

UNIVERSIDADE DE SANTO AMARO
Medicina Veterinária

Marcelo Sant'Ana Borges

**EFEITO PARADOXAL DO ANTIOXIDANTE QUERCETINA SOBRE A
CINÉTICA E INTEGRIDADE DE ESPERMATOZOIDES CAPRINOS
SUBMETIDOS À CRIOPRESERVAÇÃO**

São Paulo – SP

2018

Marcelo Sant'Ana Borges

**EFEITO PARADOXAL DO ANTIOXIDANTE QUERCETINA SOBRE A
CINÉTICA E INTEGRIDADE DE ESPERMATOZOIDES CAPRINOS
SUBMETIDOS À CRIOPRESERVAÇÃO**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado
ao Curso de Medicina Veterinária da
Universidade de Santo Amaro – UNISA, como
requisito parcial para obtenção do título
Bacharel em Medicina Veterinária.
Orientador: Prof. Dr. André Maciel Crespilho

São Paulo – SP

2018

B733e Borges, Marcelo Sant'Ana

Efeito paradoxal do antioxidante quercetina sobre a cinética e integridade de espermatozoides caprinos submetidos à criopreservação / Marcelo Sant'Ana Borges. – São Paulo, 2018.

31 f.: il.

Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Medicina Veterinária) – Universidade Santo Amaro, 2018.

Orientador(a): Prof. Dr. André Maciel Crespilho

1. Caprinos. 2. Congelação. 3. Quercetina. 4. Sêmen. I. Crespilho, André Maciel, orient. II. Universidade Santo Amaro. III. Título.

Marcelo Sant'Ana Borges

**EFEITO PARADOXAL DO ANTIOXIDANTE QUERCETINA SOBRE A
CINÉTICA E INTEGRIDADE DE ESPERMATOZOIDES CAPRINOS
SUBMETIDOS À CRIOPRESERVAÇÃO**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Medicina Veterinária da Universidade de Santo Amaro – UNISA, como requisito parcial para a obtenção do título Bacharel em Medicina Veterinária.

Orientador: Prof. Dr. André Maciel Crespilho

São Paulo,dede 20.....

Banca Examinadora

Prof. Dr......

Prof. Dr......

Prof. Dr......

Conceito Final:_____

Agradecimentos

Agradeço primeiramente à Deus, por tudo que proporcionou em minha vida, todas as bênçãos e graças Dele recebidas.

Aos meus pais Maria Aparecida e Walter pelo alicerce para que eu pudesse sonhar e correr atrás de meus objetivos, mesmo diante de todas as dificuldades, sempre me apoiando e incentivando a ser cada vez melhor; ainda que não pudessem me dar tudo, conseguiram me dar o essencial, o apoio em todos os momentos em minha vida; sempre ensinando a dar o devido valor ao trabalho e às conquistas alcançadas com muito suor.

Ao meu irmão e grande amigo Daniel, que, apesar dos desentendimentos, sempre esteve ao meu lado, dando conselhos, compartilhando momentos incríveis e me servindo como um modelo de ser humano, a quem pude me espelhar.

À minha namorada Letícia, sempre amorosa e preocupada, me aturando nos momentos de estresse e nunca me deixando desistir quando as dificuldades apareciam.

Aos meus amigos Carlos, Cayo, Felipe, Gabriel, Lucas, Maurício, Rafael, Bárbara, Joana e todos os demais, pelos ótimos momentos juntos, pelas conversas, risadas e conselhos.

Ao meu orientador Prof. Dr. André Maciel Crespilho, pelos conhecimentos transmitidos, pelos conselhos, e principalmente pela paciência e confiança durante esse tempo de orientação.

Gostaria de agradecer a Universidade Santo Amaro e seus profissionais pela oportunidade de evolução e crescimento. Pelo privilégio de aprender com professores incríveis.

“É elogiado como grato quem se lembra do benefício recebido, mas é muito mais grato quem esquece o benefício para lembrar-se do benfeitor.”

L. Boerne

RESUMO

Durante o processo de criopreservação ocorre a morte de um número significativo de espermatozoides em função da geração de altas concentrações de espécies reativas de oxigênio (EROS). Embora fundamentais para o desencadeamento de diversos eventos de sinalização celular, incluindo a regulação da maturação, capacitação, reação acrossomal e hiperativação espermática, altas concentrações de EROS podem levar a lesões irreversíveis à ultraestrutura da célula espermática das diferentes espécies domésticas. Como estudos anteriores demonstraram a efetividade do antioxidante quercetina (QC) para a proteção de células espermáticas, o objetivo desse estudo foi avaliar a incorporação de diferentes concentrações de QC aos meios diluidores voltados à manutenção de espermatozoides caprinos congelados. Ejaculados de 4 reprodutores adultos da raça Anglo Nubiana (n=4 ejaculados/bode) foram colhidos através de vagina artificial e diluídos em solução de Ringer com Lactato de Sódio aquecido à 37°C para remoção do plasma seminal através de centrifugação. As amostras espermáticas resultantes foram diluídas em meio TRIS gema de ovo frutose, atendendo a concentração de 120×10^6 espermatozoides/ml de meio e separados em grupos: G1 Controle (G1, sem adição de antioxidantes); G2 (adição de $10 \mu\text{M}$ de quercetina no meio diluidor após a centrifugação); G3 (adição de $10 \mu\text{M}$ de QC no diluidor antes da centrifugação) e G4 (adição de $10 \mu\text{M}$ antes e $10 \mu\text{M}$ após a centrifugação, totalizando $20 \mu\text{M}$ de quercetina ao meio diluidor). Após a divisão dos tratamentos as amostras foram envasadas em palhetas de 0,5 ml e submetidas à curva de refrigeração em geladeira previamente ajustada a 5°C até a temperatura de estabilização, quando então foram transferidas para a congelação em vapor de nitrogênio líquido. As amostras foram avaliadas quanto à cinética espermática (ISAS V.1.2, Valência, Espanha) e submetidas à análise de integridade de membrana plasmática (IMP, %) em microscopia de epifluorescência. Os dados gerados foram avaliados através de modelo linear geral (GLM). Após o procedimento de congelação e descongelação foram observadas redução na motilidade espermática ($P = 0,0014$), motilidade progressiva ($P = 0,0029$) e velocidade de trajeto ($P < 0,0001$) nos tratamentos com quercetina. A integridade da membrana plasmática foi melhor preservada ($P = 0,0154$) no grupo controle (35,47%) do que nos grupos com a introdução da QC (G2 = 32,56%; G3 = 32,38% e G4 = 26,74%) levando a crer em um efeito deletério dose dependente, onde a maior concentração de quercetina levou a uma menor preservação da integridade de membrana plasmática. Em conclusão, mesmo usando doses recomendadas pela literatura, o antioxidante quercetina teve efeitos tóxicos para os espermatozoides de caprinos submetidos a criopreservação.

Palavras-chave: Caprinos; Congelação; Quercetina; Sêmen.

ABSTRACT

During the cryopreservation process the death of a significant number of spermatozoa occurs due to the generation of high concentrations of reactive oxygen species (EROS). Although important for triggering various cell signaling events, including regulation of maturation, training, acrosomal reaction and sperm hyperactivation, high concentrations of EROS can lead to irreversible damage to the sperm cell ultrastructure of the different domestic species. As previous studies have demonstrated the effectiveness of the antioxidant quercetin (QC) for the protection of sperm cells, the objective of this study was to evaluate the incorporation of different concentrations of QC to the diluent media aimed at the maintenance of frozen goat spermatozoa. Ejaculates of 4 adult Anglo Nubian breeders (n = 4 ejaculates / goat) were collected through artificial vagina and diluted in Ringer's solution with Sodium Lactate heated to 37 ° C for removal of seminal plasma by centrifugation. The resulting sperm samples were diluted in TRIS egg-fructose medium, taking into account the concentration of 120×10^6 spermatozoa / ml of medium, where: G1 Control (G1, without addition of antioxidants); G2 (addition of 10 μ M quercetin in the diluent medium after centrifugation); G3 (addition of 10 μ M of QC in the diluent prior to centrifugation) and G4 (addition of 20 μ M quercetin diluent medium, 10 μ M before and 10 μ M after centrifugation). After the treatments were divided the samples were bottled in 0.5 ml vials and submitted to the refrigeration curve in a refrigerator previously adjusted to 5 ° C until the stabilization temperature, when they were transferred to the freezing in liquid nitrogen vapor. The samples were evaluated for spermatic kinetics (ISAS V.1.2, Valencia, Spain) and submitted to analysis of plasma membrane integrity (IMP,%) in epifluorescence microscopy. The generated data were evaluated using the general linear model (GLM). After frozen-thawed procedure were observed a reduction in sperm motility (P=0.0014), progressivity (P=0.0029) and velocity (P<0.0001) in the Quercetin treatments. The plasma membrane integrity was better preserved (P=0.0154) in control group (35.47%) than in QC groups (G2=32.56%; G3=32.38% and G4=26.74%). In conclusion, even using doses recommended by the literature, the antioxidant Quercetin has toxic effects for goat spermatozoa of goats subjected to cryopreservation.

