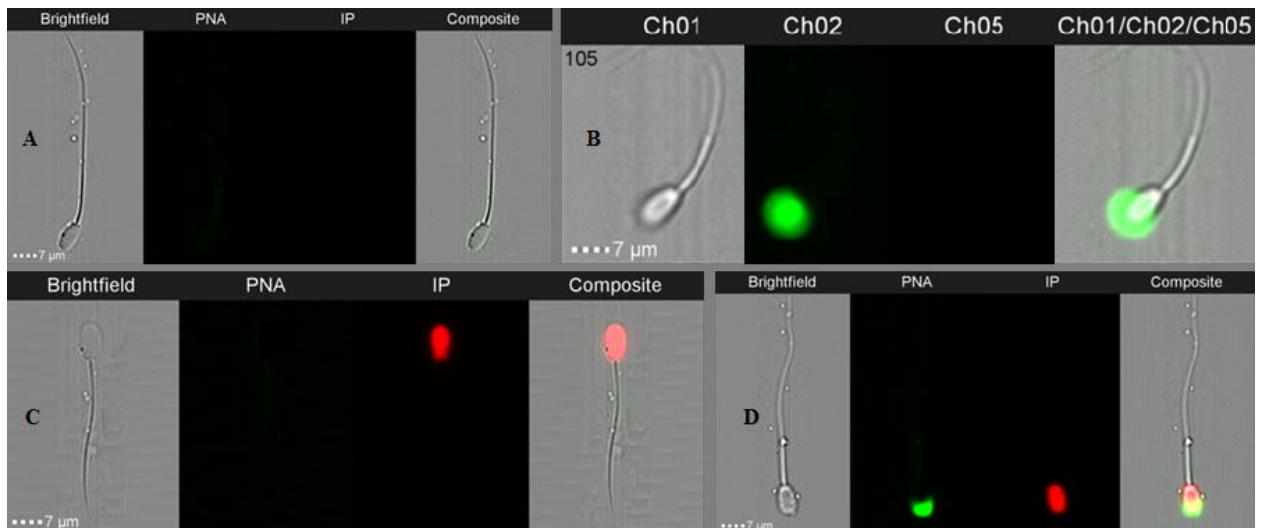


Figura 2 Avaliação de membrana acrossomal e plasmática de espermatozoides congelados de ovinos, por citometria de fluxo. (A) Células com Membrana Acrossomal Íntegra e Membrana Plasmática Íntegra; (B) Células com Membrana Acrossomal Lesada e Membrana Plasmática Íntegra; (C) Células com Membrana Acrossomal Íntegra e Membrana Plasmática Lesada; (D) Células com Membrana Acrossomal e Membrana Plasmática Lesadas.

ANEXO

Normas do periódico Animal Reproduction Science

DESCRIPTION

Animal Reproduction Science publishes original research and timely reviews on topics relating to **reproduction** and **fertility** in **animals**. This includes both fundamental research and applied studies, including management practices that increase our understanding of the **biology** and **manipulation** of reproduction. The focus is on animals that are useful to humans including food- and fibre-producing; companion/recreational; captive; and endangered species including zoo animals, but excluding laboratory animals unless the study reveals new information that impacts our basic understanding of the biology or manipulation of reproduction applicable to the animals listed above.

The journal's scope includes the study of reproductive physiology and endocrinology, reproductive cycles, natural and artificial control of reproduction, preservation and use of gametes and embryos, pregnancy and parturition, infertility and sterility, diagnostic and therapeutic techniques.

Animal Reproduction Science has decided not to publish papers that exclusively examine the *in vitro* development of oocytes and embryos; however, it will consider papers that include *in vitro* studies where the source of the oocytes and/or development of the embryos beyond the blastocyst stage is part of the experimental design.

Authors with any concerns are encouraged to contact the journal to enquire about the suitability of the content of their paper for submission. *Animal Reproduction Science* has no page charges and only publishes papers after rigorous peer review.

AUDIENCE

Research Workers in Animal and Human Reproduction, Animal Health Workers.

IMPACT FACTOR

2013: 1.581 © Thomson Reuters Journal Citation Reports 2014

AUTHOR INFORMATION PACK 19 Feb 2015 www.elsevier.com/locate/anireprosci 2

ABSTRACTING AND INDEXING.

