



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

USO DE MIRICETINA EM MEIO DE CRIOPRESERVAÇÃO DE SÊMEN OVINO

LÚCIA CRISTINA PEREIRA ARRUDA

RECIFE – PE

2018



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

USO DE MIRICETINA EM MEIO DE CRIOPRESERVAÇÃO DE SÊMEN OVINO

LÚCIA CRISTINA PEREIRA ARRUDA

Tese submetida à Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Ciência Animal Tropical, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutor em Ciência Animal Tropical.

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

RECIFE – PE

2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema Integrado de Bibliotecas da UFRPE
Biblioteca Central, Recife-PE, Brasil.

A779u Arruda, Lúcia Cristina Pereira
Uso de miricetina em meio de criopreservação de sêmen ovino /
Lúcia Cristina Pereira Arruda. – 2018.
98 f. : il.

Orientadora: Maria Madalena Pessoa Guerra.
Tese (Doutorado) – Universidade Federal Rural de Pernambuco,
Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal Tropical, Recife,
BR-PE, 2018.
Inclui referências e anexo(s).

1. Espermatozoide 2. Carneiros 3. Flavonoides 4. Congelação
5. Inseminação Artificial 6. Citometria de fluxo I. Guerra, Maria
Madalena Pessoa, orient. II. Título

CDD 636.089

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

USO DE MIRICETINA EM MEIO DE CRIOPRESERVAÇÃO DE SÊMEN OVINO

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal Tropical, como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Doutor em Ciência Animal Tropical, outorgado pela Universidade Federal Rural de Pernambuco, à disposição na Biblioteca Central desta universidade. A transcrição ou utilização de trechos deste trabalho é permitida, desde que respeitadas às normas de ética científica.

Tese elabora por:

LÚCIA CRISTINA PEREIRA ARRUDA

Aprovada em 23 de fevereiro de 2018

BANCA EXAMINADORA

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Maria Madalena Pessoa Guerra / DMV-UFRPE

Prof. Dr. Gustavo Ferrer Carneiro / UAG-UFRPE

Prof. Dr. Diogo Ribeiro Câmara / UFAL

Prof^a. Dr^a. Sildivane Valcácia Silva / UFPB

Prof^a. Dr^a. Ellen Cordeiro Bento da Silva / DMFA-UFRPE

Dedico esta tese a minha filha (Ana Cecília),

aos meus pais, a Nenem e a Deus.

“Tem vez que as coisas pesam mais
Do que a gente acha que pode aguentar
Nessa hora fique firme
Pois tudo isso logo vai passar
Você vai rir, sem perceber
Felicidade é só questão de ser
Quando chover, deixar molhar
Pra receber o sol quando voltar”

(Marcelo Jeneci)

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos que fazem parte da equipe, ou melhor, família ANDROLAB, Millena, Robespierre, Aline, Mergulhão e Julianne, que muito me ajudaram durante toda essa jornada; juntos, diariamente, trabalhamos para que esse projeto se tornasse real;

Ao Dr. André Mariano, eu não sei como agradecer; você que, incansavelmente, nos ensina, nos aconselha, dá puxão de orelha e nos coloca nos trilhos. Obrigada!

Agradeço a Pedro Leopoldo, que contribuiu com a análise estatística; a Raquel e Desiree, que estagiaram durante um tempo no Androlab e me ajudaram bastante; e a Joana Amélia e Otávio, que me ajudaram nas colheitas de sêmen;

Agradeço ao senhor Leônidas Maia e ao colega Flávio Mergulhão, que me permitiram utilizar seus animais para realização dos experimentos;

Agradeço a Dr. Gustavo Ferrer e Wilton Arruda, que me cederam hormônios para realização dos trabalhos;

Agradeço também à FACEPE, pela disponibilização da bolsa de estudos, e ao CNPq, pelo apoio financeiro;

E por fim, agradeço à minha orientadora, Prof^a. Dr^a. Madalena Guerra, que desde a iniciação científica vem confiando em meu trabalho e me dando oportunidades e subsídios para chegar até aqui.

APOIO FINANCEIRO

Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco – FACEPE

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq

SUMÁRIO

	Página
1	INTRODUÇÃO..... 17
2	REVISÃO DE LITERATURA..... 19
	2.1 Ovinocultura..... 19
	2.2 Congelação de Sêmen..... 20
	2.2.1 Estresse oxidativo..... 22
	2.2.2 Peroxidação lipídica ou lipoperoxidação..... 23
	2.3 Terapias Antioxidantes..... 24
	2.3.1 Flavonóides..... 25
	- Miricetina..... 27
	2.4 Avaliação do Sêmen..... 29
	2.4.1 Sistema computadorizado de análise do sêmen..... 30
	2.4.2 Citometria de fluxo..... 31
	- Integridade de membrana plasmática e acrossomal (FITC-PNA + Iodeto de Propídeo) 32
	- Estabilidade de membrana (Merocianina 540 / YO-PRO-1 Iodide)..... 34
	- Potencial de membrana mitocondrial (JC-1)..... 35
	- Níveis de ROS intracelular (CM-H ₂ DCFDA + Iodeto de Propídeo)..... 37
	- Peroxidação lipídica (C11-BBODIPY ^{581/591})..... 38
	2.5 Inseminação Artificial..... 39
3	OBJETIVOS..... 41
	3.1 Objetivo Geral..... 41
	3.2 Objetivos Específicos..... 41
4	REFERÊNCIAS..... 42

5	ARTIGOS.....	57
	5.1 Avaliação <i>in vitro</i> do sêmen congelado de carneiros com diluidor suplementado com miricetina.....	58
	5.2 Ação da miricetina na criopreservação de espermatozoides ovinos.....	72
6	CONCLUSÃO.....	88
7	ANEXOS.....	89
	7.1 Normas para Submissão de Artigo no Periódico Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia.....	90
	7.2 Parecer da Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA.....	98

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Estrutura básica dos flavonoides.....	26
Figura 2. Estrutura química da quercetina.....	28
Figura 3. Estrutura química da miricetina.....	28
Figura 4. Avaliação de integridade de membranas plasmática e acrossomal..	33
Figura 5. Avaliação da estabilidade de membrana.....	35
Figura 6. Avaliação do potencial de membrana mitocondrial.....	36
Figura 7. Avaliação dos níveis de ROS intracelular.....	38
Figura 8. Avaliação da peroxidação lipídica.....	39

LISTA DE TABELAS

	Página
Artigo 1	
Tabela 1. Parâmetros cinéticos (CASA) de espermatozoides criopreservados de ovino com meio de congelação suplementado ou não com miricetina. Dados são expressos como média dos quadrados mínimos e erro-padrão.....	66
Tabela 2. Avaliação por citometria de fluxo da integridade de membranas plasmática e acrossomal, potencial de membrana mitocondrial, níveis de ROS intracelular, peroxidação lipídica e estabilidade de membrana de espermatozoides de carneiros após congelação em meio suplementado ou não com miricetina. Dados expressos como média dos quadrados mínimos e erro-padrão.....	67
Artigo 2	
Tabela 1. Parâmetros cinéticos (CASA), de espermatozoides criopreservados de ovino em meio suplementado com diferentes concentrações de miricetina. Dados são expressos como média dos quadrados mínimos±erro-padrão.....	86
Tabela 2. Avaliação por citometria de fluxo da integridade de membranas plasmática e acrossomal, potencial de membrana mitocondrial, níveis de ROS intracelular, peroxidação lipídica e estabilidade de membrana de espermatozoides de carneiros após congelação em meio suplementado com diferentes concentrações de miricetina. Dados expressos como média dos quadrados mínimos±erro-padrão.....	87

ABREVIATURAS E DEFINIÇÕES

AGP – Ácidos graxos poli-insaturados

ALH – Deslocamento lateral da cabeça

BCF – Frequência de batimento cruzado

CM-H₂DCFDA - 5-(e 6-) clorometil-2',7'-diacetato de diclorodihidrofluoresceína acetil éster

CASA – Sistema Computadorizado de Análise do Sêmen

CAT – Catalase

C11-BODIPY^{581/591} - 4,4-difluoro-5-(4-fenil-1,3-butadienil)-4-bora-3a-ácido4a-diaza-s-indaceno-3-undecanóico

DMSO – Dimetilsulfóxido

eMP – Estabilidade de membrana

EO – Estresse Oxidativo

FAO – Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação

FITC-PNA – Isoticianato de fluoresceína conjugado ao *peanut agglutinin*

GPx – Glutathione peroxidase

GR – Glutathione reductase

GSH – Glutathione

GSH-Rd – Glutathione reduzida

IA – Inseminação artificial

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

iMPA – Integridade de membranas plasmática e acrossomal

IP – Iodeto de propídeo

iROS – Níveis de ROS intracelular

JC-1 - 5,5',6,6'-tetracloro-1,1,3,3'- tetraetilbenzimidazolilcarbocianina

LIN – Linearidade

LPO – Peroxidação lipídica ou lipoperoxidação

MDA – Malonaldeído

MP – Motilidade progressiva

MT – Motilidade total

M540 – Merocianina 540

OH – Radical hidroxila

O₂ – Ânion superóxido

PBS – Fosfato salino tamponado

Prx – Peroxirredoxina

PMM – Potencial de Membrana Mitocondrial

RAP – Rápidos

ROS – Espécies reativas de oxigênio

SOD – Superóxido dismutase

STR – Retilinearidade

TGO – Tris-gema de ovo

VAP – Velocidade média da trajetória

VCL – Velocidade curvilínea

VSL – Velocidade em linha reta

WOB – Índice de oscilação

YO – Yo-Pro-1 Iodide

RESUMO

Sêmen ovino foi diluído (200×10^6 espermatozoides/mL) em Tris-gema de ovo (5% de glicerol), acrescido de miricetina (0, 1, 10, 20, 30, 40, 100, 200, 300, 400 e 1000 nM) e congelado ($-196\text{ }^{\circ}\text{C}$). Após descongelação ($37^{\circ}\text{C}/30\text{s}$), avaliou-se cinética, iMPA, PMM, iROS, LPO, eMP e fertilidade *in vivo* (0 e 100 nM miricetina). As análises de 0, 1, 10, 100 e 1000 nM de miricetina evidenciaram: miricetina 10nM apresentou menor %RAP ($P \leq 0,05$), do que 1000nM. Amostras do controle apresentaram maior ($P \leq 0,05$) VAP que o 10nM, enquanto amostras com 10, 100 e 1000nM de miricetina evidenciaram maior BCF ($P \leq 0,05$), quando comparadas ao controle. Miricetina 1000nM apresentou maior percentual ($P < 0,05$) de células com LPO, do que o controle. Para 0, 20, 30, 40, 100, 200, 300 e 400 não houve efeito do tratamento ($P > 0,05$) para cinética e citometria de fluxo ($P > 0,05$), também não houve interações entre tratamento x tempo ($P > 0,05$). Para ambos houve efeito do tempo de incubação, em alguns parâmetros avaliados a MP, VCL, VSL, VAP, LIN, ALH, percentual de células com membrana plasmática e acrossomal intactas, estresse oxidativo e estabilidade de membrana foram reduzidos ($P < 0,05$) em todos os grupos, enquanto que o BCF ($P < 0,05$) aumentou em todos os grupos. A taxa de prenhez no grupo 100 nM de miricetina foi de 50% (5/10) e a do controle 10% (1/10). Nas análises *in vitro*, concluiu-se que a miricetina não tem efeito antioxidante sobre os espermatozoides criopreservados. No entanto, melhora a taxa de prenhez de ovelhas inseminadas.

Palavras-chave: espermatozoide, carneiros, flavonoides, congelação, inseminação artificial, citometria de fluxo.

ABSTRACT

Ram semen was diluted (200×10^6 sperm/mL) in Tris-egg yolk (5% glycerol), added of myricetin (0.1, 10, 20, 30, 40, 100, 200, 300, 400 and 1000 nM) and frozen (-196°C). After thawing ($37^\circ\text{C}/30\text{s}$), kinetics, iMPA, PMM, iROS, LPO, eMP and fertility *in vivo* (0 and 100 nM myricetin) were evaluated. The analyzes of 0, 1, 10, 100 and 1000 nM of myricetin showed: 10nM myricetin showed lower % RAP ($P \leq 0.05$), than 1000nM. Samples of control showed higher ($P \leq 0.05$) VAP than 10nM, while samples with 10, 100 and 1000nM of myricetin showed higher BCF ($P \leq 0.05$), when compared to control. Myricetin 1000nM presented higher percentage ($P < 0.05$) of cells with LPO, than the control. For 0, 20, 30, 40, 100, 200, 300 and 400 here was no treatment effect ($P > 0.05$) for kinetics and flow cytometry ($P > 0.05$), there were also no interactions between treatment and time ($P > 0.05$). For both there was effect of the incubation time, in some evaluated parameters, the PM, VCL, VSL, VAP, LIN, ALH, percentage of cells with intact plasma and acrosomal membrane, oxidative stress and membrane stability were reduced ($P < 0.05$) in all groups, while BCF ($P < 0.05$) increased in all groups.. The pregnancy rate in the 100 nM myricetin group was 50% (5/10) and that of the 10% control (1/10). In the *in vitro* analysis, it was concluded that myricetin has no antioxidant effect on cryopreserved spermatozoa. However, it improves the pregnancy rate of inseminated sheep.

Key words: sperm, ram, flavonoids, freezing, artificial insemination, flow cytometry.

1 INTRODUÇÃO

A criopreservação é uma ferramenta muito importante para a conservação do sêmen de reprodutores de qualquer espécie animal (ENGLAND, 1993). Entretanto, esse processo ocasiona a diminuição da fertilidade devido a danos estruturais e funcionais dos espermatozoides, estando entre os principais efeitos negativos desta técnica a perda de viabilidade, redução da motilidade e alterações morfológicas (CRITSER et al., 1987; CROSS; HANKS, 1991) que podem estar associados ao estresse oxidativo (WATSON, 2000).

Os espermatozoides são particularmente susceptíveis a danos induzidos por espécies reativas de oxigênio (ROS), pelo fato de sua membrana plasmática ser constituída por grandes quantidades de ácidos graxos poli-insaturados (AGP) e o seu citoplasma possuir baixas concentrações de enzimas antioxidantes (AITKEN, 1994). Estudos têm demonstrado que o uso de agentes antioxidantes em meios de refrigeração e congelamento de sêmen ajuda na proteção dos espermatozoides contra os danos induzidos pelos oxidantes sobre a sua motilidade, viabilidade, produção de energia e integridade do DNA, bem como interrompe a reação em cadeia da peroxidação lipídica ou liporeroxidação (LPO) (MAIA; BICUDO, 2009).

Os flavonoides são agentes antioxidantes que podem ser utilizados nos meios de criopreservação do sêmen, em virtude de apresentarem uma estrutura química adequada para a remoção de oxidantes, devido à presença de grupos hidroxila, que os torna mais potentes do que as vitaminas C e E (BARREIROS et al., 2006). Trabalhos vêm sendo realizados para avaliar os efeitos destes compostos sobre os espermatozoides (MARTINEZ-SOTO et al., 2010; MORETTI et al., 2012; SILVA et al., 2016).

Dentre os flavonoides está a miricetina (3,5,7,3',4',5'- hexa-hidroxiflavona), que se destaca por sua capacidade em eliminar radicais gerados por sistemas enzimáticos e não-enzimáticos, bem como por inibir a formação de malonaldeído (MDA) a partir do ácido araquidônico. Ressaltando-se, que o MDA é produzido durante o processo de LPO (ROBAK et al., 1986) e é uma causa importante de disfunção espermática (AITKEN, 1995).

Na literatura, não foram identificados relatos sobre a ação da miricetina em diluidores de congelamento de sêmen em nenhuma espécie, existindo apenas um relato com sêmen humano, em que é avaliada a capacidade da miricetina provocar mudanças como capacitação espermática em amostras de sêmen *in natura* (AQUILA et al., 2013), demonstrando, portanto, a necessidade de estudos que avaliem os possíveis efeitos dessa substância sobre a qualidade do sêmen quando utilizada para suplementação de diluidores de criopreservação, com o intuito de melhorar os resultados de prenhez após inseminação artificial utilizando sêmen congelado.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Ovinocultura

Os ovinos foram uma das primeiras espécies de animais domesticadas pelo homem (ZEUNER, 1963), devido à criação apresentar vários potenciais, como produção de leite, carne, pele e lã, sendo de grande importância para o sustento de pequenos criadores nas comunidades rurais (SCORTICHINI et al., 2015). De acordo com dados da Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação (FAO, 2015), existem cerca de 1,2 bilhões de ovinos no mundo. Desses, 18.433.810 encontram-se no Brasil, sendo, 18º maior rebanho do mundo, com a maior parte dos ovinos na Região Nordeste (IBGE, 2016).

Em 2015, a FAO estimou uma produção mundial de leite de ovelha de 10,52 milhões de toneladas e uma produção de carne de 13,76 milhões de toneladas. A maioria do leite de ovelha é produzida na região do Mediterrâneo, próximo ao Oriente. Ao contrário, a produção de carne é mais relevante na Ásia e na Oceania. Mais da metade da população mundial de ovinos encontra-se em países em desenvolvimento, sendo 39% na Ásia, 20% na África, 16% na Oceania, 15% na Europa e 10% na América.

Como demonstrado, a ovinocultura está presente em todos os continentes e esse fato se deve à capacidade que esses animais têm para se adaptarem a diferentes condições ambientais (PRIMO, 2004). Além disso, entre as espécies de ruminantes domesticados para produção de carne, os ovinos apresentam rápido ciclo produtivo de dez meses (cinco de gestação e cinco para cria e cria), o que faz da ovinocultura uma das atividades pecuárias com retorno econômico garantido (SANTELLO et al., 2006). No Brasil, de acordo com Madruga et al., 2005, a ovinocultura se apresenta como uma atividade promissora para o agronegócio, em virtude do Brasil possuir baixa oferta para o consumo interno da carne ovina e dispor dos requisitos necessários para ser um exportador desta carne.

A produção de ovinos é sustentável e tem um alto impacto socioeconômico sobre os agricultores brasileiros (PAGANOTI; RODRIGUES, 2010). Na Região Nordeste, este impacto é evidente, sendo uma atividade pecuária importante para o crescimento econômico. No entanto, a ovinocultura passa por constantes transformações na sua cadeia produtiva,

estimulada pela expansão dos mercados interno e externo de carnes e peles, que impulsiona o aumento populacional e a qualidade genética dos rebanhos, pressionando os criadores a adotarem tecnologias que sejam técnica e economicamente viáveis (SIMPLÍCIO et al., 2003).

Para que o aumento populacional e melhoramento genético dos rebanhos ovinos aconteçam é preciso que eles alcancem sua máxima eficiência produtiva e reprodutiva, por meio do uso de biotecnologias. Assim, para cada sistema de produção, uma ou mais técnicas de reprodução podem ou devem ser aplicadas, sendo escolhidas de forma cautelosa, de acordo com o perfil de cada rebanho.

2.2 Congelação de Sêmen

As primeiras tentativas de criopreservação de sêmen de mamíferos datam dos séculos XVIII e XIX, com as observações feitas por Spallanzani em 1776 e Mantegazza em 1866, com espermatozoides de cães. No entanto, essa tecnologia foi realmente desenvolvida no século 20, quando o glicerol foi utilizado como agente crioprotetor (POLGE et al., 1949). Assim, durante a década de 50, o sêmen de suínos, equinos e bovinos foram criopreservados com êxito (POLGE et al., 1957). O primeiro relato da congelação do sêmen ovino foi feito por Araújo em 1955 e, desde então, tem-se investido fortemente nessa tecnologia. Entretanto, o uso do sêmen congelado nessa espécie não apresenta bons resultados (MORAES, 2003).

Apesar de ser uma técnica amplamente utilizada, é sabido que os processos de congelação e descongelação prejudicam o espermatozoide devido à mudanças de temperatura, indução de estresse osmótico e formação de cristais de gelo (SAMPER et al., 1991; CEROLINI et al., 2001). Vale ressaltar que essas alterações afetam a membrana plasmática, o acrossoma, as mitocôndrias, a produção de ROS e a integridade do DNA, reduzindo, conseqüentemente, a motilidade e a sobrevivência do espermatozoide (GILLAN et al., 2004; DZIEKONSKA et al., 2009).

A extensão desses danos varia de acordo com as espécies e depende fortemente da resiliência do espermatozoide aos procedimentos de criopreservação (MAZUR et al., 2008; KOPEIKA, 2015). Os espermatozoides de carneiros são extremamente sensíveis às mudanças que acontecem durante todo o processamento (SALAMON; MAXWELL, 1995) devido à

grande quantidade de AGP presente em sua membrana plasmática (SANOCKA; KURPISZ, 2004).

Todas as alterações ocorridas durante a congelação-descongelação do sêmen ovino determinam baixos índices de fertilidade das fêmeas inseminadas. No entanto, esses índices podem ser melhorados com avanços na técnica de inseminação artificial e, principalmente, com melhorias nos protocolos e nos diluidores de preservação de sêmen (AISEN et al., 2005; CSEH et al., 2012). Durante cada etapa do ciclo de criopreservação, que inclui colheita, diluição, equilíbrio e congelação, as células podem perder a capacidade fertilizante (WATSON, 1995).

Na criopreservação, o sêmen deve ser refrigerado da temperatura corporal à temperatura ambiente (37 a 20 °C), sem ocasionar danos, sendo necessário diluir o sêmen em meio adequado. O estresse inicial ocorre quando o espermatozoide é submetido à temperatura de refrigeração (5 °C), devido à transição de fase da membrana plasmática do estado líquido cristalino para o estado de gel (GRAHAM, 1996; MEDEIROS et al., 2002). Quando efetuado de modo inadequado, o processo de refrigeração do sêmen causa choque térmico, que induz a ocorrência de danos espermáticos irreversíveis (GRAHAM, 1996).

Entre as temperaturas de -5 a -10 °C, inicia-se a formação de cristais de gelo no meio extracelular, alterando o equilíbrio osmótico e ocasionando a desidratação celular (SQUIRES, 1999). As células normalmente resistem à redução da temperatura, entretanto não suportam a formação de cristais de gelo extracelular e ao desequilíbrio osmótico (HOLT, 2000). Além dos danos ocasionados pelo choque térmico, osmótico e pela formação dos cristais de gelo, são observados danos oxidativos que podem acontecer durante todo o processamento. Fisiologicamente a célula espermática produz uma variedade de ROS, incluindo ânion superóxido, peróxido de hidrogênio e óxido nítrico. Pequenas quantidades de ROS são funcionalmente importantes para conduzir cascatas de fosforilação de tirosina associadas à capacitação espermática. No entanto, quando a produção de ROS excede as defesas antioxidantes do espermatozoide, determina estresse oxidativo (EO), caracterizado por dano peroxidativo à membrana plasmática e quebra da cadeia de DNA no núcleo da célula (HOLT, 2000, WATSON, 1995, WATSON, 2000).

Esse processo de EO não só prejudica o potencial de fertilização espermática, mas também sua capacidade de originar um embrião normal e saudável. A formação de ROS pelos espermatozoides pode ser uma possível explicação da má qualidade do sêmen, seja na amostra fresca ou após o processamento, para uso em várias tecnologias reprodutivas (AITKEN et al., 2009; GUTHRIE; WELCH, 2006).

2.2.1 Estresse oxidativo

O estresse oxidativo é ocasionado por um desequilíbrio na quantidade de ROS, que pode ser causado por diversos fatores relacionados com o aumento da produção de ROS e/ou a redução da disponibilidade de antioxidantes (De LAMIRANDE; GAGNON, 1995). Assim, pode ser definido como o desequilíbrio entre a produção de ROS e a capacidade dos sistemas biológicos para desintoxicar prontamente os intermediários reativos ou reparar facilmente os danos ocasionados (AGARWAL et al., 2003). Sob condições oxidativas, todos os componentes celulares são alvos das ROS, que podem resultar em morte celular (AGARWAL et al., 2008).