Keywords: quercetin, cooled, semen, goats.

Lista de abreviaturas

CASA	Sistema de Análise Computadorizada de Sêmen
CE	Centrifugação
CFDA	Diacetato de Carboxifluoresceína
EROS	Espécies Reativas a Oxigênio
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
IA	Inseminação Artificial
IMP	Integridade de membrana plasmática
LIN	Linearidade espermática
MDA	Malondialdeído
MOT	Motilidade espermática total
MP	Motilidade espermática progressiva
N ₂	Nitrogênio Líquido
O ₂ ⁻	Radical superóxido
PL	Peroxidação Lipídica
QC	Quercetina
RAP	Espermatozoides rápidos
SO	Estresse Oxidativo
TBARS	Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
VAP	Velocidade de trajeto

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVAS	9
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	10
2.1. Produção de caprinos e inseminação artificial	10
2.2. Processamento do sêmen caprino e IA	11
2.3. Utilização do sêmen congelado	12
2.4. Incorporação de Antioxidantes ao Sêmen Caprino – Quercetina.....	12
3. OBJETIVOS	14
4. HIPÓTESE	15
5. MATERIAL E MÉTODOS	15
5.1. Animais	15
5.2. Processamento do Sêmen	16
5.3. Análise do Sêmen	18
5.3.1. Análise Computadorizada do Movimento Espermático (CASA).....	18
5.3.2. Integridade de Membrana Plasmática (IMP).....	18
5.3.3. Quantificação das substâncias reativas ao ácido Tiobarbitúrico (TBARS).....	19
6. DELINEAMENTO ESTATÍSTICO	20
7. RESULTADOS	20
8. DISCUSSÃO	22
9. CONCLUSÃO	25
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	26

1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVAS

A caprinocultura é uma importante fonte de renda, principalmente, para pequenos e médios produtores no Brasil, com a produção de carne e leite sendo seus principais produtos. Tendo a região Nordeste como a maior concentração de criação de caprinos, sobretudo, em sistema extensivo ou de subsistência.

Apesar de sua importância, a caprinocultura, no Brasil, ainda é deficiente em importantes tecnologias para a produção, principalmente quando relacionadas a reprodução, o que poderia aumentar de forma significativamente a lucratividade dessa atividade. Dentre essas técnicas podemos citar a inseminação artificial, que é uma das mais notáveis quando relacionadas ao melhoramento genético animal.

A inseminação artificial possibilita ao produtor uma maior gama de material genético desejável, uma vez que não há a necessidade da presença do macho reprodutor. Isso se deve a possibilidade da utilização do sêmen refrigerado ou congelado. O sêmen congelado proporciona uma facilidade no transporte e um armazenamento desse material genético por tempo indeterminado, permitindo seu emprego mesmo após a morte do reprodutor.

Entretanto, devido as particularidades do sêmen caprino se faz necessário a remoção do plasma seminal durante o processo de congelação, graças a interação deletéria entre alguns constituintes dos principais meios diluidores e o mesmo. A centrifugação se apresenta como uma das melhores opções, entretanto, assim como a congelação, pode induzir uma queda na viabilidade desses espermatozoides, devido a formação de um número exacerbado de espécies reativas a oxigênio, estabelecendo a necessidade de proteção das células espermáticas.

Para tal proteção, há a necessidade de um antioxidante para combater essas espécies reativas a oxigênio. Dentre as opções, a Quercetina tem se mostrado um potencial antioxidante para a utilização junto ao sêmen animal, porém não há uma padronização da dose a ser utilizada ou o momento para a incorporação do mesmo.

Observando tais necessidades, o presente estudo foi desenvolvido para observar a interação da quercetina quando incorporada em diferentes doses e estágio do processo de congelação do sêmen caprino.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Produção de caprinos e inseminação artificial

A caprinocultura corresponde a uma das principais fontes de renda para pequenos e médios produtores no Brasil, representando umas das mais importantes atividades para subsistência de diversos modelos de criação familiar predominantes, principalmente, na região Nordeste do país (FARIAS et al., 2014; PERDIGÃO et al., 2016; VIEIRA et al., 2016).

Por falta de estruturação da cadeia produtiva, convencionalmente a criação de caprinos no Brasil utiliza sistemas extensivos ou semi-intensivos de produção, que em geral possuem baixa taxa de adoção tecnológica, que compromete o manejo geral, sanitário, reprodutivo e nutricional da caprinocultura brasileira (SANTOS et al., 2014; FARIAS et al., 2014).

Devido ao baixo grau de tecnificação dos sistemas de produção nacionais, estratégias básicas para otimização da capacidade reprodutiva como correta escrituração zootécnica, adoção de regime de estação de monta e uso da inseminação artificial (IA) não são empregadas em larga escala, o que determina uma baixa eficiência e produtividade da caprinocultura no Brasil. (SIQUEIRA et al., 2009).

A inseminação artificial representa uma das mais importantes técnicas de melhoramento genético animal. A partir da utilização de material genético de reprodutores com alto potencial zootécnico a IA é capaz de imprimir maior produtividade animal, permitindo o aprimoramento genético dos rebanhos em uma velocidade superior à que seria alcançada em programas reprodutivos que envolvem apenas monta natural (PERDIGÃO et al., 2016; GUERRA et al., 2011). Além do ganho genético, as principais características da IA se relacionam à facilidade para implementação, maior intercâmbio de material genético entre diferentes localidades ou criatórios, além de maior confiabilidade para realização e interpretação de testes de progênie (SANTOS et al., 2014; GUERRA et al., 2011).

Mesmo em detrimento a sua importância como ferramenta de aperfeiçoamento genético e produtivo dos rebanhos, a inseminação artificial ainda é pouco utilizada para o manejo reprodutivo de caprinos no Brasil. Entre os fatores que contribuem para

o baixo número de fêmeas inseminadas destacam-se as dificuldades relacionadas aos processos de conservação e transporte de sêmen (BISPO, 2005).

2.2 Processamento do sêmen caprino para IA

Dentre as vantagens proporcionadas pela utilização da IA destaca-se o uso de sêmen de reprodutores com características desejáveis, muitas vezes residentes em áreas distantes, o que diminui substancialmente os custos e o estresse com o transporte de animais. Em vista disso, o armazenamento do sêmen sob congelação ou refrigeração se faz necessário, permitindo o aumento da longevidade do material genético para fins reprodutivos. Entretanto, para o correto aproveitamento biotecnológico do material genético é preciso conhecimento prévio sobre diversas particularidades apresentadas pelo sêmen caprino que diferem das demais espécies domésticas.

Uma particularidade importante do sêmen caprino representa a constituição enzimática do plasma seminal dessa espécie, que promove interações deletérias entre os espermatozoides e os constituintes dos meios diluidores (BEZERRA, 2010; PURDY, 2006). Estudos anteriores demonstraram que as glândulas bulbouretrais dos bodes secretam enzimas com ação detergente sobre os lipídeos presentes nas membranas celulares e na gema de ovo que é utilizada nos meios diluidores de preservação, que são convertidas a ácidos graxos e isolecitas, compostos extremamente tóxicos aos espermatozoides caprinos (JIMÉNEZ-RABADÁN et al., 2012). Em virtude da interação deletéria entre o sêmen caprino e os constituintes dos meios diluidores para congelação ou refrigeração espermática torna-se indispensável a remoção do plasma seminal previamente ao processamento das amostras espermáticas dessa espécie para prevenção da ocorrência de processos enzimáticos (BEZERRA et al., 2010; SIQUEIRA et al., 2009; PURDY, 2006; LEBOEUF et al., 2000). Apesar da perda de uma pequena quantidade de espermatozoides durante o processo, a centrifugação (CE) se mostrou eficaz na remoção do plasma seminal, podendo haver até um efeito benéfico na sobrevivência dos espermatozoides após o descongelamento de sêmen criopreservado (RITAR, SALAMON, 1982). Entretanto, estudos revelam que mesmo durante a centrifugação há um estresse oxidativo,

originado por espécies reativas a oxigênio (EROS) formados ao decorrer do processo (AITKEN & CLARKSON, 1988; TWIGG et al, 1998). Observando tais danos, há a necessidade de minimizar essas injúrias decorrentes deste processamento, sendo que pelos meios diluidores seria a melhor forma de ação contra esse sofrimento celular.

2.3 Utilização do sêmen congelado

O processo de congelação do sêmen possibilita que o material genético de reprodutores seja armazenado por tempo indeterminado. Entretanto, tal biotecnologia pode causar crioinjúrias à membrana plasmática e acrossomal dos espermatozoides (CELEGHINI, 2005). Sendo que a formação das espécies reativas a oxigênio (EROS) está entre os principais fatores causadores desses danos (KADIRVEL, 2009).

