



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAIBA
CENTRO DE BIOTECNOLOGIA
GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**

LUDMILLA CHRISTINE SILVA DE SALES

**AVALIAÇÃO DA ADIÇÃO DE QUERCETINA (C₁₅H₁₀O₇) NA
CRIOPRESERVAÇÃO DE ESPERMATOZOIDES EPIDIDIMÁRIOS
BOVINOS**

JOÃO PESSOA-PB

2017

LUDMILLA CHRISTINE SILVA DA SALES

**AVALIAÇÃO DA ADIÇÃO DE QUERCETINA (C₁₅H₁₀O₇) NA
CRIOPRESERVAÇÃO DE ESPERMATOZOIDES EPIDIDIMÁRIOS
BOVINOS**

Documento apresentado à disciplina de Trabalho de Conclusão de Curso do Centro de Biotecnologia da Universidade Federal da Paraíba como um dos requisitos para obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia.

Orientadora: Prof^a Dr^a Sildivane
Valcácia Silva

JOÃO PESSOA-PB

2017

Catálogo na publicação
Biblioteca Setorial do CCEN/UEPB
Josélia M.O. Silva – CRB-15/113

S163a Sales, Ludmila Christine Silva.
Avaliação da adição de quercetina ($C_{15}H_{10}O_7$) na
criopreservação de espermatozoides epididimários bovinos /
Ludmila Christine Silva Sales. – João Pessoa, 2017.
53 p. : il. color.

Monografia (Bacharelado em Biotecnologia) – Universidade
Federal da Paraíba.

Orientador(a): Prof^a. Dr^a. Sildivane Valcácia Silva.

1. Bovinos - Sêmen. 2. Flavonoides. 3. Sêmen - Refrigeração.
I. Título.

UEPB/BS-CCEN

CDU 636.2(043.2)

LUDMILLA CHRISTINE SILVA DE SALES

**AVALIAÇÃO DA ADIÇÃO DE QUERCETINA (C₁₅H₁₀O₇) NA
CRIOPRESERVAÇÃO DE ESPERMATOZOIDES EPIDIDIMÁRIOS
BOVINOS**

Aprovado em 29 de Maio de 2017

BANCA EXAMINADORA



Prof^a Dr^a Sildivane Valcácia Silva
(Universidade Federal da Paraíba)
Orientadora



Associação Sem e Consultoria Agropecuária
Allan Gledson Ferreira dos Santos
Médico Veterinário
CRMV 01619 PB

Allan Gledson Ferreira dos Santos
(Médico Veterinário – UFPB)
Examinador externo



Aline Francelina de Queiros
(Médica Veterinária – IFPB)
Examinadora externa

Dedico este trabalho aos meus pais, irmãos, avós, noivo e amigos que me apoiaram e incentivaram a correr atrás dos meus objetivos.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por me dar forças e saúde para conseguir vencer todas as dificuldades.

Agradeço de forma especial ao meu avô Dirson que não mediu esforços em me apoiar e ajudar durante maior parte da graduação, mas que agora está ao lado de Deus.

A minha mãe Roselene e minha avó Margarida pelo amor, carinho, e seus ensinamentos.

Ao meu noivo Lucinaldo por me incentivar e apoiar durante toda a graduação.

A minha orientadora Sildivane Valcácia por toda a sua atenção, dedicação, esforço e ensinamentos que contribuíram para a realização deste trabalho.

Aos professores do Centro de Biotecnologia, Ulrich Vasconcelos, Kristerson Reinaldo, por contribuírem para a realização das análises deste trabalho.

Aos professores Flávia Paulino e Lindomar Pena, por contribuírem para o meu aprendizado e me incentivarem a sempre buscar o melhor.

Aos companheiros de laboratório, Alex Rique, André Tork, Ana Paula, Julyana e os demais estagiários por contribuir para realização das análises.

Aos meus amigos do Centro de Biotecnologia principalmente Arauana Lima, Elizanete Maciel, Palloma Farias, Olivia Alves pela amizade além dos corredores da faculdade, e especialmente aos colegas do Laboratório de Biotecnologia e Reprodução Animal por confiarem em mim e por estarem ao meu lado em todos os momentos.

A UFRPE por contribuir com a Quercetina utilizada nos experimentos.

A Big Carne que concedeu os testículos utilizados para extração dos espermatozoides.

Aos membros da banca, Mestrando Allan Gledson Ferreira dos Santos e Mestranda Aline Francelina de Queiros, pela disponibilidade em participar desse trabalho.

A Universidade Federal da Paraíba e todo o seu corpo docente, pelo ambiente e por proporcionar profissionais qualificados, onde podemos contar com um ensino de ótima qualidade.

Agradeço a todos que não citei aqui mas que em algum momento contribuíram para o meu crescimento pessoal e profissional.

*“Uma mente aberta a novas ideias
nunca retornará ao seu tamanho
anterior”*

(Albert Einstein)

RESUMO

Os espermatozoides são células haploides, composto por acrossoma, cabeça, peça intermediária e flagelo, tem a finalidade de transferir o material genético masculino. São formados dentro dos túbulos seminíferos dos testículos, após o processo de espermatogênese e são liberados gradativamente dos túbulos seminíferos para os túbulos retos onde chegam ao epidídimo, adquirem mobilidade própria e capacidade fecundante. A criopreservação tem como objetivo, suspender o metabolismo espermático com o intuito de manter as suas características por tempo indeterminado, se mantidos em nitrogênio líquido, para depois serem utilizados na inseminação artificial. No entanto, a exposição dos espermatozoides ao frio é um processo prejudicial as células, no qual se torna necessário a adição de crioprotetores, para a manutenção da integridade e funcionalidade da membrana. Uma das injúrias causadas pela criopreservação é peroxidação lipídica, causada pelas ROS. Os espermatozoides são altamente susceptíveis à ação das ROS, pois sua membrana é rica em ácidos graxo poli-insaturados, o que vem influenciado a busca por possíveis antioxidantes que possam ser adicionados aos diluentes de congelação dos espermatozoides. O flavonoide quercetina é conhecido pelo seu alto poder antioxidante e quelação de metais, e há relatos na literatura de efeitos benéficos na criopreservação de sêmen. Considerando estudos anteriores que utilizaram a quercetina na criopreservação esse projeto teve como objetivo avaliar o efeito protetor da quercetina em espermatozoides epididimários submetidos a refrigeração a 5°C. Foram adicionados a concentração de 0, 10µM, 15µM e 25µM de quercetina em espermatozoides diluídos em Tris-gema e foram avaliados nos tempos de 0h, 24h e 48h pós-refrigeração. Os resultados observados nesse trabalho mostraram que a adição de quercetina não apresentou diferença significativa ($p < 0,05$) nos grupos com 0, 10µM e 15µM, mas a concentração de 25µM diminuiu de forma gradual a motilidade e vigor dos espermatozoides com o passar do tempo de refrigeração. Já em relação a integridade e funcionalidade membrana, não houve diferença significativa ($p < 0,05$) entre os grupos com e sem adição da quercetina. Assim, pode-se concluir que a adição da quercetina à célula espermática não apresenta efeitos sobre a integridade e funcionalidade da membrana plasmática e altas concentrações deste flavonoide reduz a motilidade e vigor de espermatozoides bovinos epididimários submetidos à refrigeração. Ainda, estudos sobre possíveis solventes para a quercetina e seu efeito tóxico sobre a célula espermática devem ser realizados.

PALAVRAS-CHAVE: Flavonoides, refrigeração, sêmen.

ABSTRACT

The sperm are haploid cells, composed of acrosome, head, intermediate piece and scourage, has the purpose of transferring genetic material. Are formed within the seminiferous tubules of the testicles, after the process of spermatogenesis and are released gradually of the seminiferous tubules to the straight tubules where they reach the epididymis, acquire fecundating capacity and mobility. The cryopreservation aims, suspend the sperm metabolism in order to maintain their characteristics for an indefinite period, if kept in liquid nitrogen for later use in artificial insemination. However, sperm exposure to cold is a harmful process cells, in which it is necessary to add cryoprotectants, to maintain the integrity and functionality of the membrane. One of the injuries caused by cryopreservation is lipid peroxidation caused by ROS. The sperm are highly susceptible to the action of the ROS because its membrane is rich in polyunsaturated fatty acids, which influenced the quest for possible antioxidants that can be added to solvents of freezing sperm. The flavonoid quercetin is known by your high antioxidant power and chelation of metals, and there are reports in the literature of beneficial effects on semen cryopreservation. Whereas previous studies that used the quercetin in cryopreservation this project aimed to evaluate the protective effect of quercetin on sperm epididimários subjected to 5°C cooling. Added the concentration of 0, 10 µM, 15 µM and 25 µM quercetin on sperm diluted in Tris-gem and were assessed at the time of 0h, 24h and 48h post cooling. The results observed in this work have shown that the addition of quercetin showed no significant difference ($p < 0.05$) in groups with 0, 10 µM, 15 µM, but the concentration of 25 µM decreased gradually motility and force the sperm over time. Already in relation to membrane integrity and functionality, there was no significant difference ($p < 0.05$) between the groups with and without quercetin. Thus, we can conclude that the addition of quercetin to sperm cell does not have effects on the integrity and functionality of the plasma membrane and high concentrations of this flavonoid reduces motility and vigor of sperm epididimários bovine animals submitted to refrigeration. Still, studies on potential solvents for quercetin and your toxic effect on the sperm cell must be performed.

KEYWORDS: Flavonoids, cooled, semen.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Estrutura do espermatozoide	5
Figura 2	Estrutura básica dos flavonoides.....	16
Figura 3	Estruturas químicas de alguns flavonoides	17
Figura 4	Estrutura molecular da quercetina.....	19
Figura 5	Separação do complexo testículo-epidídimo.....	23
Figura 6	Extração dos espermatozoides por técnica de flutuação	24
Figura 7	Delineamento experimental dos grupos e a adição de quercetina	25
Figura 8	Avaliação da integridade de membrana plasmática	27

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Composição do diluidor TRIS-gema	22
Tabela 2 Preparo da quercetina.....	22
Tabela 3 Motilidade subjetiva média de espermatozoides epididimários refrigerados a 5 °C por 48 horas, com a adição ou não de quercetina.....	28
Tabela 4 Vigor médio de espermatozoides epididimários refrigerados a 5 °C por 48 horas, com a adição ou não de quercetina	29
Tabela 5 Integridade de membrana plasmática de espermatozoides epididimários refrigerados a 5 °C por 48 horas, com a adição ou não de quercetina	29
Tabela 6 Funcionalidade de membrana plasmática de espermatozoides epididimários refrigerados a 5 °C por 48 horas, com a adição ou não de quercetina.....	30

ABREVIATURAS E SIGLAS

ATP	Adenosina trifosfato
AMP cíclico	Monofosfato cíclico de adenosina
CAT	Catalase
DNA	Ácido desoxirribonucleico
FSH	Hormônio folículo estimulante
GPx	Glutaciona peroxidase
GR	Glutaciona redutase
GSH	Glutaciona
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
LH	Hormônio luteinizante
MDA	Malonaldeído
MP	Membrana plasmática
NaOH	Hidróxido de Sódio
pH	Potencial hidrogeniônico
PKA	Proteína quinase A
Prx	Peroxiredoxinas
ROS	Espécies reativas de oxigênio
SOD	Superóxido dismutase