A célula espermática é capaz de gerar e degradar ROS, que em pequenas quantidades são necessárias para o funcionamento normal da célula. Vários estudos foram realizados visando entender o papel desses radicais na função espermática, onde se evidenciou a participação do ânion superóxido e do peróxido de hidrogênio, mesmo em baixas concentrações, nos eventos que culminam com a fertilização em diferentes espécies (MAIA; BICUDO, 2009)

Nos espermatozoides, as principais causas de EO são as elevadas concentrações de ROS produzidas por gametas imaturos ou anormais (BAILEY et al., 2000; GIL-GUZMAN et al., 2001) e leucócitos (ESFANDIARI et al., 2003), além das baixas concentrações de antioxidantes presentes no plasma seminal (YEUNG et al., 1998). Por conseguinte, EO é um dos fatores mais importantes que contribuem para a má qualidade do sêmen (BUCAK et al., 2010).

Durante a criopreservação do sêmen, pode-se induzir a formação de ROS devido ao choque térmico, a exposição ao oxigênio atmosférico e a remoção do plasma seminal

(WATSON, 2000). Tais procedimentos com elevação na quantidade de ROS, desencadeiam a LPO dos espermatozoides (BUCAK et al., 2008).

2.2.2 Peroxidação lipídica ou lipoperoxidação

A LPO é definida como a deterioração oxidativa de AGP, sendo estes últimos classificados como aqueles que contêm duas ou mais duplas ligações carbono-carbono ($H_2C=CH_2$). A LPO é mediada por radicais livres, que atacam as ligações carbono-carbono, e são excelentes alvos das ROS (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1999; NORDBERG; ARNÉR, 2001). Ela ocorre por meio de um mecanismo de reação em cadeia e pode ser iniciado enzimaticamente ou não, sendo os AGP das membranas celulares destruídos pela peroxidação, levando à desestabilização e perda da integridade dessas membranas (TAPPEL, 1978; BUS; GIBSON 1979). Por isso, uma maior suscetibilidade aos danos peroxidativos nos espermatozoides é observada na presença de alto teor de AGP na membrana plasmática (HAMMERSTEDT, 1993). Estes AGP, particularmente em espermatozoides mortos (PAGL et al., 2006), se ligam ao oxigênio, resultando na produção de altos níveis de ROS (MAIA et al., 2010; GADEA et al., 2013).

O processo de criopreservação é um fenômeno prejudicial às células, resultando em diminuição da qualidade do espermatozoide e tendo como uma das causas o excesso de produção ROS durante os ciclos de congelação-descongelação, que desencadeia a LPO (NASEER et al., 2015; AMIDI et al., 2016; SEIFI-JAMADI et al., 2016), e é uma causa particularmente importante de disfunção espermática. Espermatozoides com LPO apresentam redução da fluidez da membrana e da sua capacidade de fertilização (AITKEN, 1995). A LPO e o EO podem ser controlados ou mesmo revertidos por meio da ação dos antioxidantes, que podem ser adicionados aos diluidores de criopreservação, a fim de manter o equilíbrio entre agentes oxidantes e antioxidantes (MAIA, 2006), melhorando a qualidade seminal após a descongelação.

2.3 Terapias Antioxidantes

Estudos revelam que células e órgãos necessitam de defesa contra oxidantes, sem os quais a sobrevivência em condições aeróbicas seria comprometida. Em vista da grande variedade de oxidantes existentes, não é surpreendente que a natureza tenha desenvolvido uma grande quantidade de diferentes tipos de antioxidantes (SIES, 1993).

Os antioxidantes, em uma ampla definição, são quaisquer substâncias que, presentes em baixas concentrações quando comparada a de um substrato oxidável, atrasa ou inibe a oxidação deste substrato de maneira eficaz (SIES; STAHL, 1995), evitando o início ou a propagação das reações em cadeia de oxidação (DEGÁSPARI; WASZCZYNSKYJ, 2004).

Os antioxidantes são classificados em dois sistemas que os dividem como enzimáticos, composto pelas enzimas produzidas no organismo, superóxido dismutase (SOD); catalase (CAT), peroxirredoxinas (Prx), glutathione (GSH), glutathione redutase (GR) e glutathione peroxidase (GPx), e os não enzimáticos, conhecidos como antioxidantes sintéticos ou suplementos da dieta, como vitaminas, flavonoides, licopeno e bilirrubina (ANDRADE et al., 2010; VASCONCELOS et al., 2014). No sêmen, estão presentes antioxidantes que constituem os sistemas de defesa antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos (SANOCCA; KURPISZ, 2004; SILVA et al., 2011).

De modo geral, o mecanismo de defesa antioxidante é dividido nas etapas de prevenção, onde é inibida a produção de ROS (quelantes de metais e as proteínas de ligação de metais, que bloqueiam a formação de novos ROS); interceptação, que interrompe a reação; e de reparação, que não é observada nos espermatozoides, devido ao carente sistema enzimático presente em seu citoplasma (SALEH; AGARWAL, 2002; AGARWAL et al., 2005).

Estão envolvidos na etapa de prevenção a GSH, SOD, CAT, GPx e vitamina E, enquanto nos reparos de lesões o ácido ascórbico (vitamina C), a glutathione reduzida (GSH-Rd) e GPx (FERREIRA; MATSUBARA, 1997). Já foi demonstrado que no sêmen de ovinos há presença de antioxidantes como a SOD, GPx e CAT (MANN; LUTWAK-MANN, 1981). Contudo, no período de maturação, as células espermáticas perdem a maior parte de seu citoplasma, sendo privados de uma fração dos antioxidantes endógenos, tornando-os susceptíveis à ação das ROS (CARVALHO et al., 2002). Deste modo, espermatozoides

maduros passam a depender da proteção dos antioxidantes presentes no plasma seminal (CARVALHO et al., 2002; ALVAREZ; MORAES, 2006).

Durante o processo de criopreservação do sêmen, há um favorecimento do desequilíbrio entre oxidantes e antioxidantes, em favor dos agentes oxidativos, com comprometimento da integridade estrutural e funcional dos espermatozoides (WATSON, 2000; GUERRA et al., 2004). Alguns fatores podem provocar este desequilíbrio, como por exemplo a diluição do sêmen, comumente utilizada nos processos de criopreservação, que promove a redução da concentração de antioxidantes presentes no plasma seminal e favorece a oxidação (BILODEAU et al., 2000).

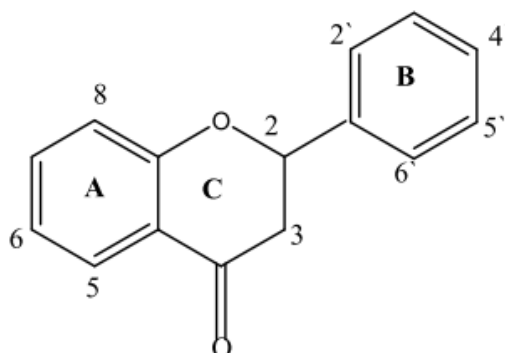
Com isso, faz-se necessária a adição de substâncias com atividade antioxidante nos diluidores de criopreservação (MAXWELL; STOJANOV, 1996), a fim de promover um balanço entre a produção de ROS e a desintoxicação dos mesmos, podendo ser um importante fator de sobrevivência e funcionalidade dos espermatozoides antes, durante e após sua criopreservação, exercendo influência direta sobre a fertilidade (BILODEAU et al., 2000).

2.3.1 Flavonoides

Flavonoides são um dos mais numerosos e generalizados grupos de constituintes naturais, onde mais de 8.000 tipos já foram identificados (PIETTA, 2000). Os flavonoides são compostos polifenólicos biossintetizados a partir da via dos fenilpropanoides e do acetato, precursores de vários grupos de substâncias, como aminoácidos alifáticos, terpenoides, ácidos graxos, dentre outros (MANN, 1987). Eles participam de importantes funções no crescimento, no desenvolvimento e na defesa dos vegetais contra o ataque de patógenos (DIXON; HARRISON, 1990). Estes derivados de benzo-y-pirona de baixo peso molecular estão presentes nas plantas e são acessíveis aos animais por meio de sua dieta.

Eles são encontrados em frutas, vegetais, nozes, sementes, folhas, flores e cascas (HARBORNE et al., 1975) e são caracterizados por uma estrutura de difenilpropano ($C_6C_3C_6$) (HERTOG et al., 1993), com dois anéis benzênicos (A-B), ligados a um anel pirano (C) (Fig. 1).

Figura 1. Estrutura básica dos flavonoides (DORNAS et al., 2007)



Os flavonoides podem ocorrer como agliconas, glicosídeos ou como parte de outras estruturas que contenham flavonoides, como as flavolignanas, porém frequentemente ocorrem como glicosídeos. As subclasses dos flavonoides são: chalconas, dihidrochalconas, auronas, flavonas, flavonóis, dihidroflavonol, flavanonas, flavanol, flavandioli, antocianidina, isoflavonoides, bioflavonoides e proantocianinas (BRAVO, 1998). Na subclasse dos flavonóis, os mais encontrados em vegetais são canferol, quercetina e miricetina (FENNEMA, 1992).

Efeitos farmacológicos dessas substâncias foram observados em 1936 por Rusznyak e Szent-Gyorgyi, onde esses compostos foram descritos por apresentarem uma miríade de efeitos farmacológicos sobre os sistemas biológicos (CODY et al., 1986). Alguns flavonoides foram relatados como tendo efeitos antioxidativos, inibindo fenômenos mediados por radicais livres (TOREL et al., 1986).

A capacidade antioxidante de compostos fenólicos é determinada por sua estrutura, em particular por hidroxilas que podem doar elétrons e suportar, como resultado, a deslocalização em torno do sistema aromático. Outro determinante estrutural importante é a capacidade antioxidante dos flavonoides, atribuídas às hidroxilas em C4 e C3, que atuam no aumento do potencial antioxidante (LIEN et al., 1999).

Os flavonoides são antioxidantes efetivos devido às suas propriedades sequestrantes de radicais livres e por quelar íons metálicos (KANDASWAMI; MIDDLETON, 1994). A propriedade antioxidante é direcionada sobre o radical hidroxil (OH) e o ânion superóxido (O_2^-), que são espécies altamente reativas envolvidas na iniciação da LPO. Além destes efeitos importantes, os flavonoides têm propriedades estabilizadoras de membrana (GALATI et al., 2002). Estudos indicam que agliconas, incluindo quercetina, luteolina, miricetina e canferol, possuem grande capacidade antioxidante, maior que de flavonoides conjugados, como a quercetina-3-glicosídica, quercetina e rutina (NOROOZI et al., 1998).

Eles diferem entre si por sua estrutura química e características particulares (NIJVELDT et al., 2001), e sua atividade antioxidante depende de sua estrutura, podendo ser determinada por cinco fatores: reatividade como agente doador de H e elétrons, estabilidade do radical flavanoil formado; reatividade frente a outros antioxidantes, capacidade de quelar metais de transição, solubilidade e interação com as membranas (BARREIROS et al., 2006). O pH dos tecidos biológicos também é um fator que pode influenciar na atividade antioxidante dos fenóis (DECKER, 1997).

- Miricetina

Dentre os flavonoides, encontra-se a miricetina, que é um flavonol encontrado na natureza e estruturalmente similar à quercetina, encontrada em quantidades significativas em bagas, chás e vinho tinto (HUANG et al., 2010). A hidroxilação na posição 5' no anel B (Fig. 2 e 3) conduz à formação de miricetina a partir da quercetina (MATTIVI et al., 2006). No entanto, pouca atenção é dada à avaliação das atividades biológicas da miricetina, embora seja ela semelhante à quercetina e abundante em plantas e alimentos. As atividades da quercetina incluem a eliminação de radicais de oxigênio, a inibição da LPO e a quelação de íons metálicos (FORMICA; REGELSON, 1995).

Figura 2. Estrutura química da Quercetina (ALVES et al., 2007)

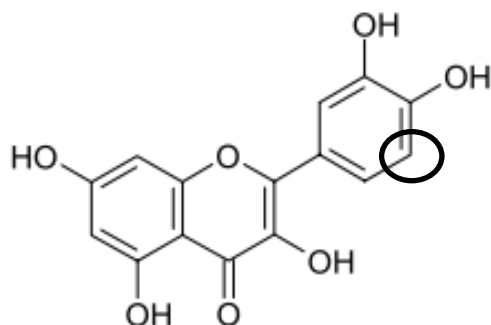
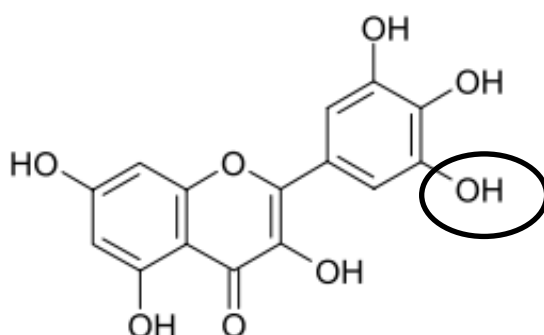


Figura 3. Estrutura química da Miricetina (ALVES et al., 2007)



Dados controversos estão disponíveis na literatura sobre o potencial terapêutico da miricetina, uma vez que tem sido relatado apresentar tanto ação antioxidante (SELLAPPAN; AKOH, 2002) quanto pró-oxidante (CHOBOT; HADACEK, 2011) *in vitro*, bem como propriedade anti-cancerígena (HE et al., 2008) e pró-tumorigênica (MAGGIOLINI et al., 2005). Foi demonstrado que, entre os flavonoides (quercetina, kaempferol, catequina e rutina), a miricetina apresenta a maior capacidade antioxidante por possuir mais grupos hidroxilo fenólicos (PEKKARINEN, 1999). Verificou-se que a atividade antioxidante dos

flavonoides aumenta dependendo do número de grupos hidroxílicos fenólicos (PEKKARINEN, 1999).

Estes grupos fenólicos proporcionam ligação a receptores estrogênicos (atividade fitoestrogênica). Assim, a miricetina pode atuar também como agonista ou antagonista de estrogênio (AQUILA et al., 2013). Fitoestrógenos são compostos presentes na natureza que apresentam estrutura química semelhante ao estradiol, um estrógeno endógeno. Como resultado, esses compostos vegetais biologicamente ativos podem se ligar a receptores de estrógenos em várias células (AQUILA et al., 2013), uma vez que foi mostrado que a miricetina provoca atividade estrogênica (MAGGIOLINI et al., 2005) e que os estrogênios são capazes de estimular a capacitação espermática e as consequentes alterações bioquímicas, como o aumento da taxa metabólica e gasto energético global (VISCONTI et al., 1998; BALDI et al., 2000; AQUILA et al., 2005). Portanto, é importante determinar se este flavonol afeta a função de espermatozoides maduros de uma forma que possa alterar a fertilidade.

2.4 Avaliação do Sêmen

A análise do sêmen nas mais variadas espécies é baseada em técnicas de microscopia de luz, tendo como principais parâmetros avaliados motilidade, vigor, concentração e morfologia (FREITAS-DELL'AQUA et al., 2009). Embora úteis, esses testes não são completamente confiáveis ou reprodutíveis, devido ao pequeno número de espermatozoides avaliados, falta de objetividade e erro humano (GRAHAM et al., 1980).

Mais, objetividade e repetibilidade na avaliação do sêmen podem ser alcançadas com uso do sistema computadorizado de análise do sêmen - CASA (DAVIS; SIEMERS, 1995) e da citometria de fluxo (SHAPIRO, 1988; EVENSON et al., 1994), uma vez que superam habilidade que as pessoas têm em identificar padrões de motilidade ou de anormalidades espermáticas. O poder de análise destes testes é dado pela avaliação precisa e acurada dos espermatozoides, podendo, assim, melhorar o processo de avaliação seminal em animais (ARRUDA, 2000).

Além destes, testes de fertilidade podem ser realizados por meio da inseminação artificial ou da fertilização *in vitro*, representando técnicas de alta sensibilidade para o acesso

de avaliação da capacidade de fertilização das amostras seminais (CRESPILHO et al., 2009) e permite fazer avaliação simultânea dos requisitos mais importantes da célula espermática para o processo de fertilização (RODRIGUEZ-MARTINEZ, 2005).

2.4.1 Sistema computadorizado de análise do sêmen – CASA

A análise de sêmen por computador foi proposto por Dott e Foster em 1971, onde vários parâmetros poderiam ser analisados, como por exemplo, concentração, motilidade e morfologia espermática. O primeiro sistema CASA para comercialização desenvolvido especificamente para avaliação da motilidade espermática foi o CellSoft® (CRYO Resources, Montgomery, New York), comercializado por volta de 1985 para uso em laboratório de pesquisa e laboratórios médicos (MACK et al., 1988). Os equipamentos utilizados nos sistemas CASA variam entre aparelhos, ópticas e *software* usados para identificação e reconstrução da trajetória (VERSTEGEN et al., 2002).

Estes sistemas fornecem informações precisas sobre diferentes características do movimento (GRAVANCE; DAVIS, 1995; HOLT; PALOMO, 1996), como motilidade total (MT) e progressiva (MP), linearidade (LIN), retilinearidade (STR), índice de oscilação (WOB), velocidade curvilínea (VCL), velocidade em linha reta (VSL), velocidade média da trajetória (VAP), deslocamento lateral da cabeça (ALH) e frequência de batimento cruzado (BCF). Desta forma, o sistema torna-se uma ferramenta útil no monitoramento da qualidade espermática de amostras submetidas a diferentes tratamentos experimentais (FARREL et al., 1996), na pesquisa de novos diluidores seminais, crioprotetores ou outros tipos de processamento (AMANN; KATZ, 2004), além de avaliar a hiperativação, estabelecer relação entre qualidade do sêmen e a fertilidade da amostra, assim como auxiliar nas avaliações gerais para uso de machos para reprodução (FARREL et al., 1996; VERSTEGEN et al., 2002).

Este detalhamento da cinética celular proporcionado pelo CASA reflete a atividade metabólica espermática (GIL et al., 2000) e a qualidade dos espermatozoides presentes em uma amostra seminal (FARREL et al., 1996). Entretanto, a motilidade espermática representa apenas um dos vários pré-requisitos básicos indispensáveis para que os espermatozoides

concluem com êxito sua função biológica representada pela fertilização do oócito (GRAHAM; MOCÉ, 2005).

2.4.2 Citometria de fluxo

É uma tecnologia de alta velocidade pela qual células únicas, agregados celulares ou pequenos organismos multicelulares em suspensão líquida podem ser classificados e ordenados de forma viável e em tempo real (GOOLSBY; HANSEN, 2014). Todos os tipos de citometro de fluxo (fluidos, óticas e eletrônicas) realizam as mesmas tarefas básicas: suspender partículas em uma corrente de fluido e, em seguida, analisar as características físicas e químicas das partículas, à medida que passam por um laser (MACEY, 2007), executando a análise de milhares de células individuais por segundo e medindo vários parâmetros simultaneamente (DING et al., 2017).

A citometria de fluxo foi primeiramente desenvolvida por Moldovan em 1934, que desenvolveu um sistema em que células coradas dentro de um tubo capilar, sob a luz do microscópio óptico, passavam por um detector fotoelétrico e procedia a contagem celular, conforme a incidência da luz. A adaptação da citometria para a avaliação dos espermatozoides começou quando esta tecnologia foi utilizada para medir o conteúdo de DNA destas células (EVENSON et al., 1980).

Sua aplicação nas análises do sêmen aumentou gradualmente (GILLAN et al., 2005), permitindo a observação de características físicas, como o tamanho da célula, a forma e a complexidade interna, e qualquer componente ou função do espermatozoide que possa ser detectado por um fluorocromo (LARSSON; RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ et al., 2000), podendo ser utilizado para avaliação de características como viabilidade celular, integridade acrossomal, função mitocondrial, status de capacitação, fluidez da membrana e estado do DNA (GILLAN et al., 2005), de forma objetiva, com um alto nível de repetibilidade experimental. Além disso, permite a associação de fluorocromos, sendo vários atributos da mesma célula avaliados simultaneamente (LARSSON; RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ et al., 2000), tornando mais precisa a previsão de fertilidade da amostra analisada (AMMAN; HAMMERSTEDT, 1993).

Para realização destas análises, diferentes marcadores fluorescentes podem ser utilizados (GRAHAM et al., 1990). A capacidade de análise multiparamétrica em combinação com os corantes fluorescentes permitem a análise e identificação de populações de células em amostras heterogêneas, como o sêmen (MACEY, 2007; CHATTOPADHYAY et al., 2008), e novos corantes e técnicas fluorescentes são desenvolvidas continuamente e possuem potencial aplicação para a avaliação na citometria de fluxo de espermatozoides (GILLAN et al., 2005).

Além dos avanços nas técnicas e nos fluorocromos, os aparelhos de citometria também passam por inovações, como o desenvolvimento da citometria de fluxo associada à imagem, que é uma técnica de alto desempenho, que combina as capacidades de análise de imagem da microscopia com o aumento da produção e o poder estatístico da citometria de fluxo tradicional (BASJI et al., 2007). Ao longo da última década, a instrumentação de citometria e a tecnologia de processamento de imagem avançaram até o ponto em que a citometria de fluxo baseada em imagem de alto rendimento está disponível para um segmento maior da comunidade científica. Em particular, avanços significativos foram realizados não apenas ao hardware, mas à análise de software (McFARLIN e GARY, 2017).

A seguir estão alguns dos parâmetros e associações de fluorocromos que podem ser analisados na citometria de fluxo:

- Integridade membranas plasmática e acrossomal (FITC-PNA + Iodeto de propídeo)

A associação dos fluorocromos FITC-conjugada ao *Peanut agglutinin* (FITC-PNA) e iodeto de propídeo (IP) é utilizada para avaliação da integridade das membranas plasmática (IP) e acrossomal (FITC-PNA). A primeira citação na literatura sobre a associação de sondas fluorescentes para avaliar simultaneamente membranas plasmática e acrossomal foi de Graham et al. (1990), usando um sistema de citometria de fluxo. A integridade de membrana plasmática é comumente analisada após a marcação dos espermatozoides a corantes impermeáveis à membrana. Desta forma, os gametas não corados são considerados viáveis (SILVA; GADELLA, 2006), e dentre estes corantes encontramos o IP.

A membrana plasmática circunda todo o espermatozoide e mantém suas organelas e componentes intracelulares e, por meio de suas características semipermeáveis, mantém o

gradiente químico de íons e outros componentes solúveis (SCHURMANN et al., 2002). Se esta membrana não estiver funcionalmente intacta, o espermatozoide é considerado deteriorado (morto) e *in vivo* não é capaz de fertilizar o oócito (LIU et al., 2004), daí a importância de se avaliar seu estado.

Além disso, a manutenção da integridade do acrossoma também é de fundamental importância para que haja a fertilização do oócito (HAFEZ; HAFEZ, 2004), sendo a reação acrossômica caracterizada pela liberação das enzimas acrossomais, essenciais para a penetração do espermatozoide na zona pelúcida e fusão com a membrana plasmática do oócito (DIAZ-PERES et al., 1988).

Para a avaliação da integridade do acrossoma podem ser utilizadas diversas técnicas fluorescentes com lectinas conjugadas, as quais interagem com glicoconjugados exclusivamente localizados no acrossoma (HOLT, 2000; SILVA; GADELLA, 2006; ARRUDA et al., 2007).

Na Figura 4, pode-se observar, por meio das imagens de citometria de fluxo de espermatozoides marcados com FITC-PNA e IP, células que apresentam marcação PNA-/IP-, classificadas como portadoras de membranas acrossomal e plasmática intactas; células com marcação PNA+/IP-, classificadas como de membrana acrossomal reagida e plasmática intacta; células com marcação PNA-/IP+, classificadas como portadoras de membrana acrossomal intacta e plasmática lesionada; e células com marcação PNA+/IP+, classificadas com membranas acrossomal e plasmática lesionadas.