Embora em quantidades reduzidas as EROS proporcionam sinalização e maturação celular, capacitação e hiperativação espermática (O'FLAHERTY, 1999; FORD, 2004), quando em concentrações elevadas levam a peroxidação lipídica (PL) e estresse oxidativo (SO) causando danos irreversíveis aos espermatozoides (GRIVEAU, 1997; SCHOBBER, 2007).

Considerando que os espermatozoides têm uma limitada capacidade de resistência ao estresse oxidativo (NICHI et al., 2006), torna-se imprescindível que os meios diluidores possuam componentes que minimizem o efeito deletério das EROS.

2.4 Incorporação de Antioxidantes ao Sêmen Caprino - Quercetina

A quercetina (3,3',4',5,7-pentahidroxi-flavona) corresponde a principal substância da classe dos flavonoides (ROBAK; GRYGLEWSKI, 1988), que são compostos de origem natural, comumente encontrados em alimentos de origem vegetal (ALRAWAIQ; ABDULLAH, 2014), tendo a cebola, a maçã e o brócolis como fontes majoritárias (BEHLING et al., 2004). Sabe-se que os flavonoides possuem pronunciada atuação como quelantes de íons ferro (AFANAS'EV et al., 1989) e cobre (THOMPSON; WILLIAMS, 1976) apresentando, portanto, parte do seu efeito

antioxidante mediado pela interação iônica (DE WHALLEY, 1990).

De acordo com Afanas'ev et al., (1989) a quercetina tem a capacidade de inibir o processo de formação de radicais livres em três fases distintas: pela interação com íons superóxido, por quelação de íons ferro e por reação com radicais peroxi lipídicos, o que leva a interrupção do processo de PL. Por eliminarem ânions superóxidos por vias enzimáticas e não enzimáticas os flavonoides podem ser considerados poderosos agentes antioxidantes (Y. Li, 2011 citado por BANDAY, 2016).

Embora a quercetina seja mais conhecida por suas propriedades quelantes e estabilizadoras de ferro, essa substância possui pronunciado potencial de inibição da xantina oxidase e da peroxidação lipídica (BEHLING et al., 2004). *In vitro* a QC inibe a oxidação e a citotoxicidade das lipoproteínas de baixa densidade (LDL) (DE WHALLEY, 1990), mostrando-se um antioxidante mais potente do que as vitaminas C e E (VINSON, 1995).

Dentre os diferentes flavonoides a quercetina é a que possui maior capacidade de interação com biomembranas em virtude de sua grande lipofilicidade, característica que pode garantir maior proteção às bicamadas fosfolipídicas das membranas celulares aos efeitos deletérios dos EROS (BARREIROS et al., 2006; SAIJA, 1995).

De acordo com Córdoba et al., (2007) a adição da QC aos diluidores para criopreservação do sêmen bovino foi capaz de modular o estado redox e o metabolismo oxidativo necessários para a capacitação dos espermatozoides.

Na utilização como aditivo ao sêmen de coelhos foi observado que a quercetina apresentou capacidade de redução do dano oxidativo, da peroxidação lipídica e redução nos danos acrossomais de espermatozoides dessa espécie (JOHINKE et al, 2014).

Quando adicionado ao sêmen refrigerado de garanhões a QC não foi capaz de influenciar a cinética espermática ou reduzir o estresse oxidativo; porém utilizando as mesmas concentrações dessa substância como adjuvante ao sêmen congelado foi observado efeito significativo relacionado à redução da produção de EROS e da peroxidação dos lipídios de membrana plasmática (SILVA et al., 2016B). Em estudo conduzido por Seifi-Jamadi et al., (2016) foi observado que em baixas dosagens (0,1 mM) a quercetina se mostrou eficiente na preservação da motilidade total e progressiva dos espermatozoides equinos pós-descongelção.

Silva et al., (2012), relataram que a adição de quercetina ao sêmen criopreservado de carneiros não foi capaz de causar mudanças significativas na

motilidade progressiva, no vigor ou na integridade de membrana plasmática. De acordo com esse mesmo estudo, embora os grupos tratados com quercetina tenham apresentado integridade do acrossoma de 68,9%, houve a redução do potencial de membrana mitocondrial dos espermatozoides por volta de 25% e 16% nos grupos que receberam 10 µg/mL e 5 µg/mL de quercetina, respectivamente.

Em outro estudo com sêmen congelado de caprinos Silva et al., (2016A) relataram que a adição de QC reduziu o índice de oscilação do espermatozoide e aumentando a linearidade, o que pode favorecer a fertilidade espermática em função da maior qualidade de movimentação celular. Também com sêmen congelado caprino, Seifi-Jamadi et al., (2017) observaram que a adição da quercetina proporcionou melhor preservação da cinética espermática, diminuindo a peroxidação lipídica, a formação de EROS e a concentração de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico, entretanto nesse mesmo estudo, foi observado um possível efeito paradoxal dose-dependente sobre a qualidade espermática, onde altas doses de QC foram associadas à queda da cinética e integridade de espermatozoides caprinos.

Dessa forma, a literatura indica que a quercetina já se mostrou um potente e promissor antioxidante que pode ser incorporado aos meios de criopreservação para melhora da viabilidade e fertilidade espermática. Porém, até o presente não existe consenso sobre quais as concentrações ideais desse antioxidante podem ser incorporadas ao sêmen das diferentes espécies animais, podendo ainda apresentar efeito paradoxal dose-dependente ao sêmen caprino. No tocante à reprodução caprina existem poucos trabalhos publicados explorando o uso da QC como adjuvante seminal e seus efeitos.

Levando-se em consideração a importância da caprinocultura como instrumento de subsistência de diversas comunidades no país, às particularidades existentes em relação ao aproveitamento biotecnológico do sêmen caprino, além do reduzido número de pesquisas avaliando à incorporação da quercetina para otimizar a preservação do sêmen congelado de bodes, se justificam novas proposta de pesquisa nessa importante área do conhecimento.

3. OBJETIVOS

3.1. Avaliar os efeitos da incorporação de quercetina ao meio diluidor de

congelamento sobre a cinética e integridade de espermatozoides caprinos.

3.2. Testar diferentes doses e momento de incorporação do antioxidante quercetina sobre a qualidade do sêmen caprino congelado.

3.3. Testar ainda a hipótese de um possível efeito paradoxal da suplementação com quercetina sobre a qualidade e viabilidade do sêmen caprino congelado.

4. HIPÓTESE

Em virtude de sua capacidade de diminuição do processo de peroxidação lipídica espera-se que amostras suplementadas com quercetina apresentem melhor padrão de movimento e menor produção de radicais livres em relação aos grupos não tratados.

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1 Animais

O protocolo experimental deste estudo seguiu os Princípios Éticos na Experimentação Animal, seguindo as diretrizes brasileiras para o cuidado e a utilização de animais para fins científicos e didáticos (DBCA) e aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Santo Amaro (CEUA/UNISA), parecer N.23.1/2017.

Foram selecionados 4 bodes (*Capra hircus*), raça Anglo Nubiana, com idade média de 30 meses pertencentes a mini fazenda da Universidade Santo Amaro, São

Paulo/SP. Como critérios para inclusão no experimento foram considerados o histórico clínico e reprodutivo dos animais, além do exame andrológico. Nesse sentido, apenas os bodes que apresentaram circunferência escrotal mínima de 28 cm, motilidade total do sêmen superior a 50%, concentração espermática total superior a 1×10^9 de células por ejaculado, defeitos espermáticos maiores em porcentagem inferior a 20% e defeitos totais em proporção inferior a 30% foram incluídos no estudo.

Todos os animais passaram por um período de adaptação e nivelamento biológico no qual os ejaculados foram colhidos 2 vezes por semana durante 30 dias através de vagina artificial própria para a espécie.

Para execução das avaliações laboratoriais previstas no experimento foram colhidos 4 ejaculados de cada animal, totalizando 16 amostras espermáticas.

5.2 Processamento do Sêmen

Imediatamente após cada colheita foi retirada uma alíquota de cada ejaculado para avaliação subjetiva sob lâmina e lamínula em microscopia de luz quanto à aderência aos critérios de inclusão definidos para o trabalho. Após a triagem inicial de qualidade cada amostra foi diluída em solução de Ringer com Lactato de sódio previamente aquecido a 37°C de forma a fixar o volume final em 10 ml. Cada alíquota diluída foi dividida em duas partes iguais com 5 mililitros cada, onde foi adicionado $10\mu\text{M}$ de Quercetina em apenas uma das partes.