Animal Breeding Abstracts

Bibliography of Reproduction

Elsevier BIOBASE

Current Contents/Agriculture, Biology & Environmental Sciences

MEDLINE®

PubMed

Biological Abstracts

Current Awareness in Biological Sciences

Scopus

EDITORIAL BOARD

Co-Editors-in-Chief

A.C.O. Evans, University College Dublin, Belfield, Dublin, Ireland

P.J. Hansen, University of Florida, Gainesville, FL, USA

G.N. Hinch, University of New England, Armidale, NSW, Australia

J.E. Kinder, Ohio State University, Wooster, OH, USA

Reviews Editor

K.L. Macmillan, University of Melbourne, Veterinary Clinical Centre, Werribee, VIC, Australia

Editorial Advisory Board

B.M. Alexander, Laramie, WY USA

L.L. Anderson, Ames, IA USA

C. Aurich, Vienna, Austria

F.W. Bazer, College Station, TX USA

P.J. Broadbent, Aberdeen, Scotland, UK

H. Cardenas, Columbus, OH USA

J.F. Cavalieri, Townsville, QLD, Australia

D. Cavestany, Montevideo, Uruguay

P. Comizzoli, Washington, DC USA

R.A. Cushman, Clay Center, NE USA

R.A. Dailey, Morgantown, WV USA

S.P. de Graaf, Sydney, NSW, Australia

J.A. Delgadillo, Torreón, Coahuila, Mexico

M.G. Diskin, Athenry, County Galway, Ireland

M-A. Driancourt, Beaucauzé, France

A.D. Ealy, Gainesville, FL USA

W.L. Flowers, Raleigh, NC USA

J. Ford, Maryville, MO, USA

D.L. Garner, Reno, NV USA

C.L. Gasser, Cedar City, UT USA

W.V Holt, London, UK
K. Imakawa, Tokyo, Japan
A.L. Johnson, University Park, PA USA
R.J. Mapletoft, Saskatoon, SK, Canada
J.F. Mee, Fermoy, County Cork, Ireland
J.C.F. Moraes, Bage, Brazil
T. Nagai, Taipei, Taiwan, China
N. Parvizi, Neustadt, Germany
J.R. Pursley, East Lansing, MI USA
J.P. Ravindra, Bangalore, India
R.R. Santos, Utrecht, Netherlands
D.C. Sharp, Gainesville, FL USA
Y-L. Shiue, Kaohsiung, Taiwan
J.F. Smith, Auckland, New Zealand
D.L. Thompson, Baton Rouge, LA USA
A. Turner, Burwood, VIC Australia
S. Uzbekova, Nouzilly, France

GUIDE FOR AUTHORS

INTRODUCTION

Types of Paper

1. Original Research Papers (Regular Papers)
2. Review Articles

Original Research Papers should report the results of research that comprises one or a series of experiments. The paper should contribute to increasing our understanding of the biology and/or manipulation of reproduction in animals. The material should not have been previously published elsewhere, except in a preliminary form.

Review Articles should cover subjects falling within the scope of the journal which are of active current interest. They may be submitted or invited. Invited reviews will normally be solicited by the Review's

Editor, but suggestions for appropriate review topics may be sent to:

K.L. Macmillan

University of Melbourne

Veterinary Clinical Centre

250 Princess Highway
VIC 3030 Werribee, Australia
k.macmillan@unimelb.edu.au

Contact details for submission

Authors should send queries concerning the submission process or journal procedures to AuthorSupport@elsevier.com. Authors can check the status of their manuscript within the review procedure using Elsevier Editorial System.

BEFORE YOU BEGIN

Ethics in publishing

For information on Ethics in publishing and Ethical guidelines for journal publication see <http://www.elsevier.com/publishingethics> and <http://www.elsevier.com/journal-authors/ethics>.

Human and animal rights

If the work involves the use of animal or human subjects, the author should ensure that the work described has been carried out in accordance with The Code of Ethics of the World Medical Association (Declaration of Helsinki) for experiments involving humans <http://www.wma.net/en/30publications/10policies/b3/index.html>; EU Directive 2010/63/EU for animal experiments http://ec.europa.eu/environment/chemicals/lab_animals/legislation_en.htm; Uniform Requirements for manuscripts submitted to Biomedical journals <http://www.icmje.org>. Authors should include a statement in the manuscript that informed consent was obtained for experimentation with human subjects. The privacy rights of human subjects must always be observed.

Unnecessary cruelty in animal experimentation is not acceptable to the Editors of *Animal Reproduction Science*.