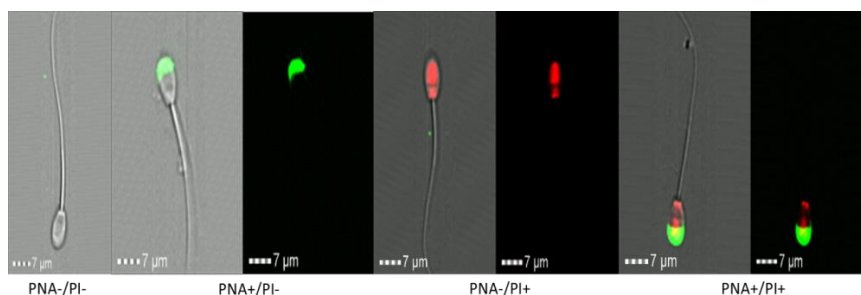


Figura 4. Avaliação de integridade das membranas plasmática e acrossomal de espermatozoides com FITC-PNA (acrossomal) e iodeto de propídeo (membrana plasmática) (Arruda et al., 2018). Células PNA-/IP-, classificadas como portadoras de membranas

acrossomal e plasmática intactas; células com marcação PNA+/IP-, classificadas como de membrana acrossomal reagida e plasmática intacta; células com marcação PNA-/IP+, classificadas como portadoras de membrana acrossomal intacta e plasmática lesionada; e células com marcação PNA+/IP+, classificadas com membranas acrossomal e plasmática lesionadas.

- Estabilidade de membrana (Merocianina 540 / YO-PRO-1 Iodide)

Apesar de relatos anteriores de que a integridade das membranas é pré-requisito para a viabilidade do espermatozoide, se esta não estiver funcionalmente estável, o espermatozoide não é capaz de interagir com o ambiente do trato genital da fêmea e, conseqüentemente, fertilizar (RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, 2007).

Para que o espermatozoide se ligue ao oócito, ele deve passar pelo processo de capacitação espermática, quando a membrana da célula passa por uma reorganização e desestabilização. Portanto, quando a capacitação ocorre prematuramente, determinando a exocitose do acrossoma ou morte celular, a fertilização é prejudicada. É sabido que durante o processo de criopreservação ocorrem mudanças nos espermatozoides semelhantes à capacitação fisiológica (AUSTIN, 1952; CORMIER et al., 1997; GADELLA; HARRISON, 2000, JANUSKAUSKAS et al., 2000).

Portanto, a estabilidade de membrana é mais um parâmetro que deve ser analisado. Para tanto, o fluorocromo merocianina 540 (M540) pode ser utilizado. Este corante monitora a ordem dos fosfolípidios no folheto externo da bicamada lipídica da membrana plasmática (LANGNER; HUI, 1993) e detecta mudanças induzidas pelo bicarbonato no envelope lipídico e sua distribuição dentro da membrana plasmática (KUMARESAN et al., 2011).

O bicarbonato provoca mudanças na fluidez da membrana, que parecem ser alterações precoces no processo de capacitação, com isso a M540 é capaz de se interligar à membrana e atuar como um marcador útil para identificar a desestabilização de membrana (HARRISON et al., 1996; GREEN; WATSON, 2001). De acordo com Steckler et al. (2015), a coloração de espermatozoides com M540 proporciona uma avaliação rápida e objetiva da estabilidade da membrana de uma grande população de espermatozoides, por meio de citometria de fluxo.

Além disso, a coloração com M540 pode ser combinada com a sonda de ligação de DNA impermeável à membrana Yo-Pro 1- Iodide (YO), para analisar simultaneamente a viabilidade das células espermáticas (HALLAP et al., 2006). O conhecimento da quantidade de espermatozoides viáveis, com membrana plasmática estável, numa dose inseminante proporciona informações valiosas sobre sua qualidade (THUNDATHIL et al., 1999).

A seguir, tem-se imagens da citometria de fluxo (Fig. 5), onde se observa os padrões de marcação de espermatozoides expostos a M540 e o YO, sendo identificadas quatro populações: células viáveis com membrana estável (M540-/YO-); células viáveis com membrana desestabilizada (M540+/YO-); células não viáveis com membrana estável (M540-/YO+) e células não viáveis com membrana desestabilizada (M540+/YO+).

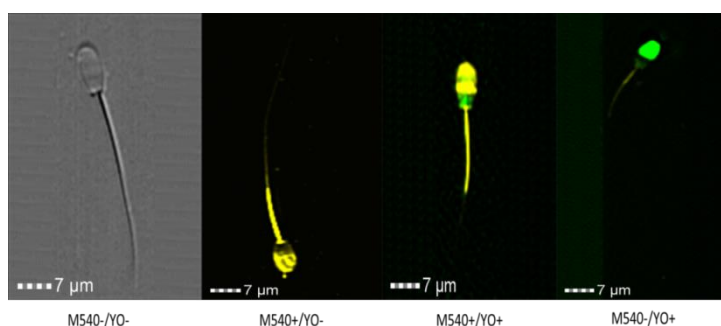


Figura 5. Avaliação da estabilidade de membrana espermática com Merocianina 540 (avalia estabilidade) e Yo-pro-1 (viabilidade) (Arruda, 2017). Células viáveis com membrana estável (M540-/YO-); células viáveis com membrana desestabilizada (M540+/YO-); células não viáveis com membrana estável (M540-/YO+) e células não viáveis com membrana desestabilizada (M540+/YO+).

- Potencial de membrana mitocondrial (JC-1)

O funcionamento mitocondrial de maneira ordenada e aprimorada é crucial para os espermatozoides de mamíferos, sendo relacionado com altas taxas de funcionalidade e fertilidade da célula espermática (ANGRIMANI et al., 2015). A mitocôndria possui papel central na viabilidade e na morte celular, estando relacionada com a funcionalidade da célula espermática (St. JOHN, 2002).

Nas células espermáticas, as mitocôndrias estão dispostas de forma helicoidal na peça intermediária e o ATP produzido serve como suplemento energético para os batimentos flagelares, sendo indispensável para que haja motilidade (COSSON, 1996). Alguns marcadores fluorescentes conseguem avaliar o potencial da membrana mitocondrial (PMM), que está relacionado à capacidade da mitocôndria em bombear prótons da matriz mitocondrial para o espaço intermembranar, por meio da energia livre gerada pelo transporte de elétrons, produzindo um gradiente eletroquímico (CHEN, 1988).

Dentre os marcadores, pode-se encontrar o 5,5',6,6'-tetracloro-1,1,3,3'-tetraetilbenzimidazolilcarbocianina (JC-1), que, dependente do gradiente eletroquímico, precisa de PMM altamente negativo para penetrar na mitocôndria e emitir fluorescência nos comprimentos de onda de luz vermelha ou verde, de acordo com sua concentração interna final (ARRUDA et al., 2007).

Este corante vem sendo amplamente utilizado para detectar casos de infertilidade masculina (HU et al., 2009), avaliar o efeito da função mitocondrial nas taxas de fecundação *in vitro* (KASAI et al., 2002) e do potencial mitocondrial de espermatozoides equinos (PUKAZHENTHI et al., 2014) e bovinos (CASTRO et al., 2016), além de atuar como ferramenta para avaliar o efeito da criopreservação espermática (CELEGHINI et al., 2008).

Na Figura 6 estão apresentadas imagens, por meio de citometria de fluxo, de espermatozoides marcados com JC-1, onde células que apresentam a peça intermediária coradas em laranja possuem alto potencial de membrana mitocondrial e células com peça intermediária coradas em verde apresentam baixo potencial de membrana mitocondrial.

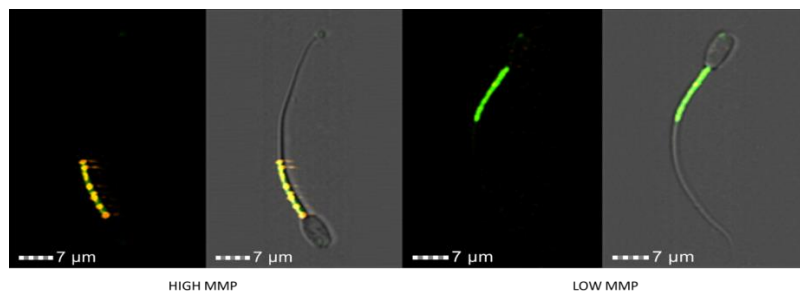


Figura 6. Avaliação do potencial de membrana mitocondrial de espermatozoides utilizando JC-1 (Arruda, 2017). Células que apresentam a peça intermediária coradas em laranja

possuem alto potencial de membrana mitocondrial e células com peça intermediária coradas em verde apresentam baixo potencial de membrana mitocondrial.

- Níveis de ROS intracelular (CM-H₂DCFDA + Iodeto de propídeo)

Em tópico anterior já foi abordada a produção de ROS pelos espermatozoides, seus efeitos benéficos quando produzidas em níveis fisiológicos e suas desvantagens quando produzidas em excesso, desencadeando o EO. Portanto, nesta sessão será abordado apenas a avaliação da produção de ROS pelas células espermáticas.

A detecção e avaliação do EO são importantes tanto para estudos fisiológicos quanto para patológicos. A detecção de ROS pode ser feita por meio de reagentes que se acumulam intracelularmente e se tornam fluorescentes após a oxidação, como é o caso do CM-H₂DCFDA (5- (e 6-) clorometil-2',7'- diacetato de diclorodihidrofluoresceína, acetil éster), que penetra na membrana plasmática e é retida depois que as esterases intracelulares clivam os grupos acetato e emitem fluorescência verde após a oxidação. (MARTÍNEZ-PASTOR et al., 2010; KALYANARAMAN et al., 2012).

Este fluorocromo é frequentemente chamado de "sonda de detecção de peróxido de hidrogênio para a medição de peróxido de hidrogênio em células intactas". No entanto, o intervalo de ROS detectado por esta sonda é muito mais amplo (KALYANARAMAN et al., 2012). A oxidação de H₂DCF para DCF ocorre em duas etapas: primeiro, o radical DCF é formado, e depois é oxidado para DCF em uma reação com oxigênio molecular (WARDMAN, 2007). O primeiro passo da oxidação de H₂DCF pode ser mediado por diferentes espécies de radicais (radical hidroxilo, radical carbonato e dióxido de nitrogênio), bem como por radicais de tiol resultantes da oxidação do tiol (KALYANARAMAN et al., 2012; WINTERBOURN, 2014).

Esta sonda pode ser associada a corantes de viabilidade, como é o caso do IP, para eliminar a população de células não viáveis da análise (MARTÍNEZ-PASTOR et al., 2010), já que o corante ficará acumulado apenas em células com a membrana plasmática intacta. Na Figura 7 encontram-se imagens de espermatozoides marcados com o CM-H₂DCFDA associado ao IP, por citometria de fluxo, onde se observam os seguintes padrões de marcação:

células viáveis com altos níveis de ROS (DCFDA+), aquelas marcadas em verde fluorescente, ou células viáveis com baixa produção de ROS (DCFDA-), aquelas não marcadas ou com baixa intensidade de fluorescência.

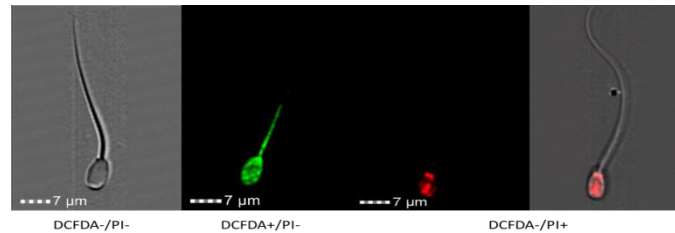


Figura 7. Avaliação dos níveis de ROS intracelular em espermatozoides com CM-H₂DCFDA (níveis de ROS) e IP (integridade de membrana) (Arruda, 2017). Células viáveis com altos níveis de ROS (DCFDA+), aquelas marcadas em verde fluorescente, ou células viáveis com baixa produção de ROS (DCFDA-), aquelas não marcadas ou com baixa intensidade de fluorescência.

- Peroxidação lipídica (C₁₁-BODIPY^{581/591})

O C₁₁-BODIPY^{581/591} (4,4-difluoro-5-(4-fenil-1,3-butadienil)-4-bora-3a-ácido4a-diaza-s-indaceno-3-undecanóico) é uma sonda fluorescente de membrana, cuja fluorescência altera, irreversivelmente, quando as células são expostas às ROS (PAP et al., 1999), tratando-se de uma enzima de oxidação fluorescente, análoga de ácidos graxos, que é facilmente incorporada à membrana (DRUMMEN et al., 2002). Esta sonda emite fluorescência laranja em seu estado não oxidado (excitação a 581 nm e emissão 591 nm), deslocando-se para a fluorescência verde quando peroxidado (excitação a 500 nm e emissão a 510 nm) (CHRISTOVA et al., 2004), como demonstrado na Figura 8.

O ataque oxidante nas membranas resulta em LPO, afetando negativamente a qualidade do espermatozoide. O C₁₁-BODIPY^{581/591} tem sido utilizado para avaliar a peroxidação lipídica, por citometria de fluxo, em espermatozoides (BROUWERS; GADELLA, 2003).

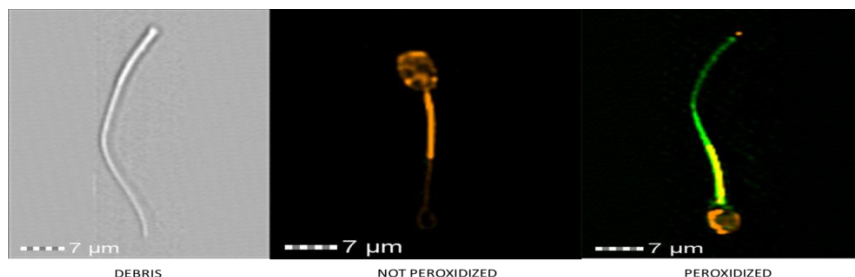


Figura 8. Avaliação da peroxidação lipídica de espermatozoides com C_{11} -BODIPY^{581/591} (Arruda, 2017). Células apresentando fluorescência laranja em seu estado não peroxidado, deslocando-se para a fluorescência verde quando peroxidado.

2.5 Inseminação Artificial

A IA é uma técnica de reprodução animal que consiste em introduzir o sêmen, por meios instrumentais, no local mais apropriado do sistema genital da fêmea, possibilitando a ocorrência da fertilização (OBERLENDER et al., 2008). A primeira IA de que se tem relato foi realizada pelos árabes em 1332, em equinos. Porém a primeira inseminação registrada foi realizada em 1779, por Lázaro Spalanzani que colheu sêmen de cão e o aplicou em uma cadela em cio, e esta pariu três filhotes (MOURA et. al., 2010).

O uso da IA permite rápido avanço genético e melhor aproveitamento dos animais com características produtivas superiores, tornando possível a maximização da realização dos testes de progênie paternos, a formação de bancos genéticos, a queda na incidência de doenças sexualmente transmissíveis e a racionalização do uso do reprodutor (AZAWI et al., 1993; MÉNDEZ et al., 1994).

Apesar desta técnica apresentar resultados satisfatórios quando realizada via transcervical com sêmen fresco (ANEL et al. 2005; FAIR et al., 2005), o uso do sêmen fresco apresenta algumas limitações, como pequena quantidade de animais geneticamente superiores e dificuldades no transporte desse sêmen (SALAMON; MAXWELL, 1995), o que leva os produtores a optarem pelo uso de sêmen congelado, que permite a utilização intensiva de reprodutores geneticamente superiores.

Mas os resultados de IA com sêmen congelado de ovinos ainda não alcançaram, padrões satisfatórios, sendo fatores limitantes para seu êxito a anatomia particular da cervice da ovelha, o deficiente transporte espermático, as alterações bioquímicas e moleculares dos espermatozoides e a baixa qualidade obtida nas doses de sêmen congelado (MAXWELL et al., 1995; WATSON, 1995; HOLT, 2000; SALAMON; MAXWELL, 2000).

Portanto, esta técnica não é tão difundida para os ovinos como acontece para outras espécies. Isso ocorre não só porque os resultados de fertilidade são irregulares, mas devido à dificuldade de melhorias na técnica para uso com sêmen congelado. Esses resultados insatisfatórios também estão relacionados às fêmeas (manejo, sazonalidade, morfologia genital, etc.), ao macho (sazonalidade, qualidade do sêmen, conservação do sêmen, etc.), à fazenda (condições ambientais, estado sanitário, manejo, etc.) e à técnica em si (via de aplicação, espermatozoides / dose, técnico, etc.) (SHACKELL et al., 1990; DONOVAN et al., 2004; PAULENZ et al., 2004).

Apesar das dificuldades, os testes de IA ou de fertilização *in vitro* representam as técnicas de maior sensibilidade para o acesso ao potencial de fertilização das amostras seminais (CRESPILHO et al., 2009), pois permitem a avaliação simultânea dos requisitos mais importantes da célula espermática para o processo de fertilização (RODRIGUEZ-MARTINEZ, 2005).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral:

Avaliar o efeito da adição do antioxidante miricetina, ao diluente de criopreservação de sêmen ovino, visando o desenvolvimento de diluidores mais eficazes.

3.2 Objetivos Específicos:

1- Estudar o efeito da adição de miricetina na cinética de espermatozoides ovinos submetidos à congelação;

2- Analisar a ocorrência de lipoperoxidação e de estresse oxidativo em espermatozoides de ovinos congelados em meio suplementado com miricetina;

3- Avaliar a viabilidade *in vitro* de espermatozoides ovinos submetidos à congelação, em meio suplementados com miricetina;

4- Analisar a capacidade de fertilização dos espermatozoides ovinos submetidos à congelação, em meio suplementados com miricetina, quando submetidos ao teste de fertilização de *in vivo*.

3 REFERÊNCIAS

- AGARWAL, A.; SALEH, R.A.; BEDAIWY, M.A. “Role of reactive oxygen species in the pathophysiology of human reproduction”. **Fertility and Sterility**, v. 79, n. 4, p. 829–843, 2003.
- AGARWAL, A.; PRABAKARAN, S.A.; SAID, T.M. Prevention of Oxidative Stress Injury to Sperm. **Journal of Andrology**, v. 26, n. 6, p. 654-660, 2005.
- AGARWAL, A.; MAKKER, K.; SHARMA, R. “Clinical relevance of oxidative stress in male factor infertility: an update”. **American Journal of Reproductive Immunology**, v. 59, n. 1, p. 2–11, 2008.
- AISEN, E.G.; QUINTANA, M.; MEDINA, V. et al. Ultramicroscopic and biochemical changes in ram spermatozoa cryopreserved with trehalose-based hypertonic extenders. **Cryobiology**, v. 50, n. 3, p. 239-249, 2005.
- AITKEN, R.J. A free radical theory of male infertility. **Reproduction and Fertility and Development**, v. 6, p. 19– 24, 1994.
- AITKEN, R.J. Free radicals, lipid peroxidation and sperm function. **Reproduction and Fertility and Development**, v. 7, p. 659-68, 1995.
- AITKEN, R.J.; DE IULIIS, G.N.; McLACHLAN, R.I. Biological and clinical significance of DNA damage in the male germ line. **International Journal of Andrology**, v. 32, p. 46–56, 2009.
- ALVAREZ, C.A.; MORAES, G.V. Efeitos da Selenometionina e vitamina C sobre o sêmen. **Revista de Saúde e Biologia**, v. 1, n. 1, p. 42-51, 2006.
- AMANN, R.; KATZ, D.F. Reflections on CASA after 25 years. **Journal of Andrology**, v. 25, p. 317-325, 2004.
- AMMAN, R.P.; HAMMERSTEDT, R.H. In vitro evaluation of sperm quality: an opinion. **Journal of Andrology**, v. 14, p. 397–406, 1993.
- AMIDI, F.; PAZHOHAN, A.; NASHTAEI, M.S. et al. The role of antioxidants in sperm freezing, a review. **Cell and Tissue Banking**, v. 17, n. 4, p.745-756, 2016.
- ANDRADE, E.R.; MELO-STERZA, F.A.; SENEDA, M.M.; ALFIERI, A.A. Consequências da produção das espécies reativas de oxigênio na reprodução e principais mecanismos antioxidantes. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 34, n. 2, p. 79-85, 2010.

ANEL, L.; KAABI, M.; ABROUG, B. et al. Factors influencing the success of vaginal and laparoscopic artificial insemination in churra ewes: a field assay. **Theriogenology**, v. 63, p. 1235-1247, 2005.

ANGRIMANI, D.S.R.; LOSANO, J.D.A.; RUI, B.R. Ferramentas para avaliação da funcionalidade da mitocôndria espermática. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 39, n. 2, p. 277-283, 2015.

AQUILA, S.; GENTILE, M.; MIDDEA, E. et al. Leptin secretion by human ejaculated spermatozoa. **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 90, p. 4753–4761, 2005.

AQUILA, S.; SANTORO, M.; AMICIS, F. et al. Red wine consumption may affect sperm biology: the effects of different concentrations of the phytoestrogen myricetin on human male gamete function. **Molecular Reproduction and Development**, v. 80, p. 155-165, 2013.

ARAÚJO, P.G. Inseminação intrauterina em ovinos de corte com sêmen congelado. Emprego da via transperitonal por laparoscopia. **Boletim Inseminação Artificial**, v.7, p. 5-10, 1955.

ARRUDA, R.P. **Avaliação dos efeitos de diluidores e crioprotetores para o espermatozoide equino pelo uso de microscopia de epifluorescência, citometria de fluxo, análises computadorizadas da motilidade (CASA) e da morfometria (ASMA)**. 2000. 121f. Tese (Livre Docência) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2000.

ARRUDA, R. P.; ANDRADE, A. F. C.; PERES, K.R. et al. Biotécnicas aplicadas à avaliação do potencial de fertilidade do sêmen equino. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 31, n. 1, p. 8-16, 2007.

AUSTIN, C.R. The “capacitation” of the mammalian sperm. **Nature**, v. 170, p. 4321-4326, 1952.

AZAWI, O.I.; AL-DAHASH, S.Y.A.; JUMA, F. T. Effect of different diluents on Shami goat semen. **Small Ruminant Research**, v. 9, p. 347-352, 1993.

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

BALDI, E.; LUCONI, M.; BONACCORSI, L. et al. Intracellular events and signaling pathways involved in sperm acquisition of fertilizing capacity and acrosome reaction **Frontiers in Bioscience**, v. 5, p. 110–123, 2000.

BARREIROS, A.L.B.S.; DAVID, J.M.; DAVID, J.P. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Química Nova**, v. 29, n. 1, p. 113-123, 2006.

BASIJI, D.A.; ORTYN, W.E.; LIANG, L. et al. Cellular image analysis and imaging by flow cytometry. **Clinics in Laboratory Medicine**, v. 27, n. 3, p. 653–670, 2007.

BILODEAU, J.F.; CHATTERJEE, S.; SIRARD, M.A.; GAGNON, C. Levels of antioxidant defense are decreased in bovine spermatozoa after a cycle of freezing and thawing. **Molecular, Reproduction and Development**, v. 55, p. 282-288, 2000.

BRAVO, L. Polyphenols: Chemistry, Dietary Sources, Metabolism and Nutritional Significance. **Nutrition Reviews**, v. 56, n. 11, p. 317-333, 1998.

BROUWERS, J.F.H.M.; GADELLA, B.M. In situ detection and localization of lipid peroxidation in individual bovine sperm cells. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 35, p. 1382–1391, 2003.

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

BUCAK, M.N.; SARIOZKAN, S.; TUNCER, P.B. et al. “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.

BUS, J.S.; GIBSON, J.E. Lipid peroxidation and its role in toxicology. **Reviews in Biochemical Toxicology**, v. 1, p. 125-149, 1979.

CARVALHO, O.F.; FERREIRA, J.D.J.; SILVEIRA, N.A.; FRENEAU, G.E. Efeito oxidativo do óxido nítrico e infertilidade no macho. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 38, p. 33-38, 2002.

CASTRO, L.; ASSIS, P.M.; SIQUEIRA, A.F.P. et al. Sperm oxidative stress is detrimental to embryo development: a dose-dependent study model and a new and more sensitive oxidative status evaluation. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2016, 12p., 2016.

CELEGHINI, E.C.C.; ARRUDA, R.P.; ANDRADE, A.F.C. et al. Effects that bovine sperm cryopreservation using two different extenders has on sperm membranes and chromatin. **Animal Reproduction Science**, v. 104, p. 119-131, 2008.

CEROLINI, S.; MALDJIAN, A.; PIZZI, F.; GLIOZZI, T.M. Changes in sperm quality and lipid composition during cryopreservation of boar semen. **Reproduction**, v. 121, p. 395–401, 2001.

CHATTOPADHYAY, P.K.; HOGERKORP, C.; ROEDERER, M. A chromatic explosion: the development and future of multiparameter flow cytometry. **Immunology**, v. 125, p. 441–449, 2008.

CHEN, L.B. Mitochondrial membrane potential in living cells. **Annual Review of Cell Biology**, v. 4, p. 155-181, 1988.