O material diluído foi submetido à retirada do plasma seminal através de centrifugação a $500 \times \text{G}$ por 10 minutos. Após a centrifugação o sobrenadante foi descartado e as amostras foram ressuspensas em meio TRIS gema de ovo frutose de forma a compor 4 grupos experimentais: Grupo 1 Controle (GC, TRIS sem adição de antioxidantes); Grupo 2 (G2, adição de $10\mu\text{M}$ de QC ao meio diluidor somente após a centrifugação); Grupo 3 (G3, adição de $10\mu\text{M}$ de QC ao diluidor somente antes da centrifugação) e Grupo 4 (G4, adição de $10\mu\text{M}$ de QC antes e $10\mu\text{M}$ de QC após a centrifugação, totalizando $20\mu\text{M}$ de QC), segundo a Figura-1 abaixo. Todas as amostras foram diluídas de forma a fixar a concentração final em 120×10^6 espermatozoides/mL de meio, de forma independente aos tratamentos propostos.

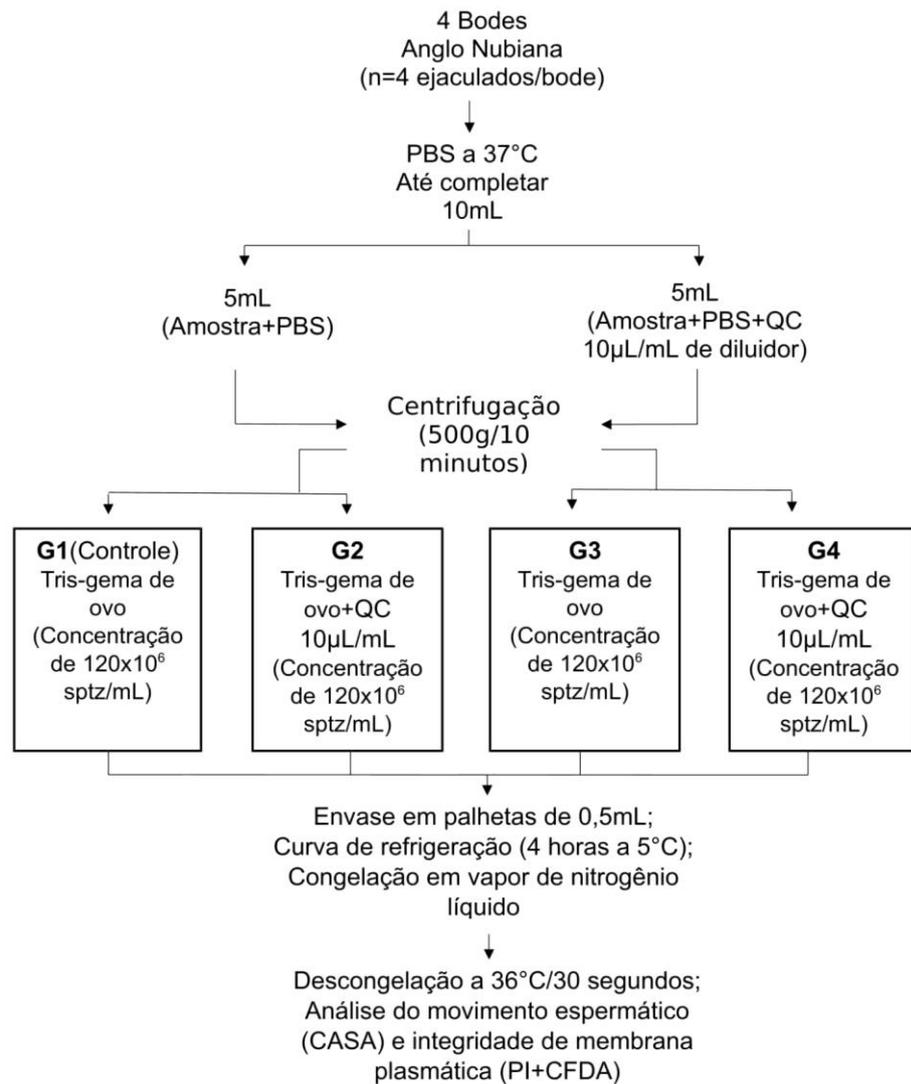


Figura 1 – Ilustração do processamento do sêmen.

Amostras dos 4 grupos experimentais foram envasadas em palhetas francesas de 0,5mL e refrigeradas a aproximadamente $-0,13^{\circ}\text{C}/\text{minuto}$ em geladeira previamente ajustada a 5°C pelo período de 4 horas. Após a fase inicial de refrigeração as palhetas foram transferidas para caixa de isopor de 44 litros, previamente preenchida com coluna de 3 cm de nitrogênio líquido (N_2). As doses de sêmen foram dispostas em raques metálicas horizontais permanecendo a 5cm do nível de N_2 por 20 minutos, sendo mergulhadas integralmente no nitrogênio após esse período, segundo Crespilho et al., (2014).

5.3 Análise do Sêmen

Após o armazenamento em botijões criobiológicos as amostras foram descongeladas a 36°C por 30 segundos, depositadas em microtubos graduados de 1,5 ml, acondicionadas em banho-maria seco à temperatura constante de 37°C e avaliadas quanto a cinética espermática, integridade de membrana plasmática em microscopia de epifluorescência e peroxidação lipídica pela quantificação das substâncias reativas ao ácido Tiobarbitúrico (TBARS).

5.3.1 Análise Computadorizada do Movimento Espermático (CASA)

A qualidade do movimento espermático desempenhado por cada grupo experimental foi avaliada através do sistema ISAS® V.1.2 (Proiser, Valencia, Espanha). Os parâmetros avaliados corresponderam a motilidade espermática total (MT, %) e progressiva (MP, %); velocidade de trajeto (VAP, $\mu\text{m/s}$; linearidade (LIN, $\mu\text{m/s}$) espermática; e porcentagem de espermatozoides exibindo movimento rápido (VR, %). Para cada amostra foram observados 5 campos aleatórios em câmara de análise modelo Sperm Tracker® (Proiser, Valencia, Espanha), avaliando-se um número mínimo de 200 células por campo.

5.3.2 Integridade de Membrana Plasmática (IMP)

Para a determinação da integridade de membrana plasmática (IMP, %) utilizou-se a combinação de sondas fluorescentes Diacetato de Carboxifluoresceína (CFDA) e Iodeto de Propídeo (PI), segundo Harrison & Vickers (1990) e adaptado por Viana (2004). Para tanto, houve a retirada uma alíquota de 25 μL de sêmen de cada amostra, procedendo-se a pronta diluição em 25 μL de solução de citrato de sódio 2,96% previamente aquecido a 37°C. À solução originada foi adicionado 20 μL de solução de

trabalho fluorescente, composta por 1,0 mL de citrato de sódio 2,94%, 20 µL de formol salino tamponado (solução de 2mL de Formalina 38% em 98 mL de Ringer com Lactato de Sódio), 120 µL de PI e 30 µL de CFDA. As amostras coradas foram avaliadas sob lâmina e lamínula em aumento de 400 vezes através de microscopia de epifluorescência, permitindo a diferenciação das células portadoras de membrana plasmática íntegra (coloração verde devido a marcação pela carboxifluoresceína) ou lesada (exibindo coloração vermelha característica da sonda iodeto de propídeo, fluorocromo exclusivamente permeável às células portadoras de membrana plasmática desestruturada). Para cada amostra foram avaliadas 200 células espermáticas em cada um dos momentos experimentais.

5.3.3 Quantificação das substâncias reativas ao ácido Tiobarbitúrico (TBARS)

Amostras de sêmen foram centrifugadas a 2500xG por 10 minutos, retirando-se 600µL da solução sobrenadante e depositando em novos tubos de microcentrífuga de 1,5mL. Para cada amostra será adicionado 600µL (1:1) de ácido tricloroacético a 10% (TCA; 100g em 1000mL de água) previamente confeccionado e estocado a temperatura de 5°C, utilizado para provocar a precipitação das proteínas da solução sobrenadante de acordo com Nichi et al. (2006). Todas as amostras serão congeladas em freezer convencional e armazenadas a temperatura de -18°C até o momento da realização dos testes laboratoriais.

Após descongelamento em temperatura ambiente, as amostras foram centrifugadas novamente a 2500xG por 10 minutos. Após centrifugação, 500µL do sobrenadante foram acondicionados em tubo de vidro de 5mL com 500µL de 1% de ácido tiobarbitúrico (diluídos em 0.05N hidróxido de sódio) e aquecidos em banho-maria à 100°C por 10 minutos, e subsequentemente refrigerado a 0°C para interromper a reação química (NACHI et al., 2006). As espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico foram quantificadas usando espectrofotômetro (UV-vis Spectrophotometer Ultro-spec 3300 Pro, Biochrom Ltd., Cambridge, UK) calibrado para absorvância de 532nm. Os resultados foram comparados com curva de estabilização previamente preparada com solução padrão de malondialdeído (MDA) (que representa um dos principais produtos do estresse oxidativo).