Conflict of interest

All authors must disclose any financial and personal relationships with other people or organizations that could inappropriately influence (bias) their work. Examples of potential conflicts of interest include employment, consultancies, stock ownership, honoraria, paid expert testimony, patente applications/registrations, and grants or other funding. If there are no conflicts of interest then please state this: 'Conflicts of interest: none'. See also <http://www.elsevier.com/conflictsofinterest>.

Further information and an example of a Conflict of Interest form can be found at: http://help.elsevier.com/app/answers/detail/a_id/286/p/7923.

Submission declaration and verification

Submission of an article implies that the work described has not been published previously (except in the form of an abstract or as part of a published lecture or academic thesis or as an electronic preprint, see <http://www.elsevier.com/sharingolicy>), that it is not under consideration for publication elsewhere, that its publication is approved by all authors and tacitly or explicitly by the responsible authorities where the work was carried out, and that, if accepted, it will not be published elsewhere in the same form, in English or in any other language, including electronically without the written consent of the copyright-holder. To verify originality, your article may be checked by the originality detection service CrossCheck <http://www.elsevier.com/editors/plagdetect>.

Authorship

All authors should have made substantial contributions to all of the following: (1) the conception and design of the study, or acquisition of data, or analysis and interpretation of data, (2) drafting the article or revising it critically for important intellectual content, (3) final approval of the version to be submitted.

Changes to authorship

This policy concerns the addition, deletion, or rearrangement of author names in the authorship of accepted manuscripts: *Before the accepted manuscript is published in an online issue:* Requests to add or remove an author, or to rearrange the author names, must be sent to the Journal Manager from the corresponding author of the accepted manuscript and must include: (a) the reason the name should be added or removed, or the author names rearranged and (b) written confirmation (e-mail, fax, letter) from all authors that they agree with the addition, removal or rearrangement. In the case of addition or removal of authors, this includes confirmation from the author being added or removed. Requests that are not sent by the corresponding author will be forwarded by the Journal Manager to the corresponding author, who must follow the procedure as described above. Note that: (1) Journal Managers will inform the Journal Editors of any such requests and (2) publication of the accepted manuscript in an online issue is suspended until authorship has been agreed.

After the accepted manuscript is published in an online issue: Any requests to add, delete, or rearrange author names in an article published in an online issue will follow the same policies as noted above and result in a corrigendum.

Copyright

Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete a 'Journal Publishing Agreement' (for more information on this and copyright, see <http://www.elsevier.com/copyright>). An e-mail will be sent to the corresponding author

confirming receipt of the manuscript together with a 'Journal Publishing Agreement' form or a link to the online version of this agreement.

Subscribers may reproduce tables of contents or prepare lists of articles including abstracts for internal circulation within their institutions. Permission of the Publisher is required for resale or distribution outside the institution and for all other derivative works, including compilations and translations (please consult <http://www.elsevier.com/permissions>). If excerpts from other copyrighted works are included, the author(s) must obtain written permission from the copyright owners and credit the source(s) in the article. Elsevier has preprinted forms for use by authors in these cases: please consult <http://www.elsevier.com/permissions>.

For open access articles: Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete an 'Exclusive License Agreement' (for more information see <http://www.elsevier.com/OAauthoragreement>). Permitted third party reuse of open access articles is determined by the author's choice of user license (see <http://www.elsevier.com/openaccesslicenses>).

Author rights

As an author you (or your employer or institution) have certain rights to reuse your work. For more information see <http://www.elsevier.com/copyright>.

Role of the funding source

You are requested to identify who provided financial support for the conduct of the research and/or preparation of the article and to briefly describe the role of the sponsor(s), if any, in study design; in the collection, analysis and interpretation of data; in the writing of the report; and in the decision to submit the article for publication. If the funding source(s) had no such involvement then this should be stated.

Funding body agreements and policies

Elsevier has established a number of agreements with funding bodies which allow authors to comply with their funder's open access policies. Some authors may also be reimbursed for associated publication fees. To learn more about existing agreements please visit <http://www.elsevier.com/fundingbodies>.

After acceptance, open access papers will be published under a noncommercial license. For authors requiring a commercial CC BY license, you can apply after your manuscript is accepted for publication.

Open access

This journal offers authors a choice in publishing their research:

Open access

- Articles are freely available to both subscribers and the wider public with permitted reuse
- An open access publication fee is payable by authors or on their behalf e.g. by their research funder or institution.