LISTA DE SÍMBOLOS

Ca²⁺	Cálcio
°C	Graus Celsius
%	Porcentagem
<	Menor que
±	Mais ou menos
10⁶	Milhões
sptz/mL	Espermatozoides por mililitros
h	Hora
min	Minutos
mg/dia	Miligramas por dia
mL	Mililitros
mOsmol/Kg	Miliosmoles por quilo
g	Gramas
μL	Microlitro
μM	Micromolar
μg/mL	Microgramas por mililitros
M	Molar
RPM	Número de rotações por minuto
H⁺	Próton ou próton de hidrogênio
H₂O₂	Peróxido de hidrogênio
O₂⁻	Radical livre superóxido
OH⁻	Radical hidroxila

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	1
2 APARELHO REPRODUTOR E CÉLULA ESPERMÁTICA.....	3
2.1 CAPACITAÇÃO E REAÇÃO ACROSSÔMICA	6
3 CRIOPRESERVAÇÃO	7
4 DILUIDORES E CRIOPROTETORES.....	10
4.1 CRIOPROTETORES PENETRANTES.....	11
4.2 CRIOPROTETORES NÃO-PENETRANTES	11
5 ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO (ROS) E ANTIOXIDANTES ..	13
6 FLAVONOIDES	16
7 QUERCETINA.....	19
7.1 EFEITOS BENÉFICOS DA QUERCETINA	20
8 OBJETIVOS.....	21
8.1 OBJETIVO GERAL	21
8.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	21
9 MATERIAL E MÉTODOS.....	22
9.1 PREPARAÇÃO DO DILUENTE TRIS-GEMA	22
9.2 PREPARO DA QUERCETINA.....	22
9.3 COLETA DE TESTÍCULOS BOVINOS E EXTRAÇÃO DOS ESPERMATOZOIDES	22
9.4 MONTAGEM DOS GRUPOS.....	24
9.5 AVALIAÇÕES ESPERMÁTICAS	25
9.5.1 Avaliação de motilidade	25
9.5.2 Avaliação da concentração espermática	25
9.5.3 Avaliação da morfologia espermática	26
9.5.4 Avaliação de integridade de membrana.....	26
9.5.5 Avaliação de viabilidade bioquímica da membrana	27
9.6 ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	27
10 RESULTADOS.....	28
11 DISCUSSÃO	31
12 CONSIDERAÇÕES FINAIS	34
REFERÊNCIAS.....	35
GLOSSÁRIO.....	41

1 INTRODUÇÃO

Os espermatozoides são células altamente especializadas, com capacidade de fertilizar e transferir o material genético masculino. Sua estrutura é envolvida por uma membrana, e dividida em quatro compartimentos: acrossoma, cabeça, peça intermediária e flagelo, onde cada estrutura possui um papel fundamental para o funcionamento da célula espermática e a fertilização (SILVA, 2016).

A inseminação artificial é uma biotécnica muito utilizada pelos produtores, pois apresenta diversas vantagens, como por exemplo: redução da transmissão de doenças pela monta natural, utilização de sêmen de touros de alto valor genético, melhoramento do rebanho em menor tempo com menor custo e utilização de sêmen de touros que estão impossibilitados de realizarem a monta (SILVA et al., 2013).

Com os avanços na tecnologia de reprodução animal, tem aumentado significativamente a utilização do sêmen criopreservado na inseminação artificial. A criopreservação rompe a barreira tempo-espaço pela manutenção da viabilidade dos espermatozoides, permitindo assim o transporte e o armazenamento do material genético (SILVA; GUERRA, 2012).

No entanto, devido a ação do frio, o processo de criopreservação, seja por refrigeração ou congelamento, é um fenômeno prejudicial as células, resultando na diminuição da viabilidade decorrente da produção excessiva de espécies reativas de oxigênio (ROS), o que conseqüentemente reduz a integridade estrutural e funcional da célula espermática, diminuindo as taxas de concepção após a inseminação artificial (BANDAY et al., 2017).

No plasma seminal, encontramos diversos antioxidantes que são responsáveis pela proteção dos espermatozoides contra as ROS, porém, durante o processo de criopreservação ocorre um desequilíbrio entre a geração de ROS e a atividade antioxidante, o que conseqüentemente, pode prejudicar a viabilidade, motilidade, potencial mitocondrial e elevar os níveis de apoptoses e danos no DNA nuclear e mitocondrial das células (TREVIZAN, 2013).

Devido a conhecida ação prejudicial das ROS aos espermatozoides, vários estudos estão sendo feitos para identificar antioxidantes que possam ser

adicionados aos diluentes de congelação dos espermatozoides (SILVA; GUERRA, 2012). A quercetina (3,5,7,3',4'- pentahidroxi flavona) é um tipo de flavonoide geralmente encontrado nas frutas, chás e vinhos, e é conhecido pelo seu excelente poder antioxidante e capacidade de quelação de metais (TVRDÁ et al., 2016).

Como já se sabe que a criopreservação causa diversas injúrias causadas pelas ROS, e que a quercetina é o flavonoide com maior poder sequestrador de radicais livres, a perspectiva deste trabalho é que a quercetina possa exercer um efeito protetor aos espermatozoides epididimários bovino submetidos ao processo de resfriamento à 5 °C.

2 APARELHO REPRODUTOR E CÉLULA ESPERMÁTICA

O aparelho reprodutor masculino é composto por diversos órgãos que possuem a capacidade de produzir espermatozoides e liberá-los no aparelho reprodutor da fêmea. São compostos por dois testículos, dois epidídimos, dois ductos deferentes, glândulas sexuais acessórias e o pênis. O testículo é o órgão responsável pela produção de espermatozoides e do hormônio sexual masculino, a testosterona e outros hormônios como progesterona, estrógeno e colesterol (MARQUES FILHO, 2006).

Os espermatozoides são células haploides, composto por núcleo, acrossoma e várias mitocôndrias num arranjo helicoidal posicionadas na parte anterior do flagelo. São células de exíguo citoplasma e outras organelas, mas possui vários compartimentos celulares, membranas e outras estruturas subcelulares. Seu DNA é condensado de maneira que impede a expressão de genes, impossibilitando a realização de auto reparo a algum dano sofrido (CANDEIAS, 2010).

Espermatozoides são formados dentro dos túbulos seminíferos dos testículos, como resultado final do processo de espermatogênese, com a divisão e transformação das células-tronco germinativas (CELEGHINI, 2005). Quando completam o desenvolvimento, são estruturas alongadas, formados por duas regiões altamente especializadas: a cabeça e a cauda (ou flagelo), ligados entre si por uma peça de conexão, chamada colo (ARAÚJO, 2010).

A espermatogênese, de maneira geral, é um processo cíclico, onde os gonócitos nos túbulos seminíferos, se multiplicam e diferenciam-se em espermatogônias, na qual sofre meiose e forma os espermatócitos primários e espermátides arredondadas que se diferenciam em espermatozoides (AGUIAR et al., 2006).

Em bovinos, a espermatogênese tem duração média de 60 dias, e é dividida em 3 etapas: 1- Espermatocitogênese: onde ocorre a divisão mitótica de células germinativas para produção de células tronco germinativas e espermatócitos primários; 2- Meiose: duplicação dos cromossomos para recombinação e segregação do material genético; 3- Espermiogênese: onde as espermátides sofrem

alterações na morfologia e se diferenciam em espermatozoides (ARRUDA et al., 2015).

O processo de espermatogênese, depende da atividade funcional das células de Sertoli, dos níveis de esteroides, gonadotrofinas e fatores de crescimento. A multiplicação, meiose e diferenciação das células germinativas está relacionado com as alterações morfológicas e expressão gênica nas células de Sertoli e Leydig, na qual, são reguladas pela secreção das gonadotrofinas hormônio luteinizante (LH) e hormônio folículo estimulante (FSH), que são liberados pela adenohipófise, localizada lateralmente à neurohipófise (AGUIAR et al., 2006).

Os espermatozoides criados a partir da diferenciação das espermatídes não possuem capacidade fecundante, e então, são liberados gradativamente dos túbulos seminíferos para os túbulos retos, e chegam ao epidídimo, local onde adquirem mobilidade própria e capacidade de fecundação como resultado do processo de maturação. Os espermatozoides considerados maduros são transportados e armazenados na cauda do epidídimo (ARRUDA et al., 2015).

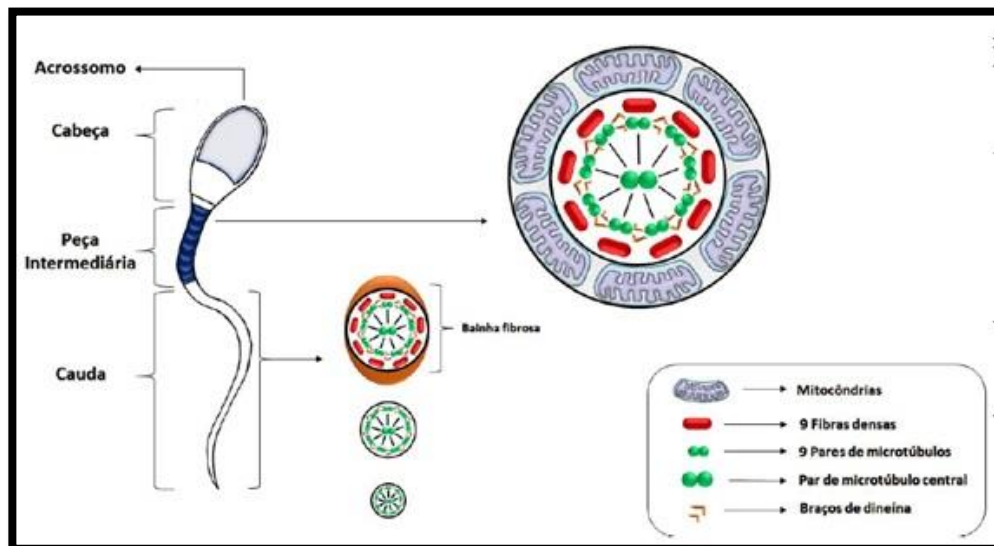
Na cabeça do espermatozoide está contido o DNA (ácido desoxirribonucleico), o acrossoma, e algumas estruturas do citoesqueleto e do citoplasma (CELEGHINI, 2005). O acrossoma é uma vesícula de dupla camada, que armazena em seu interior enzimas hidrolíticas, como a acrosina e a hialuronidase, que são fundamentais para a penetração do espermatozoide no oócito (PENITENTE FILHO, 2010).

Segundo Araújo (2010), o colo se localiza dentro de uma depressão na área posterior da cabeça, ligando-a a peça intermediária. A cauda do espermatozoide é a unidade responsável pelo movimento da célula, na qual é dividida em peça intermediária principal e peça terminal (SILVA, 2016).