Para a realização do teste de TBARS induzido a amostra seminal foi ressuspensa afim de chegar à concentração de 1×10^8 sptz/mL. A peroxidação lipídica foi induzida com a adição de sulfato ferroso (250 μ L, 4mM) e ascorbato de sódio (250 μ L, 4mM) em 1 mL de sêmen ressuspensado, a mistura foi armazenada em 37°C por 2 horas assim como proposto por Nichi et al. (2007). Após o período de 2 horas o teste foi conduzido como o teste de TBARS espontâneo mencionado acima.

A concentração de TBARS foi determinada usando o valor de 1.56×10^5 x M/mL de coeficiente de extinção molar de MDA. A peroxidação lipídica foi expressa como ng de TBARS/ 10^8 espermatozoides.

6. DELINEAMENTO ESTATÍSTICO

Os dados gerados foram avaliados através de modelo linear de análise de variância (GLM®, SAS Institute, Cary, USA). Foram incluídos no modelo os efeitos principais dos diferentes tratamentos e das diferentes concentrações do antioxidante quercetina como variáveis explanatórias e os efeitos de reprodutor e suas interações como co-variáveis. Diferenças foram consideradas quando $p < 0,05$.

7. RESULTADOS

De acordo com a metodologia proposta foi observada interação negativa entre a incorporação de QC sobre a cinética e integridade de espermatozoides caprinos, havendo redução na MOT ($P=0,0014$), MP ($P=0,0029$), VAP ($P < 0,0001$), RAP ($P < 0,0001$) e IMP ($P=0,0154$). Não foram observados efeitos adjuvantes da QC quando incorporada nos momentos pré ou pós-centrifugação, como demonstrado na Tabela 1 abaixo. Já quando observamos o grau de peroxidação lipídica, mensurada pela quantidade de malondialdeído (MDA) durante o teste de TBARS espontâneo ($P > 0.9582$) e induzido ($P=0,0093$); não foram observada diferença significativa entre os grupos após o teste espontâneo, sendo: G1, G2, G3 e G4 (336.21 ± 27.77 , 339.73 ± 27.12 , 319.84 ± 27.84 e 328.48 ± 27.77 respectivamente). Entretanto,

observando os resultados do teste de TBARS induzido pudemos notar uma queda significativa do estresse oxidativo nos grupos suplementados com a QC quando comparados ao grupo controle durante o teste de indução do estresse oxidativo (Figura 1).

Tabela-1: Efeito da incorporação do antioxidante quercetina (média±SE) sobre as características cinéticas e integridade de espermatozoides caprinos submetidos à criopreservação, de acordo com cada grupo experimental. Onde G1: Grupo Controle (sem incorporação de quercetina); G2: Incorporação de 10 µmol/mL de quercetina previamente à centrifugação do sêmen; G3: Incorporação de 10 µmol/mL previamente à criopreservação do ejaculado; G4: Incorporação de 10 µmol de quercetina/mL à centrifugação e mais 10 µmol/ mL antes da congelação do sêmen (total de 20 µmol de quercetina/ml).

PARÂMETROS	G1	G2	G3	G4
MOT (%)	56,82 (4,14) ^A	42,35 (3,93) ^B	40,94 (4,59) ^B	37,53 (3,93) ^B
MP (%)	24,71 (1,86) ^A	18,94 (2,12) ^B	18,12 (2,44) ^B	15,59 (2,09) ^B
VAP (µM/S)	58,35 (2,13) ^A	50,65 (3,34) ^B	51,00 (2,79) ^B	50,18 (2,23) ^B
LIN (%)	49,29 (2,12) ^A	49,41 (1,30) ^A	46,59 (2,58) ^A	47,41 (2,06) ^A
RAP (%)	37,18 (3,55) ^A	24,88 (3,53) ^B	24,24 (3,84) ^B	21,59 (3,75) ^B
IMP (%)	35,47 (1,70) ^A	32,56 (2,15) ^{AB}	32,38 (2,43) ^{AB}	26,74 (2,92) ^B

^{A,B} Letras diferentes na mesma linha expressam as diferenças estatísticas encontradas. Onde MOT: motilidade espermática total pós-descongelamento; MP: motilidade espermática progressiva pós-descongelamento; VAP: velocidade de trajeto; LIN: linearidade espermática; RAP: percentual de espermatozoides rápidos da amostra; IMP: integridade de membrana plasmática.

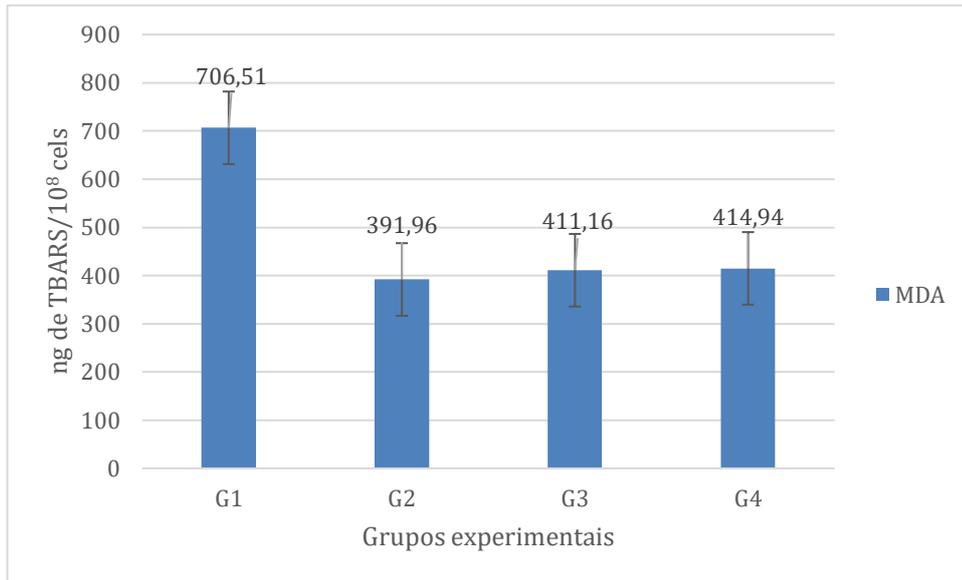


Figura 1: Efeito da incorporação do antioxidante quercetina (média±SD) sobre o grau de peroxidação lipídica dos espermatozoides caprinos submetidos à criopreservação. Estresse oxidativo avaliado indiretamente pela quantificação de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico durante o teste induzido (ng de TBARS/10⁸ cels, de acordo com Nichi et al., 2006).

8. DISCUSSÃO

Nos últimos anos a Quercetina tem sido alvo de diversos estudos em virtude do seu potencial antioxidante. Graças a grande disponibilidade em alimentos, sua utilização é facilitada, possibilitando a observação de todas as suas propriedades em estudos desenvolvidos *in vitro* e *in vivo* (ALRAWAIQ; ABDULLAH, 2014; OZGEN et al., 2016).

Nesse contexto, o emprego da QC como adjuvante do sêmen submetido aos processos de refrigeração ou congelação tem sido amplamente estudado, principalmente, pela função antioxidante dessa substância que pode prevenir o estresse oxidativo espermático durante as diferentes fases do processamento seminal (JOHINKE et al., 2014, BANDAY et al., 2016; SILVA et al., 2016A).

A criopreservação fornece a possibilidade da preservação do sêmen de distintas espécies. Entretanto, durante o processo de congelação são geradas diversas lesões às células espermáticas; dentre esses danos destaca-se o estresse oxidativo causado pela produção excessiva das EROS. Apesar de fundamentais para processos fisiológicos de sinalização celular (O'FLAHERTY, 1999; FORD, 2004), quando em altas concentrações as EROS são responsáveis pela peroxidação dos

lipídeos de membrana plasmática da célula, gerando danos à integridade e cinética dos espermatozoides (AITKEN; FISHER, 1994; SCHOBBER, 2007). Estudos anteriores envolvendo especificamente a criopreservação do sêmen caprino reportaram excessiva formação de EROS e estresse oxidativo durante o processo de congelação espermática dessa espécie, resultados que reforçam a necessidade de utilização de agentes antioxidantes durante o processamento do sêmen de bodes (BUCAK et al., 2009; BUCAK et al., 2010).

Em virtude da constituição enzimática do plasma seminal caprino, diversos protocolos de criopreservação do sêmen dessa espécie preconizam o uso de CE como técnica de eleição para eliminação do excesso de PS (BEZERRA et al., 2010; JIMÉNEZ-RABADÁN et al., 2012). Entretanto, em virtude da força física de rotação imposta aos espermatozoides pode-se assumir que potencialmente a CE pode ser deletéria às células espermáticas das diferentes espécies animais; nesse contexto, estudos anteriores desenvolvidos com bovinos (GLÓRIA et al., 2010), equinos (HOOGEWIJS et al. 2010) e suínos (NOGUCHI et al. 2013) demonstraram lesões estruturais aos espermatozoides submetidos à CE. Durante o processo de centrifugação ocorre a formação de grande quantidade de EROS e, devido a alta quantidade de ácidos graxos polinsaturados presentes na membrana plasmática da célula espermática caprina, ocorre o desencadeamento do processo de peroxidação lipídica (PIZZIMENTI et al., 2013; AITKEN et al., 2014).