Subscription

- Articles are made available to subscribers as well as developing countries and patient groups through our universal access programs (<http://www.elsevier.com/access>).
- No open access publication fee payable by authors. Regardless of how you choose to publish your article, the journal will apply the same peer review criteria and acceptance standards. For open access articles, permitted third party (re)use is defined by the following Creative Commons user licenses: *Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs (CC BY-NC-ND)*. For non-commercial purposes, lets others distribute and copy the article, and to include in a collective work (such as an anthology), as long as they credit the author(s) and provided they do not alter or modify the article.

The open access publication fee for this journal is **USD 2500**, excluding taxes. Learn more about Elsevier's pricing policy: <http://www.elsevier.com/openaccesspricing>.

Language (usage and editing services)

Please write your text in good English (American or British usage is accepted, but not a mixture of these). Authors who feel their English language manuscript may require editing to eliminate possible grammatical or spelling errors and to conform to correct scientific English may wish to use the English Language Editing service available from Elsevier's WebShop (<http://webshop.elsevier.com/languageediting/>) or visit our customer support site (<http://support.elsevier.com>) for more information.

Submission

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

Submit your article

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

Referees

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

PREPARATION

Article structure

Manuscripts should have numbered lines with wide margins and double spacing throughout, i.e. also for abstracts, footnotes and references. Every page of the manuscript, including the title page, references, tables, etc., should be numbered. However, in the text no reference should be made to page numbers; if necessary, one may refer to sections. Avoid excessive usage of italics to emphasize part of the text.

Introduction

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

The introduction "sets the scene" for your work. Do not over-reference statements; two or three key references should suffice unless each adds something specific. The introduction should not normally be more than 500 words (approximately two manuscript pages).

Material and methods

Provide sufficient detail to allow the work to be reproduced. Methods already published should be indicated by a reference: only relevant modifications should be described.

Results

Results should be clear and concise.

Discussion

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

Conclusions

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

Essential title page information

- **Title.** Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible.
- **Author names and affiliations.** Where the family name may be ambiguous (e.g., a double name), please indicate this clearly. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lower-case superscript letter immediately after the author's name and in front of the appropriate address. Provide the full postal address of each affiliation, including the country name and, if available, the e-mail address of each author.

- ***Corresponding author.*** Clearly indicate who will handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. **Ensure that the e-mail address is given and that contact details are kept up to date by the corresponding author.**

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

Abstract

A concise and factual abstract is required of not more than 250 words. The abstract should state briefly the purpose of the research, the principal results and major conclusions. An abstract is often presented separately from the article, so it must be able to stand alone. For this reason, References should be avoided, but if essential, then cite the author(s) and year(s). Also, non-standard or uncommon abbreviations should be avoided, but if essential they must be defined at their first mention in the abstract itself.

Graphical abstract

Although a graphical abstract is optional, its use is encouraged as it draws more attention to the online article. The graphical abstract should summarize the contents of the article in a concise, pictorial form designed to capture the attention of a wide readership. Graphical abstracts should be submitted as a separate file in the online submission system. Image size: Please provide an image with a minimum of 531×1328 pixels (h \times w) or proportionally more. The image should be readable at a size of 5×13 cm using a regular screen resolution of 96 dpi. Preferred file types: TIFF, EPS, PDF or MS Office files. See <http://www.elsevier.com/graphicalabstracts> for examples. Authors can make use of Elsevier's Illustration and Enhancement service to ensure the best presentation of their images and in accordance with all technical requirements: Illustration Service.

Highlights

Highlights are mandatory for this journal. They consist of a short collection of bullet points that convey the core findings of the article and should be submitted in a separate editable file in the online submission system. Please use 'Highlights' in the file name and include 3 to 5 bullet points (maximum 85 characters, including spaces, per bullet point). See <http://www.elsevier.com/highlights> for examples.

Keywords

Immediately after the abstract, provide a maximum of 6 keywords, using American spelling and

avoiding general and plural terms and multiple concepts (avoid, for example, 'and', 'of'). Be sparing with abbreviations: only abbreviations firmly established in the field may be eligible. These keywords will be used for indexing purposes.

Acknowledgements

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

Authors and editors are, by general agreement, obliged to accept the rules governing biological nomenclature, as laid down in the *International Code of Botanical Nomenclature*, the *International Code of Nomenclature of Bacteria*, and the *International Code of Zoological Nomenclature*.

All biotica (crops, plants, insects, birds, mammals, etc.) should be identified by their scientific names when the English term is first used, with the exception of common domestic animals. All biocides and other organic compounds must be identified by their Geneva names when first used in the text. Active ingredients of all formulations should be likewise identified.