De acordo com Silva (2016), a porção principal possui uma bainha fibrosa que envolve nove fibras densas, nove pares de microtúbulos periféricos conectados por dineínas e um par central de microtúbulos, onde as dineínas utilizam a energia gerada pela hidrólise da adenosina trifosfato (ATP) nas mitocôndrias pela metabolização de substratos de glicose, para deslocar os microtúbulos, assim,

movimentando a cauda. A porção terminal é composta apenas pelos pares de microtúbulos e dineínas. As mitocôndrias estão situadas exclusivamente na peça intermediária (Figura 1).

Figura 1 Estrutura do espermatozoide



Fonte: Adaptado de Silva (2016).

A célula espermática é revestida por uma membrana plasmática (MP), composta por camadas lipídicas e proteicas, onde os lipídeos estão divididos em três classes principais: fosfolipídios, colesterol, glicolipídios, sendo os fosfolipídios encontrados em maiores concentrações (SILVA, 2013). As moléculas de fosfolipídios se agrupam umas às outras e influenciam a fluidez da membrana. A quantidade de colesterol também influencia diretamente a fluidez, pois torna a bicamada menos fluida (ARAÚJO, 2010).

No modelo mosaico fluido, os fosfolipídios estão dispostos de forma que, as regiões não polares das moléculas lipídicas de cada camada interajam entre si na parte interior da bicamada, e as regiões polares, interajam com a fase aquosa na face externa da membrana. A maioria das interações entre os lipídeos e proteínas é não-covalente, permitindo que os componentes possam se mover lateralmente no plano da membrana (PENITENTE FILHO, 2010).

As cadeias de ácidos graxo dos fosfolipídios são altamente poli-insaturadas, com isso, quando são submetidos a redução de temperatura se agrupam de forma cônica, com as extremidades hidrofóbicas externas e as hidrofílicas internas, formando a estrutura micela invertida, na qual deve ser transitória durante a mudança da fase fluida para a cristalina, mas, em certos fosfolipídios esta estrutura permanece (BORGES, 2008). Essas alterações podem afetar a estabilidade da membrana, possibilitando uma permeabilidade excessiva ou ruptura da membrana, na qual resultaria em perda da homeostase com posterior morte celular, afetando negativamente a fertilidade (ARAÚJO, 2010).

Para Silva (2016), a membrana plasmática é a principal responsável pela preservação da homeostase celular e de suas organelas, sendo uma condição crucial para a sobrevivência e manutenção da capacidade fertilizante dos espermatozoides, e a sua integridade funcional essencial para os processos de capacitação, reação acrossômica e adesão ao oócito.

2.1 Capacitação e reação acrossômica

A capacitação espermática é um processo fundamental para que ocorra a fertilização e acontece de forma gradual, durante a passagem dos espermatozoides em diferentes compartimentos do trato genital feminino (PENITENTE FILHO, 2010). O processo de capacitação se inicia através da remoção do colesterol dos espermatozoides pela albumina, resultando em maior fluidez da membrana, principalmente pelo aumento de fosfatidilcolina e pela desestabilização da membrana. Outras alterações também ocorrem: nas glicosaminoglicanas, maior influxo de cálcio, e ativação da adenilatociclase, convertendo ATP (Adenosina trifosfato) em AMP cíclico que ativa a PKA e fosforila a tirosina (BORGES, 2008).

O processo de capacitação termina com um processo de exocitose, denominado de reação acrossomal, na qual, acontece a liberação de enzimas hidrolíticas, com a finalidade de habilitar os espermatozoides para a penetração na zona pelúcida. A reação acrossomal engloba várias fusões da membrana do acrossoma com a membrana espermática, resultando na liberação do conteúdo acrossomal através dos canais de membrana (PENITENTE FILHO, 2010).

3 CRIOPRESERVAÇÃO

A tecnologia de criopreservação de sêmen vem sendo estudada e aprimorada há cerca de 50 anos, com a confirmação de que o uso do glicerol como crioprotetor penetrante permitia o congelamento e armazenamento dos espermatozoides por longos períodos (MELO, 2003). De acordo com Pesch e Hoffmann (2007), a criopreservação de sêmen é uma técnica de grande importância para a reprodução animal, visando a suspensão do metabolismo espermático, mantendo as suas características por longo período quando mantidos em nitrogênio líquido.

A inseminação artificial é uma biotécnica que vem sendo expandida devido as suas diversas vantagens, como por exemplo: redução da transmissão de doenças pela monta natural, utilização do sêmen de reprodutores com valor genético agregado, melhoramento do rebanho em curto tempo e baixo custo e, utilização de sêmen de animais que estão impossibilitados de realizar a monta. Conseqüentemente, as vantagens tornam a relação custo/benefício viável para o produtor (SILVA et al., 2013).

Com o crescente progresso da biotecnologia de reprodução animal, a utilização de sêmen criopreservado na inseminação artificial se sobressai como umas das ferramentas mais importantes para o melhoramento genético de várias espécies animais, sendo mais enfatizado na bovinocultura (SILVA et al., 2013). No entanto, a manipulação dos espermatozoides com a finalidade de preservá-los poderá ocasionar danos a estrutura espermática, resultando em comprometimento da sua função biológica (SILVA; GUERRA, 2011).

A criopreservação é uma biotecnologia complexa que, compreende o balanço de diversos fatores, onde, para garantir o sucesso, além do diluente, da taxa de diluição do sêmen, da taxa de resfriamento e de congelamento corretos, são requeridos também, elevado conhecimento sobre a fisiologia espermática das espécies, para que possa potencializar a recuperação dos espermatozoides pós-descongelamento, garantindo assim a fertilidade (PENITENTE FILHO, 2010).

No processo de criopreservação os espermatozoides são submetidos a diversos tratamentos, começando pela colheita do sêmen, e em sequência é feito a

primeira diluição para a avaliação da viabilidade, posteriormente, centrifugação, diluição com diluente para congelamento, refrigeração, congelamento e enfim, descongelamento, o que pode acarretar em diminuições na taxa de fertilidade dos reprodutores quando comparado ao sêmen fresco (CANDEIAS, 2010).

A temperatura utilizada no processo de criopreservação é denominada “Temperatura Criogênica”, na qual, é extremamente baixa, onde os gases se encontram liquefeitos a pressão atmosférica. Essa temperatura é alcançada através do nitrogênio líquido (-196 °C) ou em sua fase de vapor. Nesta temperatura, todas as reações químicas, processos biológicos, e as atividades intra e extracelulares ficam suspensas, e como resultado, na teoria, a célula ou o tecido podem ser mantidos criopreservados indefinidamente (CASTRO et al., 2011).

O sucesso da criopreservação de sêmen depende diretamente da redução das crioinjúrias causadas aos espermatozoides, para manutenção da sua morfologia e capacidade fertilizante. Com o choque frio, ocorre alterações na estrutura da membrana, devido ao rearranjo dos fosfolipídios mudando de estado líquido para gel, aumentando a permeabilidade da célula. A sensibilidade ao choque frio é resultante da composição de fosfolipídios e relação colesterol/fosfolipídios da membrana, sendo mais susceptíveis as espécies com menor concentração (SILVA et al., 2013).

O sêmen bovino é mais suscetível as crioinjúrias causadas pelo choque frio nas temperaturas entre 15°C e 5°C (SILVA et al., 2013). De acordo com Brandão et al. (2006), o processo de criopreservação também pode causar estresse físico e químico alterando a membrana dos espermatozoides, a diminuição irreversivelmente da motilidade espermática, o aumento da degeneração do DNA e a liberação intracelular de enzimas lipídeos e proteínas.

Segundo Melo (2003), a formação de cristais de gelo durante a criopreservação ocorre no espaço extracelular, gerando um gradiente osmótico entre a solução intracelular a princípio isotônica e a solução extracelular congelada que se encontra concentrada. Influenciada pela velocidade de refrigeração, a água se move através da membrana e se une a solução congelada extracelular e congela, formando assim cristais de gelo no interior da célula, tornando os espermatozoides

inviáveis pós-descongelamento, pois, a formação de cristais de gelo pode resultar em lise celular ou tornar a célula osmoticamente inativa.

Com o intuito de reduzir as crioinjúrias causadas pelo choque frio, são utilizados crioprotetores no processo de congelamento, que tem como função evitar a formação de cristais de gelo intracelular, reduzir o estresse osmótico pela reposição de água para manutenção do volume celular, interagir com íons e macromoléculas, reduzir o ponto de congelamento da água, e também servir como tampão para manutenção de possíveis alterações do pH. Os crioprotetores devem oferecer temporariamente: energia, proteção aos danos causados pelo frio e manutenção de um ambiente favorável a sobrevivência da célula armazenada (SILVA; GUERRA, 2011).

Espermatozoides quando expostos a ação do frio, seja por refrigeração ou congelamento, estão sujeitos a uma situação estressante que conseqüentemente, estimula a formação de espécies reativas de oxigênio (ROS), onde, a produção desequilibrada dessas ROS pode resultar em: peroxidação dos lipídeos insaturados da membrana, diminuição da motilidade espermática, estimulação da capacitação espermática e danos no DNA, o que tem influenciado as buscas pelo aperfeiçoamento da biotécnica de criopreservação com terapias antioxidantes (CANDEIAS, 2010).

4 DILUIDORES E CRIOPROTETORES

O sêmen ejaculado possui mais espermatozoides que o necessário para a fecundação, já o sêmen diluído pode ser utilizado em várias inseminações, considerando o número mínimo de espermatozoides móveis como parâmetro para determinar o número de doses inseminantes do ejaculado. A alta concentração espermática pode ser prejudicial a célula por resultar em intensa atividade metabólica e acúmulo de metabolitos no plasma seminal (SANTOS, 2013).

O sêmen puro não pode ser congelado, pois causaria danos a maioria dos espermatozoides, necessitando da adição de soluções que mantenham a viabilidade das células espermáticas durante a refrigeração. Essa solução deve conter substâncias para diluir e nutrir as células, e substâncias crioprotetoras para protegê-las contra o choque térmico (SALMITO-VANDERLEY et al., 2012).

Os diluentes de congelação de sêmen possuem várias substâncias químicas diferentes entre si, como: açúcares, substâncias tampões, antibióticos, que tem como finalidade manter os espermatozoides viáveis até o momento da fertilização (SILVA et al., 2013). Para o diluidor ser considerado adequado deve aumentar o volume do sêmen, assim consequentemente aumentar as doses inseminantes; ter isotonicidade, com o intuito de impedir a prévia ativação de motilidade espermática, assim reservando a energia necessária a fertilização; ter estabilidade para não ocorrer alterações das características físico-químicas; possuir condutividade térmica elevada permitindo a rápida transferência de temperatura; ser estéril para não levar microrganismos nocivos às células espermáticas e oferecer nutrientes como fontes de energia (SALMITO-VANDERLEY et al., 2012).

O processo de criopreservação de sêmen de mamíferos é muito complexo, e para que seja bem sucedido, é necessário que o diluente, a taxa de diluição do esperma, e taxa de resfriamento e congelamento sejam corretos, para maximizar a recuperação pós-descongelamento dos espermatozoides e assim garantir a fertilidade (PENITENTE FILHO, 2010).