Uma alternativa para reduzir o estresse oxidativo gerado durante a remoção do PS seria a adição de um antioxidante previamente à centrifugação. Em estudo com sêmen caprino congelado, Sariözkan et al. (2010) observaram aumento no estresse oxidativo espermático em espermatozoides submetidos à CE.

Devido a necessidade de minimizar os danos oxidativos decorrentes da criopreservação do sêmen caprino, a utilização de um antioxidante se torna imprescindível (NICHI et al., 2007; BUCAK et al., 2008; BUCAK et al., 2009). Dentre as diversas opções, a Quercetina tem sido apontada como um potencial antioxidante para incorporação ao sêmen de diferentes espécies animais, tais como bovinos (CÓRDOBA et al., 2007), equinos (SEIFI-JAMADI et al., 2016; SILVA et al., 2016B), ovinos (SILVA et al., 2012) e coelhos (JOHINKE et al., 2014), resultando em maior preservação da qualidade seminal após técnicas de refrigeração e congelação.

No entanto, de acordo com a metodologia e delineamento experimental empregado nesse estudo, não foi observado efeitos adjuvantes da incorporação da

QC sobre os parâmetros cinéticos de espermatozoides caprinos. Embora Seifi-Jamadi et al. (2017), tenham reportado melhora significativa na criotolerância de espermatozoides caprinos suplementados com 10 μ M/mL de QC, nossos resultados indicaram efeitos adversos desse antioxidante quando adicionado em concentrações similares (G2 e G3), sendo observada queda significativa em importantes parâmetros cinéticos tais como MOT, MP, VAP e RAP quando comparados ao G1 (que não recebeu suplementação com antioxidante).

Também trabalhando com sêmen caprino criopreservado Silva et al. (2016A), observaram maior linearidade e progressividade de movimento de espermatozoides suplementados com doses mais elevadas de QC (75 e 100 μ M/ml) em relação às utilizadas neste estudo. Em nosso trabalho a incorporação de QC não exerceu influência sobre a LIN (P=0,4368) dos grupos tratados.

Já em estudo realizado com sêmen sexado criopreservado de garanhões, Gibb et al. (2013) relataram que a adição da quercetina (0,15mM/ml) promoveu melhora da motilidade total, resultados que divergem dos apresentados neste estudo, onde a MOT dos grupos suplementados com QC não diferiu entre si, sendo, no entanto, inferiores quando comparados com o grupo controle não suplementado.

Assim como Khanduja et al. (2001) observaram, a redução da cinética modulada pela Quercetina, provavelmente, pode ser justificada pela interação desse antioxidante com a enzima Ca₂⁺ ATPase presente na membrana plasmática dos espermatozoides. Essa interação deletéria pode causar distúrbios no equilíbrio da concentração de Cálcio (Ca₂⁺) intracelular, resultando em queda na capacidade de movimento espermático. Segundo esse mesmo estudo, sob a influência de altas concentrações de QC os espermatozoides podem se tornar imóveis devido ao acúmulo do Ca₂⁺ intracelular levando ao bloqueio cinético espermático. Destaca-se que o controle do equilíbrio da concentração de Ca₂⁺ intracelular é fundamental para o correto funcionamento e capacitação das células espermáticas e a Ca₂⁺ ATPase representa importante fator para manutenção dos níveis de Ca₂⁺ em concentrações adequadas para os espermatozoides (BREITBART; RUBINSTEIN, 1983; CÓRDOBA et al., 2001; GHOSHAL et al, 2008).

Segundo a metodologia proposta pudemos observar uma diminuição significativa do percentual de IMP nos grupos com a implementação da QC. Nesse contexto, Seifi-Jamadi et al. (2016) observaram efeitos deletérios da QC sobre o movimento e integridade de membrana dos espermatozoides equinos

criopreservados quando suplementados com doses mais elevadas desse antioxidante (0,2 e 0,3 mM), sugerindo pronunciado efeito dose-dependente; tal efeito também pôde ser observado em nossos resultados uma vez que houve queda mais pronunciada no grupo com maior quantidade de QC (G4) quando comparado com os demais grupos experimentais.

A redução da IMP e o efeito dose-dependente podem estar intimamente relacionados com possível efeito pró-oxidante da QC, já descrito em estudos anteriores (BEHLING et al., 2004; OZGEN et al., 2016). Tal efeito deve-se aos grupos hidroxila (OH) (presentes na molécula dos flavonoides) que possuem potencial de apresentar efeito pró-oxidante significativo graças a interação com o radical superóxido (O_2^-) formando o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e convertendo a Quercetina em *ortho*-quinonas e *ortho*-semiquinonas que produzem efeito deletérios às células espermáticas (METODIEWA et al., 1999; HARWOOD et al., 2007).

Já quando analisamos a peroxidação lipídica nas células espermáticas foi possível observar que a suplementação do sêmen caprino congelado com QC promoveu a redução do estresse oxidativo, onde menores quantidades de MDA ($P>0,05$) foram associados aos grupos experimentais que receberam QC em relação ao controle não tratado. Tais resultados encontram-se de acordo com estudos anteriores que observaram significativa redução na formação de EROS e proteção espermática contra a peroxidação lipídica quando adicionada QC aos diluidores (NASS-ARDEN; BREITBART, 1990; ABDALLAH et al., 2011; SEIFI-JAMADI et al., 2016; SEIFI-JAMADI et al., 2017).

9. CONCLUSÃO

Mesmo empregando doses preconizadas pela literatura foram observados efeitos adversos da Quercetina à cinética e integridade de espermatozoides caprinos submetidos à criopreservação. Não foram observadas interações entre a qualidade do sêmen pós-descongelação com os diferentes momentos (pré ou pós centrifugação) em que o antioxidante foi incorporado sendo, no entanto, observado efeito paradoxal dose dependente. Apesar da proteção contra o estresse oxidativo, os efeitos deletérios sobrepujaram os efeitos benéficos. Dessa forma, conclui-se que nas

concentrações utilizadas a Quercetina apresenta toxicidade para o sêmen caprino.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDALLAH, F. B.; ZRIBI, N.; AMMAR-KESKES, L. **Antioxidative potential of Quercetin against hydrogen peroxide induced oxidative stress in spermatozoa in vitro.** *Andrologia*, v. 43, n. 4, p. 261-265, 2011.

AFANAS'EV, I. B.; DCROZHKO, A. I.; BRODSKII, A. V.; KOSTYUK, V. A.; POTAPOVITCH, A. I. **Chelating and free radical scavenging mechanisms of inhibitory action of rufin and quercetin in lipid peroxidation.** *Biochemical Pharmacology*, v. 38, n. 11, p. 1763-1769, 1989.

AITKEN, J.; FISHER, H. **Reactive oxygen species generation and human spermatozoa: the balance of benefit and risk.** *Bioessays*, v. 16, n. 4, p. 259-267, 1994.

AITKEN, R. J.; CLARKSON, J. S. **Significance of reactive oxygen species and antioxidants in defining the efficacy of sperm preparation techniques.** *Journal of andrology*, v. 9, n. 6, p. 367-376, 1988.

AITKEN, R. J.; SMITH, T. B.; JOBLING, M. S.; BAKER, M. A.; DE LULIIS, G. N. **Oxidative stress and male reproductive health.** *Asian journal of andrology*, v. 16, n. 1, p. 31, 2014.

ALRAWAIQ, N. S.; ABDULLAH, A. **A review of flavonoid quercetin: Metabolism, bioactivity and antioxidant properties.** *International Journal of PharmTech Research*. v. 6, n. 3, p. 933-941, Jul-Ago, 2014.

BANDAY, N. M.; LONE, F. A.; RASOOL, F.; RASHID, M.; SHIKARI, A. **Use of antioxidants reduce lipid peroxidation and improve quality of crossbred ram sperm during its cryopreservation.** *Cryobiology*, v. 74, p. 25-30, 2017.

BARREIROS, A. L. B. S.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P. **Oxidative stress: relations between the formation of reactive species and the organism's defense.** *Química Nova*, v. 29, n. 1, p. 113-123, 2006.

BEHLING, E. V.; SENDÃO, M. C.; FRANCESCATO, H. D. C.; ANTUNES, L. M. G.; BIANCHI, M. D. L. P. **Flavonoide quercetina: Aspectos gerais e ações biológicas.** *Alim. Nutr.*, Araraquara, v. 15, n. 3, p. 285-292, 2004.

BEZERRA, F. S. B. **Conservação do sêmen caprino sobre refrigeração ou congelação.** *Acta Veterinaria Basilica*, v. 4, p. 20-25, 2010.