CHOBOT, V.; HADACEK, F. Exploration of pro-oxidant and antioxidant activities of the flavonoid myricetin. **Redox Report**, v. 16, p. 242-247, 2011.

CHRISTOVA, Y.; JAMES, P.S.; JONES, R. Lipid diffusion in sperm plasma membranes exposed to peroxidative injury from oxygen free radicals. **Molecular Reproduction and Development**, v. 68, p. 365–372, 2004.

CODY, V.Jr.; MIDDLETON, E.; HARBORNE, J.B. “Plant Flavonoids in Biology and Medicine: Biochemical Pharmacological and Structure-Activity Relationships”. **Progress in Clinical and Biological Research**, v. 213, p. 1-592, 1986.

CORMIER, N.; SIRARD, M.A.; BAILEY, J.L. Premature capacitation of bovine spermatozoa is initiated by cryopreservation. **Journal of Andrology**, v. 18, p. 461–468, 1997.

COSSON, J. A moving image of flagella: news and views on the mechanisms involved in axonemal beating. **Cell Biology International**, v. 20, n. 2, p. 83-94, 1996.

CRESPILHO, A.M.; PAPA, F.O.; MARTINS JUNIOR, A.; DELL’AQUA JUNIOR, J.A. Evaluation of frozen bovine semen: How do semen collection and processing centers evaluate the quality of commercialized samples? **Revista Veterinária e Zootecnia**, v. 16, p. 335-342, 2009.

CRITSER, J.K.; ARNESON, B.W.; AAKER, D.V. et al. Cryopreservation of human spermatozoa. II. Postthaw chronology of motility and of zona-free hamster ova penetration. **Fertility and Sterility**, v. 47, p. 980–984, 1987.

CROSS, N.L.; HANKS, S.E. Effects of cryopreservation on human sperm acrosomes. **Human Reproduction**, v. 6, p. 1279–83, 1991.

CSEH, S.; FAIGL, V.; AMIRIDIS, G.S. Semen processing and artificial insemination in health management of small ruminants. **Animal Reproduction Science**, v. 130, p. 187-192, 2012.

DAVIS, R.O.; SIEMERS, R.J. Derivation and reliability of kinematic measures of sperm motion. **Reproduction and Fertility and Development**, v. 7, p. 857–869, 1995.

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

DEGÁSPARI, C.H.; WASZCZYNSKYJ, N. Propriedades antioxidantes de compostos fenólicos. **Visão Acadêmica**, v. 5, n. 1, p. 33-40, 2004.

DE LAMIRANDE, E.; GAGNON, C. Impact of reactive oxygen species on spermatozoa: a balancing act between beneficial and detrimental effects. **Human Reproduction**, v. 10, n. 1, p. 15-21, 1995.

DIAZ-PERES, E.; THOMAS, P.; MEIZEL, S. Evidence suggesting a role for sperm methalloendoprotease activity in penetration of zone-free hamster eggs by human sperm. **Journal of Experimental Zoological**, v. 248, p. 213-221, 1988.

DING, M.; KASPERSSON, K.; MURRAY, D.; BARDELLE, C. High-throughput flow cytometry for drug discovery: principles, applications, and case studies. **Drug Discovery Today**, v. 22, p. 1844-1850, 2017.

DIXON, R.A.; HARRISON, M.J. Activation, structure, and organization of genes involved in microbial defense in plants. **Advances in Genetics**, v. 28, p. 165-234, 1990.

DONOVAN, A.; HANRAHAN, J.P.; KUMMEN, E, et al. Fertility in the ewe following cervical insemination with fresh or frozen-thawed at a natural or synchronized oestrus. **Animal Reproduction Science**, v. 84, p. 359–368, 2004.

DOTT, H.M.; FOSTER, G.C. The estimation of sperm motility in semen, on a membrane slide, by measuring the area change frequency with an image analyzing computer. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 55, p. 161–166, 1971.

DRUMMEN, G.P.; VAN LIEBERGEN L.C.M.; OP DEN KAMP J.A.F. et al. C11-BODIPY(581/591), an oxidation-sensitive fluorescent lipid peroxidation probe: (micro)spectroscopic characterization and validation of methodology. **Free Radical Biology & Medicine**. v. 33, p. 473–490, 2002.

DZIEKONSKA, A.; FRASER, L.; STREZEZEK, J. Effect of different storage temperatures on the metabolic activity of spermatozoa following liquid storage of boar semen. **Journal of Animal and Feed Sciences**, v. 18, p. 638–49, 2009.

ENGLAND, G.C.W. Cryopreservation of dog semen: a review. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 47, p. 243-255, 1993.

ESFANDIARI, N.; SHARMA, R.K.; SALEH, R.A. et al. Utility of nitroblue tetrazolium reduction test for assessment of reactive oxygen species production by seminal leukocytes and spermatozoa. **Journal of Andrology**, v. 24, p. 862-870, 2003.

EVENSON, D.P.; DARZYNKIEWICZ, Z.; MELAMED, M.R. Relation of mammalian sperm chromatin heterogeneity to fertility. **Science**, v. 210, p. 1131–1133, 1980.

EVENSON, D.P.; THOMPSON, L.; JOST, L.K. Flow cytometric evaluation of boar semen by the sperm chromatin structure assay as related to cryopreservation and fertility. **Theriogenology**, v. 41, p. 637–651, 1994.

FAO-FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. Statistics: Animal productions, 2015. Disponível em: <http://www.fao.org/3/a-i4691e.pdf>.

FAIR, S.; HANRAHAN, J.P.; O'MEARA C.M. et al. Differences between Belclare and Suffolk ewes in fertilization rate, embryo quality and accessory sperm number after cervical or laparoscopic artificial insemination **Theriogenology**, v. 63, p. 1995-2005, 2005.

FARREL, P.B.; FOOTE, R.N.; MCARDLE, M.M. et al. Media and dilution procedures tested to minimize handling effects on human, rabbit and bull sperm for computer-assisted sperm analysis (CASA). **Journal of Andrology**, v. 17, p. 293-300, 1996.

FENNEMA, O.R. **Química de los alimentos**. 2.ed. Zaragoza: Acribia; 1992. p.1096.

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

FORMICA, J.V.; REGELSON, W. Review of the biology of Quercetin and related bioflavonoids. **Food and Chemical Toxicology**, v. 33, p. 1061–1080, 1995.

FREITAS-DELL'AQUA, C.P.; CRESPILO, A.M.; PAPA, F.O.; DELL'AQUA JUNIOR J.A. Metodologia de avaliação laboratorial do sêmen congelado bovino. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 33, n. 4, p. 213-22, 2009.

GADEA, J.; GUMBAO, D.; GOMEZ-GIMENEZ, B.; GARDON, J.C. Supplementation of the thawing medium with reduced glutathione improves function of frozen-thawed goat spermatozoa. **Reproductive Biology**, v. 13, p. 24-33, 2013.

GADELLA, B.M.; HARRISON, R.A.P. The capacitating agent bicarbonate induces protein kinase A-dependent changes in phospholipid transbilayer behaviour in the sperm plasma membrane. **Development**, v. 127, p. 2407–2420, 2000.

GALATI, G; SABZEVARI, O; WILSON, J.X.; O'BRIEN, P.J. Prooxidant activity and cellular effects of the phenoxyl radicals of dietary flavonoids and other polyphenolics. **Toxicology**, v. 177, p. 91-104, 2002.

GILLAN, L.; EVANS, G.; MAXWELL, W.M. Flow cytometric evaluation of sperm parameters in relation to fertility potential. **Theriogenology**, v. 63, p. 445–457, 2005.

GILLAN, L.; MAXWELL, W.M.; EVANS, G. Preservation and evaluation of semen for artificial insemination. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 16, p. 447–54, 2004.

GIL J.; JANUSKAUSKAS, A.; HÅÅRD, M.C.H. et al. Functional sperm parameters and fertility of bull semen extended in Biciphos-Plus® and Triladyl®. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 35, p. 69-77, 2000.

GIL-GUZMAN, E; OLLERO, M; LOPEZ, M.C. et al. Differential production of reactive oxygen species by subsets of human spermatozoa at different stages of maturation. **Human Reproduction**, v. 16, p. 1922 -1930, 2001.

GOOLSBY, C.L.; HANSEN P. Historical Roots of Flow Cytometry. **Reference Module in Biomedical Sciences**, p. 3629–3641, 2014.

GRAHAM, E.F.; SCHMEHL, K.L.; NELSON, D.S. Problems with laboratory assays. In: **Proceedings of the eighth technical conference on artificial insemination and reproduction**. Milwaukee, Wis: NAAB; p. 1–8, 1980.

GRAHAM, J.K.; KUNZE, E.; HAMMERSTEDT, R.H. Analysis of sperm cell viability, acrosomal integrity, and mitochondrial function using flow cytometry. **Biology of Reproduction**, v. 43, p. 55-64, 1990.

GRAHAM, J.K. Analysis of stallion semen and its relation to fertility. **Veterinary Clinics of North America: Equine Practices**, v. 12, p. 119–130, 1996.

GRAHAM, J.K.; MOCÉ, E. Fertility evaluation of frozen/thawed semen. **Theriogenology**, v. 64, p. 492-504, 2005.

GRAVANCE, C.G.; DAVIS, R.O. Automated sperm morphometry analysis (ASMA) in the rabbits. **Journal of Andrology**, v. 16, p. 88–93, 1995.

GREEN, C.E.; WATSON, P.F. Comparison of the capacitation-like state of cooled boar spermatozoa with true capacitation. **Reproduction**, v. 122, p. 889–898, 2001.

GUERRA, M.M.P.; EVANS, G.; MAXWELL, W.M.C. Papel de oxidantes e anti- oxidantes na andrologia. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 28, n. 4, p. 187-195, 2004.

GUTHRIE, H.D.; WELCH, G. Determination of intracellular reactive oxygen species and high mitochondrial membrane potential in percoll-treated viable boar sperm using fluorescence-activated flow cytometry. **Journal of Animal Science**, v. 84, p. 2089–2100, 2006.

HAFEZ, E.S.E.; HAFEZ, B. **Reprodução animal**. 7ª Ed. São Paulo: Manole, 2004.

HALLAP, T.; NAGY, S.; JAAKMA, U. et al., Usefulness of a triple fluorochrome combination Merocyanine 540/Yo-Pro 1/Hoechst 33342 in assessing membrane stability of viable frozen- thawed spermatozoa from Estonian Holstein AI bulls. **Theriogenology**, v. 65, p. 1122-1136, 2006.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. **Free Radicals in Biology and Medicine**. 3ed. New York: Oxford University Press. 1999. 936p.

HAMMERSTEDT, R.H. Maintenance of bioenergetic balance in sperm and prevention of lipid peroxidation: a review of the effect on design of storage preservation systems. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 5, p. 675-690, 1993.

HARBORNE, J.B.; MABRY, T.J.; MABRY, H. “**The Flavonoids.**” Chapman & Hall, London, 1975.

HARRISON, R.A.P.; ASHWORTH, P.J.C.; MILLER, N.G.A. Bicarbonate/CO₂, an effector of capacitation, induces a rapid and reversible change in the lipid architecture of boar sperm plasma membranes. **Molecular Reproduction and Development**, v. 45, p. 378–391, 1996.

HE, S.; SUN, C.; PAN, Y. Red wine polyphenols for cancer prevention. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 9, p. 842–853, 2008.

HERTOG, M.G.; FESKENS, E.J.; HOLLMAN, P.C. et al. Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease: the Zutphen Elderly Study. **Lancet**, v. 342, p. 1007-11, 1993.

HOLT, W.V. Basic aspects of frozen storage of semen. **Animal Reproduction Science**, v. 62, p. 3-22, 2000.

HOLT, W.V. ; PALOMO, M.J. Optimization of a continuous real time computerized semen analysis system for ram sperm motility assessment, and evaluation of four methods of semen preparation. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 8, p. 219–230, 1996.

HU, Y.; XIA, X.; PAN, L. et al. Evaluation of sperm mitochondrial membrane potential in varicocele patients using JC-1 fluorescent staining. **International Journal of Andrology**, v. 15, p. 792-795, 2009.

HUANG, J.; HUANG, C.; FANG, J. et al. Protective effects of myricetin against ultraviolet-B-induced damage in human keratinocytes. **Toxicology in Vitro**, v. 24, p. 21–28, 2010.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Anuário Estatístico do Brasil**, 2016.

JANUSKAUSKAS, A.; JOHANNISSON, A.; SODERQUIST, L.; RODRIGUEZ-MARTINEZ H. Assessment of sperm characteristics PT and response to calcium ionophore in relation to the fertility of Swedish dairy AI bulls. **Theriogenology**, v. 53, p. 859–875, 2000.

KALYANARAMAN, B.; DARLEY-USMAR, V.; DAVIES, K.J. et al. Measuring reactive oxygen and nitrogen species with fluorescent probes: Challenges and limitations. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 52, p. 1–6, 2012.

KANDASWAMI, C.; MIDDLETON, E. Jr. Free radical scavenging and antioxidant activity of plants flavonoids. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 366, p. 351-376, 1994.

KASAI, T.; OGAWA, K.; MIZUNO, K. et al., Relationship between sperm mitochondrial membrane potential, sperm motility, and fertility potential. **Asian Journal of Andrology**, v. 4, p. 97-104, 2002.

KOPEIKA, J.; THORNHILL, A.; KHALAF, Y. The effect of cryopreservation on the genome of gametes and embryos: principles of cryobiology and critical appraisal of the evidence. **Human Reproduction Update**, v. 21, p. 209–27, 2015.

KUMARESAN, A.; SIQUEIRA, A.; HOSSAIN, M.; BERGQVIST, A. Cryopreservation-induced alterations in protein tyrosine phosphorylation of spermatozoa from different portions of the boar ejaculate. **Cryobiology**, v. 63, p. 137–44, 2011.

LANGNER, M.; HUI, S.W. Merocyanine interaction with phosphatidylcholine bilayers. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1149, p. 175–179, 1993.

LARSSON, B.; RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, H. Can we use in vitro fertilization tests to predict semen fertility? **Animal Reproduction Science**, v. 60–61, p. 327–36, 2000.

LIEN, E.J.; REN, S.; BUI, H.H.; WANG, R. Quantitative structure activity relationship analysis of phenolic antioxidants. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 26, n. 3-4, p. 285-294, 1999.

LIU, J.L.; KUSAKABE, H.; CHANG, C.C. et al. Freeze-dried sperm fertilization leads to full-term development in rabbits. **Biology of Reproduction**, v. 70, p. 1776–81, 2004.

MACEY, M. Flow Cytometry: Principles and Applications. **Human press**, p. 1-15, 2007.

McFARLIN, B.K.; GARY, M.A. Flow cytometry what you see matters: Enhanced clinical detection using image-based flow cytometry. **Methods**, v. 112, p. 1-8, 2017.

MACK, S.O.; WOLF, D.F.; TASH, J.S. Quantitation of specific parameters of motility in large numbers of human sperm by digital image processing. **Biology of Reproduction**, v. 38, p. 270-281, 1988.

MADRUGA, M.S.; SOUSA, W. H.; ROSALES, M. D. et al. Qualidade da carne de cordeiros Santa Inês terminados em diferentes dietas. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 344, n. 1, p. 309-315, 2005.

MAGGIOLINI, M.; RECCHIA, A.G.; BONOFILIO, D. et al. The red wine phenolics piceatannol and myricetin act as agonists for estrogen receptor α in human breast cancer cells. **Journal of Molecular Endocrinology**, v. 35, p. 269–281, 2005.

MAIA, M.S., 2006. Viabilidade espermática e geração de metabólitos reativos do oxigênio (ROS) no sêmen ovino criopreservado em diluidor aditivado de lauril sulfato de sódio (OEP), Trolox-c e catalase. **Tese** (Doutorado em Medicina Veterinária). Faculdade de Medicina Veterinária e Ciência Animal, UNESP, Botucatu.

MAIA, M.S.; BICUDO, S.D.; SICHERLE, C.C. et al. Lipid peroxidation and generation of hydrogen peroxide in frozen–thawed ram semen cryopreserved in extenders with antioxidants. **Small Ruminant Research**, v. 122, p. 118–123, 2010.

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

MANN, T.; LUTWAK-MANN. **Male Reproductive Function and Semen**. New York: Springer-Verlag. 1981. 495 p.

MANN, J. **Secondary metabolism**. Oxford: Clarendon Press; 1987. p.374.

MARTÍNEZ-PASTOR, F.; MATA-CAMPUZANO, M.; ÁLVAREZ-RODRÍGUEZ, M. et al. Probes and Techniques for Sperm Evaluation by Flow Cytometry. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 45, p. 67-78, 2010.

MARTINEZ-SOTO, J.C.; DIOSHOURCADE, J.; GUTIÉRREZ-ADÁN, A. Effect of genistein supplementation of thawing medium on characteristics of frozen human spermatozoa. **Asian Journal of Andrology**, v. 12, p. 431-441, 2010.

MATTIVI, F.; GUZZON, R.; VRHOVSEK, U. Metabolite profiling of grape: flavonols and anthocyanins. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, p. 7692– 7702, 2006.

MAXWELL, W.M.C.; LANDERS, A.J.; EVANS, G. Survival and fertility of ram spermatozoa frozen in pellets, straws and minitubs. **Theriogenology**, v. 43, p. 1201- 1210, 1995.

MAXWELL, W.M.; STOJANOV, T. Liquid storage of ram semen in the absence or presence of some antioxidants. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 8, n. 6, p. 1013-1020, 1996.

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

MEDEIROS, C.M.O.; FORELL, F.; OLIVEIRA, A.T.D.; RODRIGUES, J.L. Current status of sperm cryopreservation: why isn't it better? **Theriogenology**, v. 57, p. 327-344, 2002.

MÉNDEZ, J.V.; HERRERA, G.G.; GARCÍA, M.E.G.; GONZÁLEZ, A.T. Motilidad y daño acrosomal del semen caprino congelado en pajillas de 0,25 ml y 0,5 ml y descongelado a dos diferentes ritmos de temperatura. **Veterinaria México**, v. 25, n. 2, p. 127-131, 1994.

MOLDOVAN, A. Photo-electric technique for the counting of microscopical cells. **Science**, v. 80, p. 188–189, 1934.

MORAES, J.C.F. Perspectivas da utilização do sêmen congelado em programas de reprodução assistida em ovinos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 27, n. 4, p. 613-619, 2003.

MORETTI, E.; MAZZI, L.; TERZUOLI, G. et al. Effect of quercetin, rutin, naringenin and epicatechin on lipid peroxidation induced in human sperm. **Reproductive Toxicology**, v. 34, p. 651-657, 2012.

MOURA, M.D.; SOUZA, M.C.B; SCHEFFER, B.B. Reprodução assistida. Um pouco de história. **Revista da Sociedade Brasileira de Psicologia Hospitalar**, v. 12, n. 2, p. 23-42, 2010.

NASEER, Z.; AHMAD, E.; AKSOY, M. et al. Protective effect of cholesterol-loaded cyclodextrin pretreatment against hydrogen peroxide induced oxidative damage in ram sperm, **Cryobiology**, v. 71, p. 18-23, 2015.

NIJVELDT, R.J.; VAN NOOD, E.; VAN HOORN, D.E. et al. Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 74, p. 418-425, 2001.

NORDBERG, J.; ARNÉR, E.S.J. Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system free radical. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 31, p. 1287-1312, 2001.

NOROOZI, M.; ANGERSON, W.J.; LEAN, M.E. Effects of flavonoids and vitamin C on oxidative DNA damage to human lymphocytes. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 67, n. 6, p. 1210-1218, 1998.

OBERLENDER, G.; MURGAS, L.D.S; MESQUITA, S.P. Inseminação artificial em Suínos. **Boletim Técnico**, n.º 79, p. 1-16, 2008.

PAGANOTI, M.; RODRIGUES, R.M.C. Análise da Ovinocultura Brasileira: Oportunidades e Ameaças. **Revista Cabra & Ovelha**, v. 17, n. 55, p. 2-5, 2010.

PAGL, R.; AURICH, C.; KANKOFER, M. Anti-oxidative status and semen quality during cooled storage. **Journal of Veterinary Medicine**, v. 53, p. 486–489, 2006.

PAP, E.H.W.; DRUMMEN, G. P. C.; WINTER, V. J.; et al. Ratio-fluorescence microscopy of lipid oxidation in living cells using C11-BODIPY(581/591). **FEBS Letters**, v. 453, p. 278–282, 1999.

PAULENZ, H.; SODERQUIST, L.; ADNOY, T. Fertility results after different thawing procedures for ram semen frozen in minitubes and mini straws. **Theriogenology**, v. 61, p. 1719–1727, 2004.

PEKKARINEN, S.S. Flavonoids quercetin, myricetin, kaemferol and (+) catechin as antioxidants in methyl linoleate. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 79, p. 499–506, 1999.

PIETTA, G. Flavonoids as antioxidants. **Journal of Natural Products**, v. 63, p. 1035-1042, 2000.

POLGE, C.; SMITH, A.U.; PARKES, A.S. Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures. **Nature**, v. 64, p. 666, 1949.

POLGE, C. Low-temperature storage of mammalian spermatozoa. **Proceedings of the Royal Society B**, v. 147, p. 498–508, 1957.

PRIMO, A. T. **América: conquista e colonização: a fantástica história dos conquistadores ibéricos e seus animais na era dos descobrimentos**. In Porto Alegre (Ed.). Movimento, Brazil 2004.

PUKAZHENTHI, B.S.; JOHNSON, A.; GUTHRIE, H.D. et al. Improved sperm cryosurvival in diluents containing amides versus glycerol in the Przewalski's horse (*Equus ferus przewalskii*). **Cryobiology**, v. 68, p. 205-214, 2014.

ROBAK, J.; DUNIEC, Z.; RZADKOWSKA BODALSKA, H. et al. The effect of some flavonoids on non-enzymatic lipid oxidation and enzymatic oxidation of arachidonic acid. **Polish Journal of Pharmacology and Pharmacy**, v. 38, p. 483-491, 1986.

RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, H. Methods for semen evaluation and their relationship to fertility. In: Congresso Brasileiro de Reprodução Animal, 16, 2005, Goiânia, GO. **Anais: Palestra**. Belo Horizonte, MG: CBRA, 2005. 8p.CD-ROM. 2005.

RODRIGUÉZ-MARTINÉZ, H. State of the art in farm animal sperm evaluation. **Reproduction and Fertility and Development**, v. 19, p. 91-101, 2007.

RUSZNYAK, S.; SZENT-GYORGYI, A. Nature (London) 138, 27,1936.

SALAMON, S.; MAXWELL, W. M. C. Frozen storage of ram semen I: processing, freezing, thawing and fertility after cervical insemination. **Animal Reproduction Science**, v. 37, p. 185-249, 1995.

SALAMON, S.; MAXWELL, W.M.C. Storage of ram semen. **Animal Reproduction Science**, v. 62, p. 77-111, 2000.

SALEH, R.A.; AGARWAL, A. Oxidative stress and male infertility: from research bench to clinical practice. **Journal of Andrology**, v. 23, n. 6, p. 737-752, 2002.

SAMPER, J.C.; HELLANDER, J.C.; CRABO, B.G. Relationship between the fertility of fresh and frozen stallion semen and semen quality. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 44, p. 107-114, 1991.

SANOCCA D.; KURPISZ, N. Reactive oxygen species and sperm cells. **Reproductive Biology Endocrinology**, v. 23, p. 2-12, 2004.

SANTELLLO, G.A.; MACEDO, F.A.F.; MEXIA, A.A. et al. Características de carcaça e análise do custo de sistemas de produção de cordeiros ½ Dorset Santa Inês. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 35, n. 4, p. 1852-1859, 2006

SCHURMANN, A.; AXER, H.; SCHEEPERS, A. et al. The glucose transport facilitator GLUT8 is predominantly associated with the acrosomal region of mature spermatozoa. **Cell and Tissue Research**, v. 307, p. 237-42, 2002.

SCORTICHINI, G.; AMORENA, M.; BRAMBILLA, G. et al. Sheep farming and the impact of environment on food safety. **Small Ruminant Research**, v. 135, p. 66-74, 2015.