Na criopreservação, o sêmen deve ser refrigerado da temperatura corpórea à temperatura ambiente (37 °C à 20 °C), o que não causa injúrias se os

espermatozoides estiverem diluídos em meio adequado. O estresse começa quando os espermatozoides saem da temperatura corporal para 5 °C, pois, fase de transição da membrana plasmática passa do estado líquido cristalino, para o estado de gel. Uma solução para reduzir os danos, é controlar a taxa de resfriamento entre as temperaturas de 19 °C a 8 °C com a adição de lipídios (gema de ovo) ou lipoproteína (leite) ao diluente, além do uso de curvas de refrigeração lentas (- 0,05 °C/min) (MELO, 2003).

Os crioprotetores utilizados no congelamento tem a função de evitar que se forme cristais grande de gelo intracelular, a redução do estresse osmótico devido a reposição de água necessária para manutenção do volume celular, interação com íons e macromoléculas para reduzir o ponto de congelação da água e servir como tampão, para controlar possíveis alterações do potencial de hidrogênio (pH) (SILVA; GUERRA, 2011).

Atualmente, os crioprotetores mais utilizados são as macromoléculas, como a caseína do leite, as proteínas da gema do ovo e o glicerol. Podem ser classificados como crioprotetores penetrantes e crioprotetores não-penetrantes (SANTOS, 2013).

4.1 Crioprotetores penetrantes

Os crioprotetores penetrantes são moléculas que atuam na face interna e externa do espermatozoide, desidratando a célula espermática, devido ao efluxo de água intracelular para equilibrar o meio celular. Esses solutos penetram na membrana por meio de difusão passiva e permanecem na membrana e no citoplasma, e atuam na desidratação celular por meio do seu efeito osmótico que gera um meio hipertônico, induzindo a saída de água das células espermáticas (SILVA; GUERRA, 2011).

Os crioprotetores intracelulares são classificados em dois grupos: alcoólicos e amidas, nos quais, os alcoólicos mais utilizados são: o glicerol, etilenoglicol e o DMSO (Dimetil sufóxido), e entre as amidas se destacam: a acetamida, lactamida, dimetilformamida e a dimetilacetamida (SILVA; GUERRA, 2011).

4.2 Crioprotetores não-penetrantes

De acordo com Gonzales (2004), os crioprotetores não-penetrantes aumentam a osmolaridade do meio extracelular, resultando na passagem de água do interior da célula espermática para o meio extracelular, o que conseqüentemente protege contra a formação de cristais de gelo no interior da célula durante a congelação.

Os crioprotetores não-penetrantes, atuam recobrando a superfície celular, estabilizando a membrana, e repondo os fosfolipídios perdidos durante o choque térmico. Os mais utilizados na criopreservação de sêmen são: a gema de ovo de galinha e o leite desnatado, pois, a fosfatidilcolina (lecitina) e lipoproteínas da gema, e a caseína do leite possuem características protetoras. Já a combinação de um crioprotetor penetrante com um não-penetrante oferece uma proteção maior as células durante o processo de criopreservação (SALMITO-VANDERLEY et al., 2012).

Como fonte de energia para os espermatozoides são adicionados os açúcares glicose e frutose, para garantir a manutenção celular e o movimento espermático pós-descongelação. Também são adicionados aditivos, como antibióticos, para o controle do crescimento microbiano no sêmen, antioxidantes, para a proteção contra o estresse oxidativo, enzimas e detergentes (SILVA et al., 2013)

5 ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO (ROS) E ANTIOXIDANTES

Os radicais livres são compostos que apresentam um número ímpar de elétrons, sendo estes, altamente energéticos e instáveis, por consequência da ação direta de uma fonte de luz (externa), o próprio metabolismo, reações catalisadas por metais, como ferro e cobre; enzimas e o contato com o oxigênio, fazendo com que essa energia ao atingir um átomo resulte na perda de um elétron, deixando esta molécula instável. No entanto, para se tornar estável novamente, essa molécula precisa liberar essa energia acumulada, aumentando assim, a concentração de radicais livres no meio (SILVA et al., 2013).

A denominação “Espécies Reativas de Oxigênio (ROS)” corresponde aos radicais livres ou espécies de oxigênio ativas, onde os mais produzidos pelos espermatozoides são: o radical livre superóxido (O_2^-), radical hidroxila (OH^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (não radical, mas sim, metabólito de oxigênio altamente deletério), e oxigênio singlete, os quais podem causar danos oxidativos nas membranas lipídicas, proteínas transmembranas e carboidratos, resultando em danos nos ácidos nucleicos e despolimerização dos ácidos hialurônicos (BORGES, 2008).

Devido a membrana dos espermatozoides ser rica em ácidos graxos poli-insaturados, estas células são altamente susceptíveis a ação das ROS. Outros fatores que aumentam a susceptibilidade são a restrita localização de enzimas antioxidantes no citoplasma, além da capacidade de produzir ROS pela atividade mitocondrial situada na peça intermediária (TREVIZAN, 2013).

No plasma seminal estão presentes antioxidantes intra e extracelulares, que são divididos em antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos, responsáveis pela defesa dos espermatozoides contra os danos causados pelos radicais livres. No entanto, durante a maturação dos espermatozoides há uma perda de grande parte do seu citoplasma, e como consequência, são privados de grande parte dos seus antioxidantes endógenos, que os torna vulneráveis a ação das ROS, dependendo exclusivamente dos antioxidantes presentes no plasma seminal (SILVA; GUERRA, 2012).

De acordo com Silva et al. (2013), os antioxidantes retardam a velocidade de oxidação inibindo a produção ou os danos dos radicais livres. O sistema de defesa enzimático é composto pelas enzimas: superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), peroxiredoxinas (Prx), glutathione (GSH), glutathione redutase (GR) e glutathione peroxidase (GPx), já o sistema não enzimático é constituído por compostos de baixo peso molecular, que integra o ácido ascórbico (Vitamina C), tocoferol (Vitamina E), diferentes compostos de selênio, ubiquinonas (coenzima Q), ácido úrico e ácido lipoico.

Segundo Trevizan (2013), as altas concentrações de ROS são prejudiciais para os espermatozoides, no entanto, as baixas concentrações são fundamentais para que ocorram os processos fisiológicos como, a reação acrossomal, capacitação e interação espermatozoide-oócito. A peroxidação lipídica, definida como processo de degradação autocatalítica da membrana plasmática dos espermatozoides, é o dano mais comum causado pelas ROS. Neste processo, a geração de peróxidos lipídicos reduzem a fluidez da membrana plasmática e favorece a decomposição de aldeídos citotóxicos, como o malonaldeído (MDA), que é o produto final da peroxidação lipídica, onde talvez, resulte em redução da motilidade e viabilidade espermática, na qual é causada pelo aumento da permeabilidade da membrana plasmática, resultando em perda de íons responsáveis pela regulação do movimento espermático ou pela depleção de ATP.

Durante o processo de criopreservação, devido a necessidade de diluição do sêmen, a concentração de antioxidantes diminui, gerando um desequilíbrio entre oxidantes e antioxidantes, resultando em estresse oxidativo. Na tentativa de solucionar este desequilíbrio, passou a ser estudada a adição de antioxidantes aos diluidores de preparação, manutenção e criopreservação de diversas espécies (SILVA; GUERRA, 2011).

Há relatos na literatura de que supostamente, a adição de substâncias antioxidantes exógenas no meio diluidor melhora a motilidade e viabilidade do espermatozoide bovino, equino, ovino e também, a capacidade fertilizante (*in vitro*) do espermatozoide ovino (MAIA; BICUDO, 2009). Geram também, resultados favoráveis na redução do malonaldeído (MDA) resultante da peroxidação lipídica,

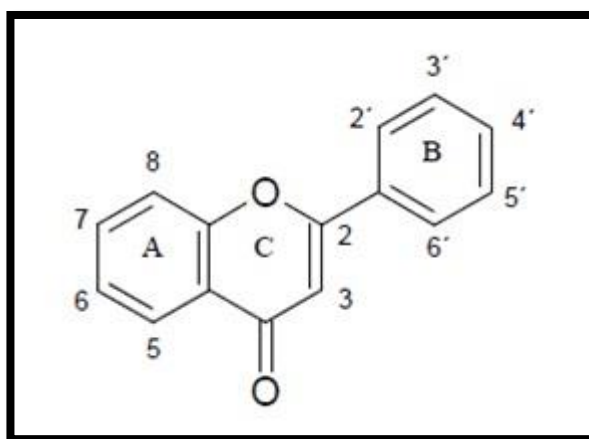
assim, gerando menos danos espermáticos e melhorando a conservação desses gametas durante a criopreservação (SILVA; GUERRA, 2012).

Conforme Guerra (2012), devido à ação negativa das ROS sobre os espermatozoides, torna-se necessário estudos sobre os antioxidantes que possam ser utilizados no processo de criopreservação com o intuito de equilibrar a reação antioxidantes-oxidantes.

6 FLAVONOIDES

De acordo com Behling et al. (2004), os flavonoides são uma classe de compostos fenólicos que são caracterizados pela sua estrutura básica, que apresenta um esqueleto de difenil propano ($C_6C_3C_6$) e dois anéis benzênicos A e B, ligados a um anel pirano (C) (Figura 2). Flavonoides possuem atividades biológicas diversas, devido as alterações que ocorrem em sua estrutura, geralmente por modificações do núcleo, principalmente a saturação do anel pirônico, por número e posição do fenol, e grau de metilação e glicosilação, o que afeta principalmente sua hidrofobicidade (DOVICHI, 2002).

Figura 2 Estrutura básica dos flavonoides

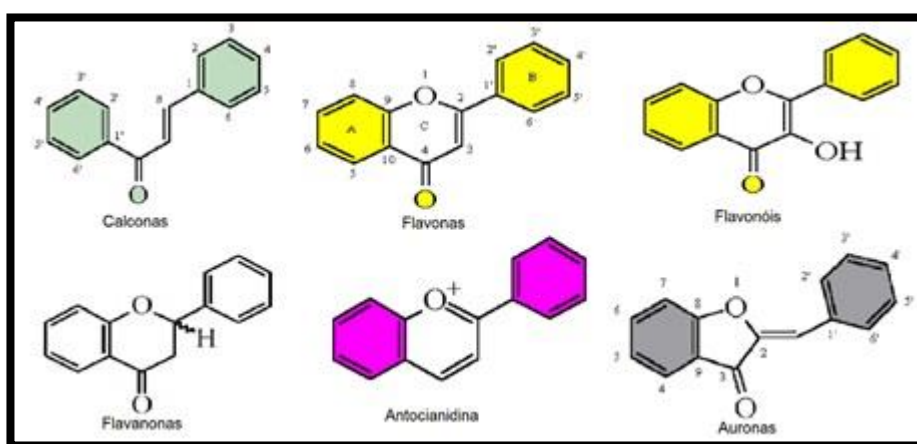


Fonte: Adaptado de Behling et al. (2004).