BISPO, C.A.S. **Avaliação "in vitro" do sêmen caprino resfriado a 5°C em função**

de curvas de resfriamento e diluidores. 2005. 61p. Dissertação (Mestrado, Área de Concentração: Reprodução Animal) – Universidade Federal de Viçosa – UFV, Viçosa/ MG, 2005.

BREITBART, H; RUBINSTEIN, S. **Calcium transport by bull spermatozoa plasma membrane.** *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 732, p. 464-468, 1983.

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

BUCAK, M. N.; SARIÖZKAN, S., TUNCER, P. B., SAKIN, F., ATESSAHIN, A., KULAKSIZ, R., CEVIK, M. **The effect of antioxidants on post-thawed Angora goat (*Capra hircus ancyrensis*) sperm parameters, lipid peroxidation and antioxidant activities.** *Small Ruminant Research*, v. 89, n. 1, p. 24-30, 2010.

BUCAK, M. N.; TUNCER, P. B.; SARIÖZKAN, S.; ULUTAS, P. A. **Comparison of the effects of glutamine and an amino acid solution on post-thawed ram sperm parameters, lipid peroxidation and anti-oxidant activities.** *Small Ruminant Research*, v. 81, n. 1, p. 13-17, 2009.

CAO, G.; SOFIC, E.; RONALD, L.; PRIOR, R. L. **Antioxidant and prooxidant behavior of flavonoids: Structure-activity relationships.** *Free Radical Biology & Medicine*, v. 22, n. 5, p. 749–760, 1997.

CASTELO, T. DE 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.

CELEGHINI, E. C. C. **Efeitos da criopreservação do sêmen bovino sobre as membranas plasmática, acrossomal e mitocondrial e estrutura da cromatina dos espermatozoides utilizando sondas fluorescentes.** (Tese de Doutorado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, 186f, 2005.

CÓRDOBA, M.; PINTOS, L. N.; BECONI, M. T. **Heparin and quercetin generate differential metabolic pathways that involve aminotransferases and LDH-X dehydrogenase in cryopreserved bovine spermatozoa.** *Theriogenology*, v. 67, n. 3, p. 648-654, 2007.

CÓRDOBA, M.; PINTOS, L.; BECONI, M. T. **Oxidative metabolism and intracellular calcium variation in capacitated bovine sperm.** In: Proceeding of the VIIth International Congress of Andrology. Medimond Medical Publications, Montreal. 2001. p. 109-114.

CRESPILHO, A.M., NICHII, M.; GUASTI, P. N.; FREITAS-DELL'AQUA, C. P.; SÁ FILHO, M. F.; MAZIERO, R. R.; DELL'AQUA JR, J. A.; PAPA, F. O. **Sperm fertility and viability following 48 h of refrigeration: Evaluation of different extenders for**

the preservation of bull semen in liquid state. *Animal Reproduction Science*, 146, p. 126–133, 2014.

DE WHALLEY, C. V.; RANKIN, S. M.; HOULT, J. R. S.; JESSUP, W.; LEAKE, D. S. **Flavonoids inhibit the oxidative modification of low density lipoproteins by macrophages.** *Biochemical pharmacology*, v. 39, n. 11, p. 1743-1750, 1990.

DECKER, E.A. **Phenolics: prooxidants or antioxidants?** *Nutr. Rev.*, v. 55, p. 396-398, 1997.

FARIAS, J. L. DE S. DE ARAÚJO, M. R. A.; LIMA, A. R.; ALVES, F. S. F.; OLIVEIRA, L. S.; DE SOUZA, H. A. **Análise socioeconômica de produtores familiares de caprinos e ovinos no semiárido cearense, Brasil.** *Archivos de zootecnia*. v. 63, n. 241, p. 13-24, 2014.

FELISBERTO, N. R. DE O.; OLIVEIRA, L. S.; CORDEIRO, A. G. P. C. **Sistemas de produção de caprinos leiteiros.** In: Embrapa Caprinos e Ovinos-Artigo em anais de congresso (ALICE). In: WORKSHOP SOBRE PRODUÇÃO DE CAPRINOS NA REGIÃO DA MATA ATLÂNTICA, 13., 2016, Coronel Pacheco. Anais... Sobral: Embrapa Caprinos e Ovinos; Coronel Pacheco: Embrapa Gado de Leite, 2016. p. 11-35.

FONSECA, J. F. DA; CRUZ, R. D. C.; PINTO, P.; FACO, O. **Inseminação artificial em pequenos ruminantes.** In: Embrapa Caprinos e Ovinos-Artigo em anais de congresso (ALICE). In: WORKSHOP SOBRE CIÊNCIA ANIMAL NA BAHIA, 1., 2010, Ilhéus. Anais... Ilhéus: UESC, 2010. 30 f.

FORD, W. C. L. **Regulation of sperm function by reactive oxygen species.** *Human reproduction update*, v. 10, n. 5, p. 387-399, 2004.

GHOSHAL, S; SENGUPTA, T; DUNDUNG, S. R.; MAJUMDER, G. C.; SEN, P. C. **Characterization of a low-molecular-mass stimulator protein of Mg²⁺-independent Ca²⁺-ATPase: effect on phosphorylation/ dephosphorylation, calcium transport and sperm-cell motility.** *Biosci. Rep.*, v. 28, p. 61-71, 2008.

GIBB, Z.; BUTLER, T.; MORRIS, L.H.A.; MAXWELL, W.M.C.; GRUPEN, C.G. **Quercetin improves the postthaw characteristics of cryopreserved**

GLORIA, A.; CARLUCCIO, A.; WEGHER, L.; ROBBE, D.; BEFACCHIA, G.; CONTRI, A. **Single and double layer centrifugation improve the quality of cryopreserved bovine sperm from poor quality ejaculates.** *Journal of animal science and biotechnology*, v. 7, n. 1, p. 30, 2016.

GRIVEAU, J. F.; LANNOU, D. **Reactive oxygen species and human spermatozoa: physiology and pathology.** *International journal of andrology*, v. 20, n. 2, p. 61-69, 1997.

GUERRA, M.M.P. SILVA, S. V.; BATISTA, A. M., COLETO, Z. F.; SILVA, E. C. B.; MONTEIRO JR, P. L. J.; CARNEIRO, G. F. **Goat reproductive biotechnology in Brazil.** *Small Ruminant Research*, v. 98, n. 1, p. 157-163, 2011.

HARWOOD, M.; DANIELEWSKA-NIKJEL, B.; BORZELLECA, J. F.; FLAMM, G. W.;

WILLIAMS, G. M.; LINES, T. C. **A critical review of the data related to the safety of quercetin and lack of evidence of in vivo toxicity, including lack of genotoxic/carcinogenic properties.** *Food and chemical toxicology*, v. 45, n. 11, p. 2179-2205, 2007.

HOOGEWIJS, M.; RIJSSELAERE, T.; DE VliegHER, S.; VANHAESEBROUCK, E.; DE SCHAUWER, C.; GOVAERE, J.; THYS, M.; HOFLACK, G.; SOOM, A. V.; DE KRUIF, A. **Influence of different centrifugation protocols on equine semen preservation.** *Theriogenology*, v. 74, n. 1, p. 118-126, 2010.

JIMÉNEZ-RABADÁN, P.; MORRELL, J. M.; JOHANNINSSON, RAMÓN, M.; GARCÍA-ÁLVAREZ, O.; MAROTO-MORALES, A.; ÁLVARO-GARCÍA, P. J.; PÉREZ-GUZMÁN, M. D.; FERNÁNDEZ-SANTOS, M. R.; GARDE, J. J.; SOLER, A. J. **Single layer centrifugation (SLC) improves sperm quality of cryopreserved Blanca-Celtibérica buck semen.** *Animal reproduction science*, v. 136, n. 1, p. 47-54, 2012.

JOHINKE, D.; DE GRAAF, S. P.; BATHGATE, R. **Quercetin reduces the in vitro production of H₂O₂ during chilled storage of rabbit spermatozoa.** *Animal reproduction science*, v. 151, n. 3, p. 208-219, 2014.

KADIRVEL, G.; KUMAR, S.; KUMARESAN, A. **Lipid peroxidation, mitochondrial membrane potential and DNA integrity of spermatozoa in relation to intracellular reactive oxygen species in liquid and frozen-thawed buffalo semen.** *Animal reproduction science*, v. 114, n. 1-3, p. 125-134, 2009.

KHANDUJA, K. L.; VERMA, A.; BHARDWAJ, A. **Impairment of human sperm motility and viability by quercetin is independent of lipid peroxidation.** *Andrologia*, v. 33, n. 5, p. 277-281, 2001.

LEBOEUF, B.; RESTALL, B.; SALAMON, S. **Production and storage of goat semen for artificial insemination.** *Animal Reproduction Science*, v. 62, p. 113-141, 2000.