SEIFI-JAMADI, A.; KOHRAM, H.; SHAHNEH, A.Z. et al. Quercetin Ameliorate Motility in Frozen-Thawed Turkmen Stallions Sperm. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 45, p. 73-77, 2016.

SELLAPPAN, S.; AKOH, C.C. Flavonoids and Antioxidant Capacity of Georgia-Grown Vidalia Onions. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, p. 5338–5342, 2002.

SHAPIRO, H.M. **Practical Flow Cytometry**. 2nd Ed. New York, NY: Alan R. Liss Inc; 1988.

SHACKELL, G.H.; KYLE, B.; LITTLEJOHN, R.P. Factors influencing the success of a large scale artificial insemination programme in sheep. **Proceedings of the New Zealand Society of Animal Production**, v. 50, p. 427–430, 1990.

SIES, H; STAHL, W. Vitamins e and c, b-carotene, and other carotenoids as antioxidants. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 62, n.6, p.1315-21, 1995.

SIES, H. Strategies of antioxidant defense. **European Journal of Biochemistry**, v. 215, p. 213-219, 1993.

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

SILVA, P.F.N.; GADELLA, B.M. Detection of damage in mammalian sperm cells. **Theriogenology**, v. 65, p. 958-978, 2006.

SILVA, S.V.; SOARES, A.T.; BATISTA, A.M. et al. In Vitro and In Vivo Evaluation of Ram Sperm Frozen in Tris Egg-yolk and Supplemented with Superoxide Dismutase and Reduced Glutathione. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 46, p. 874–881, 2011

SIMPLÍCIO, A.A.; WANDER, A.E.; LEITE, E.R.; LOPES, E.A. **A caprino-ovinocultura de corte como alternativa para a geração de emprego e renda**. Sobral: Embrapa Caprinos. 44 p. 2003.

SQUIRES, E. L.; PICKETT, B. W.; GRAHAM, J. K. et al. Principles of cryopreservation. **In: Cooled and frozen Stallion Semen**, 1999.

STECKLER, D.; STOUT, T.A.; DURANDT, C.; NÖTHLING, J.O. Validation of merocyanine 540 staining as a technique for assessing capacitation-related membrane destabilization of fresh dog sperm. **Theriogenology**, v. 83, n. 9, p. 1451-60, 2015.

St. JOHN, J.C. The transmission of mitochondrial DNA following assisted reproductive techniques. **Theriogenology**, v. 57, p. 109-123, 2002.

TAPPEL, A. L. Protection against free radical lipid peroxidation reactions. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 97, p. 111-131, 1978.

TOREL, J.; CILLARD, J.; CILLARD, P. Antioxidant activity of flavonoids and reactivity with peroxy radical. **Phytochemistry**, v. 25, p. 383-385, 1986.

THUNDATHIL, J.; GIL, J.; JANUSKAUSKAS, A., et al. The relationship between the proportion of capacitated sperm present in the post-thawed semen and fertility with artificial insemination. **International Journal of Andrology**, v. 22, p. 366–373, 1999.

VASCONCELOS, T.B.; CARDOSO, A.R.N.R.; JOSINO, J.B. et al. Radicais Livres e Antioxidantes: Proteção ou Perigo?. **Revista Unopar Científica Ciências Biológicas e da Saúde**, v. 16, n. 3, p. 213-219, 2014.

VERSTEGEN, J.; IGUER-OUADA, M.; ONCLIN, K. Computer assisted semen analyzers in andrology research and veterinary practice. **Theriogenology**, v. 57, p. 149-179, 2002.

VISCONTI, P.E.; GALANTINO-HOMER, H.; MOORE, G.D. et al. The molecular basis of sperm capacitation. **Journal of Andrology**, v. 19, p. 242–248, 1998.

WARDMAN, P. Fluorescent and luminescent probes for measurement of oxidative and nitrosative species in cells and tissues: Progress, pitfalls and prospects. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 43, p. 995–1022, 2007.

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

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

WINTERBOURN, C. C. The challenges of using fluorescent probes to detect and quantify specific reactive oxygen species in living cells. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1840, p. 730–738, 2014.

YEUNG, C.H.; SONNENBERG-RIETHMACHER, E.; COOPER, T.G. Receptor tyrosine kinase c-ros knockout mice as a model for the study of epididymal regulation of sperm function. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 53, p. 137–147, 1998.

ZEUNER, F. E. **A history of domesticated animals**. London: Hutchinson, [1963]. 560 p.

5 ARTIGOS

5.1 Avaliação *in vitro* do sêmen congelado de carneiros com diluidor suplementado com miricetina¹

[In vitro evaluation of ram sperm frozen with extender supplemented with myricetin]

L.C.P. Arruda^{1*}, R.A.J. Araújo Silva¹, M.M. Monteiro¹, R.P.F. Silva², A.S. Oliveira¹,

F.C.C. Mergulhão¹, P.L.J. Monteiro Júnior³, A.M. Batista¹, M.M.P. Guerra¹

¹Departamento de Medicina Veterinária, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brasil

²Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brasil

³Departamento de Ciência Animal, Universidade de São Paulo, Piracicaba, São Paulo, Brasil

RESUMO

O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito da suplementação do diluidor de congelamento de sêmen ovino com o flavonoide miricetina contra os danos ocasionados aos espermatozoides. Oito *pools* de sêmen, obtidos de quatro reprodutores ovinos, foram congelados com diferentes concentrações de miricetina (0, 1, 10, 100 e 1000nM). Após o descongelamento, o sêmen foi avaliado quanto à cinética espermática, à integridade das membranas plasmática e acrossomal, ao potencial de membrana mitocondrial, aos níveis de ROS intracelular, à peroxidação lipídica e à estabilidade de membrana. Amostras tratadas com miricetina 10nM apresentaram menor percentual de células rápidas ($P \leq 0,05$), quando comparadas ao grupo miricetina 1000nM. Amostras do grupo controle apresentaram maior ($P \leq 0,05$) VAP que o grupo 10nM de miricetina, enquanto amostras criopreservadas com miricetina (10, 100 e 1000nM) evidenciaram maior ($P < 0,05$) BCF, quando comparadas ao grupo controle. O grupo tratado com miricetina 1000nM apresentou maior percentual ($P < 0,05$) de células com peroxidação lipídica, quando comparado ao grupo controle. Em conclusão, a suplementação do diluidor de criopreservação de sêmen ovino com 10 e 100nM de miricetina afeta a cinética espermática sem provocar alterações na estrutura geral do gameta, enquanto 1000nM de miricetina provoca mudanças na cinética associadas à danos peroxidativos.

Palavras-chave: ovinos, antioxidantes, flavonoides, criopreservação

¹Artigo publicado no Arq. Bras. Med. Vet. Zootec., v. 70, n. 1, p. 153-159, 2018.

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the effect of the supplementation of ram semen frozen with extender with the flavonoid myricetin against damage to sperm. Eight pools of semen obtained from four ram breeders, were frozen with different concentrations of myricetin (0, 1, 10, 100 and 1000nM). After thawing, the semen was evaluated for spermatocin kinetics, plasma and acrosome membrane integrity, mitochondrial membrane potential, intracellular ROS levels, lipid peroxidation, and membrane stability. Samples treated with 10nM myricetin preserved a lower percentage of rapid cells ($P \leq 0.05$) when compared to the 1000nM myricetin group. Samples from the control group presented higher ($P \leq 0.05$) VAP than 10nM group of myricetin, while cryopreserved samples with myricetin (10, 100 and 1000nM) showed greater ($P < 0.05$) BCF, when compared to control group. The group treated with 1000nM myricetin had a higher percentage ($P < 0.05$) of cells with lipid peroxidation, when compared to the control group. In conclusion, supplementation of ram semen cryopreservation extender with 10 and 100nM myricetin affects sperm kinetics, without causing changes in the overall structure of the gamete, while 1000nM myricetin causes changes in the kinetics associated with peroxidative damage.

Keywords: sheep, antioxidants, flavonoids, cryopreservation

INTRODUÇÃO

A criopreservação do sêmen de carneiros é uma valiosa ferramenta para distribuição de material genético. No entanto, o uso do sêmen congelado tem sido limitado devido às baixas taxas de gestação após a inseminação intracervical em ovinos (Salamon e Maxwell, 1995). Nos últimos tempos, tem-se buscado aperfeiçoar a técnica de criopreservação, na tentativa de melhorar o desempenho reprodutivo desses animais (Silva et al., 2011), uma vez que os protocolos aplicados ainda afetam a estrutura e a resistência dos espermatozoides (Yeste, 2016).

O desequilíbrio entre as espécies reativas ao oxigênio (ROS) e os antioxidantes durante a congelação, por exemplo, pode comprometer a fisiologia e a viabilidade das células espermáticas (Apriokur, 2013). A miricetina (3,5,7,3',4',5'- hexa-hidroxiflavona) é um composto fenólico que apresenta diversos efeitos: antioxidante (Ong e Khoo, 1997) ou pró-oxidante (Chobot e Hadacek, 2011); efeito fitoestrogênico (Adeoya-Osiguwa et al., 2003; Fraser et al., 2006, Aquila et al., 2013); e efeito inibidor da atividade de ATP-ase das bombas implicadas no transporte iônico (Thiyagarajah et al., 1991).

Diversos estudos vêm sendo realizados para avaliar os efeitos antioxidantes de compostos fenólicos sobre os espermatozoides (Martinez-Soto et al., 2010; Moretti et al., 2012; Silva et al., 2016). No entanto, não há relatos na literatura acerca da ação da miricetina em diluidores de congelação de sêmen de qualquer espécie. Com isso, o presente estudo teve como objetivo avaliar *in vitro* o efeito da suplementação do diluidor de congelação do sêmen ovino com o flavonoide miricetina contra os danos ocasionados aos espermatozoides congelados-descongelados.

MATERIAL E MÉTODOS

Todos os reagentes utilizados foram adquiridos da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA), com exceção dos fluorocromos CM-H₂DCFDA (5-(e-6)-carboxi-2',7'-diacetato de diclorodi-hidrofluoresceína), C11-BODIPY^{581/591} (4,4-difluoro-5-(4-fenil-1,3-butadienil)-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacene-3-ácido undecanoico) e YO-PRO®-1 iodide, que foram adquiridos da Molecular Probes (Life Technologies, Eugene, EUA), e do fosfato salino tamponado (PBS), adquirido da Gibco® (Life Technologies, EUA). Soluções estoques dos fluorocromos foram preparadas da seguinte maneira: IP (25mg/mL), JC-1 (5mg/mL), CM-H₂DCFDA (0,5mM), C11-BODIPY^{581/591} (2mM), Merocianina 540 (M540: 54mM) e Yo-Pro-1 (1mM) em DMSO (dimetilsulfóxido) e FITC-conjugada ao *Peanut agglutinin* (FITC-PNA:1mg/mL) em PBS; as soluções de trabalho: JC-1 (153µM) e C11-BODIPY^{581/591} (0,4mM) em DMSO e FITC-PNA (0,04mg/mL), IP (0,5mg/mL), CM-H₂DCFDA (50µM), M540 (270µM) e Yo-Pro-1 (2,5µM) em PBS. Todas as soluções foram armazenadas a -20°C. O diluidor de criopreservação do sêmen (Tris-gema de ovo - TGO) foi composto de 375mM de Tris, 124mM de ácido cítrico, 41,6mM de frutose, 20% de gema de ovo, 5% de glicerol, 100UI de penicilina e 50mg de estreptomicina, com pH 6,8. A solução estoque de miricetina (31,42mM) foi preparada em DMSO e armazenada a -20°C.

Todos os procedimentos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (Ceua) da Universidade Federal Rural de Pernambuco (licença 047/2015

Ceua-UFRPE). Foram utilizados quatro ovinos da raça Santa Inês, sexualmente maduros, com histórico de fertilidade, alojados no biotério do Hospital Veterinário da UFRPE, submetidos a manejo intensivo, alimentados com feno de capim Tifton e 400g/dia de ração comercial, além de água e sal mineral *ad libitum*. Os ejaculados foram obtidos usando-se vagina artificial, na presença de uma fêmea como manequim. As colheitas de sêmen foram realizadas em dias alternados, totalizando oito colheitas por animal (32 ejaculados). Imediatamente após a colheita, os ejaculados foram submetidos a avaliações macroscópicas e microscópicas de forma subjetiva, em microscópio de contraste de fase (Olympus, Japão; 100x). Em seguida, os ejaculados que apresentaram motilidade $\geq 70\%$ foram aprovados e destinados à formação do *pool* (n=8).

Para congelação, o *pool* de sêmen foi diluído em TGO suplementado de miricetina (0, 1, 10, 100 e 1000nM), na concentração final de 200×10^6 espermatozoides/mL. Posteriormente, as amostras foram envasadas em palhetas (0,25mL) e congeladas em sistema automatizado (TK 3000® - TK Tecnologia em Congelação Ltda., Brasil). A curva de refrigeração usada apresentava queda de temperatura de $-0,25^\circ\text{C}/\text{min}$ até atingir 5°C , temperatura na qual o material permaneceu por 120min (tempo de estabilização). Em seguida, foi iniciada a curva de congelação, com queda de $-20^\circ\text{C}/\text{min}$, até atingir -120°C , após o que as palhetas foram imersas e estocadas em nitrogênio líquido (-196°C).

No momento das análises, quatro palhetas de cada grupo experimental foram descongeladas em banho-maria ($37^\circ\text{C}/30\text{s}$), agrupadas e destinadas às avaliações de cinética espermática, integridade de membranas plasmática e acrossomal (iMPA), potencial de membrana mitocondrial (PMM), níveis de ROS intracelular (iROS), peroxidação lipídica (LPO) e estabilidade de membrana (eMP).

Para o estudo da cinética espermática, uma alíquota (10 μL) de sêmen foi diluída em TGO sem glicerol para concentração de 50×10^6 espermatozoides/mL e incubada em banho-maria ($37^\circ\text{C}/15\text{min}$). A seguir, 2,5 μL da amostra diluída foram depositados em lâmina, coberta com lamínula (18 x 18mm), previamente aquecidas (37°C), e avaliados

em microscópio de contraste de fase (Eclipse 50i; Nikon, Japão; 100x). As imagens foram capturadas com uma câmera digital Basler A312FC (Basler Vision Technologies, Alemanha). Pelo menos cinco campos aleatórios foram escolhidos, com registro de, no mínimo, 500 espermatozoides. Os parâmetros cinéticos avaliados utilizando o software SCA™, versão 5.1 (Microoptics, S.L., Barcelona, Espanha), foram: motilidade total (MT, %), motilidade progressiva (MP, %), rápidos (RAP, %), linearidade (LIN, %), retilinearidade (STR, %) e índice de oscilação (WOB, %); velocidade curvilínea (VCL, $\mu\text{m/s}$), velocidade em linha reta (VSL, $\mu\text{m/s}$) e velocidade média da trajetória (VAP, $\mu\text{m/s}$); deslocamento lateral da cabeça (ALH, μm) e frequência de batimento cruzado (BCF; Hz).

Para citometria de fluxo, alíquotas (50 μL) de sêmen de cada grupo experimental foram distribuídas em microtubos (1,5mL), para cada uma das avaliações, aos quais foi adicionado 1,0mL de PBS, lentamente, através da parede do tubo, e homogeneizadas. Em seguida, realizou-se a centrifugação (500g/5min) para retirada de diluidor; após, o sobrenadante foi descartado e o pellet ressuspensão em 40 μL de PBS.

Para avaliação da iMPA, adicionaram-se à amostra 5 μL da solução de trabalho de FITC-PNA e 5 μL de IP. A amostra foi incubada por 5min em temperatura ambiente e, em seguida, procedeu-se à leitura. Células que apresentam marcação PNA-/IP- foram classificadas como portadoras de membranas acrossomal e plasmática intactas; células com marcação PNA+/IP-, membrana acrossomal reagida e plasmática intacta; células com marcação PNA-/IP+, membrana acrossomal intacta e plasmática lesionada; e células com marcação PNA+/IP+, membranas acrossomal e plasmática lesionadas.

Para análise do PMM, adicionaram-se 5 μL da solução de trabalho de JC-1 à amostra de sêmen. A seguir, as amostras foram incubadas por 5min em temperatura ambiente e procedeu-se à leitura. Células com peça intermediária coradas em laranja foram classificadas com alto potencial de membrana mitocondrial e células com peça intermediária coradas em verde, com baixo potencial de membrana mitocondrial.

Os níveis de iROS foram avaliados por meio da marcação com o fluorocromo CM-H₂DCFDA, sendo adicionados às amostras 5µL da solução de trabalho, as quais foram incubadas em banho-maria (37°C/30min). Em seguida, as amostras foram centrifugadas (200g/5min), o sobrenadante foi eliminado e o pellet ressuspense com 40µL de PBS. A seguir, adicionaram-se 5µL da solução de trabalho de IP, as amostras foram incubadas por mais 5min em temperatura ambiente e realizou-se a leitura. Os resultados foram expressos como percentual de células viáveis com altos níveis de ROS (DCFDA+), aquelas marcadas em verde fluorescente, ou células viáveis com baixa produção de ROS (DCFDA-), aquelas não marcadas ou com baixa intensidade de fluorescência.

O fluorocromo C11-BODIPY^{581/591} foi utilizado para avaliar a LPO nos espermatozoides, sendo adicionados à amostra 5µL de sua solução de trabalho, a qual foi incubada em banho-maria (37°C/30min). Em seguida, foi adicionado 1,0mL de PBS lentamente pela parede do tubo, a amostra foi homogeneizada e procedeu-se à centrifugação (200g/5min), para se eliminarem os restos de fluorocromos não ligados. O sobrenadante foi eliminado e o pellet ressuspense com 40µL de PBS. Em seguida, as amostras foram avaliadas: células coradas em laranja (C11-BODIPY-), não peroxidadas, e coradas em verde (C11-BODIPY+), peroxidadas.

A associação dos fluorocromos M540 e Yo-Pro-1 foi utilizada para avaliar a eMP dos espermatozoides. Para tanto, 5µL do Yo-Pro-1 foram adicionados na amostra e incubados em banho-maria (37°C/15min). A seguir, foram adicionados 5µL de M540, à amostra, que foi incubada por 5min em temperatura ambiente, e, logo após, procedeu-se à leitura, quando foram identificadas quatro populações: células viáveis com membrana estável (M540-/ Yo-Pro-1-); células viáveis com membrana desestabilizada (M540+/Yo-Pro-1); células não viáveis com membrana estável (M540-/Yo-Pro-1+) e células não viáveis com membrana desestabilizada (M540+/Yo-Pro-1+). Os resultados foram expressos como percentual de células viáveis com membranas estáveis (M540-) ou desestabilizadas (M540+).

As avaliações do sêmen foram realizadas utilizando-se aparelho ImageStream®X, versão Mark II (Amnis, Seattle, WA, EUA). As aquisições dos dados foram realizadas usando-

se o software INSPIRE®, versão 200.1.388.0 (Amnis, Seattle, WA, EUA). Os espermatozoides em foco foram separados mediante histograma do gradiente RMS x frequência normalizada, e as células únicas foram identificadas por meio de um gráfico de pontos da área x relação de aspecto, que foi verificado pelas imagens da galeria do canal campo claro. Todos os fluorocromos foram excitados por um laser de 488nm. Para a associação FITC-PNA+IP, a potência do laser utilizada foi de 55mW, o FITC-PNA foi detectado no canal 2 (505-560nm), e o IP no canal 5 (640-745nm); para o JC-1, a potência do laser foi de 130mW, e a detecção nos canais 2 e 4 (595-640nm); para o DCFDA+ IP, a potência do laser foi de 80mW, e os canais 2 e 5, respectivamente; no C11-BODIPY, a potência do laser foi de 60mW, e os canais 2 e 4; para a associação M540+ Yo-Pro-1, a potência do laser foi de 100mW, e a detecção nos canais 3 (560-595nm) e 2, respectivamente. Em cada uma das amostras, foram adquiridos 5000 eventos. O software IDEAS, versão 6.0 (Amnis, Seattle, WA, EUA), foi utilizado para análise dos dados. Todas as amostras foram analisadas e as populações divididas por meio de gráficos de pontos e histogramas, além da confirmação visual mediante as imagens das células.

Os dados obtidos foram analisados usando-se o procedimento Glimmix do SAS (Sistema para Windows, Versão 9.3; SAS Instituto Inc., Cary, NC, EUA), com metodologia de modelos lineares generalizados. Para MT, MP, RAP, LIN, STR, WOB, iMPA, PMM, iROS, LPO e eMP, utilizou-se uma distribuição binomial empregando-se a função logit link, e para VCL, VSL, VAP, ALH e BCF, a distribuição Gaussiana, utilizando-se a função link de identificação. As variáveis foram analisadas por meio de um modelo matemático que incluiu os efeitos fixos do tratamento. O método residual foi usado para calcular os graus denominadores de liberdade para aproximar os testes F nos modelos mistos. As comparações ortogonais foram utilizadas para determinar o efeito da miricetina (controle vs. miricetina). Todas as comparações estatísticas foram realizadas usando-se médias ajustadas pelo método dos quadrados mínimos, e os resultados descritos foram apresentados como quadrados mínimos \pm erro-padrão da média (SEM), com as distribuições apresentadas nas escalas originais para auxiliar na

interpretação. Diferenças com $P \leq 0,05$ foram consideradas significativas, e aquelas com $0,05 < P \leq 0,10$ foram consideradas tendências.

RESULTADOS

Na análise de cinética espermática, observou-se que MT, MP, VCL, VSL, LIN, STR, WOB e ALH não evidenciaram diferenças (Tab. 1; $P > 0,05$) ao se adicionar miricetina (1, 10, 100 e 1000nM) ao diluidor de congelamento de sêmen ovino, em relação ao grupo controle. Além disso, a miricetina 10nM reduziu o percentual de gametas rápidos (Tab. 1; $P \leq 0,05$), quando comparada à miricetina 1000nM. Foi observada também tendência do grupo controle ser superior ao miricetina 10nM para RAP e inferior para STR ($P = 0,07$ e $P = 0,08$, respectivamente). No entanto, a adição de miricetina 10nM reduziu a VAP, em relação ao grupo controle (Tab. 1; $P \leq 0,05$), com tendência a ser inferior aos grupos 100 e 1000nM ($P = 0,08$ e $P = 0,052$, respectivamente), enquanto a adição de miricetina nas concentrações de 10, 100 e 1000nM aumentou o BCF (Tab. 1; $P \leq 0,05$).

Da mesma forma, a adição de miricetina (1, 10, 100 e 1000nM) não demonstrou incremento no percentual de células com membranas plasmática e acrossomal intactas, nem provocou alterações no potencial de membrana mitocondrial e na estabilidade das membranas quando esse grupo foi comparado ao grupo controle (Tab. 2; $P > 0,05$).

Para a produção de ROS intracelular identificada pelo CM-H₂DCFDA, não foram detectadas diferenças entre os grupos (Tab. 2; $P > 0,05$). No entanto, foi observado aumento no percentual de células peroxidadas (Tab. 2; $P \leq 0,05$) no grupo tratado com miricetina 1000nM, quando comparado ao grupo controle, não diferindo dos demais grupos.

1 **Tabela 1.** Parâmetros cinéticos (CASA) de espermatozoides criopreservados de ovino com meio
 2 de congelamento suplementado ou não com miricetina. Dados são expressos como média dos
 3 quadrados mínimos e erro-padrão

	Controle	1nM	10nM	100nM	1000nM
MT (%)	49.2±3.5	47.1±3.5	50.8±3.5	46.6±3.5	52.5±3.5
MP (%)	25.1±2.8	22.8±2.7	27.2±2.8	25.3±2.8	27.8±2.9
RAP (%)	18.3±2.7 ^{abx}	15.0±2.5 ^{ab}	11.5±2.4 ^{by}	16.8±2.6 ^{ab}	20.8±2.8 ^a
VCL (µm/s)	92.8±3.4	87.3±3.4	84.9±3.4	88.0±3.4	89.5±3.4
VSL (µm/s)	51.6±2.2	48.7± 2.2	47.2±2.4	52.4±2.2	52.5±2.2
VAP (µm/s)	66.1 ± 2.4 ^a	61.3±2.4 ^{ab}	57.8±2.6 ^{by}	64.1±2.4 ^{abx}	65.0±2.4 ^{abx}
LIN (%)	56.0±1.9	56.0±1.9	58.7±1.8	59.6±1.8	58.7±1.8
STR (%)	78.5±1.5 ^y	79.3±1.5	82.2±1.4 ^x	81.8±1.4	80.6±1.5
WOB (%)	71.5±1.2	70.2±1.2	71.5±1.2	73.0±1.2	72.7±1.2
ALH (µm)	2.7±0.0	2.7±0.0	2.6±0.0	2.6±0.0	2.7±0.0
BCF (Hz)	13.1±0.1 ^b	13.3±0.1 ^{ab}	13.7±0.1 ^a	13.7±0.2 ^a	13.8±0.2 ^a

4 ^{a,b} Quando presentes, na mesma linha, indicam diferença significativa (P<0,05) entre os grupos.