Flavonoides são metabólitos secundários gerados pelas plantas, e são sintetizados pela reação de derivados da fenilalanina (via metabólica do ácido chiquímico) e do ácido acético (NEVES, 2016). Segundo Winkel-Shirley (2001), a fenilalanina é convertida em ácido cinâmico, pela enzima fenilalanina amônio liase, que é responsável por ligar os metabolismos primário (via do ácido chiquímico) com o secundário (fenilpropanoides). O ácido cinâmico é então hidrolisado á ácido cumárico (C9) que é convertido em 4-cumaroil-CoA e condensado em 3 unidades de malonil-CoA (C2) formando assim uma chalcona (C15), da qual, todos os flavonoides são formados.

Os flavonoides são subdivididos em 12 subclasses, que possuem mais 5000 compostos conhecidos até 1990. Suas subclasses são: as Calconas, Dihidrocalconas, Auronas, Flavonas (apegenina, luteolina, diosmetina), Flavonóis (quercetina, miracetina, kaempferol), Dihidroflavonol, Flavanonas (naringina, hesperidina), Flavanol, Flavandioli, Antocianidina, Isoflavonoides (genisteína, daizideína), Bioflavonoides e Proantocianina (Figura 3) (BEHLING et al., 2004).

Figura 3 Estruturas químicas de alguns flavonoides



Fonte: Adaptado de Martinez (2005).

As principais fontes de flavonoides são as frutas, vegetais, grãos, flores, chá e vinho. São encontrados nas plantas (com exceção da catequina) principalmente em sua forma glicosilada, ligados a moléculas de açúcar, normalmente o-glicosídeos com a molécula de açúcar ligada na posição C3 ou C7 do grupo hidroxila. As moléculas desprovidas de açúcar são intituladas agliconas (NEVES, 2016).

Segundo Jamalán (2016), os flavonoides são conhecidos por possuírem características antioxidantes, por sequestrar os radicais livres e quelantes de metais, o que os torna excelentes compostos com capacidade de neutralizar os efeitos adversos das ROS e dos metais sobre a qualidade do sêmen. A característica antioxidante é direcionada principalmente para o radical hidroxil (OH) e ânion

superóxido (O_2^-), que são radicais extremamente reativos e estão envolvidos no início da peroxidação lipídica (BEHLING et al., 2004).

Behling et al. (2004) relatam que diversos mecanismos antioxidantes estão sendo propostos para os flavonoides:

“a) Opressão da formação de espécies reativas do oxigênio pela inibição do sistema enzimático responsável pela geração de radicais livres (ciclooxigenase, lipoxigenase ou xantina oxidase); b) quelatação de íons metálicos que podem iniciar a produção de radicais hidroxil pela Reação de Fenton ou Harber-Weis; c) sequestro de radicais livres; d) regulação positiva ou proteção das defesas antioxidantes por induzir a fase II de enzimas como glutathione transferase que aumenta a excreção de espécies oxidadas ou e) indução de enzimas antioxidantes como a metalotioneína que é uma proteína queladora de metais, com propriedades antioxidantes.”

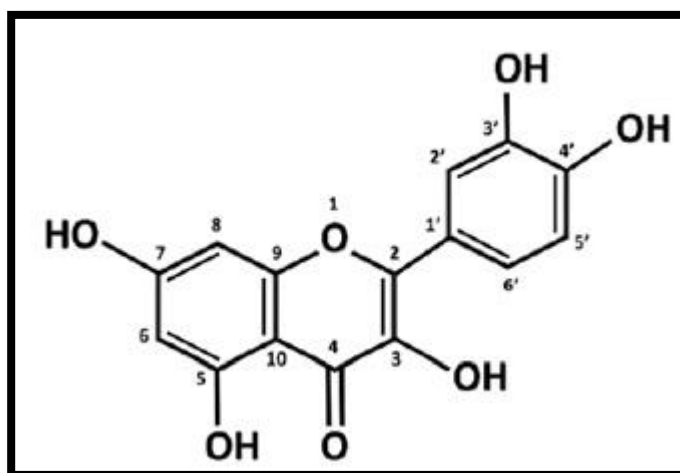
O flavonol quercetina (3,5,7,3',4'- pentahidroxiflavona) é o flavonoide que possui maior capacidade antioxidante, e o mais consumido na dieta humana, cerca de 4 a 68mg/dia, de acordo com estudos epidemiológicos realizados nos EUA, Europa e Ásia, onde a população Japonesa obteve o maior índice de consumo devido à alta ingestão do chá verde. O resultado desses estudos indicaram que alto consumo de alimentos ricos em flavonóis e flavonas podem minimizar o risco de doenças cardiovasculares (DOVICH, 2002).

7 QUERCETINA

A quercetina (3,5,7,3',4'- pentahidroxi flavona) é um flavonol da classe dos flavonoides, presentes principalmente em frutas, chás e vinhos. É o flavonoide com maior potencial sequestrador de oxigênio reativo e espécies de nitrogênio, e é reconhecida por conter características anticancerígenas, anti-inflamatórias, anti-agregatórias e propriedades vasodilatadoras (TVRDÁ et al., 2016).

A estrutura molecular da quercetina possui 05 grupamentos OH (Figura 4), assim, possibilita a doação de até 05 elétrons e H⁺ as ROS, resultando na estabilização desses radicais (SILVA, 2016).

Figura 4 Estrutura molecular da quercetina



Fonte: Adaptado de Silva (2016).

Segundo Behling et al. (2004), a quercetina possui característica antioxidante devido a sua capacidade de sequestrar os radicais de oxigênio, como o radical hidroxil e o ânion superóxido, que estão envolvidos na iniciação da peroxidação lipídica. Também possui propriedade quelante e estabilizadora de ferro.

Silva (2016) afirma que, a quercetina pode exercer sua função antioxidante através de 03 mecanismos: “reagindo com os radicais O₂⁻ e OH⁻, agindo como quelante de íons metálicos e interrompendo a continuidade da peroxidação lipídica”.

Devido a ótica capacidade antioxidante já reconhecida da quercetina, foi gerado a hipótese de que ela exerça um efeito protetor aos espermatozoides criopreservados, reduzindo o estresse oxidativo e assim evitando a peroxidação lipídica.

7.1 Efeitos benéficos da quercetina

Segundo Behling et al. (2004), a quercetina tem diversos benefícios para a saúde. No câncer, a quercetina quando combinada com o flavonoide genisteína, ofereceu ação sinérgica contra células do carcinoma ovariano, regulando o ciclo celular, interagindo com os locais de ligação do estrogênio tipo II, diminuindo a resistência às drogas e induzindo a apoptose de células tumorais.

No sistema cardiovascular, a quercetina com sua capacidade antioxidante pode evitar a oxidação do LDL, impedindo a formação da placa arteriosclerótica, e também impedir a acumulação excessiva de plaquetas evitando danos aos vasos sanguíneos e coagulação do sangue (MARTINEZ, 2005).

Na função renal, a quercetina possui funções imunossupressoras e nefroprotetoras, onde estudos com ratos resultaram na preservação da integridade histológica renal e diminuição do dano tubular e da inflamação intersticial. Já na função hepática, a quercetina pode melhorar a capacidade antioxidativa hepática, assim, pode proteger o fígado contra falência induzida por isquemia-reperfusão (BEHLING et al., 2004).

8 OBJETIVOS

8.1 Objetivo geral

Avaliar o efeito da adição de quercetina ao diluente de criopreservação de espermatozoides epididimários refrigerados à 5 °C, por 48 horas.

8.2 Objetivos específicos

- ✓ Verificar a motilidade espermática subjetiva de espermatozoides epididimários refrigerados a 5 °C, nas concentrações de 0, 10, 15 e 25 µM de quercetina, a cada 24 horas.
- ✓ Mensurar a integridade de membrana plasmática de espermatozoides epididimários refrigerados a 5 °C, nas concentrações de 0, 10, 15 e 25 µM de quercetina, a cada 24 horas.
- ✓ Identificar a funcionalidade da membrana plasmática de espermatozoides epididimários refrigerados a 5 °C, nas concentrações de 0, 10, 15 e 25 µM de quercetina, a cada 24 horas.

9 MATERIAL E MÉTODOS

9.1 Preparação do diluente Tris-gema

Para a preparação do diluidor Tris-gema, foram utilizados Tris, ácido cítrico, frutose, água destilada, e gema de ovo. O pH foi ajustado para 7,0 (Tabela 1).

Tabela 1 Composição do diluidor TRIS-gema

Composição	Concentração
Tris	3,605g
Ácido Cítrico	2,024g
Frutose	1,488g
Água destilada	100mL
Gema de ovo	20%

Fonte: Autor (2017).

9.2 Preparo da Quercetina

A Quercetina (Peso molecular 302,24), foi obtida pelo Sigma-Aldrich (Q4951). É insolúvel em água, para sua utilização neste experimento, a quercetina foi diluída em uma solução de Hidróxido de Sódio (NaOH) (Tabela 2).

Tabela 2 Preparo da quercetina

Composição	Concentração
Quercetina	0,0015g
Hidróxido de sódio	10mL

Fonte: Autor (2017).

9.3 Coleta de testículos bovinos e extração dos espermatozoides

Para a realização do experimento, foi efetuado a coleta de testículos bovinos sem raça definida em abatedouro, situado na zona da mata do estado da Paraíba, e transportados até o Laboratório de Biotecnologia em Reprodução Animal da

Universidade Federal da Paraíba, Campus I, em caixa térmica para a manutenção da temperatura estável, de aproximadamente 37°C.

No laboratório, foi realizado a separação do complexo testículo-epidídimo, onde, os epidídimos foram higienizados com soro fisiológico em temperatura ambiente e em seguida, foi realizado o fatiamento da cauda do epidídimo para recuperação das células espermáticas (Figura 5).

Figura 5 Separação do complexo testículo-epidídimo



Fonte: Autor, 2017.

Os epidídimos foram inseridos em placas de Petri estéreis, contendo dois mL de soro fisiológico estéril aquecido a 37 °C, onde os espermatozoides foram recuperados por técnica de flutuação (Figura 6). Foi avaliado a motilidade (em porcentagem) e vigor (avaliação da força que o espermatozoide se move), sendo dispensados os espermatozoides com motilidade menor que 50%.

Os espermatozoides considerados viáveis foram homogeneizados em um tubo tipo falcon formando um *pool* (de espermatozoides diluídos em soro) para evitar a variável “indivíduo” no experimento.

Figura 6 Extração dos espermatozoides por técnica de flutuação



Fonte: Autor (2017).

9.4 Montagem dos grupos

Do *pool* de espermatozoides foi retirado 10 μ L e adicionado 1000 μ L da solução formol-salina para a avaliação da concentração espermática em Câmara de Neubauer e avaliação da morfologia espermática em câmara úmida.