MACHADO, R.; SIMPLÍCIO, A. A.; SANTOS, D. O.; DE ARAÚJO, M. R. A. **Fontes de variação da congelação do sêmen caprino.** In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL SOBRE CAPRINOS E OVINOS DE CORTE. 4, 2009, João Pessoa, Feira Nacional do Agronegócio da Caprino-Ovinocultura de Corte, Embrapa Caprinos e Ovinos, 16-20 de nov., 2009.

METODIEWA, D.; JAISWAL, A. K.; CENAS, N.; DICKANCAITÉ, E.; SEGURA-AGUILAR, J. **Quercetin may act as a cytotoxic prooxidant after its metabolic activation to semiquinone and quinoidal product.** *Free radical biology and medicine*, v. 26, n. 1-2, p. 107-116, 1999.

NASS-ARDEN, L.; BREITBART, H. **Modulation of mammalian sperm motility by quercetin.** *Molecular reproduction and development*, v. 25, n. 4, p. 369-373, 1990.

NICHI, M.; BOLS, P. E. J.; ZÜGE, R. M.; BARNABE, V. H.; GOOVAERTS, I. G. F.; BARNABE, R. C.; CORTADA, C. N. M. **Seasonal variation in semen quality in *Bos indicus* and *Bos taurus* bulls raised under tropical conditions.** *Theriogenology*, v. 66, n. 4, p. 822-828, 2006.

NICHI, M.; GOOVAERTS, I. G. F.; CORTADA, C. N. M.; BARNABE, V. H.; DE CLERCG, J. B. P.; BOLS, P. E. J. **Roles of lipid peroxidation and cytoplasmic droplets on in vitro fertilization capacity of sperm collected from bovine epididymides stored at 4 and 34 C.** *Theriogenology*, v. 67, n. 2, p. 334-340, 2007.

NOGUCHI, M.; YOSHIOKA, K.; HIKONO, H.; IWAGAMI, G.; SUZUKI, C.; KIKUCHI, K. **Centrifugation on Percoll density gradient enhances motility, membrane integrity and in vitro fertilizing ability of frozen-thawed boar sperm.** *Zygote*, v. 23, n. 1, p. 68-75, 2015.

O'FLAHERTY, C. M.; BEORLEGUI, N. B.; BECONI, M. T. **Reactive oxygen species requirements for bovine sperm capacitation and acrosome reaction.** *Theriogenology*, v. 52, n. 2, p. 289-301, 1999.

OZGEN, S.; KILINC, O. K.; SELAMOĞLU, Z. **Antioxidant activity of quercetin: A mechanistic review.** *Turkish Journal of Agriculture-Food Science and Technology*, v. 4, n. 12, p. 1134-1138, 2016.

PIZZIMENTI, S.; CIAMPORCERO, E.; DAGA, M.; PETTAZZONI, P.; ARCARO, A.; CETRANGOLO, G.; MINELLI, R.; DIANZANI, C.; LEPORE, A.; GENTILE, F.; BARRERA, G. **Interaction of aldehydes derived from lipid peroxidation and membrane proteins.** *Frontiers in physiology*, v. 4, p. 242, 2013.

PURDY, P. H. **A review on goat sperm cryopreservation.** *Small Ruminant Research*, v. 63, n. 3, p. 215-225, 2006.

RANAWAT, P.; PATHAK, C. M.; KHANDUJA, K. L. **A new perspective on the quercetin paradox in male reproductive dysfunction.** *Phytotherapy Research*, v. 27, n. 6, p. 802-810, 2013.

RITAR, A. J.; SALAMON, S. **Effects of seminal plasma and of its removal and of egg yolk in the diluent on the survival of fresh and frozen-thawed spermatozoa of the Angora goat.** *Australian journal of biological sciences*, v. 35, n. 3, p. 305-312, 1982.

ROBAK, J.; GRYGLEWSKI, R. J. **Flavonoids are scavengers of superoxide anions.** *Biochemical Pharmacology*, vol. 37, n. 5, p. 837-841, 1998.

SAIJA, A.; SCALESE, M.; LANZA, M.; MARZULLO, D.; BONINA, F.; CASTELLI, F. **Flavonoids as antioxidant agents: importance of their interaction with biomembranes.** *Free Radical Biology and Medicine*, v. 19, n. 4, p. 481-486, 1995.

SANTOS, G. R DE A. MENDONÇA, R. C.; SILVA, M. A.; QUEIROZ, L. O. **Caracterização da caprinocultura na bacia leiteira sergipana.** *Scientia Plena*, v.

10, n. 11, p. 2-11, 2014.

SARIÖZKAN, S.; BUCAK, M. N.; TUNCER, P. B.; TASDEMIR, U.; KINET, H.; ULUTAS, P. A. **Effects of different extenders and centrifugation/washing on postthaw microscopic-oxidative stress parameters and fertilizing ability of Angora buck sperm.** *Theriogenology*, v. 73, n. 3, p. 316-323, 2010.

SCHOBER, D.; AURICH, C.; NOHL, H.; GILLE, L. **Influence of cryopreservation on mitochondrial functions in equine spermatozoa.** *Theriogenology*, v. 68, n. 5, p. 745-754, 2007.

SEIFI-JAMADI, A.; AHMAD, E.; ANSARI, M.; KOHRAM, H. **Antioxidant effect of quercetin in an extender containing DMA or glycerol on freezing capacity of goat semen.** *Cryobiology*, v. 75, p. 15-20, 2017.

SEIFI-JAMADI, A.; KOHRAM, H.; SHAHNEH, A. Z.; ANSARI, M.; MARCÍAS-GARCÍA, B. **Quercetin Ameliorate Motility in Frozen-Thawed Turkmen Stallions Sperm.** *Journal of Equine Veterinary Science*, v. 45, p. 73-77, 2016.
sex-sorted and nonsorted stallion sperm. *Theriogenology*, v. 79, p. 1001-1009, 2013.

SILVA, E. C. B.; ARRUDA, L. C. P.; SILVA, S. V.; SOUZA, H. M.; GUERRA, M. M. P. **High resveratrol or quercetin concentrations reduce the oscillation index of frozen goat semen.** *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 68, n. 5, p. 1237-1243, 2016A.

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, n. 8, p. 1722-1726, 2012.

SILVA, L. F. M. C. **Estudo sobre a redução do estresse oxidativo em sêmen equino a partir da adição de quercetina nos diluentes de refrigeração e congelação.** Dissertação (Mestrado), Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" - UNESP, Botucatu-SP, Abr., 2016B.

SIQUEIRA, A. P. SILVA FILHO, J. M. DA; BRUSCHI, J. H.; PALHARES, M. S.; BORGES, A. M.; BRUSCHI, M. C. M.; PEIXOTO, M. P.; ROSSI, R. **Taxa de concepção de cabras inseminadas com sêmen caprino resfriado a 5°C, por 12 ou 24 horas, em meio diluidor à base de gema de ovo.** *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v. 61, n. 1, p. 66-71, 2009.

THOMPSON, M; WILLIAMS, C. R. **Stability of flavonoid complexes of copper and flavonoids antioxidant activity.** *Analytica Chimica Acta*, v.85, p. 375-381, 1976.

TWIGG, J.; IRVINE, D. S.; HOUSTON, P.; FULTON, N.; MICHAEL, L.; AITKEN, R. J. **Iatrogenic DNA damage induced in human spermatozoa during sperm preparation: protective significance of seminal plasma.** *Molecular human reproduction*, v. 4, n. 5, p. 439-445, 1998.

VIDAL, A. H., BATISTA, A. M.; DA SILVA, E. C. B.; GOMES, W. A.; PELINCA, M. A.; SILVA, S. V.; GERRA, M. M. P. **Soybean lecithin-based extender as an alternative for goat sperm cryopreservation.** *Small ruminant research*, v. 109, n. 1, p. 47-51, 2013.

VIEIRA, M. M. M. FURTADO, F. M. V.; CÂNDIDO, M. J. D.; BARBOSA FILHO, J. A. D.; CAVALCANTE, A. C. R.; MAGALHÃES, J. A.; COSTA, N. DE L. **Aspecto fisiológico e bioclimático de caprinos nas regiões semiáridas.** *Pubvet*, v. 10, p. 356-369, Mai., 2016.

VINSON, J. A.; DABBAGH, Y. A.; SERRY, M. M.; JANG, J. **Plant flavonoids, especially tea flavonols, are powerful antioxidants using an *in vitro* oxidation model for heart disease.** *Journal of agricultural and food chemistry*, v. 43, n. 11, p. 2800-2802, 1995.

Y. Li, **Antioxidants in biology and medicine: essentials, advances and clinical applications**, 2011 *Nova Science Publishers*, pp. 21-30.

ZRIBI, N.; CHAKROUN, N. F.; ABDALLAH, F. B.; ELLEUCH, H.; SELLAMI, A.; GARGOURI, J.; REBAI, T.; FAKHFAKH, F.; KESKES, L. A. **Effect of freezing-thawing process and quercetin on human sperm survival and DNA integrity.** *Cryobiology*, v. 65, n. 3, p. 326-331, 2012.