5 ^{x,y} Quando presentes, na mesma linha, indicam tendência (0,05< P≤0,10) entre os grupos.

6

7

8

9

10

11 **Tabela 2.** Avaliação por citometria de fluxo da integridade de membranas plasmática e
 12 acrossomal, potencial de membrana mitocondrial, níveis de ROS intracelular, peroxidação
 13 lipídica e estabilidade de membrana de espermatozoides de carneiros após congelação em meio
 14 suplementado ou não com miricetina. Dados expressos como média dos quadrados mínimos e
 15 erro-padrão

	Controle	1nM	10nM	100nM	1000nM
PNA-/IP-	26.3±1.3	26.6±1.3	25.6±1.3	25.6±1.3	25.3±1.3
PNA-	68.3±2.1	69.7±2.0	70.7±2.0	67.2±2.1	68.8±2.1
APMM	8.7±1.3	11.5±1.5	10.3±1.4	8.5±1.3	10.0±1.4
DCFDA+	41.1±5.5	39.7±5.5	44.8±5.6	45.7±6.0	44.7±5.6
C11-BODIPY -	93.8±1.9 ^a	91.1±2.0 ^{ab}	89.3±2.2 ^{ab}	89.5±2.0 ^{ab}	87.2±2.2 ^b
M540-/ Yo-Pro-1-	5.7±2.0	8.2±2.3	10.3±2.5	9.6±2.4	9.6±2.4
M540+/ Yo-Pro-1-	93.8±2.1	91.6±2.2	91.8±2.4	89.6±2.5	90.1±2.4

16 Letras minúsculas diferentes, quando presentes, na mesma linha, indicam diferença significativa
 17 (P<0,05) entre os grupos.

18

19 DISCUSSÃO

20 O presente estudo amplia o conhecimento sobre os efeitos da suplementação do diluidor de
 21 congelação de sêmen ovino com o flavonoide miricetina. Os resultados obtidos demonstram que
 22 a adição de miricetina na concentração de 10nM provocou redução do percentual de
 23 espermatozoides rápidos, quando esse grupo foi comparado ao grupo 1000nM, aliado à
 24 tendência de ser inferior ao controle. Além disso, os valores de VAP foram inferiores quando
 25 esse grupo foi comparado ao controle, mostrando ainda tendência a ser inferior quando
 26 comparado aos grupos 100 e 1000nM, enquanto as concentrações de 10, 100 e 1000nM
 27 aumentaram o BCF. Não foram observadas quaisquer alterações no grupo 1nM.

28

29 Com o advento de sistemas computadorizados para análise do sêmen, além da avaliação objetiva
30 e precisa da motilidade, diversas variáveis cinéticas puderam ser mensuradas e seu valor
31 prognóstico sobre a fertilidade tem sido estudado (Gillan et al., 2008). Parâmetros cinéticos
32 como VAP, VCL e BCF têm sido demonstrados como possuindo alta correlação com a
33 fertilidade do sêmen congelado-descongelado de ovinos (Del Olmo et al., 2013).

34 Embora o BCF possua alta correlação com a fertilidade, quando associado à redução dos valores
35 de VAP e %RAP, como observado no presente estudo, pode-se sugerir o desenvolvimento de um
36 padrão cinético de espermatozoides hiperativados, evento caracterizado por movimentos
37 vigorosos e de baixa progressão, que só deve ocorrer no oviduto próximo ao momento da
38 ovulação (Suarez, 2008).

39 Portanto, apesar de haver fortes evidências de que a hiperativação seja requerida para penetração
40 na zona pelúcida (Suarez, 2008), a adição de 10nM de miricetina ao meio de congelação de
41 sêmen ovino pode não ser interessante, já que a hiperativação precoce no sêmen criopreservado
42 está relacionada a baixas taxas de fertilidade *in vivo* (Yániz et al., 2015).

43 Por outro lado, na concentração de 100nM, houve apenas o aumento no BCF, sem alterações nos
44 demais parâmetros cinéticos, nem na estrutura geral dos espermatozoides, o que pode ser
45 favorável à fertilização, uma vez que a migração e a penetração do espermatozoide no muco
46 cervical são favorecidas por elevados valores de BCF e LIN (Mortimer, 2000).

47 Os fitoestrógenos são compostos vegetais de ocorrência natural, que são estrutural e/ou
48 funcionalmente semelhantes aos estrógenos de mamíferos e aos seus metabólitos ativos, os quais
49 podem interagir com os receptores de estrógeno (REs) para promover e/ou inibir respostas
50 estrogênicas (Patisaul e Jefferson, 2010). Estudos prévios demonstraram a presença de REs em
51 espermatozoides de carneiros, distribuídos em distintos imunotipos de acordo com a localização
52 celular (Casao et al., 2011). Além disso, a incubação de espermatozoides ovinos com estradiol
53 não afetou a motilidade progressiva ou a integridade da membrana plasmática, entretanto
54 resultou em aumento no percentual de espermatozoides capacitados (Gimeno et al., 2016).

55 Como a miricetina foi relatada por atuar como um agonista para REs em espermatozoides
56 humanos e provocar alterações fisiológicas associadas à capacitação espermática (Aquila et al.,
57 2013), os resultados relatados no presente estudo poderiam ser explicados pelo pressuposto de
58 que a miricetina exerceu seus efeitos no sêmen ovino por meio de um mecanismo envolvendo a
59 sinalização dos REs. Mudanças na cinética espermática também poderiam estar relacionadas à
60 propriedade inibidora da miricetina sobre a atividade ATP-ase das bombas relacionadas ao

61 transporte de íons, tais como o íon Ca^{2+} (Thiyagarajah et al., 1991). No entanto, esses
62 mecanismos não foram testados neste experimento, o que evidencia a necessidade de serem
63 abordados em estudos futuros.

64 O uso da miricetina na maior concentração demonstrou ter efeitos adversos sobre os
65 espermatozoides ovinos pós-descongelção. Os resultados deste experimento, mostraram que a
66 suplementação do diluidor com 1000nM de miricetina provocou aumento no percentual de
67 espermatozoides peroxidados, enquanto as menores concentrações (1, 10 ou 100mM) não
68 afetaram a peroxidação lipídica. A miricetina tem sido relatada como sendo um potente
69 antioxidante ou pró-oxidante, dependendo das condições (Chobot e Hadacek, 2011). É digno de
70 nota que a atividade antioxidante ou a pró-oxidante de flavonoides dependem de sua estrutura, da
71 concentração e da fonte de radicais livres (Barreiros et al., 2006).

72 Devido à escassez de estudos anteriores relacionados com as ações da miricetina sobre a função
73 espermática *in vitro*, os resultados do efeito da miricetina não são intensamente discutidos.

74

75 **CONCLUSÃO**

76

77 Em conclusão, a suplementação do diluidor de criopreservação de sêmen ovino com 10 e 100nM
78 de miricetina afeta a cinética espermática sem provocar alterações na estrutura geral do gameta,
79 enquanto 1000nM de miricetina acarretam mudanças na cinética associadas a danos
80 peroxidativos.

81

82 **AGRADECIMENTOS**

83 Os autores agradecem à Facepe, à Capes e ao CNPq, pelo apoio financeiro.

84

85 **REFERÊNCIAS**

86 ADEOYA-OSIGUWA, S.A.; MARKOULAKI, S.; POCOOCK, V. et al. 17beta-Estradiol and
87 environmental estrogens significantly affect mammalian sperm function. Hum. Reprod., v.18,
88 p.100-107, 2003.

89 APRIOKUR, J.S. Pharmacology of free radicals and the impact of reactive oxygen species on
90 the testis. *J. Reprod. Infertil.*, v.14, p.158-172, 2013.

91 AQUILA, S.; SANTORO, M.; AMICIS, F. et al. Red wine consumption may affect sperm
92 biology: the effects of different concentrations of the phytoestrogen myricetin on human male
93 gamete function. *Mol. Reprod. Dev.*, v.80, p.155-165, 2013.

94 BARREIROS, A.L.B.S.; DAVID, J.M.; DAVID, J.P. Estresse oxidativo: relação entre geração
95 de espécies reativas e defesa do organismo. *Quím. Nova*, v.29, p.113-123, 2006.

96 CASAO, A.; GALLEGO, M.; PEREZ-PE, R.; MUINO-BLANCO, T.; CEBRIAN-PEREZ, J.
97 Immunolocalization of estrogen receptor beta in ejaculated ram spermatozoa. *Reprod. Dom.
98 Anim.*, v.46, Suppl.3, p.93, 2011.

99 CHOBOT, V.; HADACEK, F. Exploration of pro-oxidant and antioxidant activities of the
100 flavonoid myricetin. *Redox. Rep.*, v.16, p.242-247, 2011.

101 DEL OLMO, E.; BISBAL, A.; MAROTO-MORALES, A. et al. Fertility of cryopreserved ovine
102 semen is determined by sperm velocity. *Anim. Reprod. Sci.*, v.138, p.102-109, 2013.

103 FRASER, L.R.; BEYRET, E.; MILLIGAN, S.R.; ADEOYA-OSIGUWA, S.A. Effects of
104 estrogenic xenobiotics on human and mouse spermatozoa. *Hum. Reprod.*, v.21, p.1184-1193,
105 2006.

106 GILLAN, L.; KROETSCH, T.; MAXWELL, W.M.C.; EVANS, G. Assessment of in vitro sperm
107 characteristics in relation to fertility in dairy bulls. *Anim. Reprod. Sci.*, v.103, p.201-214, 2008

108 GIMENO, S.; DEL MOLINO, L.; CASAO, A. et al. Effect of 17-estradiol and progesterone on
109 ram sperm functionality. *Anim. Reprod. Sci.*, v.169, p.111, 2016.

110 MARTINEZ-SOTO, J.C.; DIOSHOURCADE, J.; GUTIÉRREZ-ADÁN, A. Effect of genistein
111 supplementation of thawing medium on characteristics of frozen human spermatozoa. *Asian. J.
112 Androl.*, v.12, p.431-441, 2010.

113 MORETTI, E.; MAZZI, L.; TERZUOLI, G. et al. Effect of quercetin, rutin, naringenin and
114 epicatechin on lipid peroxidation induced in human sperm. *Reprod. Toxicol.*, v.34, p.651-657,
115 2012.

116 MORTIMER, S.T. CASA—practical aspects. *J. Androl.*, v.21, p.515-524, 2000.

- 117 ONG, K.C.; KHOO, H.E. Biological Effects of Myricetin. *Gen. Pharmacol.*, v.29, p.121-126,
118 1997.
- 119 PATISAUL, H.B.; JEFFERSON, W. The pros and cons of phytoestrogens. *Front.*
120 *Neuroendocrinol.*, v.31, p.400-419, 2010.
- 121 SALAMON, S.; MAXWELL, W.M. Frozen storage of ram semen I. Processing, freezing,
122 thawing and fertility after cervical insemination. *Anim. Reprod. Sci.*, v.37, p.185-249, 1995.
- 123 SILVA, E.C.B.; ARRUDA, L.C.P.; SILVA, S.V. et al. High resveratrol or quercetin
124 concentrations reduce the oscillation index of frozen goat semen. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*,
125 v.68, p.1237-1243, 2016.
- 126 SILVA, S.V.; SOARES, A.T.; BATISTA, A.M. et al. In vitro and in vivo evaluation of ram
127 sperm frozen in tris egg yolk and supplemented with superoxide dismutase and reduced
128 glutathione. *Reprod. Dom. Anim.*, v.46, p.874-881, 2011.
- 129 SUAREZ, S.S. Regulation of sperm storage and movement in the mammalian oviduct. *Int. J.*
130 *Develop. Biol.*, v.52, p.455-462, 2008.
- 131 THIYAGARAJAH, P.; KUTTAN, S.C.; LIM, S.C. et al. Effect of myricetin and other
132 flavonoids on the liver plasma membrane Ca²⁺ pump. *Biochem. Pharmacol.*, v.41, p.669-675,
133 1991.
- 134 YÁNIZ, J.L., PALACÍN, I., VICENTE-FIEL, S. et al. Sperm population structure in high and
135 low field fertility rams. *Anim. Reprod. Sci.*, v.156, p.128-134, 2015.
- 136 YESTE, M. Sperm cryopreservation update: Cryodamage, markers, and factors affecting the
137 sperm freezability in pigs. *Theriogenology*, v.85, p.47-64, 2016.

138
139
140
141
142
143

5.2 Ação da miricetina na criopreservação de espermatozoides ovinos

[Action of myricetin in the cryopreservation of ovine spermatozoa]

L.C.P. Arruda^{1*}, R.A.J. Araújo Silva¹, F.C.C. Mergulhão¹, M.M. Monteiro¹, J.A.S. Costa¹, A.M. Batista¹, P.L.J. Monteiro Júnior², M.M.P. Guerra¹

¹Departamento de Medicina Veterinária, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brasil

²Alta Genetics do Brasil, Uberada, Minas Gerais, Brasil

RESUMO

Objetivou-se com esse estudo avaliar a capacidade da miricetina de proteger espermatozoides ovinos durante a congelação-descongelação, assim como a habilidade destes gametas em fertilizar oócitos *in vivo*. Cinco *pools* de sêmen, obtidos de quatro ovinos, foram submetidos à congelação em diluidor Tris-gema de ovo (5% de glicerol), suplementado com miricetina (0, 20, 30, 40, 100, 200, 300 e 400 nM) e submetidos à avaliação de cinética espermática, integridade das membranas plasmática e acrossomal, potencial de membrana mitocondrial, níveis de ROS intracelular, peroxidação lipídica e estabilidade de membrana, após descongelação (37 °C/30 s) e 2h de incubação (37 °C). Amostras do grupo controle (n=10) e do grupo 100 nM (n=10) de miricetina foram utilizadas para realização de teste de fertilidade *in vivo*. Não foi observado efeito do tratamento (P>0,05) para os parâmetros de cinética espermática e citometria de fluxo, também não foram observadas interações entre tratamento x tempo (P>0,05). Para ambos houve efeito do tempo de incubação, em alguns dos parâmetros avaliados. A MP, VCL, VSL, VAP, LIN, ALH, porcentual de células com membrana plasmática e acrossomal intactas, o estresse oxidativo e estabilidade de membrana foram reduzidos (P <0,05) durante a incubação em todos os grupos, independente do tratamento, enquanto que o BCF (P <0,05) aumentou em todos os grupos independente do tratamento. A taxa de prenhez de ovelhas inseminadas com sêmen tratado com 100 nM de miricetina foi de 50% (5/10), enquanto que a do grupo controle foi de 10% (1/10). Conclui-se que a adição de miricetina (20, 30, 40, 100, 200, 300 e 400 nM) no diluidor de congelação de sêmen de ovinos não provoca efeitos antioxidantes, mas *in vivo* a suplementação com 100 nM de miricetina melhora as taxas de prenhez.

Palavras-chave: sêmen, carneiros, flavonoides, congelação, inseminação artificial

ABSTRACT

The of this study was to evaluate the ability of myricetin to protect ovine spermatozoa during freezing-thawing, as well as the ability of these gametes to fertilize oocytes *in vivo*. Five semen *pools*, obtained from four rams, were diluted and frozen in Tris-egg yolk extender (5% glycerol) supplemented with myicetin (0, 20, 30, 40, 100, 200, 300 and 400 nM) and the samples were thawed (37 ° C / 30 sec) and incubation (37 ° C) for 2 h of incubation. Samples from the control group (n = 10) and from the 100 nM (n = 10) group of myicetin were used for *in vivo* fertility

testing. No treatment effect ($P > 0.05$) was observed for the parameters of sperm kinetics and flow cytometry evaluated ($P > 0.05$). Interactions between treatment and time ($P > 0.05$) were also not observed. For both, there was an effect of the incubation time, in some of the evaluated parameters. The MP, VCL, VSL, VAP, LIN, ALH, percentage of cells with intact plasma membrane and acrosomal, oxidative stress and membrane stability were reduced ($P < 0.05$) during incubation in all groups regardless of treatment, while BCF ($P < 0.05$) increased in all groups regardless of treatment. The pregnancy rate of semen inseminated with semen treated with 100 nM of myricetin was 50% (5/10), while that of the control group was 10% (1/10). It is concluded that the addition of myricetin (20, 30, 40, 100, 200, 300 and 400 nM) in the frozen diluent of ovine semen does not cause antioxidant effects, but *in vivo* supplementation with 100 nM myricetin improves rates of pregnancy.

Keywords: semen, ram, flavonoids, freezing, artificial insemination

1 INTRODUÇÃO

A miricetina é um membro da subclasse flavonol dos flavonoides, com atividade antioxidante, comumente encontrada em frutas, vegetais, nozes, bagas, chás e vinho tinto (HUANG et al., 2015). Apesar de sua atividade antioxidante, em diferentes tipos celulares, ser reportada em diversos estudos (ONG; KHOO, 1997; SELLAPPAN; AKOH, 2002, HUANG et al., 2010), é essencial esclarecer o seu papel na proteção dos espermatozoides, já que a atividade antioxidante ou a pró-oxidante de flavonoides dependem não somente de sua estrutura química, da concentração utilizada ou da capacidade de interação com as membranas, mas também da fonte de radicais livres sobre a qual irá atuar (BARREIROS et al., 2006).

Os flavonoides podem interagir com componentes lipídicos das membranas biológicas. As interações com lipídios são, na maioria dos casos, limitadas à região polar da bicamada lipídica. No entanto, a profundidade de penetração na membrana depende de sua estrutura. Devido à distribuição desses compostos na bicamada lipídica das membranas celulares, estes agentes podem proteger a membrana da oxidação (HENDRICH, 2006).

A miricetina parece não se incorporar facilmente à membrana, no entanto, tanto em lipossomas quanto na membrana de eritrócitos humanos ela apresenta a maior potência antioxidante quando comparada a outros flavonoides (HENDRICH, 2006). Esta habilidade que a miricetina tem de se incorporar à membrana, associada à sua potência antioxidante, pode ser eficiente na proteção dos espermatozoides contra os danos oxidativos ocasionados durante o processo de congelamento do sêmen.

É sabido que, durante o processamento do sêmen (congelamento-descongelamento), ocorrem danos oxidativos à membrana plasmática dos espermatozoides, ocasionados pelo desequilíbrio entre as espécies reativas ao oxigênio (ROS) e os antioxidantes (NASEER et al., 2015; AMIDI et al., 2016; SEIFI-JAMADI et al., 2016). Além disso, a oxidação é favorecida devido à grande

quantidade de ácidos graxos poli-insaturados presentes na membrana dessas células, os quais são os principais alvos de ataques das ROS (HAMMERSTEDT et al., 1993), resultando em danos que afetam a capacidade fertilizante das mesmas (CROSS; HANKS, 1991).

Assim, a capacidade fertilizante é afetada, devido à necessidade dos espermatozoides apresentarem membrana plasmática e acrossomal intactas para que o correto reconhecimento e singamia entre os gametas masculino e feminino ocorram (MOGIELNICKA-BRZOZOWSKA et al., 2015). Com isso, a suplementação dos meios utilizados para a congelação de sêmen, com substâncias capazes de evitar os danos ocasionados pelas ROS aos espermatozoides é uma alternativa, podendo melhorar a qualidade das amostras seminais após a descongelação (MAIA, 2006).

Portanto, esse estudo teve como objetivo avaliar o efeito da miricetina sobre os espermatozoides de ovinos durante a congelação-descongelação, assim como a capacidade destes gametas em fertilizar oócitos *in vivo*.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Reagentes

Todos os reagentes utilizados foram adquiridos da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA), com exceção dos fluorocromos CM-H₂DCFDA (5-(e-6)-carboxi-2',7'-diacetato de diclorodihidrofluoresceína), C11-BODIPY^{581/591} (4,4-difluoro-5-(4-fenil-1,3-butadienil)-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacene-3-ácido undecanoico) e YO-PRO[®]-1 iodide, que foram adquiridos da Molecular Probes (Life Technologies, Eugene, EUA), e do fosfato salino tamponado (PBS), adquirido da Gibco[®] (Life Technologies, EUA).

Soluções estoques dos fluorocromos foram preparadas da seguinte maneira: IP (25 mg/mL), JC-1 (5 mg/mL), CM-H₂DCFDA (0,5 mM), C11-BODIPY^{581/591} (2 mM), Merocianina 540 (M540: 54 mM) e Yo-Pro-1 (1 mM) em DMSO (dimetilsulfóxido) e FITC-conjugada ao *Peanut agglutinin* (FITC-PNA:1 mg/mL) em PBS; as soluções de trabalho: JC-1 (153 µM) e C11-BODIPY^{581/591} (0,4 mM) em DMSO e FITC-PNA (0,04 mg/mL), IP (0,5 mg/mL), CM-H₂DCFDA (50 µM), M540 (270 µM) e Yo-Pro-1 (2,5 µM) em PBS. Todas as soluções foram armazenadas a -20 °C.

O diluidor de criopreservação do sêmen (Tris-gema de ovo - TGO) foi composto de 3,605g de Tris, 2,024g de ácido cítrico, 1,188g de frutose, 100 mL de água destilada, 20% de

gema de ovo, 5% de glicerol, 100UI de penicilina e 50mg de estreptomicina, com pH 7,2. Antes da adição do glicerol e dos antimicrobianos, o diluidor foi centrifugado duas vezes (5500 g / 1h). Em seguida, o sobrenadante e o *pellet* foram descartados, aproveitando-se apenas a região intermediária. Após esse procedimento, o diluidor foi filtrado (0,45 micras e 0,22 micras). A solução estoque de miricetina (31,42 mM) foi preparada em DMSO. O diluidor foi fracionado e acrescido das concentrações de miricetina, e armazenados a -20 °C até o momento da utilização.

2.2 Experimento 1

2.2.1 Animais e colheita de sêmen

Todos os procedimentos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal Rural de Pernambuco (licença 047/2015 CEUA-UFRPE). Foram utilizados quatro ovinos, dois da raça Dorper e dois White Dorper, sexualmente maduros, com bom histórico de fertilidade, alojados em uma propriedade localizada no Município de Camaragibe, Pernambuco, Brasil (07°96'93''S, 34°99'52''W), submetidos a manejo intensivo, alimentados com concentrado comercial (500g/dia), capim-elefante (*Pennisetum purpureum*), sal mineral proteínado e água *ad libitum*. Os ejaculados foram obtidos pelo método de vagina artificial, na presença de uma fêmea como manequim. As colheitas de sêmen foram realizadas em dias alternados, totalizando cinco colheitas por animal (20 ejaculados).

2.2.2 Avaliação e congelamento de sêmen

Imediatamente após a colheita, os ejaculados foram submetidos a avaliações macroscópicas e microscópicas de forma subjetiva, em microscópio de contraste de fase (Olympus, Japão; 100x). Em seguida, os ejaculados que apresentaram motilidade $\geq 70\%$ foram aprovados e destinados à formação do *pool* (n=5) e cada *pool* foi submetido à análise de motilidade (subjetiva) e concentração espermática.

Após avaliação, o *pool* de sêmen foi diluído em TGO, suplementado de miricetina (0, 20, 30, 40, 100, 200, 300 e 400 nM), para concentração final de 200×10^6 espermatozoides/mL e encaminhado ao laboratório a temperatura ambiente, onde foram envasados em palhetas (0,25 mL) e congeladas em sistema automatizado (TK 3000® - TK Tecnologia em Congelamento Ltda., Brasil). O intervalo entre o momento da colheita até as amostras serem acondicionadas no sistema de congelamento foi de aproximadamente 2 h. A curva de refrigeração usada apresentava redução de temperatura de - 0,25 °C/min até atingir 5 °C, permanecendo nesta temperatura por

120 min (tempo de estabilização). Em seguida, foi iniciada a curva de congelação, com redução de $-20\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$, até atingir $-120\text{ }^{\circ}\text{C}$, momento em que as palhetas foram imersas e estocadas em nitrogênio líquido ($-196\text{ }^{\circ}\text{C}$).