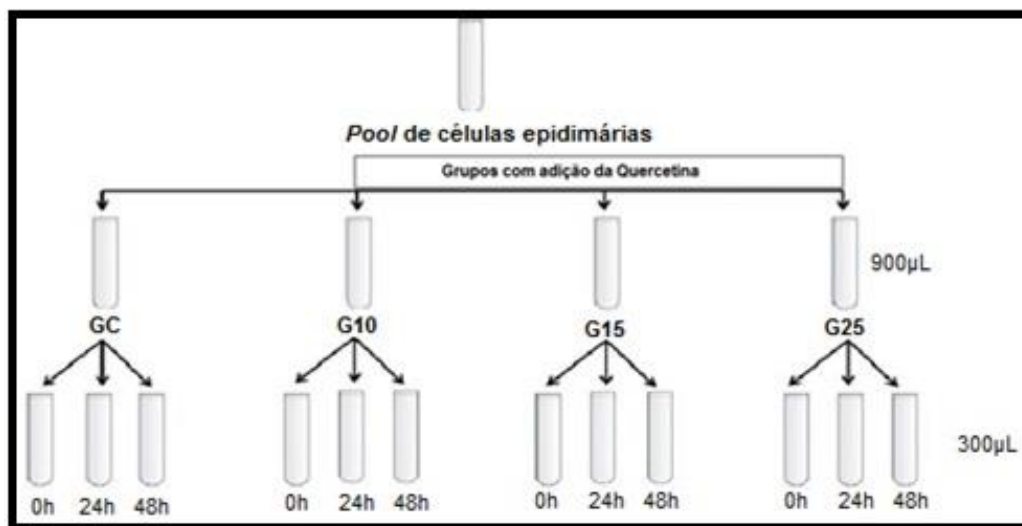
Para a montagem dos grupos com adição da quercetina, foram inseridos em quatro microtubos o volume de 900 μ L da solução do *pool*, no qual, foram centrifugados, em 3.500 RPM, com aceleração seis, na temperatura de 30 °C durante cinco minutos. Após a centrifugação, foi descartado o sobrenadante, e o *pellet* de células foi ressuspenso em 900 μ L de TRIS-gema, diluidor padrão para criopreservação de espermatozoides de bovinos, segundo Madeira et al. (2013).

Foi feito então a montagem dos grupos, no qual o grupo controle (GC), não tinha adição da quercetina, no G10 foi adicionado 18 μ L de quercetina (concentração de 10 μ M), no G15 foi adicionado 27 μ L de quercetina (concentração de 15 μ M), e no G25 foi adicionado 45 μ L de quercetina (concentração de 25 μ M). De cada microtubo foi transferido 300 μ L da solução, para outros dois microtubos, para que fossem analisados no tempo de 24h e 48h (Figura 7).

Após duas horas de refrigeração foi realizado as análises do grupo 0h, momento este quando as células perfazem a curva e alcançam 5 °C e foram avaliados a motilidade, vigor, integridade e funcionalidade de membranas

(plasmática e acrossomal), e, após 24 e 48 horas os testes foram repetidos. Foram efetuadas quatro repetições, em triplicata.

Figura 7 Delineamento experimental dos grupos e a adição de quercetina



Montagem dos grupos, GC grupo sem adição do antioxidante, G10 grupo com adição de 10µM de quercetina, G15 grupo com adição de 15µM de quercetina, e G25 grupo com adição de 25µM de quercetina. Fonte: Autor (2017).

9.5 Avaliações espermáticas

9.5.1 Avaliação de motilidade

Após duas horas de refrigeração a 5 °C, os microtubos foram colocadas em banho-maria para que as células espermáticas se mantivessem na temperatura de 37 °C, e então, foram realizadas as análises de motilidade e vigor do tempo 0h. Os espermatozoides foram colocados em uma lâmina e coberta com uma lamínula para observação em microscópio óptico, com aumento de 40x. A motilidade foi expressa em porcentagem e o vigor definido a média de 1-5 (FONSECA et al., 1992 apud SANTOS, 2013).

9.5.2 Avaliação da concentração espermática

Esta técnica define a concentração total de espermatozoides em uma amostra. Os espermatozoides que foram diluídos (1:100) na solução formol-salina são introduzidos na Câmara de Neubauer (GONZALES, 2004). São contados cinco

quadrados maiores, onde nestes contém dezesseis quadrados menores. Foram considerados os espermatozoides que estiverem no interior de cada quadrado e aqueles que se encontram nas linhas que formam o ângulo inferior esquerdo de cada quadrado. A diferença entre as contagens da parte inferior e superior da câmara tem que ser menor que 10%.

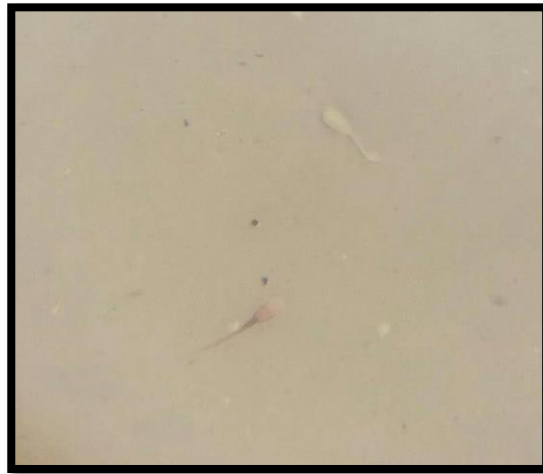
9.5.3 Avaliação da morfologia espermática

A avaliação de morfologia espermática consiste na contagem em câmara úmida de 200 células, da solução do *pool* que foi diluído em formol-salina (CELEGHINI, 2005). São avaliados os defeitos morfológicos das células, e os valores de espermatozoides com caudas morfollogicamente enroladas são subtraídos do resultado final do teste hiposmótico.

9.5.4 Avaliação de integridade de membrana

As análises de eosina-nigrosina visam avaliar a da integridade da membrana (MARIA, 2005). Foram misturados 50µL da solução eosina-nigrosina + 25µL de soro + 25µL de sêmen, de cada grupo nos tempos de 0h, 24h e 48h pós-refrigeração, e então, feito o estiramento para a contagem de 200 células, na qual, as células rosadas representam espermatozoides com a membrana lesada, que permitiu a penetração da eosina, na qual se liga aos ácidos nucleicos e conferem uma coloração rosada ao espermatozoide (Figura 8).

Figura 8 Avaliação da integridade de membrana



Células não-coradas indicam membrana plasmática íntegra. Fonte: Autor (2017).

9.5.5 Avaliação de viabilidade bioquímica da membrana

O teste hiposmótico (HOST) visa avaliar a funcionalidade da membrana plasmática, baseado nas propriedades de manutenção do equilíbrio osmótico entre o ambiente intra e extracelular. Foi retirado 10 μ L de sêmen de cada grupo, e adicionado 100 μ L de solução hiposmótica (50mOsmol/Kg; Citrato de Sódio), na qual foi mantida em banho-maria a 37 °C durante 30 minutos. Após o tempo de incubação, foi adicionado 50 μ L de formol-salina com a finalidade de parar a reação, segundo metodologia de Santos et al. (2013). As membranas funcionais absorvem a água do meio, resultando no ingurgitamento da cauda do espermatozoide.

Em cada teste foi contado 200 células, de cada grupo, por três avaliadores distintos, e as análises foram repetidas após 24 e 48 horas de refrigeração a 5°C.

9.6 Análises estatísticas

Foram realizadas quatro repetições, em triplicata. Foi realizado análise de variância (ANOVA) seguida por Tukey, tomando o valor de $p < 0,05$ como nível mínimo necessário para a significância estatística.

10 RESULTADOS

A concentração espermática nas repetições foi de $22,5 \times 10^6$ espermatozoides/mL. Nas análises de câmara úmida, foi obtido o valor de 3,25% de espermatozoides com caudas enroladas. Esses valores foram reduzidos na média obtida do teste de HOST.

Após duas horas de refrigeração, os grupos foram avaliados em relação a motilidade os valores obtidos no tempo de 0h dos grupos GC, G10, G15 e G25, foram respectivamente 57%, 70%, 68% e 64%, e não houve diferença significativa ($p < 0,05$) entre os grupos controle e os grupos com adição de quercetina. No tempo de 24h, os valores de GC, G10, G15 e G25 foram 56,3%, 67,3%, 70,0% e 24,3% respectivamente e foi percebida diferença ($p < 0,05$) entre o G25 e os demais grupos. No tempo de 48h, os valores dos grupos GC, G10, G15 e G25 foram 41,8%, 54,3%, 41,3% e 3,0% respectivamente. Mais uma vez o G25 (48h) apresentou menor motilidade ($p < 0,05$) em relação aos demais grupos.

O G15 (24h) diferiu ($p < 0,05$) do grupo G15 (48h), e o grupo G25 (0h) diferiu do G25 (24h) e do G25 (48h), o que indica que a adição da quercetina pode ser prejudicial à motilidade dos espermatozoides durante a manutenção da célula espermática sob refrigeração (Tabela 3).

Tabela 3 Motilidade subjetiva média de espermatozoides epididimários refrigerados a 5 °C por 48 horas, com a adição ou não de quercetina

MOTILIDADE	0h	24h	48h
GC	57,25±3,6 ^{Aa}	56,25±9,0 ^{Aa}	41,75±12,4 ^{Aa}
G10	69,75±2,0 ^{Aa}	67,25±4,3 ^{Aa}	54,25±11,4 ^{Aa}
G15	67,50±8,4 ^{Aa}	70±6,0 ^{Aa}	41,25±14,3 ^{Ab}
G25	63,75±13,7 ^{Aa}	24,25±5,3 ^{Bb}	3±2,4 ^{Bc}

CG: grupo controle, G10: 10 µM de quercetina, G15: 15 µM de quercetina, G25: 25 µM de quercetina. Valores seguidos de letras minúsculas diferentes na mesma linha possuem diferença significativa ($p < 0,05$) entre os tempos, e maiúsculas na mesma coluna diferenças entre os grupos. Fonte: Autor (2017).

Em relação ao vigor, no tempo de 0h os valores obtidos para GC, G10, G15 e G25 foram 2,07, 2,3 2,4 e 2,1 respectivamente, onde o valor de vigor 5 era

considerado ótimo para espermatozoides epididimários. Não houve diferença significativa entre os grupos ($p < 0,05$).

No tempo 24h, os valores de GC, G10, G15 e G25 foram 2,08, 2,18, 2,45 e 1,0, e foi percebida diferença ($p < 0,05$) entre o G25 e os demais grupos, apresentando menor vigor espermático.

No tempo de 48h, os valores para os grupos GC, G10, G15 e G25 foram 2,0, 2,2, 1,6 e 0,8 respectivamente. Mais uma vez o G25 (48h) apresentou menor vigor ($p < 0,05$) em relação aos demais grupos (Tabela 4).

Tabela 4 Vigor médio de espermatozoides epididimários refrigerados a 5 °C por 48 horas, com a adição ou não de quercetina

VIGOR	0h	24h	48h
GC	2,07±0,15 ^{Aa}	2,07±0,15 ^{Aa}	2±0,4 ^{Aa}
G10	2,3±0,4 ^{Aa}	2,1±0,15 ^{Aa}	2,2±0,5 ^{Aa}
G15	2,4±0,2 ^{Aa}	2,4±0,17 ^{Aa}	1,6±0,5 ^{Aa}
G25	2,1±0,3 ^{Aa}	1±0 ^{Bb}	0,75±0,5 ^{Bc}

CG: grupo controle, G10: 10 µM de quercetina, G15: 15 µM de quercetina, G25: 25 µM de quercetina. Valores seguidos de letras minúsculas diferentes na mesma linha possuem diferença significativa ($p < 0,05$) entre os tempos, e maiúsculas na mesma coluna diferenças entre os grupos. Fonte: Autor (2017).