Nomenclature and units

Follow internationally accepted rules and conventions: use the international system of units (SI). If other quantities are mentioned, give their equivalent in SI. You are urged to consult IUB: Biochemical Nomenclature and Related Documents: <http://www.chem.qmw.ac.uk/iubmb/> for further information.

Math formulae

Please submit math equations as editable text and not as images. Present simple formulae in line with normal text where possible and use the solidus (/) instead of a horizontal line for small fractional terms, e.g., X/Y. In principle, variables are to be presented in italics. Powers of e are often more conveniently denoted by exp. Number consecutively any equations that have to be displayed separately from the text (if referred to explicitly in the text).

Footnotes

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

Artwork

Electronic artwork

General points

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

A detailed guide on electronic artwork is available on our website:
<http://www.elsevier.com/artworkinstructions>

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

Formats

If your electronic artwork is created in a Microsoft Office application (Word, PowerPoint, Excel) then please supply 'as is' in the native document format. Regardless of the application used other than Microsoft Office, when your electronic artwork is finalized, please 'Save as' or convert the images to one of the following formats (note the resolution requirements for line drawings, halftones, and line/halftone combinations given below):

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

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

TIFF (or JPEG): Bitmapped (pure black & white pixels) line drawings, keep to a minimum of 1000 dpi. TIFF (or JPEG): Combinations bitmapped line/half-tone (color or grayscale), keep to a minimum of 500 dpi.

Please do not:

- Supply files that are optimized for screen use (e.g., GIF, BMP, PICT, WPG); these typically have a low number of pixels and limited set of colors;
- Supply files that are too low in resolution;
- Submit graphics that are disproportionately large for the content.

Color artwork

Please make sure that artwork files are in an acceptable format (TIFF (or JPEG), EPS (or PDF), or MS Office files) and with the correct resolution. If, together with your accepted article, you submit usable color figures then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in color online (e.g., ScienceDirect and other sites) regardless of whether or not these

illustrations are reproduced in color in the printed version. **For color reproduction in print, you will receive information regarding the costs from Elsevier after receipt of your accepted article.** Please indicate your preference for color: in print or online only. For further information on the preparation of electronic artwork, please see <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>. Please note: Because of technical complications that can arise by converting color figures to 'gray scale' (for the printed version should you not opt for color in print) please submit in addition usable black and white versions of all the color illustrations.

Tables

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

Web references

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

Reference style

Text: All citations in the text should refer to:

1. *Single author:* the author's name (without initials, unless there is ambiguity) and the year of publication;
 2. *Two authors:* both authors' names and the year of publication;
 3. *Three or more authors:* first author's name followed by 'et al.' and the year of publication.
- Citations may be made directly (or parenthetically). Groups of references should be listed first alphabetically, then chronologically. Examples: 'as demonstrated (Allan, 2000a, 2000b, 1999; Allan and Jones, 1999). Kramer et al. (2010) have recently shown'

List: References should be arranged first alphabetically and then further sorted chronologically if necessary. More than one reference from the same author(s) in the same year must be identified by the letters 'a', 'b', 'c', etc., placed after the year of publication.

Examples:

Reference to a journal publication:

Van der Geer, J., Hanraads, J.A.J., Lupton, R.A., 2010. The art of writing a scientific article. *J. Sci. Commun.* 163, 51–59.

Reference to a book:

Strunk Jr., W., White, E.B., 2000. *The Elements of Style*, fourth ed. Longman, New York.

Reference to a chapter in an edited book:

Mettam, G.R., Adams, L.B., 2009. How to prepare an electronic version of your article, in: Jones, B.S., Smith, R.Z. (Eds.), *Introduction to the Electronic Age*. E-Publishing Inc., New York, pp. 281–304.

Video data

Elsevier accepts video material and animation sequences to support and enhance your scientific research. Authors who have video or animation files that they wish to submit with their article are strongly encouraged to include links to these within the body of the article. This can be done in the same way as a figure or table by referring to the video or animation content and noting in the body text where it should be placed. All submitted files should be properly labeled so that they directly relate to the video file's content. In order to ensure that your video or animation material is directly usable, please provide the files in one of our recommended file formats with a preferred maximum size of 50 MB. Video and animation files supplied will be published online in the electronic version of your article in Elsevier Web products, including ScienceDirect: <http://www.sciencedirect.com>.

Please supply 'stills' with your files: you can choose any frame from the video or animation or make a separate image. These will be used instead of standard icons and will personalize the link to your video data. For more detailed instructions please visit our video instruction pages at <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>. Note: since video and animation cannot be embedded in the print version of the journal, please provide text for both the electronic and the print version for the portions of the article that refer to this content.