2.2.3 Descongelamento e análise do sêmen

No momento das análises, duas palhetas de cada grupo experimental foram descongeladas em banho-maria ($37\text{ }^{\circ}\text{C}/30\text{ s}$), agrupadas e incubadas ($37\text{ }^{\circ}\text{C}/15\text{ min}$). Em seguida, as amostras foram diluídas (1:4) em TGO sem glicerol, incubadas ($37\text{ }^{\circ}\text{C}/5\text{ min}$) e destinadas às avaliações (0 h) e reavaliadas após 2h de incubação ($37\text{ }^{\circ}\text{C}$), quanto a cinética espermática, integridade de membranas plasmática e acrossomal (iMPA), potencial de membrana mitocondrial (PMM), níveis de ROS intracelular (iROS), peroxidação lipídica (LPO) e estabilidade de membrana (eMP).

- Sistema automatizado de análise espermática (CASA)

Para o estudo da cinética espermática, uma alíquota ($2,5\mu\text{L}$) de sêmen foi depositada em lâmina, coberta com lamínula ($18 \times 18\text{ mm}$), previamente aquecida ($37\text{ }^{\circ}\text{C}$), e avaliada em microscópio de contraste de fase (Eclipse 50i; Nikon, Japão; $100\times$). As imagens foram capturadas com uma câmera digital Basler A312FC (Basler Vision Technologies, Alemanha). Pelo menos cinco campos aleatórios foram escolhidos, com registro de, no mínimo, 500 espermatozoides. Os parâmetros cinéticos avaliados utilizando o software SCA™, versão 5.1 (Microptics, S.L., Barcelona, Espanha), foram: motilidade total (MT, %), motilidade progressiva (MP, %), linearidade (LIN, %) e retilinearidade (STR, %); velocidade curvilínea (VCL, $\mu\text{m}/\text{s}$), velocidade em linha reta (VSL, $\mu\text{m}/\text{s}$) e velocidade média da trajetória (VAP, $\mu\text{m}/\text{s}$); deslocamento lateral da cabeça (ALH, μm) e frequência de batimento cruzado (BCF; Hz).

- Citometria de fluxo

Para citometria de fluxo, duas alíquotas ($300\text{ }\mu\text{L}$) de sêmen de cada grupo experimental foram distribuídas em dois microtubos ($2,0\text{ mL}$), onde foram adicionados, lentamente, $1,7\text{ mL}$ de PBS, pela parede do tubo, e homogeneizadas. Em seguida, realizou-se a centrifugação ($100\text{ g}/5\text{ min}$) para retirada de diluidor; o sobrenadante foi descartado, os *pellets* foram agrupados e ressuspensos em $250\text{ }\mu\text{L}$ de PBS e distribuídos em alíquotas ($50\text{ }\mu\text{L}$) em cinco microtubos de $1,5\text{ mL}$, para realização de cada uma das análises.

a) Avaliação de integridade de membrana plasmática e acrossomal

Para avaliação da iMPA, adicionaram-se à amostra 5µL da solução de trabalho de FITC-PNA e 5µL de IP. A amostra foi incubada por 5min em temperatura ambiente e, em seguida, procedeu-se à leitura. Células que apresentam marcação PNA-/IP- foram classificadas como portadoras de membranas acrossomal e plasmática intactas; células com marcação PNA+/IP- foram classificadas como portadoras de membrana acrossomal reagida e plasmática intacta; células com marcação PNA-/IP+ foram classificadas como portadoras de membrana acrossomal intacta e plasmática lesionada; e células com marcação PNA+/IP+ foram classificadas como portadoras de membranas acrossomal e plasmática lesionadas.

b) Avaliação do potencial de membrana mitocondrial

Para análise do PMM, adicionaram-se 5µL da solução de trabalho de JC-1 à amostra de sêmen. A seguir, as amostras foram incubadas por 5min em temperatura ambiente e procedeu-se à leitura. Células com peça intermediária coradas em laranja foram classificadas como portadoras de alto potencial de membrana mitocondrial e células com peça intermediária coradas em verde foram classificadas como portadoras de baixo potencial de membrana mitocondrial.

c) Avaliação dos níveis de ROS intracelular

Os níveis de iROS foram avaliados por meio da marcação com o fluorocromo CM-H₂DCFDA, sendo adicionados às amostras 5µL da solução de trabalho, as quais foram incubadas em banho-maria (37 °C/30 min). A seguir, adicionaram-se 5µL da solução de trabalho de IP, as amostras foram incubadas por mais 5 min em temperatura ambiente, momento em que se realizou a leitura. Os resultados foram expressos como percentual de células viáveis com altos níveis de ROS (DCFDA+), aquelas marcadas em verde fluorescente, ou células viáveis com baixa produção de ROS (DCFDA-), aquelas não marcadas ou com baixa intensidade de fluorescência.

d) Avaliação da peroxidação lipídica

O fluorocromo C11-BODIPY^{581/591} foi utilizado para avaliar a LPO nos espermatozoides, sendo adicionados à amostra 5µL de sua solução de trabalho, a qual foi incubada em banho-maria (37 °C/30 min). Em seguida, foi adicionado 0,5mL de PBS lentamente pela parede do tubo, procedeu-se a homogeneização da amostra e posterior centrifugação (100 g/5 min), para eliminar os restos de fluorocromos não ligados. O sobrenadante foi eliminado e o *pellet*

ressuspensão em 40µL de PBS. Em seguida, as amostras foram avaliadas: células coradas em laranja (C11-BODIPY-) foram classificadas como não peroxidadas, e células coradas em verde (C11-BODIPY+) foram classificadas como peroxidadas.

e) Avaliação da estabilidade de membrana

A associação dos fluorocromos M540 e Yo-Pro-1 foi utilizada para avaliar a eMP dos espermatozoides. Para tanto, 5µL do Yo-Pro-1 foram adicionados na amostra e incubados em banho-maria (37 °C/15 min). A seguir, foram adicionados 5µL de M540, à amostra, que foi incubada por 5 min em temperatura ambiente, e, logo após, procedeu-se à leitura, quando foram identificadas quatro populações: células viáveis com membrana estável (M540-/ Yo-Pro-1-); células viáveis com membrana desestabilizada (M540+/Yo-Pro-1-); células não viáveis com membrana estável (M540-/Yo-Pro-1+) e células não viáveis com membrana desestabilizada (M540+/Yo-Pro-1+). Os resultados foram expressos como percentual de células viáveis com membranas estáveis (M540-) ou desestabilizadas (M540+).

f) ImageStream® X, versão Mark II

As avaliações do sêmen foram realizadas utilizando-se aparelho ImageStream® X, versão Mark II (Amnis, Seattle, WA, EUA). As aquisições dos dados foram realizadas usando-se o software INSPIRE®, versão 200.1.388.0 (Amnis, Seattle, WA, EUA). Os espermatozoides em foco foram separados mediante histograma do gradiente RMS x frequência normalizada, e as células únicas foram identificadas por meio de um gráfico de pontos da área x relação de aspecto, que foi verificado pelas imagens da galeria do canal campo claro. Todos os fluorocromos foram excitados por um laser de 488nm. Para a associação FITC-PNA+IP, a potência do laser utilizada foi de 55mW, o FITC-PNA foi detectado no canal 2 (505-560nm), e o IP no canal 5 (640-745nm); para o JC-1, a potência do laser foi de 130mW, e a detecção nos canais 2 e 4 (595-640nm); para o DCFDA+ IP, a potência do laser foi de 80mW, e os canais 2 e 5, respectivamente; no C11-BODIPY, a potência do laser foi de 60mW, e os canais 2 e 4; para a associação M540+ Yo-Pro-1, a potência do laser foi de 100mW, e a detecção nos canais 3 (560-595nm) e 2, respectivamente. Em cada uma das amostras, foram adquiridos 5000 eventos. O software IDEAS, versão 6.0 (Amnis, Seattle, WA, EUA), foi utilizado para análise dos dados. Todas as amostras foram analisadas e as populações divididas por meio de gráficos de pontos e histogramas, além da confirmação visual mediante as imagens das células.

2.3 Experimento 2

2.3.1 Inseminação artificial

Para realização do teste de fertilidade *in vivo* foi utilizada a técnica de inseminação artificial. Vinte ovelhas foram sincronizadas através da inserção de CIDR intravaginal (contendo 0,33g de progesterona – EAZI-BREED™ CIDR®, Zoetis, Brasil), por um período de 12 dias, seguido da administração de 300UI de Gonadotrofina Coriônica Equina (SINCRO ECG®, Ouro Fino, Brasil) no momento da retirada do CIDR.

As inseminações (intrauterinas) ocorreram entre 55 e 60 h após a retirada do CIDR, utilizando o método de laparoscopia (Laparoscópio ENDOVIEW, Germany). Para tanto, amostras de sêmen dos grupos controle (n=10) e 100 nM de miricetina (n=10), contendo 50×10^6 espermatozoides/mL, foram descongeladas (37 °C/30 s) e utilizadas para inseminar as vinte ovelhas. Devido à ausência de efeitos significativos, nos testes *in vitro* do experimento 1, a escolha da concentração de miricetina utilizada para o teste de fertilidade *in vivo* (IA) foi realizada com base nos resultados obtidos em trabalho prévio (ARRUDA et al., 2018).

Trinta dias após as inseminações, o diagnóstico de gestação foi realizado por ultrassonografia, utilizando aparelho Mindray (modelo DP20) com transdutor retal de 6MHz, por um técnico capacitado.

2.4 Análise estatística

O procedimento GLIMMIX do SAS (Sistema para Windows, Versão 9.3; SAS Instituto Inc., Cary, NC, EUA), foi utilizado com metodologia de modelos lineares generalizados. Para MT, MP, LIN, STR, PNA-/IP-, PNA-, APMM, DCFDA-, C11-BODIPY-, M540-/ Yo-Pro-1- e M540+/ Yo-Pro-1- foi empregada uma distribuição binomial usando a função de ligação logit e para VCL, VSL, VAP, ALH e BCF a distribuição Gaussiana, com a função de link de identificação. As variáveis foram analisadas através de modelo matemático que incluiu os efeitos fixos do tratamento e o método residual para calcular os graus denominadores de liberdade para aproximar os testes F nos modelos mistos.

Todas as comparações estatísticas foram feitas utilizando os meios ajustados pelo método de quadrados mínimos e os resultados escritos são apresentados como médias dos quadrados mínimos \pm erro padrão da média (SEM), com as distribuições mostradas nas escalas originais para auxiliar a interpretação. As diferenças com $P \leq 0,05$ foram consideradas significativas.

Na ausência de interação entre tratamento e tempo, o efeito da miricetina foi analisado e apresentado após a fusão dos tempos de avaliação, portanto, os resultados apresentados são a média entre os tempos 0 e 2h.

3 RESULTADOS

Os resultados das análises de cinética espermática estão sumarizados na Tabela 1. Não foi observado efeito do tratamento ($P>0,05$) para os parâmetros avaliados. Os parâmetros de MP, VCL, VSL, VAP, LIN e ALH apresentaram redução ($P<0,05$) ao longo do período de incubação, enquanto que o BCF aumentou ($P<0,05$), independente dos tratamentos. Interações entre tratamento x tempo não foram observadas ($P>0,05$).

Os resultados de citometria de fluxo estão apresentados na Tabela 2. Não houve efeito do tratamento ($P>0,05$) nos parâmetros estudados. O percentual de células com membrana plasmática e acrossomal intactas, o estresse oxidativo e a estabilidade de membrana reduziram ($P<0,05$) durante a incubação, independente do tratamento. Não houve interação tratamento x tempo ($P<0,05$) nos parâmetros avaliados.

Por outro lado, a taxa de prenhez de ovelhas inseminadas com sêmen tratado (100 nM de miricetina) foi de 50% (5/10), enquanto que a do grupo controle foi de 10% (1/10).

4 DISCUSSÃO

Estudos têm demonstrado os efeitos da miricetina sobre aspectos funcionais de espermatozoides humanos e ovinos (AQUILA et al., 2013; ARRUDA et al., 2018). No presente estudo, análises microscópicas e de citometria de fluxo foram realizadas para avaliar o impacto de várias concentrações de miricetina (20, 30, 40, 100, 200, 300 e 400 nM) sobre a cinemática, integridade das membranas plasmática e acrossomal, potencial de membrana mitocondrial, níveis de ROS intracelular, peroxidação lipídica e estabilidade de membrana de espermatozoides ovinos *in vitro*. Além de, teste de fertilidade *in vivo*, sendo, o primeiro trabalho a realizar este tipo de avaliação com o uso de miricetina.

Entretanto, os resultados obtidos não demonstraram resposta positiva dos espermatozoides ovinos ao tratamento com miricetina, no que se refere aos parâmetros de

cinemática, imediatamente e após 2 horas de incubação. A avaliação dessas propriedades dos espermatozoides é de grande importância para prever a fertilidade do sêmen, por meio da correlação da velocidade de deslocamento do gameta masculino com a fertilização do oócito *in vitro* e *in vivo* (COX et al., 2006). Por isso, é imprescindível, realizá-los após o período de incubação, onde apresentam maior correlação com a fertilidade que as avaliações imediatamente após o descongelamento (DEL OLMO et al., 2013).

Além disso, as análises de citometria de fluxo realizadas revelaram não haver vantagem em adicionar a miricetina ao sêmen ovino, em relação às variáveis de integridade ou estabilidade das membranas, ou ainda sobre os aspectos relacionados ao estresse oxidativo. Experimento similar foi conduzido por nosso grupo (ARRUDA et al., 2018), o qual demonstrou que 10 nM de miricetina reduziu o percentual de células rápidas e a VAP, e que 10, 100 e 1000 nM aumentaram o BCF, não havendo efeito benéfico em nenhum dos demais parâmetros avaliados imediatamente após a descongelação. Também, foi observado efeito adverso nos espermatozoides criopreservados com miricetina a 1000 nM, que provocou aumento no percentual de espermatozoides peroxidados. As diferenças encontradas na cinemática, entre os dois trabalhos do grupo, podem ter ocorrido devido a algumas modificações realizadas no protocolo. Como, por exemplo, o modo de preparação do diluidor de criopreservação do sêmen, diluição e incubação antes das análises no sistema CASA, processamento do sêmen do momento da coleta até a colocação das amostras na máquina para congelamento. Além, de terem sido utilizados animais de raça diferente, sobre condição de manejo e alimentação diferentes.

Em contraste, Aquila et al. (2013), testando o efeito fitoestrogênico da miricetina em espermatozoides de humanos (sêmen *in natura*), observaram que a exposição dessas células a baixas concentrações de miricetina (10, 100 e 1000 nM) é capaz de alterar a motilidade e viabilidade, assim como causar mudanças bioquímicas associadas à capacitação (efluxo de colesterol e fosforilação da tirosina). Além disso, nessas concentrações (10, 100 e 1000 nM), a miricetina pode aumentar a atividade da acrosina, bem como a utilização da glicose, demonstrando que através dos receptores de estrógeno a função espermática foi potencializada. Nesta sequência de descobertas, é evidente que, nas espécies humana e ovina, as diferentes concentrações de miricetina testadas conferem efeitos variados sobre os espermatozoides nas condições em que foram avaliadas.

A miricetina é uma substância que pode apresentar diversos efeitos sobre vários tipos de células (células cancerígenas, neurônios, células do fígado), como ação antioxidante (ONG;

KHOO, 1997) ou pró-oxidante (CHOBOT; HADACEK, 2011), fitoestrogênico (AQUILA et al., 2013); e inibidor da atividade de ATP-ase das bombas, implicadas no transporte iônico (THIYAGARAJAH et al., 1991), além de poder interagir com componentes lipídicos das membranas biológicas e conferir-lhes maior estabilidade (HENDRICH, 2006).

Existem poucos relatos na literatura no que diz respeito à utilização da miricetina no sêmen, para que os resultados possam ser discutidos profundamente. No entanto, a ausência de efeitos em nosso experimento *in vitro*, pode estar relacionada à proteção fisiológica conferida pelos antioxidantes encontrados no plasma seminal, o qual não foi retirado antes da congelação, sendo a utilização adicional da miricetina ineficaz, já que a produção de ROS proveniente do processo de congelação-descongelação não foi observada.

Elevados níveis de ROS poderiam afetar a integridade das membranas dos espermatozoides e aumentar a peroxidação lipídica, o que resultaria em perda da viabilidade, redução da motilidade e perda da integridade das membranas plasmática e acrossomal, levando à redução da qualidade dessas células e, conseqüentemente, de sua capacidade fertilizante. (ALVAREZ; STOREY, 1992, AITKEN et al., 1995; PERIS et al., 2007). No entanto, pesquisas utilizando flavonoides estruturalmente semelhantes à miricetina vem demonstrando efeitos parecidos. Seifi-Jamadi et al. (2016) não obtiveram sucesso com o uso de quercetina para melhorar os parâmetros espermáticos, como viabilidade e redução do estresse oxidativo, após congelação do sêmen de cavalos. Da mesma forma, Silva et al. (2016) não observaram efeito da quercetina sobre a integridade de membrana plasmática e acrossomal e do estresse oxidativo de espermatozoides de caprinos, após criopreservação. Estes atribuíram a ausência de efeito protetor desses antioxidantes às condições fisiológicas (baixos níveis de ROS) a que o sêmen estava exposto, visto que a ação desses compostos é visível apenas em situação de estresse extremo, as quais só são observadas após indução da oxidação, que não refletem o que ocorre durante a criopreservação.

Embora os testes *in vitro* não tenham demonstrado nenhum efeito sobre os espermatozoides, o teste de fertilidade *in vivo*, sinaliza para existência de um efeito positivo da adição de miricetina (100 nM) sobre a fertilidade, havendo a necessidade de se realizar novos estudos para confirmação e compreensão desse resultado. No estudo realizado por Arruda et al. (2018), a miricetina (100 nM) provocou aumento na frequência de batimento cruzado dos espermatozoides de ovinos após a congelação do sêmen ovino. Isto fez com que os autores levantassem a hipótese de que a adição de miricetina, nessa concentração, ao diluidor de

congelamento, pode ser favorável à fertilização, já que parâmetros como VAP, VCL e BCF já foram demonstrados como tendo alta correlação com a fertilidade do sêmen congelado-descongelado de ovinos (DEL OLMO et al., 2013).

Conforme os resultados de fertilidade, obtidos no presente trabalho, após a inseminação artificial, a miricetina (100 nM) melhora a taxa de fertilidade do sêmen criopreservado de carneiros, apresentando um futuro promissor como aditivo de diluentes de congelamento de sêmen ovino. Por conseguinte, esses resultados evidenciam que mais estudos *in vitro* e principalmente *in vivo*, utilizando outras concentrações de miricetina e um número maior de animais inseminados, são necessários para determinar o real impacto desse agente sobre a fertilidade do sêmen dessa espécie.

5 CONCLUSÃO

A adição de miricetina (20, 30, 40, 100, 200, 300 e 400 nM) no diluidor de congelamento de sêmen de ovinos não provoca efeitos na cinética e estrutura dos espermatozoides *in vitro*, mas 100 nM de miricetina melhora as taxas de fertilidade *in vivo*.

6 AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à Facepe, à Capes e ao CNPq, pelo apoio financeiro.

7 REFERÊNCIAS

- AITKEN, R.J. Free radicals, lipid peroxidation and sperm function. **Reproduction and Fertility and Development**, v. 7, p. 659-68, 1995.
- ALVAREZ, J.G.; STOREY, B.T. Evidence for increased lipid peroxidative damage and loss of superoxide dismutase activity as a model of sublethal cryodamage to human sperm during cryopreservation. **Journal of Andrology**, v. 13, p. 232–241, 1992.
- AMIDI, F.; PAZHOHAN, A.; NASHTAEI, M.S. et al. The role of 331 antioxidants in sperm freezing, a review. **Cell and Tissue Banking**, v. 17, n. 4, p.745-756, 2016.

AQUILA, S.; SANTORO, M.; AMICIS, F. et al. Red wine consumption may affect sperm biology: the effects of different concentrations of the phytoestrogen myricetin on human male gamete function. **Molecular Reproduction and Development**, v. 80, p. 155-165, 2013.

ARRUDA, L.CP.; ARAÚJO SILVA, R.A.J.; MONTEIRO M.M. et al. Avaliação *in vitro* do sêmen congelado de carneiros com diluidor suplementado com miricetina. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 70, n. 1, p.153-159, 2018.

BARREIROS, A.L.B.S.; DAVID, J.M.; DAVID, J.P. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Química Nova**, v. 29, p. 113-123, 2006.

COX, J.F.; ALFARO, V.; MONTENEGRO, V.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Computer-assisted analysis of sperm motion in goats and its relationship with sperm migration in cervical mucus. **Theriogenology**, v. 66, p. 860-867, 2006.

CHOBOT, V.; HADACEK, F. Exploration of pro-oxidant and antioxidant activities of the flavonoid myricetin. **Redox Report**, v. 16, p. 242-247, 2011.

CROSS, N.L.; HANKS, S.E. Effects of cryopreservation on human sperm acrosomes. **Human Reproduction**, v. 6, p. 1279-83, 1991.

DEL OLMO, E.; BISBAL, A.; MAROTO-MORALES, A. et al. Fertility of cryopreserved ovine semen is determined by sperm velocity. **Animal Reproduction Science**, v. 138, p. 102-109, 2013.

GRIVEAU, J.F.; LE LANNOU, D. Reactive oxygen species and human spermatozoa: physiology and pathology. **International Journal of Andrology**, v. 20, p. 61-69, 1997.

HENDRICH, A.B. Flavonoid-membrane interactions: possible consequences for biological effects of some polyphenolic compounds. **Acta Pharmacologica Sinica**, v. 26, n. 1, p. 27-40, 2006.

HUANG, H.; CHEN, A.Y.; ROJANASAKUL, Y. et al. Dietary compounds galangin and myricetin suppress ovarian cancer cell angiogenesis. **Journal of Functional Foods**, v. 15, p. 464-475, 2015.

MAIA, M.S., 2006. Sperm viability and reactive oxygen species (ROS) generation in RAM semen cryopreserved in extenders with sodium lauryl sulfate (OEP), Trolox-c and catalase. **Tese** (Doutorado em Medicina Veterinária). Faculdade de Medicina Veterinária e Ciência Animal, UNESP, Botucatu.

MOGIELNICKA-BRZOZOWSKA, M.; STRZEŻEK, R.; WASILEWSKA, K.; KORDAN, W. Prostatomes of canine seminal plasma – Zinc-binding ability and effects on motility characteristics and plasma membrane integrity of spermatozoa. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 50, p. 484-491, 2015.

- NASEER, Z.; AHMAD, E.; AKSOY, M. et al. Protective effect of cholesterol-loaded cyclodextrin pretreatment against hydrogen peroxide induced oxidative damage in ram sperm. **Cryobiology**, v. 71, p. 18-23, 2015.
- ONG, K.C.; KHOO, H.E. Biological Effects of Myricetin. **General Pharmacology**, v. 29, p. 121-126, 1997.
- PERIS, S.I.; BILODEAU, J.F.; DUFOUR, M.; BAILEY, J.L. Impact of cryopreservation and reactive oxygen species on DNA integrity, lipid peroxidation, and functional parameters in ram sperm. **Molecular Reproduction and Development**, v. 74, p. 878–92, 2007.
- SEIFI-JAMADI, A.; KOHRAM, H.; SHAHNEH, A.Z. et al. Quercetin Ameliorate Motility in Frozen-Thawed Turkmen Stallions Sperm. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 45, p. 73-77, 2016.
- SELLAPPAN, S.; AKOH, C.C. Flavonoids and Antioxidant Capacity of Georgia-Grown Vidalia Onions. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, p. 5338–5342, 2002.
- SILVA, E.C.B.; ARRUDA, L.C.P.; SILVA, S.V. et al. High resveratrol or quercetin concentrations reduce the oscillation index of frozen goat semen. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 68, p. 1237-1243, 2016.
- THIYAGARAJAH, P.; KUTTAN, S.C.; LIM, S.C. et al. Effect of myricetin and other flavonoids on the liver plasma membrane Ca²⁺ pump. **Biochemical Pharmacology**, v.41, p.669-675, 1991.