No teste de integridade da membrana plasmática, não houve diferença ($p < 0,05$) entre os grupos experimentais formados, independente da concentração e do tempo de refrigeração (Tabela 5).

Tabela 5 Integridade de membrana plasmática de espermatozoides epididimários refrigerados a 5 °C por 48 horas, com a adição ou não de quercetina

EOSINA-NIGROSINA	0h	24h	48h
GC	75,2±3,9	73,8±1,2	76,2±5,9
G10	77,7±5,5	76,8±6,0	74,6±8,2
G15	77,2±4,9	67,7±16,0	70,2±12,4
G25	71,07±4,7	63,3±8,5	64,9±8,1

CG: grupo controle, G10: 10 µM de quercetina, G15: 15 µM de quercetina, G25: 25 µM de quercetina. Fonte: Autor (2017).

No teste de funcionalidade da membrana plasmática, não houve diferença ($p < 0,05$) entre os grupos experimentais formados, independente da concentração e do tempo de refrigeração (Tabela 6).

Tabela 6 Funcionalidade de membrana plasmática de espermatozoides epididimários refrigerados a 5 °C por 48 horas, com a adição ou não de quercetina

HOST	0h	24h	48h
GC	63,4±5,7	62,05±4,4	59,05±15,8
G10	68,1±9,8	63,8±12,7	58,4±9,2
G15	56,02±14,7	54,9±16,2	47,5±8,4
G25	49,9±16,8	41,9±12,7	51,4±9,15

CG: grupo controle, G10: 10 µM de quercetina, G15: 15 µM de quercetina, G25: 25 µM de quercetina.
Fonte: Autor (2017).

11 DISCUSSÃO

A refrigeração de sêmen apresenta muitos benefícios, quando comparados ao sêmen fresco, como por exemplo, o aumento do tempo de utilização dos espermatozoides, no entanto, a exposição dos espermatozoides ao frio pode resultar em danos a célula, com isso é necessário a manutenção dos parâmetros de viabilidade da célula pós-refrigeração. Diversos benefícios da quercetina são relatados na literatura, no entanto, na criopreservação de sêmen, os resultados são muito variados, e por vezes, contraditórios.

Em espermatozoides de humanos, a adição de 50 μM de quercetina induziu melhora significativa nos parâmetros de motilidade, viabilidade e integridade do DNA, quando comparados ao grupo controle (ZRIBI et al., 2012). No entanto, Khanduja et al. (2001), ao analisar a adição de quercetina no sêmen fresco da mesma espécie, observaram uma queda na motilidade e viabilidade das células, e não houve efeitos na peroxidação de lipídios.

No experimento realizado por Gibb et al. (2013), a adição de quercetina (0,15 μM) em espermatozoides de equinos melhorou significativamente a motilidade e capacidade de ligação da zona do espermatozoide criopreservado de garanhões e reduziu a fragmentação do DNA. Semelhante aos resultados obtidos por Mcniven e Richardson (2003), onde a adição de quercetina (100 μM) em espermatozoides de equinos refrigerado à 5°C por 48 horas apresentou maior motilidade, maior porcentagem de células com membrana íntegra e maior teor de ATP quando comparados ao controle.

No entanto, segundo o experimento de Silva (2016), a adição de 20 μg de quercetina (66,18 μM) durante a refrigeração do sêmen equino a 5 °C por 24 horas, não influenciou os parâmetros de cinética espermática ou reduziu o estresse oxidativo, porém, a mesma concentração para o sêmen congelado reduziu a concentração de ROS e a peroxidação lipídica, principalmente para os equinos considerados sensíveis ao processo de congelação, e concluíram que a inclusão da quercetina ao diluente permitiu às células espermáticas maior resistência aos danos oxidativos quando estas foram submetidas a uma situação de elevado estresse.

Adicionando quercetina em sêmen de carneiro, Silva et al. (2012) não observaram diferença ($P < 0,05$) entre os grupos quanto a motilidade progressiva, vigor, acrossoma e membranas íntegras, mas a quantidade de espermatozoides com alto potencial de membrana mitocondrial foi maior no grupo suplementado com quercetina 5 $\mu\text{g/mL}$ do que naqueles tratados com 10, 15 ou 20 $\mu\text{g/mL}$ de quercetina.

Jamalan et al. (2016) avaliaram o efeito protetor da quercetina em relação a metais tóxicos em espermatozoides humanos, onde verificou que a adição de quercetina em concentrações mais altas resultou na diminuição gradual da motilidade dos espermatozoides em relação aos grupos não tratados.

Em espermatozoides de coelhos, a adição de quercetina reduziu a peroxidação lipídica, no entanto, influenciou negativamente a motilidade (JOHINKE; GRAAF; BATHGATE, 2014).

No presente estudo, a adição de quercetina em espermatozoides bovinos epididimários em concentrações mais elevadas foram prejudiciais à motilidade e vigor espermático, influenciado pelo tempo no qual os espermatozoides foram expostos ao antioxidante. Em relação a manutenção da integridade e funcionalidade da membrana espermática pós-refrigeração, a adição do antioxidante não apresentou diferenças significativas quando comparado ao grupo controle.

Resultados bastante semelhantes com os obtidos no estudo de Trevdá et al. (2014), no qual observaram uma diminuição gradual da motilidade dos espermatozoides bovinos com o aumento da concentração ao longo de uma cultura de espermatozoides *in vitro* por 24 horas. Também semelhante ao resultado do estudo de Silva et al. (2016), onde a adição de quercetina em espermatozoides caprinos não apresentou diferenças significativas em relação à membrana plasmática e integridade do acrossoma no tempo de 0h, mas após uma hora de refrigeração, as concentrações mais altas influenciaram negativamente a motilidade total dos espermatozoides.

Mesmo que ainda não se tenha conseguido estabelecer a concentração ótima de quercetina a ser utilizada nos espermatozoides, Spencer et al. (2003) em

avaliação do efeito da quercetina sobre fibroblastos observaram que baixas concentrações resultam em redução do estresse oxidativo, enquanto as concentrações elevadas causam efeitos citotóxicos, provavelmente pela produção de metabólitos oxidativos.

A motilidade espermática depende de diversos fatores, como a ação sincronizadas de proteínas, açúcares, íons e pequenas moléculas orgânicas, e é um dos principais fatores que permitem a migração do espermatozoide em direção ao óvulo, e defeitos nessa motilidade são relacionados com a infertilidade. A inibição da motilidade sem efeitos consideráveis na peroxidação indica que existe o envolvimento de outros mecanismos inibitórios (JAMALAN et al., 2016).

Silva (2016) relatou que a motilidade depende da energia gerada pela hidrólise do ATP nas mitocôndrias, onde a saída de Ca^{2+} das células permite o deslocamento dos microtúbulos, resultando em movimentação da cauda dos espermatozoides, e que essa redução observada na motilidade espermática ao se elevar a concentração de quercetina pode estar relacionada ao potencial efeito inibitório desse antioxidante sobre a enzima Ca^{2+} -ATPase, na qual consequentemente, baixos níveis desta enzima levaria ao acúmulo de Ca^{2+} nas células, bloqueando assim a capacidade dos espermatozoides se movimentarem.

Fato comprovado por Khanduja et al. (2001), que observaram uma redução significativa da enzima Ca^{2+} -ATPase com concentrações elevadas de quercetina, onde ocorreu redução gradativamente com o passar do tempo de incubação.

Outro fator a ser estudado é o modo de preparo da quercetina, uma vez que a mesma é insolúvel em água e não há um diluidor padrão, onde, alguns trabalhos utilizam DMSO (JAMALAN, 2015; SILVA et al., 2016), hidróxido de sódio 1M (SOVERNIGO, 2015; GUEMRA et al., 2013) ou etanol (SIMÕES et al., 2013), no qual também podem apresentar alguma toxicidade, alterações no pH, ou outras modificações que afetem os parâmetros de motilidade, viabilidade e funcionalidade dos espermatozoides. O hidróxido de sódio é altamente corrosivo, e em altas concentrações pode destruir os tecidos vivos, desta forma, são necessários mais estudos sobre seus possíveis efeitos citotóxicos sobre a célula espermática.

12 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com base nos dados apresentados podemos observar que a adição da quercetina ao diluidor de criopreservação da célula espermática não apresenta efeito sobre a integridade e funcionalidade da membrana plasmática e em altas concentrações reduz a motilidade e vigor de espermatozoides epididimários bovinos, submetidos à refrigeração.

Devido à variedade de resultados encontrados na literatura sobre a eficiência da quercetina na criopreservação de sêmen, são necessários mais estudos para avaliação da possível toxicidade, farmacocinética e do meio adequado para a diluição da quercetina.

REFERÊNCIAS

AGUIAR, G. V.; ARAÚJO, A. A.; MOURA, A. A. A. Desenvolvimento testicular, espermatogênese e concentrações hormonais em touros Angus. **Revista Brasileira de Zootecnia**, vol. 35, n. 4, p.1629-1638, 2006.

ARAUJO, G. F. Viabilidade da dose fracionada de sêmen bovino criopreservado descongelada por diferentes métodos. 2010. 40 f. **Mestrado em Ciência Animal (Dissertação)**, Universidade Federal do Pará, Belém – PA, 2010.

ARRUDA, R. P.; CELEGHINI, E. C. C.; GARCIA, A. R.; SANTOS, G. C.; LEITE, T. C.; OLIVEIRA, L. Z.; LANÇONI, R.; RODRIGUES, M. P. Morfologia espermática de touros: interpretação e impacto na fertilidade. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, vol. 39, n. 1, p. 47-60, Jan/Mar. 2015.

BANDEY, M. N.; LONEA, F. A.; RASOOLA, F.; RASHIDA, M.; SHIKARIB, A. Use of antioxidants reduce lipid peroxidation and improve quality of crossbred ram sperm during its cryopreservation. **Cryobiology**. vol. 74, p. 25–30, 2017. Disponível em <www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0011224016304461>. Acessado em: 08 Mar. 2017.

BEHLING, E. B.; SENDÃO, M. C.; FRANCESCATO, H. D. C.; ANTUNES, L. M. G.; BIANCHI, M. L. P. Flavonóide quercetina: aspectos gerais e ações biológicas. **Alimentos e Nutrição Araraquara**, vol. 15, n. 3, p.285-292, Araraquara - SP 2004.

BORGES, J. C. Efeito da utilização de antioxidante no diluidor para a criopreservação de sêmen bovino avaliado através de testes complementares, inseminação artificial e fecundação *in vitro*. 2008. 70 f. **Mestrado em Medicina Veterinária (Dissertação)**, Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho” Faculdade De Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal – SP, 2008.

BRANDÃO, A. C.; ARRUDA, R. P.; MADUREIRA, E. H.; MARTINS, J. F. P.; ASSUMPÇÃO, M. E. O. D. A.; VISINTIN, J. A. Influência do glicerol e etilenoglicol e da criopreservação sobre o complexo DNA-Proteína de espermatozoides em garanhões. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, vol. 43, p. 68-73, São Paulo, 2006.