AudioSlides

The journal encourages authors to create an AudioSlides presentation with their published article. AudioSlides are brief, webinar-style presentations that are shown next to the online article on ScienceDirect. This gives authors the opportunity to summarize their research in their own words and to help readers understand what the paper is about. More information and examples are available at <http://www.elsevier.com/audioslides>. Authors of this journal will automatically receive an invitation e-mail to create an AudioSlides presentation after acceptance of their paper.

Supplementary data

Elsevier accepts electronic supplementary material to support and enhance your scientific research. Supplementary files offer the author additional possibilities to publish supporting

applications, highresolution images, background datasets, sound clips and more. Supplementary files supplied will be published online alongside the electronic version of your article in Elsevier Web products, including ScienceDirect: <http://www.sciencedirect.com>. In order to ensure that your submitted material is directly usable, please provide the data in one of our recommended file formats. Authors should submit the material in electronic format together with the article and supply a concise and descriptive caption for each file. For more detailed instructions please visit our artwork instruction pages at <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

Submission checklist

The following list will be useful during the final checking of an article prior to sending it to the journal for review. Please consult this Guide for Authors for further details of any item.

Ensure that the following items are present:

One author has been designated as the corresponding author with contact details:

- E-mail address
- Full postal address

All necessary files have been uploaded, and contain:

- Keywords
- All figure captions
- All tables (including title, description, footnotes). Further considerations
- Manuscript has been 'spell-checked' and 'grammar-checked'
- References are in the correct format for this journal
- All references mentioned in the Reference list are cited in the text, and vice versa
- Permission has been obtained for use of copyrighted material from other sources (including the Internet). Printed version of figures (if applicable) in color or black-and-white
- Indicate clearly whether or not color or black-and-white in print is required.
- For reproduction in black-and-white, please supply black-and-white versions of the figures for printing purposes. For any further information please visit our customer support site at <http://support.elsevier.com>.

AFTER ACCEPTANCE

Use of the Digital Object Identifier

The Digital Object Identifier (DOI) may be used to cite and link to electronic documents. The DOI consists of a unique alpha-numeric character string which is assigned to a document by the Publisher upon the initial electronic publication. The assigned DOI never changes. Therefore, it is an ideal medium for citing a document, particularly 'Articles in press' because they have not

yet received their full bibliographic information. Example of a correctly given DOI (in URL format; here an article in the journal *Physics Letters B*):

When you use a DOI to create links to documents on the web, the DOIs are guaranteed never to change.

Online proof correction

Corresponding authors will receive an e-mail with a link to our online proofing system, allowing annotation and correction of proofs online. The environment is similar to MS Word: in addition to editing text, you can also comment on figures/tables and answer questions from the Copy Editor. Web-based proofing provides a faster and less error-prone process by allowing you to directly type your corrections, eliminating the potential introduction of errors. If preferred, you can still choose to annotate and upload your edits on the PDF version. All instructions for proofing will be given in the e-mail we send to authors, including alternative methods to the online version and PDF. We will do everything possible to get your article published quickly and accurately. Please use this proof only for checking the typesetting, editing, completeness and correctness of the text, tables and figures. Significant changes to the article as accepted for publication will only be considered at this stage with permission from the Editor. It is important to ensure that all corrections are sent back to us in one communication. Please check carefully before replying, as inclusion of any subsequent corrections cannot be guaranteed. Proofreading is solely your responsibility.

Offprints

The corresponding author, at no cost, will be provided with a personalized link providing 50 days free access to the final published version of the article on ScienceDirect. This link can also be used for sharing via email and social networks. For an extra charge, paper offprints can be ordered via the offprint order form which is sent once the article is accepted for publication. Both corresponding and co-authors may order offprints at any time via Elsevier's WebShop (<http://webshop.elsevier.com/myarticleservices/offprints>). Authors requiring printed copies of multiple articles may use Elsevier WebShop's 'Create Your Own Book' service to collate multiple articles within a single cover (<http://webshop.elsevier.com/myarticleservices/booklets>).

AUTHOR INQUIRIES

You can track your submitted article at [://help.elsevier.com/app/answers/detail/a_id/89/p/8045/](http://help.elsevier.com/app/answers/detail/a_id/89/p/8045/).

You can track your accepted article at <http://www.elsevier.com/trackarticle>.

You are also welcome to contact Customer Support via <http://support.elsevier.com>.

© Copyright 2014 Elsevier | <http://www.elsevier.com>