Tabela 1. Parâmetros cinéticos (CASA) de espermatozoides criopreservados de ovinos, em meio suplementado com diferentes concentrações de miricetina. Dados expressos como média dos quadrados mínimos \pm erro-padrão

	Controle	20 nM	30 nM	40 nM	100 nM	200 nM	300 nM	400 nM	Tratamento	Tempo	Interação
MT (%)	59,8 \pm 4,5	46,7 \pm 4,6	50,4 \pm 4,6	58,4 \pm 4,5	60,4 \pm 4,5	55,8 \pm 4,6	53,2 \pm 4,6	51,3 \pm 4,6	0,5311	0,2142	0,4064
MP (%)	40,7 \pm 5,2	30,3 \pm 4,8	31,5 \pm 4,9	35,0 \pm 5,0	37,9 \pm 5,1	31,3 \pm 4,9	26,7 \pm 4,7	27,6 \pm 4,8	0,6518	0,0029	0,0965
VCL ($\mu\text{m/s}$)	74,2 \pm 2,4	71,6 \pm 2,4	69,0 \pm 2,4	69,0 \pm 2,4	67,7 \pm 2,4	69,7 \pm 2,4	66,3 \pm 2,4	69,1 \pm 2,4	0,5396	<0,0001	0,9125
VSL ($\mu\text{m/s}$)	55,3 \pm 2,9	52,9 \pm 2,9	49,9 \pm 2,9	49,4 \pm 2,9	50,1 \pm 2,9	49,7 \pm 2,9	46,5 \pm 2,9	48,8 \pm 2,9	0,6960	<0,0001	0,1173
VAP ($\mu\text{m/s}$)	62,5 \pm 2,1	59,9 \pm 2,1	57,1 \pm 2,1	56,5 \pm 2,1	56,5 \pm 2,1	57,0 \pm 2,1	53,3 \pm 2,1	56,5 \pm 2,1	0,2113	<0,0001	0,4006
LIN (%)	74,9 \pm 4,5	74,1 \pm 4,5	73,3 \pm 4,6	72,0 \pm 4,6	73,5 \pm 4,6	71,3 \pm 4,7	70,2 \pm 4,7	71,0 \pm 4,7	0,9979	0,0359	0,2608
STR (%)	88,2 \pm 2,6	87,9 \pm 2,7	87,4 \pm 2,7	87,0 \pm 2,8	88,4 \pm 2,6	87,0 \pm 2,8	87,0 \pm 2,8	86,7 \pm 2,8	0,9997	0,7719	0,9738
ALH (μm)	1,9 \pm 0,1	1,9 \pm 0,1	1,8 \pm 0,1	1,9 \pm 0,1	1,9 \pm 0,1	1,9 \pm 0,1	2,0 \pm 0,1	1,9 \pm 0,1	0,9707	0,0044	0,6688
BCF (Hz)	10,9 \pm 0,4	10,8 \pm 0,4	11,5 \pm 0,4	11,1 \pm 0,4	10,9 \pm 0,4	11,2 \pm 0,4	11,5 \pm 0,4	11,2 \pm 0,5	0,9213	<0,0001	0,3030

MT- Motilidade total; MP- motilidade progressiva; VCL -velocidade curvilínea, VSL- velocidade em linha reta; VAP- velocidade média da trajetória; LIN-linearidade; STR- retilinearidade; ALH- deslocamento lateral da cabeça e BCF- frequência de batimento cruzado

Tabela 2. Avaliação da integridade de membranas plasmática e acrossomal, potencial de membrana mitocondrial, níveis de ROS intracelular, peroxidação lipídica e estabilidade de membrana de espermatozoides de carneiros (citometria de fluxo), após congelação em meio suplementado com diferentes concentrações de miricetina. Dados expressos como média dos quadrados mínimos \pm erro-padrão

	Controle	20 nM	30 nM	40 nM	100 nM	200 nM	300 nM	400 Nm	Tratamento	Tempo	Interação
PNA-/IP-	19,2 \pm 2,5	17,4 \pm 2,4	20,0 \pm 2,5	17,5 \pm 2,4	18,2 \pm 2,5	15,7 \pm 2,3	14,1 \pm 2,2	15,5 \pm 2,6	0,7730	<0,0001	0,4109
PNA-	64,5 \pm 3,7	62,8 \pm 3,7	65,5 \pm 3,7	61,1 \pm 3,7	63,1 \pm 3,7	61,1 \pm 3,8	62,2 \pm 3,7	61,8 \pm 3,7	0,9675	0,0055	0,8156
APMM	10,3 \pm 1,7	9,3 \pm 1,6	11,1 \pm 1,8	9,5 \pm 1,6	10,8 \pm 1,8	10,2 \pm 1,7	9,5 \pm 1,6	9,5 \pm 1,6	0,9924	0,1751	0,5422
DCFDA-	98,1 \pm 1,7	99,2 \pm 0,9	99,5 \pm 1,0	98,8 \pm 1,3	98,9 \pm 1,5	94,3 \pm 2,6	96,2 \pm 2,1	98,3 \pm 1,5	0,5185	0,0335	0,8889
C11-BODIPY-	79,6 \pm 7,0	82,9 \pm 6,5	81,6 \pm 6,5	86,2 \pm 5,8	87,7 \pm 5,6	86,7 \pm 5,9	85,2 \pm 6,0	90,7 \pm 5,3	0,9645	0,4681	0,4679
M540-/ Yo-Pro-1-	5,8 \pm 4,2	5,5 \pm 3,3	3,8 \pm 2,2	5,3 \pm 2,5	2,8 \pm 1,8	3,2 \pm 1,8	2,6 \pm 1,7	2,2 \pm 1,5	0,7505	0,0012	0,6982
M540+/ Yo-Pro-1-	93,6 \pm 4,2	94,2 \pm 3,3	95,9 \pm 2,2	94,5 \pm 2,5	97,3 \pm 1,8	96,4 \pm 1,9	97,3 \pm 1,7	97,5 \pm 1,6	0,7438	0,0013	0,6930

PNA-/IP-: percentual de células com membrana plasmática e acrossomal intactas; PNA-: percentual de células com acrossoma intacto; APMM: percentual de células com alto potencial de membrana mitocondrial; DCFDA-: percentual de células com baixos níveis de ROS; C11-BODIPY-: percentual de células sem peroxidação lipídica; M540-/ Yo-Pro-1-: percentual de células viáveis com membrana estável e M540+/ Yo-Pro-1-: percentual de células viáveis com membrana desestabilizada.

6 CONCLUSÃO

A adição de miricetina ao meio de criopreservação de sêmen ovino, não apresenta efeito antioxidante sobre os espermatozoides, sendo observado efeito pró-oxidante na maior concentração testada (1000 nM). Apesar da ausência de efeitos antioxidantes alterações na cinética foram observadas, no entanto, estas mudanças podem ter ocorrido através de outras vias de atuação da miricetina, como por exemplo, através da via estrogênica ou inibidora que ATP-ases que não foram avaliadas nesse estudo.

No estudo *in vivo*, a miricetina (100 nM) melhora os índices de fertilidade de ovelhas inseminadas com sêmen congelado via laparoscopia. Mais estudos são necessários para determinar qual via de atuação da miricetina, no sêmen ovino, provoca alterações na cinética e melhora as taxas de prenhez após a inseminação.

7 ANEXOS

7.1 Normas para submissão de artigo no periódico Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia:



ISSN 1678-4162 versão
online

INSTRUÇÕES AOS AUTORES

- [Política Editorial](#)
- [Reprodução de artigos publicados](#)
- [Orientações Gerais](#)
- [Comitê de Ética](#)
- [Tipos de artigos aceitos para publicação](#)
- [Preparação dos textos para publicação](#)
- [Formatação do texto](#)
- [Seções de um artigo](#)
- [Taxas de submissão e de publicação](#)
- [Recursos e diligências](#)

Atualizado: 09/08/2016

Política Editorial

O periódico **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia** (Brazilian Journal of Veterinary and Animal Science), ISSN 0102-0935 (impresso) e 1678-4162 (on-line), é editado pela FEPMVZ Editora, CNPJ: 16.629.388/0001-24, e destina-se à publicação de artigos científicos sobre temas de medicina veterinária, zootecnia, tecnologia e inspeção de produtos de origem animal, aquacultura e áreas afins.

Os artigos encaminhados para publicação são submetidos à aprovação do Corpo Editorial, com assessoria de especialistas da área (relatores). Os artigos cujos textos necessitarem de revisões ou correções serão devolvidos aos autores. Os aceitos para publicação tornam-se propriedade do **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia (ABMVZ)** citado como **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.** Os autores são responsáveis pelos conceitos e informações neles contidos. São imprescindíveis originalidade, ineditismo e destinação exclusiva ao **ABMVZ**.

Reprodução de artigos publicados

A reprodução de qualquer artigo publicado é permitida desde que seja corretamente referenciado. Não é permitido o uso comercial dos resultados.

A submissão e tramitação dos artigos é feita exclusivamente on-line, no endereço eletrônico
<<http://mc04.manuscriptcentral.com/abmvz-scielo>>.

Não serão fornecidas separatas. Os artigos encontram-se disponíveis no endereço www.scielo.br/abmvz.

Orientações Gerais

- Toda a tramitação dos artigos é feita exclusivamente pelo Sistema de publicação online do Scielo – ScholarOne, no endereço <http://mc04.manuscriptcentral.com/abmvz-scielo> sendo necessário o cadastramento no mesmo.
- Leia "[PASSO A PASSO – SISTEMA DE SUBMISSÃO DE ARTIGOS POR INTERMÉDIO DO SCHOLARONE](#)"
- Toda a comunicação entre os diversos autores do processo de avaliação e de publicação (autores, revisores e editores) será feita apenas de forma eletrônica pelo Sistema, sendo que o autor responsável pelo artigo será informado automaticamente por e-mail sobre qualquer mudança de status do mesmo.
- Fotografias, desenhos e gravuras devem ser inseridos no texto e quando solicitados pela equipe de editoração também devem ser enviados, em separado, em arquivo com extensão JPG, em alta qualidade (mínimo 300dpi), zipado, inserido em "Figure or Image" (Step 6).
- É de exclusiva responsabilidade de quem submete o artigo certificar-se de que cada um dos autores tenha conhecimento e concorde com a inclusão de seu nome no texto submetido.
- O **ABMVZ** comunicará a cada um dos inscritos, por meio de correspondência eletrônica, a participação no artigo. Caso um dos produtores do texto não concorde em participar como autor, o artigo será considerado como desistência de um dos autores e sua tramitação encerrada.

Comitê de Ética

É indispensável anexar cópia, em arquivo PDF, do Certificado de Aprovação do Projeto da pesquisa que originou o artigo, expedido pelo CEUA (Comitê de Ética no Uso de Animais) de sua Instituição, em atendimento à Lei 11794/2008. O documento deve ser anexado em "Ethics Committee" (Step 6). Esclarecemos que o número do Certificado de Aprovação do Projeto deve ser mencionado no campo Material e Métodos.

Tipos de artigos aceitos para publicação

Artigo científico

É o relato completo de um trabalho experimental. Baseia-se na premissa de que os resultados são posteriores ao planejamento da pesquisa.

Seções do texto: Título (português e inglês), Autores e Afiliação (somente na "Title Page" – Step 6), Resumo, Abstract, Introdução, Material e Métodos, Resultados, Discussão (ou Resultados e Discussão), Conclusões, Agradecimentos (quando houver) e Referências.

O número de páginas não deve exceder a 15, incluindo tabelas, figuras e Referências.

O número de Referências não deve exceder a 30.

Relato de caso

Contempla principalmente as áreas médicas em que o resultado é anterior ao interesse de sua divulgação ou a ocorrência dos resultados não é planejada.

Seções do texto: Título (português e inglês), Autores e Afiliação (somente na "Title Page" - Step 6), Resumo, Abstract, Introdução, Casuística, Discussão e Conclusões (quando pertinentes), Agradecimentos (quando houver) e Referências.

O número de páginas não deve exceder a dez, incluindo tabelas e figuras.

O número de Referências não deve exceder a 12.

Comunicação

É o relato sucinto de resultados parciais de um trabalho experimental digno de publicação, embora insuficiente ou inconsistente para constituir um artigo científico.

Seções do texto: Título (português e inglês), Autores e Afiliação (somente na "Title Page" - Step 6). Deve ser compacto, sem distinção das seções do texto especificadas para "Artigo científico", embora seguindo àquela ordem. Quando a Comunicação for redigida em português deve conter um "Abstract" e quando redigida em inglês deve conter um "Resumo".

O número de páginas não deve exceder a oito, incluindo tabelas e figuras.

O número de Referências não deve exceder a 12.

Preparação dos textos para publicação

Os artigos devem ser redigidos em português ou inglês, na

forma impessoal.

Formatação do texto

- O texto **NÃO** deve conter subitens em nenhuma das seções do artigo, deve ser apresentado em arquivo Microsoft Word e anexado como "Main Document" (Step 6), no formato A4, com margem de 3cm (superior, inferior, direita e esquerda), na fonte Times New Roman, no tamanho 12 e no espaçamento de entrelinhas 1,5, em todas as páginas e seções do artigo (do título às referências), **com linhas numeradas**.
- Não usar rodapé. Referências a empresas e produtos, por exemplo, devem vir, obrigatoriamente, entre parêntesis no corpo do texto na seguinte ordem: nome do produto, substância, empresa e país.

Seções de um artigo

Título: Em português e em inglês. Deve contemplar a essência do artigo e não ultrapassar 50 palavras.

Autores e Filiação: Os nomes dos autores são colocados abaixo do título, com identificação da instituição a qual pertencem. O autor e o seu e-mail para correspondência devem ser indicados com asterisco somente no "Title Page" (Step 6), em arquivo Word.

Resumo e Abstract: Deve ser o mesmo apresentado no cadastro contendo até 200 palavras em um só parágrafo. Não repetir o título e não acrescentar revisão de literatura. Incluir os principais resultados numéricos, citando-os sem explicá-los, quando for o caso. Cada frase deve conter uma informação completa.

Palavras-chave e Keywords: No máximo cinco e no mínimo duas*.

* na submissão usar somente o Keyword (Step 2) e no corpo do artigo constar tanto keyword (inglês) quanto palavra-chave (português), independente do idioma em que o artigo for submetido.

Introdução: Explanação concisa na qual os problemas serão estabelecidos, bem como a pertinência, a relevância e os objetivos do trabalho. Deve conter poucas referências, o suficiente para balizá-la.

Material e Métodos: Citar o desenho experimental, o material envolvido, a descrição dos métodos usados ou referenciar corretamente os métodos já publicados. Nos trabalhos que

envolvam animais e/ou organismos geneticamente modificados **deverão constar obrigatoriamente o número do Certificado de Aprovação do CEUA.** (verificar o Item Comitê de Ética).

Resultados: Apresentar clara e objetivamente os resultados encontrados.

Tabela. Conjunto de dados alfanuméricos ordenados em linhas e colunas. Usar linhas horizontais na separação dos cabeçalhos e no final da tabela. O título da tabela recebe inicialmente a palavra Tabela, seguida pelo número de ordem em algarismo arábico e ponto (ex.: Tabela 1.). No texto, a tabela deve ser referida como Tab seguida de ponto e do número de ordem (ex.: Tab. 1), mesmo quando referir-se a várias tabelas (ex.: Tab. 1, 2 e 3). Pode ser apresentada em espaçamento simples e fonte de tamanho menor que 12 (o menor tamanho aceito é oito). A legenda da Tabela deve conter apenas o indispensável para o seu entendimento. As tabelas devem ser obrigatoriamente inseridas no corpo do texto de preferência após a sua primeira citação.

Figura. Compreende qualquer ilustração que apresente linhas e pontos: desenho, fotografia, gráfico, fluxograma, esquema etc. A legenda recebe inicialmente a palavra Figura, seguida do número de ordem em algarismo arábico e ponto (ex.: Figura 1.) e é citada no texto como Fig seguida de ponto e do número de ordem (ex.: Fig.1), mesmo se citar mais de uma figura (ex.: Fig. 1, 2 e 3). Além de inseridas no corpo do texto, fotografias e desenhos devem também ser enviados no formato JPG com alta qualidade, em um arquivo zipado, anexado no campo próprio de submissão, na tela de registro do artigo. As figuras devem ser obrigatoriamente inseridas no corpo do texto de preferência após a sua primeira citação.

Nota: Toda tabela e/ou figura que já tenha sido publicada deve conter, abaixo da legenda, informação sobre a fonte (autor, autorização de uso, data) e a correspondente referência deve figurar nas Referências.

Discussão: Discutir somente os resultados obtidos no trabalho. (Obs.: As seções Resultados e Discussão poderão ser apresentadas em conjunto a juízo do autor, sem prejudicar qualquer uma das partes).

Conclusões: As conclusões devem apoiar-se nos resultados da pesquisa executada e serem apresentadas de forma objetiva, **SEM** revisão de literatura, discussão, repetição de resultados e especulações.

Agradecimentos: Não obrigatório. Devem ser concisamente expressados.

Referências: As referências devem ser relacionadas em ordem alfabética, dando-se preferência a artigos publicados em revistas nacionais e internacionais, indexadas. Livros e teses devem ser referenciados o mínimo possível, portanto, somente

quando indispensáveis. São adotadas as normas gerais da ABNT, **adaptadas** para o ABMVZ, conforme exemplos:

Como referenciar:

1. Citações no texto

A indicação da fonte entre parênteses sucede à citação para evitar interrupção na sequência do texto, conforme exemplos:

- autoria única: (Silva, 1971) ou Silva (1971); (Anuário..., 1987/88) ou Anuário... (1987/88);
- dois autores: (Lopes e Moreno, 1974) ou Lopes e Moreno (1974);
- mais de dois autores: (Ferguson *et al.*, 1979) ou Ferguson *et al.* (1979);
- mais de um artigo citado: Dunne (1967); Silva (1971); Ferguson *et al.* (1979) ou (Dunne, 1967; Silva, 1971; Ferguson *et al.*, 1979), sempre em ordem cronológica ascendente e alfabética de autores para artigos do mesmo ano.

Citação de citação. Todo esforço deve ser empreendido para se consultar o documento original. Em situações excepcionais pode-se reproduzir a informação já citada por outros autores. No texto, citar o sobrenome do autor do documento não consultado com o ano de publicação, seguido da expressão **citado por** e o sobrenome do autor e ano do documento consultado. Nas Referências deve-se incluir apenas a fonte consultada.

Comunicação pessoal. Não faz parte das Referências. Na citação coloca-se o sobrenome do autor, a data da comunicação, nome da Instituição à qual o autor é vinculado.

2. Periódicos (até quatro autores citar todos. Acima de quatro autores citar três autores *et al.*):

ANUÁRIO ESTATÍSTICO DO BRASIL. v.48, p.351, 1987-88.

FERGUSON, J.A.; REEVES, W.C.; HARDY, J.L. Studies on immunity to alphaviruses in foals. *Am. J. Vet. Res.*, v.40, p.5-10, 1979.

HOLENWEGER, J.A.; TAGLE, R.; WASERMAN, A. *et al.* Anestesia general del canino. *Not. Med. Vet.*, n.1, p.13-20, 1984.

3. Publicação avulsa (até quatro autores citar todos. Acima de quatro autores citar três autores *et al.*):

DUNNE, H.W. (Ed). Enfermedades del cerdo. México: UTEHA, 1967. 981p.

LOPES, C.A.M.; MORENO, G. Aspectos bacteriológicos de ostras, mariscos e mexilhões. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE

MEDICINA VETERINÁRIA, 14., 1974, São Paulo. *Anais...* São Paulo: [s.n.] 1974. p.97. (Resumo).

MORRIL, C.C. Infecciones por clostrídios. In: DUNNE, H.W. (Ed). *Enfermedades del cerdo*. México: UTEHA, 1967. p.400-415.

NUTRIENT requirements of swine. 6.ed. Washington: National Academy of Sciences, 1968. 69p.

SOUZA, C.F.A. *Produtividade, qualidade e rendimentos de carcaça e de carne em bovinos de corte*. 1999. 44f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

4. Documentos eletrônicos (até quatro autores citar todos. Acima de quatro autores citar três autores *et al.*):

QUALITY food from animals for a global market. Washington: Association of American Veterinary Medical College, 1995. Disponível em: <<http://www.org/critca16.htm>>. Acessado em: 27 abr. 2000.

JONHNSON, T. Indigenous people are now more combative, organized. Miami Herald, 1994. Disponível em: <<http://www.summit.fiu.edu/MiamiHerld-Summit-RelatedArticles/>>. Acessado em: 5 dez. 1994.

Taxas de submissão e de publicação

- **Taxa de submissão:** A taxa de submissão de R\$50,00 deverá ser paga por meio de boleto bancário emitido pelo sistema eletrônico do Conveniar <http://conveniar.fepmvz.com.br/eventos/#servicos> (necessário preencher cadastro). Somente artigos com taxa paga de submissão serão avaliados.
Caso a taxa não seja quitada em até 30 dias será considerado como desistência do autor.
- **Taxa de publicação:** A taxa de publicação de R\$150,00 por página, por ocasião da prova final do artigo. A taxa de publicação deverá ser paga por meio de depósito bancário, cujos dados serão fornecidos na aprovação do artigo.
OBS.: Quando os dados para a nota fiscal forem diferentes dos dados do autor de contato deve ser enviado um e-mail para abmvz.artigo@abmvz.org.br comunicando tal necessidade.

SOMENTE PARA ARTIGOS INTERNACIONAIS

- **Submission and Publication fee.** The publication fee is of US\$100,00 (one hundred dollars) per page, and US\$50,00 (fifty dollars) for manuscript submission and will be billed to the corresponding author at the final proof of the article. The publication fee must be paid through a bank slip issued by the electronic article submission system. When requesting the bank slip the

author will inform the data to be intle invoice issuance.

Recursos e diligências

- No caso de o autor encaminhar resposta às diligências solicitadas pelo ABMVZ ou documento de recurso o mesmo deverá ser anexado em arquivo Word, no item "Justification" (Step 6), e também enviado por e-mail, aos cuidados do Comitê Editorial, para abmvz.artigo@abmvz.org.br.
- No caso de artigo não aceito, se o autor julgar pertinente encaminhar recurso o mesmo deve ser feito pelo e-mail abmvz.artigo@abmvz.org.br.

7.2 Parecer da Comissão de ética no uso de animais – CEUA:



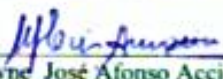
Universidade Federal Rural de Pernambuco
Rua Dom Manoel de Medeiros, s/n,
Dois Irmãos - CEP: 52171-900 - Recife/PE

Comissão de ética no uso de animais - CEUA

Licença para o uso de animais em experimentação e/ou ensino

O Comitê de ética no uso de animais CEUA da Universidade Federal Rural de Pernambuco, no uso de suas atribuições, autoriza a execução do projeto discriminado abaixo. O presente projeto também se encontra de acordo com as normas vigentes no Brasil, especialmente a Lei 11794/2008.

Número da licença	047/2015
Número do processo	23082.002570/2015
Data de emissão da licença	17 de Abril de 2015
Título do Projeto	Uso de antioxidantes Flavonoide e não flavonoide em meios de criopreservação de sêmen ovino.
Finalidade (Ensino, Pesquisa, Extensão)	Pesquisa
Responsável pela execução do projeto	Maria Madalena Pessoa Guerra
Colaboradores	Lúcia Cristina Pereira Arruda; Robespierre Augusto Joaquim Araújo Silva; André Mariano Batista; Igor Henrique de Azevedo Valença Nery; Wilton Arruda Gomes; Ellen Cordeiro Bento da Silva; Helder Melo de Souza.
Tipo de animal e quantidade total autorizada	Ovino; total de 126 animais.


Prof. Dra. Marleyne José Afonso Accioly Lins Amorim
(coordenadora da CEUA-UFRPE)



Prof. Dr. Marleyne Amorim
Coordenadora CEUA