CANDEIAS, M. L. Avaliação de diferentes protocolos de criopreservação de sêmen de garanhões da raça Mangalarga Marchador. 2010. 105 f. **Mestrado em Medicina Veterinária (Dissertação)**, Universidade Federal Fluminense, Niterói - RJ, 2010.

CASTRO, S. V.; CARVALHO, A. A.; SILVA, C. M. G.; RODRIGUES, A. P. R. Intracellular Cryoprotectant Agents: Characteristics and Use of Ovarian Tissue and Oocyte Cryopreservation. **Acta Scientiae Veterinariae**, p. 957, 2011.

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

DOVICH, S. S. Estudo do efeito da quercetina sobre a resposta inflamatória neurogênica avaliado através do extravasamento plasmático em ratos. 2002. 76 f. **Mestrado em Ciências Biológicas (Dissertação)**, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2002.

GIBB, Z.; BUTLER, T.J.; MORRIS, L. H.; MAXWELL, W. M.; GRUPEN, C. G. Quercetin improves the postthaw characteristics of cryo-preserved sex-sorted and nonsorted stallion sperm. **Theriogenology**. p. 1001-1009, 2013.

GONZALES, R. A. F. Efeito da criopreservação usando diferentes técnicas de congelação e crioprotetores sobre parâmetros espermáticos e a integridade de membranas do espermatozoide bovino. 2004. 92 f. **Doutorado em Medicina Veterinária (Tese)**, Universidade de São Paulo, Pirassununga – SP, 2004.

GUEMRA, S.; MONZANII, P. S.; SANTOS, E.S.; ZANIN, R.; OHASHIII, O. M.; MIRANDAI, M. S.; ADONA, P. R. Maturação *in vitro* de oócitos bovinos em meios suplementados com quercetina e seu efeito sobre o desenvolvimento embrionário. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 65 n. 6 Belo Horizonte, 2013.

GUERRA, M. M. P.; CÂMARA, D. R.; SILVA, E. C. B.; SILVA, S. V. Uso de antioxidantes no sêmen ovino. *In*: Palestra apresentada no VI Congresso Norte Nordeste de Reprodução Animal, Fortaleza, CE, Brasil, 27 a 29 de junho de 2012. **Ciência Animal**, p. 354-364.

JAMALAN, M.; GHAFARI, M. A.; HOSEINZADEH, P.; HASHEMITABAR, M.; ZEINALI, M. Human sperm quality and metal toxicants: protective effects of some flavonoids on male reproductive function. **Royal Institute International Journal of Fertility and Sterility**, vol. 10, n. 2, p. 215-222, 2016.

JOHINKE, D.; DE GRAAF, SP.; BATHGATE, R. Quercetin reduces the in vitro production of H₂O₂ during chilled storage of rabbit spermatozoa. **Animal Reproduction Science**, vol. 151, p. 208-219, 2014.

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

MADEIRA, E. M.; BIANCHI, I.; VIEIRA, M. B.; SCHNEIDER, A.; SEVERO, N. C.; PFEIFER, L. F. M.; CORRÊA, M. N. Avaliação de diferentes crioprotetores intra e extracelulares na criopreservação de sêmen de touros. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, vol. 65, n. 2, p. 415-420, Pelotas-RS, 2013.

MAIA, M. S.; BICUDO, S. D. Radicais livres, antioxidantes e função espermática em mamíferos: uma revisão. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, vol. 33, n. 4, p. 183-193, Belo Horizonte, 2009. Disponível em <www.cbra.org.br>. Acessado em: 08 Mar. 2017.

MARIA, A. N. Diluidores e crioprotetores no resfriamento e congelamento do sêmen de Piracanjuba (*Brycon orbignyanus*). 2005. 71 f. **Mestrado em Zootecnia (Dissertação)**, Universidade Federal de Lavras, Lavras –MG, 2005.

MARQUES FILHO, W. C. Espermatogênese em bovinos. 2006. 25 f. **Trabalho de Conclusão de Curso (Monografia)** - Reprodução Animal, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da UNESP – Botucatu, Botucatu 2006.

MARTINEZ M, A. **Flavonoides**. Medellín, 2005. Disponível em <www.researchgate.net/publication/283308856_Flavonoides>. Acessado em: 09 Mar. 2017.

MCNIVEN, M. A.; RICHARDSON, G. F. Chilled storage of stallion semen using perfluorochemicals and antioxidants. **Cell Preservation Technology**, vol. 1, p. 165-174, 2003.

MELO, C. M. Ação dos crioprotetores na biotecnologia de sêmen congelado. **Mestrado na Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (Dissertação)**, da Universidade Estadual Paulista – UNESP, Botucatu-SP, 2003.

NEVES, P. G. R. Avaliação *in vitro* da Quercetina como potencial agente Antileishmania. 2016. 70 f. **Trabalho de Conclusão de Curso (Monografia)-** Biotecnologia, Universidade Federal Da Paraíba, João Pessoa- PB, 2016.

PENITENTE FILHO, J. M. Adição da vitamina E na criopreservação do sêmen caprino. 2010. 55 f. **Mestrado em Zootecnia (Dissertação)**, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa – MG, 2010.

PESCH, S.; HOFFMANN, B. Cryopreservation of spermatozoa in veterinary medicine. **Journal fur Reproduction Medizin Endokrino**, vol. 2, p. 101-105, 2007.

SALMITO-VANDERLEY, C. S. B.; VIEIRA, M. J. A. F.; LEITE, L. V.; OLIVEIRA, F. C. E.; LINHARES, F. R. A.; SALGUEIRO, C. C. M.; NUNES, J. F. Meios de congelamento para conservação de sêmen de peixes da família *Characidae*. *In: Palestra apresentada no VI Congresso Norte Nordeste de Reprodução Animal*, Fortaleza, CE, Brasil, 27 a 29 de junho de 2012. *Ciência Animal*, p. 255-268.

SANTOS, M. C. R. Adição do complexo ciclodextrina-colesterol na criopreservação do sêmen caprino. 2013. 76 f. **Doutorado na Universidade Federal de Viçosa (Tese)**, Minas Gerais, 2013.

SILVA, E. C. B.; CAJUEIRO, J. F.; SILVA, S. V.; SOARES, P. C.; GUERRA, M. M. Effect of antioxidants resveratrol and quercetin on *in vitro* viability of frozen ram sperm. **Theriogenology**, vol. 77, p. 1722-1726, 2012.

SILVA, E. C. B.; GUERRA, M. M. P. Terapias antioxidantes na criopreservação espermática. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**, vol. 107, p. 143-149, Recife-PE, 2012.

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**, vol. 68, n. 5, p. 1237-1243, 2016.

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 congelamento. 2016. 94 f. **Mestrado em Biotecnologia Animal (Dissertação)**, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP, Botucatu – SP, 2016.

SILVA, N. C.; LEÃO, K. M.; MARQUES, T. M.; SILVA, R. P. S.; RODRIGUES, M. C. Ação de antioxidantes na manutenção da viabilidade espermática de sêmen bovino criopreservado. **Enciclopédia Biosfera**, Centro Científico Conhecer, vol. 9, n. 17, p. 17-32, Goiânia, 2013.

SILVA, S. V.; GUERRA, M. M. P. Efeitos da criopreservação sobre as células espermáticas e alternativas para redução das crioinjúrias. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, vol. 35, n. 4, p. 370-384, Belo Horizonte, 2011. Disponível em <www.cbra.org.br>. Acessado em: 08 Mar. 2017.

SIMÕES, V. N.; FAVARIN, L. R. V.; CABEZA, N. A.; OLIVEIRA, T. D.; FIORUCCI, A. R.; STROPA, J. M.; RODRIGUES, D. C. M.; CAVALHEIRO, A. A.; ANJOS, A. Síntese, caracterização e estudo das propriedades de um novo complexo mononuclear contendo quercetina e íon Ga(III). **Química Nova**, vol. 36, no. 4, São Paulo, 2013.

SOVERNIGO, T. C. Uso de antioxidantes na produção *in vitro* de embriões bovinos. 2015. 44 f. **Mestrado em Ciências Agrárias (Dissertação)**, Universidade Norte do Paraná, Arapongas, 2015.

SPENCER, J. P. E.; KUHNLE, G. G. C.; WILLIAMS, R. J.; RICE-EVANS, C. Intracellular metabolism and bioactivity of quercetin and its *in vivo* metabolites. **Biochemical Journal**, vol. 372, p. 173-181, 2003.

TREVIZAN, J. T. Influência dos danos oxidativos na qualidade espermática em bovinos de diferentes idades. 2013. 44 f. **Mestrado em Medicina Veterinária (Dissertação)**, Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho” Faculdade De Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal – SP, 2013.

TVRDÁ, E.; LUKÁČ, N.; LUKÁČOVÁ, J.; JAMBOR, T.; MASSÁNYI, P. Dose-and time-dependent *in vitro* effects of quercetin on bovine spermatozoa activity and superoxide production. **Biological Trace Element Research**, vol. 58, p. 224–231, 2014.

TVRDÁ, E.; TUSIMOVÁ, E.; KOVÁCIK, A.; PÁAL, D.; LIBOVÁ, L.; LUKÁC, N, Protective effects of quercetin on selected oxidative biomarkers in bovine spermatozoa subjected to ferrous ascorbate. **Reproduction in Domestic Animals**, vol. 51, p. 524–537, 2016.

WINKEL-SHIRLEY, B. Flavonoid biosynthesis. A colorful model for genetics, biochemistry, cell biology, and biotechnology. **Plant Physiology**, vol. 126, p. 485-493, 2001.

ZRIBI, N.; CHAKROUN, N. F.; BEN ABDALLAH, F.; 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**, vol. 65, p. 326-331, 2012.

GLOSSÁRIO

Apoptose	Autodestruição programada de uma célula
Carcinoma	Câncer que afeta o tecido epitelial
Concepção	Junção de um espermatozoide com um óvulo; Fecundação
Crioinjúrias	Danos às células submetidas à baixa de temperatura
Centrifugação	Separação pela força centrífuga
Difusão	Propagação; Estado do que se espalha por múltiplas direções
Enzimas	Proteínas catalisadoras das reações químicas
Fertilização	Consiste na junção de gametas que originam o zigoto
Flavonoide	Classe de compostos fenólicos caracterizados por estrutura básica de um esqueleto de difenil propano (C ₆ C ₃ C ₆) e dois anéis benzênicos A e B, ligados a um anel pirano.
Gonócitos	Célula reprodutora masculina inicial
Haploide	Possui n cromossomo (metade de um ovo fecundado)
Helicoidal	Que tem a forma de hélice
Homeostase	Capacidade do organismo de se manter constante
Isotônico	Que tem a mesma tensão ou concentração
Lise	Dissolução ou destruição de um elemento orgânico
Monta	Cobertura de animais de reprodução
Motilidade	Competência para se mover; mobilidade
Osmolaridade	Número de partículas de soluto contidas num volume
Permeabilidade	Qualidade dos corpos que se deixam atravessar
Quelação	Combinação com um metal
Ruminante	Animal que ruma
Transmembrana	Que atravessa a membrana